

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi

**ALZHEİMER HASTALIĞI HÜCRE HATTI MODELİNDE
MİTOKONDİRİ SPESİFİK ANTİOKSİDAN MİTOQ'NUN
MİTOKONDİRİYAL DİSFONKSİYON ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Esra YETİŞGİN

Danışman

Prof. Dr. Hasibe VURAL

Konya-2023

T.C.

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi

**ALZHEİMER HASTALIĞI HÜCRE HATTI MODELİNDE
MİTOKONDİRİ SPESİFİK ANTİOKSİDAN MİTOQ'NUN
MİTOKONDİRİYAL DİSFONKSİYON ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Esra YETİŞGİN

Danışman

Prof. Dr. Hasibe VURAL

Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 191418001 proje numarası ile desteklenmiştir.

Konya-2023

TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi **Esra YETİŞGİN'in** “**Alzheimer hastalığı hücre hattı modelinde mitokondri spesifik antioksidan MitoQ'nun mitokondriyal disfonksiyon üzerindeki etkinliğinin araştırılması**” başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

KONYA/16.01.2023

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Hasibe Vural

İmzası

Necmettin Erbakan Üniversitesi /Meram Tıp Fakültesi/
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye

Prof. Dr. Ercan Kurar

İmzası

Necmettin Erbakan Üniversitesi /Meram Tıp Fakültesi/
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye

Prof. Dr. Figen Güney

İmzası

Necmettin Erbakan Üniversitesi /Meram Tıp Fakültesi/
Nöroloji Anabilim Dalı

Üye

Doç. Dr. Kıvanç Bilecen

İmzası

Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi /Tarım ve Doğa
Bilimleri Fakültesi/ Moleküler Biyoloji ve Genetik
Bölümü

Üye

Dr. Öğretim Üyesi Esra Şumlu

İmzası

KTO Karatay Üniversitesi/ Tıp Fakültesi/ Dahili Tıp
Bilimleri Bölümü/ Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 25/01/2023 tarih ve 02/19 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Enstitü Müdürü

İmzası

BEYANAT

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

16.01.2023

Esra YETİŞGİN



BENZERLİK RAPORU

Tezin Tam Adı :Alzheimer hastalığı hücre hattı modelinde mitokondri spesifik antioksidan MitoQ'nun mitokondriyal disfonksiyon üzerindeki etkinliğinin araştırılması

Öğrencinin Adı Soyadı :Esra YETİŞGİN

Dosyanın Toplam Sayfa Sayısı :45

ORJİNALLİK RAPORU

% 4	% 3	% 2	% 1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikerisim.erbakan.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
2	Martin D. Brand. "Riding the tiger – physiological and pathological effects of superoxide and hydrogen peroxide generated in the mitochondrial matrix", Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 2020 Yayın	<% 1
3	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1
4	Esteban, Gerard, Universitat Autònoma de Barcelona. Institut de Neurociències. "Biological assessment of novel series of Multitarget-Directed Ligands based on donepezil to be used in Alzheimer's disease therapy", [Barcelona] : Universitat Autònoma	<% 1

Danışman Öğretim Üyesi Adı Soyadı : Prof. Dr. Hasibe VURAL

İmza :

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca yol göstericiliği ve desteğinden ötürü sayın danışman hocam Prof. Dr. Hasibe VURAL'a,

Paylaştıkları tecrübelerinden ve bilgilerinden dolayı Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Ercan KURAR ve Doç. Dr. Hatice Gül DURSUN'a, Nöroloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Figen GÜNEY'e,

Tez çalışmalarımındaki katkılarından ötürü Dr. Ebru GÜÇLÜ ve Dr. Safaa ALTWEŞ'e, desteklerinden ötürü arkadaşlarım Fatma Seçer ÇELİK'e, Hatice Kübra YILDIZ'a,

Bu araştırmaya 191418001 proje numarası ile maddi destek sağlayan Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne,

Tez deneylerimin gerçekleşmesindeki katkılarından ötürü Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi personellerine,

Bu zorlu süreçte sevgilerini ve desteklerini her zaman hissettiğim başta Merve YURDAKUL ve Büşra YİĞİTOL olmak üzere tüm sevgili arkadaşlarıma,

Her konuda destek olan Konya'daki ailem Birsen UZUNAY ve ailesine,

Bu uzun yolculukta maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ilk öğretmenlerim annem Gülfıdan YETİŞGİN, babam Osman YETİŞGİN ve bir tanecik kardeşim Derya YETİŞGİN'e, hayattaki en büyük destekçim, bilgeliğiyle ve hayal gücüyle beni her geçen gün daha da şaşırtan neşe kaynağım, canım kızım İpek'e,

Teşekkür ederim.

Bu tezi, tezimle birlikte büyüyen kızım İpek'e ithaf ediyorum.

Esra YETİŞGİN

İÇİNDEKİLER

Tez Kapağı ve İç Kapak.....	i
Tez Onay Sayfası	ii
Beyanat.....	iii
Benzerlik Raporu	iv
Önsöz ve Teşekkür.....	v
İçindekiler	vi
Kısaltmalar ve Simgeler Listesi	viii
Şekiller Listesi.....	ix
Tablolar Listesi.....	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Alzheimer Hastalığı	4
2.2. Alzheimer Hastalığı Tedavisinde Kullanılan İlaçlar	7
2.3. Mitokondri	8
2.4. AH'de Mitokondri Disfonksiyonu.....	11
2.5. Oksidatif Stres	14
2.6. Mitokondri Hedefli Antioksidan Moleküller	16
2.7. Nörodejeneratif Hastalıklarda SH-SY5Y Nöroblastoma Hücrelerinin Kullanımı	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Hücre Kültürü.....	21
3.2. Liyofilize Haldeki Amiloid Betanın Hazırlanması	24
3.3. XTT ile Hücrelerin Toksisitelerinin Ölçülmesi	24
3.4. AH Hücre Modeli.....	25

3.5. Gerçek Zamanlı PCR ile İlgili Genlerin Ekspresyonlarının Ölçülmesi	25
3.6. Western Blot ile İlgili Genlerin Protein Düzeyindeki Ekspresyonlarının Belirlenmesi	28
3.7. MitoTracker Red ile Floresan Mikroskop Altında Mitokondrilerin Görüntülenmesi	30
3.8. Hücre içi ROS Seviyesi Ölçümü.....	31
3.9. İstatistiksel Analiz.....	31
4. BULGULAR	32
4.1. Aβ42'nin Hücreler Üzerindeki Canlılık Seviyeleri	32
4.2. Aβ42'nin Hücrelerin Morfolojileri Üzerindeki Etkileri	32
4.3. Real-time PCR ile İlgili Genlerin Ekspresyonlarının Ölçülmesi	36
4.4. Western Blot ile İlgili Genlerin Protein Düzeyindeki Ekspresyonlarının Belirlenmesi	41
4.5. Floresan Mikroskop ile Mitokondrilerin Görüntülenmesi	42
4.6. Hücre içi ROS Seviyesi Ölçümü.....	43
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	50
7. KAYNAKLAR	52
8. ÖZGEÇMİŞ.....	55
9. EKLER.....	57

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

Aβ	: Amiloid beta
AH	: Alzheimer Hastalığı
ALS	: Amyotrofik Lateral Skleroz
APS	: Amonyum persülfat
BSA	: Bovine Serum Albumin
ECL	: Enhanced Chemical Luminescence
MS	: Multiple Skleroz
mtDNA	: Mitokondriyal DNA
OXPHOS	: Oksidatif Fosforilasyon
PCR	: Polimerase Chain Reaction
PH	: Parkinson Hastalığı
RA	: Retinoik asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RS	: Reaktif türler
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektroforezi
SOD	: Süperoksit dismutaz
TPP	: Trifenilfosfonyum
β	: beta
μ	: mikro
γ	: gama

ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Sekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Mitokondri organelinin yapısı.....	8
Şekil 2.2. Mitokondri dinamiklerine görev alan proteinler.....	10
Şekil 2.3. Mitokondri organelinin taşınmasında görevli proteinler.....	11
Şekil 2.4. Sağlıklı ve Alzheimer hastası nöronlarda mitokondriler.....	13
Şekil 2.5. TPP bazlı mitokondri hedefli antioksidan molekül MitoQ'nun yapısı.....	18
Şekil 3.1. SH-SY5Y (ATCC:CRL-2266) nöroblastoma hücreleri.....	22
Şekil 4.1. A β 42 Konsantrasyonunun SH-SY5Y Hücrelerinin Canlılıkları Üzerine Etkisi.....	32
Şekil 4.2. Kontrol hücrelerin 4. günde görüntüleri (200X).....	33
Şekil 4.3. 2 μ M A β uygulanan hücrelerin 2. günde görüntüleri (200X).....	33
Şekil 4.4. 2 μ M A β uygulanan hücrelerin 2. günde görüntüleri (400X).....	33
Şekil 4.5. 2 μ M A β uygulanan hücrelerin 2. günde görüntüleri (400X).....	34
Şekil 4.6. 2 μ M A β uygulanan hücrelerin 2. günde görüntüleri (630X).....	34
Şekil 4.7. 2 μ M A β uygulanan hücrelerin 4. günde görüntüleri (400X).....	34
Şekil 4.8. 2 μ M A β uygulanan hücrelerin 4. günde görüntüleri (630X).....	35
Şekil 4.9. Kontrol grubu hücrelerin 10. günde görüntüleri (100X).....	35
Şekil 4.10. 2 μ M A β uygulanan hücrelerin 10. günde görüntüleri (100X).....	35
Şekil 4.11. 2 μ M A β uygulanan hücrelerin 10. günde görüntüleri (200X).....	36
Şekil 4.12. 2 μ M A β uygulanan hücrelerin 10. günde görüntüleri (400X).....	36
Şekil 4.13. Genlerin mRNA düzeyindeki ekspresyon değişimleri.....	37
Şekil 4.14. Oksidatif stres ilişkili genlerin mRNA düzeyindeki ekspresyon değişimleri.....	37
Şekil 4.15. mtDNA tarafından kodlanan genlerin mRNA düzeyindeki ekspresyon değişimleri.....	38
Şekil 4.16. Mitokondriyal dinamiklerle ilişkili genlerin mRNA düzeyindeki ekspresyon değişimleri.....	39
Şekil 4.17. Bradford yöntemi ile protein yoğunluklarının hesaplanması.....	41

Şekil 4.18. Opa1ve Mff genlerinin protein düzeyinde ekspresyon seviyeleri.....42

Şekil 4.19. MitoTracker Red floresan boya ile işaretlenen hücre gruplarındaki mitokondri yoğunlukları (200X, 400X) A) Kontrol grubu hücreleri, B) A β grubu hücreleri, C) A β +MitoQ grubu hücreleri.....43

Şekil 4.20. Hücre gruplarındaki hücre içi ROS seviyeleri.....44



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo No

Sayfa No

Tablo 3.1. Primer Dizileri.....27

Tablo 4.1. A β ve A β + MitoQ gruplarındaki gen ekspresyon seviyelerinin kontrol gruplarına göre değişimleri.....40



ÖZET

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Alzheimer Hastalığı Hücre Hattı Modelinde Mitokondri Spesifik Antioksidan MitoQ'nun Mitokondriyal Disfonksiyon Üzerindeki Etkinliğinin Araştırılması

Esra YETİŞGİN

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi / Konya -2023

Ortalama yaşam süresinin uzamasıyla beraber, toplumda nörodejeneratif hastalıkların insidansında bir artış görülmektedir. Bu durum hem bireylerin yaşam kalitelerini olumsuz olarak etkilemekte hem de sağlık sektörü için büyük bir yük teşkil etmektedir. Demansın yaygın görülen bir formu olan Alzheimer hastalığı (AH) nöronların erken ölümüyle ilişkili progresif bir hastalıktır. Günümüzde yaklaşık 36 milyon insanın etkilendiği AH'nin, 2050 yılında 115 milyon insanı etkilemesi beklenmektedir. AH genetik ve çevresel faktörlerle tetiklenebilen bir hastalıktır.

AH'li hastaların yaşam kaliteleri hastalığın ilerlemesiyle büyük ölçüde düşmekte ve hastalar bakıma muhtaç hale gelmektedir. Hatta ileri evrede beyin fonksiyonlarının önemli ölçüde hasara uğramasıyla beraber, bu hastalar kaybedilmektedir. AH tedavisinde kullanılmak üzere 1998 yılından itibaren 244 ilaç çalışması yapılmış olup bugün yalnızca *donepezil*, *rivastigmin*, *galantamin* ve *memantin* tedavide kullanılmaktadır. Bu ilaçlar AH belirtilerinin yavaşlatılmasına yöneliktir.

AH'nin ortaya çıkmasında geçerli olduğu düşünülen 5 hipotez bulunmaktadır. Bunlar; kalıtsal olarak aktarılması, asetilkolin sentezinde azalma, beyinde Amiloid-beta (A β) plak birikiminin nörotoksik etkileri, hiperfosforile tau nedeniyle beyinde nörofibril yumaklarının oluşumu, mitokondri dinamiklerinde ve fonksiyonlarında bozulmalardır. A β plakları nöronlar arası iletişimasyonu bloke ederek, tau yumakları ise hücre içine esansiyel moleküllerin ve besinlerin girmesini engelleyerek etki gösterirler. Mitokondri disfonksiyonu AH'nin erken evrelerinde ortaya çıktığından hastalığın sebebi olabileceği üzerinde durulmakta ve hastalığın erken teşhisi ve tedavisine imkan sağlayabileceği düşünülmektedir.

Mitokondri kendi genetik materyalini taşıyan bir organeldir. Mitokondriyal DNA (mtDNA) solunum zincirinde elektron taşınması için gerekli 80 proteinden 13'ünü kodlamaktadır. AH'de bazı mitokondriyal fonksiyonların etkilendiği gösterilmiştir. Bu fonksiyonlardan bazıları glukoz metabolizmasında azalma, mitokondriyal enzimatik hasar ve ROS üretimindeki artıştır. Mitokondri dinamiklerinde saptanan değişimler ise; mitokondriyal füzyon ve fizyon dengesinde bozulma, mitokondrinin aksonlar üzerindeki taşınmasında azalma, hücre içi mitokondri oranında düşüş ve morfoloji bozulmalarıdır.

Bu tez çalışmasında ülkemizde yaygın olarak görülen nörodejeneratif hastalıklardan biri olan AH'nin mekanizmasının tanımlanmasına katkıda bulunmak, mitokondri disfonksiyonu ile AH'nin patogenezi arasındaki ilişkinin açığa çıkarılması ile potansiyel terapötik hedefler ortaya koymak amaçlanmıştır. Bu amaçla SH-SH5Y nöroblastoma hücrelerinde A β 42 agregatları ile AH modeli geliştirilmiştir. Mitokondri hedefli yeni nesil bir antioksidan molekül olan MitoQ uygulanarak, A β 42'nin sebep olduğu oksidatif stresin ortadan kaldırılması hedeflenmiştir. Yapılan analizler sonucunda, MitoQ'nun antioksidan özelliği sayesinde A β 42'nin hücreler üzerindeki olumsuz etkilerinde ve mitokondri disfonksiyonu üzerinde iyileşme sağladığı gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer hastalığı, mitokondriyal disfonksiyon, mitoq, nörodejenerasyon

ABSTRACT

REPUBLIC OF TÜRKİYE

NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY

HEALTH SCIENCES INSTITUTE

The Investigation of Mitochondria-Specific Antioxidant MitoQ on Mitochondrial Dysfunction at Alzheimer's Disease Cell Line Model

Esra YETİŞGİN

Department of Medical Biology

PhD Thesis / Konya-2023

There is an increase in the incidence of neurodegenerative diseases in the community with the prolongation of the average life span. This situation both negatively affects the life quality of the individuals and is a great burden for the healthcare sector. Alzheimer's disease (AD), a common form of Dementia, is a progressive disease associated with premature death of neurons. Today, approximately 36 million people are affected by AD and it is estimated to affect 115 million people in 2050. AD is a disease that can be triggered by genetic and environmental factors.

The life quality of patients with AD falls drastically with the progression of the disease, and the patients become in need of care. These patients are also lost in the advanced stage with considerable impairment of brain functions. For AD treatment, 244 drugs have been developed since 1998; however, only donepezil, rivastigmine, galantamine and memantine are used.

There are 5 hypotheses that are believed to be valid for the emergence of AD. These; hereditary transmission, decrease in the synthesis of acetylcholine, neurotoxic effects of A β (amyloid-beta) accumulation in the brain, neurofibrillary tangle formation in the brain due to hyperphosphorylated tau, impaired mitochondrial dynamics and functions. A β plaques blocks communication between neurons and tau tangles prevents food and essential molecules intake. It is emphasized that mitochondrial dysfunction observed in early stages of AD may be the cause of the disease. And, it is thought that it may enable the early diagnosis and treatment of the disease.

Mitochondria is a organelle carrying its own genetic material. Mitochondrial DNA (mtDNA) encodes 13 of 80 proteins required for electron transport in the respiratory chain. It has been shown that some mitochondrial functions are affected in AD. Some of these functions are reduction in glucose metabolism, mitochondrial enzymatic damage, increase in the production of ROS before formation of A β plaques and tau neurofibrillary tangles. The changes detected in mitochondria dynamics are deterioration of mitochondrial fission and fusion balance, decrease in transport of mitochondria on axons, decline in intracellular mitochondria and deformations.

In this thesis, the relationship between mitochondrial dysfunction and the pathogenesis of AD is planned to be clarified to contribute to the identification of the mechanism of AD and develop potential therapeutic targets. For this purpose, A β 42-induced in vitro AD model was developed and MitoQ, a mitochondrial targeted antioxidant agent, was treated to these cells. Alzheimer, mitochondria and oxidative stress related genes were investigated. The analysis revealed that the negative effects of A β 42 on neuroblastoma cells and mitochondrial dysfunction were ameliorated by the antioxidant characteristic of MitoQ molecule.

KeyWords: Alzheimer's disease, mitochondrial dysfunction, mitoq, neurodegeneration

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünyada olduğu gibi ülkemizde de yaygın olarak görülen, demansa ve kognitif bozukluklara sebep olan nörodejeneratif hastalıklar özellikle yaşlı bireyleri etkilemektedir. Demansın yaygın görülen bir formu olan Alzheimer hastalığı (AH) nöronların erken ölümüyle ilişkili progresif bir hastalıktır. AH'nin ortaya çıkış sebepleri ve mekanizmaları hala tam olarak aydınlatılamamıştır. AH etiyolojisinin tam olarak bilinmemesi, bazı epigenetik yaklaşımların tespit edilememesi ve 65 yaş üzerinde %6-10 ve 85 yaş üzerinde %40-50 civarındaki insidansı, AH ile ilgili çalışmaların önemini artırmaktadır. AH tanısının hala büyük ölçüde klinik ölçütlere dayalı olması ve hastalığın tanısında henüz kullanılabılır bir biyobelirtecın olmaması periferel biyolojik/moleküler bir belirteç gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Hastalığın sebebi olarak düşünölen, beyinde A β plakları ve hiperfosforile tau nörofibril yumakları oluşumunun ileri evrelerde ortaya çıkması nedeniyle hastalığın patogeneğinde daha erken evrede başka mekanizmaların rol oynayabileceğı düşünölmektedir. Son yıllarda, hastalığın patogeneğine sebep olabilecek en geçerli mekanizmanın mitokondriyal disfonksiyon olduğu belirtilmektedir. Beynin yüksek oranda enerji ihtiyacı, çok sayıda mitokondrinin varlığıyla karşılanmakta ve bu durum aynı zamanda mitokondri kaynaklı reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi sebebiyle beyinde oksidatif strese yol açmaktadır. Yapılan literatür araştırmalarına göre, AH'nin oksidatif strese bağılı olarak gelişen mitokondriyal disfonksiyondan kaynaklandığı ileri sürölmektedir. Mitokondrilerin dinamiklerinde değışimler, membran potansiyellerinde azalmalar ve ilişkili genlerde ekspresyon farkları olduğu bilinmektedir.

Bu çalışmada, AH patogeneğinin tanımlanmasına katkıda bulunmak ve potansiyel terapötik hedefler ortaya çıkarabilmek için mitokondri disfonksiyonu ile AH'nin patogenezi arasındaki ilişkinin açığa çıkarılması ve mitokondri hedefli yeni nesil bir ajan olan MitoQ'nun etkinliğinin *in vitro* koşullarda tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, oksidatif stresin ve buna bağılı olarak gelişen mitokondriyal disfonksiyonun rolünü göstermek üzere A β -indöklü AH hücre modeli geliştirilmiş ve bu hücrelerde mitokondri, Alzheimer ve oksidatif stres ile ilişkili gen panellerinin ekspresyon seviyeleri incelenmiş, ROS miktarı ölçölmüş ve AH'de oksidatif stresin rolü araştırılmıştır. RNA ve protein düzeyinde yapılan analizlere ek olarak mitokondri spesifik olarak boyanan hücreler floresan mikroskop altında,

AH'de ve antioksidan uygulaması sonucunda, mitokondri yoğunlukları ve mitokondriyal membran potansiyelleri açısından incelenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

Yaşlanmayla birlikte nöronların zarar görmesiyle nörodejeneratif hastalıklar görülmeye başlar. Bu durum hem bireylerin yaşam kalitelerini olumsuz olarak etkilemekte hem de sağlık sektörü için büyük bir yük teşkil etmektedir. Nörodejeneratif hastalıklar, çeşitli mekanizmalar sonucu sinir hücrelerinin kaybı ve sinir sisteminde fonksiyon bozulmaları ile karakterize hastalıklardır.

Bu hastalıkların başında AH, Parkinson hastalığı (PH), Huntington hastalığı, Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) ve Multiple Skleroz (MS) gelmektedir. Ortalama yaşam süresinin uzamasıyla ve etkili tedavi seçeneklerinin azlığıyla beraber, toplumda nörodejeneratif hastalıkların insidansında büyük bir artış vardır. Son yıllarda yoğun bir şekilde bu yıkıcı hastalıklara yönelik tedaviler için çalışmalar yapılmaktadır. Ancak etkili teşhis yöntemlerinin olmayışı ve hastalıkların henüz bilinmeyen sebepleri de başarılı bir tedavi geliştirilmesini önlemektedir (Michalska ve Leon 2020).

Nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisi incelendiğinde hastalıkların ortaya çıkışları ve gelişmelerinde karmaşık bir ağın olduğu görülmektedir. Bu hastalıklarla ilgili bulgular, hepsinin ortak mekanizmalara sahip olduğunu göstermiştir. Bu mekanizmaların başında oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon, metal iyonlarının birikimi, nöroinflamasyon, proteinlerin yanlış katlanmaları, hastalıklarla ilişkili proteinlerin hücreler arası iletimi ve apoptotik hücre ölümü gelmektedir (Michalska ve Leon 2020).

Nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili olduğu düşünülen çok sayıda genetik mutasyon tespit edilmiştir (Goate ve ark. 1991). Ancak kalıtılan bu ailesel formlar, hastalıkların sadece %5'ini oluştururken, geri kalan kısmı ise sporadik olan vakalardır. Hastalıkların ortaya çıkışını çevresel etmenler, hayat tarzı ve vasküler risk faktörleri etkilemektedir. Yine de en önemli risk faktörü yaşlanma olmakla beraber, oksidatif stresin de nörodejeneratif hastalıkların etiyolojisinde önemli bir faktör olduğu gösterilmektedir (Brown ve ark. 2005).

2.1. Alzheimer Hastalığı

Demansın en yaygın görülen formu olan AH, ilk kez Alman doktor Dr. Alois Alzheimer'ın, akıl hastası olduğu düşünülen bir hastasının, ölümünden sonra beyinde plak oluşumlarını göstermesiyle belirlenmiş bir hastalıktır (Smith 1988). AH hastalarının postmortem beyin örneklerinde yapılan histolojik incelemeler sonucunda, iki temel patolojik belirteç gösterilmiştir. Bunlar hücreiçi nörofibril yumakları ve hücre dışı nöritik plaklardır.

AH genetik ve çevresel faktörlerle tetiklenebilen multifaktöriyel etiyolojiye sahip bir hastalıktır. Bu faktörler hastalığın ortaya çıkma yaşını ve seyrini etkilemektedir. AH'li hastaların yaşam kaliteleri hastalığın ilerlemesiyle büyük ölçüde düşmekte ve hastalar bakıma muhtaç hale gelmektedir. Hatta ileri evrede beyin fonksiyonlarının önemli ölçüde hasara uğramasıyla beraber, bu hastalar kaybedilmektedir.

Beyinde etkilediği bölgelere göre, zamanla farklı etkilere sebep olan hastalıkta, genellikle önce hafıza kaybı gelişmeye başlar. Hastaların günlük yaşamlarındaki aktivitelerinde kayıplar ortaya çıkmaktadır. Mantıksal düşünce ve duygu bozuklukları, öğrenme, oryantasyon, dil fonksiyonları, algılama, plan yapma gibi fonksiyonların kaybı, ardından halüsinasyonlar görmeye başlayan hastalarda uzun süreli hafıza kayıpları da ortaya çıkmaktadır. İleri aşamalarında solunumu ve kalbi de etkileyerek ölüme sebep olabilmektedir.

AH'nin ortaya çıkmasında geçerli olduğu düşünülen 5 hipotez bulunmaktadır:

- 1) Kalıtsal olarak aktarılması
- 2) Asetilkolin sentezinde azalma
- 3) Beyinde A β (Amyloid-beta) plak birikimi
- 4) Beyinde hiperfosforile tau nörolif yumaklarının oluşumu
- 5) Mitokondri dinamiklerinde ve fonksiyonlarında bozulmalar

2.1.1. Kalıtsal Olarak Aktarılması

AH vakalarının büyük çoğunluğu sporadik olmakla birlikte, %10'undan azı ise 21. kromozomda taşınan A β peptid üretiminde görev alan amiloid prekürsör proteini (APP), 14. kromozomda taşınan presenilin 1 ve 2. kromozomda taşınan presenilin 2 genlerinde görülen genetik mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. İleri evre AH için kesin bir genle ilişki kurulmamakla birlikte, 19. kromozomda taşınan apolipoprotein E (APOE) geni, hastalığın gelişme riskini artırmaktadır (Wang ve ark. 2014; Giri ve ark. 2016).

2.1.2. Asetilkolin Sentezinde Azalma

Asetilkolin, tüm kolinerjik nöronlar tarafından kullanılan bir nörotransmitterdir ve sinir sisteminde önemli bir rol oynamaktadır. Sentezi, kolinerjik nöronların sitoplazmasında gerçekleşmektedir. AH'de en çok etkilenen nöronlar kolinerjik nöronlardır. Asetilkolin sentezinin AH'de azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca, AH tedavisinde kullanılan ilaçlardan 3 tanesi, kolinesteraz inhibitörleridir (Ferreira-Vieira ve ark. 2016).

2.1.3. A β Plak Birikimi

A β plakları ve tau nörofibril yumakları AH'de nöronlar arasındaki iletişimi zayıflatarak, nöronların beslenmesini azaltıp ölmelerine sebep olmaktadır. Bu yapıların, AH'nin sebebi yerine sonucu olabileceğini öne sürenler de bulunmaktadır (Cadonic ve ark. 2016). A β , APP'nin α -sekretaz, β -sekretaz veya γ -sekretaz enzimleri tarafından proteolizi sonucunda oluşan bir proteindir. α -sekretaz enzimi APP'yi transmembran bölgesinden 12 aminoasit uzaklıktan keserek α -APPs fragmanını oluştururken, β -sekretaz enzimi ise APP'nin amino terminaline 16 aminoasit daha yakın bir bölgeden keserek β -APPs fragmanını oluşturur. Bu enzimlerin kesiminden sonra γ -sekretaz tarafından ikinci kesilme yapılır. α -sekretaz kesimi sonrası γ -sekretaz enziminin kesimi ile p3 fragmanı, β -sekretaz kesimi sonrası γ -sekretaz enziminin kesimi ise A β peptidini oluşturmaktadır. A β peptidinin uzunluğunu belirleyen enzim de γ -sekretaz enzimidir. Normalde görülen bu süreç, AH vakalarında daha aktif olabilmektedir. Diğer ihtimal ise, normalde parçalanmış A β peptidinin, AH'lerde parçalanamaması, yanlış katlanmaları gibi durumlardan ötürü agregatlar oluşmasıdır (Saka 2010).

Hücre dışındaki A β 'nin hücre içine ve mitokondriye taşınması oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon ve son olarak da nöronların ölümüyle sonuçlanmaktadır. A β 'nin mitokondride birikime uğraması, bazı önemli enzimlerin parçalanmasına sebep olmaktadır. Bu başlıca enzimler pirüvat dehidrojenaz (PDH), izositrat dehidrojenaz ve oksogluterat dehidrojenaz (OGDH) enzimleridir ve AH'de enzimatik disfonksiyona uğradıkları bilinmektedir (Chen ve Yan 2007). Enzimlerde görülen bu hasarlar, ATP üretimini önler, dolayısıyla hücresel enerji eksikliği sebebiyle sinaptik anormallikler ve nöron dejenerasyonuna sebep olur (Gandbhir ve Sundaram 2020).

2.1.4. Hiperfosforile Tau Nörolif Yumaklarının Oluşumu

Tau, baskın olarak nöronlarda ekspresyonu görülen ve genellikle aksonlarda lokalize, mikrotübül-ilişkili bir proteindir. Tau, mikrotübül-bağlama bölgesi sayesinde, mikrotübüllerin düzenlenmesinden sorumludur ve fosforilasyonu ile mikrotübül bağlama kapasitesi ve stabilizasyonu negatif olarak düzenlenir. Tau fibril yumakları, AH dahil olmak üzere belirli nörodejeneratif hastalıkların karakteristik özelliklerindendir ve genel olarak tautopatiler olarak da adlandırılır. Hiperfosforile tau proteinlerinin mikrotübüllere olan afiniteleri azalır ve intraselüler agregatlar oluştururlar. Tau hiperfosforilasyon etiyolojisi ve sebep olduğu durumlar hala tam olarak bilinmemekte olup genellikle deney hayvanlarında araştırılmaktadır (Espinoza ve ark. 2008; Petry ve ark. 2014).

2.1.5. Mitokondri Dinamiklerinde ve Fonksiyonlarında Bozulmalar

Mitokondri disfonksiyonu AH'nin erken evrelerinde ortaya çıktığından hastalığın sebebi olabileceği üzerinde durulmakta ve hastalığın erken teşhisi ve tedavisine imkan sağlayabileceği düşünülmektedir.

Yaşlanmaya bağlı hastalıkların yaşın ilerlemesiyle nasıl ortaya çıktığı tam olarak bilinmemekle birlikte, ileri yaşlarda ortaya çıkması ve yaşa bağlı oluşu hastalığın mitokondriyal mutasyonlarla bağlantılı olduğu görüşünü desteklemektedir. Çünkü dokuda mutant mitokondrilerin oranı yükseldikçe ATP üretimi yetersiz hale gelmekte, doku ve organlarda fonksiyon yetersizliği gözlenmektedir.

Yaşlanmanın etkilerine en açık organın beyin olduğu düşünülmektedir. Vücut ağırlığının sadece %2'si olan beyin vücut için gerekli olan enerjinin yaklaşık %20'sini tek başına tüketmektedir. Sınırlı glikolitik kapasitesi ve metabolik olarak

aktif yapısı sebebiyle nöronlar enerji ihtiyacı fazla olan hücrelerdir. Bu ihtiyaçları dolayısıyla önemli miktarda mitokondri fonksiyonuna da gereksinim duyarlar. Dendrit ve akson uzantıları ile nöronlar polarize hücrelerdir. Mitokondrilerin bu yapılar arasında uygun dağılımı ve doğru zamanda taşınması çok önemlidir (Gao ve ark. 2017; Grimm ve Eckert 2017).

AH'nin seyri progresif olarak ilerlediği için erken evrede tanısının konması büyük önem taşımaktadır. Bu sayede tedaviye daha erken başlanabilir, hastalığın progresyonu yavaşlatılabilir, semptomları düzeltilebilir. Günümüzde AH için kullanılan ilaçlar, mortaliteyi azaltmaz ve hastalığı tamamen iyileştiremez. Sadece hastalığın seyrini yavaşlatıcı, hafıza kaybının birkaç ay geciktirilmesi, hastaların daha uzun süre başka bir bireyden bağımsız yaşaması, psikiyatrik ve davranış bozukluklarının azaltılması gibi hastalığın semptomlarına yöneliktir. Var olan çalışmalar, hastalık sürecini zayıflatmaya, kolinerjik sentezi düzeltmeye ve azalan asetilkolini artırmaya yöneliktir. Kullanılan farmakolojik ajanların yan etki göstermemesi önemlidir. Bu yüzden hastalığın erken dönemde teşhisi, ayrıca ilaçların düşük dozda başlanıp giderek artırılmasına dolayısıyla ortaya çıkabilecek yan etkilerinin daha seyrek görülmesine de olanak sağlamaktadır. En sık görülen yan etkiler gastrointestinal yan etkilerdir. Hastalarda kusma, bulantı, ishal görülebilmektedir. Bu yüzden ilaçların gastrointestinal sistemde yüksek oranda emilmesi, hastaların kullanması muhtemel diğer ilaçlarla minimum etkileşime girmesi de önem taşımaktadır. Ayrıca, hastalığın ilerleyen evrelerinde ilaçlarda doz artışı olacağından, yüksek dozlarda bile toksisite göstermemelidir (Ulger ve ark. 2008).

2.2. Alzheimer Hastalığı Tedavisinde Kullanılan İlaçlar

AH tedavisi için onay alan farmakolojik ajanlar, asetilkolinesteraz inhibitörleri, memantin ve A β proteinlerini hedefleyen antikordur. Asetilkolinesteraz inhibitörleri, asetilkolinesteraz enzimini inhibe ederek, AH'de azalan en önemli nörotransmitter olan asetilkolinin seviyesinin artmasını sağlar.

Aducanumab, beyindeki A β plaklarını hedefleyen ve damar içi olarak uygulanan bir antikordur. Beyindeki amiloid beta plaklarının seviyesini düşürebildiği için, bu ilaç FDA tarafından onaylanmıştır. Ancak şimdiye kadar bu tip ilaçlar

materyaline sahip bir organeldir. Mitokondriyal DNA (mtDNA) solunum zincirinde elektron taşınması için gerekli 80 proteinden 13'ünü kodlamaktadır.

2.3.1. Mitokondri Dinamikleri

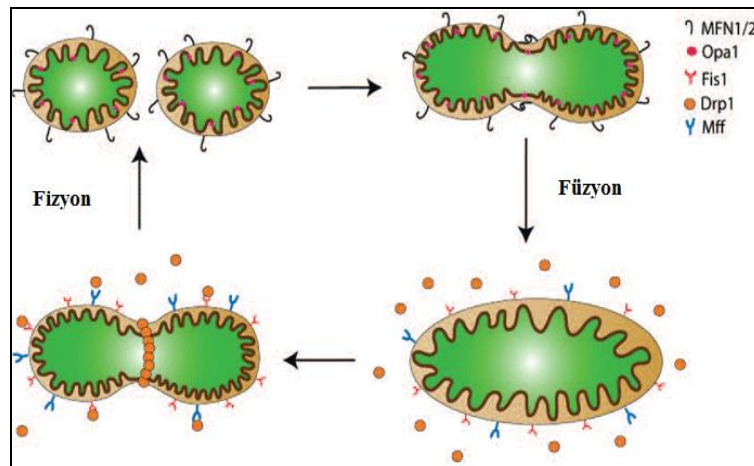
Mitokondri organelleri, sürekli olarak fizyon ve füzyon olayları ile fizyolojik değişikliğe uğrarlar. Bu olaylar mitokondrilerin morfolojileri ve dinamiklerini düzenler (Detmer ve Chan 2007). OPA1 proteini mitokondrinin iç zarında aktiftir. Mitokondriler, fizyon ve füzyon olayları ile şekil değiştiren dinamik yapılardır. Bu yapısal değişiklikler, mitokondrinin fonksiyonelliği ve yeni mitokondrilerin üretimi için gereklidir. OPA1 proteini, füzyon olayını regüle eden önemli bir proteindir. Oksidatif fosforilasyon ve apoptoz olaylarında da rol oynamaktadır (<https://medlineplus.gov/genetics/gene/opa1/>). Mitofusin proteinleri mitokondrinin dış zarında bulunmaktadır. Konformasyonel değişimlerle aktive olan mitofusinler, oligomerize olarak mitokondrilerde füzyon olayını düzenlerler (Zacharioudakis ve ark. 2022).

Mitokondri morfolojileri farklı hücre tiplerinde veya aynı hücre tipinde de farklılık göstermektedir. Küçük küreler, kısa çubuk veya uzun tübül şeklinde olabilirler. Mitokondrilerin bu dinamiklikleri lipidler, proteinler gibi komponentlerin değişimleri, hasarlı mitokondrilerin tamiri ve ortadan kaldırılması gibi olayları tetikleyerek mitokondrilerin fonksiyon ve kalitesini düzenler. Füzyon sonucu oluşan mitokondriler genellikle oksidatif fosforilasyonda ve mitokondriyal membran potansiyelinde artışa sebep olurken, parçalanan mitokondriler fonksiyon azalması, oksidatif fosforilasyonda ve mitokondriyal membran potansiyelinde azalmayla ilişkilidir (Chen ve ark. 2005; Yao ve ark. 2019).

Füzyon olayı iki aşamada gerçekleşmektedir: İlk aşamada mitofusin-1 (MFN1) ve mitofusin-2 (MFN2) ile aktive olan mitokondri dış zarının füzyonu gereklidir. İkinci aşamada ise optik atrofi-1 (OPA1) ile aktive olan mitokondri iç zarının füzyonu gerçekleşir. MFN1/2 veya OPA1 proteinlerinin yokluğu hiperfragmente olmuş mitokondrilere sebep olur. MFN1 ve MFN2 yoksunu hücrelerde tamamen fragmente olmuş mitokondri ağı, MFN1 nakavt hücrelerde benzer büyüklüklerde küçük küre yapıları halinde fragmente mitokondriler, MFN2 nakavt hücrelerde ise küre veya oval şeklinde ancak çok daha büyük boyutlarda fragmente olmuş mitokondriler görülmektedir. Yabanıl tip hücrelerdeki MFN1 veya

MFN2'nin yüksek ekspresyonu, çekirdeğin etrafında mitokondrilerin kümelenmesine sebep olur. MFN2 nakavt hücrelerdeki MFN1'in yüksek ekspresyonu ve MFN1 nakavt hücrelerdeki MFN2'nin yüksek ekspresyonu mitokondrinin füzyonunu eski haline getirmektedir. Bu durum, MFN1 ve MFN2 proteinlerinin aralarındaki baskınlık derecesini göstermektedir (Zacharioudakis ve ark. 2022).

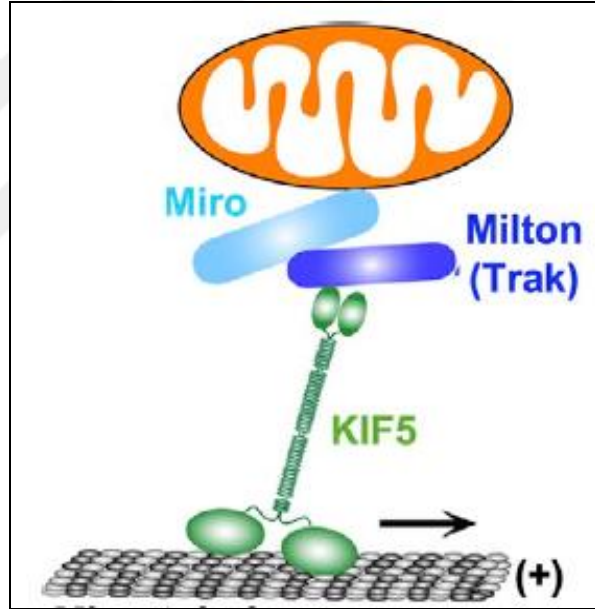
Literatürde, mitokondriyal fonksiyon bozukluklarının nöron fonksiyonu ve yapısı üzerinde yıkıcı etkileri olduğu ve bütün majör nörodejeneratif hastalıklarda görüldüğü gösterilmiştir. Mitokondrilerin nöronların dendrit ve akson uzantıları arasında uygun dağılımı ve doğru zamanda taşınması çok önemlidir. Mitokondriler, sürekli fizyon ve füzyon olayları geçirerek bütünlük ve miktarlarının korunmasını sağlar (Şekil 2.2). ATP üretimi, Ca^{+2} homeostazisinin sağlanması, hücre ölümü ve ROS üretimi gibi hücresel olaylardan sorumludurlar. Fizyon ve füzyon olayları dinamin-ilişkili büyük GTPaz proteinleri ile düzenlenmektedir. Fizyon olayının başlatılmasından sorumlu mekanizma halen tam olarak bilinmemekle birlikte temel düzenleyici molekül, genellikle sitoplazmada lokalize olan Drp1 (dinamin-ilişkili protein 1)'dir. Fizyon olayı sırasında sitozolik Drp1, Mff, Fis1 ve MiD48/51 gibi reseptör proteinler tarafından mitokondri dış zarına çağrılır ve oligomerizasyon sonucunda halka benzeri bir yapı oluşur (Gao ve ark. 2017). Drp1'in çağırılması ve polimerizasyonu sonrasında dinamin benzeri bir protein olan Dyn2'nin de membran füzyonunun son aşamasında görev aldığı gösterilmiştir (Lee ve ark. 2016; Baek ve ark. 2017).



Şekil 2.2. Mitokondri dinamiklerine görev alan proteinler (Tieu. ve Imm, 2014)

Hem dış hem de iç zarın füzyonu ile mitokondriyal füzyon olayı gerçekleşmektedir. Dış zarın füzyonu Mfn1 (Mitofusin 1) ve Mfn2 (Mitofusin 2), iç zarın füzyonu ise OPA1 (Optik atrofi protein 1) tarafından düzenlenmektedir. Mfn1 ve Mfn2 proteinleri ile homo-oligomerik veya hetero-oligomerik kompleksler dış zarların bir arada durmasını sağlar (Santel ve Fuller 2001; Ishihara ve ark. 2004).

Fizyolojik ve patolojik durumlarda, mitokondriler enerji ihtiyacı olan bölgelere hareket ederler (Frederick ve Shaw 2007). Şekil 2.3'te görüldüğü gibi, mitokondriler, mikrotübüller üzerindeki anterograde hareketlerini sağlayan motor kinesin-1 ve retrograde hareketlerini sağlayan motor dinein/ dinaktin kompleksi Milton ve Miro ile interaksiyon içindedir (Guo ve ark. 2005; Glater ve ark. 2006).



Şekil 2.3. Mitokondri organelinin taşınmasında görevli proteinler

(Sheng ve ark. 2014)

2.4. AH'de Mitokondri Disfonksiyonu

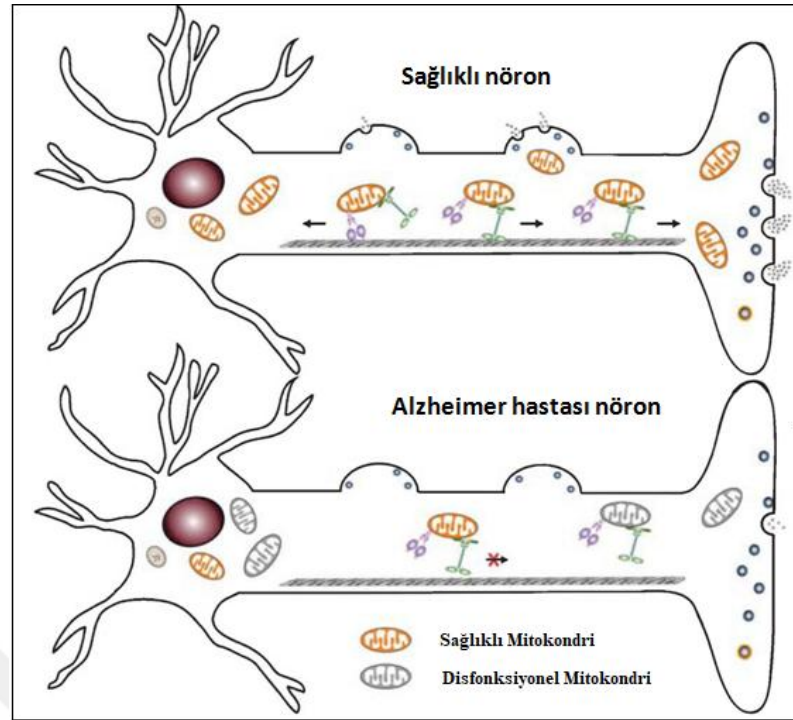
AH'de bazı mitokondriyal fonksiyonların etkilendiği gösterilmiştir. Bu fonksiyonlardan bazıları glikoz metabolizmasında azalma, mitokondriyal enzimatik hasar, A β plakları ve tau nörofibril yumakları oluşumundan önce gelişen ROS üretimindeki artıştır. Mitokondri dinamiklerinde saptanan değişimler ise; mitokondriyal füzyon ve fizyon dengesinde bozulma, mitokondirinin aksonlar

üzerindeki taşınmasında azalma, hücre içi mitokondri oranında düşüş ve şekil değişimleridir.

Mitokondri disfonksiyonu, AH'nin erken evrelerinde ortaya çıktığından hastalığın sebebi olabileceği üzerinde durulmakta olup, hastalığın teşhisi ve tedavisi için imkan sağladığı düşünülmektedir. Mitokondriyal disfonksiyonun, A β plakları ve tau nörofibril yumakları oluşmadan önce gerçekleştiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Cadonic ve ark. 2016). Ayrıca A β indüklü nörotoksisitenin oluşması için fonksiyonel mitokondri gerektiği öne sürülmektedir (Cardoso ve ark. 2001).

Mitokondrilerin taşınması için nöronlarda özelleşmiş mekanizmalar bulunur. Nörotransmitter madde salınımının gerçekleşmesi için, mitokondrilerin sinapslara taşınması gerekmektedir. Sağlıklı ve AH nöronlarında mitokondri dinamikleri farklılık göstermektedir. A β ve tau patolojileri mitokondri fonksiyonlarını bozmakta, mitokondrilerin sinapslara taşınmasında sorunlar ortaya çıkmakta ve yetersiz ATP ve Ca⁺² sebebiyle sinaptik vezikül salınımı büyük ölçüde azalmaktadır (Cai ve Tamminen 2016).

AH gelişimine mitokondriyal dinamiklerdeki bozulmaların etkileri ile ilgili çalışmalara son 10 yılda rastlanmaktadır. AH hastalarının mitokondri iç zarlarında hasarlar, Drp1, OPA1, Mfn1/2 ve Fis1 füzyon ve fizyon düzenleyici genlerin ekspresyonlarında değişimler, Drp'in GTPaz aktivitesini etkileyen, fosforilasyonunda farklılık ve S-nitrozilasyonunda post-translasyonel modifikasyonlar olduğu bildirilmiştir (Gao ve ark. 2017). Ayrıca, AH'de mitokondri morfolojilerinde değişimler, mitokondrilerin aksonal hareketlerinde azalma ve sinaptik boşluklar gözlenmiştir (Cadonic ve ark. 2016).



Şekil 2.4. Sağlıklı ve Alzheimer hastası nöronlarda mitokondriler (Cai ve Tammineneni 2016)

A β indüklü oksidatif stres AH'de nöron hücre ölümünün önemli sebeplerindendir. AH mekanizmasında etkili olduğu düşünülen mitokondriyal disfonksiyon ve apoptozun artışı aynı zamanda düşük antioksidan seviyesiyle birlikte seyretmektedir. Nöronların yüksek metabolik ihtiyacı, beyinde kısıtlı rejenerasyon ve düşük antioksidan seviyesi, beyni oksidatif strese daha açık hale getirmektedir (Manoharan ve ark. 2016). Çalışmalar süperoksit anyonu, hidroksil radikali, hidrojen peroksit ve nitrik oksit kaynaklı oksidatif stresin AH'de nörodejenerasyona sebep olduğunu göstermiştir (Van Dyke 1997; Xie ve ark. 2002).

AH'de mitokondriyal hasar, patolojik bir belirteçdir ve proteinlerin, lipidlerin ve nükleik asitlerin oksidasyonuna sebep olan reaktif türlerin temel kaynağıdır. Okside olmuş bu ürünler, düşük sitokrom c oksidaz ve kompleks IV aktivitesi ile birlikte Alzheimer hastalarının postmortem beyin dokularında gösterilmiştir (Patten ve ark. 2010). ROS ve RNS'lerin fazla üretimi A β üretimi ve toksisitesi ile ilişkilidir. Ayrıca A β da reaktif türlerin oranını artırır, mitokondriyal disfonksiyona ve sitozolik Ca⁺² dengesinin bozulmasına sebep olur. Tüm bu olaylarda A β plaklarının görülmesine yol açar (Caspersen ve ark. 2005).

Kronik inflamasyon, AH'nin ortaya çıkmasında ve gelişiminde önemli bir rol oynar. Oksidatif stres, patolojik olarak glial aktivasyonu, mikrogliosiz ve astrogliosizi indükler. Oksidatif stres, okside olmuş biyomoleküller ve A β mikrogliayı aktive eder, böylelikle proinflamatuvar tepki başlatılır. Aktive olan mikrogliya iNOS ve NOX gibi farklı inflamatuvar faktörlerin ekspresyonunu aktive eder. Sonuç olarak yüksek miktarda reaktif türler, TNF α gibi proinflamatuvar sitokinler ve IL-1 β gibi proinflamatuvar interlökinler üretilir (Akama ve ark. 2000, Michalska ve Leon 2020).

2.5. Oksidatif Stres

Normal fizyolojik koşullarda, reaktif türler (RS) hücre sağkalımı, farklılaşma, immün tepki, inflamasyon, öğrenme, hafıza, programlı hücre ölümü gibi olaylarda yer almaktadırlar. Ancak bu moleküllerin regülasyonu bozulduğunda hücre ölümü ile sonuçlanabilecek kalıcı hasarlara sebep olabilirler. RS moleküllerinin bu ikili rolleri göz önüne alındığında redoks homeostazisinin dengede tutulması için hücredeki seviyelerinin çok sıkı bir şekilde kontrol edilmesi gerekir. Bu yüzden de hücrelerde çeşitli antioksidan mekanizmaları bulunmaktadır (Michalska ve Leon 2020).

Hücre büyümesi, farklılaşma ve proliferasyon olaylarında RS molekülleri sekonder mesajcı moleküller olarak görev alırlar. Hücrelerde redoksa duyarlı çok sayıda protein bulunması da bu durumu desteklemektedir (Jones 2008). Tirozin kinaz reseptörlerine bağlı büyüme faktörleri, downstream sinyal yolları için gerekli olan RS moleküllerini artırır. RS toksisitesi biyomoleküllerde oksidatif hasara sebep olduğu gibi, RS moleküllerinin birikimi mitokondriyal disfonksiyon, glial hücre aktivasyonu, proteinlerin yanlış katlanması ve birikimine, apoptoza ve dolayısıyla nöron hasarına sebep olmaktadır (Guo 2013).

Nörodejeneratif hastalıklarda RS moleküllerinin düşük seviyede olması, hasarlı mitokondrilerin mitofaji ile ortadan kaldırılmasını sağlarken yüksek seviyede olmaları ise mitokondriyal depolarizasyona, ATP üretiminde azalmaya, Ca⁺² seviyesinde artışa dolayısıyla da apoptoza, nekrotik hücre ölümüne ve ferroptoza sebep olur.

ATP üretimi sırasında elektron transferleri sonucunda ROS üretiminin gerçekleştiği hücre içi temel kaynak mitokondri organelleridir. ROS üretimi mitokondride OXPHOS sırasında gerçekleşmektedir. ATP üretimini kontrol eden mitokondri iç membranındaki elektrokimyasal potansiyel, mitokondrinin disfonksiyonuna cevap oluşturmada mitokondriyal hareketi de değiştiren moleküler düzeydeki farklılıklar da önemlidir. Elektron taşıma zinciri aktivitesi sonucunda yan ürünler olarak O_2^- (süperoksit) formunda serbest radikaller oluşmaktadır.

Oksidatif stresin başka bir etkisi ise hücre ölümünü tetikleyerek, AH gibi pek çok nörodejeneratif hastalığın patogenezeine sebep olmasıdır. Oksidatif stresle hücrenin mücadele etme yollarından bazıları süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon sistemleridir. Mitokondri spesifik bir antioksidan olan SOD enzimi, O_2^- 'nin H_2O_2 'ye dönüştürülmesini sağlar. Glutatyon peroksidaz enzimi H_2O_2 'yi su moleküllerine dönüştürür (Oyewole ve Birch-Machin 2017).

Serbest radikal üretimi ile bu sistemler aracılığıyla gerçekleşen detoksifikasyon olayları arasında bir denge kurulmalıdır. Bu dengenin bozulması durumunda ROS üretimi ağır basarak hücrel fonksiyonlarda bozulmalara sebep olmaktadır. Bu durum da pek çok patolojiye sebep olduğu bilinen mitokondriyal disfonksiyon olarak karşımıza çıkmaktadır (Grimm ve Eckert 2017).

Nöronlar, yüksek oranda enerjiye gereksinim duyan hücrelerdir. Glikoz oksidasyonu, beyinde en yaygın enerji kaynağı olarak kullanılır. Yağ asitleri gibi kaynakların oksidasyonları, ATP üretim hızları düşük olduğu için, enerji ihtiyacını karşılayabilmek için çok fazla ROS üretimine, dolayısıyla beyinde oksidatif strese sebep olur. Sonuç olarak, nöronlar enerji ihtiyaçlarını mitokondriyal OXPHOS sisteminden ATP formunda karşılamaktadırlar (Grimm ve Eckert 2017).

Oksidatif hasar, oksijenli solunum yapan tüm hücrelerde görüldüğü halde beyin oksidatif strese daha duyarlı bir organdır. Bu duyarlılığa sebep olan bazı faktörler şu şekildedir: Yaşlanmayla birlikte mtDNA'da mutasyon artışları olur. Mitokondrinin enerji üretim verimliliği düşer ve daha fazla serbest radikal üretilir. Nöronlar oksidatif fosforilasyona daha çok ihtiyaç duydukları için oksidatif strese de daha duyarlı hale gelir.

Mitokondri hasarı ATP seviyesinin düşmesine sebep olur. Bu durumda enerji üretmek için mitokondriyal trikarboksilik asit siklusu gibi diğer mekanizmalara ihtiyaç duyulur. Ancak bu mekanizmaların nörodejeneratif hastalıklarda regülasyonlarının bozulduğu bilinmektedir. (Butterfield ve ark. 2019; Tang 2020). Bazı nörotransmitterler kendiliğinden okside olabilirler (Spencer ve ark. 1998). Demir nöronların normal fonksiyonlarında görev alan bazı proteinler (sitokrom P450, ETS komponentleri gibi) için esansiyel bir kofaktördür ve beyinde demir oranı yüksektir. Ancak demir aynı zamanda Fenton reaksiyonu ile serbest radikal oluşumunu katalizleyebilir. Bu durum da nöronlarda hasara sebep olmaktadır (Zecca ve ark. 2004). Yaşlanmaya bağlı olarak antioksidan savunma mekanizmalarında azalma görülür (Gil ve ark. 2006).

Farklı çalışmalarda, diğer yaşlı kontrol bireylere kıyasla, Alzheimer hastalarında oksidatif hasarın daha fazla olduğu gösterilmiştir (Lovell ve ark. 1997). A β ve hiperfosforile-tau birikimi Alzheimer hastalarında oksidatif stresin dolayısıyla mitokondriyal disfonksiyonun artmasına sebep olur. (Rhein ve ark. 2009) Bunun yanı sıra oksidatif stres de A β üretimi ve birikimini, tau fosforilasyonunu ve polimerizasyonunu artırabilir. Bu şekilde AH'nin ortaya çıkışı ve progresyonunda ikisi arasında bir döngü olduğu görülmektedir.

PH'de oksidatif stres en önemli patofizyolojik mekanizmadır. Ailesel PH'den sorumlu genler mitokondri fonksiyonunu etkileyerek oksidatif stresini artırır. Ailesel ALS vakalarının %20'sine RS üretiminde rol oynayan SOD1 mutasyonu sebep olmaktadır. Yanlış katlanan proteinlerin eliminasyonu, bölünme yetenekleri olmadığından nöronlar için büyük önem taşır. Protein agregatlarının aksonlarda ve dendritlerde paketlenmesi ve lizozomca zengin olan somaya taşınması gerekir. Yaşlanmayla birlikte UPS, CMA ve otofaji olaylarında görevli komponentlerde ve aktivitelerinde regülasyon azalması ortaya çıkar. Çoğu nörodejeneratif hastalıkta yanlış katlanan proteinler agregat oluşturmaya eğilimlidir (Michalska ve Leon 2020).

2.6. Mitokondri Hedefli Antioksidan Moleküller

Artan ROS seviyesinin, mitokondriyal disfonksiyonun bir sonucu veya mitokondri hasarının bir sebebi olup olmadığı henüz net olmasa da, artan ROS seviyesinin pek çok patolojik hastalık için kritik olduğu kesinlik taşımaktadır. Bu

yüzden son yıllarda, antioksidan tedavileri de dahil olmak üzere, mitokondri organeli potansiyel tedavi yöntemleri için bir hedef olmuş durumdadır (Oyewole ve Birch-Machin 2017).

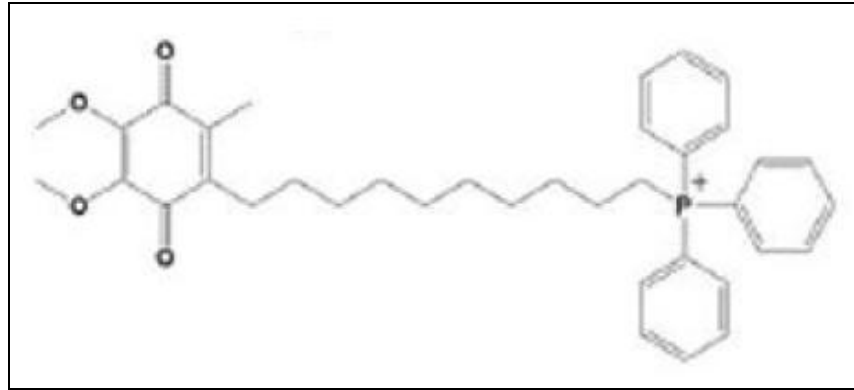
Antioksidanlar, oksidanların diğer moleküllerle reaksiyona girmesini engelleyen moleküllerdir. Böylece oksidan moleküllerin verecekleri potansiyel hasarı önler ve hücrel redoks homeostazisini düzenlerler. Antioksidan moleküller temel olarak endojen ve eksojen olmak üzere iki grupta incelenirler. Adaptif veya endojen antioksidanlar, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olabilirler. Bu moleküller vücutta sentezlenirler. Eksojen olanlar ise diyetle vücuda alınırlar. Besinlerle alınabilir (vitaminler, karotenoidler, flavenoidler gibi) veya sentetik olarak üretilmiş olabilirler (MitoTEMPO, MitoQ gibi). Hem endojen hem de eksojen antioksidanlar vücutta dağılırlar, bu moleküllerin çoğu hücrelerde sitoplazmada, bazıları ise mitokondri içinde lokalize olurlar (Oyewole ve Birch-Machin 2017).

Günümüzde, antioksidan tedavilerinde karşılaşılan en büyük zorluk, bu moleküllerin hastalıklı dokuya veya hücrelere hedeflenmesidir. Hastalıklı olmayan dokuyu etkilemeden yalnızca etkilenmiş hücreleri hedefleyerek oksidatif hasarı ortadan kaldırmak son derece zordur. Nörodejeneratif hastalıklarda tedavi amaçlı olarak çok sayıda antioksidan molekül kullanılmaktadır. Klinik denemelerde yüksek dozda alındıkları takdirde fayda gösterdikleri ortaya çıkmıştır. Bunun sebebi, küçük molekülü antioksidanların vücutta yayılarak, çok az bir kısmının mitokondriye geçmesi olarak öne sürülmektedir (Jin ve ark. 2014).

Son yıllarda keşfedilen yeni nesil mitokondriyi hedef alan antioksidan moleküller, oksidatif stres ilişkili olduğu düşünülen hastalıklarla ilgili çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır. Bu ajanlardan bazıları Mitoquinone (MitoQ), MitoVitE, MitoTEMPOL ve Sk bileşikleridir. Patolojik olaylar sonucunda ortaya çıkan fazla mitokondriyal ROS üretimini azaltmak için bazı stratejiler kullanılmaktadır. Bunlardan önemli bir tanesi mitokondri hedefli antioksidan moleküllerdir. Bu moleküllerin sentezinde kullanılan en popüler yaklaşım biyoaktif moleküllerin bir linker molekül ve lipofilik trifenilfosfonyum (TPP⁺) katyonunun birleştirilmesidir (Tauskela 2007; Battogtokh ve ark. 2018).

MitoQ ve SkQ1 molekülleri, sıklıkla kullanılan mitokondri hedefli antioksidanlardır. CoQ10, çeşitli nörodejeneratif ve hepatik hastalıklara karşı potansiyel bir terapötik ajandır. Ancak biyoyoulaşılabilirlik gücü zayıf olduğu için oldukça yüksek dozda almak gerekmektedir. Bu da çeşitli yan etkilere sebep olmaktadır. Ayrıca bazı klinik denemelerde elde edilen olumsuz sonuçlar da bulunmaktadır. (Fernandes ve ark. 2021). MitoQ molekülü mitokondri organelleri içinde depolanarak mitokondriyal ROS üretimi ve oksidatif stres sonucu meydana gelen hücre hasarını engellemektedir (Chen ve ark. 2020). MitoQ, lipofilik bir katyon olan TPP (triphenylphosphonium) bazlı bir moleküldür (Şekil 2.5) (Jin ve ark. 2014).

MitoQ, direkt antioksidan etkisinden dolayı, umut vaat eden nöroprotektif moleküldür. Ayrıca kompleks II tarafından aktif ubiquinol antioksidan formuna geri dönüştürülür. MitoQ'nun mitokondri içinde biriktiği ve öncelikli olarak iç mitokondri zarının matrikse bakan yüzeyinde absorbe edildiği gösterilmiştir (Jin ve ark. 2014). MitoQ endojen mitokondriyal antioksidan bir enzim olan Koenzim Q10'i taklit etmekle kalmayıp suprafizyolojik seviyelerde mitokondriyal membran potansiyeline bağlı bir şekilde antioksidan kapasitesini de artırmaktadır (Tauskela ve ark. 2007).



Şekil 2.5. TPP bazlı mitokondri hedefli antioksidan molekül MitoQ'nun yapısı (Jin et al, 2014)

Kas-spesifik A β eksprese eden Alzheimer modeli transgenik *C.elegans* ile yapılan bir çalışmada, MitoQ'nun ROS seviyesini ve mtDNA hasarını azaltmadığı halde yaşam süresini ve kalitesini olumlu etkilediği gösterilmiştir (Ng ve ark. 2014). Primer nöron kültüründe MitoQ'nun A β toksisitesine karşı koruyucu etkisi gösterilmiştir. Triple-transgenik fare AH modelinde, 5 ay boyunca MitoQ uygulanması ile AH benzeri nöropatolojide azalma görülmüştür. MitoQ'nun bu

farelerin beyinlerinde, oksidatif stres, A β birikimi, astrogliosis, sinaptik kayıplar ve kaspaz aktivasyonlarında azalma sağladığı gösterilmiştir (McManus ve ark. 2011). Parkinson hastalığı hücre kültürü ve fare modelinde de nöroprotektif etkisi gösterilmiştir (Solesio ve ark. 2013). Nöroprotektif etkisi yanısıra kardiyoprotektif etkileri de birkaç model üzerinde denenmiş ve kardiyak hipertrofiyi, oksidatif hasarı, mitokondriyal hasarı azalttığı gösterilmiştir (Adlam ve ark. 2005; Graham ve ark. 2009).

2.7. Nörodejeneratif Hastalıklarda SH-SY5Y Nöroblastoma Hücrelerinin Kullanımı

Embriyonik merkezi sinir sistemi dokusundan olgunlaşmış nöron hücrelerine farklılaştırılarak elde edilen hücrelerde ileri deneyler gerçekleştirilememektedir. Bu yüzden, *in vitro* çalışmalarda genellikle nöron benzeri hücre hatları kullanılmaktadır. İnsan nöroblastoma SH-SY5Y hücreleri nörotoksisite çalışmalarında sıklıkla kullanılan dopaminerjik nöronal hücre hattıdır. Metastatik kemik tümöründen köken almış olan bu hücreler SK-N-SH hücrelerinin üç kez altklonlanmasıyla elde edilmiştir (SH-SY > SH-SY5 > SH-SY5Y) ve ATCC tarafından temin edilmektedir (Kovalevich ve Langford 2013).

SH-SY5Y hücreleri, üç önemli özellikleriyle dikkat çekmektedir. Hem yüzeye yapışık halde hem de yüzer halde (adherent ve floating) hücre popülasyonuna sahiptir ve her iki tipte hücre de canlı haldedir. İkinci olarak, bu hücre hattında, morfolojik olarak birbirinden farklı olan epitel hücre benzeri (S tipi) ve nöroblast hücre benzeri (N tipi) hücreler mevcuttur. N tipi hücreler tirozin hidroksilaz ve dopamin- β -hidroksilaz enzimlerini bulunduran katekolaminerjik nöronlardır. S tipi hücreler ise enzimatik aktivitelerden yoksundur (Ross ve ark. 1983). Son olarak, SH-SY5Y hücreleri daha olgun olan ve fenotipik olarak nöronal belirteçler ile karakterize edilen nöron benzeri hücrelere farklılaştırılabilmektedir. Literatürde farklılaştırma için pek çok yöntem bulunmasına rağmen en yaygın olarak kullanılan yöntem retinoik asit (RA) ile farklılaştırma yöntemidir (Kovalevich ve Langford 2013).

Hem RA ile farklılaştırılmış hem de farklılaştırılmamış SH-SY5Y hücreleri nörobilim araştırmalarında kullanılmaktadır. Chang ve ark. (2009) RA ile

farklılaştırma işleminin bu hücrelerde Akt yolağı da dahil olmak üzere, hücre sağkalım yolağını upregüle ederek daha yüksek toleransa sebep olduğunu göstermiştir. RA, farklılaşmayı inhibe eden heliks-loop-heliks transkripsiyon faktörlerinin mRNA ve protein düzeylerinde azalmaya sebep olmaktadır (Lopez-Carballo ve ark. 2002). Ayrıca nöroblastomada, hücre sağkalımını desteklediğı ve nörotoksinlere karşı duyarlılığını azalttığı belirtilmiştir (Cavanaugh ve ark. 2006; Fernandez-Gomez ve ark. 2006).



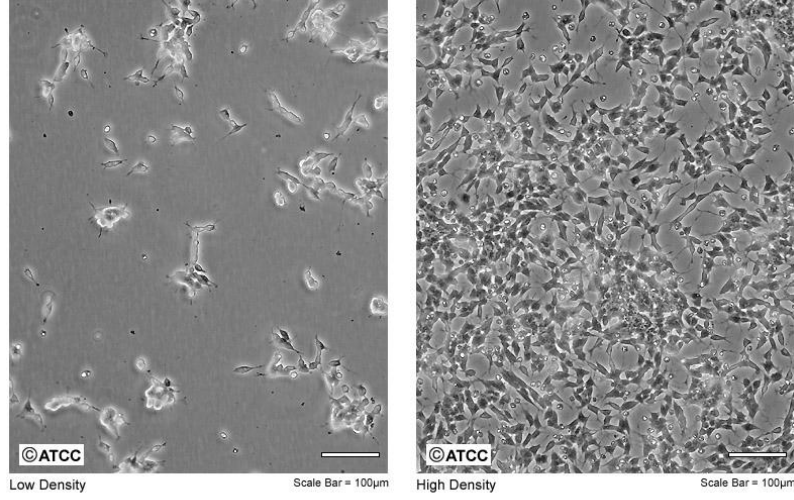
3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda ve Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi KİT-ARGEM laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın etik kurul onayı 09.11.2018 tarihli ve 2018/1563 karar sayısı ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı araştırmalar Etik Kurulundan alınmıştır. (Bkz. Ek-1).

3.1. Hücre Kültürü

SH-SY5Y (ATCC:CRL-2266) nöroblastoma hücreleri metastatik kemik tümöründen köken almış olan bu hücreler SK-N-SH hücrelerinin üç kez altklonlanmasıyla elde edilmiştir (SH-SY > SH-SY5 > SH-SY5Y) ve ATCC tarafından temin edilmektedir (Şekil 3.1). Bu hücreler %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin antibiyotiklerini içeren DMEM-F12 besiyeri içinde kültür edilmiştir. -80°C'de uzun süreli olarak muhafaza edilen SH-SY5Y hücreleri, eritilmeden önce 15 ml'lik falkon tüp içine yaklaşık 5 ml besiyeri koyulmuştur. Ardından cryo tüp (dondurma tüpü) içinde donuk halde bulunan hücreler, 37°C su banyosunda hızlıca eritilmiş ve falcon tüp içine alınmıştır. 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve DMSO içeren supernatan kısmı uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin bulunduğu pellet kısmı yaklaşık 500 µl besiyeri ile çözülmüştür. T25 flaskı içine yaklaşık 6 ml besiyeri koyulmuş ve hücreler üzerine bırakılmıştır. 37°C inkübatörde yaklaşık %70-%80 yoğunluğa erişene kadar inkübe edilmiştir.

ATCC Number: **CRL-2266**
Designation: **SH-SY5Y**



Şekil 3.1. SH-SY5Y (ATCC:CRL-2266) nöroblastoma hücreleri, düşük yoğunlukta ve yüksek yoğunlukta hücreler görülmektedir. (<https://www.atcc.org/products/crl-2266#detailed-product-images>)

3.1.1. Laminar Kabinde Steril Çalışma Koşullarının Sağlanması

Hücre kültürü deneylerinde, yalnızca çalışılan hücre hattına ait hücrelerin yaşamının devam ettirilmesi, olası bakteri, küf veya diğer hücre çeşitleri ile gerçekleşebilecek kontaminasyonların önlenmesi için steril ortamlarda çalışılmalıdır. Bu amaçla, hücre kültürü çalışmaları laminar kabin içinde gerçekleştirilmiştir. Hücre deneylerinden önce 30 dakika boyunca laminar kabin UV'ye maruz bırakılmıştır. Kullanılacak her malzeme, %70 etanol ile temizlendikten sonra kabin içine alınmıştır. Kabin içinde çalışma bittikten sonra, kabin içi tekrar 30 dakika UV'ye maruz bırakılmıştır. Yaklaşık ayda bir kez olmak üzere, kabin içi tamamen boşaltılarak çamaşır suyu ve sonrasında %70 etanol ile silinerek steril edilmiştir.

3.1.2. DMEM-F12 Besiyeri Hazırlığı

-20°C'de saklanan FBS (fötal dana serumu) (%10 w/w) ve penisilin-streptomisin antibiyotikleri (%1 w/w), 37°C su banyosunda eritildikten sonra DMEM F-12 besiyeri ile karıştırılmış ve vakum pompası yardımıyla 0,2 µm filtreden geçirilerek sterilizasyonu sağlanmıştır.

3.1.3. Nöroblastoma Hücrelerinin Besiyeri Değişikliği

Besiyeri ortamı değiştirilmeyen hücreler, yeterli besine ve oksijene ulaşamadıkları için büyüme oranları yavaşlamakta ve ölüm oranı artmaktadır. Bu yüzden yaklaşık %80 doluluk oranına ulaşana kadar, hücrelerin besiyeri ortamı 2-3 günde bir değiştirilmiştir. Böylelikle taze besinlere ulaşmaları sağlanmıştır.

3.1.4. Nöroblastoma Hücrelerinin Pasajlanması

En az %80 doluluk oranına ulaşan hücreler pasajlanmıştır. Yüzer haldeki (suspension) hücrelerin elde edilmesi için flastaki tüm medium bir santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Yapışık haldeki (adherent) hücrelerin flastan kaldırılması için Tripsin-EDTA kullanılmıştır. -20°C'de saklanan Tripsin-EDTA, 37°C su banyosunda eritilmiştir. 1 ml Tripsin-EDTA hücrelerin üzerine bırakılmış ve inkübatörde yaklaşık 3 dakika bekletilmiştir. İnkübatörden çıkarılan flask içine 5 ml besiyeri eklenmiş ve yeni bir santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Yüzer haldeki ve yapışık haldeki hücreleri içeren tüpler, 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Sıvı kısım uzaklaştırılmış ve tüm pellet, besiyeri ile çözülmüştür. Hücrelerin 1/4'ü yeni bir flaska aktarılmış ve inkübatöre alınmıştır. Kalan hücreler ise stok hazırlamak amacıyla dondurulmuştur.

3.1.5. Nöroblastoma Hücrelerinin Dondurulması

Dondurulan hücrelerin patlamaması için %5 DMSO içeren dondurma solüsyonu hazırlanmıştır. DMSO eklendikten sonra, -20°C'de muhafaza edilmektedir. Dondurulacak hücre pelleti, 1 ml dondurma solüsyonu ile çözülerek hızlı bir şekilde cryo tüp içine alınmış ve içinde izopropanol bulunan dondurma kabına yerleştirilerek -20°C'de 1 saat bekletilmiştir. Bu şekilde hücrelerin yavaş yavaş donması ve minimum zarar görmesi sağlanmaktadır. 1 saat sonra dondurma kabından çıkarılarak -80°C'ye kaldırılmıştır.

3.1.6. Nöroblastoma Hücrelerinin Thoma Lamı ile Sayılması

Pasajlanan hücrelerin istenen sayıda ekiminin yapılabilmesi için tripsin uygulaması sonrası santrifüj edilen hücrelerin supernatan kısmı atılmıştır. Hücrelerin bulunduğu pellet kısmı 1 ml besiyeri ile çözülmüştür. Tamamen homojen hale geldikten sonra 20 µl bir santrifüj tüpüne alınmıştır ve 20 µl trypan mavi boyası ile karıştırılmıştır. Thoma lamının haznesine 15 µl yüklenmiş ve ışık mikroskobu altında

alandaki canlı hücreler sayılmıştır. Bu sayı ile Thoma laminin faktörü çarpılarak 1 ml besiyeri içindeki hücre sayısı hesaplanmıştır.

3.2. Liyofilize Haldeki Amiloid Betanın Hazırlanması

Ticari firmadan satın almış olduğumuz amiloid beta (A β 42) liyofilize halde temin edilmiştir ve -20°C'de muhafaza edilmektedir. A β 42'nin hazırlanması için, firmanın yönergeleri takip edilmiştir. Bu yönergelere göre, liyofilize haldeki A β 42'nin yaklaşık 70-80 μ l %1'lik NH₄OH ile çözülmesi tavsiye edilmiştir. Öncelikle, steril kabin içerisinde %32'lik NH₄OH steril dH₂O ile seyreltilerek %1'lik NH₄OH hazırlanmıştır. 10 μ l %32'lik NH₄OH ile 310 μ l ddH₂O, 1,5 ml'lik santrifüj tüpünde pipetaj yapılarak karıştırılmıştır. Ardından 75 μ l %1'lik NH₄OH ile liyofilize haldeki A β 42 yavaşça köpürtmeden pipetaj yapılarak çözülmüştür. A β 42'nin NH₄OH içinde uzun süre muhafaza edilmesi tavsiye edilmemektedir. Bu yüzden derhal steril 1X PBS ile 1 mg/ml'ye seyreltilmiştir. 925 μ l steril 1X PBS eklenerek, 1 mg/ml A β 42 çözeltisi hazırlanmıştır. Bu halde, uzun süreli olarak muhafaza edilebilmektedir.

3.3. XTT ile Hücrelerin Toksisitelerinin Ölçülmesi

Canlılık testinin yapılması için öncelikle flastaki hücreler tripsin ile muamele edilerek inkübatörde birkaç dakika bekletilmiştir. Üzerine besiyeri eklenerek pipetaj yardımı ile tüm hücreler yüzeyden kaldırılmıştır. Ardından 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatan kısmı yavaşça uzaklaştırılmış ve hücre pelleti 1 ml besiyeri ile çözülmüştür. Ardından Thoma lamında sayılan hücreler, her kuyuda 20.000 hücre olacak şekilde 100'er μ l hacimde 4'er tekrarlı olarak 96-kuyulu plakaya ekilmiştir. İnkübatöre alınan hücreler, 24 saat sonra çıkarılmıştır. Üzerindeki besiyeri yavaşça uzaklaştırılmış ve toksisitesi ölçülecek olan maddelerin serumsuz besiyeri ile hazırlanan farklı konsantrasyonları 100'er μ l hacimde her kuyu üzerine uygulanmıştır. Kontrol kuyularına ise serumsuz besiyeri eklenmiştir. Tekrar inkübatöre alınan hücreler 24 saat inkübe edilmiştir.

Canlılık testleri, XTT assay ile gerçekleştirilmiştir. Bunun için -20°C'de muhafaza edilen XTT solüsyonu ile aktivasyon solüsyonu, firmanın yönergelerinde belirtildiği şekilde 37°C su banyosunda, saydam bir hale gelene kadar eritilmiştir. 5 ml XTT solüsyonu ile 0,1 ml aktivasyon solüsyonu, bir santrifüj tüpünde

karıştırılarak reaksiyon solüsyonu elde edilmiştir. Son olarak, 4 kuyuya da blank olarak 100 µl besiyeri koyulmuştur. 96-kuyulu plakadaki her kuyu üzerine 50'şer µl reaksiyon solüsyonu eklenmiştir. Aliminyum folyoya sarılarak inkübatöre alınmış ve yaklaşık 5 saat inkübe edilmiştir. Firma yönergelerine göre 2-5 saatlik inkübasyon, testin sonuç vermesi için yeterli olmaktadır.

5 saat sonunda boyanın homojen bir şekilde dağılması için çalkalayıcıda yaklaşık 5 dakika karıştırılmıştır. Ardından, spektrofotometre cihazında 450 nm ve 630 nm dalga boylarında okumalar yapılmıştır. Bu iki dalga boyundaki ölçüm değerlerinin farkları alınarak, ortalamaları hesaplanmıştır. Kontrol kuyularının yüzdesi olacak şekilde canlılık grafikleri elde edilmiştir.

3.4. AH Hücre Modeli

6-kuyulu plakanın her bir kuyusuna 300.000 hücre ekilmiştir. Uygulamadan 3 gün önce serumsuz besiyeri içinde 2 µM Aβ42 hazırlanmış ve inkübatörde bekletilerek agregat oluşturmaları sağlanmıştır. 24 saat sonra hücreler yapıştıktan sonra kontrol kuyularının besiyeri serumsuz besiyeri ile değiştirilmiştir. Diğer kuyuların besiyeri uzaklaştırılarak agregat oluşturan 2 µM Aβ42 içeren besiyeri kuyulara eklenmiştir.

3.5. Gerçek Zamanlı PCR ile İlgili Genlerin Ekspresyonlarının Ölçülmesi

Aβ42 ve Aβ42+MitoQ uygulanan hücre gruplarındaki mitokondriyal disfonksiyon ile ilişkili genlerin mRNA düzeyindeki ekspresyonları gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real-time qPCR) analizi ile belirlenmiştir.

3.5.1. Hücrelerden Total RNA İzolasyonu

6-kuyulu plakaya 300.000 hücre/kuyu ekilmiştir. Uygulamadan 3 gün önce serumsuz besiyeri içinde 2 µM Aβ42 hazırlanmış ve inkübatörde bekletilerek agregat oluşturmaları sağlanmıştır. 24 saat sonra hücreler yapıştıktan sonra kontrol kuyularının besiyeri serumsuz besiyeri ile değiştirilmiştir. Diğer kuyuların besiyeri uzaklaştırılarak agregat oluşturan 2 µM Aβ42 içeren besiyeri Aβ kuyularına eklenmiştir. Aβ42+MitoQ kuyularına da 2 µM Aβ42 ve 50 nM MitoQ eklenmiştir. Aβ42 ve Aβ42+MitoQ uygulanan kuyulardaki hücreler, madde uygulamaları sonunda mikroskop altında incelenmiş ve Aβ42 agregat görüntüleri gözlemlendikten

sonra, her bir kuyu için 500 µl trizol ile hücre lizatları toplanarak örnekler -80°C'de dondurulmuştur.

-80°C'de muhafaza edilen hücre lizatı örnekleri buz üzerinde eritilmiştir. Eriyen lizat üzerine 100 µl kloroform eklenmiş ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir. Ardından 15.000 rpm'de +4°C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Oluşan 3 fazın en üstteki sıvı kısmı temiz bir santrifüj tüpüne alınmıştır. Üzerine 250 µl izopropanol ve 250 µl 1,2 M NaCl eklenmiş ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra tekrar 15.000 rpm'de +4°C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatan kısmı dikkatlice uzaklaştırılmış ve pellet 500 µl %70 etanol ile çözülmüştür. Ardından 15.000 rpm'de +4°C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatan kısmı uzaklaştırılmış ve tüpler ters çevrilerek kurumaya bırakılmıştır. 50 µl DEPC ile muamele edilmiş steril saf su ile pellet çözülmüştür. Spektrofotometreye 2'şer µl örnek yüklenerek 260 ve 280 nm'de saflık ölçümü yapılmıştır. A_{260}/A_{280} oranları 2,0-2,1 ve A_{260}/A_{230} oranları da 2,0-2,4 olan örnekler devam eden analizler için kullanılmıştır. Bu örnekler, cDNA sentezinde kullanılabilecek kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.5.2 RNA Örneklerinden cDNA Sentezi

Elde edilen RNA örneklerinden iScript™ cDNA sentezi kiti (BioRad, 170-8891) ile cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. 1 µg RNA örneği üzerine 4 µl 5X iScript reaksiyon karışımı, 1 µl Revers transkriptaz enzimi eklenmiştir. Örneklerin son hacmi nükleazsız su ile 20 µl'ye tamamlanmıştır. PCR cihazında cDNA sentezi protokolü gerçekleştirilmiştir: 25°C 5 dakika, 46°C 20 dakika ve 95°C 1 dakika (enzim inaktivasyonu).

3.5.3. Primer Tasarımı ve Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizi (Real-time qPCR)

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analizinde incelenecek olan hedef genlerin dizileri Gen Bankası'ndan alınmıştır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Bu genleri çoğaltmak için kullanılacak olan primerler IDT Primer Quest (<https://eu.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>) programı ile tasarlanmıştır. Hedef genlere ait primer dizileri Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Primer Dizileri

Sıra	Gen Adı	İleri Primer (Sense)	Geri Primer (Antisense)
1	SOD1	GATGAAGAGAGGCATGTTGGAG	CTCCTGAGAGTGAGATCACAGA
2	SOD2	GGAGATGTTACAGCCCAGATAG	CGTTAGGGCTGAGGTTTGT
3	CAT	AGGGTGGTGCTCCAAATTAC	TGTTGAATCTCCGCACTTCTC
4	BACE1	ATCCACGGGCACTGTTATG	GTCATGAGGGTTGACTCATCTG
5	BACE2	CACAGAGAGGTCTAGCACATAC	GGCCAAGTATTCCATTCCATT
6	NOS2	GTTTCGGGAAGTGGAGCTAAA	CCCATGTACCAGCCATTGAA
7	MFF	AACTTCTGGAAGAGGAGAACAAA	CGAAACCAGAGCCAGCTATTA
8	MIRO1	GTGGACGCTCACGACTTATT	AGCTGAAGCTTGAGACTCTTG
9	MIRO2	TTGATGGCAGTGACCCAAA	GCCTTGGAGGAGACAAAGAG
10	ATP6	CCACCTACTCATGCACCTAAT	AGCGATTCTAGGATAGTCAGTAG
11	ATP8	CTACCACCTACCTCCCTCAC	GGGCAATGAATGAAGCGAAC
12	COI	CTAGCAGGTGTCTCCTCTATCT	GGCGTTTGGTATTGGGTTATG
13	COII	ATCCCTCCCTTACCATCAAATC	GTCGCCTGGTTCTAGGAATAAT
14	COIII	CGAGTCTCCCTTCACCATTTTC	TTGGCGGATGAAGCAGATAG
15	APOE	CGTTGCTGGTCACATTCT	CCTTCAACTCCTTCATGGTCTC
16	KINESIN-1	CAGCAAAGTCAACTGGTAGAGA	GCTCAGCTTGCATATTGTCTTG
17	TRAK1	CCGACACCATCTACGGTTATG	GTCTCTTCAATTTGCTCGGTTG
18	TRAK2	CAACCGACGAGATTCCACTAC	AATTGGGCTGTGGTACACTT
19	KIF5A	GAGAAGCTGAAGAGCGAAGAA	CTCATGTCGCTCGTACAGAAA
20	APP	GACAGACAGCACACCCTAAA	GGCCAAGACGTCATCTGAATA

Housekeeping gen olarak β -aktin geni kullanılmıştır. qPCR analiz için 5 μ l BrightGreen 2X qPCR MasterMix (BrightGreen 2X qPCR MasterMix-ROX, ABM, MasterMix-R), 5 pMol forward primer, 5 pMol reverse primer, 2 μ l cDNA kullanılmış ve nükleazsız su ile toplam hacim 10 μ l'ye tamamlanmıştır. Gerçek zamanlı PCR cihazında (Bio-Rad, CFX Connect) 95°C'de 10 dakika enzim aktivasyonu, 95°C'de 15 saniye denatürasyon, 60°C'de 60 saniye uzama ve son olarak 95°C'de 10 saniye, 65°C'ye soğutma ve ardından 5 saniyede bir 0,5'er °C artarak 95°C'ye çıkma şeklinde erime eğrisi analizi basamakları ile hazırlanmış protokol ile gerçek zamanlı PCR gerçekleştirilmiştir. Her primer için C_T değerleri elde edilmiş ve housekeeping geni ile normalizasyon yapılmıştır.

3.6. Western Blot ile İlgili Genlerin Protein Düzeyindeki Ekspresyonlarının Belirlenmesi

Western Blot metodu ile anti-Opa1 ve anti-Mff primer antikorları kullanılarak, bu genlerin protein düzeyindeki ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Öncelikle hücrelerde uygulama grupları hazırlanmış, hücrelerden protein izolasyonu gerçekleştirilmiş ve bu proteinler SDS-PAGE ile yürütülmüştür. PVDF membrana transfer edilen örnekler primer ve sekonder antikorlarda işaretlenmiş ve görüntüleme yapılmıştır.

3.6.1. Hücrelerden Protein İzolasyonu

6-kuyulu plakanın her bir kuyusuna 300.000 hücre ekilmiştir. Yaklaşık %70 yoğunluğa ulaştıklarında (~48 saat) madde uygulamaları yapılmıştır. ~48 saat sonra besiyeri uzaklaştırılmıştır. Her kuyuya, 500 μ l RIPA tampon çözeltisi (Cell Signaling, 9806) eklenmiş ve 10 dakika buz üstünde inkübe edilmiştir. RIPA tamponu, proteaz inhibitör kokteyli (%1 w/w) (Halt™ Protease Inhibitor Cocktail, Thermo Scientific, 7841) içermektedir. Ardından pipetaj yapılarak hücre lizatları santrifüj tüplerine alınmıştır. 14.000 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj yapılmış ve süpernatantlar yeni santrifüj tüplerine alınarak -80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.6.2. Proteinlerin Miktarının Belirlenmesi

Protein miktarlarının belirlenmesi için Bradford yöntemi kullanılmıştır. 2 mg/ml dana serum albumin proteini (BSA, Sigma-Aldrich, P0834) ile BSA standart grafiği hazırlanmıştır. 30'ar μ l 0 μ g, 5 μ g, 10 μ g, 15 μ g ve 20 μ g olacak şekilde 96-

kuyulu plakaya BSA eklenmiş ve 595 nm'de absorbans değerleri okutularak BSA standart eğrisi çizilmiştir. İzolasyonları gerçekleştirilen protein örnekleri yine 30 µl kuyuya eklenmiş ve 90 µl Bradford solüsyonu (Sigma-Aldrich, B6916) ile karıştırılmış ve 595 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür. BSA standart eğrisinden elde edilen denklem ile izole edilen proteinlerin protein konsantrasyon değerleri hesaplanmıştır.

3.6.3. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektroföresi)

SDS jel, ayırma ve yığınlama jellerinden oluşmaktadır. 10X10 cm büyüklüğünde, 1 mm kalınlığındaki camlar arasında bu jeller hazırlanmıştır. Ayırma jeli, 3,1 ml su, 2,4 ml %30'luk bisakrilamit çözeltisi, 1,9 ml 4X ayırma jeli çözeltisi, 112 µl %10'luk amonyum persülfat (APS) çözeltisi ve 5 µl TEMED karışımı ile hazırlanmıştır. Jelin üstüne bütanol eklenerek üstünün pürüzsüz olması sağlanmıştır. Jel donduktan sonra bütanol uzaklaştırılmış ve yığınlama jeli dökülmüştür. Yığınlama jeli 1 ml su, 200 µl %30'luk bisakrilamit çözeltisi, 444 µl 4X yığınlama jeli çözeltisi, 50 µl %10'luk APS çözeltisi ve 5 µl TEMED ile hazırlanmıştır. Yığınlama jeli üzerine uygun taraklar yerleştirilmiş ve jel donmaya bırakılmıştır.

Yürütme tamponu, 6,005 g Tris, 28,82 g glisin, 20 ml %10'luk SDS ile hazırlanmış ve su ile hacim 200 ml'ye tamamlanmıştır (10X). Tarak çıkarıldıktan sonra kuyular 1X olarak seyreltilen yürütme tamponu ile temizlenmiştir. Yükleme tamponu için 7 ml 4X Tris-HCl, 3,6 ml gliserol, 1 g SDS, 2 mg brom fenol mavisi, 400 µl β-merkaptöetanol karıştırılmış ve toplam hacim 10 ml olacak şekilde su ile tamamlanmıştır. Protein örnekleri, yükleme tamponu ile 5:1 oranında karıştırılarak, 30 µg protein örneği olacak şekilde hazırlanmış ve 5 dakika kaynatıldıktan sonra kuyulara yüklenmiştir. Protein markeri (Opti-Protein Marker, ABM, G252) da yüklendikten sonra elektroförez tankı 1X yürütme tamponu ile doldurulmuştur. Protein örnekleri yığınlama jeli boyunca yürürken 50 V ile ayırma jeli boyunca yürürken de 100 V ile yürütme işlemi yapılmıştır.

3.6.4. Proteinlerin Transferi, Antikorlar ile İşaretleme ve Görüntüleme

Transfer tamponu 3,03 g tris, 14,41 g glisin, 10 ml %10'luk SDS ve 150 ml metanol ile hazırlanmış ve su ile hacmi 250 ml'ye tamamlanmıştır. Yürütme işlemi sonrasında jelin yığınlama bölümü kesilmiş ve ayırma jeli transfer tamponu içinde 30

dakika çalkalayıcıda bekletilmiştir. Ayırma jeli büyüklüğünde PVDF membran (Porablot PVDF, MN, 741260) kesilerek, transfer öncesinde 15 saniye boyunca metanolde ve ardından 15 dakika boyunca transfer tamponu içinde çalkalayıcıda bekletilmiştir. Ayırma jeli ile aynı büyüklükte filtre kağıtları kesilerek transfer tamponu ile ıslatılmıştır. Transfer kasetinin içine önce filtre kağıtları, sonra membran, daha sonra da jel olacak şekilde yerleştirilmiş ve üstü tekrar önceden ıslatılmış filtre kağıtları ile kapatılmıştır. Transfer kaseti Trans-Blot® Turbo™ transfer sistemine (BioRad) yerleştirilmiş ve 1,3 A 25 V'ta 7 dakika boyunca jeldeki proteinlerin membrana transferi yapılmıştır.

Spesifik olmayan bağlanmaların önlenmesi amacıyla, membran %5 süt tozu içeren TBST çözeltisi ile 1 saat boyunca inkübe edilerek bloklanmıştır. TBST çözeltisi 2,42 g Tris, 9 g NaCl ve 1 ml Tween-20 ile hazırlanmış ve hacmi su ile 1 litreye tamamlanmıştır.

TBST içinde 1:1000 oranında seyreltilen anti-Opa1, anti-Mff ve anti-ACTB primer antikorları ile membran gece boyunca +4°C'de çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. TBST ile 3 defa 10'ar dakika boyunca çalkalayıcıda inkübe edilerek yıkama işlemi yapılmıştır. Ardından sekonder antikör (Jackson Immuno Research, 211-035-109) ile 2 saat boyunca çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. TBST ile 3 defa 10'ar dakika boyunca çalkalayıcıda inkübe edilerek yıkama işlemi tekrarlanmıştır. Membran, ECL (BioRad, 1705061) ile 5 dakika boyunca inkübe edilmiş ve BioRad görüntüleme sistemi (BioRad ChemiDoc™ MP, Imaging System) ile görüntüleme gerçekleştirilmiştir.

3.7. MitoTracker Red ile Floresan Mikroskop Altında Mitokondrilerin Görüntülenmesi

10.000 hücre/kuyu olacak şekilde 6-kuyulu plakaya hücre ekimi yapılmıştır. 24 saat inkübasyon sonrasında 2 μ M A β 42 ve 2 μ M A β 42 + 50 nM MitoQ uygulamaları yapılmış ve tekrar inkübatöre alınmıştır. 24 saat inkübasyon sonrasında mitokondri spesifik floresan boya olan MitoTracker Red ile boyama yapılmış ve boya ile yaklaşık 1 saat inkübe edilmiştir. Ardından boya uzaklaştırılmış ve kuyulara besiyeri eklenerek, her uygulama grubundaki mitokondri yoğunlukları, floresan mikroskop (Zeiss) ile görüntülenmiştir.

3.8. Hücre içi ROS Seviyesi Ölçümü

Siyah tabanlı 96-kuyulu plakaya, 5.000 hücre/kuyu olacak şekilde hücreler 100 µl besiyeri içinde 5 tekrarlı olacak şekilde ekilmiştir. 24 saat inkübasyon sonrasında, kontrol kuyularına 100'er µl serumsuz besiyeri ve diğer kuyulara 2 µM Aβ42 ve 2 µM Aβ42 + 50 nM MitoQ uygulamaları yapılmıştır. 24 saat sonra besiyeri uzaklaştırılmış ve her kuyuya 10 µM reagent 1 eklenmiş ve 1 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Aliminyum folyo ile sarılan plakadaki örneklerin floresan düzeyleri, floresan okuyucuda belirtilen dalga boylarında okunmuştur. (Ex/Em: 548/573)

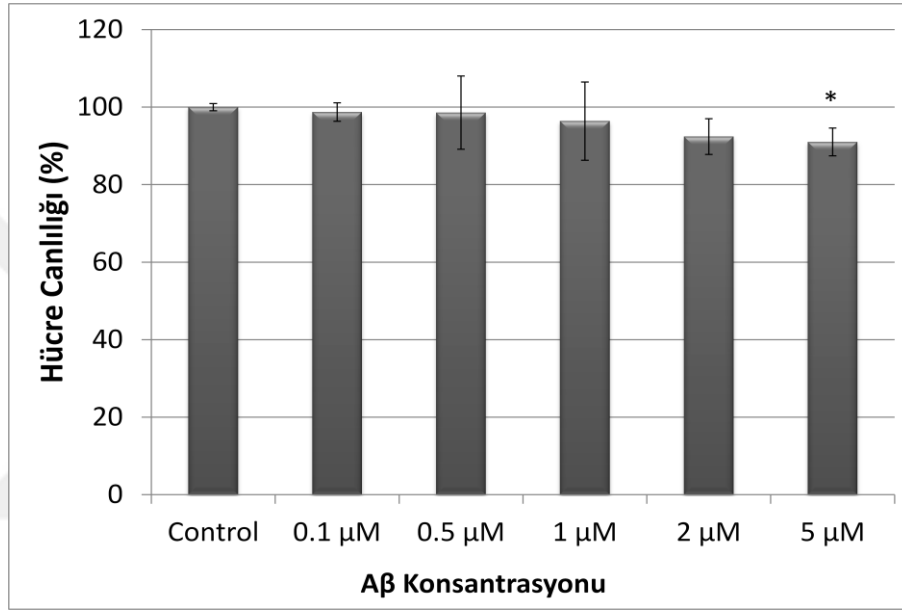
3.9. İstatistiksel Analiz

Gerçek zamanlı qPCR sonuçlarının analizi $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ metodu kullanılarak internet tabanlı RT² ProfilerTM PCR Array Data Analysis programı ile gerçekleştirilmiştir. Diğer istatistiksel analizler için gruplar arası farkların karşılaştırması SPSS programı kullanılarak yapılmıştır. Bütün istatistiksel analizlerde $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. A β 42'nin Hücreler Üzerindeki Canlılık Seviyeleri

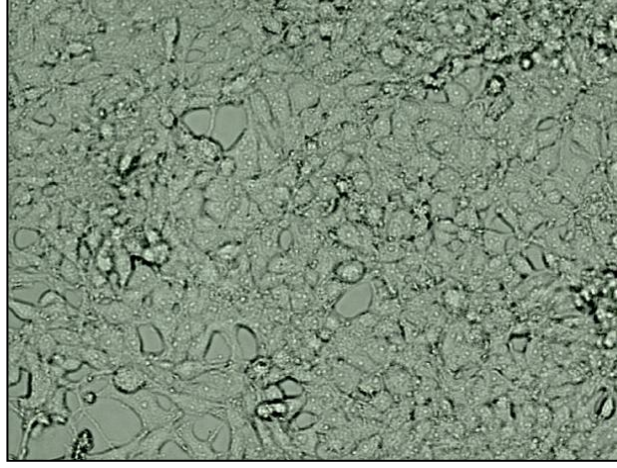
SH-SY5Y hücrelerine 24 saat uygulanan A β 42 konsantrasyonlarının hücre canlılığı üzerindeki etkileri XTT testi ile gösterilmiştir. Kontrol grubuyla kıyaslandığında denenen A β 42 konsantrasyonlarının, hücrelere büyük oranda toksik etkileri olmadığı gösterilmiştir. Bundan sonraki analizler için yaklaşık %5 toksisite gösterdiği tespit edilen konsantrasyon olan 2 μ M kullanılmıştır.



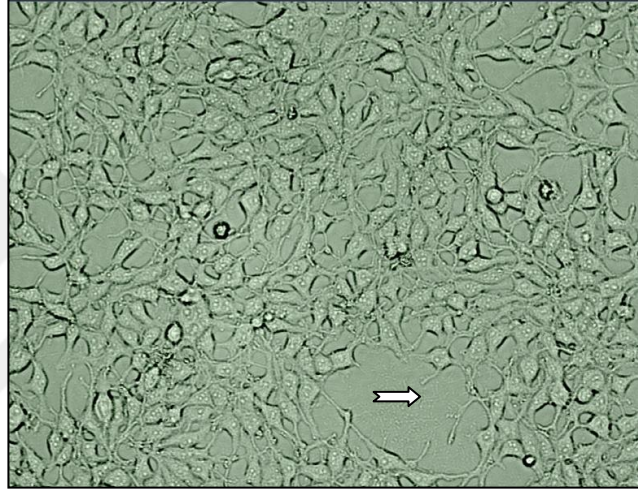
Şekil 4.1. A β 42 Konsantrasyonunun SH-SY5Y Hücrelerinin Canlılıkları Üzerine Etkisi (Hücre canlılığı yüzde olarak verilmiştir. * p<0,05)

4.2. A β 42'nin Hücrelerin Morfolojileri Üzerindeki Etkileri

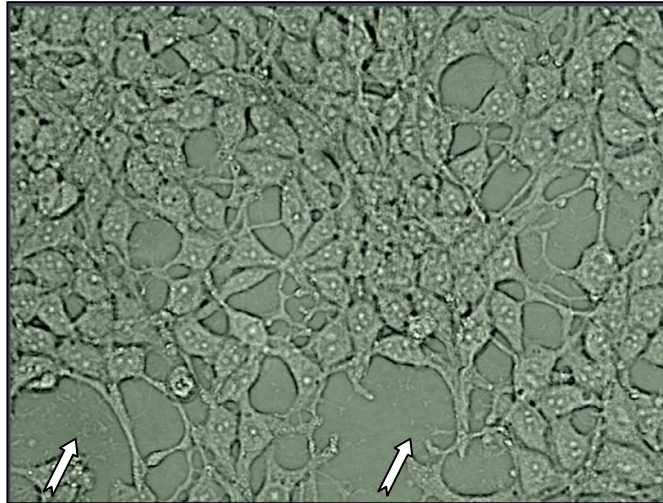
A β 42'nin hücrelerin morfolojileri üzerindeki değişimlerini gözlemek için, hücrelere 2 μ M A β 42 uygulanarak faz-kontrast mikroskopunda fotoğraflar elde edilmiştir. Şekil 4.2'de kontrol grubu hücrelerin morfolojileri görülmektedir. Şekil 4.2-4.8'de literatürdeki görüntülerden yola çıkılarak, A β 42 agregatları oldukları düşünülen birikintiler gösterilmiştir.



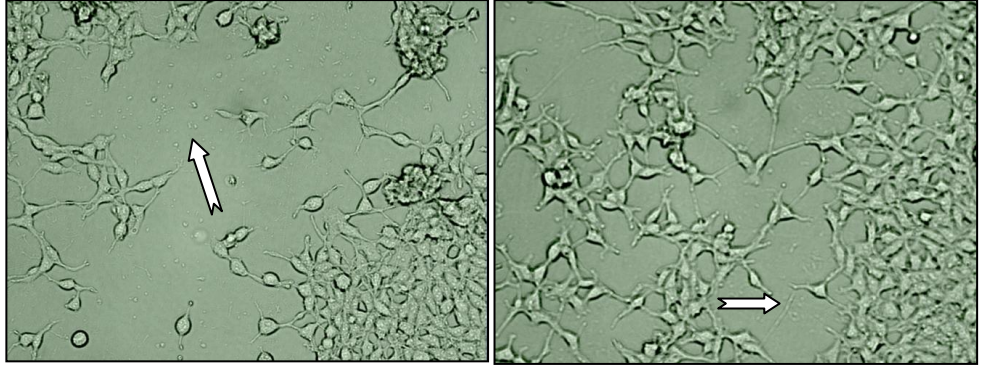
Şekil 4.2. Kontrol hücrelerin 4. günde görüntüleri (200X)



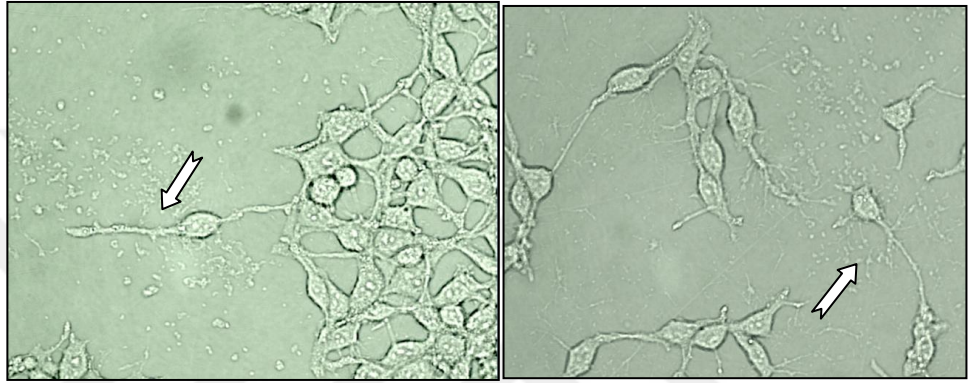
Şekil 4.3. 2 µM Aβ uygulanan hücrelerin 2. günde görüntüleri (200X) Ok, Aβ42 agregatlarını göstermektedir.



Şekil 4.4. 2 µM Aβ uygulanan hücrelerin 2. günde görüntüleri (400X) Oklar Aβ42 agregatlarını göstermektedir.



Şekil 4.5. 2 µM Aβ uygulanan hücrelerin 2. günde görüntüleri (400X) Oklar Aβ42 agregatlarını göstermektedir.



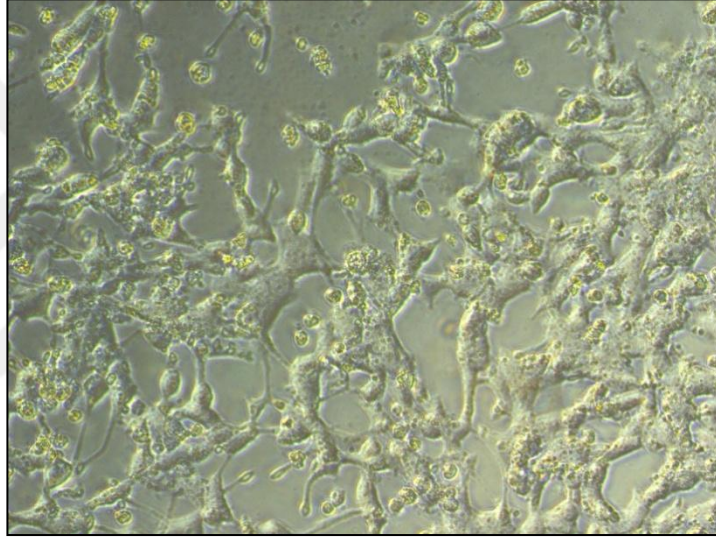
Şekil 4.6. 2 µM Aβ uygulanan hücrelerin 2. günde görüntüleri (630X) Oklar Aβ42 agregatlarını göstermektedir.



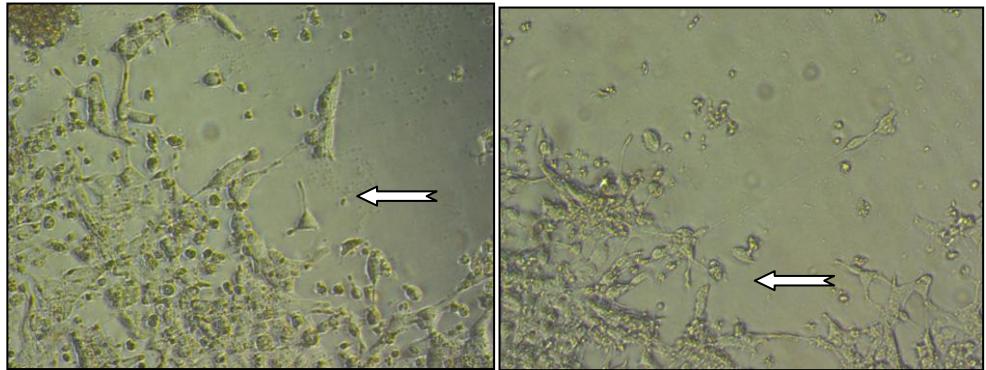
Şekil 4.7. 2 µM Aβ uygulanan hücrelerin 4. günde görüntüleri (400X)



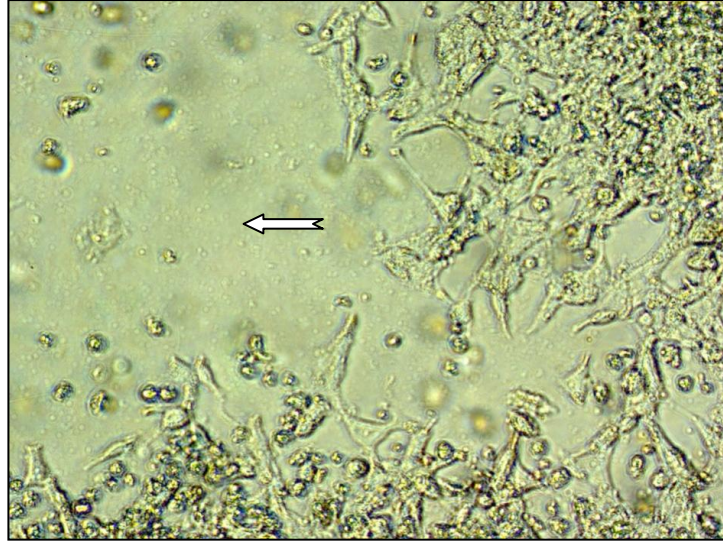
Şekil 4.8. 2 µM Aβ uygulanan hücrelerin 4. günde görüntüleri (630X)



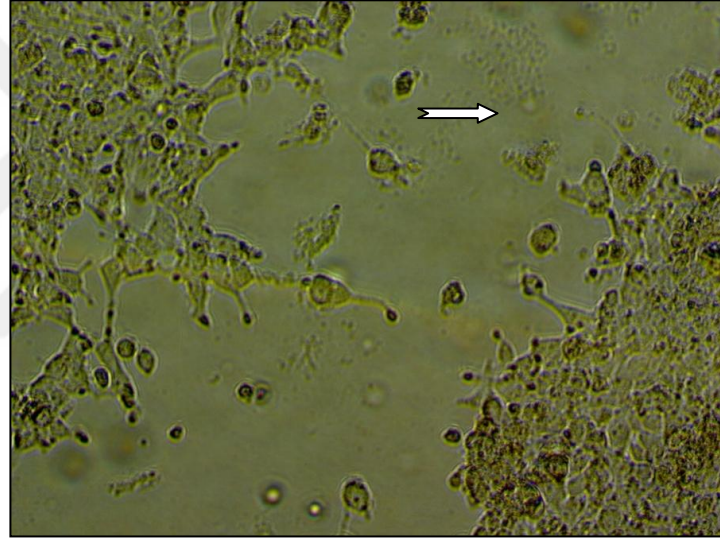
Şekil 4.9. Kontrol grubu hücrelerin 10. günde görüntüleri (100X)



Şekil 4.10. 2 µM Aβ uygulanan hücrelerin 10. günde görüntüleri (100X)



Şekil 4.11. 2 µM Aβ uygulanan hücrelerin 10. günde görüntüleri (200X)

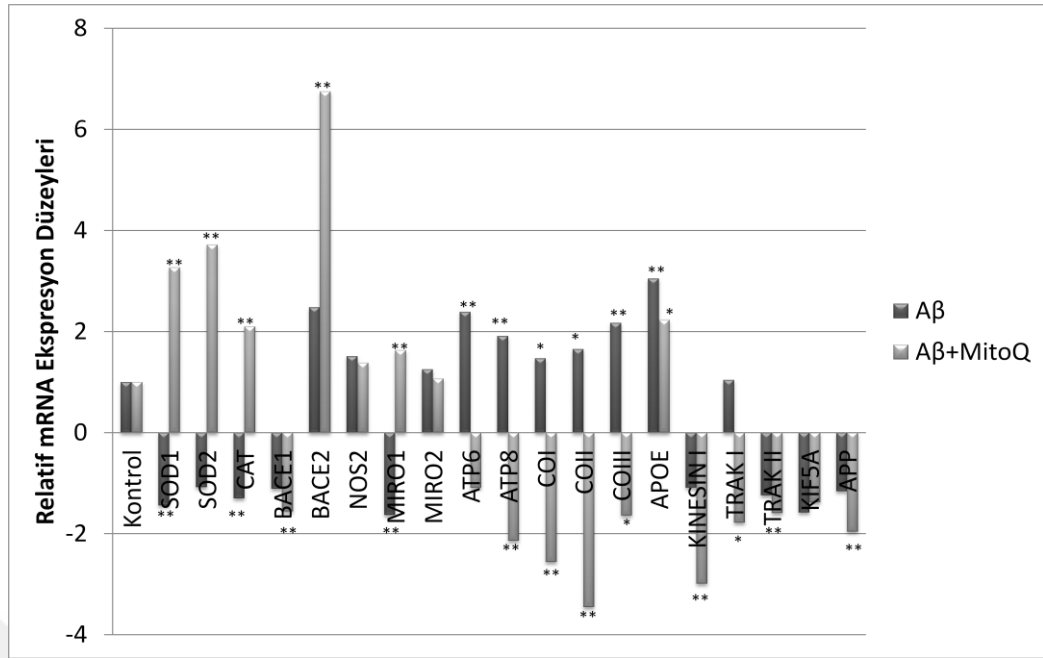


Şekil 4.12. 2 µM Aβ uygulanan hücrelerin 10. günde görüntüleri (400X)

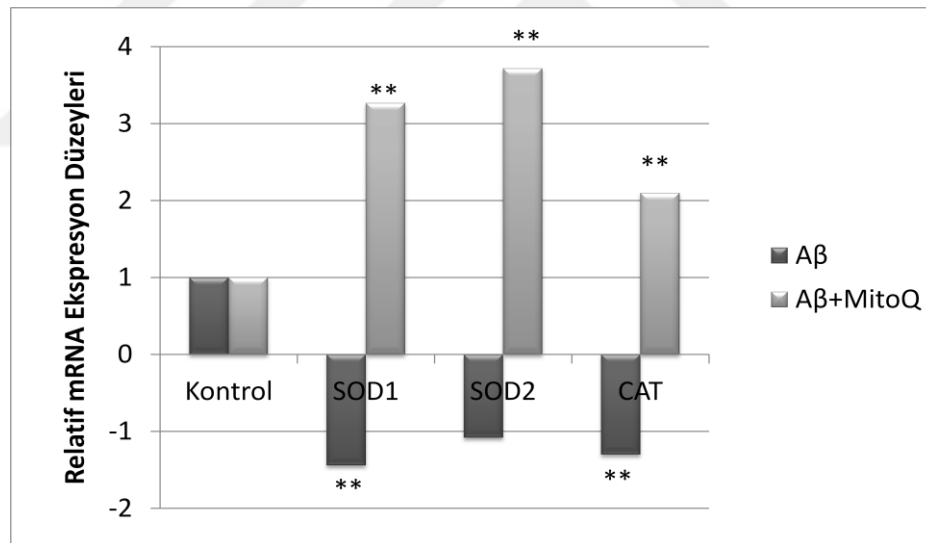
4.3. Real-time PCR ile İlgili Genlerin Ekspresyonlarının Ölçülmesi

4.3.1. mRNA Düzeyindeki Ekspresyon Değişimleri

mRNA düzeyindeki gen ekspresyon değişimlerinin incelenmesi için gerçek zamanlı PCR yapılmış ve housekeeping gen olarak β -aktin geni kullanılmıştır. Tablo 4.1'de elde edilen gen ekspresyonu değişimleri verilmiştir. Kontrol grupları ile kıyaslandığında, seçilen genlerde azalmalar ve artışlara rastlanmıştır. En büyük değişimin, MitoQ uygulanan grupta BACE2 geninde olduğu görülmektedir. KIF5A geninde, her iki grupta kontrol grubuna göre azalma tespit edilmiştir ancak istatistiksel olarak anlamlılık görülmemiştir.



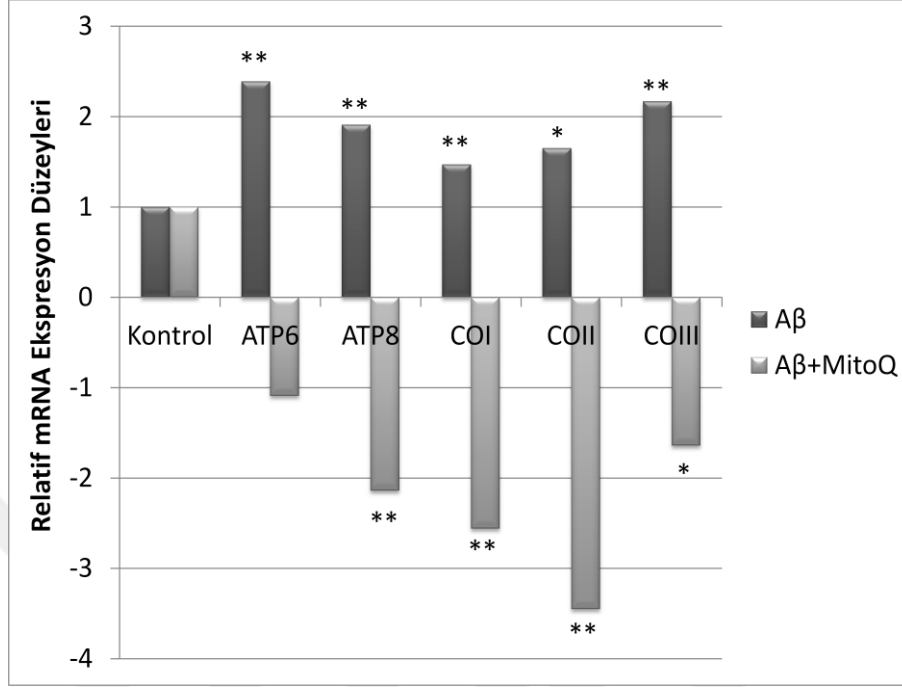
Şekil 4.13. Genlerin mRNA düzeyindeki ekspresyon değişimleri (β-aktin geni housekeeping gen olarak kullanılmıştır. Kontrole göre relatif ekspresyon seviyeleri gösterilmektedir. * p<0,05, ** p<0,01)



Şekil 4.14. Oksidatif stres ilişkili genlerin mRNA düzeyindeki ekspresyon değişimleri (β-aktin geni housekeeping gen olarak kullanılmıştır. Kontrole göre relatif ekspresyon seviyeleri gösterilmektedir. ** p<0,01)

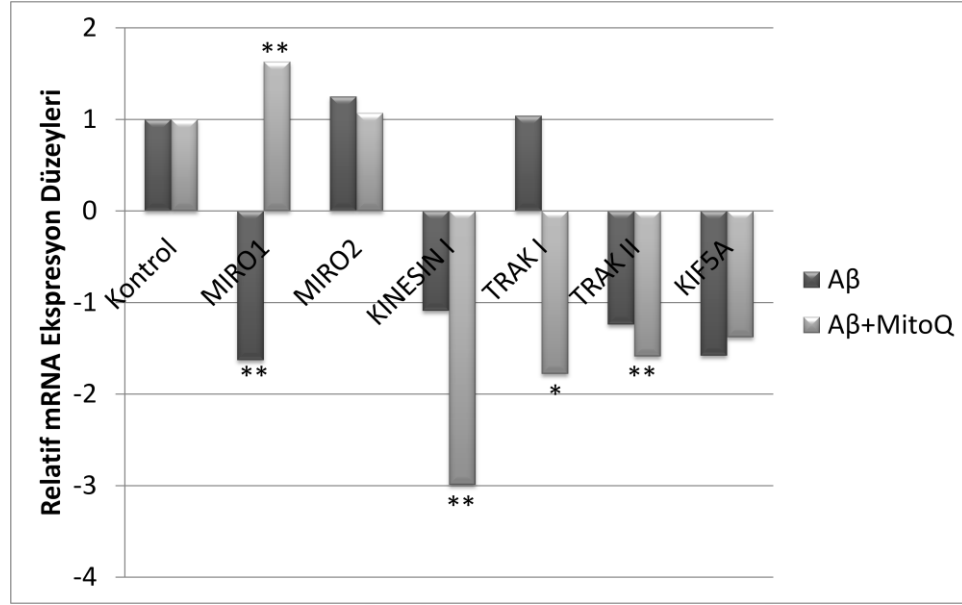
Hücrelerin antioksidan savunmasında görevli olan enzimlerden katalaz enzimini kodlayan CAT geninin, SOD enzimlerini kodlayan SOD1 ve SOD2 genlerinin mRNA düzeyindeki ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. SOD1, SOD2 ve CAT genlerinin ekspresyonu Aβ grubunda kontrol grubuna göre azalmıştır. MitoQ'nun bu seviyeleri anlamlı olarak önemli ölçüde artırdığı görülmüştür (p<0,01)

(Şekil 4.14). Nitrikosit sentaz kodlayan NOS2 geninin ekspresyonu A β grubunda 1,5 kat artmış olup, MitoQ'nun bu seviyeyi A β grubuna göre azalttığı görülmüştür ($p>0,05$).



Şekil 4.15. mtDNA tarafından kodlanan genlerin mRNA düzeyindeki ekspresyon değişimleri (β -aktin geni housekeeping gen olarak kullanılmıştır. Kontrole göre relatif ekspresyon seviyeleri gösterilmektedir.)

Mitokondriyal genom tarafından kodlanan ATP6 ve ATP8 genlerinin ekspresyonları, A β uygulaması sonucunda anlamlı olarak yaklaşık 2 kat artmıştır ($p<0,01$). MitoQ uygulaması mRNA ekspresyonlarında kontrol grubuna göre sırasıyla 1 ve 2 kat azalmaya sebep olmuştur (Şekil 4.15).



Şekil 4.16. Mitokondriyal dinamiklerle ilişkili genlerin mRNA düzeyindeki ekspresyon değişimleri (β-aktin geni housekeeping gen olarak kullanılmıştır. Kontrole göre relatif ekspresyon seviyeleri gösterilmektedir. * p<0,05, ** p<0,01)

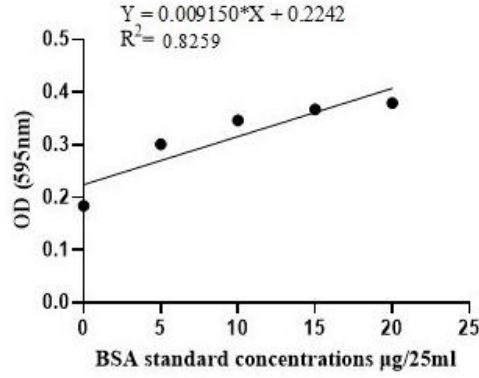
Mitokondriyal dinamiklerle ilişkili genlerin mRNA düzeyindeki ekspresyon değişimleri Şekil 4.16'da görülmektedir. Mitokondrilerin, mikrotübüller üzerindeki anterograde hareketlerini sağlayan motor kinesin-1 ve retrograde hareketlerini sağlayan motor Milton ve Miro proteinlerini kodlayan sırasıyla KINESIN1, TRAK1, TRAK2, MIRO1 ve MIRO2 genlerinin ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. MIRO1 geninin mRNA düzeyindeki ekspresyon seviyesi Aβ grubunda azalmış ve Aβ + MitoQ grubunda tekrar bir artışa uğramıştır (p<0,01). Yine hücre içinde organel taşınmasında görev alan KIF5A ve TRAK2 (Milton) genlerinin ekspresyonlarında her iki grupta da azalma görülmüştür.

Tablo 4.1. A β ve A β + MitoQ gruplarındaki gen ekspresyon seviyelerinin kontrol gruplarına göre değişimleri (β -aktin housekeeping gen olarak kullanılmıştır.)

GENLER	A β	A β +MitoQ
SOD1	-1.44	3.27
SOD2	-1.08	3.72
CAT	-1.3	2.1
BACE1	-1.11	-1.56
BACE2	2.48	6.75
NOS2	1.51	1.38
MIRO1	-1.63	1.63
MIRO2	1.25	1.07
ATP6	2.39	-1.09
ATP8	1.91	-2.14
COI	1.47	-2.56
COII	1.65	-3.45
COIII	2.17	-1.64
APOE	3.05	2.23
KINESIN I	-1.09	-2.99
TRAK I	1.04	-1.78
TRAK II	-1.24	-1.59
KIF5A	-1.58	-1.38
APP	-1.16	-1.96

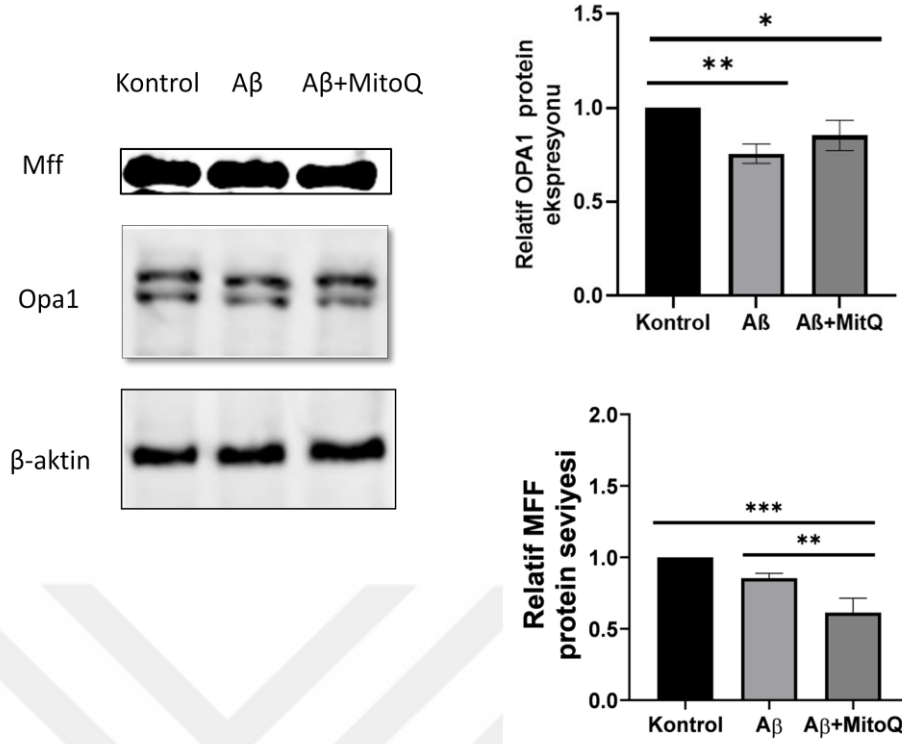
4.4. Western Blot ile İlgili Genlerin Protein Düzeyindeki Ekspresyonlarının Belirlenmesi

Protein düzeyindeki gen ekspresyon değişikliklerini analiz etmek amacıyla Western Blot yöntemi kullanılmıştır. Hücre gruplarından izole edilen proteinlerin yoğunlukları Bradford yöntemi ile tespit edilmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Bradford yöntemi ile protein yoğunluklarının hesaplanması

Primer antikorlar olarak Opa1 ve Mff proteinlerine spesifik antikorlar ve housekeeping olarak da beta-aktin antikorları kullanılmıştır. Şekil 4.18'de Western Blot sonuçları görülmektedir. Opa1 proteini için, kontrol grubuna kıyasla Aβ grubunda anlamlı bir azalma görülürken, Aβ+MitoQ grubunda ekspresyon seviyesinin kontrole yaklaştığı görülmüştür. Mff proteininin ekspresyonu ise Aβ+MitoQ grubunda Aβ grubuna ve kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır (Şekil 4.18).



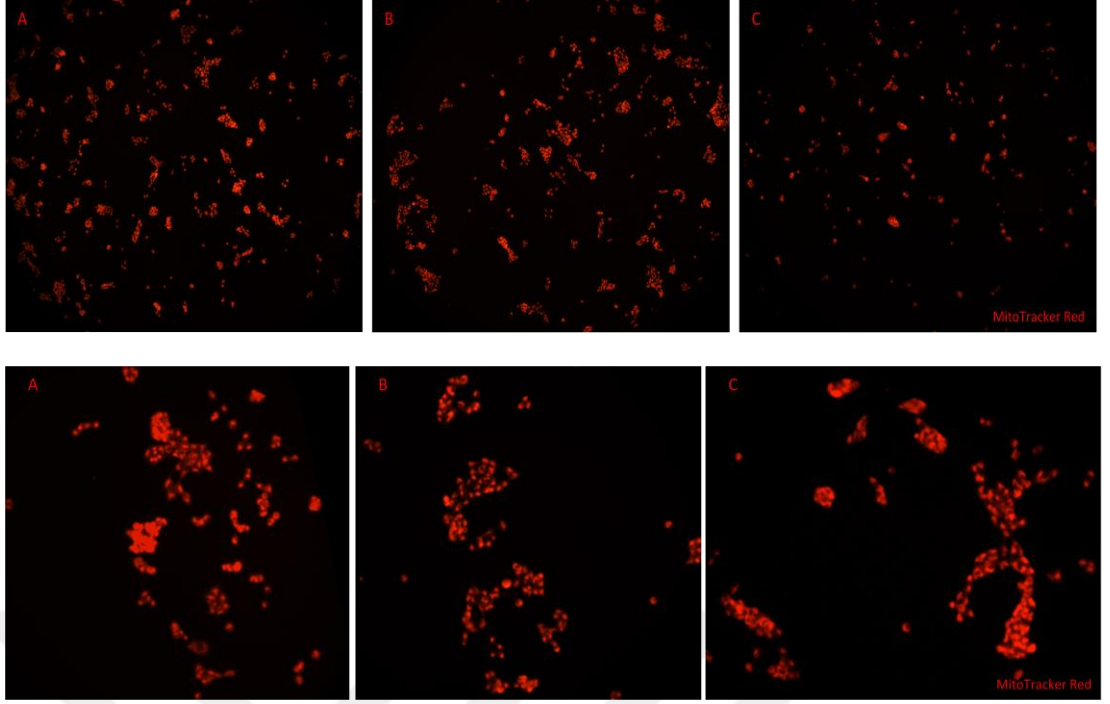
Şekil 4.18. Opa1 ve Mff genlerinin protein düzeyinde ekspresyon seviyeleri (β-aktin genine göre relatif olarak gösterilmiştir. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001)

4.5. Floresan Mikroskop ile Mitokondrilerin Görüntülenmesi

Hücre gruplarındaki mitokondri yoğunluklarının belirlenmesi için, hücreler mitokondri spesifik floresan boyalarla işaretlenip floresan mikroskop altında görüntüler elde edilmiştir.

4.5.1. MitoTracker Red ile Floresan Mikroskop Altında Mitokondrilerin Görüntülenmesi

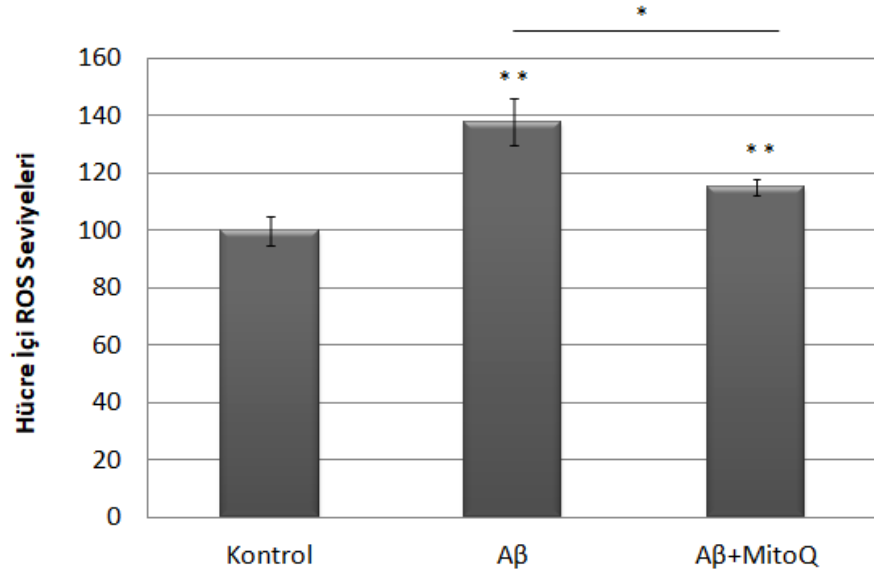
Mitokondri spesifik MitoTracker Red boyası ile işaretlenen hücrelerin floresan mikroskop altındaki görüntüleri Şekil 4.19'da verilmiştir. Bu sonuçlar, mitokondriyal membran potansiyelini de temsil etmektedir. Şekil 4.19'da görüldüğü gibi, kontrol grubuna göre Aβ grubuna ait hücrelerde mitokondri yoğunluğunda ve mitokondriyal membran potansiyelinde azalma görülmüştür. Aβ+MitoQ grubundaki hücrelerde ise ışımanın tekrar arttığı ve kontrol grubundaki hücelere benzer olduğu görülmektedir.



Şekil 4.19. MitoTracker Red floresan boya ile işaretlenen hücre gruplarındaki mitokondri yoğunlukları (200X, 400X)
A) Kontrol grubu hücreleri, B) A β grubu hücreleri, C) A β +MitoQ grubu hücreleri

4.6. Hücre içi ROS Seviyesi Ölçümü

Hücre gruplarında A β 'nin sebep olacağı oksidatif stresin ve antioksidan uygulamasının reaktif oksijen türlerinde göstereceği değişimleri tespit etmek amacıyla hücre içi ROS seviyesi ölçümü yapılmıştır. A β grubunda kontrol grubuna göre yaklaşık %40 oranında bir artış görülmüştür ($p<0,01$). A β +MitoQ grubunda ise A β grubuna kıyasla azalma gerçekleşmiş ve kontrol grubuna yaklaştığı görülmüştür ($p<0,01$) (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. Hücre gruplarındaki hücre içi ROS seviyeleri (Kontrol grubuna göre % olarak hesaplanmıştır. * $p<0,05$, ** $p<0,01$)

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında ülkemizde yaygın olarak görülen nörodejeneratif hastalıklardan biri olan AH'nin mekanizmasının tanımlanmasına katkıda bulunmak, mitokondri disfonksiyonu ile AH'nin patogenezi arasındaki ilişkinin açığa çıkarılması ile potansiyel terapötik hedefler ortaya koymak amaçlanmıştır. Bu amaçla SH-SH5Y nöroblastoma hücrelerinde A β 42 agregatları ile AH modeli geliştirilmiştir. Mitokondri hedefli yeni nesil bir antioksidan molekül olan MitoQ uygulanarak, A β 'nin sebep olduğu oksidatif stresin ortadan kaldırılması hedeflenmiştir. Yapılan analizler sonucunda, MitoQ'nun antioksidan özelliği sayesinde A β 'nin hücreler üzerindeki olumsuz etkilerinde ve mitokondri disfonksiyonu üzerinde iyileşme sağladığı gösterilmiştir.

MitoQ, mitokondri organelleri içinde depolanarak mitokondriyal ROS üretimi ve oksidatif stres sonucu meydana gelen hücre hasarını engelleyen bir antioksidan moleküldür (Chen ve ark. 2020). Birçok hastalıkta MitoQ'nun olumlu etkileri gösterilmiştir. Diyabet, karaciğer inflamasyonu, kardiyovasküler hastalıklar ve nörodejeneratif hastalıklar için çalışmalar mevcuttur ve terapötik bir seçenek olabileceği düşünülmektedir (Sukjamnong ve ark. 2018).

İlk olarak, A β peptidlerinin farklı konsantrasyonlarının hücrelerde toksisiteye sebep olup olmadığını göstermek üzere XTT hücre canlılık testi yapılmıştır. Literatür çalışmalarıyla paralellik gösteren çalışmalarımızda A β 42'nin denenen dozlarında yüksek oranda toksisite görülmemiştir. 10 μ M ve 20 μ M konsantrasyonlarda hücrelerde toksisiteye sebep olduğu gösterilmiştir (Ahmed ve ark. 2019). Bu doğrultuda optimum A β 42 konsantrasyonu 2 μ M olarak kabul edilmiştir. Bu konsantrasyondaki A β agregatlarının, hücreler üzerinde büyük ölçüde toksik etki göstermemesi hastalık modelimizi oluşturmak için avantaj sağlamıştır.

AH hücre modelini oluşturmak için 2 μ M A β 42 agregatı uygulanan hücreler, faz kontrast mikroskopu ile görüntülenmiştir. 2020 yılında Nature dergisinde yayımlanan (Kuragano ve ark. 2020) çalışmada PC-12 hücrelerinde A β 42 agregatlarının gerçek zamanlı etkileşimlerini göstermişlerdir. Benzer şekilde, Şekil 4.6, 4.7 ve 4.8'de gösterildiği gibi, hücrelerin A β agregatlarına uzantılarını yönelttikleri görülmektedir. Şekil 4.9'daki kontrol grubuna ait hücreler ile Şekil 4.10'da A β uygulanan hücreler karşılaştırıldığında, A β grubu hücrelerinin küçülüp

büzüldüğü görülmektedir. Bolea ve ark. (2013) benzer şekilde 24 saat boyunca 40 μ M A β 42 uygulanan SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde büzülmelerin ortaya çıktığını göstermişlerdir. Bu durum, uygulanan A β 42 dozunun, 10. günde hücreler üzerindeki toksik etkilerinin başladığını göstermektedir.

Alzheimer, mitokondri ve oksidatif stres ile ilişkili seçilen genlerin mRNA düzeyindeki ekspresyonları qPCR yöntemi ile hücre grupları arasında incelenmiştir. En yüksek ekspresyon farkı BACE2 genine aittir. A β uygulaması yapılan AH modeli hücre grubunda kontrol grubuna göre yaklaşık 2,5 kat artış görülmüş, A β +MitoQ grubunda ise kontrol grubuna kıyasla 6,7 kat ($p<0,01$), A β grubuna kıyasla ise 2,7 kat artış tespit edilmiştir. BACE2 geni amiloid prekürsör proteininin (APP) proteolitik olarak işlenmesinden sorumlu bir gendir. APP'yi 690 ve 691. gruplar arasından keserek çözünebilen APP'nin üretilip hücre dışına salınmasını sağlar.

BACE1 geni nöronlarda A β peptidlerinin oluşumundan sorumlu beta sekretaz proteinini kodlamaktadır. BACE1 nakavt farelerde A β üretiminin olmadığı, nöron ve hafıza kaybı gibi Alzheimer ilişkili patolojilerden yoksun oldukları gösterilmiştir (Cole ve Vassar 2007). Aynı zamanda miyelin kılıfı oluşumunda önemli bir rol oynayan bir gendir. Farelerin postnatal dönemlerinde miyelinasyon süresinde BACE1 ekspresyonunun yüksek olduğu bilinmektedir (Willem ve ark. 2006). Çalışmamızda A β uygulaması yapılan AH modeli hücre grubunda kontrol grubuna göre 1,1 kat, A β +MitoQ grubunda ise 1,6 kat azalma görülmüştür. A β +MitoQ grubunda A β grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilen 1,4 kat bir azalmaya rastlanmıştır. BACE1 ekspresyonu inflamatuvar olaylardan etkilenmektedir. AH'de, BACE1 inhibitörü olan PPAR1 sitokinler tarafından inhibe edilmektedir. Literatür bilgileri göz önüne alındığında AH grubundaki ve MitoQ uygulanan gruptaki azalma beklendiği gibidir. MitoQ uygulanması sonucunda BACE1 ekspresyonunun azalması, A β üretimini engelleyici bir yönde etki gösterdiği söylenebilir.

Oksidatif stres ilişkili olan SOD1, SOD2 ve CAT genlerinin mRNA düzeyindeki ekspresyonları incelendiğinde, süperoksit dismutaz enzimini kodlayan SOD2 geninin mRNA düzeyindeki ekspresyon seviyesinde, A β grubunda kontrol grubuna göre azalma görülmüş ve MitoQ'nun bu seviyeyi kontrole göre yaklaşık 4 kat artışı görülmüştür. Fare nöronlarının primer kültüründe yine bir mitokondri hedefli antioksidan molekül olan MitoTEMPO'nun A β kaynaklı toksisitesi üzerine

etkileri incelendiğinde SOD2 geninin mRNA düzeyindeki ekspresyonunda A β veya MitoTEMPO'nun belirgin bir fark yaratmadığı gösterilmiştir (Hu ve Li 2016). Sıçanlarda karaciğer inflamasyonu üzerindeki etkileri incelendiğinde MitoQ'nun MnSOD, Cu/ZnSOD ve katalaz ekspresyonlarını artırarak normal seviyelerine getirdiği görülmüştür (Turkseven ve ark. 2020). A β 42'nin SH-SY5Y hücrelerinde oksidatif strese olan etkileri incelendiğinde, SOD enziminin protein düzeyinde azalmaya uğradığı gösterilmiştir (Ahmed ve ark. 2019). Dolayısıyla, SOD1 ve SOD2 genleri için protein düzeyinde ekspresyon analizi yapılarak daha net sonuçlar elde edilebilir.

Opa1 ve Mff'nin protein düzeyinde ekspresyon değişikliklerini tespit etmek için Western Blot analizi gerçekleştirilmiştir. Opa1 proteini mitokondrilerin iç zarında aktif olan bir proteindir ve mitokondrilerin füzyon olayında fonksiyon gösterir. Opa1 proteini için, kontrol grubuna kıyasla A β grubunda anlamlı bir azalma görülürken, A β +MitoQ grubunda ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna yaklaştığı görülmektedir. Ahmed ve ark. (2019), SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde A β 42 ve oksidatif strese sebep olan GMF proteinlerinin mitokondriyal füzyon ve füzyon proteinlerinin ekspresyonları üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Opa1 proteini de dahil olmak üzere, A β 42'nin füzyon proteinlerinin ekspresyonunda azalmaya, füzyon protein ekspresyonlarında ise artmaya sebep olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda, benzer şekilde A β 'nin Opa1 protein ekspresyonunu azalttığı görülmektedir. Bu durum, oluşturduğumuz hücre modelinde A β 'nin mitokondriyal disfonksiyona sebep olduğunu doğrulamaktadır.

Mitokondriyal füzyon faktörü Mff, GTPaz ailesinden Drp1 proteinin mitokondriyal füzyon bölgelerine çağrılmasından sorumlu bir proteindir (Otera ve ark. 2013). Mff protein ekspresyonu incelendiğinde, A β grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma görülmektedir. A β +MitoQ grubunda A β grubuna göre anlamlı oranda bir azalma görülmüştür. Mff'nin yüksek ekspresyonunun mitokondriyal fragmentasyona sebep olduğu, RNA interferans ile Mff'nin susturulmasının da zıt bir etki göstererek, Drp1'in azalmasına yol açtığı gösterilmiştir (Otera ve ark. 2010, Otera ve Mihara 2011). Ahmed ve ark. (2019) A β 42'nin füzyon proteinlerindeki artışa sebep olduğunu göstermişlerdir. A β +MitoQ grubunda A β grubuna göre görülen istatistiksel olarak anlamlı olan protein ekspresyon seviyesindeki azalma, MitoQ'nun füzyon olayını fizyolojik düzeyine yaklaştırdığını gösterebilir.

Mitokondriyal disfonksiyonun ve oksidatif stresin, mitokondri morfolojisinde ve dinamiklerinde bozulmalara yol açtığı bilinmektedir. Ayrıca bu durumlarda, sinapslardaki sayılarının da azaldığı gösterilmiştir. Uygulama gruplarındaki mitokondri morfolojilerinin incelenmesi amacıyla floresan mikroskop ile mitokondriler görüntülenmiştir. Hücrelerdeki mitokondri yoğunlukları karşılaştırıldığında A β uygulaması yapılan AH modeli hücre grubunda kontrol grubuna kıyasla azalma olduğu görülmüştür. MitoQ uygulanan gruptaki hücrelerde ise tekrar artışa rastlanmıştır, kontrol grubuna ait hücrelere yaklaştığı tespit edilmiştir. MitoTracker Red mitokondri spesifik floresan boya yoğunluğu, aynı zamanda mitokondriyal membran potansiyelini de temsil etmektedir. Mitokondriyal membran potansiyelinin literatürde AH örneklerinde azaldığı bilinmektedir. Sürekli olarak A β peptidleri üreten 7PA2 ve 7WD4 hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelinin kontrol hücrelere göre azaldığı gösterilmiştir (Krako ve ark. 2013). Mitokondri hedefli antioksidan MitoTEMPO, fare nöronlarının primer kültüründe A β 42 maruziyeti sonucunda azalan mitokondriyal membran potansiyelini tekrar artırmıştır (Hu ve Li 2016). Bu sonuçlar, A β 'nin hücrelerde oksidatif stres kaynaklı mitokondriyal disfonksiyona sebep olduğunu göstermektedir.

Hücrelerde oksidatif stres durumunda ve antioksidan uygulaması sonrasında ROS seviyelerinin karşılaştırılması amacıyla hücre içi ROS seviyeleri ölçülmüştür. Beklendiği şekilde A β grubunda kontrol grubuna göre yaklaşık %40 artış, A β +MitoQ grubunda ise A β grubuna kıyasla azalma gerçekleşmiş ve kontrol grubuna yaklaştığı görülmüştür. MitoQ'nun plateletlerdeki etkilerini araştıran bir çalışmada ROS üretimini azalttığı gösterilmiştir (Mendez ve ark. 2020). 7PA2 ve 7WD4 hücreleri endojen olarak sürekli A β peptidleri üretmektedir ve A β toksisitesinin çalışılması için uygun hücrelerdir. Bu hücrelerdeki ROS seviyelerinin kontrol hücrelerine göre çok daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Krako ve ark. 2013). Bu sonuçlar, A β 'nin oksidatif strese sebep olduğunu doğrulamakta ve MitoQ'nun mitokondri spesifik antioksidan özelliği sayesinde, hücre içi ROS üretimini anlamlı olarak azalttığını göstermektedir.

Kas-spesifik A β eksprese eden Alzheimer modeli transgenik *C.elegans* ile yapılan bir çalışmada, MitoQ'nun ROS seviyesini ve mtDNA hasarını azaltmadığı halde yaşam süresini ve kalitesini olumlu etkilediği gösterilmiştir (Ng ve ark. 2014). Primer nöron kültüründe MitoQ'nun A β toksisitesine karşı koruyucu etkisi

gösterilmiştir. Triple-transgenik fare AH modelinde, 5 ay boyunca MitoQ uygulanması ile AH benzeri nöropatolojide azalma görülmüştür. MitoQ'nun bu farelerin beyinlerinde, oksidatif stres, A β birikimi, astrogliosis, sinaptik kayıplar ve kaspaz aktivasyonlarında azalma sağladığı gösterilmiştir (McManus ve ark. 2011). Parkinson hastalığı hücre kültürü ve fare modelinde de nöroprotektif etkisi gösterilmiştir (Solesio ve ark. 2013). Nöroprotektif etkisi yanısıra kardiyoprotektif etkileri de birkaç model üzerinde denenmiş ve kardiyak hipertrofiyi, oksidatif hasarı, mitokondriyal hasarı azalttığı gösterilmiştir (Adlam ve ark. 2005; Graham ve ark. 2009).

Literatür bilgileri ve elde ettiğimiz sonuçlar göz önüne alındığında, mitokondri hedefli antioksidan molekülü MitoQ'nun SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde A β 42 kaynaklı oksidatif stresin etkilerini ortadan kaldırabildiği ve mitokondriyal disfonksiyonda etkili genlerin ekspresyonlarını değiştirerek mitokondriyal fonksiyonun düzelmesinde olumlu etkileri olduğunu göstermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda A β 42 peptidlerinin SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerine uygulanması ile AH modeli hücreler oluşturulmuştur. Öncelikle A β 42 peptidlerinin hücreler üzerindeki toksisitelerinin gösterilmesi için hücre canlılık testi yapılmış ve optimum değer olarak 2 μ M kabul edilmiştir. Agregat oluşturmaları için 3 gün süre ile inkübe edilen bu moleküller hücrelere uygulanarak, faz kontrast mikroskopunda elde edilen görüntüler sayesinde A β moleküllerinin agregat halinde olduğu doğrulanmıştır. Ayrıca nöroblastoma hücrelerinin A β moleküllerine doğru uzantılar oluşturdıkları gözlemlenmiştir. A β moleküllerinin oluşturacağı muhtemel oksidatif stres üzerine, mitokondri hedefli yeni nesil bir ajan olan MitoQ antioksidanının özellikle mitokondriyal disfonksiyon aşamasındaki etkilerini göstermek amacıyla analizler gerçekleştirilmiştir. Literatür çalışmaları da göz önüne alınarak MitoQ için optimum konsantrasyon seviyesi 50 nM olarak seçilmiştir.

A β agregatları ile oluşturulan AH modeli ve MitoQ uygulanan hücrelerde Alzheimer, mitokondri ve oksidatif stres ile ilişkili seçilen genlerin mRNA düzeyindeki ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Her bir genin ekspresyonlarında farklı değişimler gösterilmiştir. qPCR ile ekspresyon seviyeleri tespit edilen bu genlerin, protein düzeyindeki ekspresyon seviyelerini belirlemek için her bir proteine spesifik antikor kullanılarak Western Blot yapılması daha net sonuç verecektir.

SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde A β 42 agregatlarının uygulanması ile AH hastalık modeli oluşturulmuştur. Mitokondri hedefli antioksidan molekülü MitoQ'nun, A β 42 peptidlerinin oluşturduğu oksidatif stresin ve mitokondriyal disfonksiyonun üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu grupların deney hayvan modelleriyle de oluşturulması ile elde edilen sonuçlar doğrulanabilir ve spesifik olarak etkilenen beyin gibi dokulardaki ekspresyonların incelenmesi ile daha kesin sonuçlar elde edilebilir. Yapılan son araştırmalar, mitokondriyal disfonksiyonun egzersiz, antioksidan diyet veya terapötik yaklaşımlarla restore edilerek, AH'nin başlangıcını geciktirebileceği ve ilerlemesini yavaşlatabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmalarımız hücre kültürü tabanlı olduğu için deney hayvanları modellerinde benzer grupların oluşturulması ve beyin gibi daha spesifik organlardaki ekspresyon seviyelerinin incelenmesi daha doğru sonuçlar elde etmemizi

sağlayabilir. Literatür bilgileri ve elde ettiğimiz sonuçlar göz önüne alındığında, mitokondri hedefli antioksidan molekülü MitoQ'nun SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde A β 42 kaynaklı oksidatif stresin etkilerini ortadan kaldırabildiği ve mitokondriyal disfonksiyonda etkili genlerin ekspresyonlarını değiştirerek mitokondriyal fonksiyonun düzelmesinde olumlu etkileri olduğunu göstermektedir.



7. KAYNAKLAR

- Ahmed ME, Selvakumar GP, Kempuraj D, Thangavel R, Mentor S, et al. Synergy in disruption of mitochondrial dynamics by A β (1-42) and glia maturation factor (GMF) in SH-SY5Y cells is mediated through alterations in fission and fusion proteins. *Molecular neurobiology*. 2019; 56(10), 6964-6975.
- Bolea I, Gella A, Monjas L, Perez C, Rodriguez-Franco MI, et al. Multipotent, permeable drug ASS234 inhibits A β aggregation, possesses antioxidant properties and protects from A β -induced apoptosis in vitro. *Current Alzheimer Research*. 2013; 10(8), 797-808.
- Cai Q, Tammineni P. Alterations in mitochondrial quality control in Alzheimer's disease. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2016; 10, 24.
- Cha MY, Han SH, Son SM, Hong HS, Choi YJ, et al. Mitochondria-specific accumulation of amyloid β induces mitochondrial dysfunction leading to apoptotic cell death. *PloS one*. 2012; 7(4), e34929.
- Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T, Pfanner N. Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell*. 2009; 138(4), 628-644.
- Chen JX, Yan SD. Amyloid- β -induced mitochondrial dysfunction. *J Alzheimers Dis*. 2007; 11;12(2):177-84.
- Chen W, Guo C, Jia Z, Wang J, Xia M, et al. Inhibition of mitochondrial ROS by MitoQ alleviates white matter injury and improves outcomes after intracerebral haemorrhage in mice. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2020.
- Cheung YT, Lau WKW, Yu MS, Lai CSW, Yeung SC, et al. Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *Neurotoxicology*. 2009; 30(1), 127-135.
- Chinchalongporn V, Shukla M, Govitrapong P. Melatonin ameliorates A β 42-induced alteration of β APP-processing secretases via the melatonin receptor through the Pin1/GSK 3 β /NF- κ B pathway in SH-SY5Y cells. *Journal of pineal research*. 2018; 64(4), e12470.
- Cole SL, Vassar R. The Alzheimer's disease β -secretase enzyme, BACE1. *Molecular neurodegeneration*. 2007; 2(1), 1-25.
- Gandbhir O, Sundaram P. Effect of AmyTrap, an amyloid- β binding drug, on A β induced mitochondrial dysfunction and tau phosphorylation in cultured neuroblastoma cells. *Metabolic brain disease*. 2020; 35(6), 923-931.
- Hu H, Li M. Mitochondria-targeted antioxidant mitotempo protects mitochondrial function against amyloid beta toxicity in primary cultured mouse neurons. *Biochemical and biophysical research communications*. 2016; 478(1), 174-180.
- Jin H, Kanthasamy A, Ghosh A, Anantharam V, Kalyanaraman B, et al. Mitochondria-targeted antioxidants for treatment of Parkinson's disease: preclinical and clinical outcomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2014; 1842(8), 1282-1294.
- Kovalevich J, Langford D. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. In *Neuronal Cell Culture Humana Press*, Totowa, NJ. 2013; (pp. 9-21).
- Krako N, Magnifico MC, Arese M, Meli G, Forte E, et al. Characterization of mitochondrial dysfunction in the 7PA2 cell model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2013; 37(4), 747-758.
- Kuragano M, Yamashita R, Chikai Y, Kitamura R, Tokuraku K. Three-dimensional real time imaging of amyloid β aggregation on living cells. *Scientific reports*. 2020; 10(1), 1-12.

- Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*. 2006; 443(7113), 787-795.
- Manoharan S, Guillemin GJ, Abiramasundari RS, Essa MM, Akbar M, et al. The role of reactive oxygen species in the pathogenesis of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and Huntington's disease: a mini review. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2016.
- McManus MJ, Murphy MP, Franklin JL. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ prevents loss of spatial memory retention and early neuropathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*. 2011; 31(44), 15703-15715.
- Méndez D, Arauna D, Fuentes F, Araya-Maturana R, Palomo I, et al. Mitoquinone (MitoQ) inhibits platelet activation steps by reducing ROS levels. *International journal of molecular sciences*. 2020; 21(17), 6192.
- Ng LF, Gruber J, Cheah IK, Goo CK, Cheong WF, et al. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ extends lifespan and improves healthspan of a transgenic *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014; 71, 390-401.
- Otera H, Mihara K. Molecular mechanisms and physiologic functions of mitochondrial dynamics. *The Journal of Biochemistry*. 2011; 149(3), 241-251.
- Otera H, Mihara K. Discovery of the membrane receptor for mitochondrial fission GTPase Drp1. *Small GTPases*. 2011; 2(3), 241-251.
- Otera H, Ishihara N, Mihara K. New insights into the function and regulation of mitochondrial fission. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2013; 1833(5), 1256-1268.
- Ross RA, Spengler BA, Biedler JL. Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst*. 1983; 71(4):741-747.
- Seelert H, Dani DN, Dante S, Hauß T, Krause F, et al. From protons to OXPHOS supercomplexes and Alzheimer's disease: structure-dynamics-function relationships of energy-transducing membranes. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 2009; 1787(6), 657-671.
- Shipley MM, Mangold CA, Szpara ML. Differentiation of the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2016; (108), e53193.
- Solesio ME, Prime TA, Logan A, Murphy MP, del Mar Arroyo-Jimenez M, et al. The mitochondria-targeted anti-oxidant MitoQ reduces aspects of mitochondrial fission in the 6-OHDA cell model of Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2013; 1832(1), 174-182.
- Sukjamnong S, Chan YL, Zakarya R, Nguyen LT, Anwer AG, et al. MitoQ supplementation prevent long-term impact of maternal smoking on renal development, oxidative stress and mitochondrial density in male mice offspring. *Scientific reports*. 2018; 8(1), 1-10.
- Turkseven S, Bolognesi M, Brocca A, Pesce P, Angeli P, et al. Mitochondria-targeted antioxidant mitoquinone attenuates liver inflammation and fibrosis in cirrhotic rats. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2020; 318(2), G298-G304.
- Otera H, Wang C, Cleland MM, Setoguchi K, Yokota S, et al. Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *Journal of Cell Biology*. 2010; 191(6), 1141-1158.
- Wang X, Wang W, Li L, Perry G, Lee HG, et al. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2014; 1842(8), 1240-1247.

Willem M, Garratt AN, Novak B, Citron M, Kaufmann S, et al. Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science*. 2006; 314 (5799): 664–6.

Zacharioudakis E, Agianian B, Kumar MV, Biris N, Garner TP, et al. Modulating mitofusins to control mitochondrial function and signaling. *Nature communications*. 2022; 13(1), 3775.



8. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Esra	Soyadı	Yetişgin
Doğum Yeri		Doğum Tarihi	
E-mail		Uyruğu	T.C.

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü	2011
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi	2014
Doktora	Necmettin Erbakan Üniversitesi	2022

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Araştırma Görevlisi	Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi	2016-Halen
Araştırma Görevlisi	Akdeniz Üniversitesi	2014-2016

Yabancı Dil	İngilizce
--------------------	-----------

Yayınları/Tebliğleri/Sertifika ları/Ödülleri

8.1. Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler (SCI & SSCI & Arts and Humanities)

8.1.1. Celen E, Ertosun MG, Kocak H, Dinckan A, and Yoldas B, 2017, Expression Profile of MicroRNA Biogenesis Components in Renal Transplant Patients, Transplantation Proceedings, 49, 472-476 (yüksek lisans tezinden yapılmıştır.)

8.2. Uluslararası diğer hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

8.2.1. Vural H, Kurar E, Avcı E, Eroglu C, **Celen E**, et al., 2018, KRAS mutations: A possible biomarker for advanced prostate cancer. Cancer Science and Research, 1(3); 1-4.

8.2.2. Celik FS, **Celen E**, Yildiz HK, Altweish S, Donmez H, et al., 2018, Investigation of Leptin Receptor and Enos Gene Polymorphisms in Preeclamptic Umbilical Cords. World Journal of Gynecology and Women's Health, 1(3). WJGWH.MS.ID.000515.

8.2.3. **Celen E**, Vural H, 2018, The Role of Mitochondrial Dysfunction in the Mechanism of Neurodegenerative Diseases. Archives of Neurology and Neuroscience, 1(4); 1-6.

8.2.4. Doykun M, Maltas E, **Celen E**, Gurbuz Y, Vural HC, 2019, Comparison of Protein Isolation Methods from Brassica napus subsp. Oleifera Seeds Growing in Turkey. Asian Journal of Applied Sciences, 12(3):133-139.

8.2.5. Ertosun MG, Ozkan O, **Celen E**, Ozkan O, Yoldas B, 2020, Correlation of miRNAs With Prognosis in Composite Tissue Allotransplantation, Experimental and Clinical Transplantation

8.3. Sertifikalar

8.3.1. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, ANTALYA, 2013

8.4. Ödüller

8.4.1. Türkiye Organ Nakli Kuruluşları Derneği XI. Kongresi'nde (2016) 'Böbrek Nakli Hastalarında mikroRNA İşlenmesinde Görev Alan Komponentlerin Ekspresyon Profili' başlıklı bildiri ile 'Prof. Dr. Tuncer Karpuzoğlu Özel Ödülü'(1000 \$)

8.4.2. Türkiye Organ Nakli Kuruluşları Derneği XI. Kongresi'nde (2016) 'Böbrek Nakli Hastalarında mikroRNA İşlenmesinde Görev Alan Komponentlerin Ekspresyon Profili' başlıklı bildiri ile 'En İyi Genç Araştırmacı Ödülü'

9. EKLER

Ek 1 Etik Kurul Kararı

T.C. NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ MERAM TIP FAKÜLTESİ İLAÇ VE TIBBİ CİHAZ DIŞI ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI	
Toplantı Sayısı:76	Toplantı Tarihi: 09 Kasım 2018
Karar Sayısı:2018/1563;Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Hasibe VURAL' ın "Alzheimer hastalığı hücre hattı modelinde mitokondri spesifik antioksidan MitoQ'nun mitokondriyal disfonksiyon üzerindeki etkinliğinin araştırılması" başlıklı doktora tez çalışması ile ilgili 06.11.2018 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü, Arş. Gör. Esra ÇELEN' in doktora tez çalışmasının Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Hasibe VURAL' ın sorumluluğunda bütçe desteğinin sağlandığına dair belgenin İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kuruluna sunulduktan sonra çalışmanın başlamasının uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir. Not: Çalışma ile ilgili gerekli izin ve yasal sorumluluk araştırmacılara aittir. Sorumlu Araştırmacı: Doç. Dr. Hasibe VURAL Yardımcı Araştırmacı: Arş. Gör. Esra ÇELEN	