

**T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PC 12 HÜCRELERİNDE AMİLOİD B'NİN
OLUŞTURDUĞU KASPAZ-8 AKTİVASYONUNA
ERİTROPOETİNİN ETKİSİ**

SERVET KIZILDAĞ

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

İZMİR

2004

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PC 12 HÜCRELERİNDE AMİLOİD B'NİN
OLUŞTURDUĞU KASPAZ-8 AKTİVASYONUNA
ERİTROPOETİNİN ETKİSİ

SERVET KIZILDAĞ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
PROF. DR. MERAL FADİLOĞLU

İZMİR

2004


**“PC12 HÜCRELERİNDE AMİLOİD β 'NİN OLUŞTURDUĞU KASPAZ-8
AKTİVASYONUNA ERİTROPOETİNİN ETKİSİ”** isimli bu tez 14.06.2004 tarihinde
tarafımızdan değerlendirilerek Başarılı \ Başarısız bulunmuştur.

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Meral Fadıoğlu

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Biyokimya A.B.D.



Jüri Üyesi

Prof. Dr. Banu Önvural

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Biyokimya A.B.D.

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Meral Sakızlı

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Biltan Ersöz

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi

Biyokimya A.B.D.

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Pınar Tuncel

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Biyokimya A.B.D.

TABLO LİSTESİ	1
RESİM LİSTESİ	1
ŞEKİL LİSTESİ	2
KISALTMALAR	4
1 ÖZET	6
2 SUMMARY	7
3 GİRİŞ VE AMAÇ	8
4 GENEL BİLGİLER	11
4.1 ALZHEİMER HASTALIĞI:	12
4.1.1 Amiloid Prekürsör Proteini.....	13
4.1.2 A β Peptidi.....	15
4.1.3 Amiloid Kaskad Hipotezi	17
4.1.4 Tau Hipotezi	17
4.2 ALZHEİMER HASTALIĞI GELİŞİMİNDE ROL OYNAYAN FAKTÖRLER	18
4.2.1 Yaş	18
4.2.2 Cinsiyet.....	18
4.2.3 Apo E.....	19
4.2.4 İnflamasyon	19
4.2.5 Serbest Radikaller ve Oksidatif Hasar	19
4.2.6 AH ve Genetik Faktörler	20
4.3 HÜCRE ÖLÜMÜ MEKANİZMALARI	20
4.3.1 Nekroz	20
4.3.2 Apoptoz	21
4.3.2.1 Apoptozun Düzenlenmesi ve Kaspazlar	23
4.3.2.2 Apoptotik Ölüm Yolakları	25
4.4 NÖRONAL HÜCRE ÖLÜMÜ	27
4.5 OKSİDATİF HASARIN ARACILIK ETTİĞİ NÖRON ÖLÜMÜ	28
4.6 ALZHEİMER HASTALIĞINA FARMAKOLOJİK TEDAVİ YAKLAŞIMLARI	29
4.6.1 A β Oluşumunu Etkileyen Ajanlar	29
4.6.2 Asetilkolinesteraz İnhibitörleri	30
4.6.3 A β Çökmesini İnhibe Eden Ajanlar: Metal Şelatörler ve β -Tabaka Kırıcılar ...	30
4.6.4 Antioksidanlar	30
4.6.5 Antiinflamatuvar Ajanlar.....	31

4.6.6	Östrojen	31
4.6.7	Aß ile Aşılama.....	31
4.6.8	Olası Bir Nöroprotektif Ajan: Eritropoetin	31
4.6.8.1	Eritropoetin Nöroprotektif Özellikleri	32
4.6.8.2	Eritropoetin Protaktif Etkisinin Mekanizmaları	33
5	GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	36
5.1	KULLANILAN GEREÇLER, KİMYASAL MADDELER VE SOLÜSYONLAR	37
5.1.1	Kullanılan Gereçler.....	37
5.1.2	Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	39
5.1.3	Kullanılan Solüsyonlar	41
5.2	YÖNTEMLER.....	43
5.2.1	Hücre Kültürü	43
5.2.1.1	Hücre kültür kaplarının poli-D-lizin ile kaplanması	44
5.2.1.2	Deney koşulları	45
5.2.2	Hücre canlılık testleri.....	50
5.2.2.1	Trypan mavisi canlılık testi.....	50
5.2.2.2	MTT canlılık testi	50
5.2.3	Apostain immünofloresan boyama.....	51
5.2.4	Western Blotting Yöntemi.....	53
5.2.4.1	Protein izolasyonu.....	53
5.2.4.2	Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE).....	55
5.2.4.3	Blotlama.....	56
5.2.5	Nitrik Oksit ölçüm yöntemi	57
5.2.5.1	Nitrat Ölçüm Basamakları	58
5.2.5.2	Nitrit Ölçüm Basamakları	58
5.2.5.3	Hesaplama ve Değerlendirme	59
5.2.6	İstatistiksel analiz	59
6	BULGULAR.....	60
6.1	CANLILIK TESTLERİNİN SONUÇLARI	61
6.2	APOSTAIN İMMÜNOFLORESAN BOYAMA YÖNTEMİ SONUÇLARI	64
6.3	WESTERN BLOTTING YÖNTEMİ SONUÇLARI	66
6.4	NİTRİK OKSİT ANALİZİ SONUÇLARI.....	66
7	TARTIŞMA.....	68
8	KAYNAKLAR	78

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Nekroz ve apoptoz arasındaki farklar. (34).....23

RESİM LİSTESİ

Resim 1: PC 12 hücrelerinin faz-kontrast mikroskoptaki görüntüsü, (x100)44

Resim 2: Apostain immünofloresan boyama yöntemi uygulanmış bazal koşuldaki PC12 hücrelerinin epifloresan mikroskopta, Kromo 83006 UV/DAP/FITC/ TXRD bilgisayar kontrollü filtre seti kullanılarak x1000 büyütme ile elde edilen görüntüsü.....64

Resim 3: Apostain immünofloresan boyama yöntemi uygulanmış 20µM Aβ(25-35) eklenmiş koşuldaki PC12 hücrelerinin epifloresan mikroskopta, Kromo 83006 UV/DAP/FITC/ TXRD bilgisayar kontrollü filtre seti kullanılarak x1000 büyütme ile elde edilen görüntüsü.....65

Resim 4 : Apostain immünofloresan boyama yöntemi uygulanmış 20µM Aβ(25-35) ve 2.0 U/ml Epo eklenmiş koşuldaki PC12 hücrelerinin epifloresan mikroskopta, Kromo 83006 UV/DAP/FITC/ TXRD bilgisayar kontrollü filtre seti kullanılarak x1000 büyütme ile elde edilen görüntüsü.65

Resim 5: Kaspaz-8'in aktivasyonu sonucu ayrılan 20 kDa'luk altbiriminin, Kaspaz-8 antikoru ile problelanması ile elde edilen western blot sonuçları.....66

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1:** Amiloid prekürsör protein, A β peptidi dizisi ve sekretazların kesim bölgeleri.(20)..16
- Şekil 2:** A β peptidi dizisi, sekretazların kesim bölgeleri ve ailesel AH'nda sık karşılaşılan mutasyonlar. (21).....17
- Şekil 3:** Apoptoz Yolağı. (46)26
- Şekil 4:** Epo'in sinyal mekanizması.....34
- Şekil 5:** Blotting aşamasında jel ve membran yerleşimi57
- Şekil 6 :** Artan konsantrasyonlarda A β (25-35) fragmanı ilavesinin 24 saat sonunda PC12 hücrelerinin canlılığına etkisinin Trypan mavisi ile boyama yöntemi ile değerlendirilmesi. Hiç A β (25-35) fragmanı ilave edilmemiş koşulun hücre canlılığı ile karşılaştırıldığında, A β (25-35) fragmanı ilave edilmiş koşulların hücre canlılığındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.(p<0.05)61
- Şekil 7 :** Artan konsantrasyonlarda A β (25-35) fragmanı ilavesinin 24 saat sonunda PC12 hücrelerinin canlılığına etkisinin MTT redüksiyonu yöntemi ile değerlendirilmesi. Hiç A β (25-35) fragmanı ilave edilmemiş koşulun hücre canlılığı ile karşılaştırıldığında, A β (25-35) fragmanı ilave edilmiş koşulların hücre canlılığındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (p<0.05)61
- Şekil 8 :** 20 μ M konsantrasyonda A β (25-35) fragmanı ilave edilmesinin 0.,24.,48. ve 72. saatlerin sonunda PC12 hücrelerinin canlılığına etkisinin Trypan mavisi ile boyama yöntemi ile değerlendirilmesi. 0. saatte A β (25-35) fragmanı ilave edilmiş koşulun hücre canlılığı ile karşılaştırıldığında diğer koşulların hücre canlılığındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (p<0.05)62
- Şekil 9 :** 20 μ M konsantrasyonda A β (25-35) fragmanı ilave edilmesinin 0.,24.,48. ve 72. saatlerin sonunda PC12 hücrelerinin canlılığına etkisinin MTT redüksiyonu yöntemi ile değerlendirilmesi. 0. saatte A β (25-35) fragmanı ilave edilmiş koşulun hücre canlılığı ile karşılaştırıldığında diğer koşulların hücre canlılığındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (p<0.05)62
- Şekil 10 :** 20 μ M konsantrasyonda A β (25-35) fragmanı ilave edilmeden önceki 24 saat boyunca değişik dozlarda EPO ilave edilmesinin PC12 hücrelerinin canlılığına etkisinin Trypan mavisi ile boyama yöntemi ile değerlendirilmesi. EPO ilave edilmemiş ve 20 μ M konsantrasyonda A β (25-35) fragmanı ilave edilmiş koşulun hücre canlılığı ile

karşılaştırıldığında, 0.1 ve 0.5 U/ml EPO ilave edilmiş koşulların hücre canlılığındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. ($p>0.05$) Ancak 1 ve 2 U/ml EPO ilave edilmiş koşulların hücre canlılığındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ($p<0.05$)63

Şekil 11 : 20 μ M konsantrasyonda A β (25-35) fragmanı ilave edilmeden önceki 24 saat boyunca değişik dozlarda EPO ilave edilmesinin PC12 hücrelerinin canlılığına etkisinin MTT redüksiyonu yöntemi ile değerlendirilmesi. EPO ilave edilmemiş ve 20 μ M konsantrasyonda A β (25-35) fragmanı ilave edilmiş koşulun hücre canlılığı ile karşılaştırıldığında, 0.1 ve 0.5 U/ml EPO ilave edilmiş koşulların hücre canlılığındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. ($p>0.05$) Ancak 1 ve 2 U/ml EPO ilave edilmiş koşulların hücre canlılığındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ($p<0.05$)63

Şekil 12 :Değişik koşullar uygulanmış PC12 hücrelerinin apostain immünofloresan boyama yöntemi ile analiz edilen apoptotik hücre yüzdeleri. Hiçbir ajan eklenmemiş bazal koşullardaki PC12 hücrelerinde apoptotik hücre oranı $\%3.3\pm 1.4$ olarak bulunmuştur. Hiç EPO ilave edilmemiş ve 20 μ M konsantrasyonda A β (25-35) fragmanı ilave edilmiş koşulun apoptotik hücre yüzdesi ile kıyaslandığında, 0.1 ve 0.5 U/ml EPO ilave edilen koşulların apoptotik hücre yüzdesindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir. ($p>0.05$) Ancak 1 ve 2 U/ml EPO ilave edilen koşulların apoptotik hücre yüzdesindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ($p<0.05$)64

Şekil 13: Değişik koşullar uygulanmış PC12 hücre kültür ortamlarının nitrat düzeyi analiz sonuçları. Hiçbir ajan eklenmeyen koşula göre diğer koşullar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. ($p>0.05$)66

Şekil 14: Değişik koşullar uygulanmış PC12 hücre kültür ortamlarının nitrit düzeyi analiz sonuçları. Hiçbir ajan eklenmeyen koşula göre diğer koşullar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. ($p>0.05$)67

Şekil 15: Değişik koşullar uygulanmış PC12 hücre kültür ortamlarının NO düzeyi analiz sonuçları. Hiçbir ajan eklenmeyen koşula göre diğer koşullar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. ($p>0.05$)67

KISALTMALAR

- MSS :Merkezi Sinir Sistemi
- AH :Alzheimer Hastalığı
- A β :Amiloid beta peptidi
- APP :Amiloid Prekürsör Proteini
- Epo :Eritropoetin
- DED : “Death Effector Domain”
- DNA: Deoksiribonükleik asit
- PC12 :Sıçan feokromasitoma hücre hattı
- MTT :3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
- NFT: :Nörofibriler yumak
- APLP1:Amiloid prekürsör-benzeri protein 1
- APLP2:Amiloid prekürsör-benzeri protein 2
- CTF :C-ucu fragmanı
- KPI :Serin proteaz inhibitörü
- PHF :Çiftli helikal filamanlar
- PS1 :Presenilin 1
- PS2 :Presenilin 2
- apoE :Apolipoprotein E
- LRP :Düşük dansiteli lipoprotein ilişkili protein
- PCD :Programlanmış hücre ölümü
- TNF :Tümör Nekrozis Faktör
- TNFR :Tümör Nekrozis Faktör Reseptör
- FADD : “Fas-Associated Death Domain”

DISC : “Death Inducing Signaling Complex”

Apaf-1 :Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1

AIF :Apoptoz indükleyici faktör

ALS :Amyotrofik Lateral Sklerozis

SOD :Süperoksid dismutaz

OH : Hidroksil radikali

NO : Nitrik oksid

ONOO-: Peroksinitrit

ROS :Reaktif oksijen türleri

α -Ttp : α -tokoferol taşıyıcı protein

AIDS: Kazanılmış immün defekt hastalığı

TRAIL: Tümör nekrozis faktör ilişkili apoptoz indükleyici ligand

IAP's: Apoptoz proteinleri inhibitörü

JAK-2: “Janus” tirozin kinaz -2

MAPK: Mitojenle aktive olan protein kinaz

PI3-K: Fosfo inozitol 3-kinaz

STAT-5: “transcription factor signal transducers and activators of transcription-5”

BDGF: Beyin kaynaklı büyüme faktörü

VEGF: Damar endoteli kaynaklı büyüme faktörü

NF κ B: Nükleer faktör κ B

GABA: γ - amino bütirik asit

AChE: Asetil kolin esteraz

NSAID: Nonsteroid antiinflamatuvar ilaç

EAE: Deneysel otoimmün ansefalopati

NMDA: N-metil D-aspartat

1 ÖZET

PC12 HÜCRELERİNDE AMİLOİD β 'NİN OLUŞTURDUĞU KASPAZ-8 AKTİVASYONUNA ERİTROPOETİNİN ETKİSİ

Amaç: Alzheimer Hastalığı, merkezi sinir sisteminin dejenerasyonu ve nöron kaybı ile karakterize olan nörodejeneratif bir hastalıktır. Alzheimer Hastalığı'nın nöropatolojisinde hücre dışı amiloid plaklarının ve hücre içi nörofibriler yumakların gözlemlendiği yaygın nöronal yıkım söz konusudur. Nöron ölümünün apoptozis yolu ile gerçekleştiği bilinmektedir. Bu nedenle hücre kültürü deney modellerinde nöronları apoptotik ölümden koruyabilecek ajanların test edilmesinin, Alzheimer Hastalığı için uygulanabilecek etkin tedavi yöntemlerinin bulunmasına katkısı olabilir. Eritropoetin değişik hasar modellerinde nöroprotektif etkisi gösterilmiştir. Amiloid β peptidinin neden olduğu nöron ölümü modelinde eritropoetin uygulanmasının, kaspaz kaskadının aktivasyonu, nöronal apoptoz ve oksidatif stres üzerine etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmış ve planlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler: Bu tez çalışmasında apoptotik nöron ölümü modeli sıçan feokromasitoma hücre hattı ortamına amiloid β peptidi (25-35) fragmanı uygulanarak oluşturuldu. Nöronal hasarın ve eritropoetin olası koruyucu etkinliğinin değerlendirilmesinde 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromür redüksiyonu ve trypan mavisini ile boyama testleri kullanıldı. Apoptotik hücre ölümünün değerlendirilmesinde ise apostain immünofloresan boyama yöntemi kullanıldı. Kaspaz-8 aktivasyonu western blotting yöntemi ile değerlendirildi. Hücre kültür ortamının nitrik oksit ölçümleri ise "Nitric oxide colorimetrik assay" kiti kullanılarak yapıldı.

Bulgular: Sıçan feokromasitoma hücre hattında, amiloid β peptidinin neden olduğu apoptotik nöron ölümü modelinde eritropoetin uygulanması hücre canlılığını koruyucu etki göstermiştir. Apostain immünofloresan boyama yöntemi ise apoptotik hücre ölümünü azaltıcı etkisi olduğunu göstermiştir. Western blotting yöntemi ise, eritropoetin uygulanmasının apoptotik hücre ölümünün araçlarından biri olan kaspaz-8 aktivasyonunu azaltıcı etkisi olduğunu göstermiştir. Gruplar arasında nitrik oksit düzeyleri açısından anlamlı farklılık gözlenmemiştir.

Sonuçlar: Eritropoetin'in, amiloid β peptidinin neden olduğu nörotoksitede hücre canlılığını koruyucu etkisinin olduğu ve apoptozu başlatıcı rol oynayan kaspaz-8 aktivasyonunu azaltarak nöronal apoptozu azalttığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar bize eritropoetin Alzheimer Hastalığı'nda gözlenen amiloid β nörotoksitesinin sağaltımında yer alabileceğini düşündürmüştür.

2 SUMMARY

THE EFFECT OF ERYTHROPOIETIN ON CASPASE-8 ACTIVATION INDUCED BY AMYLOID β IN PC12 CELLS

Aim of the study : Alzheimer's Disease is a neurodegenerative disorder characterized by central nervous system degeneration and neuronal loss. The neuropathological hallmark of Alzheimer's Disease includes widespread neuronal loss, extracellular amyloid plaques and intracellular neurofibrillary tangles. Evidence suggests that this neuronal loss occurs through apoptosis. Therefore, determining the agents that may prevent neuronal death in experimental cell culture models in vitro might contribute to establish effective treatment strategies for Alzheimer's Disease. It has been shown that in various models erythropoietin has a neuroprotective effect. Evaluation of the impact of erythropoietin administration on caspase cascade, neuronal apoptosis and the oxidative stress in the neuronal death model induced by amyloid β peptide is aimed and planned.

Material and methods : In this study, apoptotic neuronal death was induced in PC12 cells by the administration of amyloid $\beta_{(25-35)}$ peptide fragment. In evaluating levels of neuronal injury and the potential protective effect of erythropoietin, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide reduction cell viability assay and trypan blue exclusion were performed. Apostain immunofluorescein staining has been used for the evaluation of apoptotic cell death. Caspase-8 activation was evaluated by western blotting method. Nitric oxide levels of cell culture medium is measured using nitric oxide colorimetric assay kit.

Results : Erythropoietin administration was shown to protective effect on cell viability in amyloid β induced neuronal cell death. Apostain immunofluorescein staining revealed that erythropoietin had an anti-apoptotic effect in this experimental model. A reduction in caspase-8 activation was observed after erythropoietin administration. No significant difference was observed in nitric oxide levels between experimental groups.

Conclusion: Erythropoietin was demonstrated to have a cell protective effect in neurotoxicity induced by amyloid β peptide and to diminish the apoptosis by decreasing activation of caspase-8 which promotes apoptosis. This results suggest that erythropoietin may have a role in management of amyloid β peptide neurotoxicity in Alzheimer's Disease.

3 GİRİŞ ve AMAÇ

Merkezi sinir sisteminin (MSS) kronik dejeneratif hastalıklarında, nöron ölümü ile birlikte başlıca gri cevher hasarı, miyelin kaybı ve oligodendrosit ölümü ile birlikte beyaz cevher etkilenmesi gözlenmektedir. MSS'nin dejenerasyonu ve nöron kaybı ile karakterize olan ve progresif demansların büyük bir kısmının nedeni olan Alzheimer Hastalığı (AH), batı ülkelerinde ölüm nedenleri arasında dördüncü sırada yer almakta ve tüm dünyada 20 milyonun üzerinde kişiyi etkilemektedir. AH, yaş ile ilişkili, progresif ilerleme gösteren, hafıza kaybı ile sonuçlanan geri dönüşsüz beyin hastalığıdır ve 65 yaş üzerinde gözlenen demansın en sık nedenidir. 65 yaşından sonraki her 5 yılda prevalans ikiye katlanır ve 85 yaş üzeri en riskli gruptur. Özellikle gelişmiş batı ülkelerinde yaşam süresinde ve hastalığın görülme sıklığında ortaya çıkan artış AH'nı toplum ve aileler için sosyal ve ekonomik problem haline getirmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 4 milyondan fazla AH olgusu bulunduğu ve bu hastaların sağlık ve bakım harcamalarının yılda 100 milyar doların üzerinde olduğu bildirilmektedir. Bu nedenle AH'nda nöron ölümünün kesin mekanizmalarının anlaşılması, nöron kaybını önleyebilecek ajanların belirlenmesi ve dolayısı ile hastalıktan koruyucu ve tedavi edici yöntemlerin bulunması en önemli hedef haline gelmiştir.(1)

MSS'nin nörodejeneratif hastalıklarında; genetik ve çevresel faktörler, inflamatuvar süreçler, glutamat ve amiloid β peptidi ($A\beta$) toksisitesi, reaktif nitrojen ve oksijen ürünlerinin oluşumu gibi patofizyolojik süreçler rol oynamaktadır ve bu süreçler sinir sistemi hücrelerinin ölümü ile sonuçlanmaktadır.(2) Gerçekte hücre ölümü bitki ve hayvanlarda gelişim sürecinin değişmez bir parçasıdır ve erişkinlikte de devam eder. Hücre ölümü için iki yol vardır: nekroz ve apoptoz. Nekroz, zararlı bir uyarının etkisi ile hücrelerin gruplar halinde ölmesine neden olan patolojik bir durumdur. Apoptoz ise hücre içi veya hücre dışı uyarımlarla başlatılan programlanmış hücre ölüm mekanizmasıdır. AH'nda gözlenen hücre ölümünün apoptoz yolu ile gerçekleştiği bildirilmektedir.(3) AH'nın nöropatolojisinde hücre dışı amiloid plaklarının ve hücre içi nörofibriler yumakların gözlendiği yaygın nöronal yıkım sözkonusudur. Amiloid plaklar Amiloid Prekürsör Proteini'nin (APP) yıkım ürünü olan $A\beta$ 'nden oluşmaktadır. Bu $A\beta$ tarafından oluşturulan nöronal apoptozun hastalığın patogenezinde önemli bir yer tuttuğu bildirilmektedir.(4,5) Bu verilerin ışığında deneysel AH modelleri oluşturulurken hasar yaratıcı etken yada ajan olarak $A\beta$ kullanılmaktadır.(6,7)

Oksidatif hasar, AH ile ilişkilendirilen önemli bir patolojik mekanizmadır. Oksidatif stres tanımı; dokunun antioksidan kapasitesinden daha fazla oksidan üretiminin olduğu durumda, moleküler hasar görmesidir ki bu durum, hücrel oksidanların üretiminin artması ile birlikte , antioksidanların konsantrasyonlarındaki azalmadır. AH'nda süperoksit, hidrojen peroksit, nitrik oksit ve peroksinitrit gibi reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin aşırı üretildiği ve hücrel hasara yol açarak apoptoz sinyaline aracılık ettiği bildirilmektedir. Aβ'nin kültüre edilmiş insan hipokampal ve kortikal nöronlarında oksidatif hasar yaratarak, sinyal yollarının işleyişinde modifikasyonlara, biyokimyasal ve yapısal anormalliklere neden olarak apoptotik hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir.(8,9)

Memeli hücrelerindeki apoptotik hücre ölümünden büyük ölçüde kaspazlar olarak adlandırılan proteaz ailesi sorumludur. Apoptozda gözlenen morfolojik değişikliklerin biyokimyasal temelinde direkt veya indirekt olarak kaspazların rolü vardır. Kaspazlar apoptotik sinyal yollarında başlatıcı veya efektör olarak görev alırlar. Kaspaz-2, 8, 9 ve 10 apoptozu başlatıcı , kaspaz-3, 6 ve7 ise efektör rol oynar. (10,11)

AH'nın neden olduğu demans tablolarında gri cevher hasarını ve nöron kaybını azaltan ajanlar tedaviye katkıda bulunabilir.(3) Eritropoetin (Epo), hematopoetik bir büyüme faktörü-hormon-sitokindir ve çeşitli hücre hasarı modellerinde nöronları koruyucu etkisi farklı çalışmalarla gösterilmiştir.(12,13,14) Hücre kültürü modellerinde yapılan araştırmalarda, Epo'in etkinliğini hangi mekanizmalar ile gösterdiğinin aydınlatılması, in vivo hastalık modellerinde koruyucu ve/veya tedavi edici ajan olarak denenmesini gündeme getirebilir.

Nöron kaybına neden olan mekanizmaların anlaşılmasında ve tedavi edici potansiyeli bulunan ajanların test edilmesinde bu hastalıkların hücre kültür modelleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Deneysel hastalık modellerinde, seçilen ajanın koruyucu ve/veya tedavi edici etkinliğinin araştırılması için deney hayvanları modellerinden önce hücre kültürü modellerinin kullanılması daha uygundur. Hücre kültürü çalışmalarının avantajı çalışma kolaylığı, yeniden üretilme oranının yüksek olması ve sistem değişkenlerinin kontrol altında tutulabilmesidir.

Bu tez çalışmasında, apoptotik nöron ölümünün meydana geldiği deneysel AH modeli, kültüre edilmiş sıçan feokromasitoma (PC12) hücrelerine Aβ uygulanarak oluşturulmuştur. Bu deneysel modelde Epo'in olası nöroprotektif etkisini gösterebileceği sinyal ileti yollarından birinin araştırılması amaçlanmıştır. Apoptotik nöron ölümü mekanizmasında,

kaspaz kaskadının tetiklenmesi için “ Death Effector Domain” (DED) aracılığı ile ilk sinyali alan ve kaskadın en başında yer alan kaspaz-8’in aktivasyonunun değerlendirilmesi planlanmıştır. Yine bu deneysel AH modelinde nitrik oksit düzeyi ölçümü yapılarak meydana gelen oksidatif stres hakkında bir değerlendirme yapılması amaçlanmış ve planlanmıştır.



4 GENEL BİLGİLER

4.1 ALZHEİMER HASTALIĞI:	12
4.1.1 Amiloid Prekürsör Proteini.....	13
4.1.2 A β Peptidi.....	14
4.1.3 Amiloid Kaskad Hipotezi	17
4.1.4 Tau Hipotezi	17
4.2 ALZHEİMER HASTALIĞI GELİŞİMİNDE ROL OYNAYAN FAKTÖRLER	18
4.2.1 Yaş	18
4.2.2 Cinsiyet.....	18
4.2.3 Apo E.....	19
4.2.4 İnflamasyon	19
4.2.5 Serbest Radikaller ve Oksidatif Hasar	19
4.2.6 AH ve Genetik Faktörler	20
4.3 HÜCRE ÖLÜMÜ MEKANİZMALARI	20
4.3.1 Nekroz	20
4.3.2 Apoptoz	21
4.3.2.1 Apoptozun Düzenlenmesi ve Kaspazlar	23
4.3.2.2 Apoptotik Ölüm Yolakları	25
4.4 NÖRONAL HÜCRE ÖLÜMÜ	27
4.5 OKSİDATİF HASARIN ARACILIK ETTİĞİ NÖRON ÖLÜMÜ	28
4.6 ALZHEİMER HASTALIĞINA FARMAKOLOJİK TEDAVİ YAKLAŞIMLARI	29
4.6.1 A β Oluşumunu Etkileyen Ajanlar	29
4.6.2 Asetilkolinesteraz İnhibitörleri	30
4.6.3 A β Çökmesini İnhibe Eden Ajanlar: Metal Şelatörler ve β -Tabaka Kırıcılar ...	30
4.6.4 Antioksidanlar	30
4.6.5 Antiinflamatuar Ajanlar.....	31
4.6.6 Östrojen	31
4.6.7 A β ile Aşılama.....	31
4.6.8 Olası Bir Nöroprotektif Ajan: Eritropoetin	31
4.6.8.1 Eritropoetin Nöroprotektif Özellikleri	32
4.6.8.2 Eritropoetin Protpektif Etkisinin Mekanizmaları	33

4.1 Alzheimer Hastalığı:

İlk kez 1906'da Alois Alzheimer 'in tanımladığı yaşlıları etkileyen nöropsikiyatrik hastalık bugün yaygın olarak Alzheimer Hastalığı (AH) ismiyle bilinmektedir .Tedaviden çok yarar elde edilemeyen bu demans hastalığı 65 yaşın üzerindeki bireylerin %1-5' ini etkilerken 85 yaşın üzerindeki bireylerin yaklaşık %20- 40'ı risk altındadır.Yaşlı nüfusun artmakta olduğu gelişmiş batı toplumlarında AH' ndan etkilenen bireylerin bakımı ve sağaltımı çok miktarda tıbbi, insani ve parasal kaynak ihtiyacı gerektirdiği bildirilmektedir. Başlangıçta yakın hafıza kaybı gözlenen hastalığın sonraki 5-15 yıllık döneminde bilişsel ve duygusal fonksiyon bozukluğu ve fiziksel işlevlerde kayıp meydana gelmektedir. AH'nda genellikle motor yada duyuşsal değişiklikler olmamasına rağmen, nadir vakalar spastik paraparazi gibi atipik klinik bulgular göstermektedir. Bugün bile AH' nın kesin tanısı yalnızca ölüm sonrası beyin otopsisini yapılarak mümkün olmaktadır. Bu histopatolojik beyin analizi AH 'na ait klasik üçlü bulguyu göstermektedir: A β içeren senil plaklar, hiperfosforile mikrotübüler tau proteini içeren nörofibriler yumaklar (NFT) ve beynin özellikle temporal, parietal ve hipokampal bölgelerinde ilerleyici nöron kaybı söz konusudur.(1,4,15)

Bu hastalıktan etkilenen bireylerin beyin korteksindeki lezyonlar ilk kez gümüş boyama yöntemi ile gösterilmiştir ve gösterilen bu lezyonlar, nöronlar içindeki nörofibriler yumaklardır. 1930 yılında Divry, kongo kırmızısı boyasını kullanarak ilk kez senil plak yapısını göstermeyi başarmıştır. 1980 'li yılların ortalarında Wisniewski ve Brion isimli araştırmacılar ve arkadaşları tau proteinini (mikrotübül birleştirici protein), buna yakın bir zamanda da Glenner ve arkadaşları amiloid plaklarını oluşturan ve APP'nden köken alan, beta tabaka yapısına sahip 4 kilodalton (kDa)' luk A β 'ni tanımlamışlardır. Hastalık ilk kez 1906 yılında tanımlanmasına rağmen 20. yüzyılın sonlarına kadar bir sır olarak kalmış, 1990' lı yılların beyin on yılı ilan edilmesi AH üzerindeki çalışmalara ve dolayısı ile edinilen bilgilere büyük ivme kazandırmıştır.(8)

AH gelişiminde rol oynayan patofizyolojik süreçler ve risk faktörleri anatomik, hücreşel ve moleküler düzeylerde birçok mekanizmayı etkilemektedir. AH sadece temel bir mekanizmanın fonksiyon bozukluğundan ziyade hastalık tablosu gösteren farklı bireylerde farklı mekanizmaların etkilendiği bir süreçtir. AH'nda beynin birden fazla bölgesinin ilerleyici nörodejenerasyona uğradığı, özellikle bazal nükleus, hipokampus, amigdala, entorhinal korteksin ve neticede temporal, frontal ve parietal bölgelerin kortekslerinin

etkilendiği gözlenmiştir. Sinaptik dansite kaybı ve nöronal hasarın katıldığı bu olaydan başlıca öğrenme ve hatırlama yetenekleri etkilenmektedir. AH'nın histopatolojik belirteçleri olan senil plakların ve nörofibriler yumakların varlığı nörotransmitter sistemini büyük ölçüde zayıflatmaktadır. Asetil kolin ve diğer kolinerjik fonksiyon göstergelerinin düzeyindeki azalmalar AH'nda gözlenen öğrenme ve bellek bozuklukları ile; serotonin, norepinefrin ve somatostatin gibi diğer nörotransmitter düzeylerindeki düşüklükler yine hastalıkta gözlenen davranış bozuklukları ile ilişkili bulunmuştur.(2)

Genelde nörodejeneratif hastalık terimi hücrelerdeki anormal bileşenlerin neden olduğu hastalıkları tanımlamaktadır ve bu hatalı katlanmış proteinlerin birikimi yaşa bağlı olarak nöron kaybına yol açar. Pick's, Alzheimer, Parkinson, Huntington, prion ve motor nöron hastalıkları hücre içi ve dışı protein birikiminin var olduğu hastalıklardır.(16) Proteinlerin hatalı katlanmasına ve birikimine neden olan mekanizmalar kesin olarak açıklanamamakla birlikte birçok nörolojik hastalığın temelinde genetik, çevresel faktörlerin ve ilerlemiş yaşın büyük rol oynadığı açıkça gösterilmiştir. Yaşlılık nörodejeneratif hastalıklar için en büyük risk faktörüdür ve Alzheimer tipi demans en sık gözlenen demans tipidir.(17)

Tüm bulgular ışığında AH'na en spesifik tedavi yaklaşımının ne olduğu sorusu gündeme gelmektedir. AH gelişiminde büyük rol oynadığı bilinen A β üretiminin ve amiloid plak oluşumunun yavaşlatılması veya önceden oluşmuş amiloid birikimlerin yıkılmasının ve dokudan temizlenmesinin hızlandırılmasının etkin olabileceği öne sürülmüş, spesifik olmayan metal şelatlayıcılar, spesifik β tabaka kırıcıları, β ve γ sekretaz inhibitörlerinin kullanılması ve A β ile aşılama gibi öneriler araştırma konusu olmuştur.(8, 15,17,18)

4.1.1 Amiloid Prekürsör Proteini

AH'nın histopatolojisinde beyin korteksinde gözlenen amiloid plakların moleküler kompozisyonu 1980'li yılların ortalarında amiloid proteinin saflaştırılması ve protein diziliminin belirlenmesi sonucunda tanımlanmıştır. En büyük komponent olan ve molekül büyüklüğü 4 kDa olan amiloid beta peptidi, APP'nden köken almaktadır. APP 21. kromozom üzerinde bulunan tek bir gen tarafından kodlanır, 18 eksondan oluşur ve alternatif splicing nedeni ile 563-770 amino asit arasında değişebilen uzunlukta 10 izoformu vardır. APP, amiloid prekürsör-benzeri protein 1 ve 2 (APLP1 ve APLP2) 'yi de içeren APP-ailesinin bir üyesidir. Aynı aileden olan diğer iki protein APLP1 ve APLP2, A β peptidi bölgesi homolojisi göstermez ve A β peptidi oluşumuna katılmaz.(7,19,20,21)

APP tip 1 integral membran proteini; uzun bir ekstrasellüler domaini (ektodomain), bir transmembran domaini, kısa bir sitozolik kuyruğu vardır. APP'nin tamamen olgun formunu kazanması glikozilasyon, sülfasyon ve fosforilasyon içeren bir dizi posttranslasyonel modifikasyonları içerir. İki potansiyel N- glikozilasyon bölgesi taşır ancak sadece bir tanesi kullanılır ve yüksek oranda glikozile karbohidrat kalıntısı bulunan bir proteindir. APP'nin metal iyonlara örneğin bakır ve çinko'ya, heparin'e, kollajen ve laminin'e bağlandığı bazı fonksiyonel bölgeleri kesin olarak tanımlanmıştır. Heparin ve kollajen'e bağlanmasının ekstrasellüler matriks ile etkileşim için aracılık ettiği bildirilmiştir. APP'nin hücre adezyonu, hücre/hücre veya hücre/matriks etkileşimini düzenlemekte işlev gördüğü varsayılmaktadır. Bakır bağlama bölgesi tüm APP izoformlarında ve APLP üyelerinde bulunmaktadır. Bu ise bakır bağlama bölgesinin proteinin yapısı ve/veya işlevi için esansiyel olduğunu göstermektedir. APP, $Cu^{2+} \rightarrow Cu^+$ indirgeyebilmekte ve bir antioksidan gibi davranarak nöroprotektif etki gösterebilmektedir. APP'nin sitozolik bölümünün sinyal ileti yollarında rolü olduğu, içerdiği motiflerin sitozolik adaptör proteinlere bağlandığı ve transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girdiği, kaspazların (özellikle kaspaz 6 ve 8) tanıdığı ve kestiği bir bölge içerdiği farklı çalışmalarda bildirilmiştir.(19,21)

Alternatif (splicing) ekson işlenmesi özel hücre tiplerinde ve dokularda spesifik işlevlerine uygun izoformların ekspres olmasına olanak tanır. APP'nin periferik dokularda trombositler tarafından sentezlenen izoformu serin proteaz inhibitörü (KPI) kodlayan bir bölge taşır, bu KPI bölgesinin bulunduğu izoform kan koagülasyon faktörleri olan faktör IX ve XIa 'yı inhibe eder. Nöronlar ise KPI bölgesi içermeyen APP₆₉₅ izoformunu ekspres eder. APP gen bölgesinin 21. kromozom üzerinde olduğunun keşfedilmesi ile 21. kromozomun fazladan bir kopyasını taşıyan Down sendromlu bireylerde A β 'nin çok erken yaşlarda gelişmesinin nedeni açıklık kazanmıştır. Bu direkt gen dozaj etkisidir ve APP 'nin artmış ekspresyonu ve dolayısı ile artan A β düzeyleri hastalık oluşumunu hızlandırır.(21)

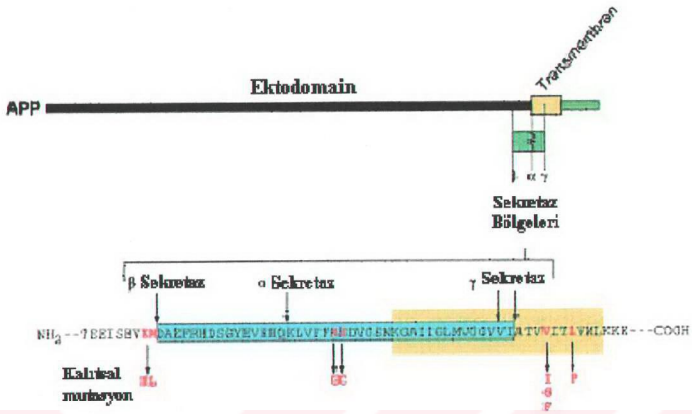
4.1.2 A β Peptidi

Beyindeki A β , çözünür ve çözünmez formlarda, monomerden yüksek molekül ağırlıklı oligomerlere kadar çökelti şeklinde bulunmaktadır. Beyinde bulunan çözünür A β ağırlıklı olarak random coil ve α -helikal katlanmış peptid olarak bulunurken, çözünmez A β ise β tabaka yapısı gösterir. A β 'nin α -helikal yapısının stabilizasyonu membran ortamı tarafından kontrol edilir. Bu nedenle A β 'nin membrandan salınımının, toksik β yapısına

kavuşmasına izin verdiği kabul edilir.(20) AH'nda beyin dokusu iskemik veya hipoksik koşullar nedeni ile düşük pH düzeylerine sahiptir ve A β peptidi asidik pH'da kolaylıkla çökelir.(5)

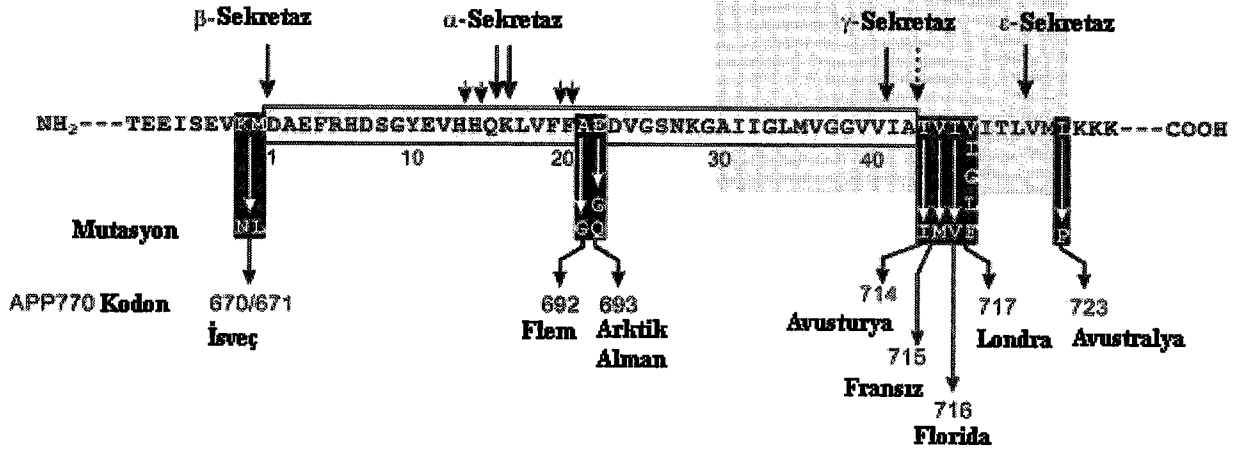
APP geni 770 aminoasitlik amiloid prekürsör proteinini kodlar. Amiloid β peptid oluşumu APP'nin proteolitik yarılmaya sonucunda meydana gelmektedir. APP'ni keserek amiloid β peptidi oluşumuna neden olan proteazlar 3 tanedir ve α , β ve γ sekretazlar olarak adlandırılmaktadır. α -sekretaz nöron dışındaki diğer hücrelerde; memeli hücrelerinde, trombositlerde, böceklerde, 'baculovirus'larda ve mayalarda daha baskın olarak mevcuttur. α -sekretaz APP'ni tam A β dizisinin ortasından kesmekte ve APP' nin ektodomaini hücre dışına salıverilmektedir. Bu ektodomain p3 fragmanı adını almaktadır, çözünebilir yapıdadır ve amiloidojenik değildir. Diğer fragman membrana bağlı C-ucu fragmanı (CTF, C-Terminal Fragment) adını almaktadır. α -sekretaz aktivitesi hücreyi intakt amiloid β peptidi oluşumundan ve amiloid toksisitesinden korumaktadır. α -sekretaz aktivitesi forbol esterleri ve protein kinaz C aktivasyonu tarafından regüle edilebilir ve bu regülasyon; nörotransmitterleri, sitokinleri, büyüme faktörlerini ve hormonları içeren bir dizi faktör tarafından etkilenmektedir.(21,23)

β -sekretaz tarafından kesilmek APP için alternatif bir hücre yolaktır ve bu aktivite intakt A β peptidi oluşumunda ilk basamaktır. β -sekretaz aktivitesi ile APP 'nin ektodomaini salıverilmektedir ve A β dizisini içeren diğer fragman membrana tutunmuş şekilde kalmaktadır. β -sekretaz aktivitesi ile kesilme memeli hücrelerinde, trombositlerde ve mayalarda görülürken böceklerde bu enzim aktivitesi görülmemektedir. Sırası ile β ve γ -sekretaz aktiviteleri intakt amiloid β peptidi oluşumuna neden olarak amiloidojenik yolağı başlatmaktadırlar.



Şekil 1: Amiloid prekürsör protein, Aβ peptidi dizisi ve sekretazların kesim bölgeleri.(20)

β -sekretaz tarafından kesilen APP'nin membrana tutunmuş diğer fragmanın γ-sekretaz ile ikinci kez kesilmesi intakt Aβ peptidi oluşumu ile sonuçlanır. Biyolojik sıvılarda ve memeli hücre kültürleri üzerinde yapılan çalışmalarda γ-sekretaz kesilmesinin normal hücrel bir olay olduğu bildirilmiştir. Ancak APP transmembran domaininin γ-sekretaz tarafından kesilmesi diziyeye özgül değildir ve farklı C-ucuna sahip Aβ peptidi oluşumuna neden olmaktadır. Aβ₄₀, 40 aminoasit kalıntısından oluşan ve en sık karşılaşılan fragmandır, suda ve sıvı ortamda nispeten çözünebilir yapıdadır. İkinci en sık karşılaşılan form Aβ₄₂, 42 aminoasit kalıntısından oluşur. Hücre kültürlerinde ve hayvan modeli beyinlerinde yapılan çalışmalarda toplam Aβ üretiminin %5-10'unu oluşturur. Peptid dizi uzunluğunun artması amiloid peptidinin suda ve sıvı ortamda daha çözünmez, daha toksik etkili ve fibril oluşumuna daha yatkın form kazanmasına neden olur.(21,23)



Şekil 2: Aβ peptidi dizisi, sekretazların kesim bölgeleri ve ailesel AH’nda sık karşılaşılan mutasyonlar. (21)

4.1.3 Amiloid Kaskad Hipotezi

AH’nın patogeneğinde, Aβ peptidinin aşırı üretimi ve birikimi sonucu potansiyel toksik etkisinin hastalığı başlatıcı ilk faktör olduğu görüşü yaygın olarak kabul edilmekte ve “amiloid kaskad hipotezi” olarak bilinmektedir. Bu hipotez birçok kez hayvan ve hücre kültürü modelleri ile yapılan genetik, nöropatolojik ve hücre biyolojisi çalışmalarının sonuçları ile desteklenmiştir. Amiloid plaklar baskın olarak Aβ peptidi içermekle birlikte Apolipoprotein E (ApoE) gibi diğer bazı proteinleri de içermektedir. Normalde çözünebilir amiloid beta proteini katabolize olarak temizlenir. Ancak AH’nın gerek erken başlangıçlı ailesel formunda gerekse sporadik formunda Aβ peptidinin üretimi veya yıkılışında meydana gelen değişiklikler, beynin belirli bölgelerinde, ortamdaki Aβ peptidi miktarının artışına ve birikimine neden olarak sitopatolojik yanıtların artışına neden olurlar. Bu peptid amfipatik bir moleküldür, lipidlere bağlanarak membran dinamiğini bozar ve hücre fonksiyonlarını etkiler.(22) Aβ oligomerlerinin nöronların çevresinde bulunan mikroglia ve astrositlerde gösterdiği kompleks etkisi sinaptik fonksiyon bozukluğuna ve böylece hafıza ve hatırlama yeteneklerinde kayıplara neden olur.(15,23)

4.1.4 Tau Hipotezi

AH’nın diğer nöropatolojik belirleyicisi nörofibriler yumaklar, bu hastalığa özel olan hücre iskelet bozukluklarıdır. İlk kez Brion ve arkadaşları tarafından 1986 yılında tanımlanan Tau bir mikrotübül birleştirici proteindir ve nörofibriler yumakların önemli bir bileşenidir.

Nörofibriler yumaklar, nöron hücrelerinin içinde bulunan, birbirinin etrafında bükülmüş iki iplikten oluşan halata benzer çiftli helikal filamanlar (PHF, Paired Helical Filaments) ve tau proteinlerinin normal olmayan çökelmeleri ile oluşmuş yapılardır. Nörofibriler yumaklar aksonal transportu zayıflatarak sinir hücrelerinin fonksiyonlarında bozukluklara neden olurlar.(8)

4.2 Alzheimer Hastalığı Gelişiminde Rol Oynayan Faktörler

AH için kesin olarak tanımlanmış birkaç risk faktörü ile birlikte halen üzerinde çalışılan ve hastalık gelişimindeki rolü tamamen aydınlatılamamış faktörler mevcuttur. İlerlemiş yaş ve aile öyküsü bulunması birinci derece risk faktörü olarak tanımlanmıştır. Yüksek eğitim düzeyine sahip olmak, artmış sinaptik ve/veya dendritik yoğunluk ve komplekslik sağlaması nedeni ile hastalık gelişimi riskini azaltıcı bir faktör olarak tanımlanmakla birlikte, bir işte çalışma süresi, stres, diyet gibi diğer değişkenlerle birlikteliği açısından farklı değerlendirmelere açıktır.(24)

4.2.1 Yaş

AH hastalığı için en önemli risk faktörüdür. Gelişmiş ülkelerde artan yaşam süresi bireylere hastalığın gelişimi için yeterli süreyi sağlamaktadır. 65 yaş üzerindeki popülasyon büyük risk taşımaktadır ve her 5 yılda hastalık gelişimi riski ikiye katlanmaktadır. Alzheimer tipi demans en sık görülen demans tipidir ve değişik kaynaklara göre tüm demansların % 50- %90' ını oluşturmaktadır.(25)

4.2.2 Cinsiyet

Epidemiyolojik çalışmalar kadın olmanın AH için bağımsız bir risk faktörü olduğunu kanıtlamıştır. Ancak bu göreceli prevalans artışının, kadın cinsiyetin erkek cinse oranla ortalama yaşam süresinin daha uzun olmasından kaynaklanabileceği belirtilmektedir. Erkek popülasyonunda beyin-damar hastalıklarının daha sık görülmesi ve bu hastalığın neden olduğu sekeller yaşlı erkeklere AH tanısı konulmasında zorluklara sebep olmaktadır. Kadın popülasyonunda gözlenen prevalans artışı; henüz tanımlanamamış çevresel etkiler, özgül olmayan hormonal etkiler ve X kromozomu üzerinde yatkınlığa neden olan bir veya daha fazla gen bölgesi olabileceği olasılıkları ile açıklanmaya çalışılmıştır. AH hastalığı için risk faktörü olduğu bilinen apolipoprotein E geninin E4 allel frekansı, AH olan kadınlarda AH olan erkeklere göre daha fazladır. Birkaç epidemiyolojik çalışmada AH'nda kadın:erkek

oranının 2:1 olduğu bildirilmiştir ve X'e bağlı dominant bir genetik faktörün rolü olduğu görüşü öne sürülmüştür. Ancak ailesel AH üzerinde yapılan çalışmalar açıkça ortaya koymuştur ki hastalık otozomal dominanttır ve ailesel geçiş gösterir.(24,26,27)

4.2.3 Apo E

Apolipoproteinler lipid taşıyıcı moleküllerdir. Periferik ve merkezi sinir sistemi hasarlarını takip eden dönemde lipid metabolizmasının düzenlenmesinde önemli rol oynarlar. Özellikle Apo E sinir sistemi hücreleri ile ilgili bir proteindir ve merkezi sinir sisteminde oluşan bir hasar sonrası nöronal membranın ve miyelin kılıfının onarılmasında kolesterolün salınımını ve yeniden dağılımını koordine eder. Yapılan çalışmalarda Apo E4 allel frekansının gerek sporadik gerekse ailesel tipteki AH'nda arttığı gösterilmiştir. Apo E4 allelindeki artış; artmış AH riski, AH'nın ilk başlama yaşının azalması, senil plak yoğunluğunun artışı ve hastalarda azalmış asetil kolin esteraaz aktivitesi ile doğru orantılı bulunmuştur.(28)

4.2.4 İnflamasyon

Beyin dokularında yapılan çalışmalarda inflamasyona işaret eden ve akut faz yanıtı oluşturan inflamatuvar proteinler gözlenmiştir. Bu moleküllerin senil plak yapısına katıldığı ve Aβ peptidi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir.(24)

4.2.5 Serbest Radikaller ve Oksidatif Hasar

Çalışmalarda serbest oksijen radikallerinin amiloid çökmesini artırıcı etki gösterdiği ve E vitamini gibi bazı serbest radikal yakalayıcıların bu etkiyi engelleyerek koruyucu rol oynadığı bildirilmiştir.(29) Bir araştırmada sağlıklı kontrol grubu ile beyin dokusu örnekleri kıyaslandığında AH'nda protein oksidasyon ürünlerinin artmış düzeylerde olduğu gözlenmiştir. Beyin korteks hücrelerinin nükleer ve mitokondriyal DNA'sını etkileyen oksidatif hasarın ve artmış lipid peroksidasyonunun, AH gelişiminde rol oynadığı bildirilmektedir.(30)

Mitokondrial sitokrom oksidaz fonksiyon bozukluğu, yüksek süperoksit dismutaz aktivitesi ve demir homeostazındaki değişimler gibi farklı biyokimyasal koşulların neden olduğu serbest radikal üretiminin AH gelişimine katkıda bulunabileceği öne sürülmektedir. Farklı çalışmalarda Aβ peptidinin serbest radikal oluşumuna neden olarak, nöronal kültürleri oksidatif toksisiteye karşı hassas kıldığı ve nöronlar arası kalsiyum düzeyi artışına neden

olarak plazma membranında hasar oluşmasına aracılık ettiği böylece nöronal değişikliklere ve beyin dokusunda hasar gelişimine neden olduğu bildirilmiştir. (31)

4.2.6 AH ve Genetik Faktörler

AH ailesel veya sporadik olarak her iki formda gelişebilmektedir. Ailesel AH' nda (erken başlangıçlı ailesel Alzheimer Hastalığı) aile hikayesi bulunması hastalık gelişimi riskini önemli ölçüde artırmaktadır ve genetik kalıtım kesin olarak belirlenmiştir. 21. kromozomda bulunan APP geni, 14. kromozomda bulunan presenilin 1 (PS1) geni ve 1. kromozomda bulunan presenilin 2 (PS2) geni üzerinde meydana gelen mutasyonlar erken başlangıçlı ailesel AH' na neden olur. Her üç mutant gen (APP, PS1 ve PS2) A β 'nin üretimini artırarak senil plaklarda birikimine neden olmaktadır. Bu üç genin mutasyonlarının neden olduğu vakalar tüm AH vakalarının sadece % 5'ini oluşturur ve büyük çoğunluğu oluşturan (%95) geç başlangıçlı AH vakalarının bu genlerinde mutasyon yoktur. ApoE, α -2 makroglobulin, çok düşük dansiteli lipoprotein reseptörü ve düşük dansiteli lipoprotein reseptörü ilişkili protein (Low density lipoprotein Related Protein,LRP) genlerinin polimorfizminin AH patogenezi için risk faktörü olduğu gösterilmiştir. Daha önceden presenilin 2 polimorfizminin erken başlangıçlı sporadik AH için risk faktörü olduğu rapor edilmesine rağmen, geniş ölçekli çalışmalarda erken başlangıçlı AH ile kontroller arasında allel frekansı açısından anlamlı farklılık olmadığı gözlenmiştir.Yine apo E 'nin ϵ 4 allelinin varlığı beyaz ırk ve Asya popülasyonunda AH için artmış risk faktörü iken siyah ırk ve hispanikler için tamamen aksi söz konusudur ve patojenik mekanizmalar henüz bilinmemektedir. Tüm genetik faktörler A β peptidi üretiminde veya oluşmuş fragmanların temizlenmesinde etki göstermeleri nedeni ile hastalık gelişiminde önemli role sahiptirler.(17,32)

4.3 Hücre Ölümü Mekanizmaları

Hücre ölümünün morfolojik kriterleri esas alınarak iki formu tanımlanmıştır; nekroz ve apoptoz.

4.3.1 Nekroz

Nekroz, sitoplazmik şişme, subsellüler komponentlerin entegrasyonunun ve plazma membranının bütünlüğünün bozulması ve enerji kaybıyla karakterizedir. Klasik hücre ölümü

nekroz olarak adlandırılır. Şiddetli bir travma, zararlı bir uyarı ile meydana gelir ve genellikle hücreleri gruplar halinde etkiler. Morfolojik olarak endoplazmik retikulum ve mitokondride dilatasyon, plazma membranının iyon transportunun bozulması, hücrelerin şişmesi ve lizisi tipiktir. Hücrelerin parçalanması ile hücre içeriği ve lizozomal enzimler ekstrasellüler ortama dökülür. Bu enzimler de komşu hücre ve dokuları zedeleyerek inflamatuvar yanıtı açar.(33)

4.3.2 Apoptoz

Apoptoz klasik hücre ölüm şekli olarak bilinen nekrozdan birçok özelliği açısından oldukça farklı olan bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Biyolojik bilimler literatüründe apoptoz terimi, ilk defa İskoçyalı araştırmacılar olan Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972 yılında kullanılmış ve canlı dokulardaki hücre azalmalarından sorumlu olan, yapısal olarak özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır.(34) Apoptoz, nükleer piknoz, kromatin kondensasyonu, plazma membranının ve hücre organellerinin bütünlüğünü koruması ile karakterizedir. Apoptotik hücre ölümü, aktif enerji tüketimini gerektirmektedir ve bu tip hücre ölümünde nükleus içinde deoksiribonükleik asid (DNA) fragmentasyonu, spesifik sistein proteazların (kaspazlar) aktivasyonu ve spesifik substratların aspartik asid kalıntısından spesifik ayrılması (cleavage) olmaktadır. Apoptotik hücrede görülen önemli değişikliklerden biri normalde plazma membranının iç yüzünde bulunan fosfatidilserin'in erken evrede membranın dış yüzüne doğru transloke olmasıdır. Bu mekanizma apoptotik hücrelerin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmasını sağlar. Kromatin kondensasyonunu takiben nükleus küçük parçacıklara ayrılmaktadır. Hücre büzülerek küçülür ve çevresi membranla sarılmış apoptotik cisim olarak adlandırılan küçük parçacıklara ayrılır. Bu apoptotik cisimler makrofajlar ve komşu hücreler tarafından tanınmaya ve fagosite edilmeye hazırdır. Böylelikle apoptoz yolu ile ölen hücreler etkin olarak dokulardan temizlenir ve inflamasyona yol açmaz.(33,35)

Apoptoz çok hücreli canlıların gelişimi esnasında görülen hücre ölümü tipidir. Çok hücreli canlıların fetal gelişim basamaklarında seçilmiş bazı hücrelerinin apoptoz yolu ile öldükleri deneysel çalışmalarla açıkça gösterilmiştir. *Caenorhabditis elegans*'ın (*C.elegans*) başlangıçta 1090 olan hücre sayısının, 131 hücre azalarak hermafroditik formdan yetişkin forma dönüştüğü gösterilmiştir. Kurbağaların metamorfozu esnasında kuyruklarının kaybolması, insan embriyosunun el parmakları arasında bulunan perdelere fetal gelişim

esnasında kaybolması buradaki hücrelerin apoptozla ölmesi sonucu gerçekleşmektedir. Ökaryotik organizmadaki hücreler doğarlar, belirli bir süre yaşarlar ve sonra ölürlür. Yaşam süresi hücre tipine ve fonksiyonuna göre değişmektedir. Barsak hücreleri 3-5 günlük bir yaşam süresini takiben ölürlerken, derinin epidermal hücreleri 20-25 günlük bir süre sonunda ölmektedir.(34)

Çok hücreli organizmalarda fütal gelişimden başlayarak ölüme kadar meydana gelen, gelişimsel ve yaşamsal süreçlerde temel rolü olan bu hücre ölümü mekanizması programlanmış hücre ölümü (Programmed Cell Death, PCD) olarak da tanımlanmaktadır. Tüm bu ölümler fizyolojik şartlarda meydana geldiği için fizyolojik hücre ölümü (physiological cell death) , virüs etkisi veya çevresel nedenlerle bir şekilde DNA'sı hasarlanmış hücrelerin organizmanın zarar görmemesi için kendilerini öldürmeleri hücre intiharı (cell suicide) , doku homeostazı için, yara iyileşmesi veya barsak hücrelerinin “turnover”ında olduğu gibi, ortamdaki ölümler temizlenmeleri hücre kaybı (cell deletion) olarak tanımlanmaktadır ve çoğu araştırmacılar tarafından (programlanmış hücre ölümü, fizyolojik hücre ölümü, hücre intiharı, hücre kaybı) literatürde genellikle apoptozla eş anlamlı ifadeler olarak kullanılmaktadır.(34)

Normal apoptotik hücre ölümü ve yerine yeni hücre yapımının “tissue remodelling” günde yaklaşık 1×10^{11} hücreyi bulduğu hesaplanmaktadır.(36) Yapım ile yıkım arasındaki kontrollü dengenin apoptozis lehine veya aleyhine bozulması birçok önemli hastalığın patogeneze katkıda bulunur. Apoptozisin gereksiz yere oluştuğu veya hızlandığı hastalıklara örnek olarak kazanılmış immün defekt hastalığı (AIDS), nörodejeneratif hastalıklar, insüline bağımlı tip diyabet, hepatit C enfeksiyonu, miyokard enfarktüsü, ateroskleroz gibi hastalıklar verilebilirken; apoptozisin yavaşladığı hastalıklara örnek olarak ise otoimmün hastalıklar ve kanser verilebilir.(34,37)

Tablo 1: Nekroz ve apoptoz arasındaki farklar. (34)

ÖZELLİK	NEKROZ	APOPTOZ
Yol açan nedenler	İskemi Hipertermi Hipoksi Litik viral enfeksiyon Toksik maddelerin yüksek konsantrasyonları Şiddetli oksidatif stres	Büyüme faktörü eksikliği Hücre yaşlanması İnsan immündefekti virüs Kanser ilaçları Radyasyon Yüksek doz glukokortikoid Fas veya TNFR-1 reseptörlerinin aktivasyonu Sitotoksik T lenfositler Çok şiddetli olmayan oksidatif stres
Morfolojik özellikler	Hücre membranı bütünlüğünün kaybı Kromatin "flocculation"u Hücre şişmesi Organellerin disintegrasyonu Endoplazmik retikulumun dilatasyonu Büyük vakuollerin oluşumu Hücre lizisi	İntakt hücre membranı fakat membranda "bleb"lerin oluşumu Kromatinin nükleer membran civarında toplanması ve yoğunlaşması Hücre küçülmesi Organellerde disintegrasyon yok Hücresinin intakt mitokondri, ribozom, nucleus parçaları ve diğer organelleri içeren membranla kaplı apoptotic cisimciklere parçalanması
Biyokimyasal özellikler	Bozulmuş iyon hemostazisi ATP gerekmez (pasif süreç) +4 °C'de gerçekleşebilir DNA rastgele parçalanır (agaroz jel elektroforezinde "smear" görüntüsü) Postlitik DNA fragmentasyonu(=ölümün geç safhasında)	İyi kontrollu, bazı aktivasyonların ve enzimatik basamakların olması için ATP gereklidir (aktif süreç) +4 °C'de gerçekleşmez DNA internukleozomal alanlarda 180 kb çiftinin katları olacak şekilde kırılır mono ve oligonukleozomlara ayrılır (agaroz jel elektroforezinde merdiven patterni=apoptozisin en önemli belirteci) Prelitik DNA fragmentasyonu (=erken evrede gerçekleşir)
Diğer özellikler	Hücreler gruplar halinde ölür Fizyolojik olmayan (patolojik) etkiler sonucu gerçekleşir Lizozomal enzimler salınır İnflamasyona neden olur	Hücreler tek tek veya birkaçı birarada ölür Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir Komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilirler İnflamasyon görülmez

4.3.2.1 Apoptozun Düzenlenmesi ve Kaspazlar

Hücrelerin akut hasar sonucu ölmesinin aksine, bir dizi aktif işlemler sonucu gerçekleşen ve farklı morfolojik değişikliklerle karakterize olan programlı hücre ölümü apoptoz olarak tanımlanmaktadır. Apoptoz çok sayıda ve çeşitte mediatör tarafından düzenlenir. Bunlar arasında, bazı iyonlar (kalsiyum), moleküller (seramid), genler (c-myc), proteinler (p53) ve hatta organeller (mitokondri) bulunmaktadır. Bazı mediatörler hücre tipine özgüdür, bazıları da apoptotik stimulusun çeşidine göre farklılık gösterebilirler. Apoptotik süreç boyunca hücre içine sürekli kalsiyum girişi olur. Kalsiyum iyonları endonükleaz

aktivasyonunda, doku transglutaminaz aktivasyonunda, gen regülasyonunda, proteazların aktivasyonunda ve hücre iskeleti organizasyonunda rol alabilirler. Fakat hücreye kalsiyum girişi apoptozisin gerçekleşmesi için esansiyel değildir.(34)

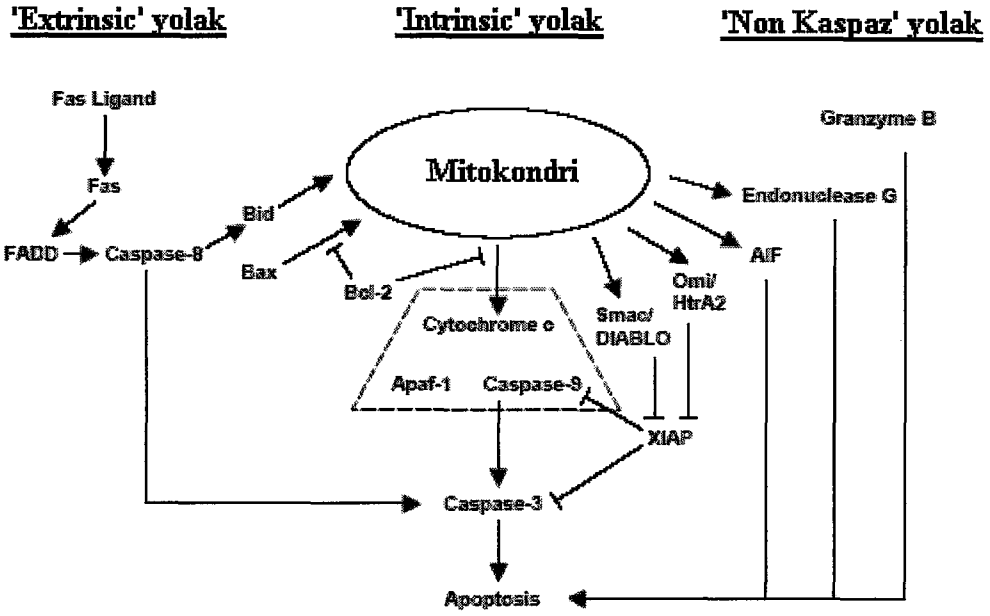
Apoptozun doğasını aydınlatmak amacı ile *C. elegans*'ın gelişimi esnasında oluşan programlı hücre ölümü üzerine yapılan çalışmalarda, apoptozu yürüten ve düzenleyen üç gen tanımlanmıştır: *ced-3* ve *ced-4* genleri apoptozun oluşumu için gerekli ve proapoptotik özelliktedirler. Eğer bu genlerin her ikisi de inaktive edilirse programlı hücre ölümü gerçekleşmez. Üçüncü gen *ced-9* ise apoptozun negatif düzenleyicisidir, antiapoptotik özelliktedir ve bir mutasyonla inaktive olursa hücre sağ kalmayı başaramaz. Yine *ced-9* anormal yüksek düzeylerde eksprese olursa normal programlanmış hücre ölümleri gerçekleşmez. Memelilerde *ced-3*, *ced-4* ve *ced-9*'un karşılığı olan genler tanımlanmış ve bu genlerin çeşitli uyarıların neden olduğu apoptozu yürüten ve düzenleyen iyi korunmuş proteinleri kodladığı bulunmuştur. *ced-3* geninin kodladığı *Ced-3*, memelilerde bugüne kadar 14 üyesi tanımlanmış olan ve kaspazlar olarak adlandırılan serin proteaz ailesinin prototipidir. Memeli hücrelerinde bulunan bu proteazlar aktif bölgelerinde sistein kalıntısı taşımaları ve substrat proteinlerini aspartik asit kalıntısından tanıyarak spesifik olarak kesmeleri nedeni ile kaspazlar (caspases) olarak adlandırılırlar. Kaspazların apoptoz sürecinde tanıyarak kestikleri 100'e yakın hedef hücre proteini vardır ve en önemli hedefleri deoksiribonükleaz (DNase) inhibitörleridir. DNase, aktive olduğunda nükleer DNA yı spesifik olarak kesen ve fragmentasyonundan sorumlu olan enzimdir. Kaspazlar DNA fragmentasyonuna ilave olarak, sitoskeletal proteinleri keserek sitoskeletonun dağılmasına, membran kabarcıklaşmasına ve hücre fragmentasyonuna da aracılık eder.(35, 38)

Kaspazlar, inaktif prekürsörler olarak sentezlenen ve başka kaspazların katalizlediği proteolitik bölünmelerle aktif formuna dönüşen zimojen yapılardır.(39) Başlatıcı kaspazın aktivasyonu, zincirleme reaksiyonlara neden olarak downstream kaspazların aktivasyonu yolu ile hücre ölümüne neden olur. Kaynağına yada ölüm uyarımına bakılmaksızın apoptoza giden tüm hücrelerde sistein proteaz aktivitesi tespit edilir ve kaspazların regülasyonu hücre canlılığının sürdürülebilmesi için esastır. *ced-4* geninin kodladığı *Ced-4* ve bunun memelilerdeki homoloğu olan apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (*Apaf-1*) kaspazlara bağlanarak aktivasyonlarına neden olur. Karşıt olarak *Ced-9* kaspaz aktivasyonunu inhibe eder. Memelilerde, *Ced-9* benzeri olan ve *Bcl-2* ailesi olarak isimlendirilen protein ailesini kodlayan genler bulunmaktadır.(41) *Bcl-2* ailesi, *Bcl-2* homoloji (BH) domainlerini (BH1,

BH2, BH3, BH4) taşıyan, üyelerinin bir kısmının apoptozisi indüklediği (Bax, Bad, Bid, Bcl-X_s), bir kısmının ise inhibe ettiği (Bcl-2, Bcl-X_l) yani pro-apoptotik ya da anti-apoptotik fonksiyon gören sitozolik proteinlerdir. Bu ailenin üyeleri kendi aralarında homo veya heterodimerler oluştururlar. Bcl-2 ailesinin üyelerinin bazıları (Bcl-2'nin kendisi dahil) kaspaz aktivasyonunun inhibitörü gibi davranarak Ced-9 benzeri antiapoptotik özellik gösterirken, diğer üyeleri kaspaz aktivasyonunu ve hücre ölümünü uyararak proapoptotik etki gösterir. Bu proteinlerin hücre koruyucu fonksiyonu için dört domaine de sahip olması gerekirken, yalnız BH3 domainine sahip olmak ölümü indüklemek için yeterli olmaktadır ve bu domaini taşıyan üyeler (Bad, Bim, Bik, Blk, Bax ve Bid) pro-apoptotik rol oynamaktadır. Pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri negatif yüklü moleküllere selektiviteleriyle mitokondri dış membranında porlar oluşturabilmektedir. Anti-apoptotik Bcl-2 ve Bcl-XL ise uygun iyonik gradienti sürdürürerek mitokondrial fonksiyonun korunmasına katkıda bulunmalarının yanı sıra Bax pro-apoptotik proteinini heterodimerize ederek onun fonksiyonunu antagonize etmektedir.(40) Kaspazlar aktivitesini direkt olarak inhibe eden ve böylelikle apoptozu baskılayan “inhibitor of apoptosis proteins” (IAPs) tarafından da regüle edilir. Yine pro-apoptotik bir molekül olan Smac/Diablo mitokondriyal membran aralığından sitozole salınır ve IAPs'in fonksiyonunu interfere ederek hücre ölümünü uyarır. Sonuç olarak, kaspazlar, Bcl-2 ailesi üyeleri ve IAPs memeli hücrelerinin sağkalımının kontrolünde yer alan sinyal yollarının kritik hedefleridir.(41)

4.3.2.2 Apoptotik Ölüm Yolları

Birçok farklı uyaran apoptotik ölümü başlatabilir. Temel olarak iki major yolağın aktivasyonu, apoptotik hücre ölümünde gözlenen morfolojik ve biyokimyasal değişikliklere neden olan ortak yolağı aktive etmektedir. Apoptotik sinyaller “intrinsic” ve “extrinsic” yolak aracılığı ile iletilir. “extrinsic” yolakta ölüm reseptörlerinin aktivasyonunun neden olduğu efektör kaspazların aktivasyonu mitokondrial değişikliklerden önce olmaktadır. “intrinsic” yolakta ise, sitokrom c mitokondrial membran aralığından sitozole efektör kaspazların aktivasyonundan önce salınmaktadır.(33)



Şekil 3: Apoptoz Yolağı. (46)

4.3.2.2.1 Ölüm Reseptörü Aracılı Yolak

Hedef hücreden salınan bazı sinyal polipeptidleri, hücre dışı bölgelerine bağlanarak ölüm reseptörlerini aktive ederler. Ölüm reseptörleri hücre yüzey reseptörleridir ve sinyali hücre içine ileterek apoptozun tetiklenmesinde görev alırlar. Bu polipeptid hücre ölüm sinyalleri Tümör Nekrozis Faktör (TNF) ailesinin üyesidir ve TNF reseptör (TNFR) ailesinin üyelerine bağlanarak apoptoz sinyalini iletirler.(42) TNFR ailesi üyeleri hücre dışı bölgelerinde sisteinden zengin tekrar dizileri içeren tip1 membran proteinleridir. TNFR ailesinin bazı üyeleri hücre içi bölgelerinde korunmuş “death domain” içerirler ve bu nedenle ölüm reseptörü olarak adlandırılırlar. Fas/APO-1/CD95, TNFR1, DR3, TRAIL R1/DR4, TRAIL R2/DR5 ve DR6 bugüne kadar tanımlanan ölüm reseptörleridir. Fas reseptörü bu ailenin en iyi karakterize edilmiş üyesidir ve immün sistemde hücre ölümünün kontrolünde önemli rol oynamaktadır.(44)

Ölüm reseptörleri, “death domain” leri aracılığı ile adaptör moleküllere bağlanmaktadır. Adaptör moleküller yapılarında reseptöre bağlanmak için “death domain”, kaspazlara bağlanmak için ise “death effector domain” taşımaktadırlar. Fas ve TRAIL reseptörü “Fas-Associated Death Domain” (FADD) adaptör molekülüne, adaptör molekül de kaspaz-8’e bağlanarak kaspaz-8 aktivasyonuna neden olur ve oluşan yapı “death inducing signaling complex” (DISC) olarak adlandırılır. Kaspaz-8 aktivasyonu efektör kaspazların

aktivasyonuna neden olur ve apoptozda gözlenen biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler ortaya çıkar.(42,43,44,45)

4.3.2.2 Mitokondrial Yolak

Mitokondrial apoptoz birden fazla mekanizma tarafından uyarılabilir. DNA hasarını uyarıcı veya DNA tamirini inhibe edici ajanlar, staurosporin ve dexametazon gibi kimyasallar, büyüme faktörü yoksunluğu mitokondri hasarına yol açarak mitokondrilerden sitozole sitokrom C salınımına neden olurlar. Sitokrom C'nin mitokondriden sitoplazmaya salınması apoptozis yoluna girmiş bir hücrede geri dönüşsüz bir döneme girildiğini işaret eder. Sitokrom C sitozolde Apaf-1'e bağlanır. Bu bağlanma çok sayıda altbirimi olan ve apoptozom olarak adlandırılan Apaf-1/kaspaz-9 kompleksinin oluşumunu tetikler. Apoptozom kompleksi kaspaz-9'u aktive eder ve kaspaz-9 aktivasyonu efektör kaspazlar aracılığı ile apoptozise özgü değişikliklere neden olur. Apoptozis esnasında mitokondriden sitozole diğer bir protein "apoptosis inducing factor" (AIF) salınır. AIF, nükleus içinde DNA hasarına neden olarak kaspazlardan bağımsız biçimde apoptoza sebep olur.(41,42,44)

4.4 Nöronal Hücre Ölümü

Apoptozis, gelişim sürecinde santral ve periferik sinir sistemindeki nöronların ve glial hücrelerin erişkinlikte olmaları gereken sayısını kontrol eden ve yine fizyolojik yaşlanma sırasında nöron kaybından sorumlu olan temel mekanizma olarak tanımlanmaktadır.(46) Genel olarak üretilmiş nöronların yaklaşık yarısının nörogenез sırasında santral sinir sistemi matürasyonunu tamamlayıncaya kadar öldükleri varsayılmaktadır. Nöronların çok sayıda ölümü sinapsların tam olarak oluşmadığı, gelişim sürecinde olur. Bu dönemde, doğumda aşırı sayıda olan nöronların sayısı uygun sinaptik ağın sağlanabilmesi için azalır. Optimum sayıda nöronun optimum sayıda sinaptik bağlantı içinde olabilmesi için bu nöron kayıpları gereklidir. Bahsedilen bu hücre ölümleri apoptozisle gerçekleşir.(33)

Nörodejeneratif hastalıklarda nöronal ölüm tamamen açıklanamamakla birlikte poliglutamin artışı birçok ataksiler, amyotrofik lateral sklerozis (ALS), AH ve iskemik beyin hasarı gibi nörodejeneratif hastalıklarda nöron ölümünün apoptik yolağın aktivasyonu ile gerçekleştiği bildirilmiştir. Bu bulgular nöronal apoptozun kontrolü ile nörodejeneratif hastalıkların gelişimi arasındaki ilişkiyi desteklemekle birlikte tüm nörodejeneratif hastalıkların tamamen artmış apoptoz nedeni ile gelişen hastalıklar olduğunu ifade etmemektedir. Örnek olarak serum yoksunluğuna maruz kalan kortikal nöron hücrelerinin

ölümü apoptotik programla gerçekleşirken, aynı hücrelerin kainik asit tarafından uyarılması eksitotoksik ölüm mekanizması yolu ile nekroza neden olur.(36) İnsanlarda uygunsuz apoptozun yol açtığı birçok hastalık gözlenmekle birlikte özellikle nörodejeneratif hastalıklar başı çekmektedir ve bu durum iki olasılıkla açıklanabilir: Nöronal hücreler, diğer hücrelere oranla hücre ölüm programlarını tetiklemeye daha hazırdır yada tüm organizmada hücre ölümü gerçekleşir fakat sinir sistemindeki dejenerasyon ölen hücrelerin yerine yenileri konulamaması nedeniyle diğer organlardakinden çok daha ciddidir.

4.5 Oksidatif Hasarın Aracılık Ettiği Nöron Ölümü

Reaktif oksijen türlerinin düzeyi hücrenin antioksidan kapasitesini aştığında hasar verici etkileri ortaya çıkar ki bu durum oksidatif stres olarak tanımlanmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin kontrol edilemeyen aşırı oluşumu, lipid, protein ve DNA'yı da içeren hücresel komponentlerin yıkımına ve sonuçta apoptoz veya nekroz yolu ile hücrenin ölümüne neden olur.(8)

Normal fizyolojik koşullarda, mitokondriyal elektron akışının yaklaşık %1 'inden fazlası süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) radikali oluşumuna neden olur. Bu kısmen indirgenmiş oksijen türleri, çeşitli enzimlerin demir sülfür merkezlerine saldırırlar ancak hücre içinde hızla süperoksit dismutaz enzimi tarafından (SOD1, SOD2, SOD3) hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüştürülürler. Hidrojen peroksit ise, Fenton tepkimesi yolu ile indirgenmiş geçiş metalleriyle reaksiyona girer ve organizma için daha fazla hasar verici olan hidroksil radikalini (OH) oluşturur. Bunun yanı sıra süperoksit radikalleri, hücre içinde hızla nitrik oksit (NO) ile tepkimeye girer ve toksik peroksinitrit ($ONOO^{\cdot-}$) anyonunu oluşturur. Peroksinitrit karbondioksit ile reaksiyona girerek, nitrotirozin ve lipid oksidasyonuna yol açar ve bu yolla protein hasarına neden olur. Normal hücrelerde ve nöronlarda reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu homeostatik kontrol altındadır. Reaktif oksijen türlerinin detoksifiye edilmesinde glutatyon, α -tokoferol, karotenoidler ve askorbik asit gibi biyolojik antioksidanlar görev alır. Deneysel olarak α -tokoferol taşıyıcı protein (α -Ttp) geninde homozigot mutasyon olan farelerde yapılan çalışmalarda fare yaşının 1.yılında retinal dejenerasyon ve spinal kord arka kolonundaki nörodejenerasyon ile korrele yürüme bozuklukları gözlenmiştir. Bu patolojik değişikliklerin α -tokoferol destek tedavisi ile büyük ölçüde önlenildiği gösterilmiştir. Süperoksit dismutaz 2 geni homozigot olarak defektli farelerde, fare yaşının 12. gününde yürüme bozuklukları ile birlikte beyin sapı ve kortikal

bölgelerinde vakuolizasyon gözlenmiştir. Bu sonuçlar antioksidan mekanizmaları kodlayan genlerdeki defektlerin nöron kaybına neden olduğunu göstermektedir.(47,48)

Nörodejeneratif hastalığı olan bireylerin beyinlerinde yapılan postmortem analizlerde oksidatif stres markerleri bulunmuştur. Ancak oksidatif stresin nörodejeneratif hastalıkların gelişimi ve progresyonunda mı etkili olduğu yoksa hastalıkta sadece bir son evre tablosu mu olduğu tartışma konusudur. Senil plaklar ve nörofibriler yumaklar içeren beyin bölgelerinde yapılan analizlerde DNA oksidasyonu, protein oksidasyonu ve lipid peroksidasyonu gözlemlendiği rapor edilmiştir. Senil plaklarda biriken A β peptidinin oluşturduğu serbest radikallerin AH'nda gözlenen bazı moleküler değişikliklere temel oluşturduğu ileri sürülmüştür. Bununla birlikte bazı diğer çalışmalarda A β peptidinin, primer nedeni farklı olan serbest radikal hasarına karşı hücreyel yanıt veya antioksidan olabileceği ileri sürülmüştür. Oksidatif hasarın, Huntington hastalığı, progresif supranuklear palsi, amyotrofik lateral sklerozis ve prion hastalıkları gibi yaşla ilişkili diğer nörodejeneratif hastalıklarda gözlenen anormal protein birikiminde rolü olduğu rapor edilmiştir.(47)

4.6 Alzheimer Hastalığına Farmakolojik Tedavi Yaklaşımları

Bugün AH tedavisinde Amerikan İlaç Dairesi onaylı yalnızca asetilkolin esteraz inhibitörleri kullanılmaktadır. Tüm diğer tedavi seçenekleri henüz klinik araştırmalar aşamasındadır.

4.6.1 A β Oluşumunu Etkileyen Ajanlar

APP'nin α -sekretaz aktivitesi ile kesilmesi çözünebilir yapıda bir fragman oluşumuna yol açması açısından önemlidir. Oluşan bu fragmanın PC12 hücrelerinde neurite outgrowth'unu uyardığı, fibroblastlarda proliferasyonu artırdığı, kültüre edilmiş nöronları metabolik ve eksitotoksik zararlardan koruduğu bildirilmiştir. Bu non-amiloidojenik yolağın APP işlenmesindeki etkinliğinin artırılması bir tedavi olasılığı olarak değerlendirilmektedir.(15) Amiloidojenik yolağı tetikleyen ve intakt A β oluşumuna neden olan β ve γ - sekretaz enzim aktivitelerinin engellenmesi bir başka tedavi olasılığı olarak düşünülmüştür. Bu enzimlerin aktivasyonlarının inhibe edilmesi toksik A β fragmanlarının oluşumunu yavaşlatarak senil plak oluşumunu azaltacaktır.(18,49)

4.6.2 Asetilkolinesteraz İnhibitörleri

Asetil kolin (ACh) öğrenme ve bellek yeteneklerinde kritik rolü olan bir nörotransmitterdir. ACh kolinasetil transferaz tarafından asetil-CoA ve kolin'den sentezlenir ve sinaptik aralığa salınır. Orada asetilkolinesteraz (AChE) tarafından kolin ve asetik aside hidrolize edilir. AChE aktivitesinin engellenmesi, beynin sinaptik aralıklarında ACh nörotransmisyonunun artmasına ve sonuçta bilişsel fonksiyonların gelişimine olanak tanır.(15)

4.6.3 A β Çökmesini İnhibe Eden Ajanlar: Metal Şelatörler ve β -Tabaka Kırıcılar

AH patogenezinde, alüminyum, demir, çinko ve bakır gibi biyometallerin A β ile ilişkiye girerek A β birikimini ve nörotoksisiteyi artırıcı etki gösterdiği bildirilmiştir. AH olan beyinlerin çeşitli bölgelerindeki demir ve çinko düzeyinin arttığı, bu metallerin oksidatif hasar yolu ile nörodejenerasyonu hızlandırdığı ifade edilmiştir. Bu bulgular ışığında metal şelatörler kullanılarak A β birikiminin inhibe edilebileceği olası bir AH tedavisi yaklaşımı olarak öne sürülmüştür.(50,51)

A β 'nin neden olduğu nörotoksitenin, amiloid fibrilleri ve/veya β -tabaka yapısının oluşumu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Buradan hareketle fibril veya β -tabaka yapısının oluşumunun engellenmesinin tedavi yaklaşımı olabileceği düşünülmüştür. Yapılan bir çalışmada A β 'ne bağlanabilen sentetik bir peptid dizayn edilmiş, monomerler ve oligomerler arasındaki etkileşim engellenerek amiloid fibril yapının önüne geçilmiştir.(15)

4.6.4 Antioksidanlar

AH'nda oksidatif hasarı azaltmak ve antioksidan korumayı artırmak hastalık ilk atağını geciktirmek bir başka tedavi edici yaklaşımdır. Bu nedenle Ginko biloba özü, melatonin, E vitamini, idebenon, selejilin gibi serbest radikal yakalayıcı moleküllerin nöroprotektif etkilerini araştırmak ve tedavi ajanı olabilirliliğini değerlendirmek amacıyla farklı çalışmalar sürdürülmektedir.(15)

4.6.5 Antiinflamatuvar Ajanlar

Retrospektif çalışmalarda, non steroid antiinflamatuvar ilaç (NSAID) kullananlarda AH'nın ilk atak süresinin geciktiği gözlenmiştir. McGeer ve ark. (1996) yayınladıkları bir çalışmada uzun süreli NSAID, kortikosteroid, metotreksat veya diğer antiinflamatuvar ilaç kullanımının AH'ndaki nörodejeneratif süreci baskıladığını öne sürmüşlerdir. Bu hipotez, romatoid artritli hastalarda AH görülme sıklığının anlamlı oranda düşük olduğu raporu ile destek bulmuştur. Lim ve arkadaşları (2000), ibuprofen'in A β birikimi ve senil plak oluşumunu azaltıcı etki gösterdiğini bildirmişlerdir.(15,52)

4.6.6 Östrojen

Östrojen, cinsiyet hormonu fonksiyonlarının yanı sıra memeli beyin dokusunda transmembran reseptör fonksiyonlarını modüle eden, hücre içi sinyal iletiminde görev alan nörotrofik ve nöroprotektif etkili bir moleküldür. Bazı klinik çalışmalarda östrojenin nörodejeneratif hastalıklarla yakından ilişkili olduğunu bildirilmiştir. Menapoz sonrası östrojen replasman tedavisi alan kadınlarda AH gelişme riskinin ve bellek zayıflamalarının azaldığı rapor edilmiştir. Östrojenin yararlı etkisini hangi mekanizma ile gösterdiği açık olmamakla birlikte, APP yarılmada α -sekretuvar yolağı uyardığı, A β 'nin neden olduğu nörotoksiteyi engellediği ve antioksidan gibi davrandığı öne sürülmüştür.(15,53)

4.6.7 A β ile Aşılama

AH'nın etyolojisi ve patogenezi üzerine yapılan çalışmalarda senil plakların büyük bileşeninin A β olduğunun bulunması, A β 'nin AH'nın tedavisi için gerçekçi bir hedef olduğunu düşündürmüştür. Schenk ve arkadaşları ilk kez 1999 yılında , AH amiloidozu gelişmiş transgenik fare modelinde, A β ₁₋₄₂ fragmanı ile basit immünizasyon yapılmasının fare beyinlerinde A β düzeylerini azalttığını, mevcut plaklar üzerine amiloid çökmesini engellediğini ve senil plakların temizlenmesini sağladığını bildirmişlerdir. Aynı grup A β ₁₋₄₂ 'yi tanıyan antikorların periton içine uygulanmasının da immünizasyonu sağladığını bildirmişlerdir.(54)

4.6.8 Olası Bir Nöroprotektif Ajan: Eritropoetin

Epo, 34 kDa ağırlığında, glikoprotein yapıda ve 165 aminoasidden oluşan hematopoetik bir büyüme faktörü, sitokin-hormondur. Fötal yaşamda başlıca üretim yeri

karaciğerdir ancak doğumdan kısa bir süre sonra böbreklerde üretilmeye başlar ve erişkinlikte de devam eder. Epo fonksiyonu gelişim sırasında ve erişkinlikte kırmızı kan hücrelerinin üretilmesi (eritropoezis) için esansiyeldir. EPO'nun görevi kemik iliğinde eritroid öncü hücrelerin canlılığını, çoğalmasını ve farklılaşmasını artırarak eritrosit üretimini kontrol etmektedir. Fötal karaciğer eritropoezinde meydana gelen hatalar veya eksiklikler nedeniyle Epo veya Epo reseptörü (EpoR)'nde fonksiyon kaybı olması embriyonun 13.günde ölümüne neden olmaktadır. Erişkinlerde Epo regülasyonu hipoksi ile kontrol edilir, böbreklerde azalmış arteriyel oksijen düzeyi algılanarak Epo üretimi ve salınımı tetiklenir, sonuçta eritrosit sayısının artmasına yol açılarak dokuların düzenli ve yeterli oksijenizasyonu sağlanır.(55)

Epo ilk kez aplastik anemili hastaların idrarından saflaştırılmıştır. İnsan Epo geni 1985 yılında izole edilerek, klonlanmıştır. 1987 yılında da rekombinant Epo, kronik böbrek yetmezliğinde gelişen anemi, kanser, prematürite, kronik inflamatuvar hastalıklar ve insan immündefekt virüsü enfeksiyonu tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır.(56)

Epo'nun özgül olarak ve yalnızca hematopoetik hücreler üzerine etkili olduğu görüşü, yapılan çalışmalarda EpoR'nün, fötal ve erişkin, insan ve kemirgen sinir sistemlerinde, kültüre edilmiş nöron ve astrosit hücrelerinde ekspresye olduğunun gösterilmesi ile yeni açılımlar kazanmıştır. Diğer yandan insan fötusunda EpoR'nün endotelial hücreler, myokardiyositler, makrofajlar, retinal hücreler, adrenal korteks ve medulla hücreleri, ince barsak, dalak, karaciğer, böbrek ve akciğerde ekspresye olduğu gösterilmiştir.(57) Böbrek kaynaklı Epo'nun kan-beyin bariyeri nedeni ile nöronlara ulaşamayacağı düşüncesi ile MSS'nde Epo üretiminin olması gerekliliği fizyolojik bir koşul olarak değerlendirilmiştir.(12) Epo'nun in vivo ve in vitro değişik hasar modellerinde hücreleri koruyucu etkisinin gösterilmesi bu sitokinin hematopoezis dışında sinir sisteminde de biyolojik rollerinin olduğunu düşündürmektedir.(58,59)

4.6.8.1 Eritropoetin Nöroprotektif Özellikleri

Epo'nun sinir sisteminde normal ve patolojik koşullar altında fonksiyon gösterdiği değişik araştırma gruplarının yaptığı farklı çalışmalarla gösterilmiştir. Nöronlar ve diğer sinir sistemi hücrelerinde eksitotoksik uyarıların varlığı, serum ve büyüme faktörü yokluğu gibi in vitro hasar modellerinde protektif etkisi kanıtlanmıştır.(14,55) Deneysel in vivo global ve fokal iskemi, travma, immün aracılı inflamasyon, subaraknoid hemoraji, toksin uyarılı Parkinsonizm modellerinde koruyucu ve iyileştirici etkileri gözlenmiştir.(14,60) Epo'nun fötal

spinal motor nöronlarını beyin kaynaklı nörotrofik faktör yoksunluğunda ve kainik asit varlığında meydana gelen hücre ölümünden kurtardığı(14), primer nöron kültüründe N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörü aracılı glutamat toksisitesinden koruduğu bildirilmiştir.(12)

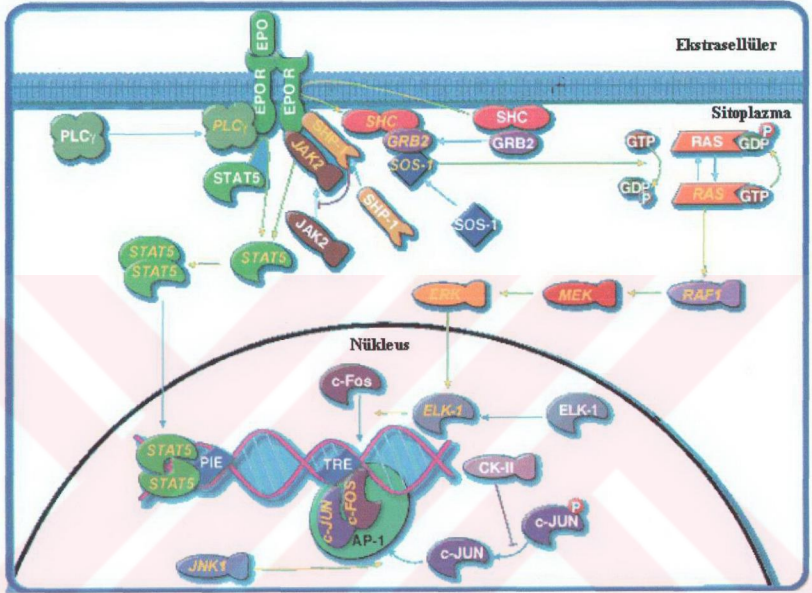
4.6.8.2 Eritropoetin'in Protpektif Etkisinin Mekanizmaları

Epo'in nöroprotpektif etkisini hangi mekanizma ile gösterdiği sorusu tamamen yanıtlanamamıştır. Epo, reaktif oksijen türleri ve glutamat gibi doku hasarı yaratıcı moleküllerin üretimini kısıtlamak, vazospazmı tersine döndürmek, anjiyogenezi stimüle etmek, inflamasyonu modüle etmek ve kök hücrelerini uyarmak gibi birden fazla düzeyde işlevi kombine ederek nöroprotpektif etkisini gösteriyor olabilir.(56)

EpoR sitokin reseptör süperalesinin bir üyesidir ve bu reseptör ailesi üyelerinin sinyalleme mekanizmaları bilinmektedir. Epo reseptörüne bağlandığında reseptörünün dimerizasyonuna neden olur ve reseptöre bağlı janus-tirozin-kinaz-2 (JAK-2) otofosforile olarak reseptör aktivasyonu gerçekleşir. JAK-2 aktivasyonu, "Ras-mitogen activated protein kinase"(MAPK), fosfatidilinozitol-3-kinaz (PI3K) ve "transcription factor signal transducers and activators of transcription-5" (STAT-5) gibi birkaç downstream sinyalleme yolağını tetikler. Hedef hücrede EpoR uyarımının net etkisi proliferasyon, apoptotik hücre ölümünün inhibisyonu ve eritroblastlara özgül olarak hücre farklılaşmasıdır.(59) Hematopoetik hücre hatlarında tanımlanan sinyalleme yollarının nöronal hücrelerde de fonksiyonel olduğu gösterilmiştir. Bu sinyalleme yolları Epo'in nöroprotpektif etkisini göstermesi için kritiktir. Çünkü MAPK ve PI(3)K yollarının spesifik inhibitörleri Epo'in hipoksi ile indüklenen hücre ölümüne karşı koruyucu etkinliğini büyük ölçüde önlemektedir.(60) Aynı sinyalleme mekanizmalarının, beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDGF) ve vasküler endotelial growth faktör (VEGF) gibi diğer growth faktörler tarafından da kullanıldığı gösterilmiştir.Nöronlarda JAK-2, STAT-5 ve nükleer faktör-κB (NFκB) sinyal ileti sistemi arasında etkileşim olduğu bildirilmiştir.(56)

Epo PC12 hücrelerinde kalsiyum kanallarının aktivasyonunu, membran depolarizasyonunu, MAPK aktivitesini uyararak ve NO sentezini artırarak, dopamin salınımını ve tirozin hidroksilaz aktivitesini uyarır. NO'in γ-amino bütirik asit (GABA), dopamin ve asetilkolin gibi nörotransmitterlerin salınımını uyardığının rapor edilmesinden bu yana, Epo'in nörotransmitter salınımını etkisinin bir kısmını NO üretimine neden olarak

gerçekleştirdiği öne sürülmüştür. NO bir transmitter ve immun modulatördür ve hem fizyolojik hem de patolojik koşullarda çok sayıda biyolojik fonksiyon görmektedir.(56)



Şekil 4: Epo'nin sinyal mekanizması.

Epo'nin bir diğer koruyucu etki mekanizması antioksidasyon olabilir. Nöroprotektif etkisini, NO aracılı serbest radikal oluşumunu azaltarak veya bunların oluşturduğu toksisiteyi antagonize ederek gösterdiği öne sürülmüştür. Nöronlarda SOD, glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini artırarak beyin parankimini iskemik hasara karşı korumaktadır. Eritrositlerde sitozolik katalaz ve glutatyon peroksidaz aktivitesini yenileme ve lipid peroksidasyonunu engelleme yolu ile oksidatif hasar sonrasında koruyucu etki gösterdiği bulgularla desteklenmiştir. Gerbil global serebral iske mi, iske mi-perfüzyonun neden olduğu fetal oksidatif hasar ve deneysel spinal kord hasar modellerinde, sistemik Epo tedavisinin hasar sonrası lipid peroksidasyonunu azalttığı rapor edilmiştir.(61,62)

Eksojen olarak verilen Epo, endotelial ve nöronal hücreleri apoptotik hücre ölümünden koruyarak beyin iske mi alanlarını azaltmaktadır. Epo'nin anti-apoptotik etkisi in

vivo ve in vitro çeşitli hücre hasar modellerinde gösterilerek doğrulanmıştır. Sıçan motor nöron kültürlerinde serum yoksunluğu veya kainik asit uyarımının neden olduğu apoptozu engellediği bildirilmiştir. Bu sistemde, Epo 'in koruyucu etkisini göstermesi için önceden uygulanması gerekliliği, gen ekspresyonu için zaman gerekliliği ile açıklanmaktadır ve Epo'in anti-apoptotik etkisini gösterebilmesi için gen ekspresyonunun gerekli olduğunu göstermektedir.(60) Epo mitokondriyal membran potansiyelinin sürdürülmesine katkıda bulunarak, sitokrom c salımının neden olduğu kaspaz-8, 1 ve 3 aktivitesini engeller. Mikroarray tekniği ile yapılan bir çalışmada Epo uygulanmış PC12 hücrelerinde gen ekspresyonlarındaki değişimler incelenmiş, hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu ve sağ kalımında rol oynayan genlerin ekspresyonunun arttığı kanıtlanmıştır. Aynı çalışmada anti-apoptotik bir gen olan bcl-XL geninin ekspresyonunun arttığı, pro-apoptotik bir gen olan bak geninin ekspresyonunun ise azaldığı bildirilmiştir.(55)

Neovaskülarizasyonun uyarılması metabolik olarak hasara uğrayan dokuda perfüzyonu korumaya yardımcı olması Epo tarafından aktive edilen bir başka potansiyel koruyucu mekanizma olabilir. Epo iskemik beyinde anjiyogenezi modüle ederek, kan dolaşımını ve doku oksijenasyonunu artırabilir. Epo'in nöronal öncü hücrelerin çoğalmasını (nörogenez) uyararak etki gösterebileceği olasılığı, özellikle kronik hastalık modellerinde ve kronik Epo uygulamasında nöroprotektif etkisi olabileceğini düşündürmektedir.(56)

Polimorfonükleer lökositlerde EpoR'nün varlığı gösterilmiştir ve Epo'in pro-inflamatuvar sitokin üretimini, serebral iskemi ve deneysel alerjik ensefalomyelit'te (EAE) oluşan inflamasyonu azalttığı bildirilmiştir.(56)

5 GEREÇ ve YÖNTEMLER

5.1 KULLANILAN GEREÇLER, KİMYASAL MADDELER VE SOLÜSYONLAR.....	37
5.1.1 Kullanılan Gereçler	37
5.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler	39
5.1.3 Kullanılan Solüsyonlar	41
5.2 YÖNTEMLER	43
5.2.1 Hücre Kültürü.....	43
5.2.1.1 Hücre kültür kaplarının poli-D-lizin ile kaplanması.....	44
5.2.1.2 Deney koşulları	45
5.2.2 Hücre canlılık testleri	50
5.2.2.1 Trypan mavisi canlılık testi	50
5.2.2.2 MTT canlılık testi	50
5.2.3 Apostain immünofloresan boyama.....	51
5.2.4 Western Blotting Yöntemi.....	53
5.2.4.1 Protein izolasyonu	53
5.2.4.2 Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE).....	55
5.2.4.3 Blotlama.....	56
5.2.5 Nitrik Oksit ölçüm yöntemi.....	57
5.2.5.1 Nitrat Ölçüm Basamakları	58
5.2.5.2 Nitrit Ölçüm Basamakları.....	58
5.2.5.3 Hesaplama ve Değerlendirme.....	59
5.2.6 İstatistiksel analiz	59

5.1 Kullanılan Gereçler, Kimyasal Maddeler ve Solüsyonlar

5.1.1 Kullanılan Gereçler

- Laminer-air flow (Aura SD4 vertikal)
- Karbondioksit inkübatörü (Heal Force HF90)
- Şarjlı pipetör (Pipetcompu Greiner)
- 25 cm² hücre kültür kabı (Falcon 353108)
- 75 cm² hücre kültür kabı (Falcon 353110)
- 6 kuyulu kültür kabı (Greiner 657920)
- 96 kuyulu kültür kabı (Greiner 655920)
- 2ml cryo.s tüp (Greiner Bio-one Kat.No:122278)
- 0.45µm Enjektör Filtre (Schleicher&Schwell Kat.No:462200)
- 2 ml steril pipet, polistren (Falcon 160210)
- 5 ml steril pipet, polistren (Falcon 357543)
- 10 ml steril pipet, polistren (Falcon 357551)
- Pastör fırını (Astell Scientific)
- Faz kontrast mikroskop (Nikon Diaphot 200)
- Işık mikroskobu (Olympus CH-2)
- Masa üstü santrifüj (Sorval® MC12V)
- Vorteks (Velp Zx3)
- Terazi (Presica 2200 SCS)
- Hassas terazi (Presica 205A SCS)
- pH metre (Jenway 3320)
- Mikrodalga fırın (Arçelik)
- Derin dondurucu (-20 C°, Philco)

- Derin dondurucu (-80 C°, Sanyo)
- Buzdolabı (+4 C°, Arçelik)
- Saf su cihazı (Nanopure)
- Ultra saf su cihazı (Elga Maxima)
- Sirkülasyonlu su banyosu (Grant LT D66)
- Güç kaynağı (ATTA Cross Power 500)
- Güç kaynağı (Hoeffer PS500XT)
- İnkübatör (Major Science Dry Bath)
- Vertikal elektroforez ekipmanı (Hoeffer HE600)
- Manyetik karıştırıcı (IKA Labortechnik)
- Gilson Pipetman p10 (0,2µl-10µl)
- Finnpiquette (0.5µl-10µl)
- Finnpiquette (40µl-200µl)
- Finnpiquette (200µl-1000µl)
- 12 ml steril tüp (Greiner 652306)
- 50 ml steril tüp (Falcon 352070)
- Metanol kalemi
- Floresan mikroskop (Nikon ECLİPSE E600)
- Neubauer lamı ve lamel
- Cell scraper (Costar 3010)
- 100-1000 µl Filtreli pipet ucu (Corning Kat.No: 4809)
- 0.5-20 µl Filtreli pipet ucu (Greiner Bio-one Kat.No: 771288)
- 10-200 µl Filtreli pipet ucu (Greiner Bio-one Kat.No: 739288)
- 0.5-20 µl Filtreli jel yükleme pipet ucu (Greiner Bio-one Kat.No: 775288)
- 1.5 ml Tüp (Greiner Bio-one Kat.No: 616201)

- PVDF (polivinil diflorid) membran (Sigma Kat. No: P-2438)
- Blotting kağıdı (Sigma Kat. No: P-6664)
- Buz makinesi (Scotsman AF 100)
- Mikroplate okuyucu (BioRad Novapath)
- Hibridizasyon fırını (Hoefer HB 400)
- Film Banyosu (Medichot 902 S)
- Kodak Biomax Film (Kodak KP106641)
- Dansitometre (BioRad GS700)

5.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Etanol (Carlo ERBA Kat.No: 414608)
- Metanol (Merck)
- N,N'-Metilen -bis-Akrilamid (Sigma Kat. No: M-2022)
- Akrilamid (Sigma Kat. No: A-9099)
- Amonyum persülfat (Sigma Kat.No: A-9164)
- Brom fenol mavisi (Merck Kat.No:61159)
- EDTA pH8.0 0.5M (Applichem Kat.No: 3145)
- İsoopropanol (Applichem Kat.No:A3928-00)
- TEMED (Sigma Kat. No: T-7024)
- Trisma-Base (Sigma Kat. No: T-8524)
- Gliserol (Carlo Erba Kat.No:516852)
- Glisin (Amresco Kat. No: 0167)
- Seebblue plus 2, protein molekül ağırlık belirleyicisi (İnvitrogen LC5925)
- Fetal sığır serumu (Sigma Kat.No: S-0123)
- Donör at Serumu (Sigma Kat.No: S-9133)
- RPMI 1640 (Biochrom AG Kat. No: F-1215)

- FITC konjuge keçi anti fare antikoru (KPL Kat.No: 02-18-03)
- Poly D Lizin (Sigma Kat. No: P-6407)
- Keçi Anti Tavşan IgG HRP konjuge antikoru (Santa Cruze Kat. No: SC-2004)
- Apostain ss DNA (MAB3299, primer antikoru) (Chemicon MAB3299)
- MTT (Sigma M-5655)
- Trypan mavisi (Biochrom AG Kat. No:L 6323)
- Aprotinin (Sigma Kat. No: A-1153)
- Leupeptin (Sigma Kat. No: L-2023)
- Pepstatin (Sigma Kat. No: P-4265)
- PMSF (Sigma Kat. No: P7626)
- Amyloid β fragman 25-35 (Sigma Kat. No: A-4559)
- Tavşan poliklonal kaspaz-8 antikoru (Santa Cruz Kat. No: SC-7890)
- Kaspaz-8 spesifik inhibitörü (Z-IETD-FMK) (Sigma Kat. No: C1230)
- Eritropoetin 2000 IU (NeoRecormon, Roche)
- NP-40 (Applichem Kat. No:A1694)
- SDS (Applichem Kat. No: A-0675)
- BCA Protein assay (Pierce)
- DAPI-Antifade (4,6-diamidino-2 fenilindol) (Vysis Kat.No: 32-804830)
- PC 12 Sıçan Feokrositoma Hücre Hattı (ATCC No: CRL-1721)
- Sığır Serum Albumin (Sigma Kat. No: B-4287)
- Formamid (Applichem Kat. No:A2156)
- DMSO (dimetil sülfoksit) (Applichem Kat. No: A3006)
- β -merkaptotanol (Sigma Kat. No: M3148)
- BSA standardı (Pierce)
- ECL kiti (Ammersham)

- Süt tozu (Santa Cruz Biotech Kat. No: SC-2325)
- Tripsin-EDTA (Biochrom KG Kat. No: L-2143)
- L-glutamin (Biochrom AG Kat. No: 0281)
- Penisilin/ Streptomisin (Biochrom AG Kat. No: A-2210)

5.1.3 Kullanılan Solüsyonlar

- Amonyum persülfat (%10)

1 g Amonyum persülfat 1 ml' ye tridistile dH₂O ile tamamlanır.

SDS (Sodyum Dodesil Sülfat (%10))

10g SDS 90ml dH₂O ile 68°C de çözülür pH HCl ile 7.2'ye ayarlanır ve toplam hacim100ml'ye dH₂O ile tamamlanır.

- Akrlamid-bisakrlamid karışımı (%30)

29 g Akrlamid ve 1 g N,N'-metilenbisakrlamid 60 ml dH₂O ile 37°C de çözülür 100 ml'ye dH₂O ile tamamlanır. 4°C de ışıktan koruyarak saklanır.

- SDS PAGE örnek tamponu (2X)

1.5M Tris (pH6.8) 10 ml, %20 SDS 6 ml, gliserol 30 ml, β-merkaptöetanol 15 ml, brom fenol mavisinden 1.8 g karıştırılarak 100ml'ye dH₂O ile tamamlanır.

- SDS PAGE yürütme tamponu (10X)

10 g SDS, 30.3 g Tris ve 144.1 g Glisin 1L'ye dH₂O ile tamamlanır.

- Transfer Tamponu (10X)

114 g Glisin, 30 g Tris, 20 ml %10 SDS 1L'ye dH₂O ile tamamlanır. Transfer sırasında 1X hazırlanırken son konsantrasyonu %20 metanol olacak şekilde metanol eklenir.

- Lizis Tamponu (10 ml için) :

1 M Tris (pH: 7.5)	200 µl
EDTA (0.5 M)	100 µl
NP-40	100 µl
Aprotinin (1 µg/ml)	250 µl
Leupeptin (100 µg/ml)	250 µl
Pepstatin (1 µg/ml)	250 µl
PMSF	100 µl
Na ₃ VO ₄ (sodyum orthovanadat)	100 µl
Distile su	8.65 ml

- TBS-t Tamponu (1X)

Son konsantrasyonu 10mM Tris.Cl, 100mM NaCl, %1 Tween 20 olacak şekilde hazırlanır. pH 7.5 'a getirilir.

- Poly-D-Lysin

Poly-D-Lysin 1 mg/ml lik konsantrasyonda steril dH₂O da çözülerek ve 500 µl'lik hacimlerde tüplere bölünerek -20 C° de saklanır. Kullanılmadan önce 49.5 ml dH₂O ile karıştırılarak son konsantrasyonu 10µg/ml olacak şekilde hazırlanır.

- MTT stok solüsyonu

20 mg MTT maddesi 10 ml PBS içinde çözülerek, 2 mg/ml stok MTT solüsyonu hazırlanır.

- Glisin Tamponu

Son konsantrasyonu 0.1 M glisin, 0.1 M NaCl olacak şekilde hazırlanır ve pH:10.5 'e ayarlanır.

- % 5 lik bloklama solüsyonu

0.5 gram yağsız süt tozu tartılarak 10ml TBS-t içinde çözülür.

- % 15 serum içeren hücre kültür ortamı
83 ml RPMI 1640
10 ml donör at serumu (56 C° de 30 dakika bekletilerek inaktive edilmiş)
5 ml fetal sığır serumu (56 C° de 30 dakika bekletilerek inaktive edilmiş)
1 ml penisilin/streptomisin
1 ml L-glutamin
(Değerler 100ml ortam hazırlamak üzere verilmiştir.)

5.2 Yöntemler

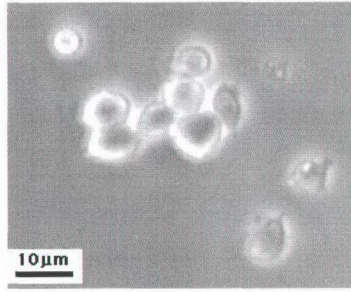
Bu tez çalışmasında sırası ile uygulanan yöntemler ve amaçları şöyle özetlenebilir.

- Hücrelerin kültür kabının yüzeyine tutunabilmeleri için tüm hücre kültür kapları poli-D-lizin ile kaplandı.
- Deneyler için uygun sayıda hücre uygun kaplara ekildi. Epo ve Aβ ilaveleri yapıldı.
- Canlılık testleri uygulanarak, Epo ve Aβ'ne yanıtları değerlendirildi.
- Apostain immünofloresan boyama yöntemi ile apoptotik hücreler görüntüleri ve değerlendirildi.
- Westernblotting yöntemi uygulandı ve kaspaz-8 aktivasyonu değerlendirildi.
- Hücre kültür ortamlarında Epo'in oksidatif stres üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla NO analizi yapıldı.

Bu yöntemlerin tüm detayları aşağıda sırası ile açıklanmıştır.

5.2.1 Hücre Kültürü

Bu tez çalışmasında kullanılan PC12 hücre kültürü hattı ticari olarak ATCC (American Tissue Culture Collection) firmasından sağlandı. PC12 hücre hattı ilk kez 1976'da Greene ve Tischler tarafından sıçan feokromasitomasından klonlanmıştır. Adrenal bezden köken alan tek hücre klonudur. Hücre morfolojisi poligonal görünümündedir.



Resim 1: PC 12 hücrelerinin faz-kontrast mikroskoptaki görüntüsü, (x100)

Kültüre edilmiş hücreler süspende veya adhere olmak üzere iki çeşittir. PC 12 hücreleri adheran özellikte, kültür kabının yüzeyine yapışarak yaşayan ve küçük kümeler halinde çoğalan hücrelerdir. Ancak, bu hücreler plastik yüzeylere tutunabilmekte zorlandıklarından, tutunmalarını kolaylaştırmak ve artırmak amacıyla, kültür kaplarının yüzeyleri kollagen, laminin, polilizin gibi kaplama maddeleri ile kaplanmaktadır. Bu tez çalışmasında PC 12 hücrelerinin çoğaltıldığı ve deneylerin yapıldığı tüm kültür kaplarının yüzeyleri poli-D-lizin (PDL) ile kaplanmıştır.

Kültüre edilen hücrelerin her iki-üç günde bir ortamlarının değiştirilmesi gereklidir. PC 12 hücre hattını beslemekte kullanılan %15 serum içeren ortam önceden hazırlanarak 4°C de saklanmıştır. Hücreler besleneceği veya pasaj yapılacağı zamanlarda önceden 37°C ye getirilerek kullanılmıştır.

PC12 hücrelerinde iki katı sayıya ulaşmak için gerekli zaman (doubling time) 92 saattir. Pasaj dilüsyonu (split ratio) 1:3 ila 1:8 arasında önerilmektedir. Hücreleri pasajlamak için yapıştıkları yüzeyden kaldırmak ve kümeleri dağıtarak hücrelerin tek tek ayrılmasını sağlamak gerekmektedir. Pipetin çek-bırak hareketleri ile yüzeyi yıkayarak ve bir akım yaratarak hücrelerin ayrılması sağlanmıştır.

Aşağıda tüm deney setlerinin hazırlanışı ve yöntemler sırası ile açıklanmıştır.

5.2.1.1 Hücre kültür kaplarının poli-D-lizin ile kaplanması

Kültür kaplarının kaplama işlemi için aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır. Tüm basamaklar laminer kabin içinde steril ortamda gerçekleştirilmiştir.

- 1) 10 µg/ml konsantrasyonda hazırlanan stok PDL çözeltisinden standart olarak; 25 cm² lik kültür kaplarına 4 ml,

- 75 cm² lik kültür kaplarına 7 ml,
6 kuyulu kültür kaplarının her bir kuyusuna 2 ml,
96 kuyulu kültür kaplarının her bir kuyusuna 100 µl eklendi.
- 2) Laminer kabin içinde oda sıcaklığında 2 saat bekletildi.
 - 3) Stok PDL solüsyonu geri çekilerek tekrar steril bir kap içine toplandı. (Bu stok solüsyon 4°C de saklanarak toplam 3 kez kaplama işleminde kullanılabilir.)
 - 4) Steril bidistile su ile birkaç defa çekip bırakılarak yıkandı. Bu yıkama işlemi bir kez daha tekrarlandı.
 - 5) Yıkama işleminin ardından kültür kapları kapakları açık olarak kurumaya bırakıldı.Yüzeyin tamamen kuruması için yaklaşık 45 dakika beklendi.
 - 6) Yüzey kuruduktan sonra kapaklar kapatılarak ağızları parafilmle sıkıca sarıldı. Kullanılınca kadar oda ısısında saklandı.

5.2.1.2 Deney koşulları

Bu tez çalışmasında tüm canlılık deneyleri 96 kuyulu kültür kabında, apostain immünofloresan boyama deneyleri 6 kuyulu kültür kabında, westernblotting için protein izolasyonu amaçlı deneyler ise 25 cm² lik kültür kabında gerçekleştirildi. Aşağıda anlatılan basamaklar tüm deney setleri için ortak olan ve bizim çalışmamız için optimize ettiğimiz koşullardır. Tez çalışmasının en başında hücre sayısı, ortam miktarı, inkübasyon süreleri gibi optimizasyonlar ve standardizasyonlar yapılarak tüm deneylerin eşit koşullarda yapılması amaçlandı. Aşağıda ifade edilen sayılar kullanılacak yönteme uygun miktarda hücre elde etmek için kullanılan hücrelerin ekim yoğunluğunu, kapların büyüklüğünü ve ortam hacmini ifade etmektedir.

- Canlılık deneylerinde her bir koşul için 96 kuyulu kültür kabının her bir kuyusuna, 200µl ortam içine 2×10^4 yoğunluğunda hücre ekildi.
- Apostain immünofloresan boyama analizi yapılırken her bir koşul için 6 kuyulu kültür kabının her bir kuyusuna , 2 ml ortam içine 5×10^5 yoğunluğunda hücre ekildi.
- Protein eldesi ve westernblotting analizi yapılırken her bir koşul için 25cm² lik kültür kabına %15 serum içeren 4ml ortam içine 3×10^6 yoğunlukta hücre ekildi.

Hücrelere kültür kabının yüzeyine yapışabilmeleri ve olağan duruma gelebilmeleri için 18-24 saat zaman tanındı. (Bu süre genellikle hücrelerin ekiminin yapıldığı gündüzü takip eden gece boyunca geçen süredir.) Sonraki basamakta kültür kabının yüzeyine tutunan hücrelerin üzerindeki kültür ortamı çekilerek uzaklaştırıldı ve %1 serum içeren yeni ortam ilave edildi. %15 serum içeren ortamın uzaklaştırılması, bu serumda bulunan faktörlerin koruyucu etkisinin ortadan kaldırılması ve koruyucu etkinliği test edilen maddenin etkisiyle serumun olası koruyucu etkisinin ayırtedilebilmesidir. Bu ortamda hücreler 24 saat inkübasyona bırakıldı.

Bu basamağa kadar tüm deney koşulları ortaktır. Bundan sonraki aşamalar, planlanan her bir deney için aşağıda sunulmuştur. Her bir deney en az üçlü setler halinde çalışıldı ve tüm deneyler farklı pasajlardan hücreler üzerinde olmak koşuluyla 3 kez tekrarlandı.

Artan konsantrasyonlarda A β ilavesinin hücre canlılığına etkisini sınamak için yapılan canlılık testlerinin deney koşullarının hazırlanması:

Bu deney koşullarında artan konsantrasyonlarda A β ₍₂₅₋₃₅₎ fragmanı ilave edilmesinin 24 saat inkübasyon sonunda hücre canlılığı üzerine olan etkisi canlılık testleri ile değerlendirildi.

- Her bir koşul için 96 kuyulu kültür kabının her bir kuyusuna, %15 serum içeren 200 μ l ortam içine 2×10^4 yoğunluğunda hücre ekildi.
- Hücrelere kültür kabının yüzeyine yapışabilmeleri ve olağan duruma gelebilmeleri için 18-24 saat zaman tanındı.
- Hücrelerin üzerindeki kültür ortamı çekilerek uzaklaştırıldı ve %1 serum içeren yeni ortam ilave edildi. Bu ortamda hücreler 24 saat inkübasyona bırakıldı.
- Bir kuyuya hiç A β ₍₂₅₋₃₅₎ fragmanı eklenmedi ve bu koşul kontrol koşulu olarak kabul edildi. Diğer kuyulara sırası ile son konsantrasyonu 20 μ M, 40 μ M, 60 μ M, 80 μ M olacak şekilde A β ₍₂₅₋₃₅₎ fragmanı eklendi ve 24 saat inkübe edildi.
- Bu sürenin sonunda Trypan mavisi ve MTT testleri uygulanarak hücre canlılığı değerlendirildi.

20µM Aβ ilavesinin 24.,48.,72. saatler sonunda hücre canlılığına etkisini sınamak için yapılan canlılık testlerinin deney koşullarının hazırlanması:

Bu deney setinde, tüm koşullara son konsantrasyonu 20µM olacak şekilde Aβ₍₂₅₋₃₅₎ fragmanı ilave edilmesinin, artan inkübasyon süreleri sonunda hücre canlılığı üzerine olan etkisi canlılık testleri ile değerlendirildi.

- Her bir koşul için 96 kuyulu kültür kabının her bir kuyusuna, %15 serum içeren 200µl ortam içine 2×10^4 yoğunluğunda hücre ekildi.
- Hücrelere kültür kabının yüzeyine yapışabilmeleri ve olağan duruma gelebilmeleri için 18-24 saat zaman tanındı.
- Hücrelerin üzerindeki kültür ortamı çekilerek uzaklaştırıldı ve %1 serum içeren yeni ortam ilave edildi. Bu ortamda hücreler 24 saat inkübasyona bırakıldı.
- Ertesi gün 72.saat koşuluna son konsantrasyonu 20µM olacak şekilde Aβ₍₂₅₋₃₅₎ fragmanı eklendi. Sonraki gün aynı saatte 48. saat koşuluna son konsantrasyonu 20µM olacak şekilde Aβ₍₂₅₋₃₅₎ fragmanı eklendi. Daha sonraki gün 24.saat koşuluna son konsantrasyonu 20µM olacak şekilde Aβ₍₂₅₋₃₅₎ fragmanı eklendi. En son gün aynı saatte 0.saat koşuluna son konsantrasyonu 20µM olacak şekilde Aβ₍₂₅₋₃₅₎ fragmanı eklendi ve bu koşul kontrol koşulu olarak kabul edildi. Hemen ardından trypan mavisi ve MTT testleri uygulandı. Böylelikle en uzun inkübasyon süresine en baştan başlamak yöntemiyle tüm deney koşulları aynı anda sonlandırılarak analizlerin bir defada yapılması sağlandı.

Epo'in, 20µM Aβ ilavesinin 24 saat sonunda oluşturduğu hücre ölümüne koruyucu etkisini sınamak için yapılan canlılık testlerinin deney koşullarının hazırlanması:

Bu deney setinde, hücre kültür ortamlarına önceden Epo ilave edilmesinin, son konsantrasyonu 20µM olacak şekilde Aβ₍₂₅₋₃₅₎ fragmanı ilave edilerek 24 saat inkübasyon sonunda gerçekleşen hücre ölümünü azaltıcı etki gösterip göstermediği canlılık testleri ile değerlendirildi.

- Her bir koşul için 96 kuyulu kültür kabının her bir kuyusuna, %15 serum içeren 200µl ortam içine 2×10^4 yoğunluğunda hücre ekildi.
- Hücrelere kültür kabının yüzeyine yapışabilmeleri ve olağan duruma gelebilmeleri için 18-24 saat zaman tanındı.

- Hücrelerin üzerindeki kültür ortamı çekilerek uzaklaştırıldı ve %1 serum içeren yeni ortam ilave edildi. Bu ortamda hücreler 24 saat inkübasyona bırakıldı.
- Daha sonra Epo 0.1 U/ml, 0.5 U/ml, 1.0 U/ml, 2.0 U/ml konsantrasyonlarda olacak şekilde ortama ilave edildi. 24 saat boyunca inkübe edildi.
- Bu inkübasyonun ardından son konsantrasyonu 20 μ M olacak şekilde A β ₍₂₅₋₃₅₎ fragmanı ilave edilerek 24 saat inkübe edildi. Hiç Epo eklenmeyen ancak 20 μ M olacak şekilde A β ₍₂₅₋₃₅₎ fragmanı ilave edilen koşul kontrol koşulu olarak kabul edildi. Bu sürenin sonunda trypan mavisi ve MTT testleri uygulanarak hücre canlılığı değerlendirildi.

Apostain immünfloresan boyama analizi için hazırlanan deney koşulları:

Bu deney setinde, hücre kültür ortamlarına önceden Epo ilave edilmesinin, son konsantrasyonu 20 μ M olacak şekilde A β ₍₂₅₋₃₅₎ fragmanı ilave edilerek 24 saat inkübasyon sonunda gerçekleşen apoptotik hücre ölümünü azaltıcı etki gösterip göstermediği apostain immünfloresan boyama yöntemi ile değerlendirildi.

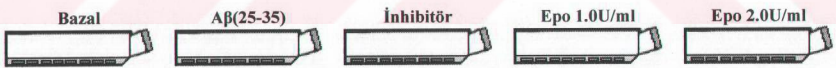
- Her bir koşul için 6 kuyulu kültür kabının her bir kuyusuna, %15 serum içeren 2 ml ortam içine 5x10⁵ yoğunluğunda hücre ekildi.
- Hücrelere kültür kabının yüzeyine yapışabilmeleri ve olağan duruma gelebilmeleri için 18-24 saat zaman tanındı.
- Hücrelerin üzerindeki kültür ortamı çekilerek uzaklaştırıldı ve %1 serum içeren yeni ortam ilave edildi. Bu ortamda hücreler 24 saat inkübasyona bırakıldı.
- Daha sonra Epo 0.1 U/ml, 0.5 U/ml, 1.0 U/ml, 2.0 U/ml konsantrasyonlarda olacak şekilde ortama ilave edildi. 24 saat boyunca inkübe edildi.
- Bu inkübasyonun ardından son konsantrasyonu 20 μ M olacak şekilde A β ₍₂₅₋₃₅₎ fragmanı ilave edilerek 24 saat inkübe edildi. Hiç Epo eklenmeyen ancak 20 μ M olacak şekilde A β ₍₂₅₋₃₅₎ fragmanı ilave edilen koşul kontrol koşulu olarak kabul edildi. Bu sürenin sonunda apostain immünfloresan boyama yöntemi ile apoptotik hücre oranı değerlendirildi.

Western blotting analizi için hazırlanan deney koşulları:

Bu deney setinde, hücre kültür ortamlarına önceden Epo ilave edilmesinin, son konsantrasyonu 20 μ M olacak şekilde A β ₍₂₅₋₃₅₎ fragmanı ilave edilerek 24 saat inkübasyon

sonunda gerçekleşen kaspaz-8 aktivasyonunu nasıl etkilediği western blotting yöntemi ile değerlendirilmiştir.

- Planlanan 5 koşul için 5 adet 25 cm²'lik hücre kültür kabına %15 serum içeren 4ml ortam içinde 3x10⁶ yoğunlukta hücre ekildi.
- Hücrelere kültür kabının yüzeyine yapışabilmeleri ve olağan duruma gelebilmeleri için 18-24 saat zaman tanındı.
- Hücrelerin üzerindeki kültür ortamı çekilerek uzaklaştırıldı ve %1 serum içeren yeni ortam ilave edildi. Bu ortamda hücreler 24 saat inkübasyona bırakıldı.
- Sonraki gün üç koşula hiç Epo ilave edilmedi ve bunlardan birisi bazal olarak isimlendirildi. Diğer iki koşula Epo1.0 U/ml, 2.0 U/ml konsantrasyonlarda olacak şekilde ortama ilave edildi ve 24 saat boyunca inkübe edildi.
- Sonraki gün bazal koşula hiçbir ajan eklenmedi. Bir koşula 20µM olacak şekilde Aβ₍₂₅₋₃₅₎ fragmanı ilave edildi ve bu koşul toksisite koşulu olarak isimlendirildi. Bir başka koşula 1 saat önceden 20µM olacak şekilde kaspaz-8 spesifik inhibitörü eklenerek, diğerleri ile eş zamanlı olarak 20µM olacak şekilde Aβ₍₂₅₋₃₅₎ fragmanı ilave edildi ve bu koşul inhibitör koşulu olarak isimlendirildi. Epo eklenen iki koşula son konsantrasyonu 20µM olacak şekilde Aβ₍₂₅₋₃₅₎ fragmanı ilave edildi. Bu detaylı ifadeleri daha kolay anlatabilmek amacıyla aşağıdaki tablo hazırlanmıştır.



1.Gün	%15 serumlu 4ml ortam içinde PC12 hücre ekildi.			
2.Gün	%1'lik serumlu ortam ile değiştirildi.			
3.Gün			Epo1.0U/ml eklendi	Epo 2.0U/ml eklendi
4.Gün	Aβ ₍₂₅₋₃₅₎ 20µM eklendi	1saat önceden 20µM inhibitör eklendi Aβ ₍₂₅₋₃₅₎ 20µM eklendi	Aβ ₍₂₅₋₃₅₎ 20µM eklendi	Aβ ₍₂₅₋₃₅₎ 20µM eklendi
5.Gün	Protein İzolasyonu			

5.2.2 Hücre canlılık testleri

Hücre ölümünün doğru belirlenmesi için duyarlı, kantitatif, güvenilir ve otomatize edilmiş yöntemlere duyulan ihtiyaç hücre canlılığının ya da ölümünün ölçülebilmesi için birkaç standart testin geliştirilmesine yol açmıştır. Yaygın olarak kullanılan standart yöntemler tripan mavisi, nigrozin, propidium iyodür ya da etidium bromür gibi vital boyaların hücreler tarafından alınması ya da alınmaması ilkesine dayanmaktadır. Ölü ve canlı hücreler ışık mikroskobu ya da floresan mikroskobu altında bu boyalarla farklı boyanma özelliklerine göre ayırt edilmekte ve sayılabilmektedir. Yine MTT redüksiyonu yöntemi, aynı anda birden fazla koşuldaki hücrelerin canlılığını ölçebilme ve koşullar arasında değerlendirme yapabileme imkanı sağlamaktadır.

5.2.2.1 Trypan mavisi canlılık testi

Trypan mavisi testi bir hücre popülasyonunda, yaşayan hücre sayısını belirlemede kullanılan yöntemlerden birisidir. Bu boya negatif yüklü olduğu için hücre membran hasarı olmadığı hücre içine giremez. Böylelikle yaşayan hücreler mavi renge boyanmazlar ama ölü hücreler membran hasarına uğradıkları için trypan boyasını içine alarak mavi renkte görülmürler. Trypan mavisi ile boyama yönteminin test basamakları :

- 1) Hücre süspansiyonu serum fizyolojik veya PBS içinde hazırlanmalıdır. Trypan mavisi serum proteinlerine hücre proteinlerinden daha yüksek afinite ile bağlandığından, hücreler proteinden arındırılmış solüsyon içinde olmalıdırlar.
- 2) %0.4'lük 0.5 ml trypan mavisi test tübüne alınır. Üzerine 0.3 ml PBS ve 0.2 ml hücre süspansiyonu eklenir. Bu karışım nazikçe karıştırılır.
- 3) Hücre süspansiyonunun bir miktarı "Neubauer" lamı üzerine damlatılarak hücreler standart Neubauer lamında hücre sayma kurallarına göre sayılır. Mavi boyanmış hücreler ölü, boyanmayan hücreler ise canlı olarak kabul edilmektedir. Mavi boyayı içine almamış hücrelerin sayısının toplam (mavi+beyaz) hücre sayısındaki payı hesaplanarak canlı hücrelerin oranı yüzde olarak ifade edilir.

5.2.2.2 MTT canlılık testi

MTT redüksiyonu yöntemiyle bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem sağlam hücrelerde mitokondrinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu reaksiyon frajil bir mitokondrial enzim olan süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağlıdır. Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu

mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücrelerin bulunduğu ortam mor renge boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücrelerin bulunduğu ortam ise boyanmamaktadır. Bu yöntem hücrelerin MTT boyasıyla inkübasyonu, presipite reaksiyon ürününün solubilize edilmesi ve reaksiyon ürününün kolorimetrik olarak ölçümü basamaklarından oluşmaktadır. Ayrıntılı deney basamakları şu şekildedir:

- 1) Hücre kültür kabı kuyularına son konsantrasyon 0.4 mg/ml olacak şekilde MTT stok solüsyonundan eklendi.
- 2) Örnekler 37 C° de %5 CO2, %95 hava içeren inkübatörde 3.5 saat bekletildi.
- 3) Kuyuların içerisindeki ortam uzaklaştırıldı.
- 4) Tüm kuyulara 200µl dimetil sülfoksit (DMSO) eklendi ve 37 C° de 30 dakika bekletildi.
- 5) Ölçümden hemen önce tüm kuyulara 50 µl glisin tampon eklendi.
- 6) 96 Kuyulu hücre kültür kabının, elisa plak okuyucusunda 595nm ve 650nm de absorbansları okutuldu.

5.2.3 Apostain immünofloresan boyama

Apoptotik hücre ölümünü saptamak için kullanılan bu yöntemin ilkesi apoptotik hücrelerdeki DNA'nın ısıyla denatürasyona duyarlılığının artmış olmasına dayanmaktadır. Bu yöntemde DNA, formamid'in varlığında ısıyla denatüre edilmekte ve tek iplikli DNA (ssDNA)'ya spesifik MAB3299 antikoru ile işaretlenmektedir. Bu işlem spesifik olarak apoptotik hücrelerin kromatinini boyamaktadır. Kondanse kromatin apoptotik hücre ölümünün kesin bir göstergesi olduğu için, kondanse kromatinin anti-ssDNA antikoruyla immünohistokimyasal olarak gösterilmesi apoptotik hücrelerin spesifik olarak tanınmasını sağlamaktadır. Antikor spesifik olarak deoksitidin ile reaksiyona girmektedir ve tek iplikli DNA'ye bağlanmak için en az 25-30 bazlık bir bağlanma bölgesi gerektirmektedir ve birçok hücre tipinde apoptozu farklı evrelerindeyken belirleyebilmektedir.

Apostain immünofloresan boyama yönteminin test basamakları aşağıdaki gibidir:

- 1) Hücrelerin üzerindeki ortam uzaklaştırılır ve kuyular PBS ile yıkanır.
- 2) Kuyulara tripsin-EDTA eklenerek hücreler kültür plaklarından kaldırılır ve süspansiyon durumuna getirilir.
- 3) Santrifüj tüplerine aktarılan hücreler PBS ile yıkanır.

- 4) Hücre süspansiyonları oda sıcaklığında 5 dakika süreyle ve 1200 rpm devirde santrifüj edilir.
- 5) Santrifüj sonrası süpernatant atılarak pellet 1 ml soğuk PBS ile süspansiyon edilir.
- 6) Hücre süspansiyonları vortekste karıştırılırken yavaşça 6 ml soğuk (-20°C sıcaklıkta) metanol eklenir. Hücreler metanol içinde 16 saat süreyle -20°C sıcaklıkta tutularak fikse edilir.
- 7) Ertesi gün hücre süspansiyonları santrifüj edilir ve süpernatant uzaklaştırılarak pellet, 0.25 ml hacimde ve distile su ile sulandırılan % 50'lik formamid ile süspansiyon edilir.
- 8) Örnekler oda sıcaklığında 5 dk tutulur.
- 9) Tüpler daha sonra 75° sıcaklığa getirilmiş su banyosunda 10 dk tutulur.
- 10) Bu ısıtma işleminden sonra tüpler hemen oda sıcaklığındaki su banyosuna konulur.
- 11) Hücre süspansiyonlarına 2 ml % 3'lük ve yağ içermeyen ve PBS içinde çözülmüş süt tozu eklenir.
- 12) Vortekste karıştırılan örnekler 15 dk süreyle oda sıcaklığında tutulur. Süt tozu non-spesifik boyanmayı önlemek için eklenmektedir.
- 13) Örnekler inkübasyon süresinin sonunda tekrar santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılır ve pellet 100 µl/ örnek hacimde MAB3299 antikoruyla süspansiyon edilir. (Antikor solüsyonu hazırlamak için 1 ml hacimde 100 µg F7-26 antikoruna PBS ile sulandırılmış %1'lik süt tozu süspansiyonundan 9 ml eklenir. final antikor konsantrasyonu 10 µg/ml olmaktadır. Dilüe edilen antikor solüsyonu -20°C sıcaklıkta saklanabilmektedir.)
- 14) Örnekler antikor solüsyonuyla oda sıcaklığında 15 dk inkübe edilir.
- 15) Inkübasyon süresinin sonunda örnekler 1 ml PBS eklenir. Santrifüj aşamasından sonra süpernatant uzaklaştırılır.
- 16) Pellet 100 µl/ örnek hacimde FITC-konjuge keçi-anti-fare sekonder antikoruyla süspansiyon edilir. (Sekonder antikor da PBS ile sulandırılan % 1'lik süt tozu süspansiyonu ile önceden hazırlanmıştır.)
- 17) Sekonder antikor ile oda sıcaklığında 15 dk inkübasyon işleminin ardından örnekler 1 ml PBS eklenir.
- 18) Santrifüj aşamasından sonra pellet tekrar PBS ile süspansiyon edilir.

- 19) Hazırlanan hücre süspansiyonları floresan mikroskopi incelemesi için lam üzerine damlatılır ve kuruması beklenir.
- 20) Lamaların üzerine DAPI-antifade eklenir ve lamel kapatılır.
- 21) Örnekler floresan mikroskopi incelemesi yapılanaya kadar karanlıkta ve 4°C sıcaklıkta tutulur. Farklı alanlardan toplam 300 hücre sayılarak apoptotik olanların yüzdesi hesaplanır.
- 22) Floresan mikroskopi incelemesinde FITC florokromu için yeşil FITC filtresi, DAPI için ise UV filtresi kullanılır.

5.2.4 Western Blotting Yöntemi

Western blotting yönteminde, hücre lizatından elde edilmiş tüm hücre proteinlerinin içinden kaspaz-8 proteinleri spesifik antikor kullanarak ayrıştırıldı ve görüntüleme işlemi yapıldı. Bu yöntem deney koşulları uygulandıktan sonra hücrelerin süspansiyonunda duruma getirilmesi, hücre membranının parçalanarak sitozolik proteinlerin eldesi, her bir koşuldan elde edilen proteinlerin konsantrasyonlarının belirlenmesi, eşit miktarda protein yüklenerek SDS-PAGE ile ayrıştırılması, ayrıştırılan proteinlerin membrana elektrotransferi ve spesifik antikorla işaretlenerek görüntülenmesi basamaklarını kapsamaktadır.

5.2.4.1 Protein izolasyonu

- 1) Kültürler faz-kontrast mikroskop altında kontrol edilir.
- 2) Kültür kapları buz üzerine alınır ve işlem boyunca buz üzerinde tutulmaya devam edilir.
- 3) Lizis tamponu hazırlanır ve buz üzerinde soğumaya bırakılır. Bu işlem sırasında tüm tüplerin ve pipet uçlarının da soğuk olmasına dikkat edilir.
- 4) Kültür kabı içindeki kültür ortamı uzaklaştırılır.
- 5) Kültür kabına 2 ml soğuk PBS eklenir ve flask yüzeyinden hücre kazıyıcı (scraper) ile hücreler kazınır.
- 6) Kültür kaplarında hücre kalmadığı kontrol edildikten sonra hücre süspansiyonu santrifüj tüplerine aktarılır ve önceden soğutulmuş olan santrifüjde 850 rpm devirde, 5 dk süreyle santrifüj edilir.
- 7) Santrifüj sonrası süpernatant atıldıktan sonra pellet tekrar PBS eklenerek süspansiyon haline getirilir ve soğuk eppendorf tüplerine aktarılır.

- 8) Örnekler önceden soğutulmuş olan santrifüjde 850 rpm devirde, 5 dk süreyle santrifüj edilir.
- 9) Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra örneklerin üzerine 100µl soğuk lizis tamponu eklenir.
- 10) Örnekler iki dakikada bir vortekste karıştırılarak lizis tamponu ile buz üstünde toplam 30 dakika inkübe edilir.
- 11) Ardından örnekler 13000 rpm devirde, +4°C sıcaklıkta, 15 dk süreyle santrifüj edilir.
- 12) Santrifüj ardından süpernatantlar alınarak BCA protein assay kiti ile protein ölçümü gerçekleştirilir. Protein ölçümü için standart olarak 2 mg/ml konsantrasyonda olan sığır serum albumin (BSA) kullanılır ve bir dizi dilüsyon ile BSA standartları şu şekilde hazırlanır:

	BSA (µl)	Distile su (µl)
1.	0	100
2.	10	90
3.	20	80
4.	40	60
5.	60	40
6.	80	20
7.	100	0

- 13) Örneklerin bulunacağı tüplere ise 10 µl örnek ve 90 µl distile su konulur.
- 14) Protein ölçümü için BCA protein assay kitinin A ve B solüsyonları 1:50 oranında karıştırılır. Bu reaksiyon karışımından her küvete 1 ml eklenir ve vortekste karıştırılır.
- 15) Reaksiyon oluşumu için örnekler 42°C sıcaklıkta 5 dk bekletilir.
- 16) Spektrofotometrede 562 nm dalga boyunda ölçüm yapılır. Standart eğrisi hazırlandıktan sonra her örneğin içerdiği protein miktarı belirlenir. SDS-PAGE için örnekler içeriğinde 50 µg protein olacak miktarlarda eppendorflara bölünür.

17) SDS-PAGE için kullanılacak olan ve 50 µg protein içeren örneklere yükleme tamponu eklenerek vortekste karıştırılır.

18) Yükleme tamponu eklenen örnekler 95°C sıcaklıkta 5 dk kaynatılır ve elektroforez yapılıncaya kadar oda sıcaklığında saklanır.

5.2.4.2 Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Protein izolasyonu tamamlandıktan ve yükleme tamponu ile kaynatıldıktan sonra proteinler SDS-PAGE ile ayrılır. Proteinleri ayırmak için % 12'lik SDS-Poliakrilamid jeli hazırlanır. Jel hazırlanmadan önce cam levhalar jelin cama yapışmasını önlemek için isopropanol ile silinir. Daha sonra cam levhalar arasına aralayıcı (spacer) yerleştirilir ve jel hazırlığı aşamasına geçilir. Bu jelin içeriğinde şu maddeler bulunmaktadır.

% 12'lik Separating Jel (Değerler toplam 10 ml jel hacmi için verilmiştir):

Distile su	3.3 ml
% 30 akrilamid-bisakrilamid karışımı	4.0 ml
Tris (1.5 M; pH: 8.8)	2.5 ml
SDS (% 10)	0.1 ml
Amonyum persülfat (% 10)	0.1 ml
TEMED	0.004 ml

TEMED, akrilamid-bisakrilamid'in polimerizasyonu için kullanılmaktadır. Karışıma en son amonyum persülfat ve TEMED eklendikten sonra jel hemen dökülmektedir ve döküldükten sonra üzerine hava kabarcıklarını önlemek ve jelin havayla temasını kesmek için isopropanol eklenmektedir. Separating jelin polimerize olması için yaklaşık 1 saat beklenir ve sonra üzerindeki isopropanol uzaklaştırılır.

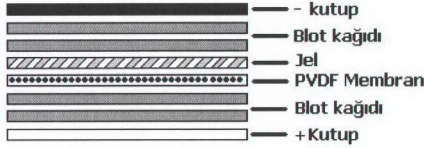
% 5'lik Stacking Jel, (Değerler 10 ml jel hacmi için verilmiştir):

Distile su	6.8 ml
% 30 acryl-bisacrylamide karışımı	1.7 ml
Tris (1.5 M; pH: 8.8)	1.25 ml
SDS (% 10)	0.1 ml
Amonyum persülfat (% 10)	0.1 ml
TEMED	0.001 ml

Stacking jel hazırlanarak separating jelin üzerine dökülür. Stacking jel döküldükten sonra kuyucukları hazırlamak için cam levhaların üst bölümüne tarak yerleştirilir. Jel polimerizasyonu gerçekleştikten sonra tarak çıkarılır. Önceden içinde 25 µg protein olacak şekilde hazırlanmış ve yükleme tamponu ile kaynatılmış örnekler kuyulara yüklenir. Örneklerin jelde yürütülmesi sırasında protein moleküler ağırlık belirleyicisi kullanılır. Örneklerle 25mA akım uygulanarak protein ağırlık belirleyicisinin 20kD'luk bantı separating jelin pozitif kutup yönünde alt ucuna doğru ayrımlandığında akım durdurularak elektroforeze son verilir. Bu işlem tamamlandıktan sonra jeldeki proteinlerin membrana transferi aşamasına geçilir.

5.2.4.3 Blotlama

Yüksek emicilik özelliği olan ve jel ile aynı boyutta hazırlanmış iki adet kurutma kağıdı transfer tamponu ile ıslatıldıktan sonra elektroblotter kasedindeki süngerlerin üzerine yerleştirilir. Jel de bu kağıtların üzerine yerleştirilir. Poli Vinil DiFlorür (PVDF) membran yine jel ile aynı boyda kesilir, metanol kalemi ile sol üst köşesine tanımlama amacıyla tarih yazılır ve metanol içinde 2 dakika bekletildikten sonra transfer tamponu ile yıkanarak jelin üzerine kapatılır. Yine jel ile aynı boydaki iki adet kurutma kağıdı transfer tamponu ile ıslatıldıktan sonra membran üzerine kapatılır ve bu katmanların en üstü bir pipet yardımı ile yuvarlanarak hava kabarcıkları çıkartılır. Sonra kaset kapatılarak elektroblotter cihazına membran pozitif elektroda gelecek şekilde yerleştirilerek elektroblotter tankı transfer tamponu ile doldurulur. Transfer tankının içine manyetik çubuk atılarak tamponun düşük hızda sürekli karıştırılması sağlanır. Elektrotransfer işlemi oda sıcaklığında 300 mA akımda 1.5 saat uygulanır.



Şekil 5: Blotting aşamasında jel ve membran yerleşimi

Transfer işleminin ardından membran plastik bir kabın içine alınır ve burada blokama solüsyonunda 2 saat tutulur. Blokama solüsyonu kullanım öncesi taze olarak hazırlanır ve non-spesifik bağlanmaları önlemek için kullanılır.

Bu işlemin ardından membran 1/500 dilüsyonda poliklonal tavşan anti-kaspaz-8 antikoruna ile +4°C sıcaklıkta gece boyunca inkübe edilir.

Ertesi sabah membran, 3 kez 10 dakika süre ile TBS-t ile yıkanır.

Membran, 1/3500 dilüsyonda HRP konjuge anti-tavşan IgG antikoruna ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilir.

Sonraki aşamada membran 4 kez 15 dakika süre ile TBS-t ile yıkandıktan sonra şeffaf bir dosyanın içine yerleştirilerek bir film kasetine aktarılır. Görüntüleme için kemilüminesans yöntemine dayanan hazır ECL kiti kullanılır. ECL kitinden 2 ml eklenir. Daha sonra kemilüminesansa duyarlı filmle görüntü elde edilir. Film karanlık ortamda değişen sürelerde membran üzerinde tutularak kemilüminansa maruz bırakılır ve sonra Radyoloji Anabilim Dalı mamografi ünitesinde hazır bulunan klasik film banyosunda banyo edilerek görüntüleme tamamlanır.

Bu tez baskısında kağıt üzerinde gösterilen western blotting bulgusu görüntüleri, radyolojik film görüntüsünün dansitometre (Biorad GS-700) cihazında taranması ile elde edilmiş ve dijital olarak işlenilerek kağıt baskısına aktarılmıştır.

5.2.5 Nitrik Oksit ölçüm yöntemi

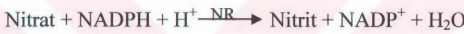
Memeli hücrelerinde, bazik amino asit L-arjinin ve moleküler oksijen substrat olarak kullanılarak Nitrik Oksit sentaz enziminin aktivitesi ile nitrik oksit (NO) sentezlenir. Biyolojik sıvılarda NO su ve oksijen varlığında oksidasyon yolu ile nitrite (NO₂) ve nitrate (NO₃) a dönüştürülerek inaktive edilir. Kullanılan bu test, nitrik oksitin bu oksidasyon ürünlerinin fotometrik olarak belirlenmesine dayanmaktadır. Örnek içindeki nitrat miktarını

ölçebilmek için öncelikle nitratlar nitrite indirgenir ve sonraki renk reaksiyonu ile oluşan kırmızı menekşe renkli bileşiğin absorbansı ölçülür. Nitrit ölçümü ise indirgenme basamağı olmaksızın renk reaksiyonu ile yapılır.

Bu çalışmada deney koşulları uygulandıktan sonra hücre kültür ortamında ticari kit (Roche Kat. No:1756281) kullanılarak nitrit ve nitrat analizleri yapıldı. Deney koşulları uygulanırken fenol kırmızısının, nitrit ve nitrat analizini interfere etmemesi amacıyla fenol kırmızısı içermeyen RPMI 1640 hücre kültür ortamı kullanıldı. PC12 hücreleri, hücre kültür kabının yüzeyinden mekanik yıkama ile kaldırıldı ve 850 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatanda nitrit ve nitrat analizi yapıldı.

5.2.5.1 Nitrat Ölçüm Basamakları

Örnek içeriğindeki nitrat, nitrat redüktaz enziminin varlığında nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) ın yükseltgenmesi ile nitrite indirgenmektedir.



(37°C de 30 dakika inkübe edilir.)

Oluşan nitrit molekülü sulfonilamid ve N-(1-Naftil) etilendiamin varlığında kırmızı menekşe renkli diazo bileşiğine dönüşür.

Nitrit + sulfonilamid + N-(1-Naftil) etilendiamin \longrightarrow Kırmızı-menekşe renkli diazo bileşiği

Oluşan bu diazo bileşiği de 550 nm de absorbans vermektedir.

Nitrat ölçümü için kit ile beraberinde verilen 80mM potasyum nitrat standardından bir dizi dilüsyon işlemi ile 80µM, 16µM, 8µM, 4µM, 1.6µM, 0.8µM, 0.4µM ve 0.25µM konsantrasyonlarda potasyum nitrat standartları elde edildi. Bu standartlar kullanılarak test basamakları izlendi, 550nm'de absorbansları ölçüldü ve standart eğrisi hazırlandı. Gerekli deney koşulları sağlandıktan sonra test basamakları uygulanarak 550nm de örneklerin absorbansları ölçüldü. Standart eğrisi ile kıyaslanarak konsantrasyonları hesaplandı.

5.2.5.2 Nitrit Ölçüm Basamakları

Örnekler içinde var olan nitrit düzeyini saptamak için indirgenme reaksiyonu olmaksızın sadece renk reaksiyonu kullanılarak analiz yapılır.

Nitrit molekülü sulfonilamid ve N-(1-Naftil) etilendiamin varlığında kırmızı menekşe renkli diazo boyasına dönüşür.

Nitrit + sulfonilamid + N-(1-Naftil) etilendiamin \longrightarrow Diazo bileşigi

Oluşan bu diazo bileşiginin 550 nm de absorbanşı ölçülür.

Nitrit ölçümü için, sodyum nitrit kullanılarak, nitrit standartları hazırlandı ve bu standartlar kullanılarak standart eğrisi hazırlandı. Test basamakları uygulanarak 550 nm de örneklerin absorbanşı ölçüldü. Standart eğrisi ile kıyaslanarak konsantrasyonları hesaplandı.

5.2.5.3 Hesaplama ve Değerlendirme

Nitrat (μM)= [Nitrat ölçümü (inkübasyon ile)- Nitrit ölçümü (inkübasyon yok)] olarak hesaplandı ve değerlendirildi.

Nitrit (μM) ise direkt olarak analiz sonuçlarından elde edilen veriler değerlendirildi.

Nitrat ve nitrit düzeylerinin toplamı nitrik oksit düzeyi olarak değerlendirildi.

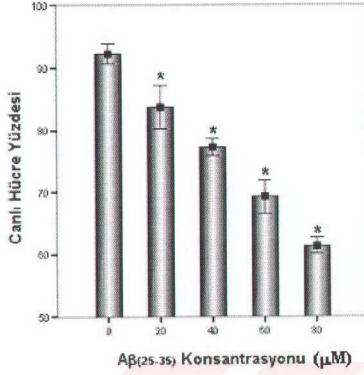
5.2.6 İstatistiksel analiz

Bu tez çalışmasının bulgularının istatistiksel olarak değerlendirmesinde SPSS 11.5 istatistik programı kullanıldı. Grupların ortalamaları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlılığını değerlendirmek için non-parametrik testlerden Mann-Whitney U testi kullanıldı. Tüm istatistiksel analizlerde anlamlılık değeri $p < 0.05$ olarak seçildi.

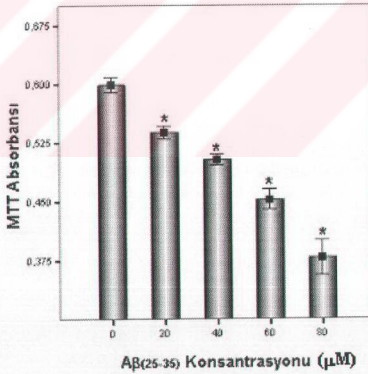
6 BULGULAR

6.1	CANLILIK TESTLERİNİN SONUÇLARI.....	61
6.2	APOSTAİN İMMÜNOFLORESAN BOYAMA YÖNTEMİ SONUÇLARI	64
6.3	WESTERN BLOTTİNG YÖNTEMİ SONUÇLARI	66
6.4	NİTRİK OKSİT ANALİZİ SONUÇLARI.....	66

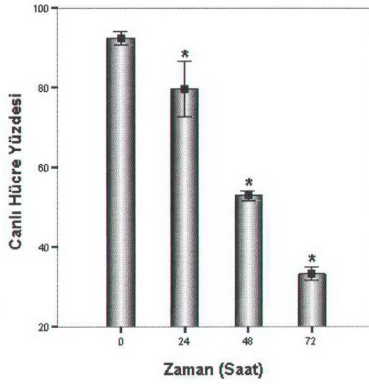
6.1 Canlılık testlerinin sonuçları



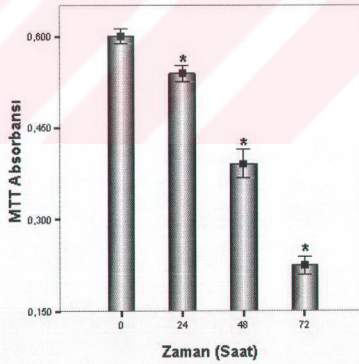
Şekil 6 : Artan konsantrasyonlarda Aβ₍₂₅₋₃₅₎ fragmanı ilavesinin 24 saat sonunda PC12 hücrelerinin canlılığına etkisinin Trypan mavisi ile boyama yöntemi ile değerlendirilmesi. Hiç Aβ₍₂₅₋₃₅₎ fragmanı ilave edilmemiş koşulun hücre canlılığı ile karşılaştırıldığında, Aβ₍₂₅₋₃₅₎ fragmanı ilave edilmiş koşulların hücre canlılığındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (p<0.05)



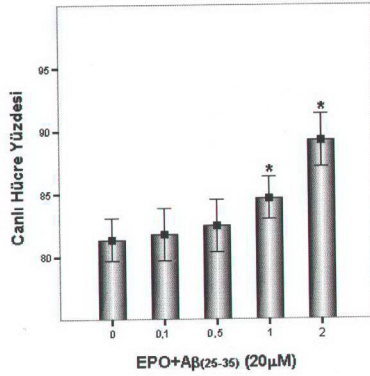
Şekil 7 : Artan konsantrasyonlarda Aβ₍₂₅₋₃₅₎ fragmanı ilavesinin 24 saat sonunda PC12 hücrelerinin canlılığına etkisinin MTT redüksiyonu yöntemi ile değerlendirilmesi. Hiç Aβ₍₂₅₋₃₅₎ fragmanı ilave edilmemiş koşulun hücre canlılığı ile karşılaştırıldığında, Aβ₍₂₅₋₃₅₎ fragmanı ilave edilmiş koşulların hücre canlılığındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (p<0.05)



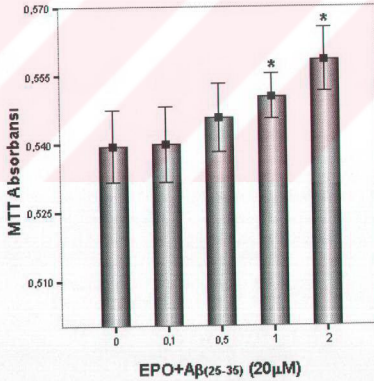
Şekil 8 : 20 µM konsantrasyonda Aβ (25-35) fragmanı ilave edilmesinin 0.,24.,48. ve 72. saatlerin sonunda PC12 hücrelerinin canlılığına etkisinin Trypan mavisi ile boyama yöntemi ile değerlendirilmesi. 0. saatte Aβ (25-35) fragmanı ilave edilmiş koşulun hücre canlılığı ile karşılaştırıldığında diğer koşulların hücre canlılığındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (p<0.05)



Şekil 9 : 20 µM konsantrasyonda Aβ (25-35) fragmanı ilave edilmesinin 0.,24.,48. ve 72. saatlerin sonunda PC12 hücrelerinin canlılığına etkisinin MTT redüksiyonu yöntemi ile değerlendirilmesi. 0. saatte Aβ (25-35) fragmanı ilave edilmiş koşulun hücre canlılığı ile karşılaştırıldığında diğer koşulların hücre canlılığındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (p<0.05)

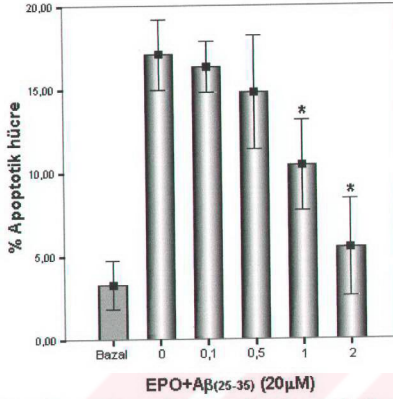


Şekil 10 : 20µM konsantrasyonda Aβ (25-35) fragmanı ilave edilmeden önceki 24 saat boyunca değişik dozlarda EPO ilave edilmesinin PC12 hücrelerinin canlılığına etkisinin Trypan mavisi ile boyama yöntemi ile değerlendirilmesi. EPO ilave edilmemiş ve 20 µM konsantrasyonda Aβ (25-35) fragmanı ilave edilmiş koşulun hücre canlılığı ile karşılaştırıldığında, 0,1 ve 0,5 U/ml EPO ilave edilmiş koşulların hücre canlılığındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. ($p>0.05$) Ancak 1 ve 2 U/ml EPO ilave edilmiş koşulların hücre canlılığındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ($p<0.05$)

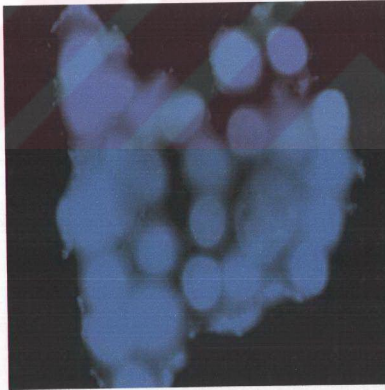


Şekil 11 : 20 µM konsantrasyonda Aβ (25-35) fragmanı ilave edilmeden önceki 24 saat boyunca değişik dozlarda EPO ilave edilmesinin PC12 hücrelerinin canlılığına etkisinin MTT redüksiyonu yöntemi ile değerlendirilmesi. EPO ilave edilmemiş ve 20 µM konsantrasyonda Aβ (25-35) fragmanı ilave edilmiş koşulun hücre canlılığı ile karşılaştırıldığında, 0,1 ve 0,5 U/ml EPO ilave edilmiş koşulların hücre canlılığındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. ($p>0.05$) Ancak 1 ve 2 U/ml EPO ilave edilmiş koşulların hücre canlılığındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ($p<0.05$)

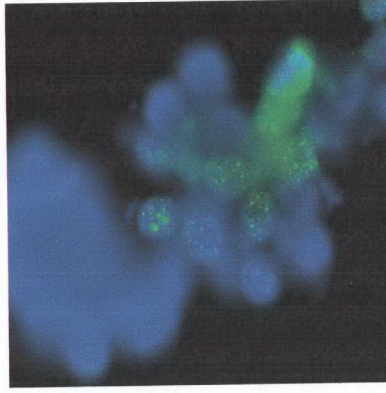
6.2 Apostain immünofloresan boyama yöntemi sonuçları



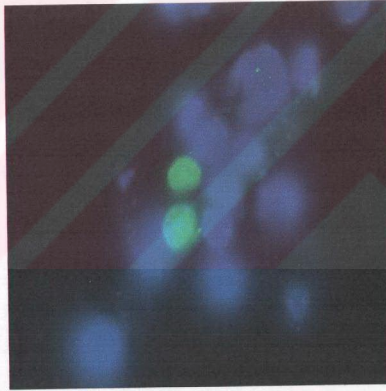
Şekil 12 :Değişik koşullar uygulanmış PC12 hücrelerinin apostain immünofloresan boyama yöntemi ile analiz edilen apoptotik hücre yüzdeleri. Hiçbir ajan eklenmemiş bazal koşullardaki PC12 hücrelerinde apoptotik hücre oranı 3.3 ± 1.4 olarak bulunmuştur. Hiç EPO ilave edilmemiş ve 20 µM konsantrasyonda Aβ (25-35) fragmanı ilave edilmiş koşulun apoptotik hücre yüzdesi ile kıyaslandığında, 0,1 ve 0,5 U/ml EPO ilave edilen koşulların apoptotik hücre yüzdesindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir. ($p > 0.05$) Ancak 1 ve 2 U/ml EPO ilave edilen koşulların apoptotik hücre yüzdesindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ($p < 0.05$)



Resim 2: Apostain immünofloresan boyama yöntemi uygulanmış bazal koşuldaki PC12 hücrelerinin epifloresan mikroskopta, Kromo 83006 UV/DAP/FITC/ TXRD bilgisayar kontrollü filtre seti kullanılarak x1000 büyütme ile elde edilen görüntüsü

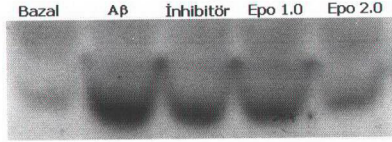


Resim 3: Apostain immünofloresan boyama yöntemi uygulanmış $20\mu\text{M}$ $\text{A}\beta(25-35)$ eklenmiş koşuldaki PC12 hücrelerinin epifloresan mikroskopta, Kromo 83006 UV/DAP/FITC/ TXRD bilgisayar kontrollü filtre seti kullanılarak $\times 1000$ büyütme ile elde edilen görüntüsü



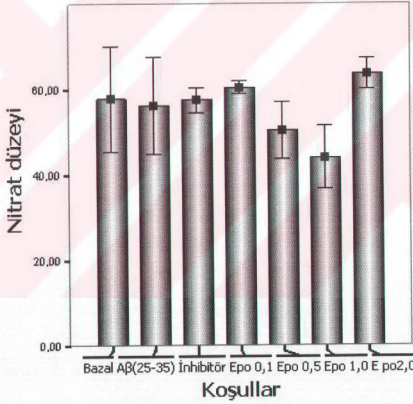
Resim 4 : Apostain immünofloresan boyama yöntemi uygulanmış $20\mu\text{M}$ $\text{A}\beta(25-35)$ ve 2.0 U/ml Epo eklenmiş koşuldaki PC12 hücrelerinin epifloresan mikroskopta, Kromo 83006 UV/DAP/FITC/ TXRD bilgisayar kontrollü filtre seti kullanılarak $\times 1000$ büyütme ile elde edilen görüntüsü.

6.3 Western blotting yöntemi sonuçları

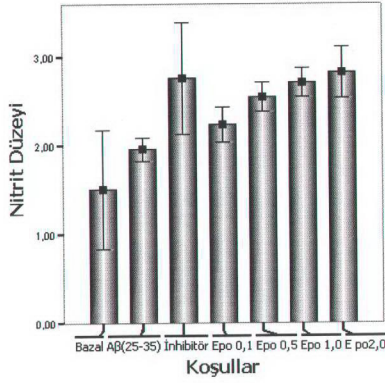


Resim 5: Kaspaz-8'in aktivasyonu sonucu ayrılan 20 kDa'luk altbiriminin, Kaspaz-8 antikoruna ile problanması ile elde edilen western blot sonuçları

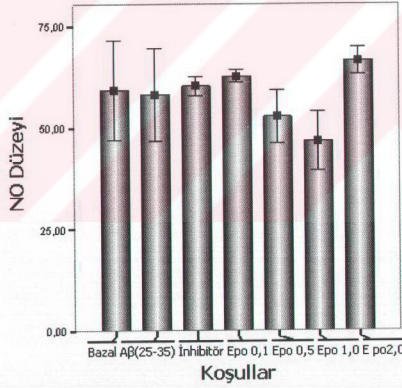
6.4 Nitrik oksit analizi sonuçları



Şekil 13: Değişik koşullar uygulanmış PC12 hücre kültürü ortamlarının nitrat düzeyi analiz sonuçları. Hiçbir ajan eklenmeyen koşula göre diğer koşullar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. ($p > 0,05$)



Şekil 14: Değişik koşullar uygulanmış PC12 hücre kültür ortamlarının nitrit düzeyi analiz sonuçları. Hiçbir ajan eklenmeyen koşula göre diğer koşullar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. ($p>0.05$)



Şekil 15: Değişik koşullar uygulanmış PC12 hücre kültür ortamlarının NO düzeyi analiz sonuçları. Hiçbir ajan eklenmeyen koşula göre diğer koşullar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. ($p>0.05$)

7 TARTIŞMA

Başta AH olmak üzere tüm nörodejeneratif hastalıklar için ilerlemiş yaş en önemli risk faktörüdür. Geçtiğimiz yüzyılda, endüstrileşmiş ülkelerin 65 yaş ve üzeri popülasyonunda nörodejeneratif hastalıkların görülme sıklığındaki artış, sonraki jenerasyonda bu sorunun hangi boyutlarda olabileceği hakkında ciddi endişe yaratmaktadır. Bu tahminler özellikle tıp dünyasını ve kanun yapıcılarını konu hakkında daha fazla bilgileneceği ve önlem almaya yöneltmektedir. Giderek artan bir şekilde yaşamsal faaliyetlerden mahrum bırakan ve tedaviden yarar sağlanamayan bu hastalıktan etkilenen bireylerin, bakımından sorumlu olanların ve toplumun üzerindeki duygusal, fiziksel ve parasal yükü her geçen yıl önemli bir artış göstermektedir. Bugüne kadar onay almayı başaran birkaç ilaç bazı nörodejeneratif hastalıklarda kullanılmış, kronik kullanım nedeni ile yan etkiler ortaya çıkmış ancak hastalığın ilerlemesini durdurmayı başaramamıştır.(2) Nöronların rejenerasyon yeteneği olmadığından hastalık ortaya çıkmadan önce koruyucu ve/veya engelleyici etkin tedavi yönteminin geliştirilmesi gerekliliği önem kazanmıştır.(63) Bu nedenle nörodejeneratif hastalıklarda nöron ölümünün nedenleri ve mekanizmalarının tamamen aydınlatılması bir zorunluluk haline gelmiştir.

Nörodejeneratif hastalıklarda, hatalı katlanmış proteinlerin oligomerik topluluklarının, farklı nöronal popülasyonlarda hasara neden olduğu bilinmektedir ve bunun en çarpıcı örneği AH'nda görülmektedir. Limbik sistemde ve korteksteki nöronlarda ilerleyici olarak fonksiyon kaybı vardır ve bilişsel fonksiyonlar giderek azalmaktadır. Bu hücre fonksiyon kaybının başlamasına ve ilerlemesine neden olan faktörlerin en başında ise A β 'nin artmış düzeyleri ve birikimi gelmektedir.(64) A β 'nin senil plak yapısında ve beyin damarlarında birikerek, AH patolojisinin gelişimine öncülük ettiği genetik, patolojik ve biyokimyasal çalışmalarla gösterilmiştir.(4, 80) Plak yapısına katılan A β , APP'nin β -sekretaz ve γ -sekretazlar tarafından kesilmesi ile 40 yada 42 amino asit uzunluğunda fragmanlardan oluşmaktadır.(21) AH'nı oluşmadan önce kontrol altına alabilmek, senil plakların oluşumunu engellemek, dolayısı ile amiloidojenik A β oluşumunu en aza indirmek veya katabolizmasını hızlandırmak bazı araştırmacılar tarafından en rasyonel tedavi olasılığı olarak öne sürülmektedir.(49,63,65)

A β 'nin neden olduğu nörodejenerasyonda nöron ölümü mekanizmalarını aydınlatmak, A β 'nin hangi sinyal ileti yollarını aktive ettiğini açıklamak nöron ölümünü engelleyebilecek tedavi ajanlarının ve yöntemlerinin geliştirilmesini sağlayabilir. Bu amaçla, sentetik A β fragmanlarının kullanıldığı in vitro ve in vivo nöron ölümü modelleri araştırmacılar

tarafından yaygın olarak kullanılmaktadır.(66, 67, 68, 69) Bu tez çalışmasında da nöron hasarı yaratan ve hücreleri ölüme sürükleyen toksisite ajanı olarak sentetik A β (25-35) fragmanı kullanılmıştır. A β (25-35) fragmanı non-fizyolojik sentetik bir peptid dizisidir ve toksik özellikleri tam uzunluktaki fizyolojik peptid dizisiyle aynıdır.(67,69) Tez çalışmamızda in vitro deney modeli sıçan feokromositoma hücre hattı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kısa PC 12 olarak isimlendirilen hücre hattı saf nöron hücrelerini içermektedir ve deneysel AH modeli çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır.(66) Hücre hatlarının avantajı saf ve homojen olması ve western blotting gibi çok fazla sayıda hücre kullanılmasının gerektiği moleküler biyolojik yöntemler için yeterli sayıda hücre elde edilmesini sağlamasıdır. Deneysel AH modeli oluşturmak için PC12 hücre kültür ortamına hangi miktarda A β (25-35) fragmanı ekleneceği ve ne kadar süre uygulanacağına ait veriler literatürde farklı araştırmacılar tarafından açık olarak bildirilmiştir. Jung-Hee Jang ve ark. 2003 te yayınladıkları makalelerinde(69), PC12 hücrelerini 50 μ M A β (25-35) fragmanı ile 36 saat boyunca inkübe etmenin, faz-kontrast mikroskopta hücre morfolojisini değiştirdiğini ve apoptotik hücre ölümünün belirteçlerini ortaya çıkardığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada submikromolar konsantrasyonlarda (0.01 μ M -0.1 μ M) A β (25-35) fragmanı ilavesinin 36 saat sonunda metabolik defektler için yeterli olduğunu ifade etmişlerdir.(69) Wanli Wei ve ark. 2002 yılında yayınladıkları çalışmalarında(67), AH ve Down sendromlu hastaların beyinlerinde diffüz plak yapısında çok miktarda gözlenen ve p3 peptidi olarak isimlendirilen A β (17-42) fragmanının toksik etkisini araştırmak ve bilinen diğer fragmanlarla karşılaştırmak amacıyla insan nöroblastoma hücre hattını kullanmışlardır. Aynı araştırmada, A β (1-40), A β (1-42), A β (25-35), A β (17-40), A β (17-42) fragmanları 20 μ M konsantrasyonlarda kullanılarak 48 saatin sonunda yaratılan toksik etki, kontrol ile karşılaştırıldığında A β (25-35) fragmanının istatistiksel olarak en yüksek anlamlılıktaki toksisiteyi oluşturduğunu göstermişlerdir.(67) Q.L.Peng ve ark.(2002), pycnogenol'un nöronları koruyucu etkisini araştırdıkları bir çalışmayı, PC12 hücre hattında A β (25-35) fragmanı ile 24 saat boyunca inkübe ederek yaratılan deneysel nörotoksosite modeli ile gerçekleştirmişlerdir.(66) Tüm bu çalışmalarda hücre canlılığı veya hücre ölümü trypan mavisi ile boyama, MTT redüksiyonu, laktat dehidrogenaz salınımı gibi canlılık testleri ile değerlendirilmiş ve genellikle veriler yüzde oranı olarak ifade edilmiştir.(5,6,10,66,67,69) Deneysel modeli oluşturmak için gerekli veriler literatürde mevcut olmasına rağmen, bu tez çalışmasında deneysel model koşullarını optimize edebilmek ve verilerin literatürle benzer olup olmadığını sınamak amacıyla bir dizi toksisite deneyi planlanmıştır ve literatürde kullanılan yöntemler örnek alınarak canlılık

testleri uygulanmıştır. Hücre hattının fenotipik ve fonksiyonel özellikleri, köken aldığı hücre tipinin primer kültürlerinkinden farklılık gösterebilir. Bu farklılıklar in vitro ortamda pasajlar sırasında da oluşabilir. Bu nedenle hücre hattının yayınlanmış fenotipik ve fonksiyonel özelliklerinin kullanıcılar tarafından tekrar kontrol edilmesi uygun görülmüştür. Öncelikle artan konsantrasyonlarda A β (25-35) fragmanı uygulanmasının 24 saat sonunda hücre canlılığına etkisi değerlendirilmiştir. Hücre kültür ortamına 20, 40, 60 ve 80 μ M konsantrasyonlarda A β (25-35) fragmanı ilavesinin hiç A β (25-35) fragmanı eklenmemiş kontrol koşuluna göre hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalttığı gözlenmiştir.(p<0.05)(şekil:4 ve şekil:5) Daha sonra, hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaltan en düşük konsantrasyon olan 20 μ M sabit tutulup inkübasyon süresi artırılarak hücre canlılığı testleri tekrar uygulanmıştır. 20 μ M A β (25-35) fragmanı ilave edilen PC12 hücrelerinin canlılığı 0., 24., 48. ve 72. saatlerin sonunda canlılık testleri ile analiz edilmiştir. 24., 48. ve 72. saat koşullarının hücre canlılığı 0.saat kontrol koşulu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalmış bulunmuştur.(p<0.05)(şekil:6 ve şekil:7) Elde ettiğimiz veriler literatüre uygunluk göstermektedir. Benzer çalışmaların yapıldığı makalelerde A β (25-35) fragmanı ilavesinin artan konsantrasyona bağımlı olarak hücre canlılığını azalttığı ifade edilmiştir(6,66,69) Gerek literatürden sağlanan gerekse kendi çalışmalarımızdan elde edilen verilerle tez çalışmasının bundan sonraki deneylerinde nöron ölümüne yol açan A β (25-35) fragmanı konsantrasyonu 20 μ M ve bu toksisiteye maruz kalma süresi 24 saat olarak seçilmiştir. Bu verilere göre 20 μ M konsantrasyon hücre ölümü için yeterli olan en az miktardır ve A β sarfiyatının en aza indirilmesi elimizdeki sınırlı A β miktarıyla deney setlerini tekrarlayabilme olanağı sağlamıştır. Bir hücrede apoptozun tamamlanması için 16-24 saatin yeterli olduğu bildirilmektedir.(70,71) Bizim çalışmamızda da PC12 hücrelerini A β ilave ederek 24 saat inkübe etmek hücre canlılığını azaltıcı etki göstermiştir ve bu veri literatürle uygunluk göstermiştir. Ayrıca deney setlerini 24 saat ve bunun katları şeklinde programlamanın uygulama ve çalışma kolaylığı sağladığı, sabah başlatılan bir setin takip eden günlerde her sabah sürdürülmesi ve sonlandırıldıktan sonraki analizlerin gün içine yayılabilmesi gibi kolaylıklar sağladığı çalışmalar sırasında gözlenmiştir.

AH'nda gözlenen nöron kaybının apoptotik hücre ölümü yolu ile gerçekleştiği bildirilmiştir.(68,72,73,74) Nöron ölümüne yol açan en önemli faktör ise amiloid plak yapısının büyük bileşeni olan A β birikimidir.(75,76) Biriken A β 'nin hücre yüzey proteinleri ile ilişki kurarak hücre içi sinyalleme yollarını aktive ettiği ve programlı hücre ölümünü başlattığı öne sürülmüştür.(68) Bu tez çalışmasında da A β 'nin neden olduğu apoptotik hücre

ölümü apostain immünofloresan boyama yöntemi kullanılarak gösterilmiştir. 20µM Aβ(25-35) fragmanı ile 24 saat boyunca inkübe edilen PC12 hücrelerinin apoptoz yüzdesi hiçbir ajan eklenmeyen bazal koşul hücrelerinin apoptoz yüzdesi ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur.(p<0.05)(şekil:10, resim:2 ve resim:3) Bu yöntemde apoptotik hücre ölümünün en önemli belirteçlerinden biri olan fragmente DNA formamid varlığında ısıtılarak denatüre edilmekte ve tek iplikli DNA 'yı spesifik olarak tanıyan monoklonal MAB3299 antikoru kullanılmaktadır. Bu yöntemin üstünlüğü spesifik antikor kullanılması nedeni ile özgülüğünün yüksek olması ve gerçekten apoptoz yolu ile fragmente olmuş DNA'ı tanıyarak ayırt etmesidir.(77)

MSS hasarlarında, nöronal sağkalımda ve fonksiyonel geri kazanımda dışarıdan verilen büyüme faktörlerinin yararlı etkileri olabilir. Periferik olarak verilen büyüme faktörlerinin proteazlarla parçalanması, kan beyin bariyerini geçememesi ve potansiyel toksik etkileri klinik kullanımını sınırlar. Periferik olarak verildiğinde hastalar tarafından kolaylıkla tolere edilen, kan beyin bariyerini geçebilen ve toksik yan etkileri olmayan ajanların kullanımı nörodegeneratif hastalıklar için alternatif bir tedavi yaklaşımı olabilir. Epo, son yıllarda farklı araştırma grupları tarafından merkezi ve periferik sinir sistemini, çeşitli faktörlerin neden olduğu nöron ölümünden koruyan ve/veya kurtaran bir ajan olarak denenmiş ve umut verici bulgular tıp literatüründe yer almıştır.(12,13,14)

Epo, hematopoetik bir büyüme faktörü, sitokin-hormondur. Epo, hipoksi ile uyarılan, dokuların oksijenasyonu için eritrosit öncü hücrelerinin proliferasyonuna ve diferansiyasyonuna neden olan bir glikoproteindir. Merkezi ve periferik sinir sisteminde EpoR'nün varlığının gösterilmesi ile birlikte Epo'in sinir sisteminde fizyolojik ve patolojik koşullarda rol oynadığı görüşü önem kazanmıştır.(13) Anti-EpoR antikoru kullanılarak kimyasal boyama yöntemi ile yapılan bir çalışmada fare hipokampal ve kortikal nöronlarının EpoR eksprese ettiği bulunmuştur. Başka bir çalışmada primer astrosit kültürlerinin Epo ürettiği ve azalmış oksijen düzeylerinin Epo mRNA düzeyini artırarak Epo üretimini uyardığı gösterilmiştir. Epo mRNA'nın erişkin sıçan ve primat beyinlerinde de eksprese edildiği ve bu ekspresyonun hipoksi ile uyarıldığı bildirilmiştir.(12) Nöronal hücre kültürleri üzerinde yapılan invitro çalışmalarda Epo'in, eksitotoksik uyarımlar, serum ve büyüme faktör yokluğu gibi çeşitli hasar modellerinde nöronları koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir. Global ve fokal iskemi, kaba travma, immün aracılı inflamasyon, eksitotoksin krizi, subaraknoidal hemoraji, toksin nedenli Parkinson hastalığı gibi deneysel invivo hasar modellerinin

uygulandığı çalışmaların sonuçlarında Epo'in hücreleri hasardan korumada yararlı etkilerinin olduğu, nöron ve myosit apoptozunu *in vivo* ve *in vitro* engellediği bildirilmiştir.(14,58,60)

Bugüne kadar yayınlanan tüm çalışmalarda Epo'nin *in vivo* yada *in vitro* deneysel iskemi ile eksitotoksik uyarıların neden olduğu hücre ölümleri üzerindeki etkisi araştırılmış olmasına karşın, A β 'nin neden olduğu hücre ölümü üzerine Epo'nin etkisini araştıran bir çalışma bildirilmemiştir. Farklı hasar yaratıcı etkenlerin kullanıldığı deneysel modellerde Epo'in nöronları koruyucu etkisinin gösterilmesi, bize A β 'nin neden olduğu nöronal apoptozda da Epo 'in koruyucu etkisinin olabileceğini düşündürmüştür. AH'nda gözlenen nöron kayıplarının apoptoz yolu ile olduğu gerçeğinden yola çıkarak, Epo'in A β 'nin oluşturduğu nöronal apoptozu inhibe edici etkisini araştırmak ve AH'nın tedavisinde kullanılabilecek potansiyel bir ilaç olabilirliğini sınamak bu tez çalışmasının amacını oluşturmuştur.

. Bu araştırma planlanmadan önce yapılan literatür incelemelerinde Epo'in anti-apoptotik etkisini gösterebilmesi için ortama önceden uygulanması gerekliliği ile karşılaşılmıştır. Anna-Leena Siren ve ark., P19 teratoma hücrelerini serum yokluğu hasarına maruz bırakarak yaptıkları çalışmada Epo'ü serum yoksunluğunu başlatmadan 24 saat önce ilave etmişlerdir veya serum yoksunluğu ile Epo ilavesini aynı anda uygulamışlardır. Bu çalışmanın sonuçlarından biri Epo'in önceden ilavesinin apoptozu azaltmada daha etkili olduğudur. Buna karşın serum yoksunluğu başladıktan hemen sonra Epo ilavesinin etkili olmadığını bildirmişlerdir.(60) Bir başka araştırmada da nöronları glutamat toksisitesinden korumak için eksitotoksik uyarı başlamadan en az 8 saat önce Epo ilavesinin gerektiği bildirilmiştir.(56)

Tez çalışmamızda, Epo'in, nöroprotektif etkisini araştırmak amacıyla kültür ortamına Epo ilave edilmiş PC12 hücrelerinin canlılığı A β toksisitesine maruz bırakıldıktan sonraki 24. saatin sonunda canlılık testleri ile değerlendirilmiştir. PC12 hücre kültür ortamlarına Epo 0.1-0.5-1.0-2.0 U/ml konsantrasyonlarda olacak şekilde 24 saat önceden uygulanmıştır. Toksikiteye maruz bırakılan ve hiç Epo eklenmeyen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 1.0 U/ml ve 2.0 U/ml Epo eklenen koşulların hücre canlılığı istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artmış bulunmuştur. ($p < 0.05$) Ancak 0.1 U/ml ve 0.5 U/ml gibi daha düşük dozda Epo eklenen koşulların hücre canlılığındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. ($p > 0.05$) (şekil:8 ve şekil:9)

Epo'in önceden uygulanmasının gerekliliği, koruyucu etkisini gösterebilmesi için gen transkripsiyonu ve protein sentezine neden olduğu ve bunun için zaman geçmesi gerektiği ile açıklanmıştır. Epo'in protektif etkisini apoptozu inhibe ederek bunu ise anti-apoptotik proteinlerin sentezine yol açarak gösterdiği ifade edilmiştir.(55,56,58)

Epo, etkisini hücre yüzeyinde bulunan EpoR aracılığı ile göstermektedir.(56) İnvivo koşullarda hipokampal nöronların EpoR'nün Epo'e yanıtı sınırlı konsantrasyonlar arasında gerçekleşmektedir. Yüksek Epo konsantrasyonlarının EpoR'nün hızla down-regülasyonuna yol açarak nöronlarda Epo aracılı sinyal iletilsinin akışına engel olduğu bildirilmiştir.(12) Dzietko ve ark. 2004 yılında yayınladıkları ve Wistar sıçanları ile yaptıkları in vivo NMDA reseptör antagonisti nörotoksitesi çalışmaları, deney hayvanlarına 5000-30000 U/kg dozda Epo'ı periton içine uygulamışlar ve en yüksek nöroprotektif yanıtı 20000 U/kg dozu ile aldıklarını bildirmişlerdir.(78) Ruscher ve ark. 2002 yılında yayınladıkları çalışmalarında, primer kortikal nöron kültürlerine 48 saat önceden artan konsantrasyonlarda Epo ilave ederek, takip eden 2 saat boyunca oksijen-glukoz yoksunluğuna maruz bırakmışlardır. 24 saat sonunda hücre canlılığı test edildiğinde 0.1 U/ml konsantrasyonda ilave edilen Epo'in en yüksek nöroprotektif etkiyi gösterdiğini bildirmişlerdir.(79) Microarray tekniği ile yapılan bir araştırmada PC12 hücrelerine 10 U/ml konsantrasyonda Epo ilave edildikten sonraki 3.saatin sonunda gen ekspresyonunun maksimum düzeye çıktığı ve 6. saatin sonunda bazale döndüğü bildirilmiştir.(55) Başka bir çalışmada H9c2 myoblast hücre hattına 0.4 veya 10 U/ml Epo önceden uygulanarak H₂O₂ toksisitesi oluşturulmuş ve apoptotik nükleuslar karşılaştırılmıştır. Epo'nun uygulanan her iki dozu da apoptotik nükleus oranını kontrole göre anlamlı ölçüde azaltmıştır.(58) Farklı çalışma gruplarından gelen bu sonuçlar Epo'in nöronal apoptozun oluşmasını engelleyecek yada koruyacak etkin dozunun standardize olmadığını açık bir biçimde göstermektedir.

Epo'in apoptozu azaltıcı etkisini araştırmak için apostain immünofloresan boyama yöntemi uygulanmıştır. Toksisiteye maruz bırakılan ve hiç Epo eklenmeyen kontrol grubu ile kıyaslandığında 1.0 U/ml ve 2.0 U/ml Epo eklenen koşulların apoptotik hücre oranı istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalmış bulunmuştur. (p<0.05) Ancak 0.1 U/ml ve 0.5 U/ml Epo eklenen koşulların apoptotik hücre oranındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.(p>0.05)(Şekil:10, Resim:3 ve Resim:4)

Aβ içeren senil plaklar, tau proteini içeren nörofibriler yumaklar, subkortikal ve hipokampal bölgelerdeki yaygın nöronal kayıp AH'nın diagnostik belirleyicileridir. Beyin dokularında gözlenen bu nöron kaybı apoptoz yolu ile olmaktadır. Senil plak yapısında

bulunan A β (fibriler veya β -tabaka yapıları) hücre dışı apoptotik uyarıcı gibi davranarak dejeneratif olayları başlatmaktadır. AH'nda beyinde A β 'nden başka çok çeşitli moleküller apoptozu uyarabilirler. Serbest radikallerin ve oksidatif hasarın, azalmış glukoz metabolizmasının, glutamat veya diğer eksitotoksik aminoasitlerin uyardığı apoptoz nörodejeneratif hastalıkların gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Tüm faktörler sinerjistik etki de gösterebilir. Ortamda bulunan ve eşik değerinin hemen altında olan A β düzeyi ile eşik değerinin hemen altında olan eksitotoksin yada oksidatif uyarıcı birlikte etki göstererek apoptozu başlatabilir. Kısaca yaşlanma ve yaşlılıkla ilgili nörodejeneratif hastalıklarda nöronlar apoptozu başlatan uyarıcılara karşı son derece hassas kılınmıştır.(76)

Apoptozu regüle eden ve 'extrinsic' ve 'intrinsic' olarak tanımlanan iki ana yolak nöronal apoptozu başlatan uyarıcıların birleştikleri ortak yollardır. A β birikiminin neden olduğu nöronal apoptozun 'extrinsic' yolak aracılığı ile başlatıldığı öne sürülmüştür. A β 'nin hücre yüzey proteinleri ile cross-link yaptığı ve (Fas ligandının apoptoz sinyalinin başlattığı gibi) hücre içi sinyalleme mekanizmasını aktive ederek apoptotik programı başlattığı düşünülmektedir. A β 'nin Fas/TNFR hücre yüzey ölüm reseptörü ailesinin üyelerinin aracılığı ile 'extrinsic' yolağı aktive ettiği, ve bu yolağın başlatıcı proteazı olan kaspaz-8 aktivasyonuna neden olduğu bildirilmiştir.(68) Kaspaz-8 aktivasyonu efektif kaspazların aktivasyonuna neden olarak apoptozu başlatır ve Kaspaz-8'in spesifik inhibitörlerle inhibisyonu hücreyi apoptozdan korumaktadır.(35)

Bu tez çalışmasında, Epo'nin A β toksisitesinin neden olduğu kaspaz-8 aktivasyonu üzerine etkisi western blotting yöntemiyle incelenmiştir. Kaspaz-8'in aktivasyonu ile oluşan fragmanı spesifik olarak tanıyan antikor kullanılarak belirlenmiştir. Hiç A β eklenmeyerek kontrol kabul edilen koşuldaki kaspaz-8 aktivasyonu belli belirsiz bir bant olarak, A β toksisitesi uygulanan koşuldaki kaspaz-8 aktivasyonu ise kalın ve keskin bir bant olarak gözlenmiştir. Kaspaz-8 spesifik inhibitörü uygulanan koşulda ise daha ince bir bant gözlenmiştir. Bu da bize kaspaz-8 aktivasyonunu tamamen engelleyemediğimizi düşündürmüştür. 1.0 U/ml ve 2.0 U/ml Epo uygulanan koşullardaki kaspaz-8 aktivasyonunu gösteren her iki bant toksite koşuluna göre ve 2.0 U/ml koşulunun bandı 1.0 U/ml koşulunun bandına göre daha incelmış olarak gözlenmiştir.(Resim:5) Bu bulgular, Epo'nin PC12 hücrelerinde A β 'nin neden olduğu kaspaz-8 aktivasyonunu azalttığını göstermiştir.

AH olan beyinlerde yapılan postmortem araştırmalarda önemli miktarda, oksidatif stres belirleyicisi olan ürünler gözlenmiştir. Alt yan lobül ve hipokampus bölgelerinde artmış

protein karbonil yapısı, protein nitrasyonu, lipid peroksidasyonu, DNA oksidasyonu, ve ilerlemiş Maillard reaksiyon ürünleri belirlenmiştir. AH olan bireylerin beyin omurilik sıvılarında bulunan lipoproteinlerin oksidasyon düzeyi kontrollere göre yüksek bulunmuştur. İmmünohistokimyasal çalışmalarda nöritik plaklar ve NFT'lar içinde bakır, çinko, mangan-SOD, katalaz, transferrin, ferritin artışı gösterilmiştir.(31) Huntington hastalığı, progresif supranükleer palsi, amyotrofik lateral sklerozis gibi patolojilerin büyük komponentini anormal protein birikimlerinin oluşturduğu, diğer yaşla ilişkili nörodejeneratif hastalıklarda da oksidatif hasar belirleyicilerinin varlığı rapor edilmiştir.(47) Hücre içindeki oksidatif stres, ilerleyen yaş ile birlikte antioksidan savunmanın azalması ve mitokondrial fonksiyonlarda bozulmanın sonucunda hasara yol açar. Bu yaşla ilgili etkiler, genetik ve çevresel faktörlerle birleşir, beyin doğası gereği yüksek enerji bağımlılığı ancak azalmış antioksidan düzeyleri nörodejeneratif hastalıklarda gözlenen patolojik değişikliklerin ortaya çıkmasında rol oynar.(47)

Aktive olmuş mikroglia, İNOS ekspresyonunu ve NADPH oksidaz aktivasyonunu takipeden çok miktarda NO ve süperoksit üretir. NO birçok biyolojik sistemde hücre içi ve hücreler arası mesajcı rolü olan bir serbest radikaldir. Ortamda NO ve süperoksit birlikte bulduklarında ikisinin tek başına olduğundan çok daha güçlü bir toksik ajan olan peroksinitriti oluştururlar. Peroksinitritler hücre içinde tiyollere, tiyol esterlerine, demir sülfür merkezlerine, 'zinc finger' yapılarına saldırır ve sonuçta lipid peoksidasyonunu başlatır. AH'nda yapılan incelemelerde, beyin dokularında artmış nitrotirozin düzeyleri gösterilmiştir.(8)

A β 'nin kültüre edilmiş sinir hücreleri üzerindeki nörotoksitesinin, mikroglia bağımlı bir mekanizma ile olduğu ileri sürülmüştür. A β 'nin neden olduğu radikal oluşumu, mikroglial toksisiteye yol açmasından ziyade, potansiyel nörotoksik bileşenlerin, sitokinlerin ve nitrik oksidin salınımına yol açan mikroglial aktivasyonu başlatarak oksidatif hasar yanıtlarının ortaya çıkmasına neden olur.(29) Aktive olan mikroglia interlökin 1 β ve tümör nekroze edici faktör- α gibi inflamatuvar araçları uyararak nörotoksisiteye sebep olur. Bu sitokinler indüklenebilir nitrik oksit sentaz ekspresyonuna neden olarak ortamdaki NO düzeylerinin artışına neden olurlar.(8)

Bu tez çalışmasında deney koşulları uygulanmış PC12 hücrelerinin kültür ortamında nitrit ve nitrat analizleri ticari kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. A β toksisitesi uygulanmış koşul ile hiçbir ajan eklenmemiş kontrol koşulunun nitrit, nitrat ve NO düzeyleri

karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık gözlenmemiştir. ($p>0.05$) Hücre kültür ortamlarına değişik dozlarda Epo eklenmiş ve sonra A β toksisitesi uygulanmış koşullar ile hiç Epo eklenmemiş kontrol koşulunun nitrit,nitrat, NO düzeyleri kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık gözlenmemiştir. ($p>0.05$)(Şekil:13, Şekil:14, Şekil:15) Bu bulgular, beyin dokusunda oksidatif hasar oluşumuna neden olan NO'nin büyük oranda gial aktivasyon ile salındığı için saf nöron kültürü olan PC12 hücrelerinde bu artışı gözlemleyememiş olabileceğimizi düşündürmüştür.

Ayrıca NO düzeylerinde istatistiksel açıdan anlamlı farklılık gözleyememizin bir diğer nedeni olarak literatürde belirtildiği gibi; Epo, hücre sağkalım sinyalleme kaskadını başlatarak, hücre içi kalsiyum düzeyini koruyarak ve NO üretimini azaltarak antioksidatif ve antiinflamatuvar etkilerini gösteriyor olabilir. Epo'nin proinflamatuvar sitokinlerin oluşumunu engelleyerek bunların aracılık ettiği inflamasyonu önleyici etki gösterdiği bildirilmiştir.(14)

Epo'nin nöronlar üzerindeki direkt ve indirekt nöroprotektif etki mekanizmaları hakkında birçok hipotez öne sürülmüştür: Glutamatın nörotoksik etkisini antagonize edebilir, antioksidan enzimlerin ekspresyonunu artırabilir, NO aracılı serbest radikallerin oluşumunu azaltabilir, serebral kan akımını düzenleyebilir, nörotransmitter salınımını uyarabilir ve neoanjyogenez başlatabilir. Sentetik Epo olan Epoetin alfa, hasar görmüş dokunun kan akımını yeniden sağlayarak veya eritropoezde olduğu gibi Epo sinyaline aracılık eden proteinlerin aktivasyonuna neden olarak indirekt nöroprotektif etki gösterir. Epo Bcl-2, Bcl-xl gibi anti-apoptotik genlerin ekspresyonuna neden olarak hücre ölümünü engelleyici etki gösterir.(59)

Sonuç olarak bu çalışmada Epo'nin A β 'nin neden olduğu nörotoksistide hücre canlılığın koruyucu etkisinin olduğu, nöronal apoptozu azalttığı, ve apoptozu başlatıcı rol oynayan kaspaz-8 aktivasyonunu azalttığı gösterilmiştir.

Literatürden sağlanan bilgiler, Epo'nin birçok mekanizmalar yolu ile nöroprotektif etkili bir ajan olduğunu göstermektedir. Epo'nin milyonlarca hastada çok iyi tolere edilerek kullanılan bir ilaç olması nedeniyle bu ajanın nöroprotektif amaçlarla klinik uygulamaya girmesi olasılığı söz konusu olabilir. EPO'nin nöroprotektif amaçla klinik uygulamada kullanımı inme gibi akut durumlarda, Parkinson hastalığı, AH, ALS gibi kronik nörodejeneratif hastalıklarda, MS gibi demiyelinizan hastalıklarda ve şizofreni gibi psikiyatrik hastalıklara kadar geniş bir kullanım alanını kapsayabilir. Epo'nin kronik kullanımı esnasında meydana gelebilecek potansiyel problem eritropoetik yan etkiler olabilir. Bu nedenle

nöroprotektif fonksiyonu korunmuş ancak non-eritropoetik rekombinan insan Epo türevleri geliştirilmeye çalışılmaktadır.(56) Bu tür çalışmaların devamının çok farklı etyolojik nedenlere bağlı olarak gelişen AH'nda gözlenen A β toksisitesinin sağaltımına katkıda bulunacağı inancındayız.

- 1 National Institute on Aging, National Institutes of Health, Alzheimer's Disease Progress Report 2001-2002 (<http://www.alzheimers.org/pr01-02/index.htm>)
- 2 Serge Przedborski, Miquel Vila, Vernice Jackson-Lewis. Neurodegeneration: What is it and where are we? *J. Clin. Invest* 2003; 111: 3-10
- 3 Peter C. Waldmeier. Prospects for antiapoptotic drug therapy of neurodegenerative diseases. *Progress in Neuro-Psycopharmacology & Biological Psychiatry* 2003; 27: 303-21
- 4 Todd E. Golde. Alzheimer Disease therapy: Can the amyloid cascade be halted? *Neurodegeneration* 2003; 111: 11-8
- 5 Yeu Su, Pei-Teh Chang. Acidic pH promotes the formation of toxic fibrils from β -amyloid peptide. *Brain Research* 2001; 893: 287-91
- 6 Sylvian Dore, Satyabrata Kar, Remi Quirion. Insulin-like growth factor I protects and rescues hippocampal neurons against β -amyloid and human amylin-induced toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94: 4772-7
- 7 P. Kienlen-Campard, B. Tasiaux, J.-N. Octave. The processing and biological function of the human amyloid precursor protein (APP): lessons from different cellular models. *Experimental Gerontology* 2000; 35: 843-50
- 8 Ricardo B. Maccioni, Juan P. Munoz, Luis Barbeito. The molecular bases of Alzheimer's Disease and other neurodegenerative disorders. *Archives of Medical Research* 2001; 32: 367-81
- 9 Jennifer Drake, Cristopher D. Link, D. Allan Butterfield. Oxidative stress precedes fibrillar depositon of Alzheimer's disease amyloid β -peptide (1-42) in transgenic *Caenorhabditis elegans* model. *Neurobiology of Aging* 2003; 24: 415-20
- 10 Neville Marks, Martin J. Berg. Recent advences on neuronal caspases in development and neurodegeneration. *Neurochemistry International* 1999; 35: 195-220
- 11 Reed JC, Paternostro G. Postmitochondrial regulation of apoptosis during heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999; 96: 7614-16

-
- 12 Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, et al. In vivo evidence that Erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95: 4635-40
- 13 W. Marie Campana, Robert R. Myers. Exogenous erythropoietin protect against dorsal root ganglion apoptosis and pain following peripheral nerve injury. *European Journal of Neuroscience.* 2003; 18: 1497-506
- 14 Murat Çelik, Necati Gökmen, Serhat Erbayraktar. Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 2002; 4: 2258-63
- 15 Yoo-Hun Suh, Frederic Checler. Amyloid precursor protein, Presenilins, and α -Synuclein: Molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's Disease. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics Pharmacol Rev.* 2002; 54: 469-525
- 16 Forman MS, Lee VM-Y, Trojanowski JQ. 'Unfolding' pathways in neurodegenerative disease. *Trends in Neurosciences* 2003; 26: 407-10
- 17 Barkur S. Shastry. Neurodegenerative disorders of protein aggregation. *Neurochemistry International.* 2003; 43: 1-7
- 18 Ilse Dewachter, Fred Van Leuven. Secretases as targets for the treatment of Alzheimer's Disease: the prospects. *The Lancet Neurology* 2002; 1: 409-16
- 19 Gassen GV, Annaert W, Broeckhoven CV. Binding partners of Alzheimer's Disease Proteins: Are they physiologically Relevant? *Neurobiology of Disease* 2000; 7: 135-51
- 20 Cappai R, White AR, Molecules in focus Amyloid β . *The Int. Jour. of Biochem.& Cell Biol.* 1999; 31: 885-89
- 21 Evin G, Weidemann A. Biogenesis and metabolism of Alzheimer's Disease A β amyloid peptides. *Peptides* 2002; 23: 1285-97
- 22 Wood WG, Eckert GP, Igbavboa U, et al. Amyloid beta-protein with membranes and cholesterol: causes or causalities of Alzheimer's Disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 2003; 1610: 281-90
- 23 Racchi M, Govoni S. The pharmacology of amyloid precursor protein processing. *Experimental Gerontology* 2003; 38: 145-57

-
- 24 Alzheimer's Disease: Unraveling the Mystery. Bethesda, Md: US Dept of Health and Human Services, National Institute on Aging; 1995. NIH publication 95-3782
- 25 K. Hasegawa. How to cope with Alzheimer's Disease? *Neurobiology of Aging* 1998; 19: 107-8.
- 26 Barclay LL, Zemcov A, Blass JP, et al. Survival in Alzheimer's Disease and vascular dementias. *Neurology* 1985; 35: 834-40.
- 27 Rocca WA, Bonaiuto S, Lippi A, et al. Prevalence of clinically diagnosed Alzheimer's Disease and other dementing disorders: a door-to-door survey in Appignano, Macerata Province, Italy. *Neurology* 1990; 40: 626-31
- 28 Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, et al. Association of apolipoprotein E allele E4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's Disease. *Neurology*. 1993; 43: 1467-72
- 29 Gerd Multhaup, Thomas Ruppert, Andrea Schlicksupp. Reactive oxygen species and Alzheimer's Disease. *Biochemical Pharmacology* 1997; 54: 533-9
- 30 Harry Ischiropoulos, Joseph S. Beckman. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? *The Journal of Clinical Investigation*. 2003; 11: 163-9
- 31 Multhaup G, Scheuermann S, Schlicksupp A, et al. Possible mechanisms of APP-mediated oxidative stress in Alzheimer's Disease. *Free Radical Biology & Medicine* 2002; 33: 45-51
- 32 Khalid Iqbal, Inge Grundke-Iqbal. Alzheimer Disease is multifactorial and heterogeneous. *Neurobiology of Aging* 2000; 21: 901-2
- 33 L. Lossi, A. Merighi. In vivo cellular and molecular mechanisms of neuronal apoptosis in the mammalian CNS. *Progress in Neurobiology* 2003; 69: 287-312
- 34 Biyokimya Ders Notları, Apoptozis, Dr. Engin Ulukaya, 11.04.2003, http://www20.uludag.edu.tr/~biokimya/apoptozis_ders_notu.pdf
- 35 Chang HY, Yang X. Proteases for cell suicide: Functions and regulation of caspases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2000; 64: 821-46
- 36 Carol M. Troy, Guy S. Salvasen. Caspases on the brain. *Journal of Neuroscience Research* 2002; 69: 145-50
- 37 Whelan J. Caspase inhibitors for liver disease. *Drug Discovery Today* 2002; 7: 444-45
- 38 Cryns V, Yuan J. Proteases to die for. *Genes & Development*. 1998; 12: 1551-70

- 39 Donepudi M, Grütter MG. Structure and zymogen activation of caspases. *Biophysical Chemistry* 2002; 101-102: 145-53
- 40 Bonnefil PC. Cell Death in the Oligodendrocyte Lineage: A Molecular Perspective of Life/Death Decisions in Development and Disease. *Glia* 2000; 29:124-35
- 41 Geoffrey M. Cooper, Robert E. Hausman. *The Cell a Molecular Approach*. 3rd. ASM press Sunderland, Massachusetts.
- 42 Markus G. Grütter. Caspases: Key players in programmed cell death. *Current Opinion in Structural Biology*. 2000; 10:649-55
- 43 Yoshiaki Shikama, Lisong Shen, Motokuni Yonetani, Jun Miyauchi. Death effector domain-only polypeptides of caspase-8 and -10 specifically inhibit death receptor-induced cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002; 291: 484-93
- 44 M. Chen, J. Wang. Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis* 2002; 7: 313-9
- 45 Jacqueline Thorburn, Laura M. Bender, Michael J. Morgan. Caspase- and serine protease-dependent apoptosis by the death domain of FADD in normal epithelial cells. *Molecular Biology of the Cell*. 2003; 14: 67-77
- 46 Zhang JH, Zhang Y, Herman B. Caspases, apoptosis and aging. *Aging Research Reviews* 2003; 2: 357-66
- 47 Jeffrey A. Klein, Susan L. Ackerman. Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *J. Clin. Invest.* 2003; 111: 785-93
- 48 Mattson MP, Duan W, Chan SL, Cheng A, Haughey N, Gary DS, Guo Z, Lee J, Furukawa. Neuroprotective and neurorestorative signal transduction mechanisms in brain aging: modification by genes, diet and behaviour. *Neurobiology of Aging* 2002; 23: 695-705
- 49 Julie A. Carson, Anthony J. Turner. β -Amyloid catabolism: roles for neprilysin (NEP) and other metallopeptidases? *Journal of Neurochemistry* 2002; 81: 1-8
- 50 Bush AI, Pettingell WH, Multhaup G, Paradis MD, Vonsattel JP, Gusella JF, Beyreuther K, Masters C, Tanzi RE. Rapid induction of Alzheimer A beta amyloid formation by zinc. *Science* 1994; 265: 1464-7

- 51 Murayama H, Shin RW, Higuchi J, Shibuya S, Muramoto T, Kimamoto T. Interaction of aluminium with PHF tau in Alzheimer's disease neurofibrillary degeneration evidenced by desferrioxamine-assisted chelating autoclave method. *Am. J Pathol* 1999; 155: 877-85
- 52 Chapman P, Falinska MA, Knevet SG, Ramsay MF. Genes, models and Alzheimer's disease. *Trends in Genetics* 2001; 17: 254-61
- 53 Hideo Honjo, Noriko Kikuchi, Tetsuya Hosada. Alzheimer's disease and estrogen. *Journal of Biochemistry & Molecular Biology* 2001; 76: 227-30
- 54 Virginia M.-Y. Lee. A β immunization: Moving A β peptide from brain to blood. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001; 98: 8931-2
- 55 Michael J. Renzi, Francis X. Farrel, Anton Bittner. Erythropoietin induces changes in gene expression in PC-12 cells. *Molecular Brain Research* 2002; 104: 86-95.
- 56 Sermin Genç, Tolga F. Koroglu, Kursat Genç. Erythropoietin and nervous system. *Brain Research* 2004; 1000: 19-31
- 57 Tong-Chun Wen, Marta Rogido, Tom Genetta. Permanent focal cerebral ischemia activates erythropoietin receptor in the neonatal rat brain. *Neuroscience Letters* 2003; XX: 1-4
- 58 Cyrus J. Parsa, Akio Matsumoto, Jihee Kim. A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. *The Journal of Clinical Investigation* 2003; 112: 999-1007
- 59 Weiss MJ. New insights into erythropoietin and epoetin alfa: Mechanism of action, target tissues, and clinical applications. *The Oncologist* 2003; 8: 18-29
- 60 Anna-Leena Siren, Maddalena Fratelli, Michael Brines. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001; 98: 4044-49
- 61 Kaptanoğlu A, Solaroğlu I, Okutan O, Surucu HS, Akbıyık F, Beskonaklı E. Erythropoietin exerts neuroprotection after acute spinal cord injury in rats: effect on lipid peroxidation and early ultrastructural findings. *Neurosurg. Rev.* 2004; 27: 113-20
- 62 Solaroğlu I, Solaroğlu A, Kaptanoğlu E, Dede S, Haberal A, Beskonaklı E, Kilinc K. Erythropoietin prevents ischemia-perfusion from inducing oxidative damage in fetal sıçan brain. *Child Nerv. Syst.* 2003; 19: 19-22
- 63 Saido TC. Alzheimer's Disease as proteolytic disorders: Anabolism and Catabolism of β -Amyloid. *Neurobiology of Aging* 1998; 19: S69-S75

-
- 64 Selkoe DJ. Deciphering the genesis and fate of amyloid β -protein yields novel therapies for Alzheimers disease. *J. Clin. Invest.* 2002; 110: 1375-81
- 65 Selkoe DJ, Wolfe MS. In search of γ -secretase: Presenilin at the cutting edge. *Proc. Natl. Sci. Acad. USA* 2000; 97: 5690-2
- 66 Peng QL, Buz'Zard AR, Lau BHS. Pycnogenol protects neurons from amyloid- β peptide-induced Apoptosis. *Molecular Brain Research* 2002; 104: 55-65
- 67 Wei W, Norton DD, Wang X, Kusiak JW. A β 17-42 in Alzheimer's disease activates JNK and caspase-8 leading to neuronal apoptosis. *Brain* 2002; 125: 2036-43
- 68 Ivins KJ, Thornton PL, Rohn TT, Cotman CW. Neuronal apoptosis induced by β -amyloid is mediated by caspase-8. *Neurobiology of Disease* 1999; 6: 440-9
- 69 Jang JH, Surh YJ. Protective effect of resveratrol on β -Amyloid-induced oxidative PC12 cell death. *Free Radical Biology & Medicine* 2003; 34: 1100-10
- 70 Raina AK, Hochman A, Ickes H, Zhu X, Ogawa O, Cash A, Shimohama S, Perry G, Smith MA. Apoptotic promoters and inhibitors in Alzheimer's disease: Who wins out? *Prog. in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 2003; 27: 251-4
- 71 Neve RL, McPhie DL, Chen Y. Alzheimer's disease: adysfunction of the amyloid precursor protein. *Brain Research* 2000; 886: 54-66
- 72 Ivins KJ, Ivins JK, Sharp JP, Cotman CW. Multiple pathways of apoptosis in PC12 cells. *The Journal of Biological Chemistry* 1999; 274: 2107-12
- 73 Tamagno E, Parola M, Guglielmotto M, Santoro G, Bardini P, Marra L, Tabaton M, Danni O. *Free Radical Biology & Medicine* 2003; 35: 45-58
- 74 Rohn TT, Head E, Nesse WH, Cotman CW, Cribbs DH. Activation of Caspase-8 in the Alzheimer Disease Brain. *Neurobiology of Disease* 2001; 8: 1006-16
- 75 Niikura T, Hashimoto Y, Tajima H, Nishimoto I. Death and survival of neuronal cells exposed to Alzheimer's insults. *Jour. of Neuroscience Research* 2002; 70: 380-91
- 76 Cotman CW. Apoptosis decision cascades and neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 1998; 19: S29-S32
- 77 Studzinski, DM Benjamins. Cyclic AMP differentiation of the oligodendroglial cell line N20.1 switches staurosporin-induced cell death from necrosis to apoptosis. *J Neuroscience Res.* 2001; 66: 691-7

78 Dzielko M, Felderhoff-Mueser U, Sifringer M, et al. Erythropoietin protects the developing brain against N-methyl-D-aspartate receptor antagonist neurotoxicity. *Neurobiology of Disease* 2004; 15: 177-87

79 Ruscher K, Freyer D, Karsch M, et al. Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain. *The Jour. of Neuroscience* 2002; 22-23: 10291-301

80 Fadiloğlu Ő. Alzheimer Hastalığında etiyopatogenez Klinikopatolojik ve Ultrastrüktürel İnceleme. Doçentlik Tezi, 1970