

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**3-HİDROKSİBÜTİRAT'IN SH SY-5Y HÜCRE
HATTINDA HİDROJEN PEROKSİT
TOKSİSİTESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

SAMAR MOHAMED ALİ AHMED

**BİYOKİMYA
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İZMİR-2020

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2016970125

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**3-HİDROKSİBÜTİRAT'IN SH SY-5Y HÜCRE
HATTINDA HİDROJEN PEROKSİT
TOKSİSİTESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

**BİYOKİMYA
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

SAMAR MOHAMED ALİ AHMED

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Özlem GÜRSOY DORUK

Bu araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından (2018.KB.SAG.107) proje numarası ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2016970125

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı,
Biyokimya Yüksek Lisans programı öğrencisi Samar Mohamed Ali AHMED
“3-HİDROKSİBÜTİRAT’IN SH SY-5Y HÜCRE HATTINDA HİDROJEN
PEROKSİT TOKSİSİTESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ”
konulu Yüksek Lisans tezini 02.07.2020 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

Doç. Dr. Özlem GÜRSOY DORUK

BAŞKAN

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Emel ALTEKİN

ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Murat ÖRMEN

ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Tuncay KÜME

ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Aslıhan BÜYÜKÖZTÜRK KARUL

ÜYE

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Ali Rıza ŞİŞMAN

ÜYE (YEDEK)

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi. Leyla DEMİR

ÜYE (YEDEK)

İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLO DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
RESİM DİZİNİ.....	vii
KISALTMALAR.....	viii
TEŞEKKÜR.....	ix
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
2. GENEL BİLGİLER.....	7
2.1. Alzheimer Hastalığı.....	7
2.2. Oksidatif Stres	7
2.2.1. Oksidatif Stresin Biyokimyası	8
2.2.2. Oksidatif Stres ve Alzheimer Hastalığı.....	9
2.3. Alzheimer Hastalığında Enerji Metabolizması ve Keton Cisimlerin Rolü	12
2.3.1. Beyin Metabolizması	12
2.3.1.1. Normal Beyin Metabolizması	12
2.3.1.2. Alzheimer Hastalığı Sırasında Beyin Metabolizmasında Değişiklikler	14
2.3.2. Keton Cisimleri, Ketojenik Diyet ve Alzheimer Hastalığı	15
2.3.2.1. Keton Cisimlerin Sentezi.....	15
2.3.2.2. Ketojenik Diyet ve Alzheimer Hastalığı	17
2.4. Nörosteroidler	19
2.4.1. Tanım.....	19
2.4.2. Nörosteroidlerin Biyosentezi ve Metabolizması	19
2.4.3. Nörosteroidlerin Sinir Sistemi Üzerine Etkisi	20

2.4.4. DHEA, DHEAS ve Alzheimer Hastalığı	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Araştırma Tipi	23
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	23
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/ Çalışma Grupları	23
3.4. Çalışma Materyali	23
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	23
3.6. Veri Toplama Araçları	23
3.6.1. Kullanılan cihaz, kimyasal ve kitler	23
3.6.2. Hücre Kültürü	25
3.6.3. Reaktiflerin Hazırlanması	27
3.6.3.1. 3-Hidroksibütirat (3-OHB)'ın Hazırlanması	27
3.6.3.2. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)'in Hazırlanması	27
3.6.3.3. MTT solüsyonunun Hazırlanması	28
3.6.4. Deneysel Çalışmalar	28
3.6.4.1. Hücre Canlılık Testi	30
3.6.4.2. ELISA için örnek hazırlanması	31
3.6.4.3. P450scc (CYP11A1) enzim ölçümü	31
3.6.4.4. DHEA ölçümü	32
3.6.4.5. DHEAS ölçümü	34
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi	36
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	36
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	37
3.10. Etik Kurul Onayı	37
4. BULGULAR	37
4.1. Ön Çalışmalara Ait Bulgular	37
4.1.1. SH SY-5Y Hücrelerinde Hidrojen Peroksit Toksisitesinin Oluşturulması	37
4.1.2. 3-Hidroksibütirat Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi	38
4.2. Ana Çalışmalara Ait Bulgular	40

4.2.1. 3-Hidroksibütirat + Hidrojen Peroksit Uygulamasının Hücre Canlılığı Etkisi	40
4.2.2. 3-Hidroksibütirat + Hidrojen Peroksit Uygulamasının Hücre P450scc Enzim Düzeylerine Etkisi	43
4.2.3. 3-Hidroksibütirat + Hidrojen Peroksit Uygulamasının Hücre DHEA Düzeylerine Etkisi ..	44
4.2.4. 3-Hidroksibütirat + Hidrojen Peroksit Uygulamasının Hücre DHEAS Düzeylerine Etkisi.	45
5. TARTIŞMA	46
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	51
7. KAYNAKLAR.....	53
8. EKLER.....	62
8.1 Etik Kurul Onayları.....	62
8.2 Özgeçmiş	65

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Çalışmada kullanılan cihazlar	24
Tablo 2: Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler	24
Tablo 3: Çalışmada kullanılan kitler	25



SEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: ROS üretimi	9
Şekil 2: Oksidatif stres ve nörodejeneratif hastalıkları	11
Şekil 3: Amiloid prekürsör proteinin (APP) sekretazlar ile kesimi sonucu AB oluşumu	11
Şekil 4: Beyinde glukoz kullanımı	13
Şekil 5: Karaciğerde ketogenez yolları	16
Şekil 6: Keton cisimleri	16
Şekil 7: Keton cisimlerinin karaciğerden taşınması ve ekstrahepatik dokularda kullanımı ve oksidasyonu	17
Şekil 8: Nörosteroidlerin biyosentezi	20
Şekil 9: Deneysel çalışmalar ve çalışma grupları	29
Şekil 10: MTT'nin formazan bileşiğine dönüşümü	30
Şekil 11: P450scc enzimin standart eğrisi	32
Şekil 12: DHEA standart eğrisi	33
Şekil 13: DHEAS standart eğrisi	35
Şekil 14: 24 saat H ₂ O ₂ uygulamasının SH SY-5Y hücre canlılığına etkisinin MTT hücre canlılık testi ile değerlendirilmesi	38
Şekil 15: 17.5mM glukoz içeren büyüme ortamı ile idame ettirilen SH SY-5Y hücrelerinde 24,48 ve 72 saat 3-OHB uygulamasının doza bağlı etkilerinin MTT hücre canlılık testi ile değerlendirilmesi	39
Şekil 16: 5mM glukoz içeren büyüme ortamı ile idame ettirilen SH SY-5Y hücrelerinde 24,48 ve 72 saat 3-OHB uygulamasının doza bağlı etkilerinin MTT hücre canlılık testi ile değerlendirilmesi	39
Şekil 17a: 24 saat boyunca H ₂ O ₂ 'ye maruz kalan hücrelerin canlılığı üzerinde 48 saatlik 1mM 3-OHB ön uygulamanın etkisi	41
Şekil 17b: 24 saat boyunca H ₂ O ₂ 'ye maruz kalan hücrelerin canlılığı üzerinde 48 saatlik 4mM 3-OHB ön uygulamanın etkisi	42

Şekil 17c: Farklı glukoz konsantrasyonu içeren büyüme ortamı ile idame ettirilen SH SY-5Y hücrelerinde 24 saat H ₂ O ₂ uygulamasının hücre canlılığına etkisinin MTT hücre canlılık testi ile değerlendirilmesi.....	42
Şekil 18: 24 saat boyunca H ₂ O ₂ 'ye maruz kalan hücrelerin P450scc enzim seviyeleri üzerinde 48 saatlik 3-OHB ön uygulamanın etkisi.....	43
Şekil 19: 24 saat boyunca H ₂ O ₂ 'ye maruz kalan hücrelerin DHEA seviyeleri üzerinde 48 saatlik 3-OHB ön uygulamanın etkisi.....	44
Şekil 20: 24 saat boyunca H ₂ O ₂ 'ye maruz kalan hücrelerin DHEAS seviyeleri üzerinde 48 saatlik 3-OHB ön uygulamanın etkisi.....	45



RESİM DİZİNİ

Resim 1: SH SY-5Y hücreleri	26
--	-----------



KISALTMALAR

3-OHB: 3-Hidroksibütirat

A β : Amiloid-beta

AH: Alzheimer hastalığı

AP: Allopregnanolon

CYP11A1: Kolesterol yan zincir koparıcı enzimi

DHEA: Dehidroepiandrosteron

DHEAS: Dehidroepiandrosteron Sülfat

DMSO: Dimetil sülfoksit

ELİSA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

ETZ: Elektron Taşıma Zinciri

FBS: Fötal Sığır Serumumu

GLUT: Spesifik glukoz taşıyıcısı

H₂O₂: Hidrojen Peroksit

MCI: Hafif bilişsel bozukluk

MCT: Orta zincirli trigliserit

MTT: 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromid

NS: Nörosteroid

P450_{scc}: Sitokrom P450 yan zincir koparıcı enzimi

PS: Pregnenolon sülfat

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

SH SY-5Y: İnsan nöroblastoma hücre hattı

TEŞEKKÜR

Deneyimleri ve bilimsel desteği ile bana ilk günden itibaren yardımcı olan, her durumda beni destekleyen, her zaman sabır ve özenle fikirlerimi dinleyen, nezaketi kelimelerle tarif edilemeyen sevgili danışman hocam Doç. Dr. Özlem GÜRSOY DORUK’a,

Bana yol gösteren ve bilimsel katkı ve yardımlarını esirgemeyen değerli Prof. Dr. Pınar AKAN’a

Beni desteklemek için çaba gösteren, kalplerini bana açan ve ikinci ailem olup hiçbir zaman kendimi yalnız hissetmeme izin vermeyen başta Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Sezer Uysal'a ve değerli Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Bana her zaman yardım eden ve yüzüme bir gülümseme koymayı başaran değerli Anabilim Dalı sekreteri ve personeline,

Laboratuvar ortamında bana mümkün olan her koşulda yardımcı olan laboratuvar arkadaşlarıma,

Fiziksel olarak uzak olmasına rağmen manevi olarak hep yanımda ve kalbimde olan çok özlediğim tüm arkadaşlarım ve aile üyelerim, özellikle sevgili yeğenlerim Menna, Mody, Meryam ve Ali’ye,

Bu araştırmanın mali desteğini sağlayan Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi’ne ve bu Yüksek Lisans eğitim yolculuğumun mali ve manevi desteğini veren Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı’na en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Samar AHMED

3-HİDROKSİBÜTİRAT'IN SH SY-5Y HÜCRE HATTINDA HİDROJEN PEROKSİT TOKSİSİTESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Samar Mohamed Ali AHMED

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya Anabilim Dalı, 35340 İnciraltı, İzmir

ÖZET

Giriş ve amaç: Alzheimer Hastalığı (AH), progresif ilerleme gösteren, hafıza kaybı ile sonuçlanan geri dönüşümsüz nörodejeneratif bir hastalıktır. Patogenezinde amiloid beta (A β) toksisitesinin temel mekanizmalardan biri olduğu düşünülse de, oksidatif stres ve mitokondri disfonksiyonu gibi birçok patofizyolojik süreç yer almaktadır. Nörolojik hastalıkların bir kısmında ketojenik diyet terapötik bir seçenek olarak kullanılmaktadır. Ketojenik diyetin etki mekanizması tam olarak anlaşılamamış olsa da, güçlü kanıtlar mitokondriyal fonksiyonu iyileştirerek etki ettiğini ileri sürmektedir. Diğer taraftan hücre mitokondrisinde sentezi başlayan nörosteroidlerin nöroprotektif rolleri yanı sıra aktif nörotransmitter rolü görerek, beynin öğrenme, hafıza, duygu durum ve bilişsel yeti ile ilgili alanlarında olumlu etkiler gösterdikleri bilinmektedir.

Bu çalışma ile nöronal karakterli SH SY-5Y hücrelerinde oluşturulan Hidrojen Peroksit (H₂O₂) toksisitesinde bir keton cismi olan 3-Hidroksibütirat (3-OHB) uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkilerinin konsantrasyon ve zaman bağımlı olarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun yanı sıra 3-OHB'nin steroid hormon sentezinde hız kısıtlayıcı mitokondriyal bir enzim olan sitokrom P450 kolesterol yan zincir koparıcı (P450_{scc}) enzim düzeyi ve kognitif fonksiyonlar üzerine olumlu etkileri olduğu bilinen nöronal steroidlerden dehidroepiandrosteron (DHEA) ve dehidroepiandrosteron sülfat (DHEAS) konsantrasyonları üzerine etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntemler: SH SY-5Y hücrelerine 48 saat süre ile 1 ve 4 mM 3-OHB'in ön uygulamasının farklı glukoz konsantrasyonlarında oluşturulan H₂O₂ toksisitesinde hücre canlılıkları üzerine etkileri 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromid (MTT) testi kullanılarak incelendi. Ayrıca P450scc enzim, DHEA ve DHEAS düzeyleri Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELİSA) yöntemi kullanılarak belirlendi.

Bulgular: H₂O₂ ile oluşturulan toksisite modelinde 200 µM dozda uygulanan H₂O₂'in hücre canlılığını kontrol grubuna göre ~% 40- 50 oranında azalttığı gösterildi. 1 mM 3-OHB ile 48 saat ön muamelenin, üç glukoz konsantrasyonu (17.5 mM, 5 mM ve 1 mM) koşulunda da 200 µM H₂O₂ uygulanan gruba kıyasla hücre canlılığında herhangi bir değişiklik ortaya çıkarmadığı izlendi. Bunun yanında, aynı deney koşullarında 1 mM 3-OHB'in sadece H₂O₂ uygulanan gruba kıyasla P450scc enzimi, DHEA ve DHEAS düzeylerinde artışa neden olduğu gösterildi. Ancak bu artış sadece 5 mM glukoz varlığında P450scc enzimi (p=0.043) ve DHEAS için (p=0.029) istatistiksel olarak anlamlıydı.

Sonuç: Sonuç olarak bu çalışma ile 3-OHB'nin nörosteroidlerin sentezinde görevli enzimi tetiklediği ve oksidatif hasara karşı olası koruyucu etkileri olduğu vurgulanan DHEA ve DHEAS seviyelerinde artışa neden olduğu gösterilmiştir. 3-OHB'nin olası nöroprotektif etkisini sadece normoglisemik bir koşulda oluşturduğunu ve bu etkinin nörosteroidler ile bağlantılı olduğunu gösteren önemli *in vitro* veriler elde edilmiştir. Keton cisimleri ve nöronal steroid yapılı hormonların ilişkisi nörodejeneratif değişikliklerin önlenmesi ve nörodejeneratif hastalıkların oluşum mekanizmalarının anlaşılmasında önemli ipuçları oluşturacaktır.

Anahtar sözcükler: Alzheimer Hastalığı, oksidatif hasar, keton, nörosteroid, mitokondri

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF 3-HYDROXYBUTYRATE ON HYDROGEN PEROXIDE TOXICITY IN SH SY-5Y CELL LINE

Samar Mohamed Ali AHMED

Dokuz Eylül University, Institute of Health Sciences

Biochemistry Department, 35340 İnciraltı, İzmir

ABSTRACT

Introduction and aim: Alzheimer's disease (AD) is a disease characterized by its progressive nature and the advance of irreversible neurodegeneration that eventually leads to memory loss. Despite amyloid beta (A β) toxicity being one of the main mechanisms in the pathogenesis of AD, many other pathophysiological processes such as oxidative stress and mitochondria dysfunction also occur. Ketogenic diet has been used as a therapeutic option for some neurological diseases. Although the mechanism of action of ketogenic diet is not fully understood, strong evidence suggests that it works by improving mitochondrial function. On the other hand, neurosteroids, whose synthesis starts in cell mitochondria, are suggested to have various effects in the areas related to learning, memory, mood and cognitive ability of the brain. This can be attributed to them being neuroprotective, as well as having an active role as neurotransmitters.

The aim of this study was to determine the effects of the ketone body 3-Hydroxybutyrate (3-OHB) administration (addition of 3-OHB at the determined concentrations to cell culture medium) on cell viability in Hydrogen Peroxide (H₂O₂) induced toxicity in SH SY-5Y cells in a concentration and time-dependent manner. In addition, we intended to evaluate the effects of 3-OHB on the levels of the first speed-limiting enzyme in steroid hormone synthesis; cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage (P450scc) enzyme as well as the levels of the neurosteroids dehydroepiandrosteron (DHEA) and dehydroepiandrosteron sulfate (DHEAS) which are presumed to have positive effects on cognitive functions.

Methods: In the presence of different glucose concentrations, we measured the effect of pretreating SH SY-5Y cells for 48 hours with 1 mM and 4 mM 3-OHB on cell viability in H₂O₂ toxicity using 3- (4,5-dimethyl-2-thiazolyl) -2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) test. Additionally, we quantified P450scc enzyme, DHEA and DHEAS levels using Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) technique.

Results: In the toxicity model induced by H₂O₂, a dose of 200 µM H₂O₂ has managed to reduce cell viability by ~ 40-50% compared to the control group. We found that in all three glucose concentrations (17.5 mM, 5 mM and 1 mM) conditions, pretreatment with 1 mM 3-OHB for 48 hours caused no change in cell viability compared to control group (cells treated with 200 µM H₂O₂ only). Additionally, under the same conditions, pretreatment with 1 mM 3-OHB for 48 hours caused an increase in P450scc enzyme, DHEA and DHEAS levels compared to control group (cells treated with 200 µM H₂O₂ only) in all three glucose conditions. However, this increase was statistically significant only in the presence of 5 mM glucose in the case of P450scc enzyme (p= 0.043) and DHEAS (p=0.029)

Conclusion: In conclusion, this study has shown that 3-OHB triggers the enzyme involved in the synthesis of neurosteroids and also causes an increase in DHEA and DHEAS levels, which are emphasized to have possible protective effects against oxidative damage. Moreover, we obtained important *in vitro* data showing that 3-OHB exerts its possible neuroprotective effect only in a normoglycemic condition and that this effect is associated with neurosteroids. Understanding the relationship between ketone bodies and hormones with neuronal steroid structure will provide important clues in preventing neurodegenerative changes and understanding the mechanisms of neurodegenerative diseases.

Keywords: Alzheimer's disease, oxidative damage, ketone, neurosteroid, mitochondria

1. GİRİŞ VE AMAC

Alzheimer Hastalığı (AH), progresif ilerleme gösteren, hafıza kaybı ile sonuçlanan geri dönüşümsüz nörodejeneratif bir hastalıktır [1]. Patogenezinde amiloid beta ($A\beta$) toksisitesinin temel mekanizmalardan biri olduğu düşünülse de nörofibriller yumak oluşumu, mitokondri disfonksiyonu, inflamasyon, glutamat toksisitesi, oksidatif stres, sinaptik hasar ve kolinerjik aktivite kaybı gibi birçok patofizyolojik süreç yer almaktadır [2]. Prooksidan ve antioksidan seviyeleri arasındaki hücresel dengesizlik olarak tanımlanan oksidatif stres [3], AH gibi birçok nörodejeneratif hastalıkla ilişkilendirilmektedir. Mitokondriyal disfonksiyonun ve biyoenerji açığının gözlemlendiği AH'nda oksidatif stresin mitokondri fonksiyon bozukluğu üzerinde etkili olabileceği ileri sürülmektedir [4].

Uzun süredir ketojenik diyet tedavisinin non-farmakolojik bir tedavi yaklaşımı olarak epilepsi başta olmak üzere nörolojik hastalıklar için kullanımı önerilmektedir [5][6]. Uzun zincirli trigliserit diyeti olarak bilinen klasik ketojenik diyetle günlük kaloringin çoğu yağdan sağlanır. Orta zincirli yağ asidi içeren diyetle ise karbohidrat ve protein daha fazla miktarlarda bulunurken yağ oranı daha azdır, daha iyi tolere edilebilir ve uzun zincirli trigliserit diyetlerine göre kilokalori enerji başına daha fazla keton cisimleri [asetoasetat (AA), 3-hidroksibütirat ve aseton] üretilmesine neden olur. 3-hidroksibütirat, uzun süreli egzersiz, açlık durumlarında, ketojenik diyet veya kalori kısıtlaması sırasında biriken keton cisimlerinin en belli başlı olanıdır [7]. Son yıllarda AH'da, keton cisimlerinin etkinliği ve bunun mekanizması araştırılmaktadır. Orta zincirli yağ asidinden zengin hindistan cevizi yağının, ketojenik diyetin ya da dışarıdan verilen ketojenik ajanların insan ya da hayvan modellerinde, nöropatolojik süreçleri azalttığı, kognitif fonksiyonları arttırdığı, öğrenmeyi güçlendirdiği ileri sürülmektedir [8][9][10].

Bugüne kadar keton cisimleri ile yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda pek çok farklı mekanizma üzerinde yoğunlaşmıştır. Keton cisimlerinin nöroprotektif etkilerini; oksidatif stresi azaltarak ya da nöron hücrelerine $A\beta$ protein girişini engelleyerek yaptıkları vurgulanmıştır [11]. Buna ek olarak nörotoksositeye karşı mitokondriyal koruma sağladığı (elektron taşıma zincirindeki (ETZ) kompleksleri koruduğu) ve mitokondriyal solunumu arttırdığı ileri sürülmekle beraber mekanizması henüz kesin olarak ortaya konmamıştır. Bununla birlikte çalışmamızın hipotezine göre nöronal keton cisim düzey artışının mitokondri disfonksiyonunu engelleyebileceği düşünülebilir. Diğer taraftan hücre mitokondrisinde

sentezi başlayan nörosteroid sentezinin de etkileneceği düşünülebilir. Bu steroid hormonlar nöroprotektif özelliklerinin yanında aktif nörotransmitter rolü görerek, beyin öğrenme, hafıza, duygu durum ve bilişsel yeti ile ilgili alanlarında çeşitli etkiler ortaya çıkarabilir [12]. Dehidroepiandrosteron (DHEA) ve Dehidroepiandrosteron sülfat (DHEAS) nöronal dokuda da üretilen önemli nörosteroidlerdendir. Hidrojen peroksit (H_2O_2), *in vitro* çalışmalarda oksidatif stres üretmek için yaygın olarak kullanılan bir ajan olup H_2O_2 'in indüklediği toksisitenin oluşum mekanizması ile steroid sentezi arasındaki ilişki ve en önemlisi keton cisimlerinin bu nöroaktif steroidler üzerine olan etkileri ise henüz kesin olarak bilinmemektedir.

Bu çalışma ile *in vitro* olarak nöronal hücrelerde oluşturulan H_2O_2 toksisitesinde 3-OHB uygulamasının (hücre kültürü ortamına 3-OHB'in ön çalışma ile belirlenen konsantrasyonlarda dışarıdan verilmesi) nöronal hücre canlılığı üzerine etkilerini konsantrasyon ve zaman bağımlı olarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun yanı sıra 3-OHB'in steroid hormon sentezinde hız kısıtlayıcı mitokondriyal bir enzim olan sitokrom P450 kolesterol yan zincir koparıcı (P450_{scc}) enzim düzeyi ve kognitif fonksiyonlar ile ilişkili olduğu öne sürülen DHEA ve DHEAS düzeyleri üzerine etkileri değerlendirilecektir.

Planladığımız çalışma ile H_2O_2 'in tetiklediği hücre ölümünün oluşum mekanizmasına farklı bir bakış açısı getirmek ve yeni tedavi seçeneklerini geliştirmek için *in vitro* verilerin elde edilmesi mümkün olabilecektir.

Çalışmanın hipotezleri: insan nöroblastoma hücrelerinde (SH SY-5Y hücre hattı hücreleri) 3-Hidroksibütirat, mitokondri fonksiyonlarını arttırarak, nörosteroid sentezini arttırıp hidrojen peroksit toksisitesini azaltarak koruyucu etki gösterir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer Hastalığı geri dönüşümsüz nörodejeneratif bir hastalık olup patogeneğinde oksidatif stres, mitokondri disfonksiyonu, inflamasyon, glutamat toksisitesi, sinaptik hasar ve kolinerjik aktivite kaybı, nörofibriller yumak oluşumu gibi birçok patofizyolojik süreç yer almakla birlikte, çoğu çalışmada da amiloid beta ($A\beta$) toksisitesinin temel mekanizmalardan biri olduğu vurgulanmaktadır [1] [2].

Batı ülkelerinde ölüm nedenleri arasında 4. sırada bulunması ve bu hastalıktan hayatını kaybeden yaşlıların sayısının halen artışı, hastaların sağlık ve bakım harcamaları için oldukça yüksek finansal ihtiyacın olması, bu hastalığı toplum için sosyal ve ekonomik bir problem haline getirmiştir. Bu nedenle AH'da nöron kaybını önleyebilecek ajanların tanımlanması, hastalıktan koruyucu ve tedavi edici yöntemlerin bulunması oldukça önemlidir.

Prooksidan ve antioksidan seviyeleri arasındaki hücrel dengeşizlik olarak tanımlanan oksidatif stres [3], AH gibi birçok nörodejeneratif hastalıkla ilişkilendirilmektedir. Mitokondriyal disfonksiyonun ve biyoenerji açığının gözleendiği AH'nda oksidatif stresin mitokondri fonksiyon bozukluğu üzerinde etkili olabileceği ileri sürülmektedir [4].

2.2. Oksidatif Stres

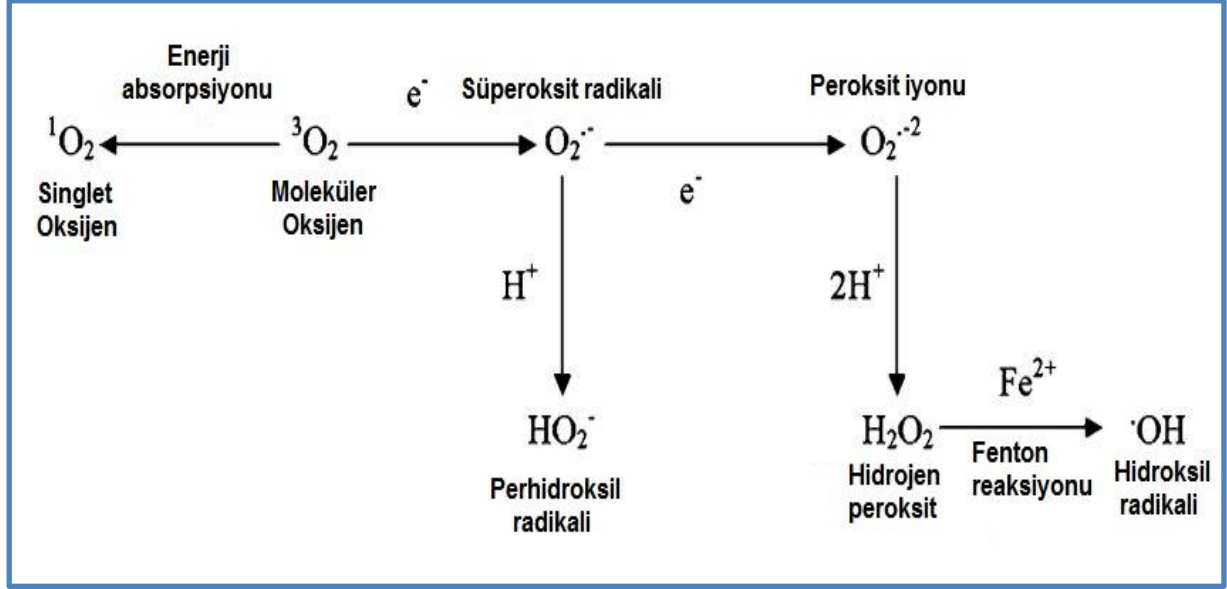
Oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin oksidanlar lehine bozulması moleküler hasarın oluşmasına yol açmaktadır. Prooksidanlar, serbest radikal ve radikal olmayan türler olabilir. Öte yandan, hücrelerin yapısal bütünlüğünü ve fizyolojik işlevlerini oksidatif strese karşı koruyan savunma sistemi olarak bilinen antioksidanlar, güçlü enzimleri (süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz ve tioredoksin sistemi enzimleri) ve indirgeyicileri (askorbik asit, karotenoidler vb.) içermektedir. Oksidatif stresin hücrel hedefleri arasında lipitler, proteinler, karbonhidratlar, deoksiribonükleik asit (DNA), ribonükleik asit (RNA) gibi birçok farklı biyomolekül bulunmaktadır [3].

2.2.1. Oksidatif Stresin Biyokimyası

Aerobik metabolizma, yükseltgenme-indirgenme (redoks) dengesi ile nitelenen sabit bir durumdur. Metabolik kararlı hallerde küçük sapmalar yaratırken (oksidatif eustress), oksidasyona doğru daha belirgin sapmalar biyomoleküllere zarar verebilir ve fizyolojik redoks sinyalini değiştirebilir hatta bozabilir [3][13]. Reaktif oksijen türleri (ROS), oksijenden türetilmiş serbest radikaller (süperoksit ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil radikali ($\bullet OH$), nitrik oksit) ve yüksek reaktiviteye sahip radikal olmayan oksijen türevleri (singlet oksijen (1O_2), hidrojen peroksit (H_2O_2), peroksinitrit, hipoklorit) için kullanılan kolektif bir terimdir. Canlı organizmalarda ROS, plazma zarında, sitozolde, peroksizomlarda, ve mitokondri ve endoplazmik retikulum zarlarında üretilir [14]. Ancak ökaryotik hücrelerde ROS'un % 90'ından fazlasının mitokondri tarafından üretildiği tespit edilmiş olup bu miktarın çoğu elektronların mitokondriyal elektron transfer zincirinden -esas olarak koenzim Q'dan-moleküler oksijene kaçmasıyla üretildiği ileri sürülmektedir [15]. Moleküler oksijen, iki molekül su üretmek için birer birer olmak üzere toplam dört elektron kabul edebilir. Bu işlem, genellikle ROS ve reaktif azot türleri (RNS) olan farklı yan ürünlerin üretilmesine yol açar [16]. Şekil 1'de gösterildiği gibi, O_2 'nin tek elektron indirgemesi $O_2^{\bullet-}$ 'nin üretilmesine neden olur. Düşük pH'ta, bir $O_2^{\bullet-}$, ek elektronunu başka bir $O_2^{\bullet-}$ 'ye verir ve daha sonra protonasyon ile H_2O_2 oluşumuna neden olur. Yine $O_2^{\bullet-}$, perhidroksil radikali ($HO_2^{\bullet}$) oluşturmak üzere protonlanabilir. Ayrıca, bakır ve demir gibi geçiş metallerinin varlığında, Haber-Weiss mekanizması veya Fenton reaksiyonu yoluyla $\bullet OH$ üretmek için başka reaksiyonlar meydana gelir [16]. Yüksek reaktivitesi ve indirgenme potansiyeli olan $\bullet OH$, hücreler için çok tehlikelidir. $\bullet OH$ fosfolipid peroksidasyonunun başlatılmasında ve protein oksidasyonunun üretilmesinde çok etkilidir [3].

Aerobik organizmalarda normal hücresel metabolizma sırasında sürekli ROS üretimi mevcuttur ve bunlar hücresel makromolekülleri hedef alarak hasar oluşturma eğilimindedirler [3]. Ayrıca, oksidatif stres kısır bir döngüye girebilir, çünkü üretilen ROS biyomolekülleri tahrip ettiğinde, bu daha yüksek ROS birikimine neden olabilir [17]. İnsan vücudunda, vücutta doğal olarak üretilen veya gıdalar ve / veya takviyeler yoluyla dışarıdan temin edilen düşük konsantrasyonlarda bulunan ve oksitlenebilir substratın oksidasyonunu önemli ölçüde geciktiren veya önleyen antioksidanlar üreterek oksidatif strese karşı koymak için çeşitli mekanizmalar vardır [16]. Ana antioksidan enzimler şunlardır: sitosolik Cu, Zn Süperoksit

dismütaz (SOD), mitokondriyal Mn-SOD, peroksizomal katalaz, sitosolik ve mitokondriyal glutatyon peroksidazlar ve sitosolik ve mitokondriyal tioredoksin redüktazlar. Diğer antioksidan kategorisi, tokoferoller, askorbik asit, karotenoidler ve diğer küçük antioksidanlar olan düşük moleküler kütle indirgeyicileridir [3].



Şekil 1: ROS üretimi [16]

2.2.2. Oksidatif Stres ve Alzheimer Hastalığı

Oksidatif hasarın, yaşlanma süreci [18], kanser ve birçok nörodejeneratif hastalığın gelişimi ile bağlantılı olduğu öne sürülmektedir [19]. Beyin, yüksek oksijen tüketimi (toplam vücut tüketiminin %20'si) nedeniyle, oksidatif strese bağlı oksidatif hasara özellikle hassastır. Buna ek olarak, beyindeki serbest radikal ve radikal olmayan türlerin üretilmesi, sinaptik plastisite gibi kritik bazı fonksiyonların gerçekleşmesinde önemlidir. Fakat redoks sinyalindeki bozulma gibi bazı durumlarda bu üretim dezavantaj olarak beyni oksidatif strese duyarlı hale getirebilir [20].

Reaktif türlerin aşırı üretimi ve yetersiz antioksidan savunma mekanizmalarının etkin aktivitesi, Alzheimer hastalığı (AH), Parkinson hastalığı (PH), Huntington hastalığı (HH) ve amyotrofik lateral skleroz (ALS) gibi birçok nörodejeneratif hastalığın patogenezi ile ilişkilendirilmiştir [21]. ROS birçok nörodejeneratif hastalığı için tetikleyici faktör olmasa da, oksidatif hasar ve mitokondri ile etkileşim yoluyla hastalık ilerlemesini şiddetlendirmesi muhtemeldir (Şekil 2)[22].

Alzheimer Hastalığı, geri dönüşümsüz nörodejeneratif bir hastalık olup dünya çapında en büyük sağlık sorunlarından biri olmaya devam etmektedir [1]. AH'nın belirtileri ortaya çıkmadan önce 20 yıl veya daha fazla beyinde hasta tarafından fark edilemeyen küçük değişikliklerle başladığı düşünülmektedir. Yıllarca süren beyin değişikliklerinden sonra bireyler dil problemleri ve hafıza kaybı gibi belirgin semptomlar yaşamaya başlar [1]. Çok faktörlü bir hastalık olduğu düşünülen AH'nda altta yatan temel nörobiyolojik mekanizmalar; amiloid peptid teorisi, kolinergik hipotez, glutamaterjik nörotransmisyon, tau proteininin rolü, oksidatif stres ve kalsiyumun katılımını içermektedir [2] [23] [24][25] [26].

Oksidatif stresin rolü hastalığının patogenezi ve seyrinde yoğun bir şekilde araştırılmış ve nöronal RNA ve proteine etkilerinin hastalık oluşumunda erken bir olay olduğu vurgulanmıştır [27]. Ayrıca, AH olan bireylerin beyin dokularındaki birçok oksitlenmiş baz seviyelerinin, kontrol deneklerine kıyasla frontal, parietal ve temporal loblarda anlamlı olarak daha yüksek olduğu, mitokondriyal DNA'nın, nükleer DNA'dan yaklaşık 10 kat daha yüksek oksitlenmiş baz seviyelerine sahip olduğu gösterilmiştir [28]. Buna ek olarak, ventriküler BOS'ta, artmış DNA oksidasyonu ve azalan onarım ürünü seviyeleri tespit edilmiş [29], hastaların otopsi sonucu elde edilen beyin dokusu örneklerinde de peroksidasyonda artış ve antioksidan enzim aktivitesinde azalma saptanmıştır [30].

AH'nda oksidatif durumdaki değişiklikler periferik olarak da belirlenmiştir. AH olan bireylerde plazma antioksidanlarında bir azalma saptanmış [31]. Kontrol grubuna göre plazma 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OH-dG) (DNA'da en sık çalışılan ve tespit edilen okside nükleozid hasar ürünü) düzeyleri anlamlı yüksek ve toplam antioksidan düzeyleri anlamlı olarak düşük bulunmuştur [32]. Ayrıca, vasküler demans ve AH'a bağlı demans hastalarından alınan kan örneklerinde, lipid peroksidasyonunda bir artış ve bazı antioksidan enzim aktivitelerinde de bir azalma olduğu gösterilmiştir [33].

Oksidatif stres aynı zamanda AH'nın ayırt edici özelliklerinin çoğunda moleküler düzeydeki değişikliklerle de bağlantılı bulunmuştur. Oksidatif stresin β -amiloid Prekürsör Protein Kırma Enzimi 1 (BACE1) transkripsiyonunu indüklediğini ve böylece AH'nda A β patolojik seviyelerinin üretimini teşvik ettiği vurgulanmıştır [34] (Şekil 3). Farelerde yapılan bir çalışmada, mitokondriyal süperoksit dismutaz 2 (SOD2) eksikliğinin amiloid yükünü şiddetlendirdiği ve fosforile tau seviyelerini artırdığı bulunurken [35], SOD1 (Bakır/Çinko

Artmış oksidatif stres ve AH'nın başlangıcı veya ilerlemesi arasındaki güçlü korelasyon nedeniyle, antioksidan ajanların AH üzerindeki etkisini test etmek için birçok çalışma yapılmıştır. Antioksidan özelliklere sahip olan C ve E vitaminlerinin 1 yıl boyunca kullanıldığı klinik bir çalışmada BOS'ta sınırlı bir antioksidan etki gözlemlense, müdahalenin AH'nın seyri üzerinde 1 yıl boyunca anlamlı bir etkisi olmamıştır [37]. Farklı bir klinik çalışmada ise, ortalama $2,27 \pm 1,22$ yıllık takip süresince, E vitamini alan hafif ila orta derecede AH olanlarda günlük yaşamın temel ve araçsal etkinliklerinde (ADCS-ADL ölçeği kullanılarak) plasebo alanlara göre daha yavaş düşüş gösterilmiştir [38].

AH'nın patogenezi ortaya koymaya çalışan araştırmalarda, hastalık oluşum mekanizmasında mitokondriyal disfonksiyon ve biyoenerji açığının oldukça önemli olduğu vurgulanmıştır [39]. Ayrıca AH olan hastaların nöronlarında, mitokondrinin amiloid-beta proteinin doğrudan birikim yeri olduğu da tespit edilmiştir [40]. Bu nedenle mitokondriyi hedefleyen antioksidanlar terapötik ajanlar olarak önem kazanmıştır. Mitokondride seçici olarak birikebilen ve fazla oksijensiz radikalleri ortadan kaldırabilen mitokondri hedefli bir antioksidan olan MitoQ, mitokondri ve hücre zarlarının oksidatif strese karşı korunmasına ve ayrıca lipid peroksidasyonunun önlenmesine yol açabilen bir ajandır [4]. Bunun yanında keton cisimlerinin de oksidatif stresi azaltarak ya da nöron hücrelerine A β protein girişini engelleyerek nöroprotektif etkiler yaptıkları, nörotoksiteye karşı mitokondriyal koruma sağladıkları vurgulanmıştır [41].

2.3. Alzheimer Hastalığında Enerji Metabolizması ve Keton Cisimlerin Rolü

2.3.1. Beyin Metabolizması

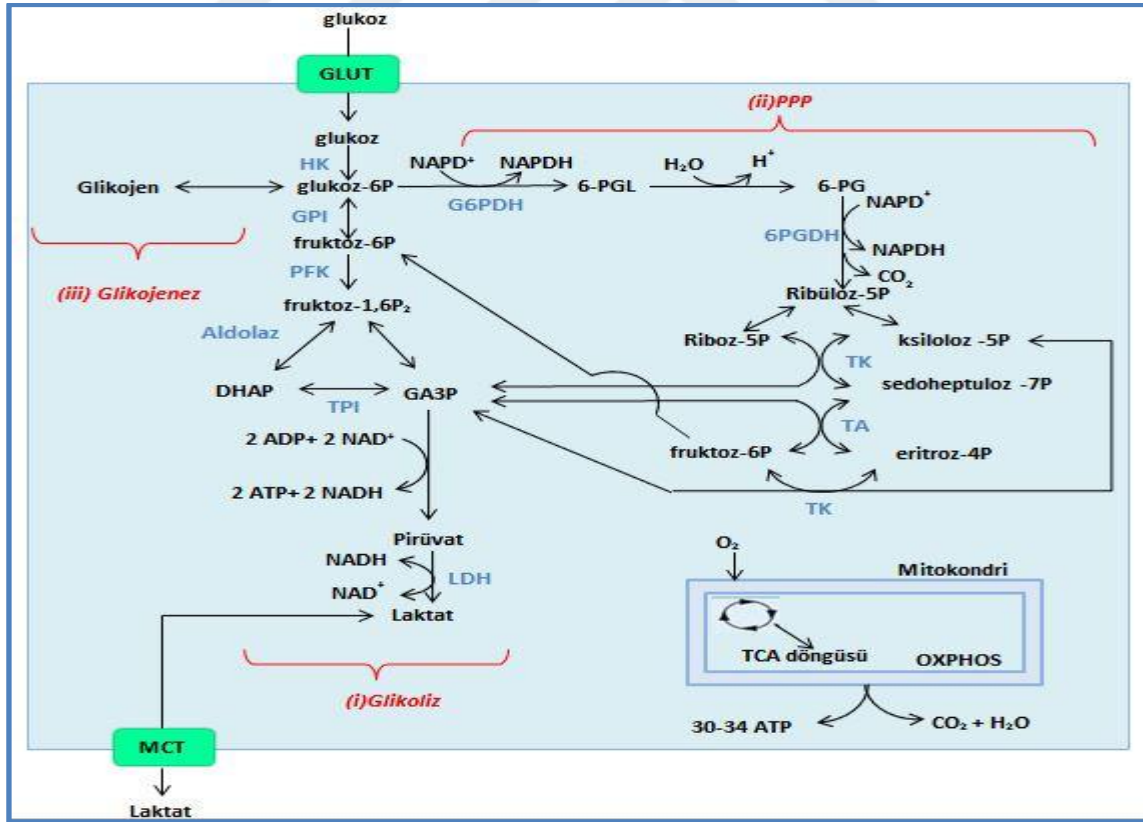
2.3.1.1. Normal Beyin Metabolizması

Beyin, toplam vücut kütleminin yaklaşık %2'lik küçük bir kısmını oluştururken, toplam oksijen metabolizmasının % 20'sinden fazlasını oluşturan en büyük enerji tüketimi kaynağını temsil eder. Ayrıca, nöronların beyinde üretilen enerjinin %75-%80'ini tükettiği tahmin edilmektedir [42].

Glukoz beyindeki ana enerji kaynağıdır. Adenosin-5' trifosfat (ATP) üretimine ek olarak, glukoz ayrıca membran ve miyelin sentezi için gerekli yağ asitleri ve diğer lipidler, protein sentezi ve nörotransmitter üretimi için amino asitler, nükleotitlerin sentezi için 5 karbonlu

şeker, ve astrositlerde glikojen üretilmesi için metabolik ara maddeler üretmek için de kullanılır [43]. Nöron membranları glukozu geçirgen değildir, bu nedenle glukoz hücre zarları boyunca spesifik taşıma proteinleri tarafından aktarılır. Bu taşıyıcılar sodyumdan bağımsız glukoz taşıyıcıları (GLUT'lar) ve sodyum bağımlı glukoz taşıyıcıları (SGLT'ler)'dir. GLUT1 ve GLUT3, beyindeki glukoz taşınmasından sorumlu ana GLUT proteinleridir [44]. Glukoz, hücrelere girdikten sonra glukoz-6 fosfat oluşturmak için heksokinaz enzimi ile fosforile edilir. Glukoz-6 fosfat Şekil 4'te görüldüğü gibi farklı metabolik yollara girebilir. Bunlardan en temel olanları (i) glikoliz (laktat üretimine veya mitokondriyal metabolizmaya yol açar), (ii) pentoz fosfat yolu (PPP), ve (iii) glikojenezdir (sadece astrositlerde). Genel olarak, glukoz neredeyse tamamen beyinde CO_2 ve H_2O 'ye oksitlenir [45].

Normal yetişkin beyindeki nöronlar enerji kaynağı olarak çoğunlukla glukozu bağımlı olsalar da, bazı durumlarda nöronlar keton cisimleri, laktat gibi glukoz dışındaki substratları da kullanabilirler. Örneğin, keton cisimleri beyin gelişimi sırasında ve yetişkinlerde uzun süreli açlık dönemlerinde kullanılırken, yoğun fiziksel aktivite sırasında beyin laktat kullanımı artar [43].



Şekil 4: Beyinde glukoz kullanımı [45]

GLUT, Glukoz taşıyıcıları; HK, Heksokinaz; glukoz-6P, glukoz-6-fosfat; GPI, glukoz-6-fosfat izomeraz; fruktoz-6P, fruktoz-6-fosfat; PFK, fosfosfruktokinaz-1, Fruktoz-1,6-P₂, fruktoz-1,6-bisfosfat; DHAP, dihidroksiaseton fosfat; TPI, trioz fosfat izomeraz; GA3P, gliseraldehid-3 fosfat; LDH, Laktat dehidrojenaz; MCT, monokarboksilat taşıyıcılar; G6PDH, glukoz-6-fosfat dehidrojenaz; 6-PGL, 6-fosfoglukono-d-lakton; 6-PG, 6-fosfoglukonat; 6 PGDH, 6-fosfoglukonat dehidrojenaz; ribuloz-5P, ribuloz-5-fosfat; riboz-5P, riboz-5-fosfat; ksiluloz-5P, ksiluloz-5-fosfat; TK, transketolaz; sedoheptuloz-7P, sedoheptuloz-7-fosfat; TA, transaldolaz; eritroz-4P, eritroz-4-fosfat ve OXPHOS, oksidatif fosforilasyonu

2.3.1.2. Alzheimer Hastalığı Sırasında Beyin Metabolizmasında Değişiklikler

AH'nda, beyinde bölgeye özgü serebral glukoz alımında ve metabolizmasında bozukluklar görülmektedir [46][44]. Değişmiş glukoz metabolizmasının AH'nda çok erken bir değişiklik olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [47][48]. Bunlara ek olarak, AH'nda, amiloid birikimi ve nörofibriler patolojiye duyarlı beyin bölgelerinde doku glukoz konsantrasyonlarının anlamlı derecede yüksek olduğu gösterilmiştir [49].

Ayrıca, son yıllarda, araştırmacılar AH için "Tip-3 Diyabet" terimini önermişlerdir. Bunun nedeni Diyabet (Tip-1 ve Tip-2) ve yaşlı bireylerde hafıza eksiklikleri ve bilişsel düşüşe bağlı insülin direnci arasındaki paylaşılan moleküler ve hücresel özellikler olmasıdır [50].

Nöronların hücre içine glukoz alımının insülininden bağımsız olduğu bilinmesine rağmen, nöronlar insülin reseptörlerini aşırı derecede eksprese ederler ve insüline yanıt oluştururlar. [44], İnsülin tarafından aktive edilen PI3K / Akt yolu, karbonhidrat ve lipid metabolizmasındaki değişiklikleri etkiler ve glukoz alımını modüle eder [51]. Ayrıca, beyin insülin direncinin biyobelirteçlerinin diyabet veya APOE ε4 durumuna bakılmaksızın normal vakalardan hafif kognitif bozukluğu olan AH vakalarına doğru gittikçe arttığı gösterilmiştir [52].

Tau, amiloid-beta ve hipometabolizma arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışma, normal yaşlanmada, düşük tau seviyelerinin artmış metabolizma aşaması ile ilişkili olduğunu, amiloid-beta varlığında yüksek tau seviyelerinin ise hipometabolizma ile ilişkili olduğunu göstermiştir [53]. AH'ye özgü bölgelerde (tipik olarak AH'nda etkilenen kortikal bölgeler) amiloid beta seviyeleri ve hipometabolizma arasındaki bu ilişki de bilişsel olarak normal yaşlı kişilerde bulunmuştur [54].

İlginç bir şekilde, bu hipometabolizmanın, keton cisimleri gibi diğer yakıt moleküllerine değil, glukozu spesifik olduğu öne sürülmektedir. Bilişsel olarak sağlıklı yaşlı erişkin

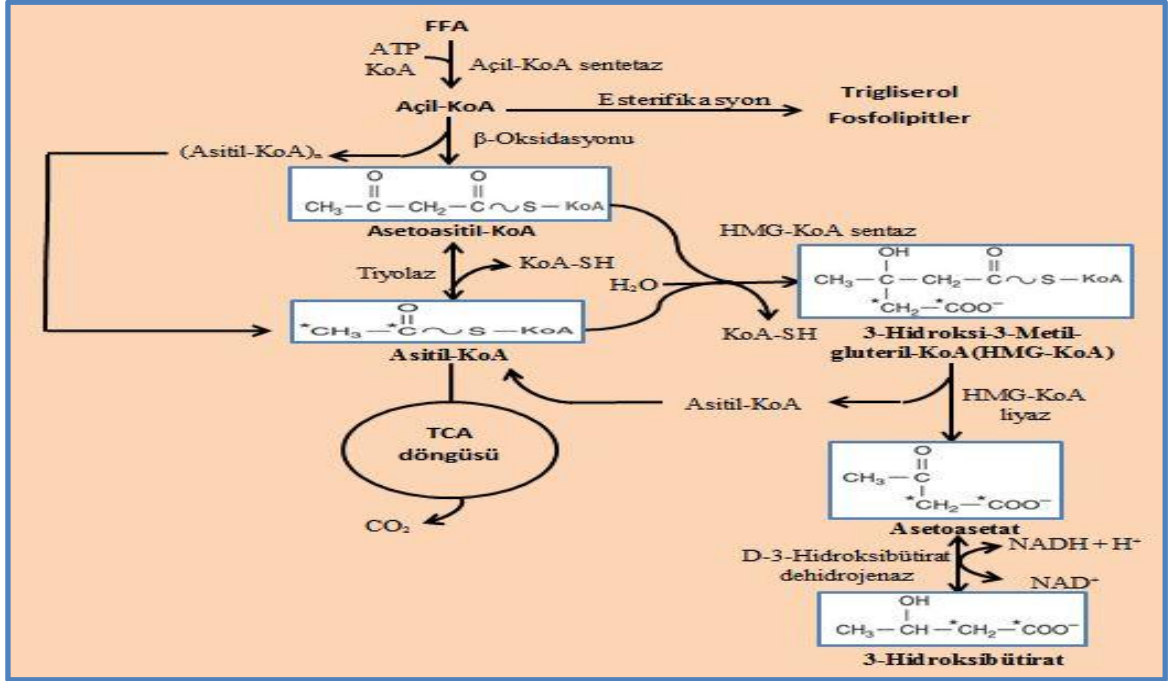
kontrolleri (KTL), hafif bilişsel bozukluk (MCI) ve erken AH hastalarında beyin enerjisi metabolizmasını (glukoz ve asetoasetat) karşılaştıran bir çalışma, AH'nda KTL'ye kıyasla serebral glukoz metabolik hızının birçok beyin bölgesinde ~%11 daha düşük olduğunu bulmuştur. Glukoz alım hızı sabiti (K_{Glu}) da bu bölgelerde ~%15 daha düşük bulunmuştur. Ayrıca, MCI'de KTL ile karşılaştırıldığında, singulat girusunda giruslarında ~%7 glukoz hipometabolizması olduğu gösterilmiş. Öte yandan, ne bölgesel ne de tüm beyin serebral asetoasetat metabolik hızı veya asetoasetat alım hızı sabiti (K_{AcAc}), KTL ve MCI veya AH arasında anlamlı olarak farklı bulunmamıştır [55].

Bu hipometabolizma AH'ndaki klinik belirtilerin başlangıcından önce ortaya çıktığı için, glukoz metabolizmasındaki erken düşüş, AH'nin tedavisi için potansiyel bir tedavi hedefi olarak kabul edilmektedir [56].

2.3.2. Keton Cisimleri, Ketojenik Diyet ve Alzheimer Hastalığı

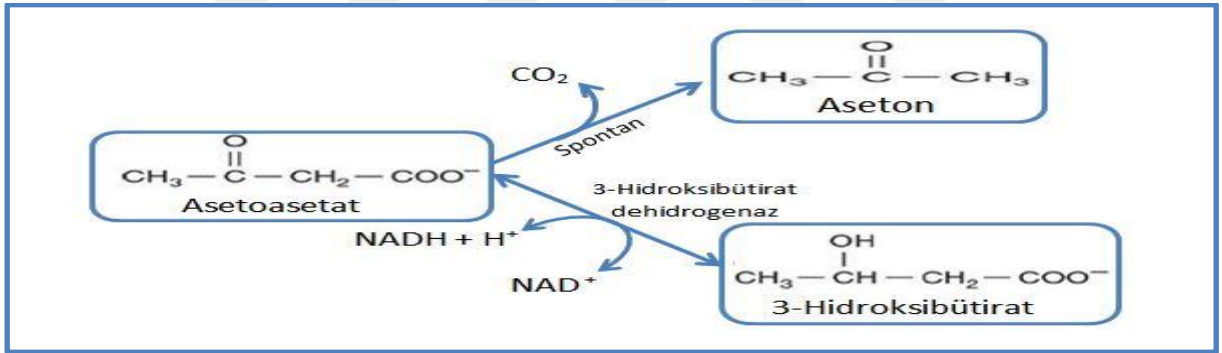
2.3.2.1. Keton Cisimlerin Sentezi

Keton cisimleri, yüksek oranda yağ asidi oksidasyonu ile ilişkili metabolik koşullar altında karaciğer tarafından üretilen suda çözünebilir, lipid türevli maddelerdir. Normal koşullarda az miktarda (<0.2 mM) üretilen üç keton molekülü; asetoasetat, D-3 hidroksibutirat (3-OHB) ve asetondur. Şekil 5'te gösterildiği gibi; asetoasetil-KoA, beta-oksidasyonu sırasında doğrudan bir yağ asidinin terminal dört karbonundan ortaya çıkabilir. Asetoasetil-KoA'nın başka bir asetil-KoA molekülü ile 3-hidroksi-3-metil-glutaril-KoA (HMG-KoA) sentaz tarafından yoğunlaştırılması HMG-KoA'yı oluşturur. HMG-CoA liyaz daha sonra asetil-KoA'nın HMG CoA'dan ayrılmasına ve serbest asetoasetat bırakmasına neden olur [57]. Asetoasetat ve 3-hidroksibutirat, mitokondriyal enzim D-3-hidroksibutirat dehidrojenaz tarafından birbirine dönüştürülebilir. Bu reaksiyonun dengesi mitokondriyal $[NAD^+]$ / $[NADH]$ oranı ile kontrol edilir (Şekil 6). Ekstrahepatik dokular solunum substratları olarak asetoasetat ve 3-hidroksibutirat kullanır, ancak aseton, uçucu olduğu için akciğerler yoluyla atılan bir atık üründür. Ayrıca, 3-OHB ketozis sırasında kanda ve idrarda bulunan baskın keton cismidir [57].



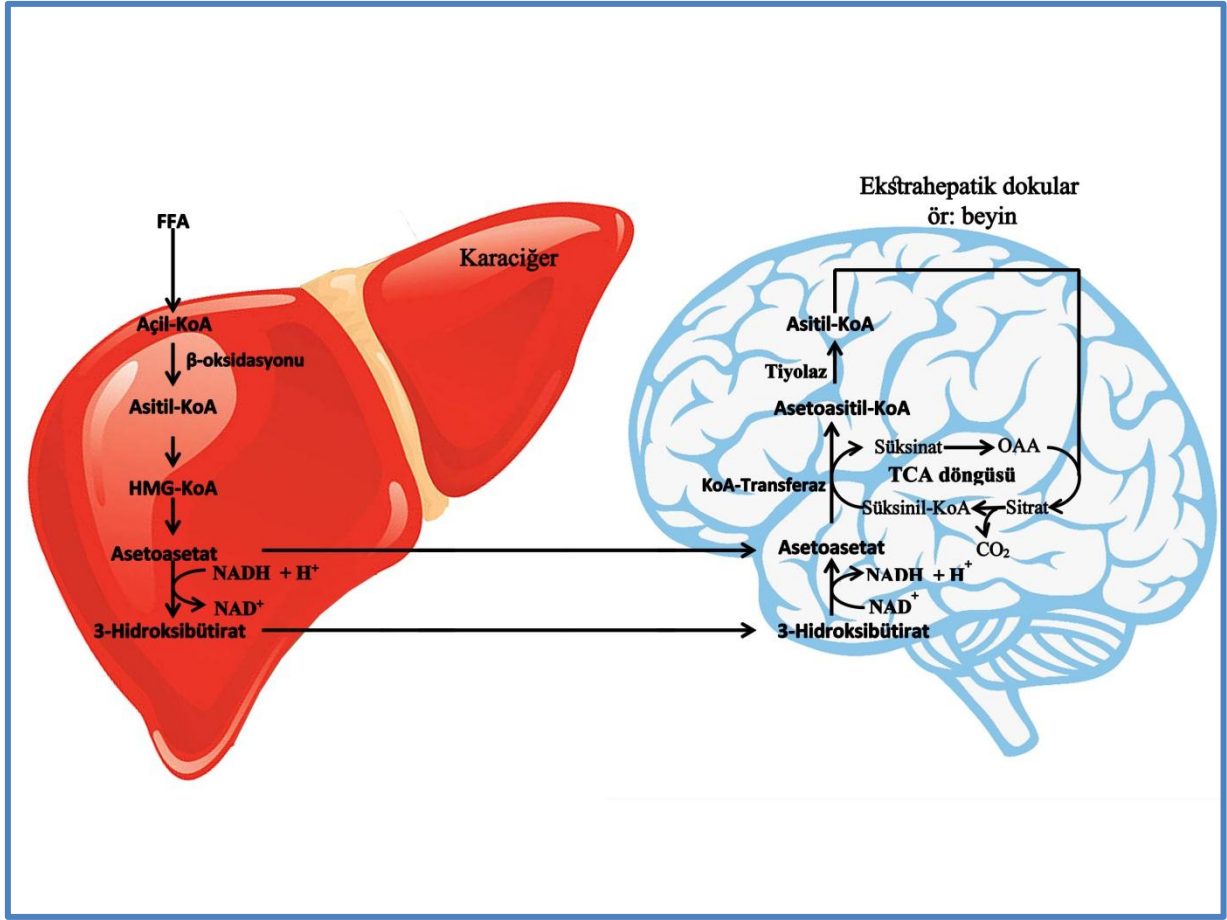
Şekil 5: Karaciğerde ketogenez yolları [57]

FFA, Serbest yağ asitleri



Şekil 6: Keton cisimleri [57]

Karaciğerde, asetoasetat doğrudan sitozol içinde yeniden aktifleştirilebilir ve kolesterol sentezinde bir öncü olarak kullanılabilir. Öte yandan, ekstrahepatik dokularda, asetoasetat, süksinil-CoA asetoasetat-CoA transferaz enzimi yardımıyla asetoasetil-CoA'ya aktive edilir. İki asetil-CoA molekülü, asetoasetil-CoA'nın tiyolaz enzimi tarafından bölünmesiyle oluşur ve bunlar daha sonra sitrik asit döngüsünde oksitlenir (Şekil 7) [57]



Şekil 7: Keton cisimlerinin karaciğerden taşınması ve ekstrahepatik dokularda kullanımı ve oksidasyonu

2.3.2.2. Ketojenik Diyet ve Alzheimer Hastalığı

Nörodejeneratif hastalıklarda diyet modifikasyonlarının ve yaşam tarzı gibi bazı dış etkenlerin de patogeneizde etkili olabileceği vurgulanmaktadır. Ketojenik diyet tedavisi farklı bir yaklaşım olarak çeşitli nörolojik hastalıklarda yıllar içinde kullanılmıştır [58]. İyi beslenen memelilerin kanındaki toplam keton cisimlerinin konsantrasyonu normalde 0.2 mM'ı geçmezken [57], diyabetik ketoasidoz gibi patolojik ketoasidozda kan 3-OHB konsantrasyonu 20 mM'ın üstüne çıkabilir. Son yıllarda, fizyolojik ketozis ile (kan 3-OHB konsantrasyonu: 1-8 mM) kanser, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok inflamatuvar hastalığın potansiyel terapötik rolü üzerine odaklanılmıştır [59]. Ketojenik diyetin ilaca dirençli epilepsi hastalarında etkili bir tedavi seçeneği olduğunu gösteren klinik çalışmalar mevcuttur [5][6]. Klasik ketojenik diyet - uzun zincirli trigliserit diyeti olarak da bilinir - günlük kalorisinin çoğu yağdan sağlanırken karbonhidrat ciddi şekilde kısıtlanır ve protein

minimum düzeyde günlük gereksinime uygun olacak şekilde verilir. Oldukça kısıtlı ve zor uygulanabilir bir diyetdir. Bunun yanında orta zincirli trigliserit içeren diyetin (MCT) klasik ketojenik diyetle benzer etkinliğe sahip olduğu ve hatta daha ketojenik etkili olduğu gösterilmiştir [60]. MCT diyetinde, karbonhidrat ve protein daha fazla miktarlarda bulunurken yağ oranı daha azdır, daha iyi tolere edilebilir ve uzun zincirli trigliserit diyetlerine göre kilokalori enerji başına daha fazla keton cisim üretilmesine neden olur [61]. 3-OHB uzun süreli egzersiz, açlık durumlarında, ketojenik diyetler veya kalori kısıtlaması sırasında biriken keton cisimlerinin en belli başlı olanıdır [7].

Ketojenik diyetin AH'nda potansiyel bir tedavi ve önleme yaklaşımı olarak kullanımı geniş çapta araştırılmıştır. AH hayvan modelleri, ketojenik diyet veya ketojenik ajanların amiloid-beta 40 ve 42 fragmanlarını azaltabildiğini [11], motor performansını iyileştirdiğini [62], epileptiform zirveleri, ve hafıza sağ kalımını iyileştirdiğini [63], ve amiloid-beta klerensi mekanizmalarını ve mitokondri fonksiyonunu arttırdığını [64] göstermiştir. Ayrıca, AH hastalarında ketojenik diyetler veya ketojenik ajanların kullanımı ile ilgili az ama umut verici insan klinik çalışması gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar temel olarak hafif ve / veya orta dereceli AH hastalarında bilişsel skorlardaki iyileşmelerdi [8][9]. Bunlara ek olarak, bazı çalışmalar ketojenik diyet / ketojenik ajanların AH'ndan önceki aşamalarda bir önleme aracı olarak rolünü araştırmıştır. Örneğin, bir çalışma, hafif bilişsel bozukluğu olan hastalarda ketojenik diyetin hafızayı geliştirdiğini bulmuştur [10]. Yakın zamanlarda yapılan bir başka pilot çalışma, ketojenik diyetin modifiye edilmiş bir versiyonunu kullanmıştır (ketozisi indüklemeyi amaçlayan çok düşük karbonhidrat diyeti olan Modifiye Akdeniz Ketojenik Diyeti) ve AH riski taşıyan yaşlı erişkinlerde beyin BOS AH biyobelirteç profilini, serebral perfüzyonu ve serebral keton cisimlerin alımını iyileştirdiği bulmuştur [65]. Keton cisimlerinin glukoz dışında alternatif bir beyin yakıtı olması dışında, ketozisin hücrel endojen antioksidan sistemin uyarılması, mitokondriyal fonksiyonların iyileştirilmesi ve nörotransmitterlerin (glutamat ve gama-amino bütirik asit gibi) metabolizmasının değiştirilmesi bazı nöromodülatör etki mekanizmaları öne sürülmektedir [66][67].

2.4. Nörosteroidler

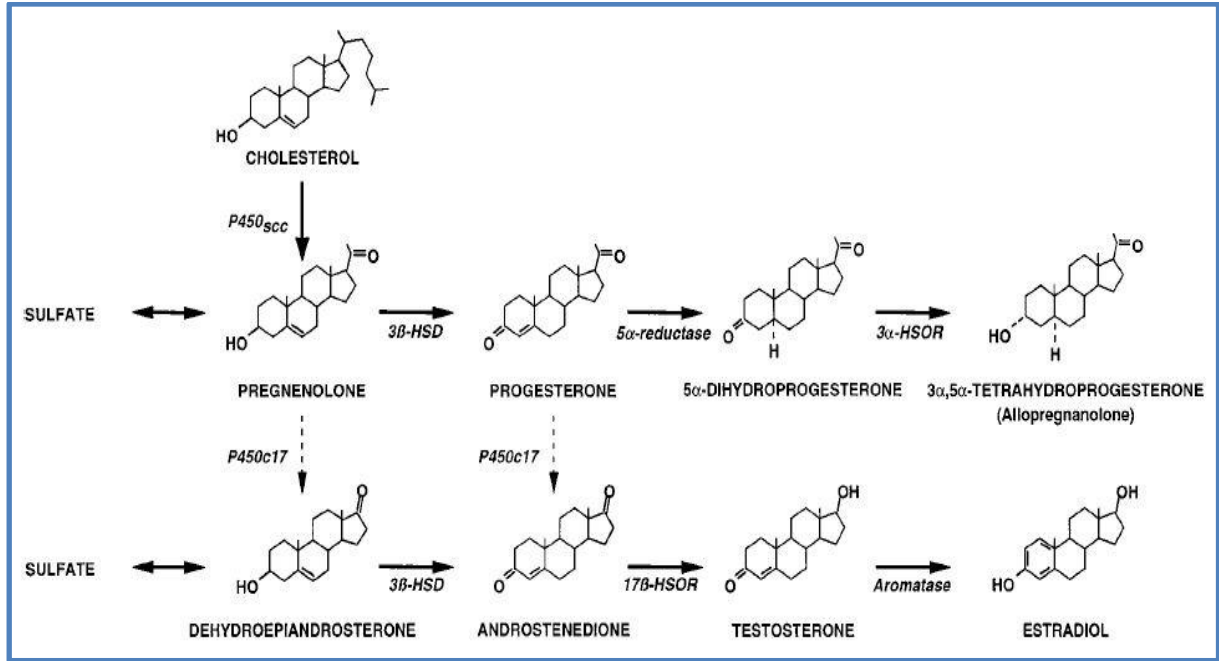
2.4.1. Tanım

Adrenal korteks, gonadlar ve plasenta gibi endokrin organlardan salınan, lipofilik doğaları nedeniyle kan-beyin bariyerini geçebilen steroid hormonların beyin gelişimi, büyümesi ve olgunlaşmasında önemli rolleri vardır [12]. Ancak, periferik endokrin bezlerin dışında, merkezi sinir sisteminde kolesterolden (*de novo*) sentezlenebilen ve nöronal aktiviteyi değiştirebilen steroid yapılı hormonlar, “nörosteroidler” olarak adlandırılmıştır [68]. Nörosteroidler yapılarına göre üç sınıfa ayrılır: (i) Allopregnanolon (AP) gibi pregnan nörosteroidleri; (ii) androstanediol gibi androstan nörosteroidleri ve (iii) pregnenolon sülfat (PS) gibi sülfatlanmış nörosteroidler [69].

2.4.2. Nörosteroidlerin Biyosentezi ve Metabolizması

Steroidogenezdeki ilk adım, kolesterolün mitokondriyal yan zincir koparıcı enzimi olan CYP11A (P450_{scc}) enzimi tarafından pregnenolona dönüştürülmesidir [69]. Bu basamak nörosteroidlerin sentezindeki hız kısıtlayıcı bir basamak olup P450_{scc}, tip 1 astrositler, oligodendrositler, Schwann hücreleri ve nöronlar gibi sinir sisteminin farklı hücrelerinde tespit edilmiştir [70]. Steroidogenezdeki bir başka kısıtlayıcı adım, kolesterolün hücre içi depolarından sitokrom P450_{scc}'nin bulunduğu iç mitokondriyal membrana taşınma hızıdır. Mitokondriyal membranın bir proteini olan periferik benzodiazepin reseptörü (PBR), kolesterol taşınmasında kritik rol oynar [70]. Sentezlenen Pregnenolon 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaz (3 β -HSD) yardımı ile progesterona okside olur [68]. Progesteron, sıralı A halkası indirgenmeleri ile AP'a dönüştürülür. A halkası indirgenmelerini sağlayan nörosteroid sentezinde yer alan iki anahtar enzim 5 α -redüktazdır (NADPH-D4-3 oksosteroid-5 α -oksidoredüktaz; EC 1.3.99.5) ve 3 α -hidroksisteroid oksidoredüktaz (3 α -HSOR)'dır. Bu enzimler, hipokampus ve neokorteks de dahil olmak üzere sentezin glia ve nöronlarda meydana geldiği beynin birçok bölgesinde eksprese edilir. Pregnenolon, hidroksilaz enzimleri tarafından katalizlenen bir dizi reaksiyon yoluyla dehidroepiandrosteron (DHEA)'yı da oluşturur. Pregnenolon ve DHEA sülfotransferaz (SULT) enzimleri ile sülfatlanır ve sırasıyla PS ve Dehidroepiandrosteron Sülfat (DHEAS) sentezlenir [69] (Şekil 8).

Beynin birçok bölgesinde ve pek çok hücresinde sentezlenebilen nörosteroidlerin metabolizması iki faz şeklinde gerçekleşir. Faz 1, pregnenolondan progesterone, DHEA, AP, testosteron ve estradiol gibi farklı steroidlerin sentezi basamaklarını içerir. Öte yandan, faz 2'de ise steroidlerin SULT ile sülfatlanması ve glukuronoziltransferaz (UGT) ile glukuronidasyonunu içeren olan temel konjugasyon reaksiyonları yer almaktadır [68].



Şekil 8: Nörosteroidlerin biyosentezi [70]

2.4.3. Nörosteroidlerin Sinir Sistemi Üzerine Etkisi

Nörosteroidlerin nöroprotektif etkilere sahip oldukları [71] ve biyoenerjik aktivatörler oldukları [72] düşünülmektedir. NS'ler sinir sisteminde aktif nörotransmitter rolü görerek, nöral aktiviteyi değiştirebilirler. Klasik steroid hormonlar gibi genomik yol ile etki gösterebildikleri gibi hızlı/non genomik yollar üzerinden de etki göstermektedirler [73] [74].

Pregnan ve androstan nörosteroidleri, inhibitör nörotransmisyon birincil araçları olan gama aminobutirik asit tip A (GABA-A) reseptörlerinin pozitif allosterik modülatörleridir. Ayrıca, Sülfatlanmış nörosteroidlerin N-metil D-aspartat (NMDA) reseptörleri ve sigma reseptörleri dahil olmak üzere pek çok farklı reseptörler ile etkileşime girdiği bilinmektedir [69]. Buna ek olarak, bazı NS'ler glutamat, asetilkolin, dopamin ve serotonin gibi çeşitli

nörotransmitterlerin salınımı üzerinde regülatör etkilere sahiptir [68]. Birçok çalışma nörosteroidlerin hafıza, stres, depresyon, anksiyete ve uyku gibi bazı biyokimyasal ve davranışsal yanıtları kontrol ettiğini ileri sürülmektedir [12]. Örneğin; pregnenolon, allopregnanolon, DHEA ve DHEAS gibi bazı nörosteroidin, nöroplastisiteyi artıran birçok hedefe etki ederek hafıza süreçlerini desteklediği bulunmuştur [75]. Ayrıca, 2018 yılında yapılan bir meta analiz çalışmasında, diğer psikiyatrik veya tıbbi komorbiditelerden kaynaklanmayan depresyon hastalarında, DHEA'nın depresif belirtilerin tedavisinde plaseboya göre daha etkili olduğu gösterilmiştir [76]. Kobaylarda yapılan bir başka çalışmada, annesi gebeliği sırasında 5 α -redüktaz inhibitörü alan ve sonucunda allopregnanolon maruziyeti azalmış dişi yavruların, kontrollere kıyasla çevrelerindeki bir değişikliğe anksiyete benzeri fenotip yanıtlarının arttığı bulunmuştur [77].

2.4.4. DHEA, DHEAS ve Alzheimer Hastalığı

DHEA ve DHEAS, dolaşımda en çok bulunan nörosteroidler olup [78], sinir sistemi ile ilişkileri yıllardır kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. İnsanlarda, DHEA ve DHEAS düzeyleri incelendiğinde beyin doku/plazma konsantrasyon oranlarının sırasıyla 4-6.5 ve 8.5 olduğu gösterilmiştir. Bu da DHEA ve DHEAS'ın nöroendokrin sisteme özgü önemli rollerini vurgulamaktadır [79]. Sıçan beyinde DHEAS düzeylerinde yaşa bağlı bir azalma olduğu [80] insanlarda ise DHEA ve DHEAS düzeylerinin yaşla birlikte her on yılda %10 azaldığı ve 80 yaşından sonra en düşük seviyeye ulaştığı gösterilmiştir [79]. Bu azalmanın nöronal disfonksiyon ve / veya dejenerasyonun ana nedenlerinden birini temsil ettiği ileri sürülmüştür [81]. Sağlıklı kadınlarda, daha yüksek endojen DHEAS seviyeleri ile yönetici işlev, konsantrasyon ve çalışma belleği arasında ilişki olduğu saptanmıştır [82]. Ayrıca, Massachusetts Erkek Yaşlanma Çalışmasına göre, plazmada DHEA ve DHEAS konsantrasyonlarının en az bir bilişsel alanda daha yüksek performans ile pozitif ilişkili olduğu kanıtlanmıştır .

AH ile yapılmış klinik çalışmalarda hastaların plazmasında DHEA ve/veya DHEAS konsantrasyonlarında azalma gösterilmiştir [83][84]. AH olan kişilerin post-mortem hippokampal dokularında yapılmış bir diğer çalışmada da DHEA'nın, H₂O₂ / FeSO₄'den kaynaklanan lipid oksidasyonunu önleyebildiği gösterilmiştir [85]. Ayrıca, başka bir fare çalışmasında anjiyogenez, nöroprotektif etki gibi birçok beyin fonksiyonunda rol oynayan

Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)'nde AH kaynaklı azalmanın, DHEAS ve insülin uygulaması ile doza bağlı bir şekilde tersine çevrildiği vurgulanmıştır [86].

Çoğu çalışmada DHEA ve sülfatının nöroprotektif etkili olduğunu, bilişsel fonksiyonları olumlu yönde etkilediğini destekleyen kapsamlı kanıtlar olmasına rağmen, klinik randomize çift kör kontrollü küçük ölçekli bir pilot çalışmada AH olan kişilere dışarıdan verilen DHEA'nın bilişsel performansı veya hastalığın şiddetinin genel derecelendirmelerini önemli ölçüde iyileştirmediği de bulunmuştur [87].



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırma Tipi

Araştırma tanımlayıcı deneysel *in vitro* bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Çalışma literatür taraması ile Haziran 2018’de başlamış; Temmuz 2020’de tez savunması ile sonlanmıştır. Deneysel çalışmalar ve veri toplama aşaması Aralık 2018 - Mart 2020 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarları altyapı olanakları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/ Çalışma Grupları

Çalışma hücre kültürü çalışması olduğu için evren ve örneklem / çalışma grupları yoktur.

3.4. Çalışma Materyali

Çalışmamızda insan kaynaklı ticari olarak satın alınan SH SY-5Y hücre hattı (insan nöroblastoma hücre hattı) materyal olarak kullanılmıştır.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Bağımlı Değişkenler: Hücrelerin % canlılık oranı, P450scc enzim düzeyi ve DHEA, DHEAS düzeyleri.

Bağımsız Değişkenler: Sadece büyüme ortamı uygulanan, H₂O₂ ve 3-OHB uygulanan hücreler ile oluşturulan gruplar.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Kullanılan cihaz, kimyasal ve kitler

Çalışmamızda kullanılan cihazlar, kimyasal malzemeler ve kitler tablo 1, 2 ve 3’te listelenmiştir.

Tablo 1: Çalışmada kullanılan cihazlar

Laminar Flow Hücre Kültürü Kabini	Thermo Sci, 2020
Santrifüj	Eppendorf 5810 R
Derin dondurucu (-80°C)	Thermo Forma Model 705
Derin dondurucu (-20°C)	Arçelik 2031
Sonikatör	Sonic Materials
Saf su cihazı	Milipore Mili-Q ZLX55003Y
Plak Okuyucu	BioTek ELX 800
Karbondiyoksit İnkübatörü	Steri-Cycle i160, Thermo Sci
Buz makinası	Scotsman AF-100
Otoklav	Hirayama HICLAVE HV-50
Ters Faz Işık Mikroskobu	Nikon Eclipse TS-100
Hassas terazi	Precisa XB 220 A

Tablo 2: Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler

DMEM-F12 ortamı	Biowest
Trypsin-EDTA	Gibco
Penisilin/Streptomisin	Gibco
L-Glutamine	Gibco
FBS (Fötal Sığır Serumı)	Gibco
(DMSO) Dimetil sülfoksit	EMPLURA

Glukoz-monohidrat	Riedel-de-Haën
HEPES	Gibco
Hidrojen Peroksit	Sigma-Aldrich (kat no. 386790-M)
PBS (Phosphate Buffer Saline)	Wisent
3-OHB (3-Hidroksibüterik asit)	Sigma-Aldrich (kat no. 166898)
MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl2H-tetrazolium bromide)	PanReac AppliChem

Tablo 3: Çalışmada kullanılan kitler

DHEA ELISA kiti	Bioassay Technology Laboratory (kat no. EA0028Hu)
DHEAS ELISA kiti	Bioassay Technology Laboratory (kat no. EA0035Hu)
CYP11A1 (P450scc) ELISA kiti	Bioassay Technology Laboratory (kat no. E6517Hu)

3.6.2. Hücre Kültürü

SH SY-5Y İnsan Nöroblastoma Hücre Hattı:

Çalışmamızda ticari olarak satın alınan SH SY-5Y hücre hattı kullanılmıştır. SH SY-5Y hücreleri metastatik nöroblastomalı 4 yaşındaki bir kızın kemik iliği biyopsisinden izole edilmiş üçüncü jenerasyon nöroblastoma olup nöronal karakterli, nörosteroidogenik enzimleri içerdiği ve nörosteroidleri üretebildikleri yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. *In vitro* çalışmalarda sıkça kullanılan hücrelerdir [88].

Donmuş Hücrelerin Çözülmesi:

Dondurulmuş hücreler cryovial (hücre dondurma tüpleri) içinde saklandığı sıvı azot ya da -80°C 'den çıkarılarak hızlıca 37°C 'de çözülerek süspanse edildi ve 15 mL'lik steril tüplere (falkon tüp) aktarıldı. Üzerine 10 mL büyüme ortamı eklenerek 1500 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Üst faz atılarak dipteki kısım 2-3 mL büyüme ortamı ile süspanse edildi. Uygun hücre kültür kabına (flask) alınan hücrelerin üzerine %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin, 12.5 mM L-Glutamin ve 17.5 mM Glukoz içeren DMEM/F12 büyüme ortamı ilave edilerek 37°C 'de, nemli atmosfer ve %5 CO_2 basıncı altında inkübatörde idame ettirildi. Hücrelerin morfolojileri ve yüzeye tutunma oranları ters faz mikroskop ile değerlendirildi (Resim 1). Hücre kültür ortamı 3-4 günde bir değiştirilerek hücreler konfluent hale geldiğinde düzenli bir şekilde pasajlandı.



Resim 1: SH SY-5Y hücrelerinin ters faz ışık mikroskop (20x büyütmedeki görüntüleri)

Hücrelerin Pasajlanması, Sayılması ve Dondurulması:

Flasktaki hücre kültür ortamı tamamen çekilip atıldıktan sonra flask 1-2 kez PBS ile yıkandı. Hücreleri yüzeyden kaldırmak için enzimatik bir yöntem olarak Tripsin-EDTA kullanıldı. Tripsin ekledikten sonra 3-5 dakika flask inkübatörde bekletildi. Tüm hücrelerin flask tabanından kalktığı ışık mikroskop ile gözlemlendikten sonra enzimi inaktive etmek için enzim hacminin 2 katı kadar hücre kültür ortamı eklendi. Flasktaki tüm solüsyon çekilip

falkon içine aktarıldı ve 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Kabin içinde falkondaki süpernatant çekilip atıldı ve pellete hücre kültür ortamı konuldu ve nazıkçe pipetlenerek resüspanse edildi. Elde edilen hücreler yüzey alanına göre uygun bir yoğunlukta olacak şekilde yeni 25 ve/veya 75 cm² 'lik flasklara ekildi.

Deney seti kurulacak ise hücre saymak amacıyla hücre solüsyonundan az bir miktar eppendorfa aktarıldı ve belli bir seyreltme oranı kullanarak üzerine tripan mavi eklendi. Bu karışım Neubauer lamı ve lamel arasına yayıldı ve hücreler sayıldı. Ön çalışmalar ile önceden belirlenen sayıda hücre yapılacak deneye uygun olarak 6 ve/veya 96 kuyucuklu plaklara ekildi.

1 milyon hücre olmak üzere %30 FBS, %10 dimetil sülfoksit (DMSO) ve %60 büyüme ortamı içinde hücrelerin stoğunu hazırlamak için hücreler -80°C'de donduruldu.

3.6.3. Reaktiflerin Hazırlanması

3.6.3.1. 3-Hidroksibütirat (3-OHB) 'in Hazırlanması

3-Hidroksibütirik asit %95 çözelti olarak (Moleküler ağırlık: 104.10 g/mol) alındı. Distile su ile 1:10.8 oranında dilüe edilerek 40 mM ana stok hazırlandı. Ana stok +4°C'de 1 ay stabil olacak şekilde saklandı. Deneylerde kullanılan 3-OHB'ın farklı konsantrasyonları (0.1, 0.25, 0.5, 1, 4, 8 ve 10 mM) ana stoktan hücre kültür ortamı ile seri dilüsyonlar yapılarak hazırlandı.

3.6.3.2. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) 'in Hazırlanması

Hidrojen peroksit suda %30 (w/w) sulu çözelti olarak (9.8 M) alındı. Ana stok 100 mM konsantrasyonda olacak şekilde distile su ile dilüe edilerek hazırlandı. H₂O₂'nin kararsız doğası nedeniyle, her deney öncesi taze olarak hazırlandı. Ara stoklar (1 mM) ve deneylerde hücrelere uygulanan konsantrasyonlar (50, 100, 120, 150, 200, 250, 300 ve 500 µM) hücre kültür ortamı ile dilüe edilerek hazırlandı.

3.6.3.3. MTT solüsyonunun Hazırlanması

Çalışmamız için toz halinde temin edilen MTT maddesi PBS içinde çözülerek 5mg/mL'lik bir stok çözelti steril ve karanlık koşullarda hazırlandı. (5 mg/mL'lik stok MTT solüsyonu karanlık ortamda 4°C'de 1 haftaya kadar veya -20°C'de 1 aya kadar stabil kalabilmektedir).

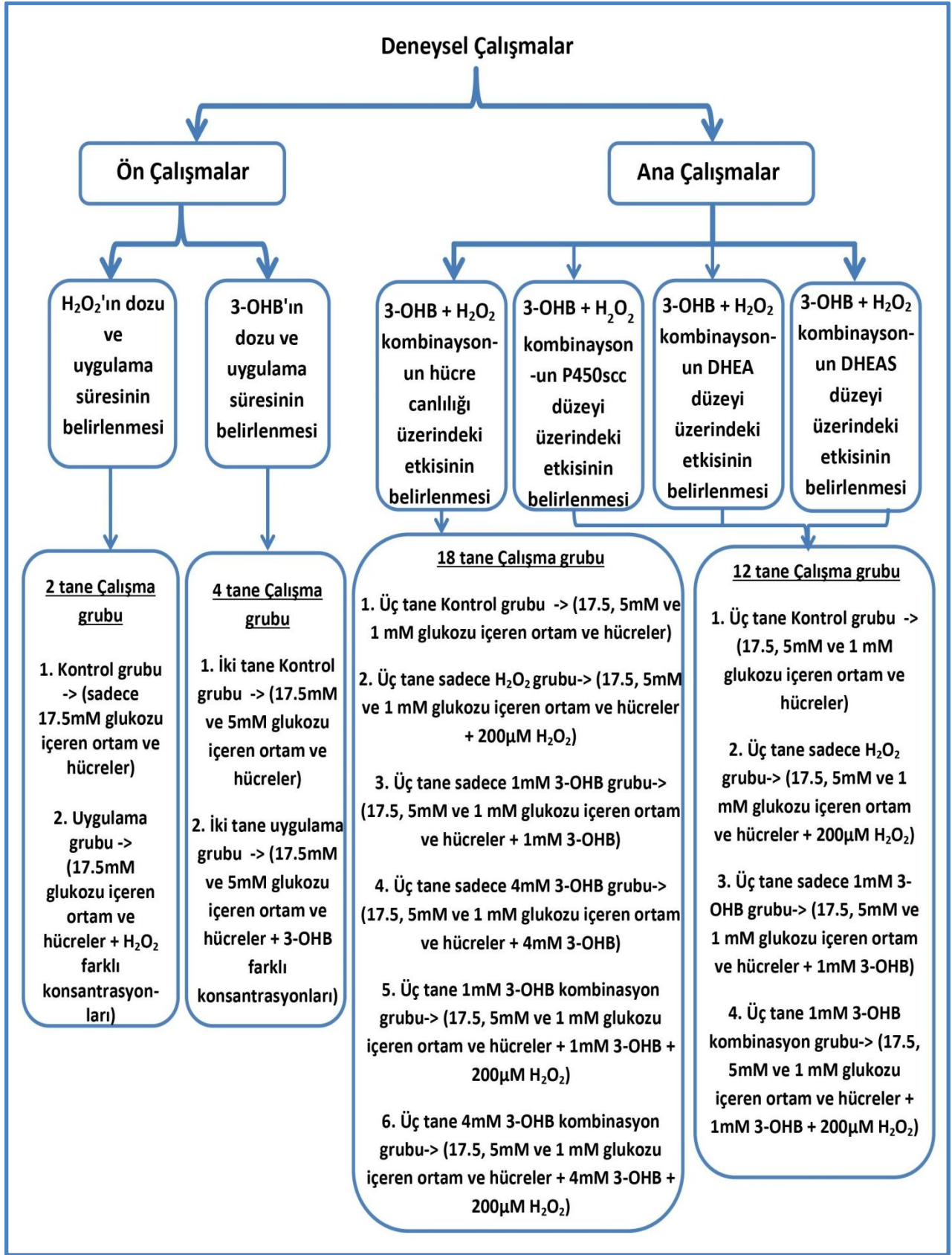
3.6.4. Deneysel Çalışmalar

Öncelikle hem ana deneylerde kullanılacak olan 3-OHB konsantrasyonları ve uygulama süresi belirlenmesi, hem de toksisite oluşturmak için gerekli olan (%50 hücre canlılık azalmasına) H₂O₂ konsantrasyonunun belirlenmesi için ön çalışmalar gerçekleştirildi. Bu amaçla MTT hücre canlılık testi kullanıldı.

3-OHB için; 0.1, 0.25, 0.5, 1, 4, 8 ve 10 mM konsantrasyonları 2 farklı glukoz konsantrasyonu (17.5 mM ve 5 mM) içeren büyüme ortamlarında denendi. Amaç, her iki glukoz konsantrasyonunda hücre canlılığını kontrole göre en az etkileyen 3-OHB konsantrasyonunu ve uygulama süresi belirlemek ve ana deneylerde bu doz ve süreleri kullanabilmektir.

Çeşitli literatür taramalarından yola çıkarak planlanan ön deneylerde en uygun konsantrasyon aralığını belirlemek için H₂O₂ için ise; 50, 100, 120, 150, 200, 250, 300 ve 500 µM konsantrasyonları 17.5 mM glukoz konsantrasyonu içeren büyüme ortamında denendi. Amaç, 24 saat içinde hücre canlılığını ≈%50'ye düşüren H₂O₂ konsantrasyonunu belirleyebilmektir.

Ön deneyler tamamlandıktan sonra 200 µM H₂O₂ ve 1 mM / 4 mM 3-OHB konsantrasyonları ile çalışmalara devam edilmesine karar verildi. Üç farklı glukoz konsantrasyonu (17.5 mM, 5 mM ve 1 mM) içeren büyüme ortamında bulunan hücreler ilk önce 48 saat süreyle 3-OHB (1 mM ve 4 mM) ile ön muamele edildi. Daha sonra 200 µM H₂O₂ 24 saat boyunca uygulandı ve canlılık testi ile % hücre canlılık oranları belirlendi. Sonuçlar değerlendirildiğinde, deneylerimizi 1 mM 3-OHB kullanarak sürdürmeye karar verdik. Ana deneylerde 1 mM 3-OHB ile hücrelerin 48 saat boyunca ön muamelesi ardından 24 saat boyunca 200 µM H₂O₂ uygulaması sonrası hücrelerde P450_{sc} enzim düzeyi, DHEA ve DHEAS nörosteroid düzeyleri ölçüldü. Şekil 9 deneysel çalışmayı ve oluşturulan deney gruplarını özetlemektedir.

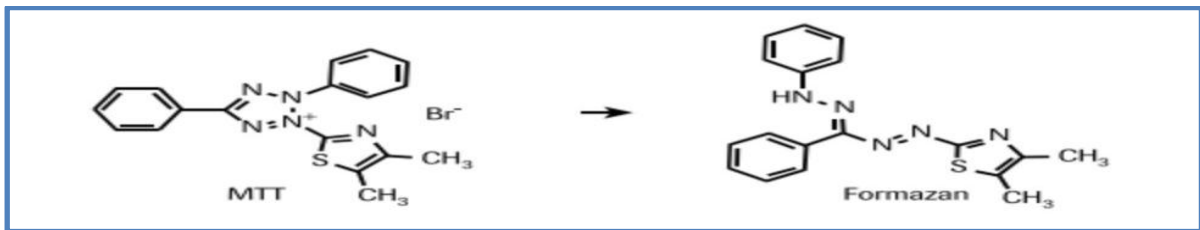


Şekil 9: Deneysel çalışmalar ve çalışma grupları

3.6.4.1. Hücre Canlılık Testi

Hücre canlılığı 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) reaktifi kullanarak belirlendi. Metabolik olarak aktif hücreler tarafından sarı bir tetrazolium tuzunun (MTT) mor formazan kristallerine indirgenmesine dayanan kolorimetrik bir testtir. Bunun nedeni, canlı hücreler, MTT'yi formazan'a indirgeyen NAD(P)H'ye bağlı oksidoredüktaz enzimleri içerir. Çözünmeyen formazan kristalleri çözündürülür ve elde edilen renkli çözelti, spektrofotometre okuyucu kullanılarak 500-600 nanometredeki absorbans ölçülerek ölçülür. Çözelti ne kadar koyu olursa, canlı, metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı o kadar fazla olur [89] (Şekil 10).

Prosedür olarak, SH SY-5Y hücreleri 96 kuyucuklu hücre kültürü plaklarına 20×10^3 hücre, DMEM/F-12 büyüme ortamıyla son hacim 200 μ L olacak şekilde ekildi. Hücreler yüzeye tutunabilmesi için 18-24 saat 37°C'de ve %5 CO₂ içeren inkübatörde beklendi. Yapılan deney prosedürüne göre reaktiflerin uygulamaları yapıldı. Deney süresi bittikten sonra her kuyucukta bulunan 200 μ L hacimde hücre ve ortam solüsyonunun 110 μ L çekilerek 10 μ L daha önce hazırladığımız MTT stok solüsyonundan eklendi (Her kuyucuktaki MTT'nin son konsantrasyonu 0.5 mg/mL olacak şekilde). Plaklar 37°C'de ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 3.5 saat inkübe edildi. Daha sonra oluşan formazan kristalleri her kuyucuğun dibine çöktürülmesi için plaklar 5 dakika boyunca 1500 rpm hızında santrifüj edildi. Bundan sonra her kuyucuktaki ortam-solüsyon karışımından 150 μ L uzaklaştırıldı ve kalan 50 μ L'nin üzerine 150 μ L DMSO eklendi. Plaklar bir daha 37°C'de ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 30 dakika inkübe edildi. Spektrofotometre okuyucusunda 590 nm ve 630 nm dalga boylarındaki absorbansları okutuldu (630 nm referans dalga boyu olarak) ve kontrol gruplarına oranlanarak her kuyucuğun % canlılığı hesaplandı.



Şekil 10: MTT'nin formazan bileşiğine dönüşümü [89]

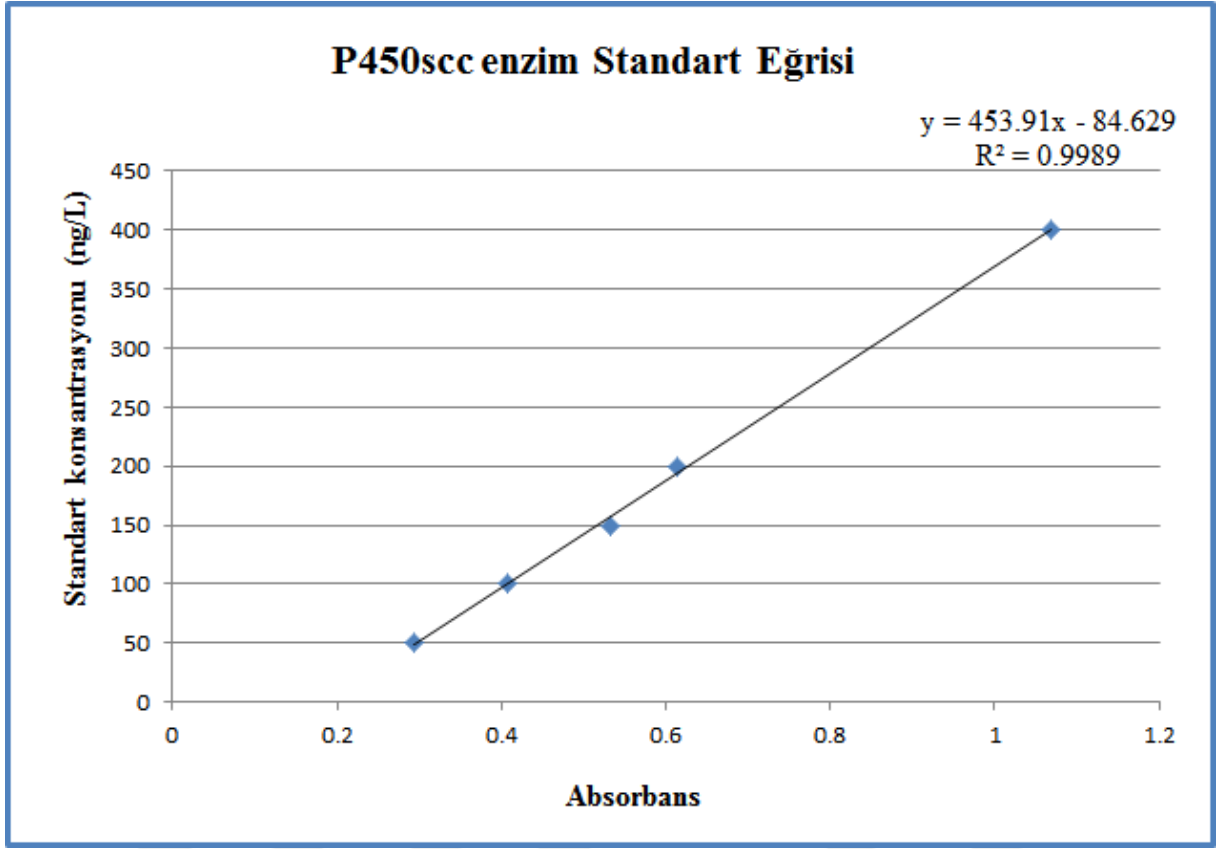
3.6.4.2. ELISA için örnek hazırlanması

Hücreler, 6 kuyucuklu plaklara 1.5 milyon hücre/kuyucuk yoğunluğunda ekildi. Kimyasalların uygulama işlemleri tamamlandıktan sonra mevcut ortam içine hücreler, hücre kazıyıcı (scraper) kullanılarak plak tabanından kaldırıldı ve eppendorflara aktarıldı. Eppendorflar buz üzerinde sonike edilerek hücreler tamamen parçalandı ve lizat oluşturuldu. 2000 rpm’de 20 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar başka eppendorflara aktarıldı ve -80°C’de P450scc (CYP11A1)enzimi, DHEA ve DHEAS analizleri yapılana kadar saklandı. Farklı deneyler ile elde edilen örneklerin tüm analizleri aynı anda çalışılarak çalışmalar arası olası değişkenlikler ortadan kaldırılmış oldu.

3.6.4.3. P450scc (CYP11A1) enzim ölçümü

Mitokondriyal Sitokrom P450 kolesterol Kolesterol yan zincir koparıcı enzim düzeyinin ölçülmesi için “Bioassay Technology Laboratory” ELISA® kiti üreticinin önerileri doğrultusunda kullanıldı. Bu kitin yöntemi çift sandviç ELISA tekniğine dayanmaktadır. Standart eğri çizebilmek için ilk önce standart materyali 120µL kendi dilüenti ile rekonstitüe edildi. Farklı standart konsantrasyonları (50ng/mL, 100ng/mL, 150ng/mL, 200ng/mL, ve 400ng/mL) seri dilüsyonlar ile hazırlandı (Şekil 10). ELISA plağının standart kuyucuklarına 50’şer µl standart ve örnek kuyucuklarına ise 40’ar µl örnek + 10’ar µl anti-CYP11A1 antikoru sırayla eklendi. Daha sonra tüm kuyucuklara 50’şer µl streptavidin-HRP eklenip karıştırıldıktan sonra plağın üzeri kapatılarak 37°C’de 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her kuyucuk 350µL yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı. Ardından tüm kuyucuklara 50’şer µL substrat A ve B solüsyonları eklenip üzeri kapalı şekilde 37°C’de 10 dakika karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, tüm kuyucuklara stop solüsyonundan 50’şer µl eklenip 10 dakika içinde plak okuyucuda 450 nm’de absorbanslar okutuldu. Bilinen konsantrasyonlara karşı ölçülmüş absorbanslar ile oluşturulmuş standart eğri kullanılarak örnekteki P450scc (CYP11A1) enzimi düzeyi hesaplandı.

Kitin belirlemiş olduğu ölçüm aralığı: 15ng/L-3000ng/L, alt saptama sınırı: 8.07ng/L’dir.



Şekil 11: P450scc enzimin standart eğrisi

3.6.4.4. DHEA ölçümü

Hücre içi DHEA'nın kantitatif analizi için 6 kuyucuklu plaklara ekilmiş olan 1.5 milyon/kuyucuk hücreden örnek hazırlığı yukarıda ayrıntılı şekilde anlatıldığı gibi yapıldı.

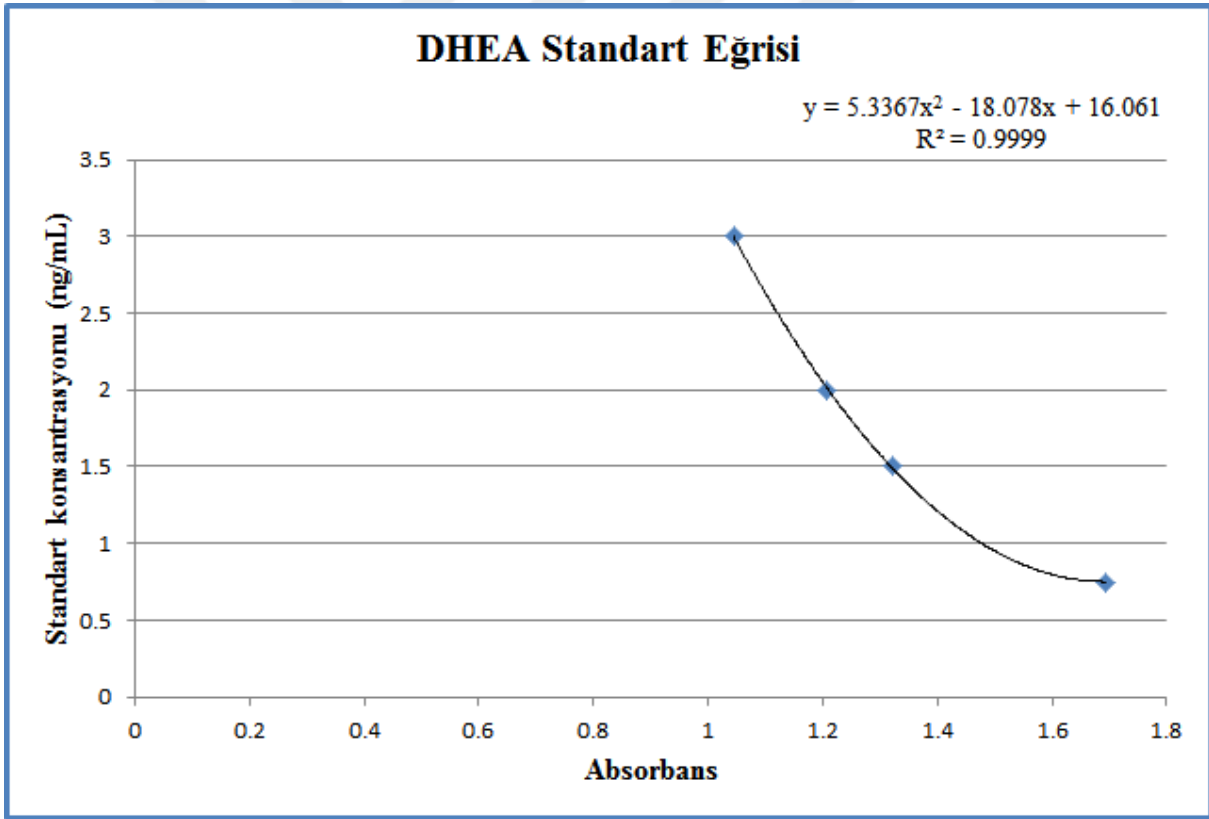
DHEA düzeyleri “Bioassay Technology Laboratory” ELISA® kiti ile ölçüldü. Çift sandviç ELISA tekniğine dayanan bu kit ile analizler üreticinin önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi.

Kit ile birlikte temin edilmiş olan DHEA standartı 150µL standart dilüenti ile rekonstitüe edildi. Standart eğri çizmek için standart çözeltinin farklı konsantrasyonları (4ng/mL, 3ng/mL, 2ng/mL, 1.5ng/mL ve 0.75ng/mL) seri dilüsyonlar ile hazırlandı (Şekil 12). Önceden hazırlanan analiz şablonuna uygun şekilde ELISA plağı kuyucuklarına 50 µL standart ve örnek eklendi. Daha sonra her kuyucuğa 50 µL biyotin ile işaretlenmiş antijen eklenip karıştırıldı, üzeri kapatılıp 30 dakika 37 °C’de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her

kuyucuk 350µL yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı. Ardından 50 µL konsantre avidin-HRP reaktifi ilave edilerek plağın üzerine kapatılıp 37°C’de 30 dakika inkübe edildi. Yukarıda belirtildiği gibi yıkama işlemi bir kez daha tekrarlandı ve sonrasında tüm kuyucuklara 50 µL substrat A ve B solüsyonlarından eklenip plağın üzeri kapatılıp 10 dakika 37°C’de karanlıkta inkübe edildi. Bundan sonra, tüm kuyucuklara 50 µL stop solüsyonunun eklenmesinin ardından 15 dakika içinde plak okuyucuda 450 nm’de absorbanslar okutuldu.

Şekil 12’deki standart eğri kullanılarak örneklerdeki DHEA konsantrasyonları hesaplandı.

Kitin belirlemiş olduğu ölçüm aralığı: 1.5ng/mL - 48ng/mL, alt saptama sınırı: 0.054ng/mL’dir.



Şekil 12: DHEA standart eğrisi

3.6.4.5. DHEAS ölçümü

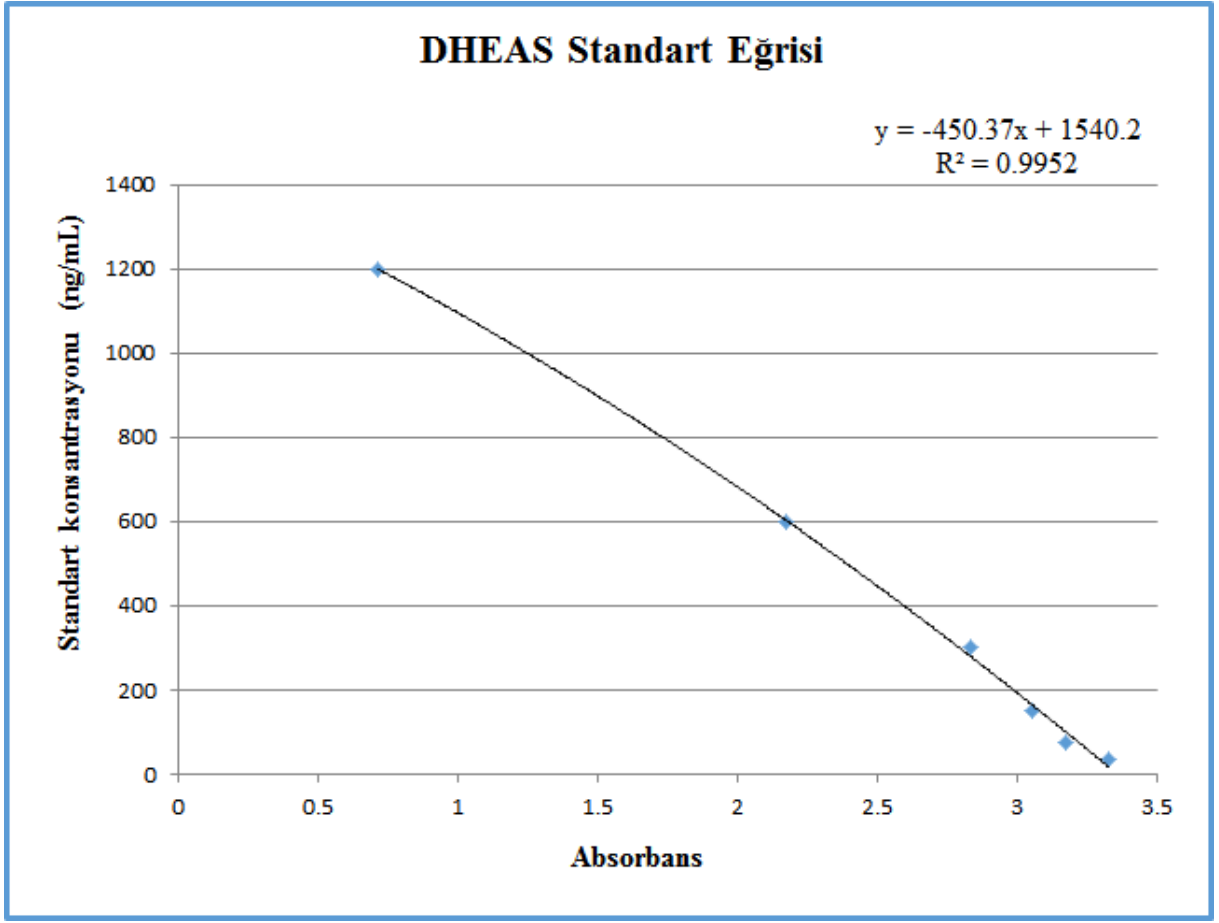
Hücre içi DHEAS'nın kantitatif analizi için 6 kuyucuklu plaklara ekilmiş olan 1.5 milyon/kuyucuk hücreden örnek hazırlığı yukarıda ayrıntılı şekilde anlatıldığı gibi yapıldı.

DHEAS düzeyleri “Bioassay Technology Laboratory” ELISA[®] kiti ile ölçüldü. Çift sandviç ELISA tekniğine dayanan bu kit ile analizler üreticinin önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi.

Kit ile birlikte temin edilmiş olan DHEAS standartı 150µL standart dilüenti ile rekonstitüe edildi. Standart eğri çizmek için standart çözeltinin farklı konsantrasyonları (1200ng/mL, 600ng/mL, 300ng/mL, 150ng/mL, 75ng/mL, ve 37.5ng/mL) seri dilüsyonlar ile hazırlandı (Şekil 13). Önceden hazırlanan analiz şablonuna uygun şekilde ELISA plağı kuyucuklarına 50 µL standart ve örnek eklendi. Daha sonra her kuyucuğa 50µL biyotin ile işaretlenmiş antijen eklenip karıştırıldı, üzeri kapatılıp 30 dakika 37 °C’de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her kuyucuk 350µL yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı. Ardından 50µL konsantre avidin-HRP reaktifi ilave edilerek plağın üzerine kapatılıp 37°C’de 30 dakika inkübe edildi. Yukarıda belirtildiği gibi yıkama işlemi bir kez daha tekrarlandı ve sonrasında tüm kuyucuklara 50µL substrat A ve B solüsyonlarından eklenip plağın üzeri kapatılıp 10 dakika 37°C’de karanlıkta inkübe edildi. Bundan sonra, tüm kuyucuklara 50µL stop solüsyonunun eklenmesinin ardından 15 dakika içinde plak okuyucuda 450 nm’de absorpsanlar okutuldu.

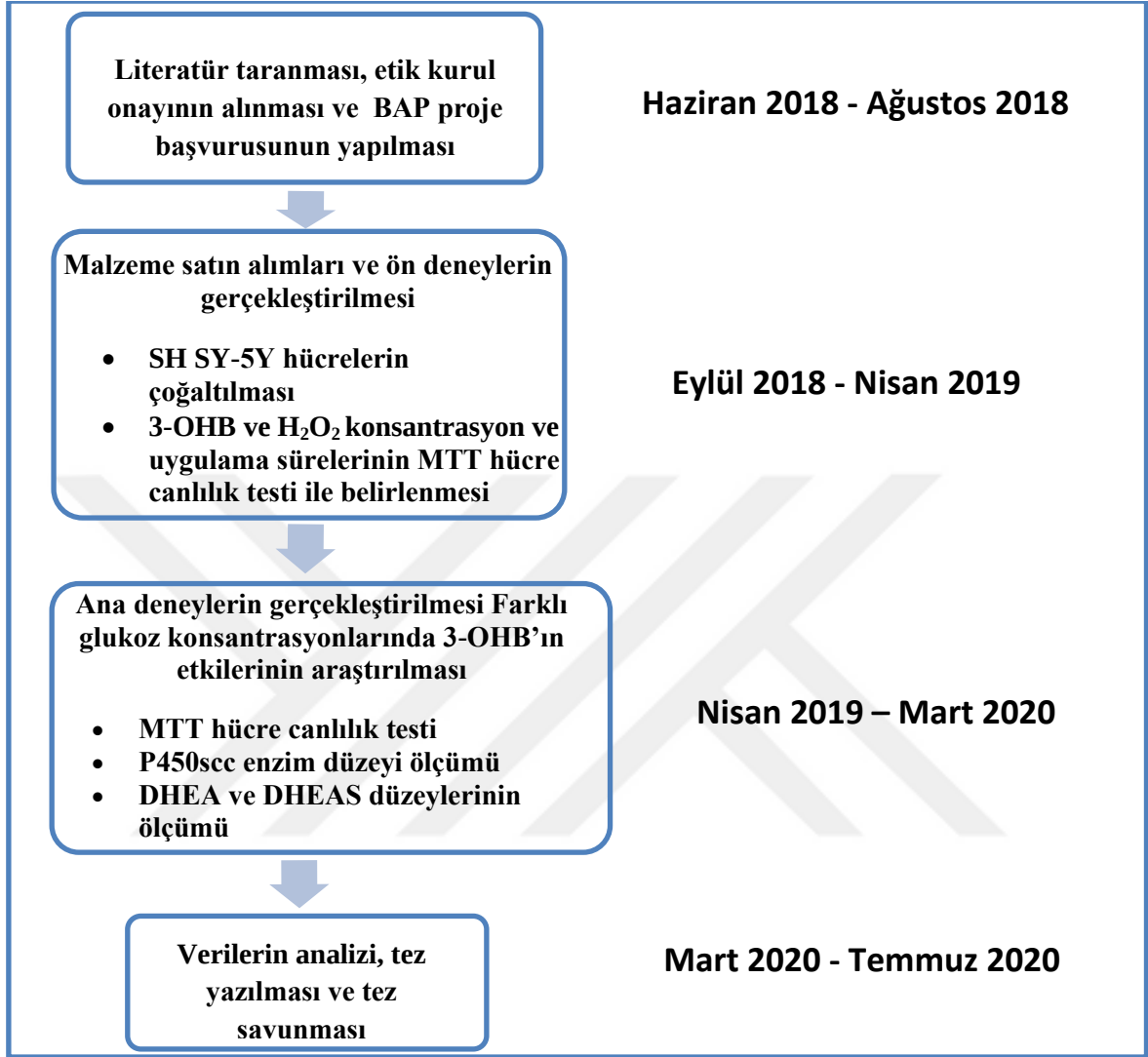
Şekil 13’deki standart eğri kullanılarak örneklerdeki DHEAS konsantrasyonları hesaplandı.

Kitin belirlemiş olduğu ölçüm aralığı: 300ng/mL - 9600ng/mL, alt saptama sınırı: 14.23ng/mL’dir.



Şekil 13: DHEAS standart eğrisi

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi



3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi GraphPad Prism [v]8 programı ve SPSS programının [v]24 yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Gruplar arası karşılaştırmalarda Mann-Whitney U testi kullanıldı. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata şeklinde verildi. p değeri <0.05 olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Oluşturulan tüm deney koşulları kendi içinde en az üçer kez ve farklı zamanlarda en az 3 kez olmak üzere tekrarlanarak çalışıldı.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

- Çalışmamız *in vitro* bir araştırma olup *in vivo* modeller ve klinik çalışmalar ile verilerimiz desteklenmelidir.
- Bu çalışma kapsamında H_2O_2 toksisite modelinde 3-OHB'ın mitokondriyal fonksiyon üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla lüminometri yöntemi kullanarak ATP düzeyi ölçmeyi planlamış olmamıza rağmen COVID-19 pandemisi nedeni ile laboratuvar çalışmalarının kesintiye uğraması sonucu bu deneyler gerçekleştirilemedi.
- 3-OHB'ın hücre içine taşınmasını sağlayan monokarboksilat taşıyıcısını bloke eden bir ajan olan AR-C15585 kullanarak deneylerin tekrarlanması planlanmış olmasına rağmen yukarıdaki belirten sebeplerden dolayı bu deneyler gerçekleştirilemedi.
- Proje bütçesinin kısıtlı olması nedeniyle 3-OHB'ın P450scc enzim gen ekspresyonu düzeyindeki etkisi belirlenememiştir.

3.10. Etik Kurul Onayı

Çalışmamız Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 26.07.2018 tarihinde 2018/19-22 karar numarası ile uygun bulunmuştur.

Çalışmamızdaki değişiklik Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 13.09.2018 tarihinde 2018/22-32 karar numarası ile ve daha sonrasında da 14.10.2019 tarihinde 2019/25-45 karar numarası ile uygun bulunmuştur (Bölüm 8.1).

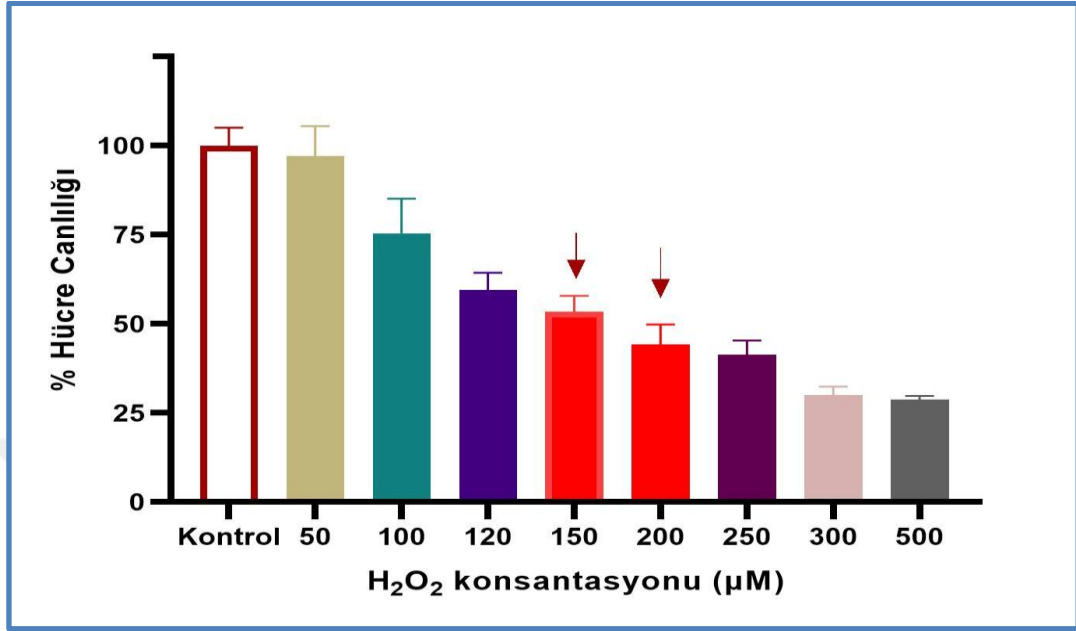
4. BULGULAR

4.1. Ön Çalışmalara Ait Bulgular

4.1.1. SH SY-5Y Hücrelerinde Hidrojen Peroksit Toksisitesinin Oluşturulması

SH SY-5Y hücrelerinde toksisite oluşturmak için, 96 kuyucuklu plaklara hücreler 20 bin hücre/kuyucuk yoğunluğunda ekildi. 50, 100, 120, 150, 200, 250, 300 ve 500 μM 'lık farklı konsantrasyonlarda H_2O_2 ilave edilerek 24 saat inkübe edildi. Hücre canlılıkları MTT testi ile

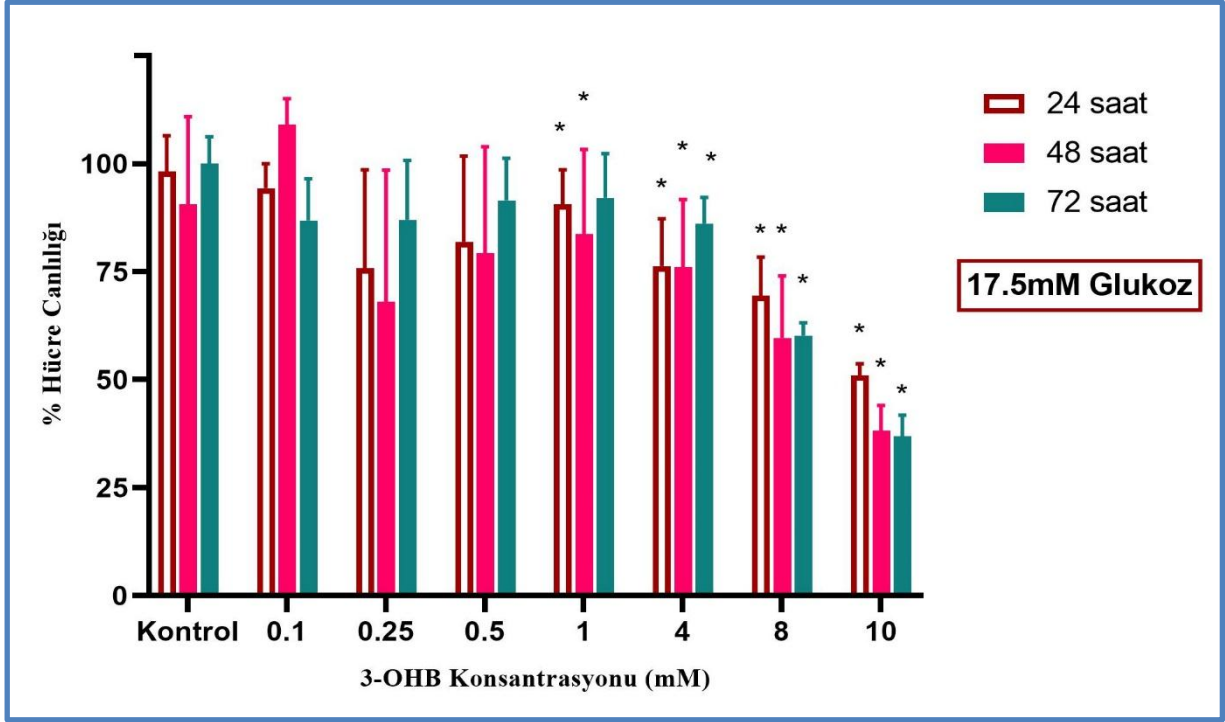
değerlendirildiğinde Şekil 14'te görüldüğü gibi, kontrole göre yaklaşık %50 hücre canlılığı sağlayan H_2O_2 dozları 150 ve 200 μM 'dir.



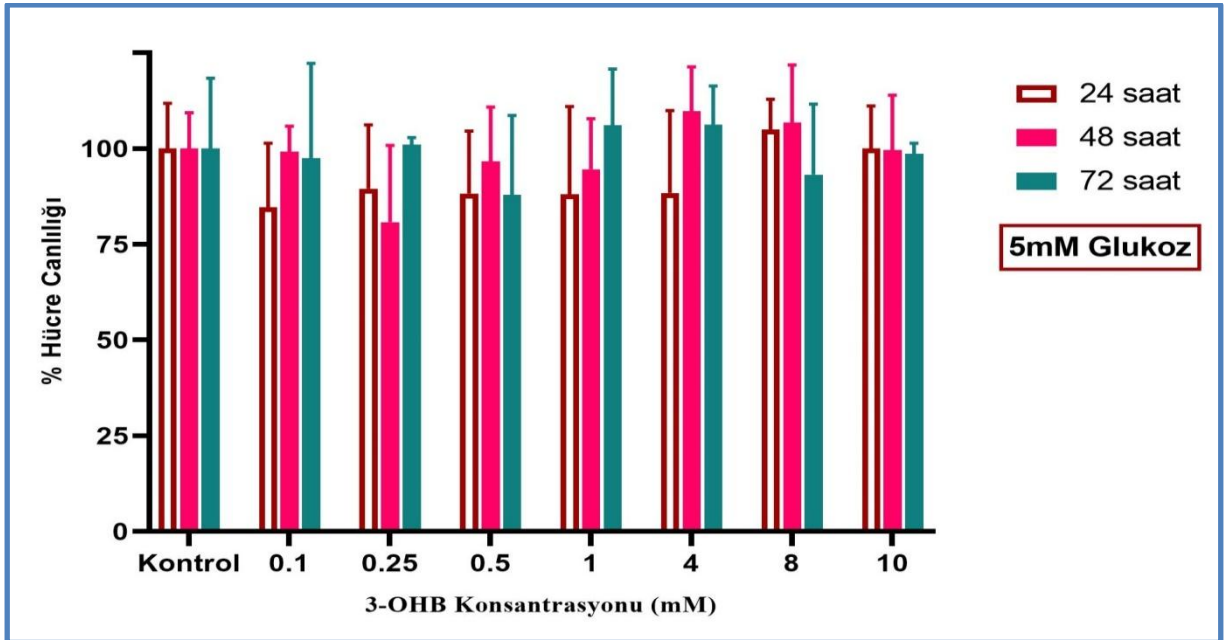
Şekil 14: 24 saat H_2O_2 uygulamasının SH SY-5Y hücre canlılığına etkisinin MTT hücre canlılık testi ile değerlendirilmesi

4.1.2. 3-Hidroksibütirat Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi

3-OHB'ın SH SY-5Y hücreleri üzerindeki etkisini araştırmak için, farklı 3-OHB konsantrasyonları (0.1, 0.25, 0.5, 1, 4, 8 ve 10 mM), farklı inkübasyon sürelerinde (24, 48 ve 72 saat) ve ayrıca 2 farklı glukoz içeriği olan (17.5 ve 5 mM) büyüme ortamı kullanıldığında uygulandı. MTT testi kullanarak, her set kendi kontrolüne göre hücre canlılığın yüzdesi hesaplandı. Sonuçlar şekil 15 ve 16'te görülmektedir.



Şekil 15: 17.5 mM glukoz içeren büyüme ortamı ile idame ettirilen SH SY-5Y hücrelerinde 24,48 ve 72 saat 3-OHB uygulamasının doza bağlı etkilerinin MTT hücre canlılık testi ile değerlendirilmesi (* İstatistiksel anlamlı fark, $p < 0.05$)



Şekil 16: 5 mM glukoz içeren büyüme ortamı ile idame ettirilen SH SY-5Y hücrelerinde 24,48 ve 72 saat 3-OHB uygulamasının doza bağlı etkilerinin MTT hücre canlılık testi ile değerlendirilmesi

Kandaki toplam keton cisimlerinin konsantrasyonu normalde 0.2 mM'ı geçmemekle birlikte [57] fizyolojik ketozis durumunda kan 3-OHB konsantrasyonunun 1-8 mM arasında olduğu literatürde belirtilmektedir. Bizim çalışmamızda da ≤ 0.5 mM 3-OHB uygulamasının her iki glukoz konsantrasyonu ve her üç inkübasyon süresinde de hücre canlılığını anlamlı değiştirmedeği izlendi. Benzer sonuçlar 1 mM 3-OHB uygulaması ile normoglisemik koşulda her 3 inkübasyon süresinde ve hiperglisemik koşulda sadece 72 saatlik inkübasyon süresinde elde edildi.

Bunun yanında 4 mM 3-OHB uygulaması sonrası normoglisemik koşulda hücre canlılığı anlamlı değişiklik göstermez iken, hiperglisemik koşulda inkübasyon süresine bağlı olarak (24. ve 48. saatlerde) anlamlı azalma izlendi ($p < 0.05$).

Ayrıca 8 mM ve 10 mM 3-OHB uygulaması sonrası normoglisemik koşulda hücre canlılığında anlamlı değişiklik görülmezken, hiperglisemik koşulda ise inkübasyon süresinden bağımsız olarak tüm zaman dilimlerinde anlamlı azalma izlendi ($p < 0.05$).

Sonuç olarak bu ön deneylerden elde edilen veriler ile 3-OHB konsantrasyonu, 1 mM ve 4 mM, ve uygulama süresi 72 saat olacak şekilde belirlenmiş oldu.

4.2. Ana Çalışmalara Ait Bulgular

Ana çalışmaların tamamı hücre büyüme ortamında 3 farklı glukoz konsantrasyonu (17.5 mM, 5 mM ve 1 mM) varlığında gerçekleştirildi. Ön çalışmalar ile karar verilen 1 mM ve 4 mM 3-OHB ile hücrelerin ön muamelesi ardından 24 saat 200 μ M H_2O_2 'ye maruz bırakılmasından sonra hücre canlılıkları, mitokondriyal bir enzim olan P450_{scc} düzeyi ve DHEA, DHEAS düzey değişikliklerine etkileri değerlendirildi.

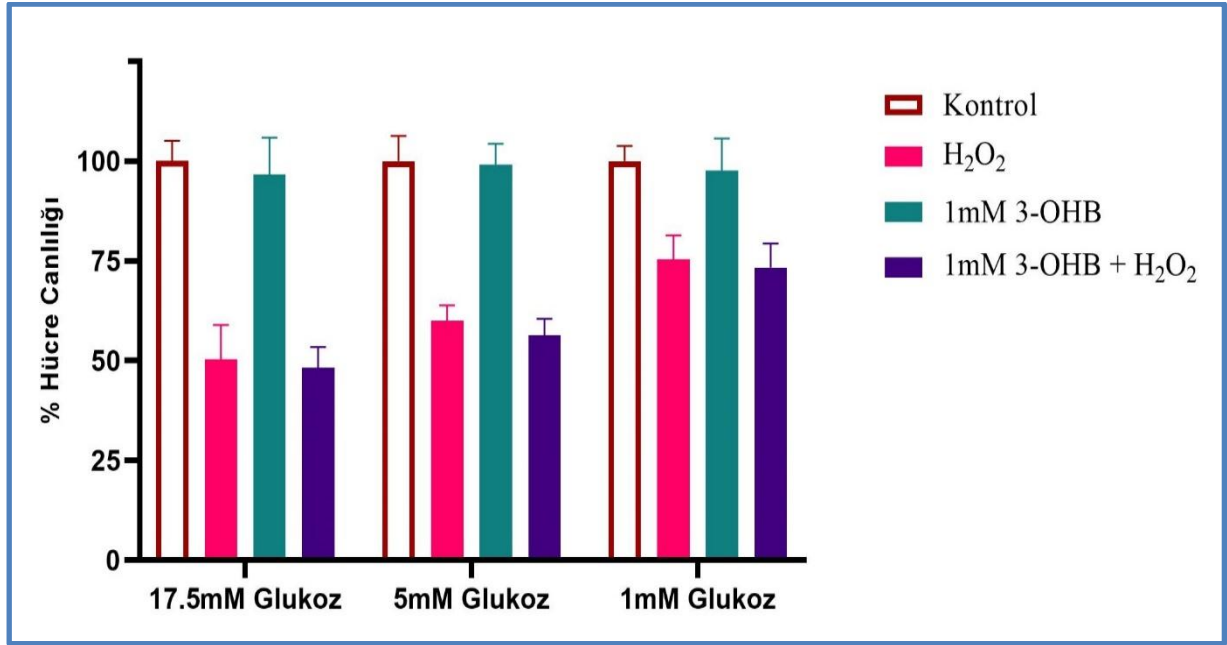
4.2.1. 3-Hidroksibütirat + Hidrojen Peroksit Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi

SH SY-5Y hücrelerine H_2O_2 uygulamasından önce 1 mM ve 4 mM 3-OHB 48 saat süre ile muamele edildikten sonra 200 μ M H_2O_2 24 saat süre ile uygulandı ve şekil 17a ve b 'de gösterilen hücre canlılık testi sonuçları elde edildi.

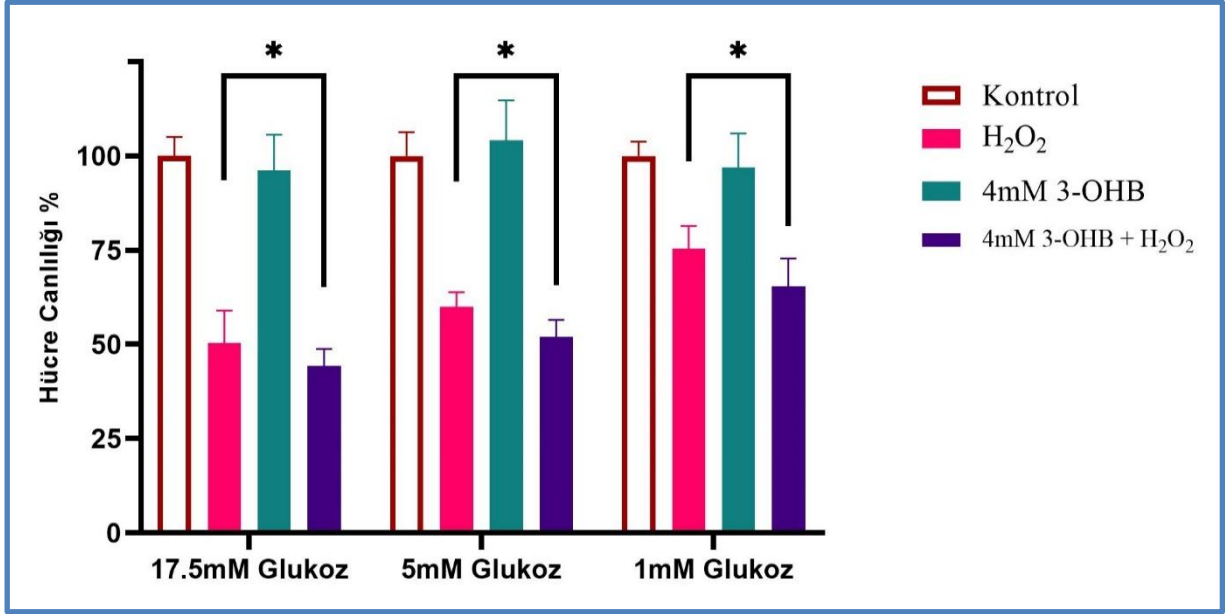
H_2O_2 uygulanan hücre grubuna 1 mM 3-OHB ön uygulamasının yapılması, sadece 24 saat boyunca H_2O_2 'ye maruz kalmış hücreler ile kıyaslandığında hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir artışa yol açmamıştır (Şekil 17a), Hatta 4 mM 3-OHB ile ön muamelenin

ise, tüm gruplarda (17.5 mM, 5 mM ve 1 mM glukoz konsantrasyonu varlığında) H_2O_2 uygulanan hücre grubuna göre hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olduğu gösterilmiştir ($p<0.05$) (Şekil 17b).

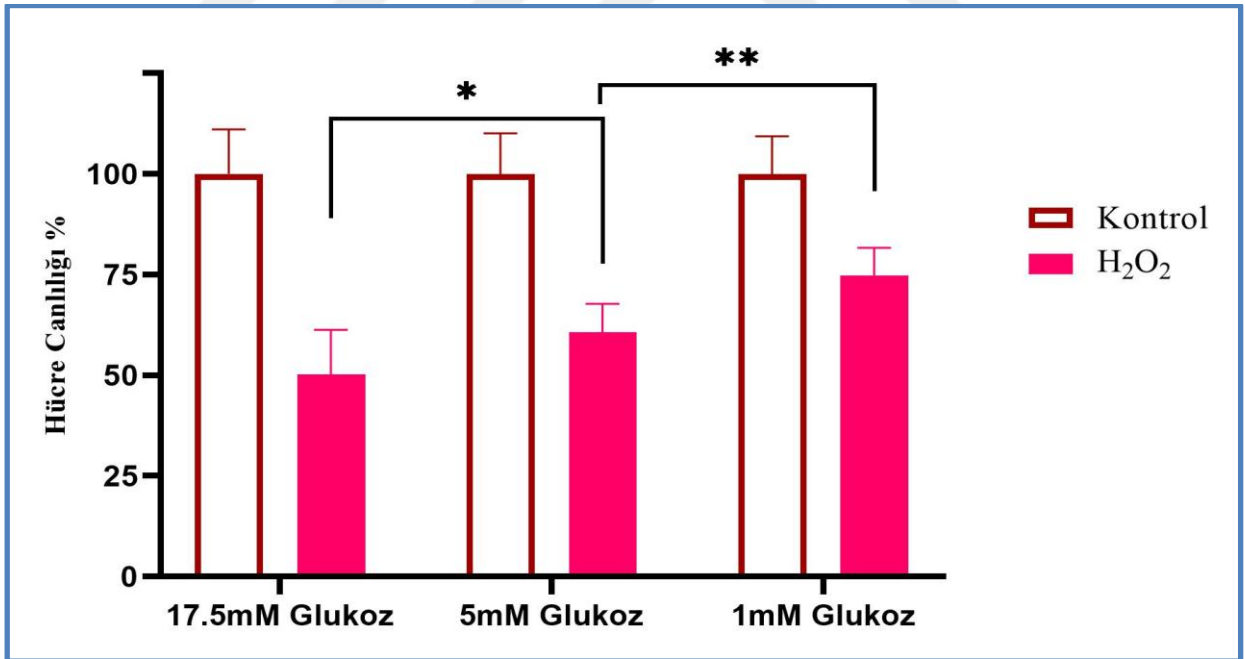
Bununla birlikte ilginç olarak, hücre kültür ortamları daha yüksek glukoz konsantrasyonu içerdiğinde hücrelerin H_2O_2 'ye daha duyarlı hale geldiği ve aynı doz ve sürede H_2O_2 uygulanmış olmasına rağmen glukoz konsantrasyonuna bağlı bir şekilde anlamlı toksisite artışının olduğu izlendi ($p<0.05$) (Şekil 17c)



Şekil 17a: 24 saat boyunca H_2O_2 'ye maruz kalan hücrelerin canlılığı üzerinde 48 saatlik 1 mM 3-OHB ön uygulamanın etkisi



Şekil 17b: 24 saat boyunca H₂O₂'ye maruz kalan hücrelerin canlılığı üzerinde 48 saatlik 4 mM 3-OHB ön uygulamanın etkisi(* İstatistiksel anlamlı fark, p<0.05)

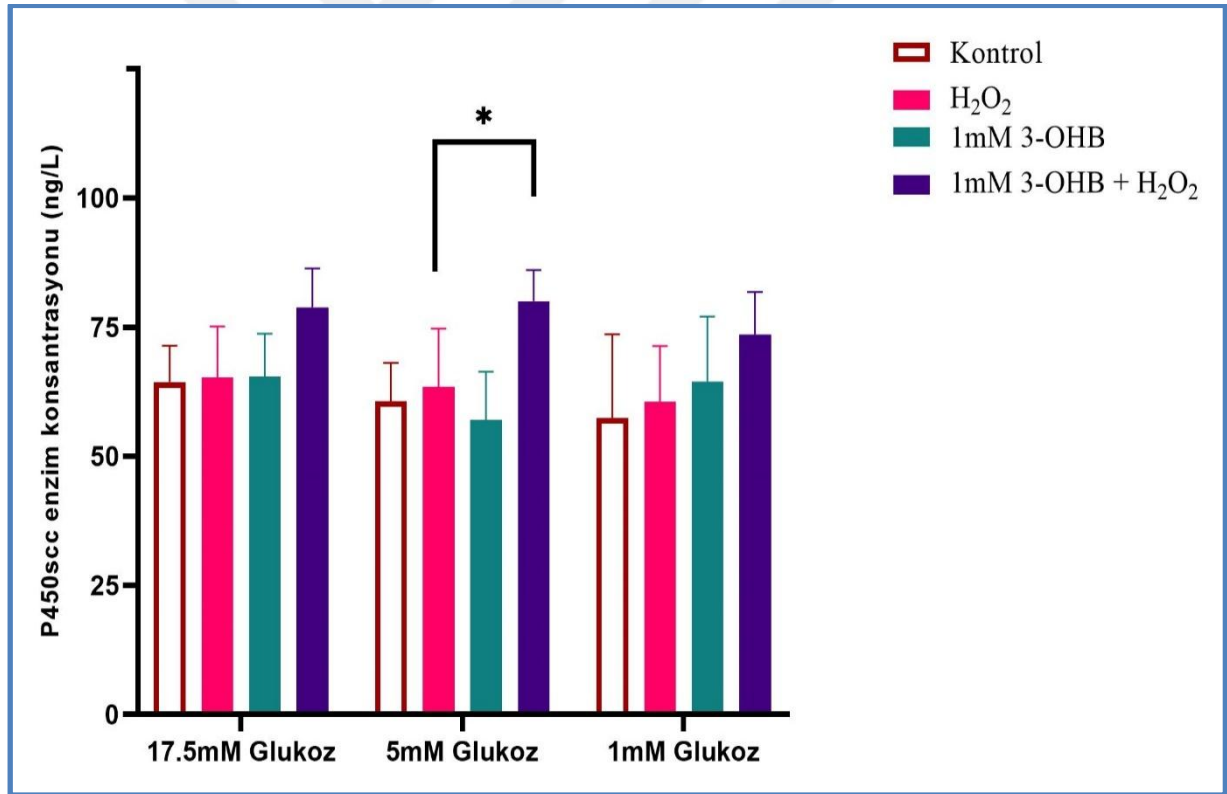


Şekil 17c: Farklı glukoz konsantrasyonu içeren büyüme ortamı ile idame ettirilen SH-SY-5Y hücrelerinde 24 saat H₂O₂ uygulamasının hücre canlılığına etkisinin MTT hücre canlılık testi ile değerlendirilmesi(* İstatistiksel anlamlı fark, p<0.05, ** İstatistiksel anlamlı fark, p<0.01)

4.2.2. 3-Hidroksibütirat + Hidrojen Peroksit Uygulamasının Hücre P450scc Enzim Düzeylerine Etkisi

Üç farklı glukoz konsantrasyonu varlığında, SH SY-5Y hücrelerinin tek başına H_2O_2 , tek başına 3-OHB'a ve hücrelerin 1 mM 3-OHB ile ön uygulaması ve ardından 24 saat 200 μM H_2O_2 'ye maruz bırakılmasından sonra P450scc enzim düzeylerinin sonuçları şekil 18'de gösterilmektedir.

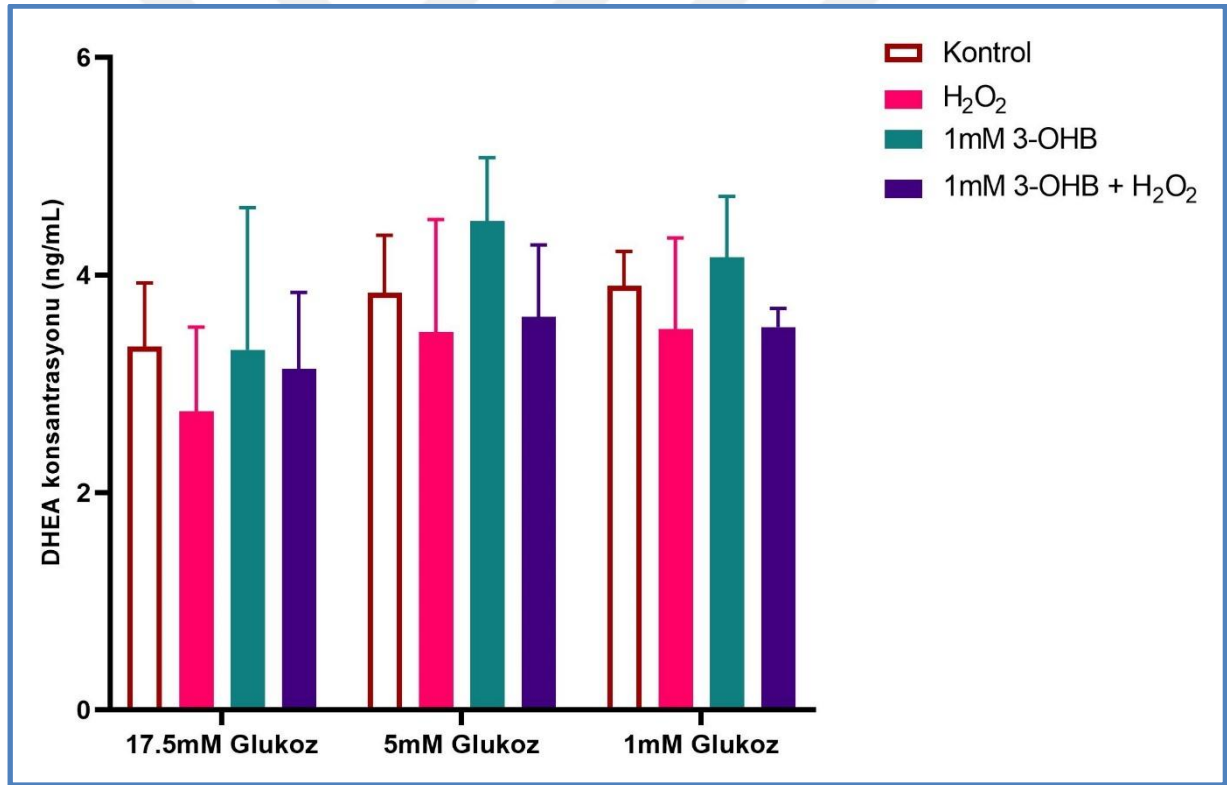
Hücrelerinin tek başına H_2O_2 veya tek başına 1 mM 3-OHB'a maruz bırakılması kontrol grubu ile kıyaslandığında P450scc enzim konsantrasyonları açısından herhangi bir anlamlı değişiklik yaratmadı. 1 mM 3-OHB ile hücrelerin ön muamelesi, sadece H_2O_2 uygulanan hücre gruplarına göre 3 glukoz koşulunda da P450scc enzim seviyelerinde bir artışa neden oldu. Ancak bu artış sadece 5 mM glukoz içeren hücre kültür ortamının kullanıldığı deney setinde istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$).



Şekil 18: 24 saat boyunca H_2O_2 'ye maruz kalan hücrelerin P450scc enzim seviyeleri üzerinde 48 saatlik 3-OHB ön uygulamanın etkisi (* İstatistiksel anlamlı fark, $p < 0.05$)

4.2.3. 3-Hidroksibütirat + Hidrojen Peroksit Uygulamasının Hücre DHEA Düzeylerine Etkisi

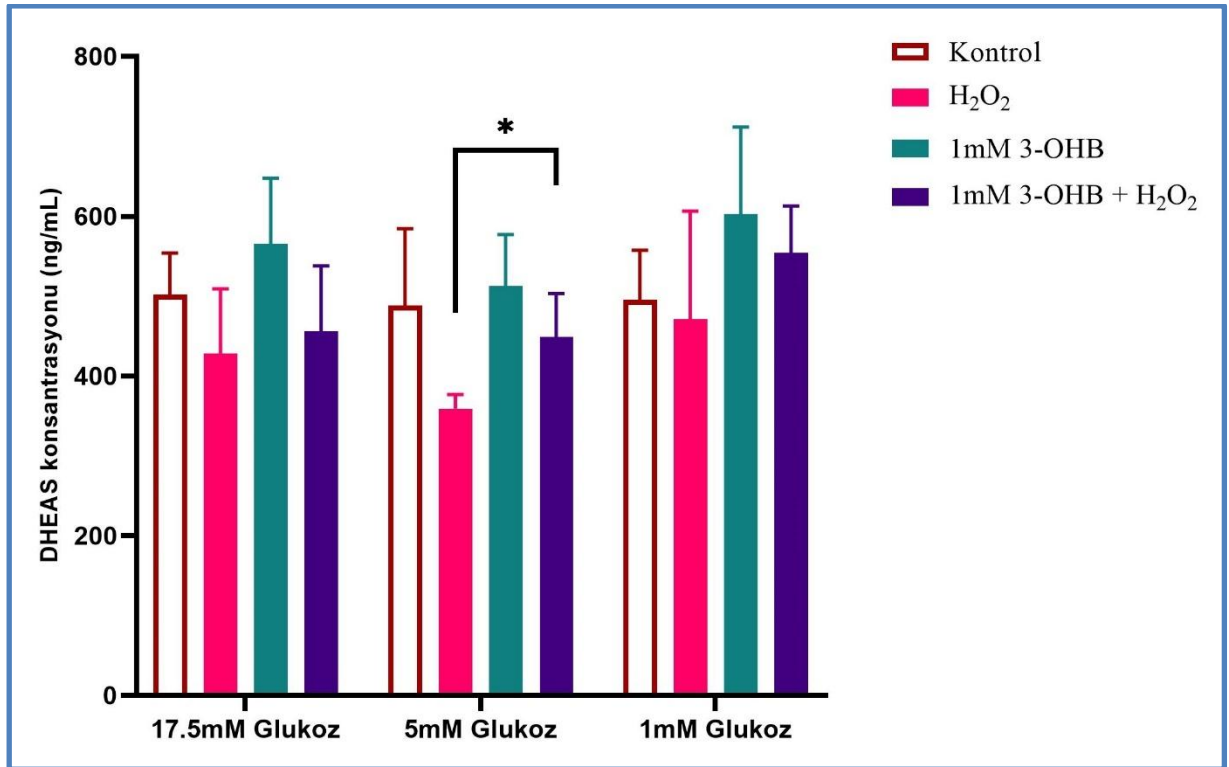
SH SY-5Y hücrelerine H_2O_2 , 3-OHB ve bunların kombinasyonunun uygulanması durumunda DHEA düzeylerindeki değişim şekil 19'da gösterilmektedir. Tüm gruplar 3 farklı glukoz konsantrasyonu varlığında tekrarlanmış olup, sadece H_2O_2 uygulanan grupta kontrole kıyasla DHEA düzeylerinin azaldığı, 1 mM 3-OHB uygulanan grupta ise hem kontrole göre hem de H_2O_2 uygulanan gruba göre DHEA düzeylerinin arttığı gözlemlendi. Hücrelerin 1 mM 3-OHB ile ön uygulaması ve ardından 24 saat 200 μM H_2O_2 'ye maruz bırakılmasından sonra DHEA düzeyleri sadece H_2O_2 uygulanan gruba kıyasla her 3 glukoz koşulunda da artmış bulundu. Ancak gruplar arasında ortaya çıkan bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı değildi.



Şekil 19: 24 saat boyunca H_2O_2 'ye maruz kalan hücrelerin DHEA seviyeleri üzerinde 48 saatlik 3-OHB ön uygulamanın etkisi

4.2.4. 3-Hidroksibütirat + Hidrojen Peroksit Uygulamasının Hücre DHEAS Düzeylerine Etkisi

Üç Farklı glukoz konsantrasyonu (17.5, 5 ve 1 mM) varlığında, hücrelerin 1 mM 3-OHB ile ön uygulaması ve ardından 24 saat 200 μ M H_2O_2 'ye maruz bırakılmasından sonra DHEAS düzeylerinin sonuçları şekil 19'de gösterilmektedir. 1 mM 3-OHB ile hücrelerin ön uygulaması, kontrollere kıyasla 3 glukoz koşulunun hepsinde DHEAS seviyelerinde bir artışa neden oldu. Ancak bu artış sadece 5 mM glukoz koşulunda istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$).



Şekil 20: 24 saat boyunca H_2O_2 'ye maruz kalan hücrelerin DHEAS seviyeleri üzerinde 48 saatlik 3-OHB ön uygulamanın etkisi (* İstatistiksel anlamlı fark, $p<0.05$)

5. TARTIŞMA

Bu çalışma ile 3-OHB uygulamasının nöronal hücrelerde oluşturulan H_2O_2 toksisitesinde hücre canlılığı üzerine nöroprotektif etkilerinin konsantrasyon ve zaman bağımlı olarak belirlenmesi hedeflenmiştir. Bunun yanı sıra 3-OHB'ın ön tedavisinin steroid hormon sentezinde hız kısıtlayıcı enzim olan sitokrom P450 kolesterol yan zincir koparıcı (P450scc) enzim düzeyi ve kognitif fonksiyonlar üzerine olumlu etkileri olduğu bilinen nöronal steroidlerden DHEA ve DHEAS konsantrasyonlarına etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Oksidatif stresin, yaşlanma [18] ve özellikle de AH olmak üzere birçok nörodejeneratif hastalığın patogeneğinde önemli bir rol oynadığı ileri sürülmektedir [19][26]. Yaşlanma ile ilgili teorilerinin çoğunun merkezinde kümülatif oksidatif stresin mitokondriyal mutasyonlara, mitokondriyal disfonksiyona ve oksidatif hasara yol açtığı düşüncesi ön plandayken, nörodejeneratif hastalıklarda oksidatif stresin kesin rolü hakkındaki araştırmalar henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Oksidatif hasarın nörodejeneratif hastalıkların bir nedeni mi yoksa bir sonucu mu olduğu ve neden bu tür hastalıklarda antioksidan tedavi kullanımının büyük ölçüde başarısız olduğu halen yanıtlanamamış önemli sorular olarak karşımıza çıkmaktadır.[90][91].

Çalışmamızda *in vitro* nörotoksisite modeli oluşturmak için düşük konsantrasyonlarda hücre sinyalleşmesinde önemli rollere sahip olan ancak daha yüksek konsantrasyonlarda oksidatif hasara neden olan radikal olmayan reaktif oksijen türlerinden biri olan H_2O_2 kullanıldı [92]. Yapılan literatür taramasında H_2O_2 , değişik konsantrasyon ve uygulama sürelerinde, oksidatif strese karşı nöroprotektif etkinin araştırıldığı pek çok farklı çalışmada oksidan ajan olarak kullanılmıştır. İsmail ve arkadaşları, bizim çalışmamızda olduğu gibi SH-SY5Y hücreleri kullanarak, çimlenmiş kahverengi pirinç, kahverengi pirinç ve ticari olarak satın alınan γ -aminobutirik asidin (GABA) nöroprotektif etkilerini araştırdıkları çalışmalarında SH-SY5Y hücrelerini 24 saat boyunca 250 μM H_2O_2 'ye maruz bırakmışlardır ve MTT hücre canlılık testi ile SH-SY5Y hücrelerinin %50'sinde canlılığının azaldığını göstermişlerdir [93]. Hanafy ve arkadaşları ise H_2O_2 'yi 90 dakika boyunca 500 μM konsantrasyonda kullanarak mentha türlerinin nöroprotektif etkilerini araştırdıkları çalışmalarında benzer sonuçlar elde etmişlerdir [94]. Biz de çalışmamızda SH-SY5Y hücrelerinde 24 saat içinde yaklaşık % 50 hücre ölümüne neden olan H_2O_2 dozunun 200 μM (44.23 ± 5.585) olduğunu belirledik ve deneylerimize bu H_2O_2 konsantrasyonu ile devam etmeye karar verdik. Ancak bunun yanında ilginç olarak, kültür ortamı glukoz

konsantrasyonu yükseldikçe SH SY-5Y hücrelerinin H_2O_2 'ye daha duyarlı hale geldiğini, aynı doz ve sürede H_2O_2 uygulanmasına rağmen glukoz konsantrasyonuna bağlı bir şekilde anlamlı toksisite artışının olduğunu göstermiş olduk. Bu veri, nörodejeneratif hastalıkların diyabet ile sıkça vurgulanan ilişkisini destekler niteliktedir.

AH'nda, presemptomatik beyin glukoz hipometabolizması gibi metabolizma değişikliklerine dair birçok kanıtın bulunması [53], glukoz dışında keton cisimleri gibi alternatif enerji kaynaklarının rolünün araştırılmasına olan ilginin artmasına neden olmuştur. Keton cisimlerinin, glukoz yanı sıra enerji kaynağı olarak nöronal hücreler tarafından kullanılmasına ek olarak, AH'nda bulunan mitokondriyal disfonksiyonu da mitokondriyal aktiviteyi arttırarak düzeltebildikleri ileri sürülmektedir [95].

Çalışmamızda kanda en bol miktarda bulunan keton cismi olan 3-OHB kullanıldı. Taranan literatüre göre, dışarıdan 3-OHB uygulamasının, farklı dozlarda ve uygulama sürelerinde birçok *in vitro* nörodejenerasyon modelinde sıkça kullanılmakta olduğu izlendi. Örneğin, *in vitro* olarak 3-OHB'ın A β uygulanan fare primer hipokampal hücreleri üzerine nöroprotektif etkilerini araştırmak amacıyla, Kashiwaya ve arkadaşları, A β uygulanmadan önce 12 saat boyunca 4 mM 3-OHB ile hücreleri ön işleme maruz bırakmışlar ve A β 'ye maruz kalan hücrelere 3-OHB uygulamasının, sadece A β uygulanan gruba kıyasla hücre sayısını arttırdığını bulmuşlardır [96]. PC-12 hücrelerinin kullanıldığı başka bir *in vitro* çalışmada da, Xie ve arkadaşları, A β uygulaması öncesi farklı konsantrasyonlarda (1, 2 ve 4 mM) 3-OHB ile 24 saat inkübe edilen hücrelerde 3-OHB ön uygulamasının, konsantrasyona bağlı bir şekilde A β kaynaklı hücre ölümüne karşı hücreleri koruduğunu bulmuşlardır [97]. Klein ve arkadaşları, SH-SY5Y hücrelerinin 48 saat boyunca 1mM 3-OHB'ye maruz bırakılmasının, hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı artışa neden olduğunu göstermişlerdir [98]

Bizim çalışmamızda farklı inkübasyon süreleri (24, 48 ve 72 saat) için farklı 3-OHB konsantrasyonları (0.1, 0.25, 0.5, 1, 4, 8 ve 10 mM) kullanıldı. Bununla birlikte, hücrelerin enerji kaynağı olarak ketonu tercih edip etmeyeceğini belirleyecek olan büyüme ortamı glukoz konsantrasyonundaki değişimin etkileri de değerlendirildi. Hücre kültürü çalışmaları sırasında normal koşullarda, SH-SY5Y hücrelerinin idamesinde DMEM-F12 büyüme ortamı kullanılmaktadır. Ticari olarak satın alınan DMEM-F12 büyüme ortamının glukoz içeriği 17.5 mM olup bu da fizyolojik hiperglisemiye eşdeğerdir. *In vitro* çalışmamızı *in vivo* koşullara mümkün olduğunca yakın hale getirmek amacı ile 5 mM glukoz (fizyolojik normoglisemiye

eşdeğer [7]) içeren ortamı da kullanmaya karar vererek tüm deneyler 5 mM glukoz içeren DMEM-F12'li ortamda tekrarlandı. Hücre canlılık testi sonuçlarımıza göre, SH-SY5Y hücrelerine farklı konsantrasyonda 3-OHB uygulanması, hem 17.5 mM hem de 5mM glukoz varlığında hücre canlılıklarında (kontrole kıyasla) istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olmamıştır. Elde ettiğimiz veriler yukarıdaki literatür bulgularını birebir destekler nitelikte olmamasına rağmen farklı glukoz konsantrasyonlarında, 7 farklı 3-OHB konsantrasyonunu ve farklı inkübasyon sürelerini aynı anda araştıran ilk çalışma olma niteliğindedir.

Aynı zamanda 17.5mM glukoz içeren koşullarda yapılan 8 ve 10 mM 3-OHB ile gözlenen hücre canlılıklarındaki istatistiksel olarak azalmanın enerji kaynağı olarak halen glukozun tercih edilmesi ve glukozun kullanımı nedeniyle ortamda kalan ketondan kaynaklı ortam pH sınırın azalması nedeniyle olabileceği düşünüldü. Ortam pH'sını dengeleyecek HEPES içeren hücre kültür ortamı ile deneyler tekrarlanmasına rağmen anlamlı bir değişiklik sağlanamadı ve hiperglisemik koşuldaki bu canlılık azalmasının sebebi net olarak ortaya konamadı.

Çalışmamızda, hücreleri H_2O_2 'ye maruz bırakmadan 48 saat önce uygulanan 3-OHB'ın potansiyel nöroprotektif etkisini de değerlendirdik. Bu etkiyi MTT hücre canlılık testi yaparak belirlemeye çalıştık. 1 mM 3-OHB ile ön uygulama yapılmış ve sonrasında H_2O_2 verilmiş gruptaki hücrelerde, sadece H_2O_2 uygulanan gruba göre, hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmadığı izlendi. Bununla birlikte, 4 mM 3-OHB ile muamele edilmiş hücrelerde, sadece H_2O_2 uygulanan gruba göre, hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu bulunmuştur Kashiwaya ve arkadaşları [96] ile Xie ve arkadaşlarının [97] yaptıkları iki farklı çalışmada $A\beta$ uygulaması öncesi 3-OHB ile ön muamele edilen hücrelerde bizim sonuçlarımızın aksine 3-OHB'ın hücre ölümüne karşı hücreleri koruduğu bulunmuştur. Şu ana kadar yaptığımız literatür araştırmasına göre SH-SY5Y hücrelerinde keton cisimleri ile birlikte H_2O_2 'nin kombine uygulanmasının hücre canlılığı üzerine etkisini araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak PC-12 hücrelerinde Cheng ve arkadaşları, 3-OHB ile ön uygulamanın, H_2O_2 'nin neden olduğu hücre canlılığının azalmasını engellediğini bulmuşlardır [99].

Ayrıca farklı çalışmalarda keton cisimlerinin AH biyobelirteç profilini iyileştirdiği ileri sürüldüğünden [65] ve oksidatif hasara karşı 3-OHB'inin SH-SY5Y üzerindeki potansiyel nöroprotektif etkisini daha ileri düzeyde araştırmak için 3-OHB uygulamasının P450sc

enzimi, DHEA ve DHEAS konsantrasyonları üzerine etkisini değerlendirdik ve bu anlamda yapılmış olan ilk çalışma olduğunu düşünmekteyiz.

P450scc, nörosteroid sentezindeki ilk hız kısıtlayıcı enzim iken [70] DHEA ve DHEAS dolaşımında en bol miktarda bulunan nörosteroidlerdir H_2O_2 'den önce 1mM 3-OHB ile ön muamelenin, 3 farklı glukoz konsantrasyonu varlığında (17.5mM, 5mM ve 1mM), H_2O_2 uygulanan gruba kıyasla, P450scc enzim seviyelerinde bir artışa sebep olduğunu, ancak bu artışın sadece 5mM glukoz varlığında istatistiksel olarak anlamlı olduğunu belirledik ($p<0.05$). 1mM 3-OHB ile ön tedavinin, üç glukoz konsantrasyonu koşulunda da sadece H_2O_2 uygulanmış gruba göre, DHEA seviyelerinde bir artışa neden olduğu ancak bu artışların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı izlendi. Öte yandan, 1mM 3-OHB ile ön tedavi DHEAS seviyelerini tüm glukoz koşullarında arttırdı, ancak, p450scc gibi, bu artış sadece 5mM glukoz varlığında istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$). DHEA düzeyindeki artışın anlamlı olmayıp sadece DHEAS artışının istatistiksel olarak anlamlı düzeylere ulaşmasının olası bir nedeni, DHEAS'nın sadece DHEA'ya geri dönüştürülebilir olması, DHEA'nın ise 3 β -HSD enzimi yardımıyla diğer steroidlere de dönüştürülebilmesidir (Şekil 8).

Oluşturduğumuz H_2O_2 toksisite modelinde, 1 mM 3-OHB ön uygulaması P450scc enzimi, DHEA ve DHEAS düzeylerini arttırırken, hücre canlılığı üzerinde böylesi bir beklenen artış göstermemiştir. Ancak bu sonuç, elde ettiğimiz nörosteroid seviyelerindeki artışın hücre sayısındaki bir artışla bağlantılı değil de, mitokondriyal sentez fonksiyonlarındaki bir artışla ilgili olduğunu daha güçlü bir şekilde düşündürmektedir.

Son yıllarda, birçok çalışma oksidatif stres, mitokondriyal fonksiyon ve nörodejenerasyon arasındaki ilişkiyi anlamaya odaklanmıştır. MitoQ ile yapılan in vivo çalışmalar umut verici sonuçlar doğururken [100], hafif bilişsel bozukluk hastalarında dışarıdan MitoQ takviyesinin serebrovasküler oksijenasyon üzerindeki etkilerini inceleyen klinik bir çalışma halen devam etmekte olup tahminen 2021 Ekim ayında sonlandırılacaktır [101].

Çalışmamız H_2O_2 'e maruz bırakılan nöronal karakterli hücrelerde 3-OHB uygulaması ile glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak nörosteroid sentezinin hız kısıtlayıcı enzimi olan P450scc enzim seviyesinin ve kognitif fonksiyon üzerinde önemli etkileri olan DHEA, DHEAS düzeylerinin artışının belirlendiği, H_2O_2 toksisitesi durumunda 3-OHB'nın olası

etkilerini nörosteroid sentezini tetikleyerek gerçekleştirdiğini gösteren ilk *in vitro* çalışma niteliğindedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular ışığında sonuçlarımız;

- SH SY-5Y hücrelerinde 24 saat içinde yaklaşık %50 hücre ölümüne neden olan H_2O_2 dozları belirlendi. 150 μM ve 200 μM H_2O_2 uygulaması sonrası % canlılık oranları sırası ile 53.35 ± 4.532 ve 44.23 ± 5.585 olarak bulunduğundan daha sonraki deneylere 200 μM H_2O_2 konsantrasyonu ile devam etmeye karar verildi.
- Farklı inkübasyon süreleri (24, 48 ve 72 saat) için farklı 3-OHB konsantrasyonları (0.1, 0.25, 0.5, 1, 4, 8 ve 10 mM) kullanıldı. Bununla birlikte, hücrelerin enerji kaynağı olarak ketonu tercih edip etmeyeceğini belirleyecek olan büyüme ortamı glukoz konsantrasyonundaki değişimin etkilerini değerlendirmek için içeriğinde hiç glukoz içermeyen DMEM-F12 büyüme ortamına dışarıdan son konsantrasyon 1 mM, 5 mM ve 17.5 mM glukoz olacak şekilde büyüme ortamları hazırlanarak deneyler yapıldı. 17.5 mM (hiperglisemiye eşdeğer), *in vitro* çalışmamızı *in vivo* koşullara mümkün olduğunca yakın hale getirmek amacı ile 5 mM glukoz (fizyolojik normoglisemiye eşdeğer) ve hipoglisemiyi yansıtmaması açısından 1 mM glukoz içeren ortamlar kullanıldı.
- 5 mM ve 17.5 mM'lık glukoz konsantrasyonunda, hücre canlılığı üzerine olumsuz etkisi olmayan 3-OHB konsantrasyonları (1 mM ve 4 mM) ve tedavi süresi (72 saat boyunca inkübasyon) belirlendi.
- 48 saatlik 1 mM ve 4 mM 3-OHB ön uygulaması sonrası 24 saat boyunca H_2O_2 'ye maruz bırakılan hücrelerin canlılığı artmadı. 3-OHB'a bağlı beklenen hücre canlılığını arttırıcı bir etki gözlenememiş oldu.
- 3-OHB'ın P450scc enzimi, DHEA ve DHEAS konsantrasyonları üzerine etkisini değerlendirdik. H_2O_2 'den önce 1 mM 3-OHB ile ön-uygulamanın, 3 farklı glukoz konsantrasyonunda da H_2O_2 uygulanan gruba kıyasla, P450scc enzim seviyelerinde bir artışa sebep olduğunu ve bu artışın sadece 5 mM glukoz varlığında istatistiksel olarak anlamlı olduğunu izledik.

Aynı şekilde DHEA seviyelerinde de bir artış izlendi ancak bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Öte yandan, 1 mM 3-OHB ile ön tedavi DHEAS seviyelerini tüm glukoz

koşullarında arttırdı, ancak, p450scc gibi, bu artış sadece 5 mM glukoz varlığında istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$).

Çalışmamızda 3-OHB ile direkt hücre canlılığında olumlu bir etki gösterilmemiş olmasına rağmen, 3-OHB'nin nörosteroid sentezini tetikleyerek nöronal etkilerini gerçekleştirdiğini gösteren ilk in vitro çalışma olması açısından literatüre büyük bir katkı sağlayacağını düşünmekteyiz. Keton cisimleri ve nöronal steroid yapıları hormonların ilişkisi nörodejeneratif değişikliklerin önlenmesi ve nörodejeneratif hastalıkların oluşum mekanizmalarının anlaşılmasında önemli ip uçları oluşturacaktır.

Öneriler:

- Mitokondri fonksiyonunu değerlendiren başka bir test daha yapılmalıdır.
- DHEA ve DHEAS düzeylerinin yanı sıra diğer nörosteroidlerin düzeylerinin de ölçülmesi ve hatta daha duyarlı bir yöntem ile analizlerin gerçekleştirilmesi uygundur.
- DHEA'dan DHEAS oluşumunda görevli sülfotransferaz enzim düzeyi ölçülmelidir.
- Asetoasetat ve/veya 3-OHB kombinasyonunun etkisini değerlendirmek sadece 3-OHB'nin etkisi değerlendirmekten fizyolojik koşulları daha net yansıtması açısından daha uygun olacaktır.
- AH multifaktöriyel bir hastalık olduğu için toksisite yaratan başka maddeler ($A\beta$ fragmanları ve tau gibi) ve kombinasyonlarını kullanarak daha kapsamlı hücre kültürü modelleri yapılmalıdır.

7. KAYNAKLAR

- [1] “2019 Alzheimer’s disease facts and figures,” *Alzheimer’s Dement.*, vol. 15, no. 3, pp. 321–387, 2019.
- [2] A. Sanabria-Castro, I. Alvarado-Echeverría, and C. Monge-Bonilla, “Molecular pathogenesis of alzheimer’s disease: An update,” *Ann. Neurosci.*, vol. 24, no. 1, pp. 46–54, 2017.
- [3] R. Albertoboveris and J. J. Poderoso, *Advances in Biochemistry in Health and Disease Biochemistry of Oxidative Stress Physiopathology and Clinical Aspects*. 2016.
- [4] L. Zhang, A. Reyes, and X. Wang, “The role of mitochondria-targeted antioxidant MitoQ in neurodegenerative disease,” *Mol. Cell. Ther.*, vol. 6, no. 1, 2018.
- [5] D. A. J. E. Lambrechts, R. J. A. de Kinderen, J. S. H. Vles, A. J. A. de Louw, A. P. Aldenkamp, and H. J. M. Majoie, “A randomized controlled trial of the ketogenic diet in refractory childhood epilepsy,” *Acta Neurol. Scand.*, vol. 135, no. 2, pp. 231–239, 2017.
- [6] P. Peng *et al.*, “Ketogenic diet as a treatment for super-refractory status epilepticus in febrile infection-related epilepsy syndrome,” *Front. Neurol.*, vol. 10, no. APR, 2019.
- [7] K. Marosi *et al.*, “3-Hydroxybutyrate regulates energy metabolism and induces BDNF expression in cerebral cortical neurons,” *J. Neurochem.*, vol. 139, no. 5, pp. 769–781, 2016.
- [8] S. T. Henderson, J. L. Vogel, L. J. Barr, F. Garvin, J. J. Jones, and L. C. Costantini, “Study of the ketogenic agent AC-1202 in mild to moderate Alzheimer’s disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial,” *Nutr. Metab. (Lond.)*, vol. 6, no. 1, p. 31, 2009.
- [9] M. K. Taylor, D. K. Sullivan, J. D. Mahnken, J. M. Burns, and R. H. Swerdlow, “Feasibility and efficacy data from a ketogenic diet intervention in Alzheimer’s disease,” *Alzheimer’s Dement. Transl. Res. Clin. Interv.*, vol. 4, pp. 28–36, 2018.
- [10] R. Krikorian, M. D. Shidler, K. Dangelo, S. C. Couch, S. C. Benoit, and D. J. Clegg, “Dietary ketosis enhances memory in mild cognitive impairment,” *Neurobiol. Aging*, vol. 33, no. 2, pp. 425.e19-425.e27, 2012.
- [11] I. Van Der Auwera, S. Wera, F. Van Leuven, and S. T. Henderson, “A ketogenic diet reduces amyloid beta 40 and 42 in a mouse model of Alzheimer’s disease,” *Nutr. Metab.*, vol. 2, pp. 1–8, 2005.
- [12] Ş. Kartalci and E. Eşel, “Nörosteroidler: Psikofarmakolojik ve davranışsal etkileri,” *Klin.*

Psikofarmakol. Bul., vol. 14, no. 1, pp. 38–49, 2004.

- [13] C. Cook and L. Petrucelli, “Oxidative stress,” *Park. Dis. Second Ed.*, pp. 559–582, 2012.
- [14] S. Di Meo, T. T. Reed, P. Venditti, and V. M. Victor, “Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions,” *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2016, 2016.
- [15] V. I. Lushchak, “Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification,” *Chem. Biol. Interact.*, vol. 224, no. October, pp. 164–175, 2014.
- [16] V. Rani and U. C. Singh Yadav, “Free radicals in human health and disease,” *Free Radicals Hum. Heal. Dis.*, pp. 1–430, 2015.
- [17] C. Cheignon, M. Tomas, D. Bonnefont-Rousselot, P. Faller, C. Hureau, and F. Collin, “Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer’s disease,” *Redox Biol.*, vol. 14, no. September 2017, pp. 450–464, 2018.
- [18] A. Bokov, A. Chaudhuri, and A. Richardson, “The role of oxidative damage and stress in aging,” *Mech. Ageing Dev.*, 2004.
- [19] R. Thanan *et al.*, “Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 1, pp. 193–217, 2014.
- [20] J. N. Cobley, M. L. Fiorello, and D. M. Bailey, “13 Reasons Why the Brain Is Susceptible To Oxidative Stress,” *Redox Biol.*, vol. 15, no. January, pp. 490–503, 2018.
- [21] E. Niedzielska *et al.*, “Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases,” *Mol. Neurobiol.*, vol. 53, no. 6, pp. 4094–4125, 2016.
- [22] L. Wang, X. Wang, and Q. Wang, “Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications,” *Biomed. Res.*, vol. 28, no. 8, pp. 3568–3573, 2017.
- [23] R. J. Castellani, G. Plascencia-Villa, and G. Perry, “The amyloid cascade and Alzheimer’s disease therapeutics: theory versus observation,” *Lab. Investig.*, vol. 99, no. 7, pp. 958–970, 2019.
- [24] L. A. Craig, N. S. Hong, and R. J. McDonald, “Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer’s disease,” *Neurosci. Biobehav. Rev.*, vol. 35, no. 6, pp. 1397–1409, 2011.

- [25] R. H. Swerdlow, J. M. Burns, and S. M. Khan, "The Alzheimer ' s Disease Mitochondrial Cascade Hypothesis EXISTING ALZHEIMER ' S DISEASE," *J. Alzheimers. Dis.*, vol. 20, no. Suppl 2, pp. S265--79, 2010.
- [26] D. Praticò, "Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease: a reappraisal," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 29, no. 12, pp. 609–615, 2008.
- [27] J. N. Keller *et al.*, "Evidence of increased oxidative damage in subjects with mild cognitive impairment," *Neurology*, vol. 64, no. 7, pp. 1152–1156, 2005.
- [28] J. Wang, S. Xiong, C. Xie, W. R. Markesbery, and M. A. Lovell, "Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in Alzheimer's disease," *J. Neurochem.*, vol. 93, no. 4, pp. 953–962, 2005.
- [29] M. A. Lovell, S. P. Gabbita, and W. R. Markesbery, "Increased DNA oxidation and decreased levels of repair products in Alzheimer's disease ventricular CSF," *J. Neurochem.*, vol. 72, no. 2, pp. 771–776, 1999.
- [30] D. L. Marcus *et al.*, "Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease," *Exp. Neurol.*, vol. 150, no. 1, pp. 40–44, 1998.
- [31] T. S. Kim *et al.*, "Decreased plasma antioxidants in patients with Alzheimer's disease," *Int. J. Geriatr. Psychiatry*, vol. 21, no. 4, pp. 344–348, 2006.
- [32] A. Moslemnezhad, S. Mahjoub, and M. Moghadasi, "Altered plasma marker of oxidative DNA damage and total antioxidant capacity in patients with Alzheimer's disease," *Casp. J. Intern. Med.*, vol. 7, no. 2, pp. 88–92, 2016.
- [33] Á. Casado, M. Encarnación López-Fernández, M. Concepción Casado, and R. De La Torre, "Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in vascular and alzheimer dementias," *Neurochem. Res.*, vol. 33, no. 3, pp. 450–458, 2008.
- [34] E. Tamagno *et al.*, "Oxidative stress activates a positive feedback between the γ - and β -secretase cleavages of the β -amyloid precursor protein," *J Neurochem*, vol. 104, no. 3, pp. 683–695, 2008.
- [35] S. Melov *et al.*, "Mitochondrial oxidative stress causes hyperphosphorylation of tau," *PLoS One*, vol. 2, no. 6, 2007.
- [36] K. Murakami *et al.*, "SOD1 (copper/zinc superoxide dismutase) deficiency drives amyloid β

- protein oligomerization and memory loss in mouse model of Alzheimer disease,” *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 52, pp. 44557–44568, 2011.
- [37] S. Arlt, T. Müller-Thomsen, U. Beisiegel, and A. Kontush, “Effect of one-year vitamin C-and E-supplementation on cerebrospinal fluid oxidation parameters and clinical course in alzheimer’s disease,” *Neurochem. Res.*, vol. 37, no. 12, pp. 2706–2714, 2012.
 - [38] M. W. Dysken *et al.*, “Effect of vitamin E and memantine on functional decline in Alzheimer disease: The TEAM-AD VA cooperative randomized trial,” *JAMA - J. Am. Med. Assoc.*, vol. 311, no. 1, pp. 33–44, 2014.
 - [39] P. Bubber, V. Haroutunian, G. Fisch, J. P. Blass, and G. E. Gibson, “Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: Mechanistic implications,” *Ann. Neurol.*, vol. 57, no. 5, pp. 695–703, 2005.
 - [40] M. Manczak, T. S. Anekonda, E. Henson, B. S. Park, J. Quinn, and P. H. Reddy, “Mitochondria are a direct site of A β accumulation in Alzheimer’s disease neurons: Implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 15, no. 9, pp. 1437–1449, 2006.
 - [41] J. X. Yin *et al.*, “Ketones block amyloid entry and improve cognition in an Alzheimer’s model,” *Neurobiol. Aging*, vol. 39, pp. 25–37, 2016.
 - [42] M. E. Watts, R. Pocock, and C. Claudianos, “Brain energy and oxygen metabolism: Emerging role in normal function and disease,” *Front. Mol. Neurosci.*, vol. 11, no. June, pp. 1–13, 2018.
 - [43] S. Camandola and M. P. Mattson, “Brain metabolism in health, aging, and neurodegeneration,” *EMBO J.*, vol. 36, no. 11, pp. 1474–1492, 2017.
 - [44] L. Szablewski, “Glucose Transporters in Brain: In Health and in Alzheimer’s Disease,” *J. Alzheimer’s Dis.*, vol. 55, no. 4, pp. 1307–1320, 2017.
 - [45] M. Bélanger, I. Allaman, and P. J. Magistretti, “Brain energy metabolism: Focus on Astrocyte-neuron metabolic cooperation,” *Cell Metab.*, vol. 14, no. 6, pp. 724–738, 2011.
 - [46] W. J. Jagust *et al.*, “Diminished glucose transport in alzheimer’s disease: Dynamic PET studies,” *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 11, no. 2, pp. 323–330, 1991.
 - [47] L. C. Costantini, L. J. Barr, J. L. Vogel, and S. T. Henderson, “Hypometabolism as a therapeutic target in Alzheimer’s disease,” *BMC Neurosci.*, vol. 9, no. SUPPL. 2, pp. 1–9,

2008.

- [48] L. Mosconi, A. Pupi, and M. J. De Leon, "Brain glucose hypometabolism and oxidative stress in preclinical Alzheimer's disease," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1147, pp. 180–195, 2008.
- [49] Y. An *et al.*, "Evidence for brain glucose dysregulation in Alzheimer's disease," *Alzheimer's Dement.*, vol. 14, no. 3, pp. 318–329, 2018.
- [50] R. Kandimalla, V. Thirumala, and P. H. Reddy, "Is Alzheimer's disease a Type 3 Diabetes? A critical appraisal," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1863, no. 5, pp. 1078–1089, 2017.
- [51] N. Abolhassani *et al.*, "Molecular pathophysiology of impaired glucose metabolism, mitochondrial dysfunction, and oxidative DNA damage in Alzheimer's disease brain," *Mech. Ageing Dev.*, vol. 161, pp. 95–104, 2017.
- [52] K. Talbot *et al.*, "Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients," *J. Clin. Invest.*, vol. 122, no. 4, pp. 1316–1338, 2012.
- [53] M. A. Daulatzai, "Cerebral hypoperfusion and glucose hypometabolism: Key pathophysiological modulators promote neurodegeneration, cognitive impairment, and Alzheimer's disease," *J. Neurosci. Res.*, vol. 95, no. 4, pp. 943–972, 2017.
- [54] V. J. Lowe *et al.*, "Association of hypometabolism and amyloid levels in aging , normal subjects," pp. 1959–1968, 2014.
- [55] E. Croteau *et al.*, "A cross-sectional comparison of brain glucose and ketone metabolism in cognitively healthy older adults, mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease," *Exp. Gerontol.*, vol. 107, pp. 18–26, 2018.
- [56] K. W. Lange *et al.*, "Ketogenic diets and Alzheimer's disease," *Food Sci. Hum. Wellness*, vol. 6, no. 1, pp. 1–9, 2017.
- [57] R. K. Murray, D. K. Granner, P. A. Mayes, and V. W. Rodwell, *Harper's Illustrated Biochemistry (31st Edition)*, vol. 32, no. 1. 2018.
- [58] K. W. Barañano and A. L. Hartman, "The ketogenic diet: Uses in epilepsy and other neurologic illnesses," *Curr. Treat. Options Neurol.*, vol. 10, no. 6, pp. 410–419, 2008.
- [59] T. N. Seyfried, "Ketone strong: Emerging evidence for a therapeutic role of ketone bodies in neurological and neurodegenerative diseases," *J. Lipid Res.*, vol. 55, no. 9, pp. 1815–1817,

2014.

- [60] J. M. Freeman, E. H. Kossoff, and A. L. Hartman, "The ketogenic diet: One decade later," *Pediatrics*, vol. 119, no. 3, pp. 535–543, 2007.
- [61] T. R. Artale, E. H. Kossoff, B. A. Zupec-kania, and J. M. Rho, "Ketogenic Diets: An Update for Child Neurologists," pp. 979–988, 2009.
- [62] T. L. Beckett, C. M. Studzinski, J. N. Keller, M. Paul Murphy, and D. M. Niedowicz, "A ketogenic diet improves motor performance but does not affect β -amyloid levels in a mouse model of Alzheimer's Disease," *Brain Res.*, vol. 1505, pp. 61–67, 2013.
- [63] E. Verdin, "Ketogenic Diet or Bbb Improves Epileptiform Spikes, Memory, Survival in Alzheimer's Model," *Innov. Aging*, vol. 2, no. suppl_1, pp. 745–745, 2018.
- [64] J. Yao, S. Chen, Z. Mao, E. Cadenas, and R. D. Brinton, "2-deoxy-D-glucose treatment induces ketogenesis, sustains mitochondrial function, and reduces pathology in female mouse model of Alzheimer's disease," *PLoS One*, vol. 6, no. 7, 2011.
- [65] B. J. Neth *et al.*, "Modified ketogenic diet is associated with improved cerebrospinal fluid biomarker profile, cerebral perfusion, and cerebral ketone body uptake in older adults at risk for Alzheimer's disease: a pilot study," *Neurobiol. Aging*, vol. 86, pp. 54–63, 2020.
- [66] K. Augustin *et al.*, "Mechanisms of action for the medium-chain triglyceride ketogenic diet in neurological and metabolic disorders," *Lancet Neurol.*, vol. 17, no. 1, pp. 84–93, 2018.
- [67] A. Pinto, A. Bonucci, E. Maggi, M. Corsi, and R. Businaro, "Anti-oxidant and anti-inflammatory activity of ketogenic diet: New perspectives for neuroprotection in alzheimer's disease," *Antioxidants*, vol. 7, no. 5, 2018.
- [68] A. P. Çalan. ÖG, "NÖRONAL HÜCRE İÇİ KOLESTEROL DÜZEYLERİNİN AMİLOİD BETA TOKSİSİTESİ VE NÖROSTEROİDLERİN SENTEZİ ÜZERİNE ETKİSİ," 2015.
- [69] D. S. Reddy and K. Bakshi, *Neurosteroids: Biosynthesis, Molecular Mechanisms, and Neurophysiological Functions in the Human Brain*. Elsevier Inc., 2019.
- [70] M. Schumacher *et al.*, "Steroid synthesis and metabolism in the nervous system: Trophic and protective effects," *J. Neurocytol.*, vol. 29, no. 5–6, pp. 307–326, 2000.
- [71] K. Wojtal, M. K. Trojnar, and S. J. Czuczwar, "Endogenous neuroprotective factors: Neurosteroids," *Pharmacol. Reports*, vol. 58, no. 3, pp. 335–340, 2006.

- [72] A. Grimm, K. Schmitt, U. E. Lang, A. G. Mensah-Nyagan, and A. Eckert, "Improvement of neuronal bioenergetics by neurosteroids: Implications for age-related neurodegenerative disorders," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1842, no. 12, pp. 2427–2438, 2014.
- [73] B. O. Dubrovsky, "Steroids, neuroactive steroids and neurosteroids in psychopathology," *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*, vol. 29, no. 2, pp. 169–192, 2005.
- [74] R. C. Melcangi and G. C. Panzica, "Neuroactive steroids: Old players in a new game," *Neuroscience*, vol. 138, no. 3, pp. 733–739, 2006.
- [75] M. Schverer, L. Lanfumey, E. E. Baulieu, N. Froger, and I. Villey, "Neurosteroids: non-genomic pathways in neuroplasticity and involvement in neurological diseases," *Pharmacol. Ther.*, vol. 191, pp. 190–206, 2018.
- [76] C. Peixoto, A. J. Grande, M. B. Mallmann, A. E. Nardi, A. Cardoso, and A. B. Veras, "Dehydroepiandrosterone (DHEA) for Depression: A Systematic Review and Meta-Analysis," *CNS Neurol. Disord. - Drug Targets*, vol. 17, no. 9, pp. 706–711, 2018.
- [77] A. L. Cumberland, H. K. Palliser, G. K. Crombie, D. W. Walker, and J. J. Hirst, "Increased anxiety-like phenotype in female guinea pigs following reduced neurosteroid exposure in utero," *Int. J. Dev. Neurosci.*, vol. 58, pp. 50–58, 2017.
- [78] A. W. Krug, C. G. Ziegler, and S. R. Bornstein, "DHEA and DHEA-S, and their functions in the brain and adrenal medulla," *Neuroact. Steroids Brain Funct. Behav. Neuropsychiatr. Disord. Nov. Strateg. Res. Treat.*, pp. 227–239, 2008.
- [79] M. Maggio *et al.*, "DHEA and cognitive function in the elderly," *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 145, pp. 281–292, 2015.
- [80] M. Sinha, A. Saha, S. Basu, K. Pal, and S. Chakrabarti, "Aging and antioxidants modulate rat brain levels of homocysteine and dehydroepiandrosterone sulphate (DHEA-S): Implications in the pathogenesis of Alzheimer's disease," *Neurosci. Lett.*, vol. 483, no. 2, pp. 123–126, 2010.
- [81] I. Charalampopoulos, E. Remboutsika, A. N. Margioris, and A. Gravanis, "Neurosteroids as modulators of neurogenesis and neuronal survival," *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 19, no. 8, pp. 300–307, 2008.
- [82] S. R. Davis, S. M. Shah, D. P. McKenzie, J. Kulkarni, S. L. Davison, and R. J. Bell, "Dehydroepiandrosterone sulfate levels are associated with more favorable cognitive function in women," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 93, no. July, pp. 801–808, 2008.

- [83] S. Aldred and P. Mecocci, "Decreased dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) concentrations in plasma of Alzheimer's disease (AD) patients," *Arch. Gerontol. Geriatr.*, vol. 51, no. 1, pp. e16–e18, 2010.
- [84] L. Ray *et al.*, "Serum homocysteine, dehydroepiandrosterone sulphate and lipoprotein (a) in Alzheimer's disease and vascular dementia," *Aging Dis.*, vol. 4, no. 2, pp. 57–64, 2013.
- [85] S. Bastianetto, C. Ramassamy, J. Poirier, and R. Quirion, "Dehydroepiandrosterone (DHEA) protects hippocampal cells from oxidative stress-induced damage," *Mol. Brain Res.*, vol. 66, no. 1–2, pp. 35–41, 1999.
- [86] S. B. Solerte *et al.*, "Decreased release of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor in alzheimer's disease: Recovering effect with insulin and DHEA sulfate," *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.*, vol. 19, no. 1, pp. 1–10, 2005.
- [87] O. M. Wolkowitz *et al.*, "DHEA treatment of Alzheimer's disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled study," *Neurology*, vol. 60, no. 7, pp. 1071–1076, 2003.
- [88] V. Schaeffer, L. Meyer, C. Patte-Mensah, A. Eckert, and A. G. Mensah-Nyagan, "Dose-dependent and sequence-sensitive effects of amyloid- β peptide on neurosteroidogenesis in human neuroblastoma cells," *Neurochem. Int.*, vol. 52, no. 6, pp. 948–955, 2008.
- [89] "Protocol Guide: MTT Assay for Cell Viability and Proliferation | Sigma-Aldrich," *sigmaaldrich*. [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/roche/cell-proliferation-kit-i-mtt.html>. [Accessed: 17-May-2020].
- [90] S. Gandhi and A. Y. Abramov, "Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration," *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2012, 2012.
- [91] G. T. Sutherland, B. Chami, P. Youssef, and P. K. Witting, "Oxidative stress in Alzheimer's disease: Primary villain or physiological by-product?," *Redox Rep.*, vol. 18, no. 4, pp. 134–141, 2013.
- [92] H. Sies, "Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress," *Redox Biol.*, vol. 11, no. December 2016, pp. 613–619, 2017.
- [93] N. Ismail, M. Ismail, S. F. Fathy, S. Nor, and A. Musa, "Neuroprotective Effects of Germinated Brown Rice against Hydrogen Peroxide Induced Cell Death in Human SH-SY5Y Cells," *Int. J. Mol. Sci.*, pp. 9692–9708, 2012.

- [94] D. M. Hanafy *et al.*, “Neuroprotective activity of mentha species on hydrogen peroxide-induced apoptosis in SH-SY5Y cells,” *Nutrients*, vol. 12, no. 5, 2020.
- [95] G. M. Broom, I. C. Shaw, and J. J. Rucklidge, “The ketogenic diet as a potential treatment and prevention strategy for Alzheimer’s disease,” *Nutrition*, vol. 60, pp. 118–121, 2019.
- [96] Y. Kashiwaya, T. Takeshima, N. Mori, K. Nakashima, K. Clarke, and R. L. Veech, “D-beta-hydroxybutyrate protects neurons in models of Alzheimer’s and Parkinson’s disease,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 97, no. 10, pp. 5440–5444, 2000.
- [97] G. Xie, W. Tian, T. Wei, and F. Liu, “The neuroprotective effects of β -hydroxybutyrate on A β -injected rat hippocampus in vivo and in A β -treated PC-12 cells in vitro,” *Free Radic. Res.*, vol. 49, no. 2, pp. 139–150, 2015.
- [98] C. Klein *et al.*, “ γ -Hydroxybutyrate (Xyrem) ameliorates clinical symptoms and neuropathology in a mouse model of Alzheimer’s disease,” *Neurobiol. Aging*, vol. 36, no. 2, pp. 832–844, 2015.
- [99] B. Cheng, H. Lu, B. Bai, and J. Chen, “D- β -Hydroxybutyrate inhibited the apoptosis of PC12 cells induced by H₂O₂ via inhibiting oxidative stress,” *Neurochem. Int.*, vol. 62, no. 5, pp. 620–625, 2013.
- [100] R. P. A. Maria Manczak, Peizhong Maoa, Marcus Calkinsa, Anda Corneaa and and P. H. R. Michael P. Murphyb, Hazel H Szetoc, Byung Parkd, “Mitochondria-targeted antioxidants protect against Abeta toxicity in Alzheimer’s disease neurons,” vol. 20, no. Suppl 2, 2010.
- [101] O. Song-Young Park, University of Nebraska, “Effects of Mitochondrial-targeted Antioxidant on Mild Cognitive Impairment (MCI) Patients,” *ClinicalTrials.gov*, 2018. [Online]. Available: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03514875>. [Accessed: 04-May-2020].

8. EKLER

8.1 Etik Kurul Onayları

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2018/22-32	Tarih:13.09.2018			
	Doç.Dr.Özlem Gürsoy ÇALAN'ın sorumlusu olduğu "3 - Hidroksibütirat'ın Nöronal Amiloid-Beta Toksikite Modelinde Nörosteroidler Üzerine Etkisinin İncelenmesi" isimli klinik araştırmaya ait 16.08.2018 tarihli araştırıcı dilekçesine ilişkin olarak; -Çalışmaya Yüksek Lisans öğrencisi Tuğba Şan'ın yardımcı araştırmacı olarak dahil edilmesi ile ilgili belge incelenerek bilgi edinilmiş ve uygun bulunmuştur.				
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu				
ETİK KURUL BİLGİLERİ					
ETİK KURUL ÜYELERİ					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?	İmza
Prof.Dr.Ali Rıza ŞİŞMAN (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	<i>Ali Şişman</i>
Prof.Dr.Gül ERGÖR (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Gül Ergör</i>
Prof.Dr.Nejat SARIOŞMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	<i>Katılmadı</i>
Prof.Dr. Mehmet Refik MAS	Geriatri	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	<i>Katılmadı</i>
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Katılmadı</i>
Prof.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Müge Kıray</i>
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEU Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Sevda Özkardeşler</i>
Prof.Dr.Sülen SARIOĞLU	Patoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Katılmadı</i>
Prof.Dr.Bilge KARA	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Bilge Kara</i>
Prof.Dr.Ayhan ABACI	Pediyatrik Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	<i>Ayhan Abacı</i>
Doç.Dr.M.Aylin ARICI	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Katılmadı</i>
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E ☐ H ☒	<i>Murat Bektaş</i>
Doç.Dr.Yasemin SOYSAL	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Yasemin Soysal</i>
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐ H ☒	<i>Ahmet Can Bilgin</i>
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐ H ☒	<i>Mehmet Erhan Özkul</i>

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2018/19-22	Tarih:26.07.2018
	Doç.Dr.Özlem Gürsoy ÇALAN'ın sorumlusu olduğu "Hidroksibütirat'ın Nöronal Amiloid-Beta Toksikite Modelinde Nörosteroidler Üzerine Etkisinin İncelenmesi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Ali Rıza ŞİŞMAN (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Şişman</i>
Prof.Dr.Gül ERGÖR (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Gül Ergör</i>
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Katılbadı</i>
Prof.Dr. Mehmet Refik MAS	Geriatri	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Katılbadı</i>
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Özkütük</i>
Prof.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Katılbadı</i>
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEU Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Sevda Özkardeşler</i>
Prof.Dr.Sülen SARIOĞLU	Patoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Katılbadı</i>
Prof.Dr.Bilge KARA	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Bilge Kara</i>
Prof.Dr.Ayhan ABACI	Pediyatrik Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Abacı</i>
Doç.Dr.M.Aylin ARICI	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Katılbadı</i>
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Bektaş</i>
Doç.Dr.Yasemin SOYSAL	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Soysal</i>
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D.	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Ahmet Can Bilgin</i>
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Erhan Özkul</i>

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2019/25-45	Tarih:14.10.2019
	Doç.Dr.Özlem Gürsoy Doruk'un sorumlusu olduğu "3 - Hidroksibütirat'ın Nöronal Amiloid-Beta Toksikite Modelinde Nörosteroidler Üzerine Etkisinin İncelenmesi" isimli klinik araştırmaya ait 08.10.2019 tarihli araştırıcı dilekçesine ilişkin; -Çalışma başlığının " 3-Hidroksibütirat'ın SH SY-5Y Hücre Hattında Hidrojen Peroksit Toksikitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi" olarak değiştirilmesi. -Nöronal toksisite yaratan ajan olarak Hidrojen peroksit (H2O2) ve temini halinde Amiloid beta (AB) 1-42 peptidinin kullanılması, -Çalışma süresinin Mayıs 2019 tarihinden Mayıs 2020 tarihine kadar uzatılması. İle ilgili belgeler incelenerek bilgi edinilmiş ve uygun bulunmuştur.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Sadık Kıvanç METİN (Başkan)	Kalp ve Damar Cerrahisi	DEÜ Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Sermin ÖZKAL (Başkan Yardımcısı)	Tıbbi Patoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Serkan YENER	Endokrinoloji	DEÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Pınar TUNCEL	Tıbbi Biyokimya	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Arzu GENÇ	Nörolojik Fizyoterapi - Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEÜ Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Nil Hocaoglu AKSAY	Tıbbi Farmakoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEÜ Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Tufan ÇANKAYA	Tıbbi Genetik	Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Ayfer DAYI	Davranış Fizyolojisi	DEÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Korcan DEMİR	Pediyatrik Endokrinoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Mahmut Cem ERGON	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Öğr.Gör.Dr.Kıvanç YÜKSEL	Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Bilişim A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
Av.Feriz FIRTINA	Avukat	DEÜ Rektörlüğü Hukuk Müşavirliği	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	

8.2 Özgeçmiş





SAMAR MOHAMED ALİ AHMED

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

Doğum Tarihi	19/09/1990
İletişim Adresi	Metin Oktay Mahallesi- Sokak 108/35- Yağmur apartmanı- No.60- Daire 1
Telefon	(553) 850 30 59
E-posta	samar.ali@pharma.asu.edu.eg
Web Adresi	

Öğrenim Bilgileri

01 Eylül 2017 - Şu Anda (2 yıl 11 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, BİYOKİMYA (YL) (TEZLİ)
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.5 / 4.0

01 Eylül 2007 - 01 Mayıs 2012 (4 yıl 9 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, AIN SHAMS UNIVERSITY, MISIR
AIN SHAMS UNIVERSITY, AIN SHAMS UNIVERSITY
Diploma Numarası: 047835
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 86.5 / 100.0

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

TÜRKÇE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

FRANSIZCA (Okuma: Orta, Yazma: Başlangıç, Konuşma: Orta)

Ar-Ge Yetkinlik

Bildiriler

S. M. A. AHMED & Ö. GÜRSOY DORUK, Higher Glucose Concentrations Sensitize SH SY-5Y Cells to Hydrogen Peroxide-induced Cytotoxicity, Poster Sunumu, Cell Death: Degeneration and Regeneration Symposium, 03 Ekim 2019, 05 Ekim 2019.

Projeler

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Sıçanlarda Sitalopramin İndüklediği QT Uzaması ve Mitokondriyal Hasarda Nikorandilin Etilerinin Değerlendirilmesi, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, 01 Ocak 2019, 01 Temmuz 2020.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0