

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AMİNOGLUTETHİMİD'İN NÖRONAL
HÜCRE HATLARINDA STEROİD SENTEZİ
VE AMİLOİD β PEPTİT TOKSİSİTESİ
ÜZERİNE ETKİSİ**

Cumhur DOĞAN

TEMEL SİNİRBİLİM
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2019

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2011970107

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AMİNOGLUTETHİMİD'İN NÖRONAL
HÜCRE HATLARINDA STEROİD SENTEZİ
VE AMİLOİD β PEPTİT TOKSİSİTESİ
ÜZERİNE ETKİSİ
TEMEL SİNİRBİLİM
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

CUMHUR DOĞAN

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Pınar AKAN

Bu Çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü
Tarafından 2013.KB.SAG.027 Kodu İle Desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSL.MSc-2011970107

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sinirbilimler Anabilim Dalı, Yüksek Lisans programı öğrencisi Cumhuriyet DOĞAN ‘AMİNOGLUTETİMİD’İN NÖRONAL HÜCRE HATLARINDA STEROİD SENTEZİ VE AMİLOİD PEPTİT TOKSİSİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ’ konulu Yüksek Lisans tezini 25.06.2019 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

BAŞKAN

Prof. Dr. Pınar AKAN

Dokuz Eylül Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Sinirbilimler Anabilim Dalı

ÜYE

Doc. Dr. Özlem GÜRSOY
ÇALAN

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya
Anabilim Dalı

ÜYE

Dr. Öğr. Üyesi Deniz CEYLAN
TUFAN ÖZALP

İzmir Ekonomi Üniversitesi

Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu
Yaşlı Bakımı Anabilim Dalı

YEDEK ÜYE

Doç. Dr. Murat ÖRMEN

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya
Anabilim Dalı

YEDEK ÜYE

Dr. Öğretim Üyesi Özge ERTENER
ÇOKBANKIR

İzmir Ekonomi Üniversitesi

Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri
Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
ŞEKİL DİZİNİ.....	i
KISALTMALAR.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	1
THE EFFECT OF AMINOGLUTETIMIDE ON AMYLOID BETA TOXICITY IN NEURONAL CELL LINES ...	2
ABSTRACT.....	2
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Alzheimer Hastalığı.....	5
2.1.1. AH Gelişimine Eşlik Eden Patofizyolojik Süreçler.....	9
2.1.2. Amiloid Plak (AP) Oluşumu.....	10
2.1.3. Aβ peptit öncülü Amiloid Prekürsör Protein (APP).....	10
2.1.4. APP Metabolizması Ve Nöronal Toksisite İle İlişkisi.....	12
2.2. Nörosteroidlerin Biyosentezi.....	18
2.3. Aminoglutetimid.....	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
3.1. Araştırmanın Tipi.....	23
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	23
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grubu.....	23
3.4. Çalışma Materyali.....	23
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	23
Bağımlı değişkenler: Hücre canlılığı ve estradiol, androstenedion, testosteron, estron DHEA ve pregnenolon seviyeleri.....	23
Bağımsız değişkenler: AB konsantrasyonu ve AMG konsantrasyonu.....	23

3.6.	Veri Toplama Araçları	23
3.6.1.	Araştırmada Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar.....	23
3.6.2.	Hücre Kültürü	25
3.6.3.	AB Peptit Toksisitesinin Belirlenmesi	26
3.6.4.	Pregnenolone sülfat düzeylerinin ölçümü.....	26
3.6.5.	ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	27
3.7.	Araştırma Planı ve Takvimi	31
3.8.	Verilerin Değerlendirilmesi.....	32
3.9.	Araştırmanın Sınırlılıkları	32
3.10.	Etik Kurul Onayı	32
4.	BULGULAR	33
4.1.	AMG'nin hücre canlılığı üzerine etkisi	33
4.2.	Steroid Analiz Sonuçları.....	35
5.	TARTIŞMA	40
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	46
7.	KAYNAKLAR	47
8.	EKLER	55

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: NINCDS-ADRDA Alzheimer Hastalığı Klinik Tanı Kriterleri	6
Tablo 2: AH ile ilgili genler, kromozomal lokuslar ve patoloji üzerine etkileri.....	9
Tablo 3: A β fibrilizasyon yolağındaki ara ürünler	15
Tablo 4: Cihaz Listesi	24
Tablo 5: Kimyasal Listesi	25
Tablo 6: Çalışma İzlem Şeması.....	31



ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Amiloid prekürsör proteinin (APP) uzun hücre dışı bölgesi, transmembran bölgesi ve kısa hücre içindeki sitozolik kuyruğu.....	11
Şekil 2: Amiloid prekürsör proteinin (APP) sekretazlar ile kesimi	13
Şekil 3: İnsan A β 1-42 peptidinin amino asit dizilimi.	17
Şekil 4: APP proteolizinden nöritik plak oluşumuna kadar geçen süreç	17
Şekil 5: Steroid sentezinin mikrozomal ve mitokondrial kompartmandaki bölümleri	19
Şekil 6: Steroidlerin biyosentez yolağı	20
Şekil 7: Farklı P450 enzimlerinin AMG etkisi ile inhibisyonu.....	22
Şekil 8: Androstenedion kalibrasyon eğrisi	27
Şekil 9: DHEA kalibrasyon eğrisi	28
Şekil 10: Estradiol kalibrasyon eğrisi	29
Şekil 11: Estron kalibrasyon eğrisi	30
Şekil 12: Aminogluthetimid Doz Cevap Eğrisi	33
Şekil 13: Aminogluthetimin AB Toksisitesine Karşı Etkisi	34
Şekil 14: Aminogluthetimid uygulamasının androstenedion düzeylerine etkisi	35
Şekil 15: Amiloid beta ve AMG uygulaması sonrası Androstenedion ölçümleri	35
Şekil 16: Amiloid beta ve AMG uygulaması ile DHEA düzeyi belirlenmesi	36
Şekil 17: Amiloid beta ve AMG uygulaması sonrası DHEA ölçümleri	36
Şekil 18: AMG uygulaması sonrası Estradiol ölçümleri	37
Şekil 19: Amiloid beta ve AMG uygulaması sonrası Estradiol ölçümleri	37
Şekil 20: Amiloid beta ve AMG uygulaması ile Estrone düzeyi belirlenmesi	38
Şekil 21: Amiloid beta ve AMG uygulaması sonrası Estrone ölçümleri	38
Şekil 22: Amiloid beta ve AMG uygulaması sonrası pregnenolon sülfat Düzeyi Değişimi	39
Şekil 23: Amiloid beta ve AMG uygulaması sonrası pregnenolon sülfat ölçümleri.....	39

KISALTMALAR

NS:	NÖROSTERÖİD
P:	PREGNENOLON
PS:	PREGNENOLON SÜLFAT
PROG:	PROGESTERON
DHEA:	DEHİDROEPIANDROSTERON
DHEAS:	DEHİDROEPIANDROSTERON SÜLFAT
SULT2:	SÜLFOTRANSFERAZ
AH:	ALZHEİMER HASTALIĞI
Aβ:	AMİLOİD BETA
APP:	AMİLOİD PREKÜRSÖR PROTEİNİ
AP:	AMİLOİD PLAK
AMG:	AMİNOGLUTETİMİD
NMDA:	N-metil-D-aspartat
NFY:	NÖROFİBRİLER YUMAKLAR
BOS:	BEYİN OMURİLİK SIVISI
FMRG:	FONKSİYONEL MANYETİK REZONANS GÖRÜNTÜLEME
PS1:	PRESENİLİN 1
PS2:	PRESENİLİN 2
SSS:	SANTRAL SİNİR SİSTEMİ

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında her türlü destek ve önerileri ile yardımlarını esirgemeyen, deneyimlerinin ve bilimsel desteğinin yanı sıra manevi olarak da her zaman yanımda hissettiğim danışmanım Sayın Prof. Dr. Pınar AKAN'a,

Yüksek lisans eğitimimiz süresince biz öğrencilere yol gösteren değerli Sinirbilimler Anabilim Dalı öğretim üyelerimize,

Yüksek lisans eğitimim süresince yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Özlem Gürsoy ÇALAN, Kerim DOYURAN, Nida DEMİRÇAK ve R. Uğur BORA 'ya

Her zaman yanımda olan hayat arkadaşım, kızımın annesi Semanur DOĞAN 'a

Hayatım boyunca maddi manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, günlere gelmeme vesile olan annem, babam, arkadaşım, sırdaşım Kadriye ÖZER'e,

Beni büyüten, öz evlatlarından ayırmayan dedem Mustafa ÖZER ve ananem Alime ÖZER'e,

Yaptığımız araştırmanın mali desteğini sağlayan Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi'ne teşekkürü bir borç bilirim.

AMİNOGLUTETİMİD'İN NÖRONAL HÜCRE HATLARINDA AMİLOİD BETA PEPTİT TOKSİSİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

Cumhur Doğan, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sinirbilimler Anabilim Dalı, 35340, İnciraltı, İzmir

ÖZET

Progresif ilerleme gösteren Alzheimer Hastalığı(AH), hafıza kaybı ile sonuçlanan geri dönüşümü olmayan nörodejeneratif bir hastalıktır. Nörodejenerasyonu başlatan faktörlerden biri nöronal dokularda Amiloid beta (A β) proteininin konsantrasyonundaki artıştır. A β gibi toksik ajanlarla indüklenen bazı steroidler hücre ölümü üzerinde doza bağlı koruyucu etkiye sahiptirler. Çok çeşitli ve farklı fizyolojik etkilere sahip steroid hormonları, in vivo koşullarda, kolesterolden yan zincir koparılması, hidroksilasyon ve aromatisasyon reaksiyonları ile oluşabilir. Aminoglutetimid (AMG) uygulama dozuna bağlı olarak steroid sentezini yan zincir koparılması veya aromatisasyon basamağında inhibe edebilir. Bu çalışma ile A β toksisitesine karşı AMG uygulamasının hücre canlılığına etkisinin doz bağımlı olarak değerlendirilmesi ve estron, estradiol, DHEA, pregnenolone sülfat ve androstenedion düzeyleri üzerine etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Çalışmamızda feokromasitoma (PC-12) hücre hattı nöroendokrin hücre modeli olarak kullanıldı. Fonksiyonel fragman A β 25-35 peptit ve AMG uygulamasının hücre steroid düzeylerindeki oluşturduğu değişiklikler ELISA ve LCMS MS yöntemiyle belirlendi. Hücre canlılıkları MTT redüksiyonu yöntemi ve ışık mikroskopisi ile değerlendirildi.

72 saat A β 25-35 (20uM) uygulaması ile hücre canlılığını kontrol grubuna göre ortalama ~%55 azalttı. A β 25-35 uygulaması hücre estron ve androstenedion düzeyini artırırken, estradiol ve DHEA düzeyini azalttı. AMG, A β toksisitesi üzerinde doza bağlı kısmi koruyucu etki gösterdi.

PC-12 hücre hattında oluşturulan A β toksisitesi oluşturulan çalışmamızda hücre içi steroid hormon değişikliklerinin olduğu ve bu değişikliklerin hücre canlılığını etkileyebildiği gösterilmiştir. AMG'nin doza bağlı koruyucu etkisi hücre içi kolesterolün steroid sentezine girişinin bloke edilmesine veya A β 'nın tetiklediği eksitotoksik yolların inhibisyonuna bağlı olabilir. AMG'nin A β toksisitesindeki rolünü daha net olarak ortaya koymak için, hücre içi reseptör modülasyonunu gösterecek mekanistik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Sözcükler: Aminoglutetimid, amiloid beta, Alzheimer Hastalığı, Steroid, Hücre Canlılığı

THE EFFECT OF AMINOGLUTHEIMIDE ON AMYLOID BETA TOXICITY IN NEURONAL CELL LINES

ABSTRACT

Alzheimer's disease is an irreversible and progressive neurodegenerative disease, which results in with memory deficit. The increase in amyloid beta (A β) concentration is one of initiating factors in the neurodegeneration process. Some steroids have protective effects on cell death induced by toxic agents (such as A β peptide) depending on their dose. In-vivo vary steroids may occur by reactions such as cholesterol side cleavage, hydroxylation or aromatization. Aminogluthetimide can inhibit steroid synthesis on the step of side cleavage or aromatization in dose dependent manner. The aim of this study is to determine the effect of aminogluthetimide on A β toxicity and also to evaluate the changes of steroid levels including estron, estradiol, DHEA, DHEA sulfate, androstenedion and pregnenolon sülfat.

In our study, the rat feochromacytoma cell line (PC-12) was used as an neuroendocrine model. The effects of A β 25-35 peptide which is the functional fragment of A β protein, and aminogluthedime on steroid levels were determined by ELISA and LCMS MS methods. MTT reduction method and light microscopy were used to assess cell viability.

A β treatment during 72 hours reduced cell viability by 50 % of control cells. A β induced estron, and androstenedione levels but also decreased estradiol and DHEA levels. Aminogluthedimide partially protected the cells against to A β toxicity in dose dependent manner.

In our study, it has been shown that A β can change the level of steroids in PC-12 cells and also the changes of steroid levels can affect the cell viability. The protective effect of aminogluthetimide may be related to block of cholesterol input for steroid synthesis or it may be connected the inhibition of exitotoxicity induced by A β peptide. It needs to be further studies to explain the relationship between aminogluthetimide and receptor modulation in cell.

Keywords: Aminogluthetimide, Amyloid Beta, Alzheimer's Disease, Steroid, Cell Death

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Alzheimer Hastalığı (AH), seçici nöronal hücre ölümü ile seyreden, geri dönüşümü olmayan serebral dejenerasyon ile nitelenen bir hastalıktır. AH, ilerleyici demansların en sıkça rastlanan nedenidir ve 65 yaş üstü insanlarda Batı ülkelerinde ölüm nedenleri arasında 4. sıradadır. Genç nüfusun hızlıca yaşlanacağı bir ülke olarak Türkiye’de 600 bin civarında olan Alzheimer hastası olduğu tahmin edilmektedir. Yaşlı nüfus 2012 yılında 5 milyon 682 bin 3 kişi iken, 2016 yılında 6 milyon 651 bin 503 kişi olmuştur. Ölüm nedeni istatistikleri incelendiğinde Alzheimer hastalığından hayatını kaybeden yaşlıların sayısı ise 6 bin 155’ten 11 bin 997’ye yükselerek Alzheimer hastalığından ölen yaşlıların sayısı yaklaşık 2 kat artmıştır[1]. 30-40 yıl sonra bu hastalık en önemli sağlık sorunlarından biri olacağı düşünülmektedir. Amerika Birleşik Devletleri’nde 4 milyondan fazla Alzheimer hastası olup bunların sağlık ve bakım harcamaları yılda yaklaşık 277 milyar doların üzerinde olması aileler ve toplum için sosyal ve ekonomik problem haline gelmesine neden olmaktadır [2]–[4]. Bu nedenle AH’da nöron kaybını önleyebilecek ajanların tanımlanması, hastalıktan koruyucu ve tedavi edici yöntemlerin bulunmasına katkı sağlayacaktır.

Amiloid β (A β) 4 kDa ağırlığında bir peptid olup, ekstrasellüler çözünmez plaklarda birikimi Alzheimer Hastalığının (AH) değişmez bir özelliğidir [5], [6]. AH patogeneğinde nörofibriller yumak, oksidan ajanlar, sinaptik hasar, kolinerjik aktivite ve nöron kaybı yer almakla birlikte, A β üretim ve birikiminin temel mekanizma olduğu ileri sürülmektedir [7]–[12].

Nöronal sistemde sentezlenen steroid hormonlar sıra dışı kökenleri ve farklı işlevleri nedeniyle nörosteroidler (NS) olarak isimlendirilir. Sinir sisteminde üretilen steroid hormonların en bilinenleri, pregnenolon (P) progesteron, dehidroepiandrostenedion (DHEA) ve bunların sülfat esterleridir [13]. Sinir dokusunda nörosteroidlerin fizyolojik düzeyleri 1 μ M ve altındadır [14]. P, DHEA ve progesteron düzeylerinin A β toksisitesi, iskemik hasar, oksidatif stres ve glutamat nörotoksitesisi gibi etkenlerle değişikliğe uğrayabildiği gösterilmiştir [15], [16]. A β toksisitesinde, fizyolojik kabul edilen 1 μ M’ın altındaki konsantrasyonlarda dışarıdan verilen steroidlerin nöronal hücreleri koruduğu, yüksek konsantrasyonlarda ise bir toksin gibi davrandıkları gösterilmiştir [17]–[21].

Aminoglutetimid (AMG) steroid hormon yüksekliği ile seyreden cushing sendromunda, meme kanseri tedavisinde kullanılan bir anti-steroid ilaçtır [22]. Düşük dozda

(<10µM) sadece androjenlerin östrojene aromatisasyonunu inhibe ederken, yüksek dozda (>100µM) kolesterolden P oluşumunu da inhibe eder [23]. Diğer taraftan 300 µM üstü dozlarda AMG'in nöronal hücrelerde N-metil-D-aspartat (NMDA) toksisitesi ve iskeminin indüklediği hücre ölümünü azalttığı gösterilmiştir [24]. AMG'in Aβ toksisitesi üzerine etkisi ise kesin olarak ortaya konmamıştır.

Bu araştırmada nöroendokrin karakterli hücre hattında oluşturulacak Aβ toksisitesinde farklı dozlarda AMG uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkilerini belirlemek ve bununla birlikte steroid sentezi ile Aβ toksisitesi arasındaki ilişkiyi ortaya koymak amaçlanmaktadır. Bu çalışma ile Aβ'nın tetiklediği hücre ölümünün oluşum mekanizmasına açıklık getirmek ve yeni tedavi seçeneklerini geliştirmek için in-vitro verilerin elde edilmesi mümkün olabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

Alois Alzheimer tarafından ilk kez 1906'da nöropsikiyatrik hastalık sebebiyle 51 yaşında ölen bir kadının beyin dokusundaki değişikliklerin incelenmesi sonucu tanımlanmıştır. AH ismiyle anılmakta olan hastalık uzun yıllar yaygın olarak demansın yaşlılık öncesi formu olarak kabul görmüştür. AH, bellek ve en azından bir diğer kognitif alandaki progresif bozulmanın, demansın başka tanımlanabilir sebepleri olmaksızın, sosyal, profesyonel ve evle ilgili işlerde önceki düzeye göre kaybın olduğu klinik durumu tanımlamak için kullanılır [25]. Herhangi bir tedavi ile fayda sağlanamayan AH 65 yaş altındaki bireylerin %1'inden azını etkilerken 85 yaş üzerindeki bireyler yaklaşık %30-40'ı risk altındadır. Demans tipleri içinde en sık (%50-70) görülen AH başlangıcında bellekteki dejenerasyon seçici olarak yakın geçmişteki olaylar ve deneyimleri kapsamaktadır. Bununla beraber çocukluk ile ilgili eski ve duygusal ağırlığı olan yeni olaylar göreceli olarak daha iyi hatırlanmaktadır. Hastalığın ilerleyen dönemlerinde bilişsel ve duygusal fonksiyon bozukluğu ve fiziksel işlevlerde kayıp meydana gelmektedir. AH'nda sinirsel bozulma, bilişsel işlevlerde hayati önem taşıyan limbik sistem ve birleşme alanlarında sınırlı kalmakta, genellikle motor ya da duygusal değişiklikler ortaya çıkarmasa da, bazı vakalarda motor sistem harabiyeti ile spastik paraparazi gibi tipik olmayan klinik bulgular gözlenmektedir [3], [26], [27].

AH'nın kesin tanısı post-mortem beyin incelemesi ile bugün bile ancak koyulabilmektedir. Beynin histopatolojik olarak incelenmesinde AH'na ait alışlagelmiş üçlü bulgu olan A β içeren senil plaklar, hiperfosforile mikrotübüler tau proteini içeren nörofibriler yumaklar (NFY) gözlenmektedir. Bunlara ek olarak beyin özellikle hipokampal, temporal ve parietal bölgelerinde ilerleyici sinir kaybı gözlenmektedir [3], [28], [29].

AH'nın tanı kriteri 1984 yılında "National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association" tarafından ortaya konan kısaca NINCDS-ADRDA kriterleri, günümüzde yaygın biçimde kullanılmaktadır (Tablo 1). Klinik tanı ile postmortem uygulanan patolojik tanı karşılaştırıldığında, NINCDS-ADRDA kriterleri muhtemel ve mümkün AH tanısı için %90 sensitivite ve %60 spesifisite sağlar [30]–[34].

Yaşayan bir hastada kesin AH tanısı koydurabilecek bir test bulunmamasından dolayı tanıda laboratuvarın yeri çok azdır. AH ile geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda önerilen aday belirteçlerin hiçbiri arasında doğrudan bir ilişki sağlanamamıştır. Beyin omurilik sıvısında

(BOS) AH'da Aβ1-42 peptit zincirinin azalması veya tau protein seviyelerinin artmış olması tanı için tek başına yeterli değildir [35], [36].

Diğer yöntemler arasında manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ya da beyin tomografisi (BT) gibi beyin görüntüleme yöntemleri ile pozitron emisyon tomografisi (PET), tek foton emisyon bilgisayarlı tomografi (SPECT) ve yeni geliştirilen fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme (fMRG) gibi fonksiyonel görüntüleme teknikleri yer almaktadır. Yukarıda belirtilen tetkikler de tek başına AH teşhisi koyduramamaktadır [34].

Tablo 1: NINCDS-ADRDA Alzheimer Hastalığı Klinik Tanı Kriterleri [30]

I. MUHTEMEL Alzheimer Hastalığı klinik tanı kriterleri şunları içerir: • klinik muayene ile saptanan, Mini-Mental Test, Blessed Demans Ölçeği ya da benzer bir test ile dokümanite edilen ve nöropsikolojik testlerle de doğrulanan demans tablosu; • iki ya da daha fazla bilişsel süreçte bozulma; • bilinç bozukluğu yok; • başlangıç 40-90 yaşları arasında, büyük sıklıkla da 65 yaşından sonra; • bellek ya da diğer bilişsel süreçlerde ilerleyici bozukluğa yol açabilecek sistemik ya da beyne ait başka bir hastalık yok.
II. MUHTEMEL Alzheimer Hastalığı tanısı şunlarla desteklenir: • dil (afazi), motor yetenekler (apraksi) ve algı (agnozi) gibi özgül bilişsel işlevlerde ilerleyici bozulma; • günlük yaşam aktivitelerinde bozulma ve davranış biçiminde değişme; • ailede benzer bozukluk öyküsü (özellikle patolojik olarak kanıtlanmışsa); • laboratuvarla: • standart tekniklerle normal lomber ponksiyon, • EEG'nin normal olması ya da yavaş dalga aktivitesinde artış gibi non-spesifik değişiklikler, • BT'de serebral atrofiye ilişkin bulgular ve seri incelemelerde bu bulguların ilerleyişi.
III. Alzheimer hastalığı dışındaki nedenler dışlandıktan sonra, MUHTEMEL Alzheimer Hastalığı tanısı ile uyumlu olabilecek diğer klinik özellikler şunlardır: • hastalığın seyrinde platolar; • depresyon, uykusuzluk, inkontinans, hezeyan, illüzyon ve halüsinasyonlar, verbal, emosyonel ya da fiziksel katastrofik patlamalar, cinsel bozukluklar ve kilo kaybı gibi eşlikçi bulgular; • bazı hastalarda, özellikle hastalığın ileri dönemlerinde, kas tonusunda artış, miyoklonus ya da yürüme güçlüğü gibi diğer nörolojik bozukluklar; • hastalığın ileri evresinde nöbetler; • yaş için normal BT.
IV. MUHTEMEL Alzheimer Hastalığı tanısını belirsizleştiren ya da ihtimal dışına çıkaran özellikler şunlardır: • inme tarzında ani başlangıç; • hemiparezi, duysal kayıp, görme alanı defektleri ve inkoordinasyon gibi lokal nörolojik bulguların hastalığın erken evrelerin de bulunması; • nöbetler ya da yürüyüş bozukluklarının, daha başlangıçta ya da hastalığın çok erken evrelerinde bulunması;
V. MÜMKÜN Alzheimer Hastalığı tanı kriterleri şunlardır: • demansa neden olabilecek diğer nörolojik, psikiyatrik ya da sistemik bozukluklar olmaksızın, başlangıç, prezentasyon ya da klinik seyrinde varyasyonların bulunması durumunda konulabilir; • demansa neden olabilecek, ancak demansın nedeni gibi görünmeyen ikinci bir sistemik ya da beyin hastalığının bulunması durumunda konulabilir; • diğer belirlenebilir nedenlerinin dışlandığı, tek ve yavaş ilerleyici bir bilişsel bozukluğun bulunması durumunda, araştırma çalışması amaçlı olarak kullanılabilir.
VI. KESİN Alzheimer Hastalığı tanısı kriterleri şunlardır: • muhtemel Alzheimer Hastalığı klinik kriterleri; • biyopsi ya da otopsiyle elde edilen histopatolojik kanıtlar.

AH için net bir biçimde tanımlanmış birkaç risk etkeniyle birlikte halen üzerinde çalışılmaya devam eden ve hastalık ilerlemesinde rolü tamamen ortaya konulmamış etkenler de mevcuttur. İleri yaş AH'nda en önemli risk etkenidir. 65 yaşın üzerinde bulunan topluluklar büyük risk taşımakta ve her 5 yılda hastalık ortaya çıkma ihtimali ikiye katlanmaktadır [37].

Aile öyküsü bulunması da birinci derece risk faktörü olarak tanımlanmıştır. AH ailesel ve sporadik olmak üzere iki formda gelişir. Otozomal dominant olan ailesel AH 30-60 yaşları arasında başlamaktadır. Erken başlangıçlı (ailesel) AH'nda aile öyküsü bulunması hastalık gelişim riskini önemli ölçüde artırmaktadır ve bu tip AH'da genetik kalıtım kesin olarak belirlenmiştir. 21. kromozomda bulunan APP geni, 14. kromozomda bulunan presenilin 1 (PS1) geni ve 1. kromozomda bulunan presenilin 2 (PS2) geni üzerinde meydana gelen mutasyonlar ailesel AH'na neden olur. Her üç mutant gen (APP, PS1, PS2) A β üretimini artırarak senil plak birikimine neden olmaktadır (Tablo 2). Ailesel AH vakaları tüm AH vakalarının sadece %5'ini oluştururken, sporadik olarak görülen geç başlangıçlı AH çok yaygındır ve vakaların %90-95'ini oluşturmaktadır. Ancak sporadik AH'nın nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte hem genetik hem de çevresel risk faktörlerinin karmaşık etkileşimi ile birlikte yaşlanma süreciyle ortaya çıkabileceği görüşü ileri sürülmektedir [38], [39]. Yapılan çalışmalarda Apo E4 allel frekansının gerek sporadik gerekse ailesel tipteki AH'nda arttığı gösterilmiştir.

ApoE, plasma ve beyinde kolesterol taşıyan temel apolipoproteinlerden biridir. Bu proteinin mRNA'sı karaciğerden sonra ikinci olarak en fazla beyinde bulunmaktadır. ApoE beyinde primer olarak astrositler tarafından sentezlenmekte ve salgılanmaktadır ayrıca mikrogliya ve nöronlarda da bulunmaktadır.

Apo E SSS'nde oluşan bir hasar sonrası nöronal membranın onarımı ve aksonların miyelinizasyonu için gerekli olan kolesterolün salınımını, hücrelere yeniden dağılımını koordine eden bir protein olup 19. kromozomda kodlanır. İnsanlarda üç ayrı allelik formu vardır; ϵ 2, ϵ 3 ve ϵ 4. Bu aleller tarafından üretilen protein izoformları 112 ve 158. pozisyonlardaki aminoasitlerde farklılık göstermektedir: ϵ 2 (Cys112, Cys158), ϵ 3 (Cys112, Arg158), ϵ 4 (Arg112, Arg158). Toplumda ϵ 3 sıklığı %70 olarak görülürken, ϵ 4 sıklığı %20'dir. AH'da bu oran %40'a çıkmaktadır. Apo E ϵ 4 alleleline sahip olmak her zaman AH'na neden olmaz ancak hastalığa duyarlılığı artırır, bu nedenle duyarlılık geni olarakta bilinmektedir [30], [34], [37], [40], [41].

Apo E ϵ 4 allelindeki artış; artmış AH riski, AH'nın ilk başlama yaşının azalması, senil plak yoğunluğunun artışı ile doğru orantılı bulunmuştur. Diğer taraftan, ϵ 2 alleli A β peptid temizlenmesinde etkin, koruyucu bir faktör olarak bilinmektedir [42], [43].

Risk faktörü olarak cinsiyet halen tartışılan bir konudur. Bazı epidemiyolojik çalışmalar kadın cinsiyetin AH riskini artırdığını belirtmektedir. Kadınlarda hastalık erkeklerden 2 kat daha fazla görülmektedir. Bu durumun altında yatan biyolojik neden tam olarak bilinmemekle birlikte, kadınlarda yaşam beklentisinin daha uzun olması, menopozdan sonra ki östrojen düzeylerinde ki düşüşün buna neden olduğu düşünülmektedir. Gözlemsel çalışmalarda postmenopozal dönemde östrojen replasmanının AH riskini azalttığı ileri sürülmüştür. Hayvan çalışmalarında östrojenin nörotrofik, nöroprotektif olduğu, serebral kan akımını arttırdığı gösterilmiş olsa da klinik çalışmalar bu durumu tam olarak desteklememektedir.

Kafa travması, depresyon öyküsü, düşük eğitim seviyesi, doğum sırasındaki parental yaş, sigara içme ve birinci-derece akrabada Down Sendromu varlığı, vasküler hastalık öyküsü, yüksek plazma homosistein öyküsü, hipotiroidizm, organik çözücüler, aliminyum, elektromanyetik alanlar gibi bazı toksik ve zararlı durumlara maruziyet AH ile ilişkilendirilen diğer olumsuz risk faktörleridir [30], [34].

Yüksek eğitim düzeyine sahip olmak, neokortikal asosiasyon alanlarında artmış sinaptik ve/veya dendritik yoğunluk ve komplekslik sağlaması nedeni ile hastalık gelişimi riskini azaltıcı bir faktör olarak tanımlanmaktadır. Bunun yanı sıra aile ve yakın çevre ile iyi ilişkilerde bulunma, sosyal aktivitelerdeki zenginlik, düzenli egzersiz gibi vasküler hastalıkların riskini azaltacak tüm koşulların sağlanması, omega 3'ten ve vitamin E gibi antioksidanlardan zengin besinlerin tüketimi, düzenli anti enflamatuvar ajan kullanımı AH gelişim riskini azaltıcı diğer etkenlerdir [37].

Tablo 2 AH ile ilgili genler, kromozomal lokuslar ve patoloji üzerine etkileri [34]

Kromozom	Gen	Başlangıç Yaşı	Patern	Varyant/Mutasyon	Etki
Ch21q21.3	APP	30-60 yaş	OD	20 (ekzon 16,17)	A β Yapımı ve Agregasyonu $\uparrow\uparrow$
Ch14q24.13	PS1	30-50 yaş	OD ve ailesel	135 (ekzon 4+12)	A β Yapımı ve Agregasyonu $\uparrow$
Ch1q31.42	PS2	50-70 yaş	OD	10 (ekzon 4,5,7)	A β Yapımı ve Agregasyonu $\uparrow$
Ch19q13.2	ApoE	50-80+ yaş	Ailesel/ Sporodik	3 izoform	A β 'nın Plaklarda Depolanmasını $\uparrow$

2.1.1. AH Gelişimine Eşlik Eden Patofizyolojik Süreçler

Yapılan yaygın çalışmalara rağmen AH'nın nedeni henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Şu an için sadece hastalığın gelişimine eşlik eden bazı nöropatolojik değişiklikler tanımlanmış durumdadır. Bunlar:

- Amiloid plak (AP)
- Nörofibriler yumak (NFY) “Neurofibrillary Tangle” (NFT)
- Gliyozis ve enflamasyon
- Oksidatif hasar
- Nöron ve sinaps kaybı
- Kolinerjik invazyon ve diğer nörotransmitterlerin kayıpları şeklinde sıralanabilir.

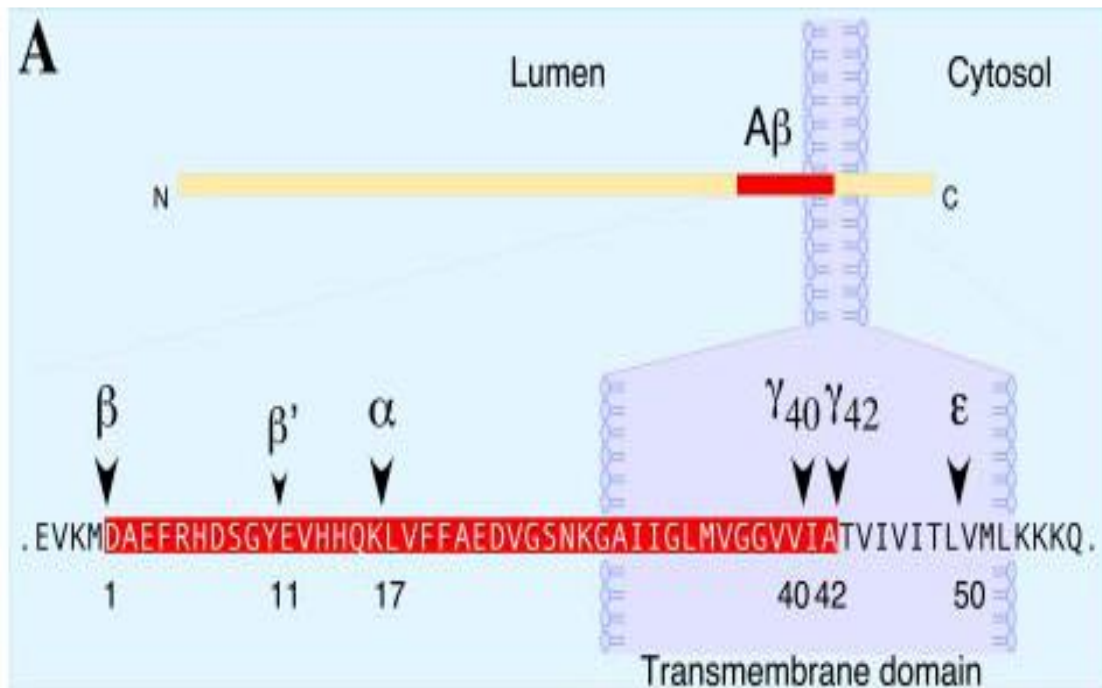
AH'nın patofizyolojik süreçleri bu başlıklar altında incelenecektir.

2.1.2. Amiloid Plak (AP) Oluşumu

Amiloid plakların temel bileşeni molekül büyüklüğü 4 kDa olan A β 'dir. A β , bir transmembran protein olan amiloid öncül proteinin “Amyloid Precursor Protein” (APP) metabolizma ürünlerinden biridir. Bu ürünün birikimi AH'nın değişmez özelliğidir. Ancak yine de AH'nın patogenezindeki A β 'nin oynadığı rol çok az anlaşılmıştır. Hücre kültürlerinde A β 'nin nöronlara toksik olduğu gösterilmişse de AH lezyonları ile in vitro aktivite arasındaki ilişki tam olarak aydınlatılamamıştır. A β birikiminin AH'nın gelişiminde primer bir rol mü oynadığı yoksa sekonder bir olayın kalıntıları mı gösterdiği halen tartışılan bir konudur. Ancak A β agregatlarının AH'nın bir sonucu olmasından çok hastalığın sebebi olduğuna dair artan kanıtlar mevcuttur. A β peptidinin aşırı üretimi ve birikimi sonucu potansiyel toksik etkisinin hastalığı başlatıcı ilk faktör olduğu görüşünün kabul edilmesi ‘‘**Amiloid Kaskad Hipotezi**’’ olarak bilinmektedir [5], [6], [44]

2.1.3. A β peptit öncülü Amiloid Prekürsör Protein (APP)

Proteazlar ile yıkım sonucu A β peptidini oluşturan APP; 21. kromozom üzerinde bulunan, ilk kez 1987'de tanımlanmış olan insan APP³ geni tarafından kodlanır. Alternatif splicing nedeni ile 563-770 amino asit arasında değişebilen uzunlukta 10 izoformu bulunur. APP, amiloid prekürsör-benzeri protein 1 ve 2 (APLP1 ve APLP2)'yi içeren küçük bir gen ailesinin üç üyesinden biri olarak bilinir. Hepsisi uzun bir ekstrasellüler bölge (ektodomain), bir transmembran bölge ve kısa bir sitozolik kuyruktan oluşan transmembran proteini kodlar ancak sadece tip 1 integral membran proteini olan APP A β parçası oluşumuna katılır (Şekil 1) [44].



Şekil 1: Amiloid prekürsör proteinin (APP) uzun hücre dışı bölgesi, transmembran bölgesi ve kısa hücre içindeki sitozolik kuyruğu [45]

APP farklı fizyolojik fonksiyonlara sahip olmakla birlikte işlevi tam olarak açıklanamamış bir glikoproteindir. APP'nin bazı fonksiyonel bölgeleri kesin olarak tanımlanmıştır. Bunlardan biri bakır ve çinko gibi metal iyonlara bağlanabilen bölgedir. Diğer ekstrasellüler matriks bileşenlerine (heparin, kollagen ve laminin) bağlandığı bölgedir. APP'nin heparin ve kollagen'e bağlanmasının ekstrasellüler matriks ile etkileşim için aracılık ettiği bildirilmiştir. APP'nin hücre adezyonu, hücre/hücre veya hücre/matriks etkileşimini düzenlemekte işlev gördüğü varsayılmaktadır.

İşlevi tanımlanan bir diğer bölge ise sadece APP751 ve APP770 izoformlarının amino terminal domainlerinde bulunan proteaz inhibisyon özelliği taşıyan fonksiyonel bölgedir. Serin proteaz inhibitörü (Kunitz proteaz inhibitör) (KPI) kodlayan bir bölge taşıyan APP'nin bu izoformları trombositler tarafından sentezlenir ve koagülasyon faktörlerinden faktör IX ve faktör XIa'ı inhibe eder. Nöronlar ise KPI bölgesi içermeyen APP 695 izoformunu ekspres ederler.

Bakır bağlama bölgesi ise tüm APP izoformlarında bulunmaktadır. Bu da bakır bağlama bölgesinin proteinin yapısı ve/veya işlevi için esansiyel olduğunu göstermektedir. APP Cu +2 'i Cu+1'e indirgeyebilmekte ve bir antioksidan gibi davranarak nöroprotektif etki gösterebilmektedir. APP'nin sitozolik bölümünün sinyal ileti yollarında rolü olduğu, içerdiği motiflerin sitozolik adaptör proteinlere bağlandığı ve transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girdiği, kaspazları (özellikle kaspaz 6 ve 8) tanıdığı ve kestiği bir bölge içerdiği farklı çalışmalar ile bildirilmiştir [5], [45]–[47].

APP'nin ekstrasellüler kısmının ortalarına denk gelen bölgede bulunan (403-407 pozisyonunda) aktif pentapeptid ile yapılan çalışmalarda bu kısmın etkisinin sadece fibroblast büyümesi üzerine sınırlı kalmadığı, hayvanlarda beyine infüzyon sonucu sinaptik yoğunluğu arttırdığı ve hafızayı güçlendirdiği gösterilmiştir.

APP gen bölgesinin 21. kromozom üzerinde olduğunun keşfedilmesi ile 21. kromozomun fazladan bir kopyasını taşıyan Down sendromlu bireylerde AH'nın çok erken

yaşlarda gelişmesinin nedeni açıklık kazanmıştır. Bu direkt gen dozaj etkisidir ve APP'nin artmış ekspresyonu ve dolayısı ile artan A β düzeyleri hastalık oluşumunu hızlandırır [45], [47].

2.1.4. APP Metabolizması Ve Nöronal Toksisite İle İlişkisi

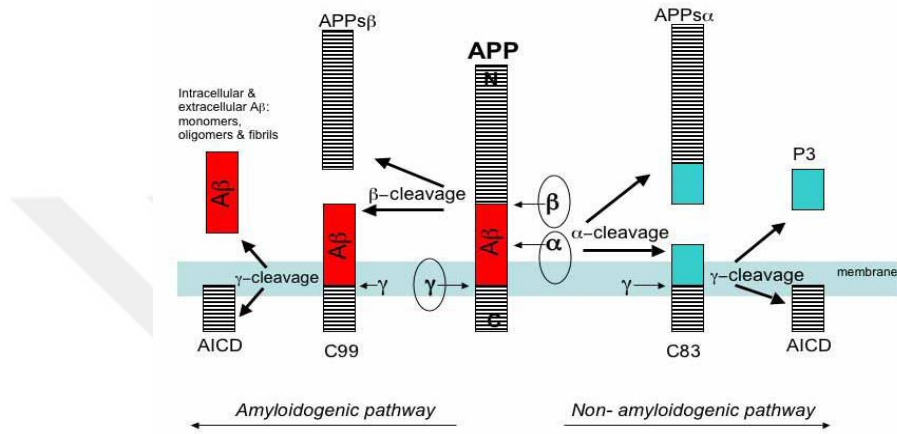
APP, “amiloidojenik” ve “amiloidojenik olmayan” olarak isimlendirilen iki alternatif yoldan biri ile proteazlar (α , β ve γ sekretazlar) tarafından proteolitik yıkımla metabolize edilebilmektedir. AH histopatolojisindeki senil plakların yapı taşı, amiloidojenik yolak hipotezinin kalbi A β ; APP'nin β ve γ sekretazlar ile ardışık yıkımı sonucu meydana gelmektedir (Şekil 2).

Amiloidojenik olmayan yolda, α -sekretaz APP'i tam A β dizisinin ortalarına denk gelen hücre dışı bölgede (Lys16 ve Lys17 arası) kesmekte ve tam bir A β parçasının oluşumunu engellemektedir. α -sekretaz etkisiyle APP'den ayrılan büyük çözünebilir N terminal kısım APPs- β olarak isimlendirilir. Hücreler arası boşluğa salınan. APPs- β 'nin hafıza ve öğrenmeyi düzenleyici, nöronları koruyucu etkisi, olduğu çalışmalar ile desteklenmektedir.

Membrana bağlı kalan 83 aminoasitlik β -C-terminal kısım (β -CTF, C-Terminal Fragment) ise β -sekretazın etkisi ile yıkılarak 3 kDa'luk p3 fragmanı adı verilen bir parçanın hücre dışına salıverilmesine neden olur. Bu ektodomain çözünebilir yapıdadır ve amiloidojenik değildir. Kalan membrana bağlı p7 fragmanı APP intrasellüler domaini (AICD) adını almaktadır.

β ve γ sekretazlar etkilerini, sırasıyla A β bölgesinin hemen dışındaki N- ve C- uçlarında göstererek tam A β oluşumuna neden olarak amiloidojenik yolağı başlatmaktadırlar. β -sekretaz aktivitesi ile APP'nin ektodomaini (APPs- β) hücre yüzeyinden hücrelerarası boşluğa salıverilmekte ve A β dizisini içeren 99 aminoasitlik β -C-terminal kısım (β -CTF) ise membrana tutunmuş şekilde kalmaktadır. Bu parça da γ -sekretaz tarafından kesilerek A β peptidi oluşmaktadır [45], [47]–[49].

γ -sekretaz'ın etkinlik gösterdiği kesim bölgesine göre, oluşan $A\beta$ parçası, kısa (39-40 aminoasit) veya uzun (42-43 aminoasit) olabilir. Uzun $A\beta$, çözünürlüğü olmayan lifler oluşturmaya daha yatkındır ve nörotoksisite olasılığı daha yüksektir. $A\beta_{1-40}$ 40 aminoasit kalıntısından oluşan ve en sık (>%60-70) karşılaşılan fragmandır, suda ve sıvı ortamda nispeten çözünebilir yapıdadır. İkinci en sık (~%15) karşılaşılan form $A\beta_{1-42}$ 42 aminoasit kalıntısından oluşur. Bunların yanı sıra $A\beta_{1-28}$, $A\beta_{1-33}$, $A\beta_{1-34}$, $A\beta_{1-37}$, $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-39}$ gibi daha az oranda bulunan formları da vardır [47], [50], [51].



Şekil 2: Amiloid prekürsör proteininin (APP) sekretazlar ile kesimi

AP'ların moleküler kompozisyonu 1980'li yılların ortalarında Glenner ve arkadaşları tarafından plağın en büyük komponenti olan amiloid proteinin saflaştırılması ve protein diziliminin belirlenmesi sonucunda tanımlanmıştır. Şekil 3'de 42 aminoasit uzunluğundaki $A\beta$ peptidin aminoasit dizilimi görülmektedir. Amfipatik özelliğe sahip $A\beta$ peptidin C-terminaldeki 12-14 aminoasitlik kısmı oldukça hidrofobik olup N-terminal kısım hidrofiliktir [5].

AP baskın olarak $A\beta$ peptid içermekle birlikte ApoE, TAU protein gibi diğer bazı proteinleri de içerebilmektedir [52]. ApoE'nin amiloid birikimi üzerine etkilerini araştıran bazı çalışmalarda ApoE4'ün $A\beta_{1-42}$ birikiminden çok $A\beta_{1-40}$ birikimine yol açtığı saptanmıştır. ApoE4'ün $A\beta_{1-40}$ 'ın fibrilizasyon eşiğini düşürerek etki gösterdiği düşünülmektedir [43], [53].

$A\beta$ birikimi başlangıçta selim olup NFY'lerin aksine limbik sistemde değil, neokortekste ve gevşek (diffuse) plaklar şeklindedir, zaman içinde patojenik senil (nöritik) plaklara dönüşür. Bu dönüşümde pek çok etken yer almaktadır. Bunlardan en önemlisi tau proteindir. Tau proteini varlığında $A\beta$ birikintilerinin kademeli olarak patojenik nöritik

plaklara dönüştükleri gösterilmiştir [54]. Bu dönüşümü başlatan bir diğer olası neden serbest radikal ve reaktif oksijen türleridir. Bu olası oksidatif stres açıklaması, vitamin E, selegilin, melatonin ve ginkgo biloba gibi antioksidanların AH'na yararlı etkileri olabileceğini öne süren hipotezlere bir dayanak oluşturmaktadır.

A β beyinde hücre içi veya hücre dışı yerleşimli olarak çözünür, çözünmez formlarda, monomerden yüksek molekül ağırlıklı oligomerlere, fibrillere ve hatta plağa kadar değişen şekillerde bulunabilir (Tablo 3 ve şekil 3).



Tablo 3: A β fibrilizasyon yolağındaki ara ürünler [5]

Aβ TÜRLERİ	ÖZELLİKLERİ
Monomerler	Çözünür, amfipatik molekül, α -helikal, random coil veya β -tabaka yapısı gösterir
Dimerler	İn vitro, in vivo ve insan beyin ekstraktlarında gözlenen hidrofobik çekirdeğe sahip hücre içi yerleşimli yapılardır
Trimerler	İn vivo fare modellerinde gözlenmiş olup toksik oligomerlerin alt birimleridirler
Küçük (globüler) oligomerler	3-50 monomerden oluşan in vivo AH hastalarında, fare modellerinde ve in vitro gözlenen çoğunlukla stabil olmayan, geçici, fakat toksik yapılardır
Anüler (halkasal) oligomerler	Hücre kültürü ve in vitro deneylerde patojenik, membran yapısını bozan, düzensiz iyon kanalları veya küçük delikler (por) olarak potansiyel role sahip yapılar olarak tanımlanırlar
ADDLs "A β -Derived Diffusible Ligands"	İn vitro olduğu gibi sıçan ve insan beyin ekstraktlarında da gözlenebilen fibriller olmayan, nörotoksik 17-42 kDa'luk trimerden 24mere kadar değişenbüyükükdte yapılarıdır
Protofibriller	Kısa, esnek, çubuk benzeri yapı gösteren in vitro saptanan toksik, olgun fibrillerin prekürsörü olan Congo red ve thioflavin T ile bağlanabilen yapılarıdır. Boyutları en fazla 8x200 nm'dir.
Fibriller	İn vivo AH hastalarda ve fare modellerinde ve in vitro gözlenen Congo red ve thioflavin T ile bağlanabilen stabil,yapısal olarak organize, tekrarlayan A β birimlerinden oluşan çözünmez, filamantöz A β agregatları perpendicular to fiber axis. Pek çok protofibrilin birbiri etrafında sarılıp bükülmesi ile oluşan yapılarıdır
Plaklar	İn vivo AH hastalarında ve fare modellerinde gözlenen geniş hücre dışı A β birikimleri olup predominantly fibrillerden oluşan toksik olmayan yapılarıdır.Distrofik dendritler, aksonlar, aktive mikroglialar ve reaktif astrositler ile çevrilidirler.

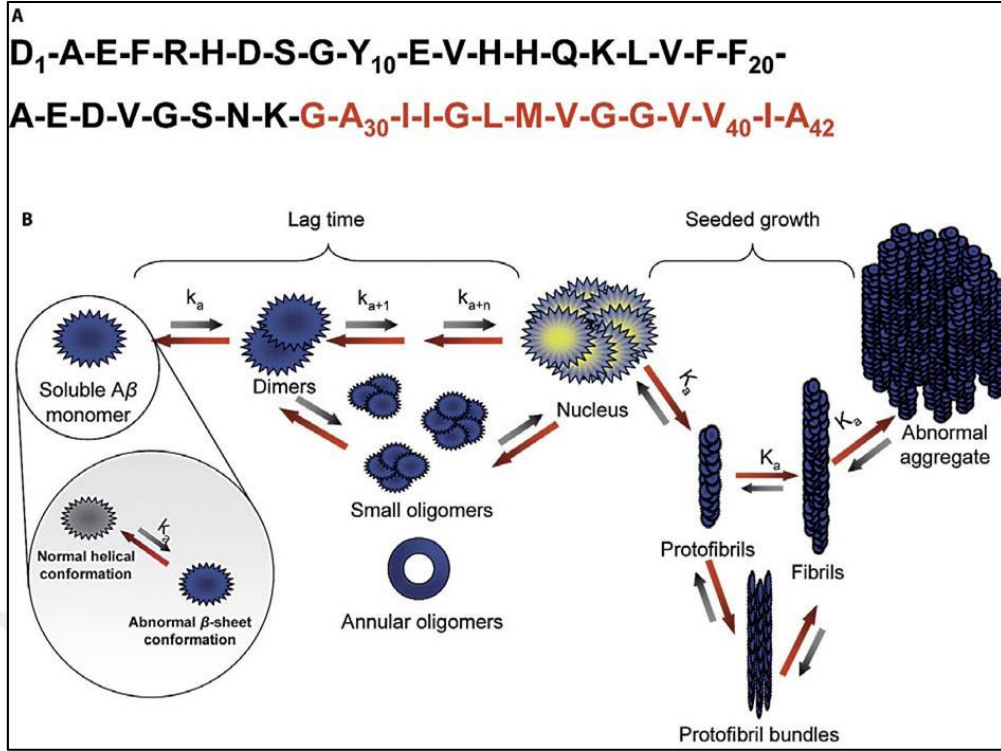
Çözünür formdaki A β monomerleri ağırlıklı olarak random coil ve α -helikal katlanmış peptid olarak bulunurken, çözünmez A β ise β tabaka yapısı gösterir ve katı (compact) plak oluşumuna katılır.

A β ve nörotoksisite üzerine yapılan çalışmalarda başlangıçta dikkatler A β fibrillerine odaklanmış olsa da son 10 yıldır yapılan çalışmalar ile düzensiz (lower-order) A β demetlerinin nörotoksik olduğu gösterilmiştir. AH olan hastaların beyinlerinde çözünür A β oligomer miktarı ile hastalığın semptomları arasında çözünmez plaklar ile kıyaslandığında çok daha iyi bir korelasyon bulunduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda AH olan insanların beyin dokularında çözünür A β oligomer konsantrasyonları yüksek bulunmuş ve bu çözünür oligomerlerin oluşumunun AH semptomlarının ortaya çıkışından daha önce meydana geldiği vurgulanmıştır.

Plakların hücre dışı yerleşimi, toksisitenin A β 'nın nöronlara hücre dışından saldırısı sonucu ortaya çıktığı varsayımını ortaya koymuştur. Ancak hücre kültürlerinde ve rat beyin dokularında A β 'nın hücre içi varlığının gösterilmesi ve hücre içi fibriller olmayan A β oligomerlerinin insan nöronlarında sitotoksisiteye neden olduğunun gösterilmesi ile hücre dışı A β türlerine ait varsayımın önüne geçilmiştir.

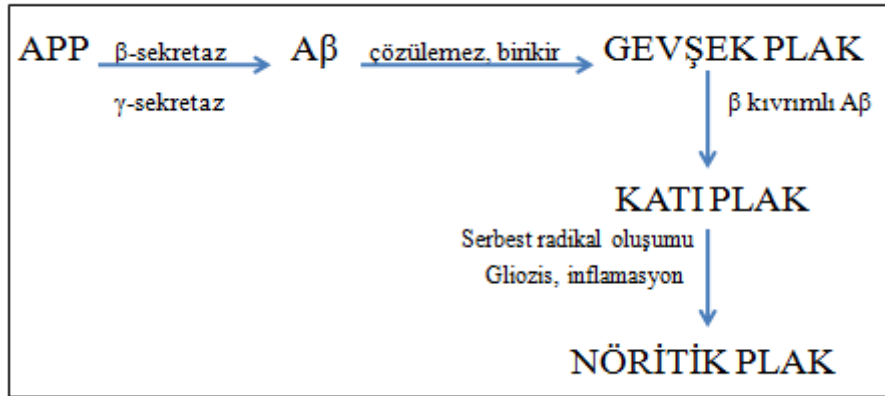
Küçük A β oligomerlerinin çözünmez A β fibrillerinden daha yüksek sitotoksisite göstermesi nedeniyle küçük A β oligomerleri ilgi odağı haline gelmiş ve bunlarla ilgili farklı çalışmalar yapılmıştır. İn vitro A β 1-42 oligomerizasyonunu başlatan olay ‘‘paranuclei’’ olarak isimlendirilen çoğu yapısal olmayan pentamerlerin/hekzamerlerin çekirdek yapısı oluşturmalarıdır.

Çözünür A β monomerlerinin β tabaka yapısına dönüşümü ile başlayan agregasyon yolağında çekirdek yapısı oluşumuna kadar geçen süreç duraklama zamanı ‘‘lag time’’ olarak bilinir ve bundan sonra protofibril, fibril ve plak oluşumuna kadar geçen süreç hızlı büyüme ‘‘seeded growth’’ dönemidir [5].



Şekil 3: İnsan Aβ1-42 peptidinin amino asit dizilimi. Aβ'nin hidrofobik transmembran kısmı kırmızı renk ile gösterilmiştir. D = Aspartat; A = alanin; E = glutamat; F = fenilalanin; R = arjinin; H = histidin; S = serin; G = glisin; Y = tirozin; V = valin; Q = glutamin; K = lizin; L = lösin; N = asparajin; I = izolösin; M = metionin. B. Aβ fibrilizasyonunun şematik görüntüsü [5]

Nöritik olmayan katı plaklar demanssız beyinlerde de görülebilir ancak bunlar da lokal nörotoksisite ile hücre ölümü ve nöritik dejenerasyona neden olmaktadır. Bu aşamadan sonra dejenere nöritler içeren katı plaklar nöritik plaklar adını alır. Sonuç olarak nöritik (senil) plaklar nörofiller içinde bulunan Aβ peptidten oluşmuş amiloid çekirdek ve anormal nöritler ile glial hücrelerden oluşan karmaşık yapılardır (Şekil 4). Bu plaklar elektron mikroskopuyla görülebilirler ve distrofik nöritlerin varlığı nöritik plakların karakteristik özelliğini oluşturur [30].

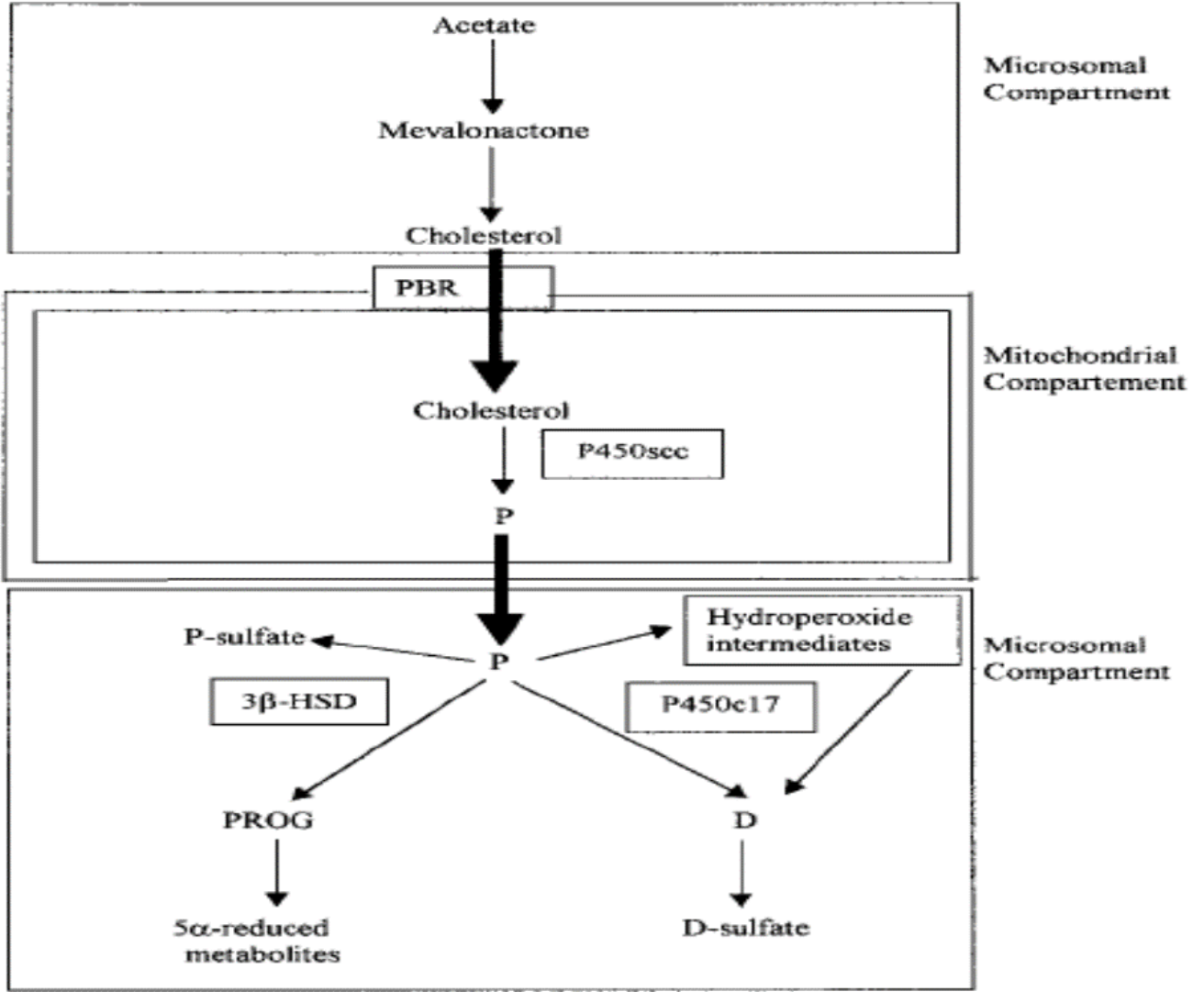


Şekil 4: APP proteolizinden nöritik plak oluşumuna kadar geçen süreç [30]

2.2. Nörosteroidlerin Biyosentezi

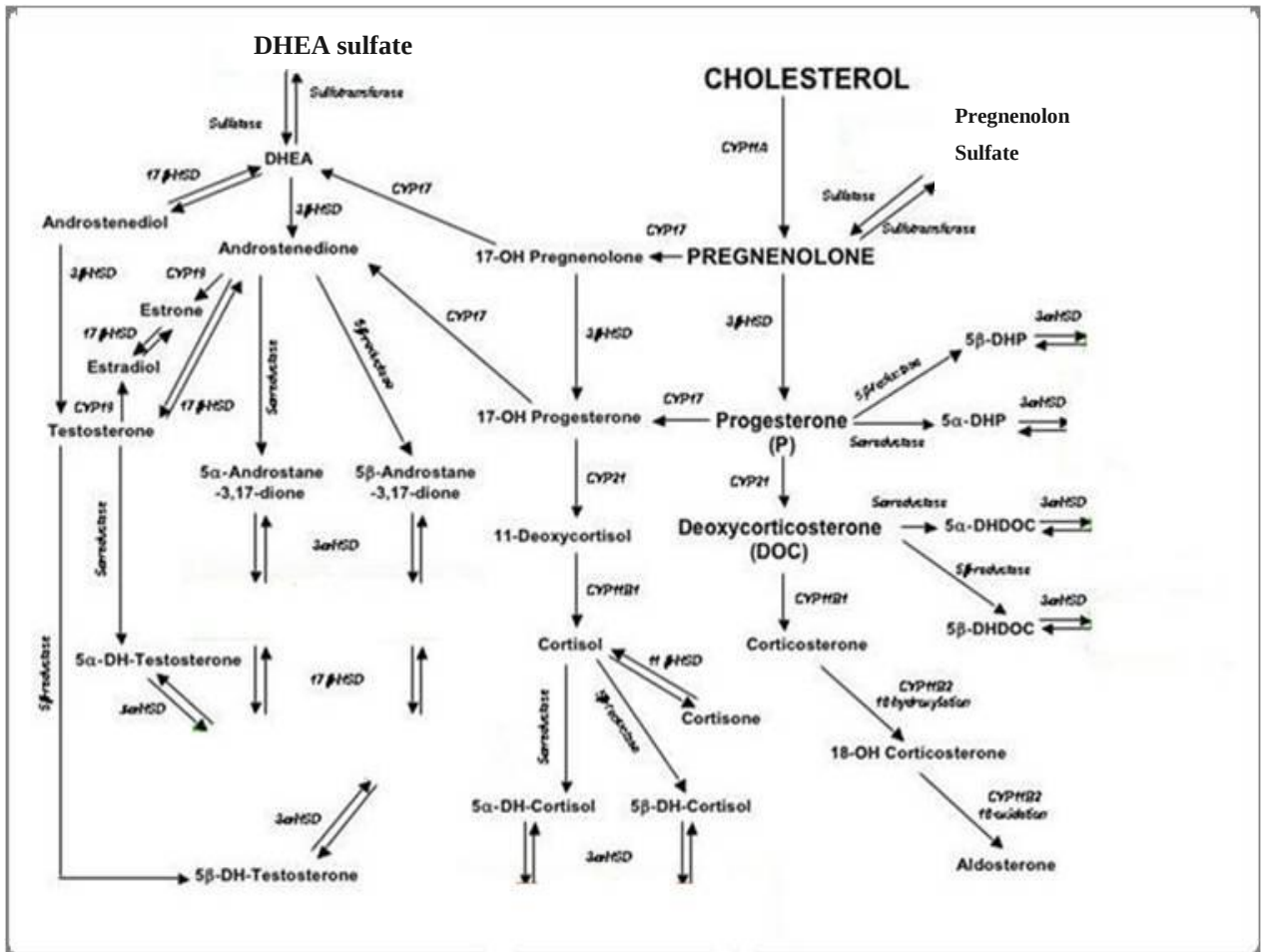
Sıçanlarda adrenalectomi ve gonadektomi yapıldıktan ve maymunlarda da adrenal baskılanma sağlandıktan sonra sinir sisteminde steroid hormon varlığının devam etmesi sinir sisteminde steroid sentezini destekleyen pek çok kanıttan birkaçıdır [55]–[57]. Steroid sentezi kolesterolün pregnenolona dönüşüm basamağı ile mitokondride başlar. Bu basamak sitokrom P450 kolesterol side-chain cleavage (P450scc) enzimi tarafından katalizlenir ve tüm steroid hormonlarda olduğu gibi nörosteroidlerin sentezinde de hız kısıtlayıcı basamaktır.

Kolesterolden P'na dönüşümü sağlayan P450scc enzimi beyinde beyaz cevherde ve özellikle oligodendrositlerde bulunur [58]–[61]. Mitokondri dış zarındaki periferik benzodiazepin reseptörü (PBR) mikrozomal kompartmanda bulunan kolesterolün iç zara bağlı P450scc enzim kompleksi ile etkileşime girmesine yardım eder ve mitokondrial kompartmanda kolesterol P'e steroid biyosentez yolağının ilk hız kısıtlayıcı basamağı olan CYP11A (P450scc) tarafından dönüştürülür (Şekil 5). Sentezlenen P mikrozomal kompartmana geçtikten sonra endoplazmik retikulumun 3 β -hidroksisteroid dehidrogenazı (3 β -HSD) ile progesterona okside olur, CYP17 (P450c17) enzimi ile de P'den DHEA oluşur [62]. P ve DHEA'nun PS ve DHEAS'a dönüşümü sitozolik enzimler ailesinden hidroksisteroid sülfotransferaz (HST; EC 2.8.2.2) enzimi tarafından katalizlenir. Bu enzim 3'-fosfoadenozin 5' fosfosülfat (PAPS)'ın sülfonat kısmını steroidlerin 3-hidroksi bölümüne transfer eder [13], [63]. Pregnenolonun sentezinden sonraki bu basamakların oligodendroglial hücrelerin dışında astrosit ve nöronlarda gerçekleştiği ileri sürülmektedir.



Şekil 5: Steroid sentezinin mikrozomal ve mitokondrial kompartmandaki bölümleri [15].

Steroid hormonların biyosentez basamakları ve bu basamaklarda yer alan enzimler şekil 6'da gösterilmiştir.



Şekil 6: Steroidlerin biyosentez yolağı [64].

CYP11A=P450scc=sitokrom P450 kolesterol yan zincir kırıcı enzim (Kolesterolün pregnenolona dönüştürüldüğü ilk hız kısıtlayıcı basamak); Sülfotransferaz (HST=EC 2.8.2.2 =SULT2B1a=Pregnenolon sülfotransferaz)(P'den PS'a oluşumunu katalizleyen enzim); 3β-HSEM=3β-hidroksisteroid dehidrogenaz; 3α-HSEM=3α-hidroksisteroid dehidrogenaz; 17β-HSEM=17β-hidroksisteroid dehidrogenaz; CYP17 =P450c17; DHEA: Dihidroepiandrosteron; DHEA-S: Dihidroepiandrosteron sülfat; DHP: Dihidroprogesteron; THP: Tetrahidroprogesteron; 3α,5β-THP: Pregnanolon; 3α,5α-THP: Allopregnanolon; DHDOC: Dihidrideoksikortikosteron; THDOC:tetrahidrideoksikortikosteron; 3α,5α-THDOC: 3α,5α tetrahidrideoksikortikosteron

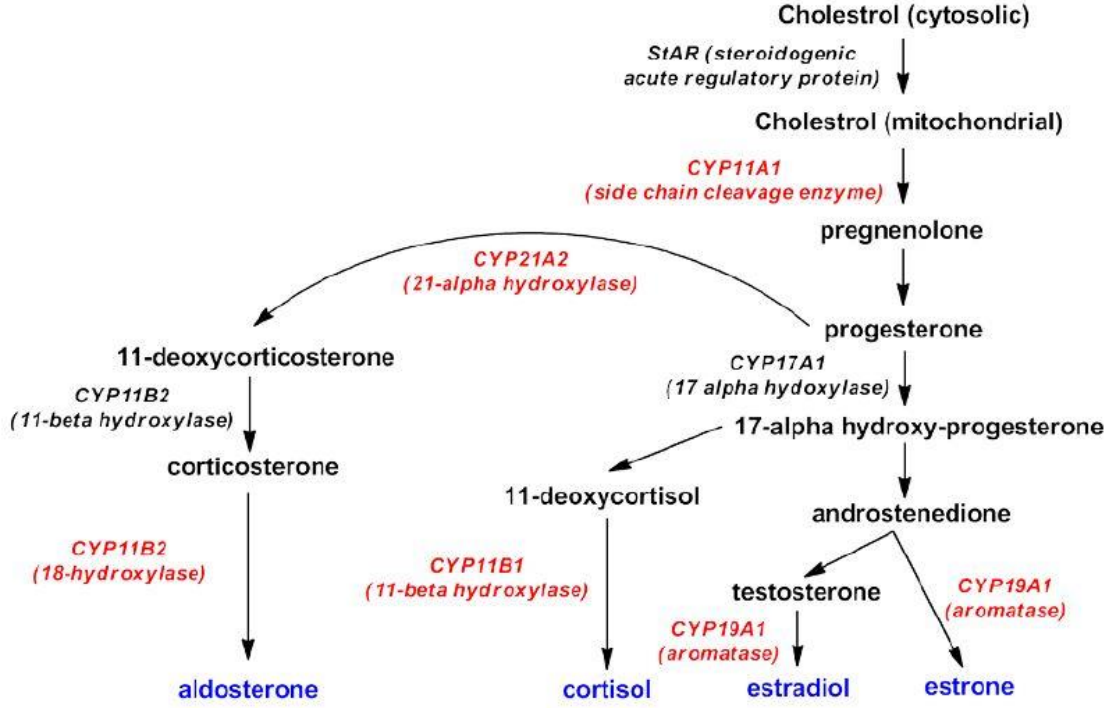
Sentezdeki biyokimyasal yolların çoğu açığa çıkarılmış olmasına rağmen, NS yapan hücrelerin aktivitesini kontrol eden düzenek halen tam olarak bilinmemektedir. GABA'nın kendisi ve reseptör kompleksinin, NS sentezinde görevli enzim aktivitelerini baskıladığı

gösterilmiştir. Nöroaktif steroidlerin de GABAA reseptör etkinliğini değiştirerek kendi sentezlerini düzenleyebildikleri bildirilmektedir [65].

2.3. Aminoglutetimid

Aminoglutetimid (AMG), klinikte Cushing sendromunun tedavisi için kullanılan bir anti-steroid (Cytadren) ilaçtır. AMG, kolesterolden türev alan farklı steroidlerin oluşumunu iki farklı mekanizma ile bloke eder. AMG, aromataz aktivitesini inhibe ederek, androstenediondan ve testosterondan östrojen üretimini engeller [66], [67]. AMG'nin yarılanma ömrü 12.5 saat olduğu hesaplanmıştır. Ancak 32 haftalık bir tedavi süresinden sonra 7 saate kadar düştüğü gözlenmiştir. Bunun, AMG metabolizmasının hepatik enzimler tarafından indüklenmesi ile gerçekleştiği düşünülmektedir [68]. Diğer taraftan, P450scc enzimini inhibe ederek, kolesterolün pregnenolona dönüşümünü engeller [69]. Böylece, hormonal aktivite gösteren tüm steroidlerin sentezini azaltır. Steroidogeneizde yer alan bilinen beş enzimin AMG tarafından inhibe edildiği bilinmektedir ve Şekil 1.3'te gösterilmiştir: 20, 22-desmolaz, CYP21A2 (21-alfa hidroksilaz), 11 CYP11B2 (aldosteron sentaz, 18-hidroksilaz), CYP11B1 (11-β-hidroksilaz) ve CYP19A1 (aromataz).

Yapılan çalışmalarda adrenal kolesterolü metabolize eden bir enzim olan CYP11A1'in inhibisyonunun mitokondriyal kolesterolün pregnenolona dönüşümünde rol aldığı gösterilmiştir. [70]–[74]. Ek olarak, sıçan beyni mitokondrisi ve sıçan Leydig hücrelerinde CYP11A1 inhibisyonuna dair bulgular da mevcuttur. [74], [75]. P45011B1 olarak adlandırılan başka bir P450 enziminin AMG tarafından inhibisyona duyarlı olduğu ve böylece in vitro kortizol seviyelerini düşürdüğü gösterilmiştir [76], [77]. Aldosteron sentaz tarafından aldosteron kortikosteronunu üretmek için P450'ye bağlı CYP11B2 in vitro koşullarda inhibe olduğu rapor edilmiştir [78]. Ayrıca progesteronun 11-deoksikortikosterona dönüşümünden sorumlu CYP21A2 (21-alfa hidroksilaz) inhibisyonuna dair de bazı kanıtlar vardır [79]. AMG'nin son hedefi kortizol ve androjenlerin adrenal biyosentezinin inhibisyonu değil estradiol'ün inhibisyonudur. AMG'nin, meme kanseri hücrelerinde hücre büyümesinin kilit bir indükleyicisi olan androstenedionun hidroksilasyonu ile estrona, testosterondan estradiole, rol oynayan bir enzim olan CYP19A1 (aromataz)'i inhibe edebildiği gösterilmiştir (Şekil 7) [72],[80]–[82].



Şekil 7 Farklı P450 enzimlerinin AMG etkisi ile inhibisyonu.

Ticari olarak mevcut AMG, rasemik karışım formunda bulunur. Yapılan in vitro çalışmalar, aromataz aktivitesinin inhibisyonunda deksamino-glutetimidin (D-AMG) L-AMG'e göre kat daha etkili olduğunu göstermiştir[83], [84]. Öte yandan, L-AMG ise kolesterol yan zincirlerinin kesiminin inhibisyonunda D-AMG'ye kıyasla daha etkilidir [85].

Bastida ve ark. 'nın 2001 yılında yaptığı çalışma, AMG'nin protein kinaz A'yı inhibe ettiğini göstermesi açısından önem taşımaktadır. Ayrıca, bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, AMG'nin cAMP tarafından düzenlenen steroidojenik genler aracılığıyla steroidojenik yolağı dolaylı olarak inhibe edebileceğini göstermektedir [86].

Shirakawa ve ark. 'nın 2006 yılında yaptığı çalışmada, uzun dönem AMG uygulamasının NMDA reseptörleri aracılığı ile oluşan glutamat sitotoksitesini azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca, uzun dönem AMG ön uygulaması, NMDA reseptörlerine bağımlı iskemik nöronal hasarı da engellemektedir [23]. Elde edilen sonuçlar, AMG'nin eksitotoksik ve iskemik hasarlara karşı yeni nöroprotektif etkilerinin gösterilmesi açısından önem taşımaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Çalışma deneysel nitelikte in vitro bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Çalışmanın deneyleri Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda Haziran 2012-2014 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grubu

Çalışmamızda sıçan kaynaklı PC-12 feokromasitoma hücre kültür hattı kullanılarak farklı deney modelleri oluşturuldu.

I- AB toksisitesi ve toksisitenin hücre canlılığı ve nörosteroid düzeylerine etkisi

II- Aminoglutetimidin AB toksisitesi üzerine etkisi

Oluşturulan tüm deney koşulları kendi içinde üçer kez ve farklı zamanlarda en az 3 kez olmak üzere tekrarlanarak n=9 olacak şekilde teyit edildi.

3.4. Çalışma Materyali

Çalışmamızda AB peptit toksisitesi ile ilişkili hücre kültürü modellerinde sıklıkla kullanılan ve nöroendokrin karaktere sahip olduğu gösterilen PC-12 hücre hattı kullanıldı [87]–[90]. PC-12 hücre hattı ticari olarak DSMZ(DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN; DSMZ ACC159) hücre kültür bankasından temin edildi.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Bağımlı değişkenler: Hücre canlılığı ve estradiol, androstenedion, testosteron, estron DHEA ve pregnenolon seviyeleri

Bağımsız değişkenler: AB konsantrasyonu ve AMG konsantrasyonu

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Araştırmada Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan cihazlar ve kimyasal malzemeler Tablo 4 ve Tablo 5'te listelenmiştir.

Tablo 4: Cihaz Listesi

CİHAZIN ADI	MODELİ
Laminer-air flow	Holten Lamin Air Biosafe 1.2
Karbondioksit inkübatörü	Nuaire Us Autoflow NU-4750
Ters-faz ışık mikroskobu	Nikon Eclipse TS-100
Santrifüj	Eppendorf 5810R
Derin dondurucu (-80°C)	Thermo Forma Model 705
Derin dondurucu (-20°C)	Arçelik 2031
Azot tankı	MVE Cryogenics cryosystem 4000
Plak okuyucu	BioTek ELX 800
Buz makinası	Scotsman AF-100
Otoklav	Hirayama HICLAVE HV-50
Etüv	Thermo Heraeus
Sonikatör	Sonic Materials
pH metre	Orion, USA Model 420
Hassas terazi	Precisa XB 220 A
Saf su cihazı	Milipore Mili-Q ZLX55003Y
HPLC cihazı	Shimadzu LC

Tablo 5: Kimyasal Listesi

KİMYASAL MALZEME ADI	ÜRETİCİ FİRMA-KOD
Pregnenolon	Fluka 81630 / Sigma P 9129
Pregnenolon Sülfat	Sigma P 162
Aminoglutetimid (AMG) (Enzim inhibitörü)	Sigma A-123
Ultra saf su	Biochrom L0020
Asetik asit	Merck K24209656 728
Etanol	Riedel-de Haen 32221
Metanol	Riedel-de Haen 34860
Fetal sıgır serumu (FBS)	Biochrom S01115
Donör at serum (DHS)	Biochrom S9133
RPMI 1640	Invitrogen 21875034
Sıgır serum albumin (BSA)	Thermo 23209
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma D 5796
Poli-D-Lizin	Sigma P1149
PBS (phosphate buffered saline)	Biochrom L1815
MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)	Appllichem A2231,0001
Amiloid beta fragman 25-35	Sigma A4559
BCA Protein kiti	Pierce 23225
DMSO (Dimetil sülfoksit)	Sigma D2650
Tripsin-EDTA	Biochrom L2143
Penisilin/Streptomisin	Biochrom A2210
Triton X-100	Sigma T 8787

3.6.2. Hücre Kültürü

Bu çalışmada AB peptit toksisite modelinin oluşturulması için sıçan feokromasitoma hücre hattı (PC-12) kullanıldı [87]–[90]. Nöroendokrin karakterde olan PC-12 hücreleri, adrenal medullanın kromaffin hücrelerinden gelişen feokromasitoma tümöründen köken alır ve AB peptit toksisitesi ile ilişkili hücre kültürü modellerinde sıklıkla kullanılmaktadır.

PC-12 hücrelerinin tutunmalarını kolaylaştırmak amacıyla kültür kaplarının yüzeyleri kullanım öncesi poli-D-lizin (10 µg/mL) ile kaplandı. PC-12 hücreleri büyüme ortamı olarak %10 DHS, %5 FBS ve %1 penisilin-streptomisin ile takviye edilmiş RPMI 1640 kullanıldı. Deneylere geçmeden önce hücreler %70-80 sıklıkta oluncaya kadar hücre sayısının iki katına çıkma süresine göre (katlanma zamanı) ~ 2-3 günde bir %15 serum içeren kültür ortamları ile beslenerek nemli atmosfer ve %5 CO₂ basıncı altında 37 °C’de inkübatör içinde tutuldu. PC-12 hücreleri %70-80 sıklıkta olunca pasajlanarak deneyler için uygun 96’lı/6’lı hücre kültür kaplarına her kuyucukta 2x10⁴ veya 2x10⁶ yoğunluğunda hücre sayısı olacak şekilde ekildi. İlk 18-24 saat boyunca hücreler plak yüzeyine yapışabilmeleri için %15 serumlu ortam, nemli

atmosfer, %5 CO₂ basıncı altında 37 °C’de tutulduktan sonra hücrelerin deneyler süresince çoğalmasını yavaşlatmak ve serumun içerebileceği koruyucu faktörlerin etkisinden kurtulmak amacı ile kültür kapları içindeki ortamların yarısı çekilip atılarak (96 kuyucuklu kap için 1 mL, 6 kuyucuklu kap için 100 µL) aynı oranlarda %1.5 serum içeren ortamlar (deney koşuluna göre uygun konsantrasyonda hazırlanmış olan kimyasal solüsyonlar) ile değiştirildi.

3.6.3. AB Peptit Toksisitesinin Belirlenmesi

AB25-35 peptit solüsyonlarının hazırlanması: AB fragmanının stok solüsyonlarının hazırlanması için Ultra saf su ve DMSO kullanılarak AB fragmanı stok solüsyonlar hazırlandı, stok solüsyonlar tükeninceye kadar -20°C’de saklandı. PC-12 hücreleri için sırası ile %1.5 serum içeren ortamlar ile seri seyreltmeler yapıldı. Kullanılacak olan çalışma solüsyonları, her deneyden önce taze olarak hazırlandı.

AB peptidinin yapılan ön deneyler ile kontrol grubuna göre ~ %50 canlılığı azaltan konsantrasyonu toksisite uygulama dozu olarak belirlendi. PC-12 hücreleri için AB 25-35 fragmanı (20µM) konsantrasyonda, hücre kültür ortamına eklendi. Hücreler 37°C’de 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edildi.

AB stok solüsyonunun hazırlanmasında çözügen madde olarak kullanılan DMSO’in hücreler üzerinde toksik etki oluşturmaması için, DMSO son konsantrasyonu <%0.5 olacak şekilde hesaplandı. Ayrıca, hücrelere farklı konsantrasyonlarda (%2, %1, %0.5ve %0.25) DMSO uygulaması yapılarak hücre canlılığı değerlendirildi. Kontrol grubuna göre % 1 ve altında DMSO uygulaması ile hücre canlılığında anlamlı bir fark saptanmadı.

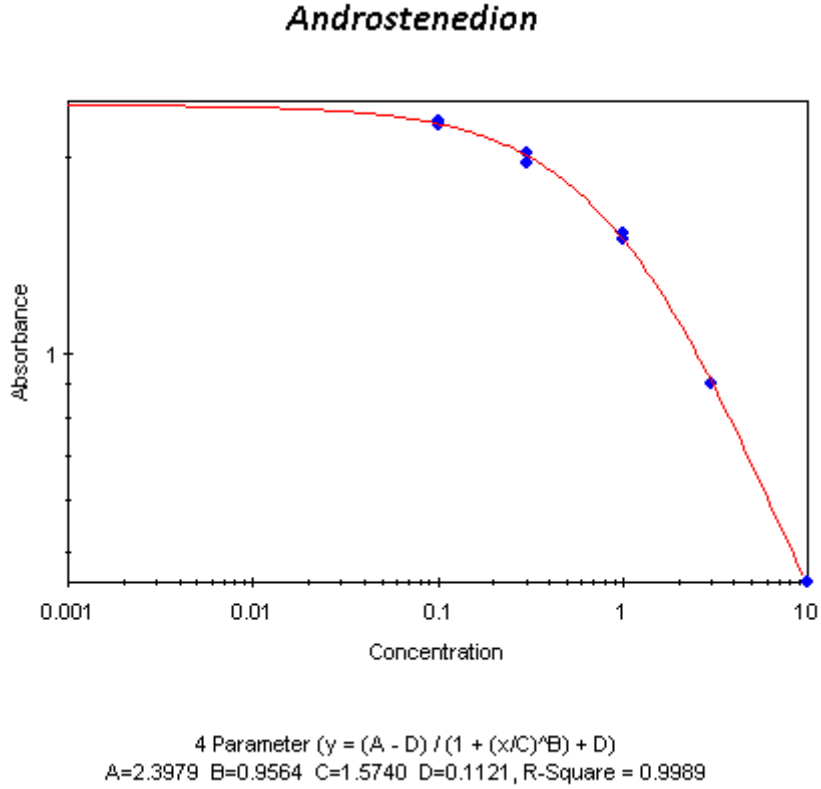
3.6.4. Pregnenolone sülfat düzeylerinin ölçümü

Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometri Sistemi (LC-MS/MS), aynı örnek içerisinde birden fazla analitin düşük oranda bulunduğu örneklerin tespit edilmesi için geliştirilmiş bir yöntem bütünüdür. Pregnenolone ve pregnenolon sülfat ölçümünde kullanılan sistem sıvı kromatografisi ve üçlü kuadropolden oluşmaktadır. İki adet iyonlaştırma kaynağı ile kütle spektrometride oluşan ana iyonlar kütle/yük oranına göre belirlenip; oluşan iyon kollizyon hücresinde azot gazı ile parçalanmış ve parçalanma sonucu oluşan iyonlar ikinci kütle spektrometrisinde kütle/yük oranlarına göre ayrılmıştır. Ölçümler, Rotakim analiz laboratuvarından hizmet satın alınarak gerçekleştirilmiştir.

3.6.5. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ölçümleri

3.6.5.1. Androstenedion analizi

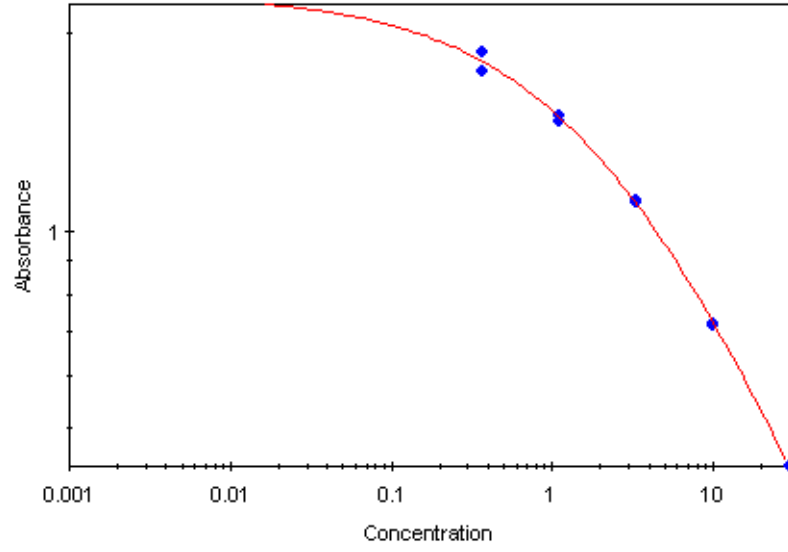
Androstenedion analizi (DRG EIA-3265, Germany) ticari hazır kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Üretici protokolüne uygun olarak analizler hücre lizat örneklerinde gerçekleştirildi. Sonuçlar ng/mL olarak hesaplanmış ve kuyu hücre sayısı başına verilmiştir. Ölçümün dinamik aralığı 0,019-10 ng/mL'dir. Kalibrasyon grafiği aşağıda verilmiştir;



Şekil 8 Androstenedion kalibrasyon eğrisi

3.6.5.2. DHEA analizi

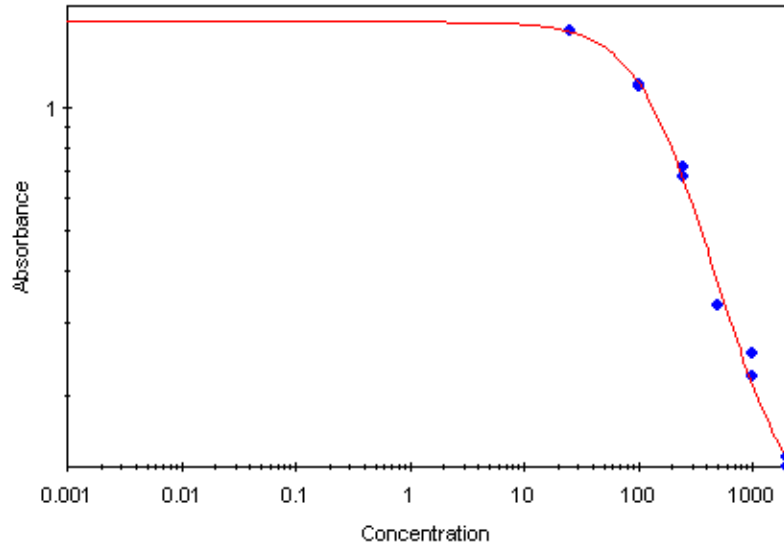
DHEA analizi (DRG EIA-3415, Germany) ticari hazır kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Üretici protokolüne uygun olarak analizler hücre lizat örneklerinde gerçekleştirildi. Sonuçlar ng/mL olarak hesaplanmış ve kuyu hücre sayısı başına verilmiştir. Ölçümün dinamik aralığı 0-30 ng/mL'dir. Kalibrasyon grafiği aşağıda verilmiştir;



Şekil 9 DHEA kalibrasyon eğrisi

3.6.5.3. Estradiol Analizi

Androstenedion analizi (DRG EIA-2693, Germany) ticari hazır kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Üretici protokolüne uygun olarak analizler hücre lizat örneklerinde gerçekleştirildi. Sonuçlar pg/mL olarak hesaplanmış ve kuyu hücre sayısı başına verilmiştir. Ölçümün dinamik aralığı 9,7-2000 pg/mL'dir. Kalibrasyon grafiği aşağıda verilmiştir;

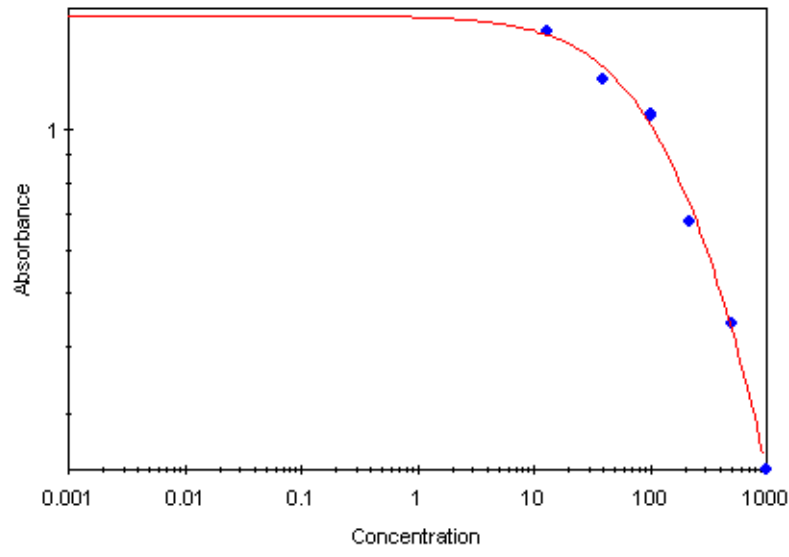


4 Parameter ($y = (A - D) / (1 + (x/C)^B) + D$)
A=1.6150 B=1.4403 C=175.1590 D=0.0975, R-Square = 0.9973

Şekil 10 Estradiol kalibrasyon eğrisi

3.6.5.4. Estron Analizi

Androstenedion analizi (DRG EIA-2693, Germany) ticari hazır kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Üretici protokolüne uygun olarak analizler hücre lizat örneklerinde gerçekleştirildi. Sonuçlar pg/mL olarak hesaplanmış ve kuyu hücre sayısı başına verilmiştir. Ölçümün dinamik aralığı 2,2-1000 pg/mL'dir. Kalibrasyon grafiği aşağıda verilmiştir;



4 Parameter ($y = (A - D) / (1 + (x/C)^B) + D$)
A=1.6295 B=0.9150 C=194.1383 D=-0.0751, R-Square = 0.9923

Şekil 11 Estron kalibrasyon eğrisi

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

Tablo 6: Çalışma İzlem Şeması

İş Paketi Ad/Tanım	AYLAR																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1. Literatür taraması ve periyodik bilgi paylaşımı toplantıları (15 günde bir olmak üzere)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2. Sarf malzemelerin satın alınması	x	x	x																					
3. Hücrelerin çoğaltılması				x																				
4. Toksikite oluşturan AB fragmanlarının ve AMG'nin konsantrasyon ve inkübasyon sürelerinin saptanması								x																
5. AMG ve AB uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesi															x	x	x	x						
6. Steroid sentez inhibitörlerinin hücre içi steroid hormon düzeyine ve hücre canlılığına etkisi																	x	x	x	x				
7. Verilerin gruplandırılması ve istatistiksel analiz								x			x				x					x	x	x	x	
8. Ara Raporların Hazırlanması						x					x						x							
9. Sonuç raporunun hazırlanması ve gelişmanın yayına hazırlanması																							x	x

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

İki farklı hücre hattında yapılacak uygulamalar için her bir koşul için hücreler çalışma içi ve çalışmalar arası olmak üzere en az üçer kez ekilerek deneyler gerçekleştirilecektir. Her bir koşul için elde edilecek olan verilerin ortalama ve standart sapma değerleri belirlenecektir. Kontrol ve deney grupları arasındaki fark Student's t test analizi SPSS 11,0 programı ile $p < 0.05$ anlamlılık düzeyinde kontrol grubundan elde edilen veriler ile karşılaştırılarak değerlendirilecektir.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışmamızda yalnızca bir hücre hattı kullanılmıştır. AB'nin yalnızca 25-35 fragmanının kullanılmış olması araştırmada bir diğer sınırlılıktır.

3.10. Etik Kurul Onayı

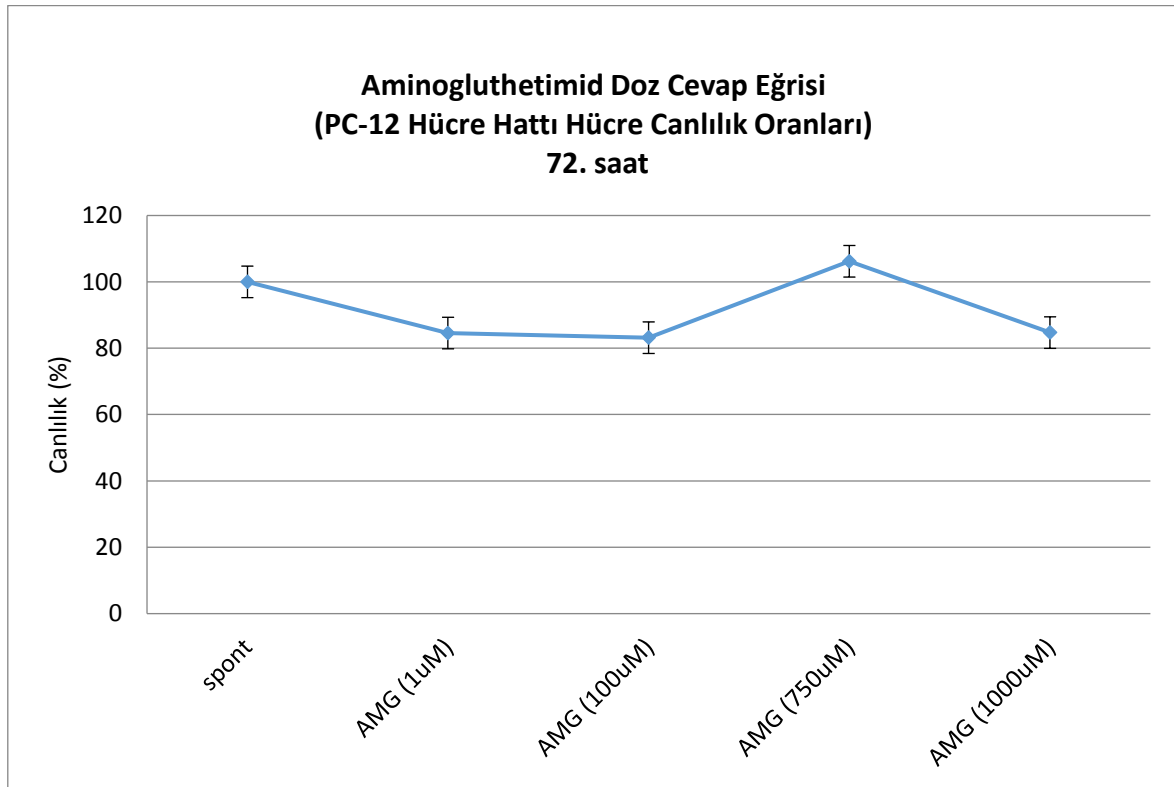
Çalışmamız Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Tarafından 570GOA protokol ve 2012/13-07 karar numarasıyla uygun bulunmuştur.

4. BULGULAR

Üç bağımsız çalışmadan elde edilen veriler, ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

4.1. AMG'nin hücre canlılığı üzerine etkisi

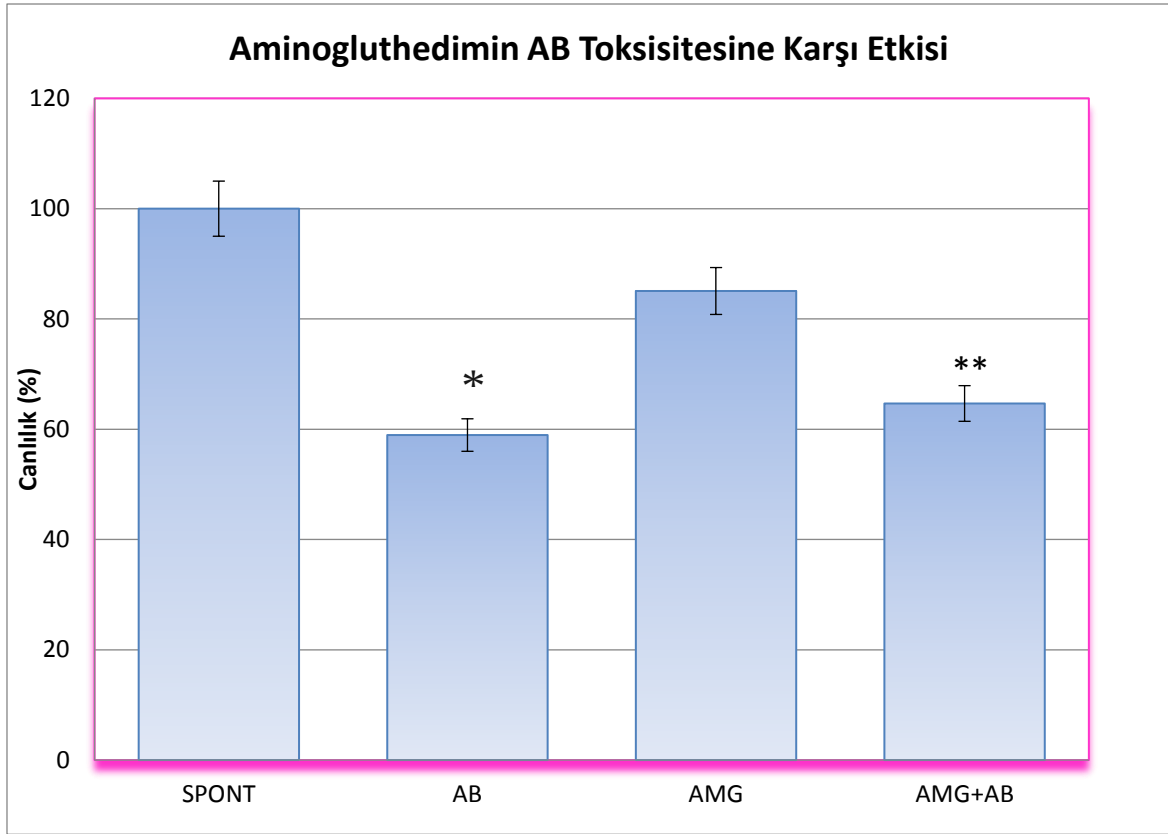
AMG'nin PC-12 hücre canlılığı üzerindeki etkisinin belirlenmesi için hücrelere farklı konsantrasyonlarda AMG uygulaması yapılmış ve hücre canlılığı 72.saat sonunda analiz edilmiştir.



Şekil 12: Aminogluthetimid Doz Cevap Eğrisi

Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak en üç çalışmadan elde edilen veriler şeklinde verilmiştir.

SPONT: Spontan kontrol hücreleri, AMG: Aminoglutetimid (n=9)



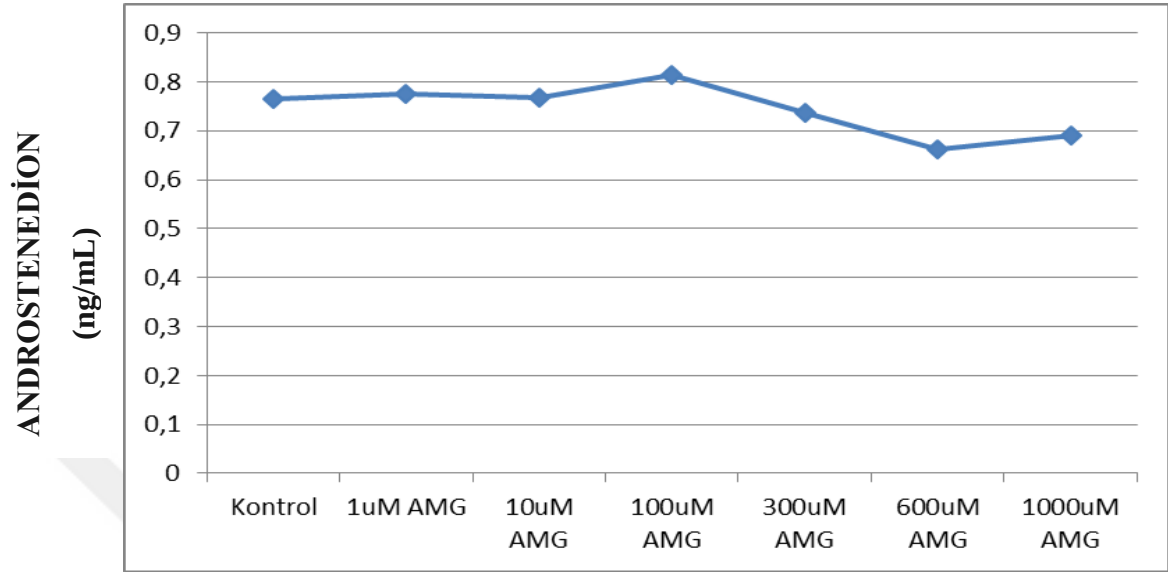
Şekil 13: *Aminogluthedimin AB Toksisitesine Karşı Etkisi*

Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak en üç çalışmadan elde edilen veriler şeklinde verilmiştir.

* Kontrol grubuna göre anlamlı fark, ** AB toksisite grubuna göre anlamlı fark ($p < 0.05$) ($n=9$);
AB: amiloid beta, SPONT: Spontan kontrol hücreleri, AMG: Aminoglutetimid

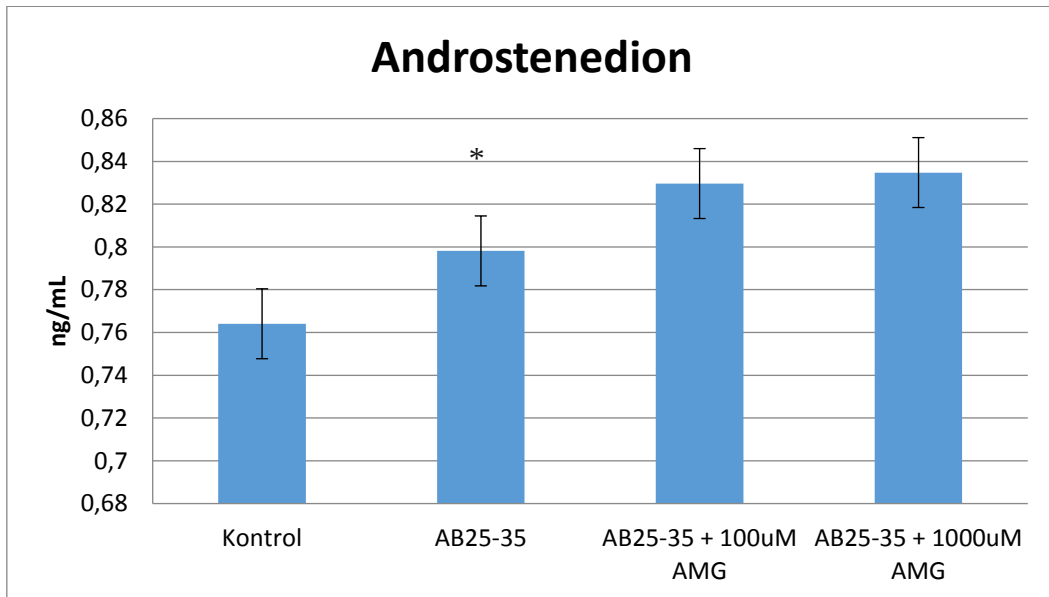
4.2. Steroid Analiz Sonuçları

Tüm steroid analiz sonuçları 2 milyon PC-12 hücresi başına verilmiştir.



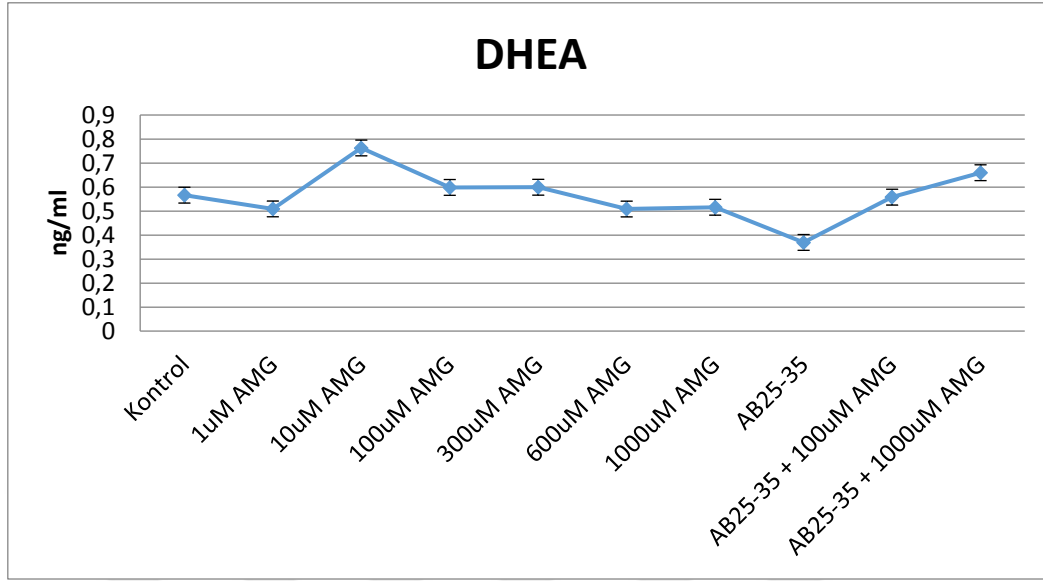
Şekil 14: Aminogluthetimid uygulamasının androstenedion düzeylerine etkisi

Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak en üç çalışmadan elde edilen veriler şeklinde verilmiştir. AMG: Aminoglutetimid (n=9)



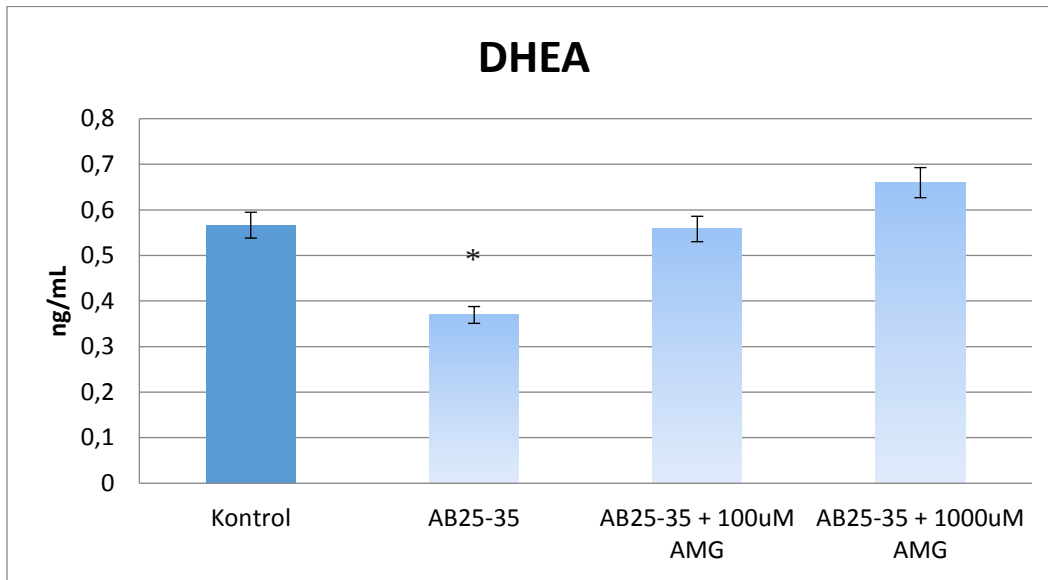
Şekil 15: Amiloid beta ve AMG uygulaması sonrası Androstenedion ölçümleri

Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak en üç çalışmadan elde edilen veriler şeklinde verilmiştir. AB: Amiloid beta, AMG: Aminoglutetimid $*(p<0.05)$ (n=9)



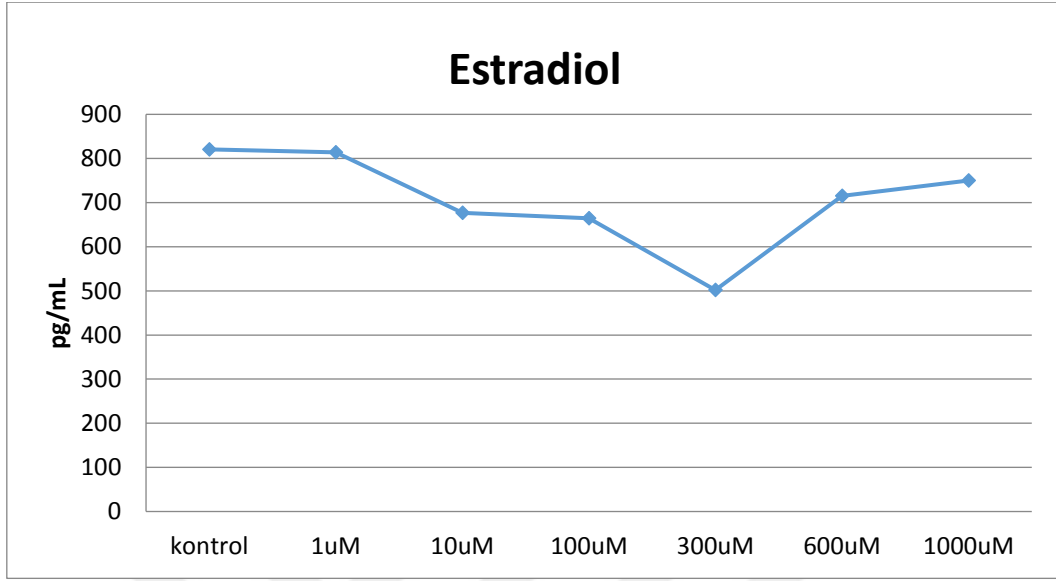
Şekil 16: Amiloid beta ve AMG uygulaması ile DHEA düzeyi belirlenmesi

Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak en üç çalışmadan elde edilen veriler şeklinde verilmiştir. AB: Amiloid beta, AMG: Aminoglutetimid, DHEA: Dehidroepiandrosteron (n=9)



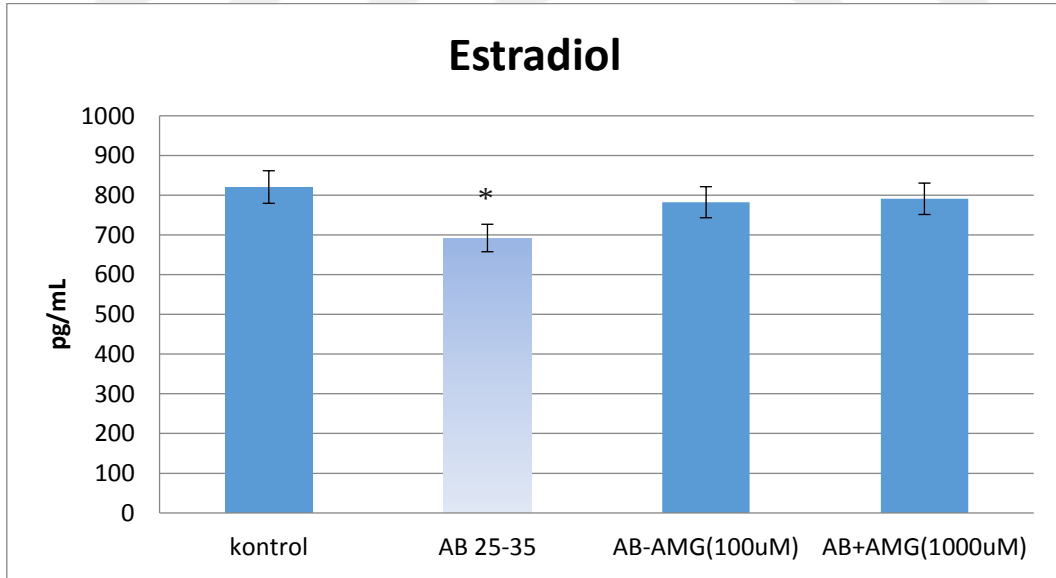
Şekil 17: Amiloid beta ve AMG uygulaması sonrası DHEA ölçümleri

Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak en üç çalışmadan elde edilen veriler şeklinde verilmiştir. AB: Amiloid beta, AMG: Aminoglutetimid (n=9)* $p<0.05$



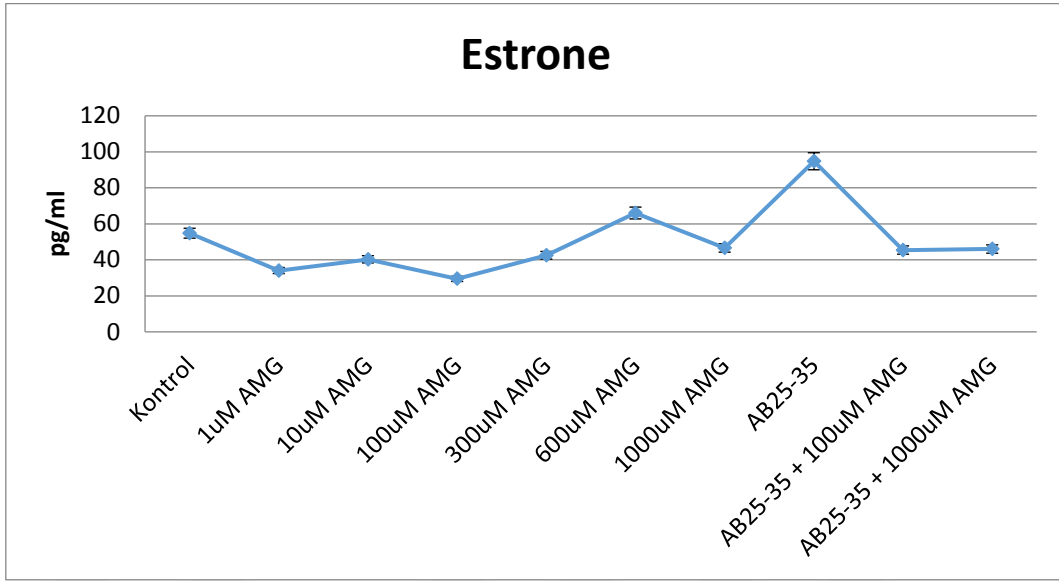
Şekil 18: AMG uygulaması sonrası Estradiol ölçümleri

Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak en üç çalışmadan elde edilen veriler şeklinde verilmiştir (n=9).

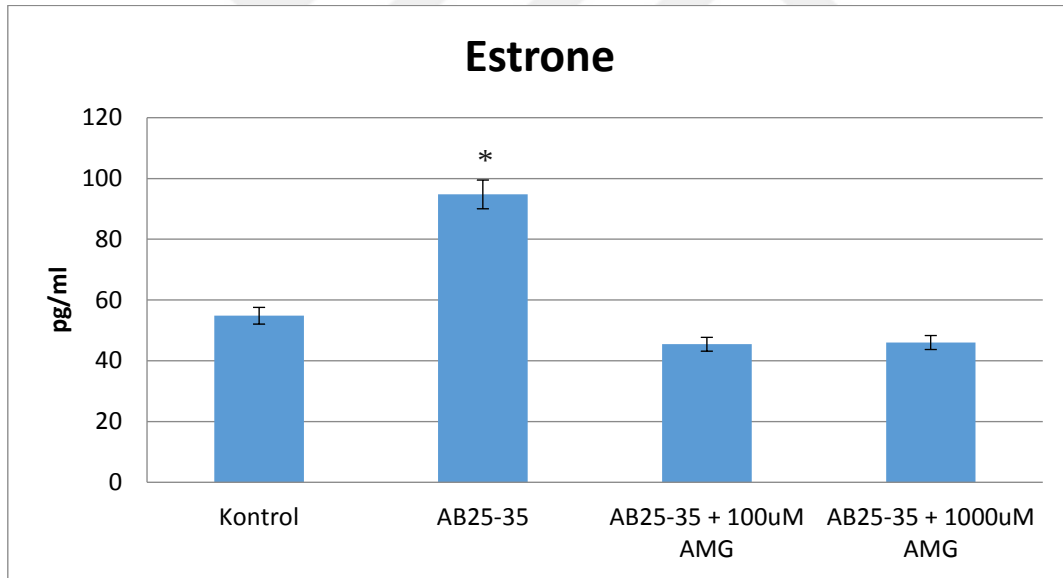


Şekil 19: Amiloid beta ve AMG uygulaması sonrası Estradiol ölçümleri

Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak en üç çalışmadan elde edilen veriler şeklinde verilmiştir. AB: Amiloid beta, AMG: Aminoglutetimid (n=9)* $p<0.05$

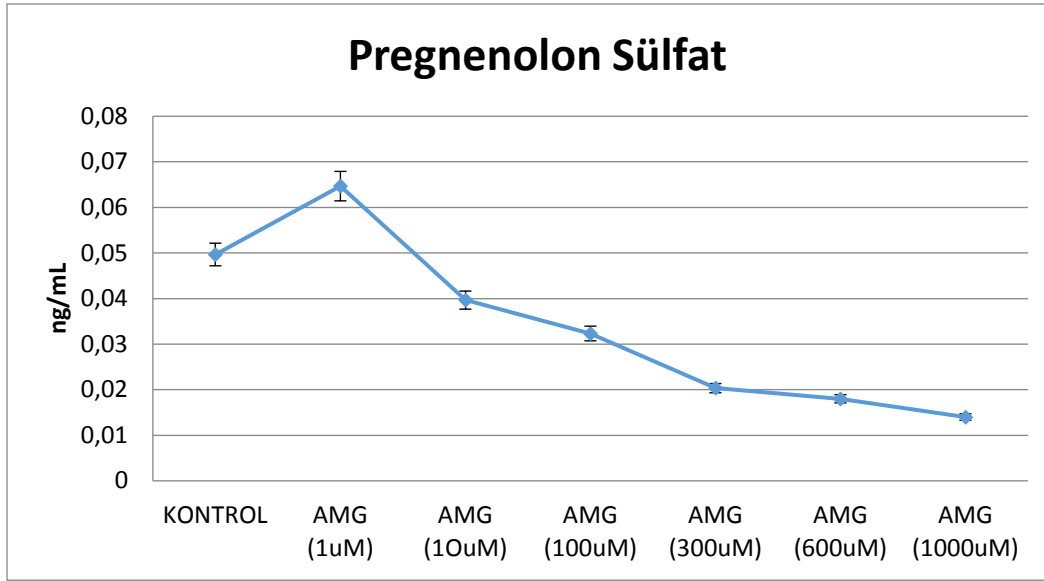


Şekil 20: Amiloid beta ve AMG uygulaması ile Estrone düzeyi belirlenmesi (n=9)

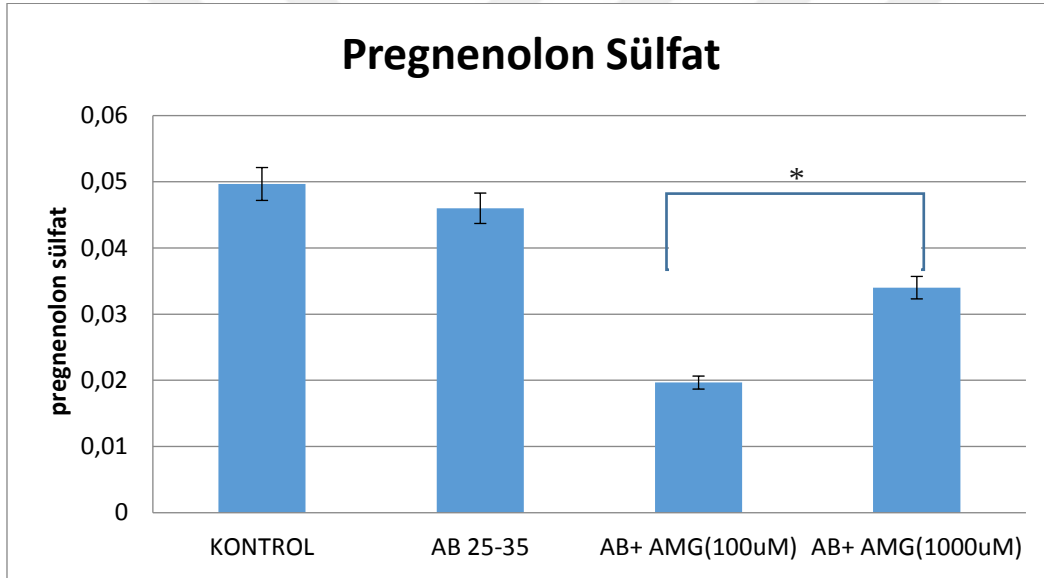


Şekil 21: Amiloid beta ve AMG uygulaması sonrası Estrone ölçümleri

Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak en üç çalışmadan elde edilen veriler şeklinde verilmiştir. AB: Amiloid beta, AMG: Aminoglutetimid (n=9)* $p < 0.05$



Şekil 22: Amiloid beta ve AMG uygulaması sonrası pregnenolon sülfat Düzeyi Değişimi (n=9)



Şekil 23: Amiloid beta ve AMG uygulaması sonrası pregnenolon sülfat ölçümleri

Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak en üç çalışmadan elde edilen veriler şeklinde verilmiştir. AB: Amiloid beta, AMG: Aminoglutetimid (n=9)* $p < 0.05$

5. TARTIŞMA

Çalışmamız ile nöronal dokunun olağan bir bileşeni olan nörosteroidlerin düzey değişimlerinin A β peptide bağlı oluşan nöronal hasar oluşum mekanizmasındaki olası rolüne açıklık getirilmeye ve AMG uygulamasının ile elde edilen steroid değişiminin AB ile indüklenen in-vitro Alzheimer deney modelinde hücre canlılığına etkisini belirlemeye çalışılmıştır. Literatür taramamıza göre AMG'in A β toksisitesi üzerine etkisi ilk kez bu tez çalışması ile ortaya konmuştur.

Amiloid beta (A β) peptit fragmanları ile oluşturulan toksisite Alzheimer hastalığı (AH) için geçerli in vitro nöronal dejenerasyon modellerinden biridir. PC-12 hücre hattı sıçan nöral krestinden köken alan nöroendokrin özelliğe sahip kromaffin hücrelerinden gelişen bir tümöral hattır [91]. PC-12 ve SHSY-5Y hücre hatları AH da dahil olmak üzere nöronal hastalıkların patogenezinin araştırıldığı çalışmalarda hücreysel bir model olarak sıklıkla kullanılır. AB 25-35 11 amino asit fragmanı, hidrofobik fonksiyonel alanında bulunan AB 1-42'nin bir C-terminal peptididir [92]. AB 25-35, AH'nın farklı yönlerini modellemek için sıklıkla kullanılır [93]–[97]. Veriler, bu AB fragmanlarının, hayvan modellerinde veya hücre hatlarında AH ile ilgili mekanizmaları araştırmak için bir araç olarak kullanılmasını desteklemektedir. Çalışmamızda AB peptidinin 25-35 fonksiyonel fragmanı (20uM) 72 saat süresince uygulanması ile hücre canlılığı kontrol grubuna göre~ %55 oranında azaltılmış ve in-vitro Alzheimer nörodejenerasyon modeli oluşturulmuştur.

Son yıllarda Alzheimer hastalığında oluşan nörodejenerasyon sürecinin kolesterol başta olmak üzere nöronal metabolik değişimlerle ilişkisi halen tartışılmaktadır [98]. Cinsiyet hormonlarında yaşa bağlı azalma kadın ve erkeklerde AH riskine katkıda bulunur. Kanıtlar AH patogenezinin kadınlarda östrojen ve progesteron ile ancak daha çok erkekte androjenler tarafından düzenlendiğini göstermektedir [99]. Alzheimer hastalığının patolojisinde temel role sahip amiloid beta varlığının nöronal dokuda steroid düzeylerini cinsiyetten bağımsız olarak ekstrasellüler bir uyaran olarak etkilemesi olasıdır.

AB uygulamasının nöronlarda gen ekspresyonu değişikliklerine neden olduğuna dair kısıtlı sayıda çalışma vardır; AB varlığı NF- κ B [100]–[102], c-jun [103], [104] ve c-fos ve egr1 gibi [105] transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu etkileyebilir. Bununla birlikte oligomerik amiloid-peptidin, primer nöronlarda steroid ve lipid metabolizmasında yer alan genlerin ekspresyonunu etkilediği gösterilmiştir [106]. AB ve steroid hormonların öncül maddesi kolesterol arasındaki etkileşimler farklı araştırmacılar tarafından çalışılmıştır [107]–[109].

Ancak kolesterol metabolizma ve katabolizmasının önemi henüz net olarak açıklığa kavuşturulmamıştır.

Çalışmamız ile nöroendokrin karakterli hücrelerde AB varlığında pregnenolone sülfat, estron, estradiol, androstenedion, pregnenolon ve DHEA steroid düzeylerini değiştirdiği gösterilmiştir. Nöronal dokuda üretilen başlıca nörosteroidler (NS) arasında (Pregnenolon (P), Pregnenolon sülfat (PS), Progesteron (PROG), Dehidroepiandrosteron (DHEA), Dehidroepiandrosteron sülfat (DHEAS), Allopregnanolon (3 α ,5 α -tetrahidroprogesteron), Epiallopregnanolon (3 β ,5 α -THP) sayılabilir. Biz bu çalışma ile özellikle sekonder cinsiyet karakterlerinin oluşmasında etkili olan estrogen ve androjenlerin nöronal sinir hücrelerinde değişimini belirledik.

Gurdeep Marwarha ve Othman Ghribi, 2018 Androjen reseptör aktivasyonu ile amiloid beta protein oluşumu arasında yakın bir ilişki olduğunu, androjen artışının amiloid beta toksisite artışı ile birlikte olduğunu ileri sürmektedir. Ancak ekstrasellüler amiloid beta artışının androjen sentezi üzerine etkisi henüz gösterilmemiştir. Bizim çalışmamızda literatür çalışmamıza göre ilk kez dışarıdan amiloid beta uygulamasının nöroendokrin hücrelerde androstenedion düzeyini belirgin olarak artırdığı gösterildi [110].

AB peptidlerinin steroid sentezi üzerindeki etkisi hakkında çok az bilgi vardır. AB peptidlerinin, steroid sentezi üzerindeki doz ve fragman tipine göre arttırıcı veya inhibe edici etkileri olduğu gösterilmiştir [26], [111]. Schaeffer ve diğ. AB 1-42 ve AB 25-35 fragmanlarının (toksik olmayan ve toksik olmayan konsantrasyonlarda) insan nöroblastom SH-SY5Ycell'lerde nörosteroidogenez üzerindeki etkilerini karşılaştırmıştır. Toksik olmayan AB 1-42 konsantrasyonlarının (nM) progesteron sentezini azalttığını, ancak pregnenolonun öncül molekül olarak kullanıldığında östradiol üretimini arttırdığını göstermişlerdir. Ayrıca AB 25-35'in progesteron oluşumunu azalttığını ancak östradiol sentezi üzerinde etkisinin olmadığını buldular. Toksik (μ M) konsantrasyonlarda AB 1-42 , progesteron ve estradiol üretimini inhibe ettiğini ve AB 1-42'nin sinir hücreleri üzerinde koruyucu veya zararlı etkiler gösterme kabiliyetine sahip olduğunu öne sürdüler. Brown ve diğ. ark. Ayrıca AB 1-42 ile muamele edilmiş oligodendrosit hücrelerinin reaktif oksijen hasarını indüklediği ve dehidroepiandrosteron oluşumunu arttırdığı göstermişlerdir [112].

Bizim çalışmamız ile literatür taramamıza göre ilk kez AB 25-35 uygulamasının nöroendokrin özelliğe sahip PC-12 hücrelerde eş zamanlı farklı steroid düzeylerine etkisi değerlendirildi.

Aminoglutetimid (AMG), östrojene bağılı meme kanseri için kullanılan birinci nesil aromataz inhibitörüdür. Aromataz inhibisyonunda D-AMG formu daha etkili iken L-AMG formunun Kolesterolde pregnenolon oluşum aşamasında CYP11a scc enzim inhibisyonunda daha etkilidir (Ref). Ayrıca AMG'nin protein kinaz A'yı inhibe ettiğı, bunun yanı sıra NMDA reseptör aracılı glutamat sitotoksitesini azalttığı gösterilmiştir (Ref). Diğer taraftan AMG kullanımı agranülositoz ile de ilişkilendirilmiştir [21]. Bu çalışma, MPO serbest radikal tespitinin ilaç oksidasyonundan kaynaklandığının ilk gösterimidir. Siraki, A. G ve arkadaşları AMG'nin metabolizmasını miyeloperoksidaz (MPO) ve bir MPO proteini serbest radikalının oluşumu ile araştırmışlardır. MPO'da AMG bağımlı serbest radikal oluşumunun agranülositozun kökeninde rol oynayabileceğini göstermişlerdir.

Alzheimer Hastalığı patogeneğinde endoplazmik retikulum stresi ile ilişkili Steroid Metabolizma değişimleri son yıllarda tartışılmaktadır [113] [98]. Elisabet Barbero-Camps ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptıkları çalışmada Alzheimer hastalığında bozulmuş kolesterol homeostazı ve amiloid beta birikiminin endoplazmik retikulum stresini tetikleyerek hastalığın ilerlemesine katkıda bulunduğı ileri sürülmüştür. Mitokondriyal kolesterol birikimi, spesifik kolesterol taşıyıcıları, özellikle steroidojenik akut düzenleyici protein ile birlikte ER'den mitokondriye kolesterol translokasyonunu destekleyen mitokondriye ilişkili ER membran proteinlerinin ekspresyonunun artmasıyla ilişkilendirilmektedir. ER stres inhibitörlerinin Alzheimer hastalığı için terapötik ajanlar olarak araştırılabileceğı ileri sürülmektedir. AB aracılı ER stresi ve artmış mitokondriyal kolesterol birikimi dolayısı ile kolesterolde oluşan steroidlerin metabolizma değişimleri patolojik ilerlemeye katkıda bulunabilir.

Bu tez çalışması ile literatür taramamıza göre ilk kez AMG (100 uM) uygulamasının nöronal hücre hattında oluşan AB toksisitesi üzerine etkisi in vitro olarak ve doza bağılı gösterildi. Düşük (100 uM) ve yüksek (1000 uM) AMG uygulaması hücre canlılığı üzerine benzer etkiye sahip bulundu. AMG 'nin hücrelerde 100 uM dozda AB toksisitesine karşı koruyucu etkiye sahipken nöroprotektif estrogen türevlerinin düzeyini azalttığı, ancak DHEA düzeyini artırdığı gösterildi. AMG uygulama dozuna bağılı olarak steroid sentezini yan zincir koparılması veya aromatisasyon basamağında inhibe edebilir. Ancak tek başına uygulandığında steroid sentezini inhibe ederken, A β ile birlikte uygulandığında ilginç olarak estradiol ve DHEA düzeylerini tek başına A β uygulanan gruba göre artırdığı gözlemlendi. AMG 'da gözlenen bu kısmi koruyucu etkinin hücrelerdeki DHEA artışına bağılı olabileceğı düşünülebilir. Diğer taraftan A β 'nın tetiklediğı eksitotoksik yolların AMG uygulaması ile inhibisyonu da söz konusu olabilir.

AB toksisitesi nörosteroidler ile ilişkilidir. Nörosteroidlerin nöronal hücre canlılığına serbest veya sülfatlanmış formları ile farklı etkiler göstererek önemli rol oynadığını bilinmektedir. AB peptidi pek çok steroidin prekürsörü olan dehidroepiandrosteron (DHEA) sentezini indüklediği gösterilmektedir. Nitrofenoller AB peptit kümelenmesini görece olarak düşük konsantrasyonlarda inhibe edebilirler. 2,4-dikloro-6-nitrofenol (DCNP) nitrofenollerin küçük, suda çözünebilen bir türevidir ve steroid sülfotransferaz enzimi inhibitörü olarak bilinmektedir. Bu çalışmada SH-SY5Y hücreleri kullanılarak 72 saat süre ile DCNP (1 μ M) ile birlikte AB1-42 peptidi ile oluşturulan AH modeli denenmiştir, hücresel DHEA, DHEA sülfat ve seks steroidlerinin değişimi LC-MS/MS ile belirlenmiştir. Bu uygulamayla DHEA Sülfat düzeyleri anlamlı oranda azaldığı gösterilmişken DHEA düzeylerinde artış olduğu gözlemlenmiştir. AB1-42 kullanılarak oluşturulan bu modelde AB peptid agregatı kullanıldığında DHEA ve Estradiol düzeylerinin anlamlı olarak değiştiği gösterilmiştir [114].

Bizim çalışmamızda AB uygulamasının androstenedion ve estron düzeylerini artırırken, nöroprotektif etkileri ön planda olan estradiol ve DHEA düzeylerini anlamlı olarak azalttığı gösterildi. Nöronal dokuda üretilen başlıca nörosteroidler (NS) arasında (Pregnenolon (P), Pregnenolon sülfat (PS), Progesteron (PROG), Dehidroepiandrosteron (DHEA), Dehidroepiandrosteron sülfat (DHEAS), Allopregnanolon (3 α ,5 α -tetrahidroprogesteron), Epiallopregnanolon (3 β ,5 α -THP) sayılabilir. Çalışmamız ile nöroendokrin karakterli hücrelerde AB varlığında pregnenolone sülfat, DHEA düzey değişimleri ve bu değişimin hücre canlılığı üzerine olan etkileri gösterilmiştir. AB'nın hücre estron, estradiol, androstenedion, pregnenolon ve DHEA steroid düzeylerini değiştirdiği gösterilmiştir. P sentezinin nöroglial hücre mitokondrisinde kolesterolden side-chain cleavage (P450_{scc}/Cyp-11a) enzim katalizi ile gerçekleştiği; hafıza ve bilişsel fonksiyonlarla yakın ilişkili bir nörotransmitter olan pregnenolone sülfatın ise sitoplazmada sülfotranferaz (SULT2) enzimi yardımı ile oluştuğu gösterilmiştir [13], [55]. SSS'de P ve PS nin non-patolojik durumlarda 1 μ M'dan düşük konsantrasyonlarda olduğu bilinmektedir [13]. Bununla birlikte düzeyleri kolesterol konsantrasyonu, iskemi, oksidatif stres ya da glutamat gibi nörotoksinlerle değiştirilebilir [14], [15], [115], [116]. A β toksisitesinin steroid sentezi üzerine etkisi ile ilgili çok az şey bilinmektedir. 2008 yılında Schaeffer V. ve ark.'nın yaptığı SHSY-5Y hücre hattında A β peptidinin nörosteroidogenez üzerine doza bağlı ve dizi sensitif etkilerini inceledikleri çalışmayla A β 25-35 ile A β 1-42'nin progesteron ve/veya östradiol düzeylerinde değişiklik yarattığı ancak testosteron ve 3 α -androstenediol düzeylerinde değişime yol açmadığı ortaya konulmuştur, ayrıca A β 25-35'in prekürsör olarak verilen pregnenolondan progesterona

dönüşümü kontrole göre anlamlı azalttığı gösterilmiştir [112]. Böylece, hormonal aktivite gösteren tüm steroidlerin sentezini azaltır. Brown ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada da A β 1-42'nin DHEA oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir [15]. Bu çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlar ise PC-12 hücre hattında 72 saat A β 25-35 uygulamasının estradiol ve DHEA düzeyini arttırdığı, apoptotik etkileri olabilen androstenedionu arttırdığını göstermektedir. AMG, kolesterolden türev alan farklı steroidlerin oluşumunu iki farklı mekanizma ile bloke ettiğini göstermiştir. 1994 yılında G. Cocconi, AMG' aromataz aktivitesini inhibe ederek, androstenediondan ve testosterondan östrojen üretimini engellediğini göstermiştir [66], [67]. Diğer taraftan 1982 yılında R. J. Santen ve arkadaşları, P450scc enzimini inhibe ederek, kolesterolün pregnenolona dönüşümünü engellediğini göstermiştir [65],[69].

P.Akan ve Ark. 2009 yılında yapmış oldukları çalışmada Pregnenolone (P) ve Pregnenolone sülfat (PS)'nin AB peptidi toksisitesi üzerindeki etkilerini çalışmışlardır. Nöroendokrin kökenli ratlardan elde edilmiş PC12 hücre hatlarında AB25-35 peptidi kullanılarak AH deney modeli oluşturulmuştur. Çalışmada AB 72 saat sonunda düşük ve yüksek dozlarda P ve PS kullanılarak yapılan hücre canlılığı testlerinde; Düşük konsantrasyonlarda kontrol gruplarına oranla anlamlı bir fark gözlenmemişken, Yüksek konsantrasyonda P'nin oluşturulan AH modelinde hücre canlılığını anlamlı bir şekilde arttırdığı gözlenmiştir. Aynı konsantrasyonda PS'nin ise oluşturulan modelde nöronal hücre canlılığını anlamlı ölçüde düşürdüğü gözlemlenmiştir. Böylelikle doza bağlı olarak P'nin nöronal kökenli hücrelerde koruyucu etkisi gösterilmiş fakat PS'nin koruyucu özelliği bulunmadığı gösterilmiş dahası hücre ölümünü arttırdığı sonucu ortaya çıkmıştır [19]. O.Gursoy ve Ark. 2016'da yayınladığı çalışmada kolesterolün AB toksisitesi üzerine etkileri çalışılmıştır. AB peptidinin kolesterol metabolizması, Progesteron ve Estradiol gibi steroid hormon sentezi üzerinde etki ettiği bilinmektedir. Kolesterolün APP'den AB peptidi sentezini arttırdığı üzerinden yola çıkılarak yapılan bu çalışmada, AH deney modeli oluşturmada kullanılan PC12 ve SH-SY5Y hücre hatları kullanılmış ve AB25-35, AB1-40 ve AB1-42 peptid fragmanları kullanılmıştır. Kullanılan bu peptid fragmanları ile nöronal hücre canlılığı, P ve PS düzeylerinin etkilendiği gösterilmiştir. Steroid seviyeleri AB fragman tipine ve hücrelerin kolesterol içeriğine bağlı olarak değişmiştir [117].

Çalışmamızın kısıtlılıkları mevcuttur. Çalışmamız bir in-vitro deneysel çalışmadır. Deney tekrar sayıları proje bütçesi nedeni ile kısıtlı kalmıştır. PC-12 hücre hattı nöroendokrin özelliğe sahip bir hücre hattı olmakla birlikte fenotipik olarak nöronal değişimi tetiklenmeden çalışma

gerçekleştirilmiştir. İmmunassay yöntemlerle çalışılan nörosteroid düzeylerinin referans LC-MS benzeri yöntemlerle doğrulanması gerekebilir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda 72 saat A β 25-35 (20uM) A β uygulaması ile hücre canlılığını kontrol grubuna göre ortalama ~% 55 oranında azalttığı belirlendi. Amiloid beta toksisitesine karşı AMG'nin doza bağlı kısmi koruyucu etkisi literatür taramamıza göre bu tez çalışması ile ilk kez gösterildi.

Çalışmamız ile PC-12 hücre hattında oluşturulan A β toksisitesinde hücre içi steroid hormon değişikliklerinin olduğu ve bu değişikliklerin hücre canlılığını etkileyebildiği belirlendi.

AMG'nin A β toksisitesindeki rolünü daha net olarak ortaya koymak için, hücre içi reseptör modülasyonunu gösterecek mekanistik çalışmalara ihtiyaç vardır. Çalışmamız farklı hücre hatları ve model organizma çalışmaları ile desteklenmelidir.



7. KAYNAKLAR

- [1] E. Keleş and S. Özalevli, "Alzheimer Hastalığı ve Tedavi Yaklaşımları Alzheimer ' s Disease and Treatment Approaches," *İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilim. Fakültesi Derg.*, vol. 3, no. 2, pp. 39–42, 2018.
- [2] C. Patterson, "World Alzheimer Report 2018 The state of the art of dementia research: New frontiers," 2018.
- [3] "National Institute on Aging, National Institutes of Health, Alzheimer's Disease Progress Report," 2002. .
- [4] "Türk Nöroloji Derneği." [Online]. Available: <http://www.noroloji.org.tr/page.aspx?menu=473>.
- [5] V. H. Finder and R. Glockshuber, "Amyloid-beta aggregation.," *Neurodegener. Dis.*, vol. 4, no. 1, pp. 13–27, Jan. 2007.
- [6] S. R. V Kumar, RS Cotran, *Robbins Temel Patoloji*, 7th ed. Nobel Tıp Kitabevleri, 2003.
- [7] S. Przedborski, M. Vila, and V. Jackson-Lewis, "Neurodegeneration: what is it and where are we?," *J. Clin. Invest.*, vol. 111, no. 1, pp. 3–10, Jan. 2003.
- [8] T. C. Gamblin *et al.*, "Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 17, pp. 10032–7, Aug. 2003.
- [9] Y. Ling, K. Morgan, and N. Kalsheker, "Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease.," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 35, no. 11, pp. 1505–35, Nov. 2003.
- [10] J. Hardy and D. J. Selkoe, "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics.," *Science*, vol. 297, no. 5580, pp. 353–6, Jul. 2002.
- [11] C. Bogdan, M. Rölinghoff, and A. Diefenbach, "Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity.," *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 12, no. 1, pp. 64–76, Feb. 2000.
- [12] N. A. Compagnone and S. H. Mellon, "Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators.," *Front. Neuroendocrinol.*, vol. 21, no. 1, pp. 1–56, Jan. 2000.
- [13] S. H. Mellon, "Neurosteroid regulation of central nervous system development.," *Pharmacol. Ther.*, vol. 116, no. 1, pp. 107–24, Oct. 2007.
- [14] C. E. Marx, L. F. Jarskog, J. M. Lauder, J. H. Gilmore, J. A. Lieberman, and A. L. Morrow, "Neurosteroid modulation of embryonic neuronal survival in vitro following anoxia.," *Brain Res.*, vol. 871, no. 1, pp. 104–12, Jul. 2000.
- [15] R. C. Brown, C. Cascio, and V. Papadopoulos, "Pathways of neurosteroid biosynthesis in cell lines from human brain: regulation of dehydroepiandrosterone formation by oxidative stress and beta-amyloid peptide.," *J. Neurochem.*, vol. 74, no. 2, pp. 847–59, Mar. 2000.
- [16] E. Gursoy, A. Cardounel, and M. Kalimi, "Pregnenolone protects mouse hippocampal

- (HT-22) cells against glutamate and amyloid beta protein toxicity.,” *Neurochem. Res.*, vol. 26, no. 1, pp. 15–21, Jan. 2001.
- [17] T. Maurice, T. P. Su, and A. Privat, “Sigma1 (sigma 1) receptor agonists and neurosteroids attenuate B25-35-amyloid peptide-induced amnesia in mice through a common mechanism.,” *Neuroscience*, vol. 83, no. 2, pp. 413–28, 1998.
 - [18] C. Cascio *et al.*, “Pregnenolone sulfate, a naturally occurring excitotoxin involved in delayed retinal cell death.,” *J. Neurochem.*, vol. 74, no. 6, pp. 2380–91, Jun. 2000.
 - [19] P. Akan, S. Kizildag, M. Ormen, S. Genc, M. A. Oktem, and M. Fadiloglu, “Pregnenolone protects the PC-12 cell line against amyloid beta peptide toxicity but its sulfate ester does not.,” *Chem. Biol. Interact.*, vol. 177, no. 1, pp. 65–70, Jan. 2009.
 - [20] T. Hosoda, H. Nakajima, and H. Honjo, “Estrogen protects neuronal cells from amyloid beta-induced apoptotic cell death.,” *Neuroreport*, vol. 12, no. 9, pp. 1965–70, 2001.
 - [21] A. G. Siraki, M. G. Bonini, J. Jiang, M. Ehrenshaft, and R. P. Mason, “Aminoglutethimide-induced protein free radical formation on myeloperoxidase: a potential mechanism of agranulocytosis.,” *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 20, no. 7, pp. 1038–45, 2007.
 - [22] R. J. Santen, S. J. Santner, N. Tilsen-Mallett, H. R. Rosen, E. Samojlik, and J. D. Veldhuis, “In vivo and in vitro pharmacological studies of aminoglutethimide as an aromatase inhibitor.,” *Cancer Res.*, vol. 42, no. 8 Suppl, pp. 3353s-3359s, 1982.
 - [23] H. Shirakawa, H. Katsuki, T. Kume, S. Kaneko, and A. Akaike, “Aminoglutethimide prevents excitotoxic and ischemic injuries in cortical neurons.,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 147, no. 7, pp. 729–36, Apr. 2006.
 - [24] A. Mirzaton, S. M. Dong, M. Guerra, Y. Zhen, A. Katz, and B. A. Schlinger, “Steroidal and gonadal effects on neural cell proliferation in vitro in an adult songbird.,” *Brain Res.*, vol. 1351, pp. 41–9, 2010.
 - [25] M. Mesulam, “Davranışsal ve Kognitif Nörolojinin İlkeleri,” in *Davranışsal ve Kognitif Nörolojinin İlkeleri*, 2nd ed., Yelkovan Yayınları, 2004, p. 465.
 - [26] J. V Haxby, C. L. Grady, R. Duara, N. Schlageter, G. Berg, and S. I. Rapoport, “Neocortical metabolic abnormalities precede nonmemory cognitive defects in early Alzheimer’s-type dementia.,” *Arch. Neurol.*, vol. 43, no. 9, pp. 882–5, 1986.
 - [27] R. Katzman *et al.*, “Development of dementing illnesses in an 80-year-old volunteer cohort,” *Ann Neurol*, vol. 25, pp. 317–324, 1989.
 - [28] T. E. Golde, “Alzheimer disease therapy: Can the amyloid cascade be halted?,” *J. Clin. Invest.*, vol. 111, no. 1, pp. 11–18, 2003.
 - [29] Y.-H. Suh and F. Checler, “Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer’s disease.,” *Pharmacol. Rev.*, vol. 54, no. 3, pp. 469–525, 2002.
 - [30] N. İ. Ü. AE, Ö., *İstanbul Tıp Fakültesi temel ve klinik bilimler ders kitapları*. Nobel Tıp Kitabevleri, 2004.
 - [31] B. H. Price, H. Gurvit, S. Weintraub, C. Geula, E. Leimkuhler, and M. Mesulam, “Neuropsychological patterns and language deficits in 20 consecutive cases of autopsy-confirmed Alzheimer’s disease.,” *Arch. Neurol.*, vol. 50, no. 9, pp. 931–7, 1993.

- [32] D. X. Rasmusson, J. Brandt, C. Steele, J. C. Hedreen, J. C. Troncoso, and M. F. Folstein, "Accuracy of clinical diagnosis of Alzheimer disease and clinical features of patients with non-Alzheimer disease neuropathology.," *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.*, vol. 10, no. 4, pp. 180–8, 1996.
- [33] W. J. Strittmatter and A. D. Roses, "Apolipoprotein E and Alzheimer's disease.," *Annu. Rev. Neurosci.*, vol. 19, pp. 53–77, 1996.
- [34] L. P. Rowland, *Merritt's Neurology*, Onbirinci. Güneş Tıp Kitabevleri, 2008.
- [35] K. Blennow and H. Hampel, "CSF markers for incipient Alzheimer's disease.," *Lancet. Neurol.*, vol. 2, no. 10, pp. 605–13, 2003.
- [36] R. Motter *et al.*, "Reduction of beta-amyloid peptide₄₂ in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease.," *Ann. Neurol.*, vol. 38, no. 4, pp. 643–648, 1995.
- [37] A. . Rodgers, "Alzheimer's Disease: Unraveling the Mystery.," pp. 1–2.
- [38] K. Iqbal and I. Grundke-Iqbal, "Alzheimer disease is multifactorial and heterogeneous.," *Neurobiol. Aging*, vol. 21, no. 6, pp. 901–2; discussion 903-4.
- [39] B. S. Shastri, "Neurodegenerative disorders of protein aggregation.," *Neurochem. Int.*, vol. 43, no. 1, pp. 1–7, 2003.
- [40] Y. Huang, "Apolipoprotein E and Alzheimer disease.," *Neurology*, vol. 66, no. 2 Suppl 1, pp. S79-85, Jan. 2006.
- [41] J. Poirier, "Apolipoprotein E, cholesterol transport and synthesis in sporadic Alzheimer's disease.," *Neurobiol. Aging*, vol. 26, no. 3, pp. 355–61, Mar. 2005.
- [42] a M. Saunders *et al.*, "Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease.," *Neurology*, vol. 43, no. 8, pp. 1467–1472, 1993.
- [43] L. Puglielli, R. E. Tanzi, and D. M. Kovacs, "Alzheimer's disease: the cholesterol connection.," *Nat. Neurosci.*, vol. 6, no. 4, pp. 345–51, Apr. 2003.
- [44] C. L. Masters, G. Simms, N. A. Weinman, G. Multhaup, B. L. McDonald, and K. Beyreuther, "Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 82, no. 12, pp. 4245–9, Jun. 1985.
- [45] G. Thinakaran and E. H. Koo, "Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 44, pp. 29615–29619, 2008.
- [46] G. Van Gassen, W. Annaert, and C. Van Broeckhoven, "Binding partners of Alzheimer's disease proteins: are they physiologically relevant?," *Neurobiol. Dis.*, vol. 7, no. 3, pp. 135–51, 2000.
- [47] G. Evin and A. Weidemann, "Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease Abeta amyloid peptides.," *Peptides*, vol. 23, no. 7, pp. 1285–97, Jul. 2002.
- [48] M. P. Mattson, "Pathways towards and away from Alzheimer's disease," *Nature*, vol. 430, no. 7000, pp. 631–639, 2004.
- [49] S. L. Cole and R. Vassar, "The Alzheimer's disease beta-secretase enzyme, BACE1.," *Mol. Neurodegener.*, vol. 2, p. 22, Jan. 2007.
- [50] L. K. Simmons *et al.*, "Secondary structure of amyloid beta peptide correlates with

- neurotoxic activity in vitro.,” *Mol. Pharmacol.*, vol. 45, no. 3, pp. 373–9, Mar. 1994.
- [51] R. Wang, D. Sweeney, S. E. Gandy, and S. S. Sisodia, “The profile of soluble amyloid beta protein in cultured cell media. Detection and quantification of amyloid beta protein and variants by immunoprecipitation-mass spectrometry.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 50, pp. 31894–902, Dec. 1996.
 - [52] W. Gibson Wood, G. P. Eckert, U. Igbavboa, and W. E. Müller, “Amyloid beta-protein interactions with membranes and cholesterol: causes or casualties of Alzheimer’s disease.,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1610, no. 2, pp. 281–90, Mar. 2003.
 - [53] M. J. McNamara, T. Gomez-Isla, and B. T. Hyman, “Apolipoprotein E genotype and deposits of Abeta40 and Abeta42 in Alzheimer disease.,” *Arch. Neurol.*, vol. 55, no. 7, pp. 1001–4, Jul. 1998.
 - [54] M. Rapoport, H. N. Dawson, L. I. Binder, M. P. Vitek, and A. Ferreira, “Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 9, pp. 6364–6369, 2002.
 - [55] E. E. Baulieu, “Neurosteroids: a novel function of the brain.,” *Psychoneuroendocrinology*, vol. 23, no. 8, pp. 963–87, Nov. 1998.
 - [56] P. Robel, M. Synguelakis, F. Halberg, and E. E. Baulieu, “[Persistence of the circadian rhythm of dehydroepiandrosterone in the brain, but not in the plasma, of castrated and adrenalectomized rats].,” *C. R. Acad. Sci. III.*, vol. 303, no. 6, pp. 235–8, 1986.
 - [57] P. Robel *et al.*, “Neuro-steroids: 3 beta-hydroxy-delta 5-derivatives in rat and monkey brain.,” *J. Steroid Biochem.*, vol. 27, no. 4–6, pp. 649–55, 1987.
 - [58] K. Iwahashi, H. S. Ozaki, M. Tsubaki, J. Ohnishi, Y. Takeuchi, and Y. Ichikawa, “Studies of the immunohistochemical and biochemical localization of the cytochrome P-450scc-linked monooxygenase system in the adult rat brain.,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1035, no. 2, pp. 182–9, 1990.
 - [59] C. Le Goascogne, P. Robel, M. Gouézou, N. Sananès, E. E. Baulieu, and M. Waterman, “Neurosteroids: cytochrome P-450scc in rat brain.,” *Science*, vol. 237, no. 4819, pp. 1212–5, 1987.
 - [60] I. Jung-Testas, Z. Y. Hu, E. E. Baulieu, and P. Robel, “Steroid synthesis in rat brain cell cultures.,” *J. Steroid Biochem.*, vol. 34, no. 1–6, pp. 511–9, 1989.
 - [61] Z. Y. Hu, E. Bourreau, I. Jung-Testas, P. Robel, and E. E. Baulieu, “Neurosteroids: oligodendrocyte mitochondria convert cholesterol to pregnenolone.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 84, no. 23, pp. 8215–9, 1987.
 - [62] E. Plassart-Schiess and E. E. Baulieu, “Neurosteroids: recent findings.,” *Brain Res. Brain Res. Rev.*, vol. 37, no. 1–3, pp. 133–40, Nov. 2001.
 - [63] D. Beaujean, A. G. Mensah-Nyagan, J. L. Do-Rego, V. Luu-The, G. Pelletier, and H. Vaudry, “Immunocytochemical localization and biological activity of hydroxysteroid sulfotransferase in the frog brain.,” *J. Neurochem.*, vol. 72, no. 2, pp. 848–57, 1999.
 - [64] B. O. Dubrovsky, “Steroids, neuroactive steroids and neurosteroids in psychopathology.,” *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, vol. 29, no. 2, pp. 169–92, Mar. 2005.
 - [65] R. C. Melcangi and G. C. Panzica, “Neuroactive steroids: old players in a new game.,”

Neuroscience, vol. 138, no. 3, pp. 733–9, Jan. 2006.

- [66] G. Cocconi, “First generation aromatase inhibitors? aminoglutethimide and testololactone,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 30, no. 1, pp. 57–80, 1994.
- [67] R. J. Santen, S. J. Santner, N. Tilsen-Mallett, H. R. Rosen, E. Samojlik, and J. D. Veldhuis, “In vivo and in vitro pharmacological studies of aminoglutethimide as an aromatase inhibitor,” *Cancer Res.*, vol. 42, no. 8 Suppl, pp. 3353s-3359s, Aug. 1982.
- [68] R. Klasco, *USP DI® Drug Information for the Healthcare Professional. Thomson MICROMEDEX*. 2005.
- [69] A. Slominski *et al.*, “An alternative pathway of vitamin D2 metabolism: Cytochrome P450scc (CYP11A1)-mediated conversion to 20-hydroxyvitamin D2 and 17,20-dihydroxyvitamin D2,” *FEBS J.*, 2006.
- [70] C. Nadjafi, “Aminoglutethimide chemistry, pharmacokinetics, pharmacology and mechanism of action,” *Acta Clin. Belg.*, 1986.
- [71] V. I. UŽGIRIS, C. A. Whipple, and H. A. Salhanick, “Stereoselective inhibition of cholesterol side chain cleavage by enantiomers of aminoglutethimide,” *Endocrinology*, 1977.
- [72] R. Cash, A. J. Brough, M. N. Cohen, and P. S. Satoh, “Aminoglutethimide (Elipten-Ciba) as an inhibitor of adrenal steroidogenesis: mechanism of action and therapeutic trial,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1967.
- [73] M. P. Cohen, “Aminoglutethimide inhibition of adrenal desmolase activity,” *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, vol. 127, no. 4, pp. 1086–90, Apr. 1968.
- [74] B. Walther, J. F. Ghersi-Egea, A. Minn, and G. Siest, “Brain mitochondrial cytochrome P-450scc: Spectral and catalytic properties,” *Arch. Biochem. Biophys.*, 1987.
- [75] M. Georgiou, L. M. Perkins, and A. H. Payne, “Steroid synthesis-dependent, oxygen-mediated damage of mitochondrial and microsomal cytochrome p-450 enzymes in rat leydig cell cultures,” *Endocrinology*, 1987.
- [76] and J. . W. H. Sheppard, J.H. Beasley, “The influence of NADPH or its generating system on corticosteroid biosynthesis by rat adrenal homogenates,” *Fed. Proc.*, vol. 25, no. 2 P 1, p. 551, 1966.
- [77] Y. Touitou, A. Bogdan, J. C. Legrand, and P. Desgrez, “Aminoglutethimide and glutethimide: effects on 18-hydroxycorticosterone biosynthesis by human and sheep adrenals in vitro,” *Acta Endocrinol. (Copenh)*, vol. 80, no. 3, pp. 517–26, Nov. 1975.
- [78] R. N. Dexter, L. M. Fishman, R. L. Ney, and G. W. Liddle, “Inhibition of adrenal corticosteroid synthesis by aminoglutethimide: studies of the mechanism of action,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1967.
- [79] R. J. Santen and R. I. Misbin, “Aminoglutethimide: Review of Pharmacology and Clinical Use,” *Pharmacother. J. Hum. Pharmacol. Drug Ther.*, vol. 1, no. 2, pp. 95–119, Sep. 1981.
- [80] L. M. FISHMAN, G. W. LIDDLE, D. P. ISLAND, N. FLEISCHER, and O. KÜCHEL, “Effects of Amino-glutethimide on Adrenal Function in Man 1,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 27, no. 4, pp. 481–490, Apr. 1967.

- [81] D. E. Schteingart, R. Cash, and J. W. Conn, "Amino-Glutethimide and Metastatic Adrenal Cancer: Maintained Reversal (Six Months) of Cushing's Syndrome," *JAMA J. Am. Med. Assoc.*, 1966.
- [82] E. A. Thompson and P. K. Siiteri, "The involvement of human placental microsomal cytochrome P 450 in aromatization," *J. Biol. Chem.*, 1974.
- [83] A. L. Harris, M. Dowsett, I. E. Smith, and S. L. Jeffcoate, "Endocrine effects of low dose aminoglutethimide alone in advanced postmenopausal breast cancer," *Br. J. Cancer*, 1983.
- [84] M. L. Rallison, F. H. Tyler, L. F. Kumagi, and M. E. Lahey, "Goitrous hypothyroidism induced by an anticonvulsant drug," *J. Pediatr.*, 2006.
- [85] M. L. Rallison, L. F. Kumagai, and F. H. Tyler, "Goitrous hypothyroidism induced by amino-glutethimide, anticonvulsant drug," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1967.
- [86] S. W. M. Hughes and D. M. Burley, "Aminoglutethimide: A 'side-effect' turned to therapeutic advantage," *Postgrad. Med. J.*, 1970.
- [87] Y.-Q. Zhou, Z.-L. Yang, L. Xu, P. Li, and Y.-Z. Hu, "Akebia saponin D, a saponin component from *Dipsacus asper* Wall, protects PC 12 cells against amyloid-beta induced cytotoxicity," *Cell Biol. Int.*, vol. 33, no. 10, pp. 1102–10, Oct. 2009.
- [88] S. Mruthinti, N. Capito, A. Sood, and J. J. Buccafusc, "Cytotoxicity of Abeta1-42, RAGE23-54, and an Abeta-RAGE complex in PC-12 cells," *Curr. Alzheimer Res.*, vol. 4, no. 5, pp. 581–6, Dec. 2007.
- [89] V. Schaeffer, C. Patte-Mensah, A. Eckert, and A. G. Mensah-Nyagan, "Modulation of neurosteroid production in human neuroblastoma cells by Alzheimer's disease key proteins," *J. Neurobiol.*, vol. 66, no. 8, pp. 868–81, Jul. 2006.
- [90] P. Guarneri, C. Cascio, T. Piccoli, F. Piccoli, and R. Guarneri, "Human neuroblastoma SH-SY5Y cell line: neurosteroid-producing cell line relying on cytoskeletal organization," *J. Neurosci. Res.*, vol. 60, no. 5, pp. 656–65, Jun. 2000.
- [91] H. Honjo *et al.*, "Alzheimer's disease and estrogen," *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 76, no. 1–5, pp. 227–230, Mar. 2001.
- [92] B. Yankner, L. Duffy, and D. Kirschner, "Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides," *Science (80-.)*, vol. 250, no. 4978, pp. 279–282, Oct. 1990.
- [93] S. Y. Lee *et al.*, "Inhibitory effect of green tea extract on β -amyloid-induced PC12 cell death by inhibition of the activation of NF- κ B and ERK/p38 MAP kinase pathway through antioxidant mechanisms," *Mol. Brain Res.*, vol. 140, no. 1–2, pp. 45–54, Oct. 2005.
- [94] M. Y. Stepanichev, Y. . Moiseeva, N. . Lazareva, M. . Onufriev, and N. . Gulyaeva, "Single intracerebroventricular administration of amyloid-beta (25–35) peptide induces impairment in short-term rather than long-term memory in rats," *Brain Res. Bull.*, vol. 61, no. 2, pp. 197–205, Jul. 2003.
- [95] M. Y. Stepanichev *et al.*, "Amyloid- β (25–35)-induced memory impairments correlate with cell loss in rat hippocampus," *Physiol. Behav.*, vol. 80, no. 5, pp. 647–655, Feb. 2004.

- [96] M. Y. Stepanichev *et al.*, “Amyloid- β (25–35) increases activity of neuronal NO-synthase in rat brain,” *Neurochem. Int.*, vol. 52, no. 6, pp. 1114–1124, May 2008.
- [97] G. Li *et al.*, “Protective effect of erythropoietin on beta-amyloid-induced PC12 cell death through antioxidant mechanisms,” *Neurosci. Lett.*, vol. 442, no. 2, pp. 143–7, Sep. 2008.
- [98] M. Ettcheto *et al.*, “A metabolic perspective of late onset Alzheimer’s disease,” *Pharmacol. Res.*, vol. 145, p. 104255, Jul. 2019.
- [99] R. S. Vest and C. J. Pike, “Gender, sex steroid hormones, and Alzheimer’s disease,” *Horm. Behav.*, vol. 63, no. 2, pp. 301–307, Feb. 2013.
- [100] S. Song *et al.*, “Essential Role of E2-25K/Hip-2 in Mediating Amyloid- β Neurotoxicity,” *Mol. Cell*, vol. 12, no. 3, pp. 553–563, Sep. 2003.
- [101] S. Paratore, R. Parenti, A. Torrisi, A. Copani, F. Cicirata, and S. Cavallaro, “Genomic profiling of cortical neurons following exposure to β -amyloid,” *Genomics*, vol. 88, no. 4, pp. 468–479, Oct. 2006.
- [102] A. Valerio *et al.*, “NF- κ B pathway: a target for preventing β -amyloid (A β)-induced neuronal damage and A β 42 production,” *Eur. J. Neurosci.*, vol. 23, no. 7, pp. 1711–1720, Apr. 2006.
- [103] S. Estus *et al.*, “Aggregated Amyloid- β Protein Induces Cortical Neuronal Apoptosis and Concomitant ‘Apoptotic’ Pattern of Gene Induction,” *J. Neurosci.*, vol. 17, no. 20, pp. 7736–7745, Oct. 1997.
- [104] M. Yao, “-Amyloid-Induced Neuronal Apoptosis Involves c-Jun N-Terminal Kinase-Dependent Downregulation of Bcl-w,” *J. Neurosci.*, vol. 25, no. 5, pp. 1149–1158, Feb. 2005.
- [105] T. Martínez and A. Pascual, “Gene expression profile in β -amyloid-treated SH-SY5Y neuroblastoma cells,” *Brain Res. Bull.*, vol. 72, no. 4–6, pp. 225–231, May 2007.
- [106] B. Malik *et al.*, “Oligomeric amyloid- β peptide affects the expression of genes involved in steroid and lipid metabolism in primary neurons,” *Neurochem. Int.*, vol. 61, no. 3, pp. 321–333, Aug. 2012.
- [107] B. Wolozin, “Cholesterol and the Biology of Alzheimer’s Disease,” *Neuron*, vol. 41, no. 1, pp. 7–10, Jan. 2004.
- [108] L. Canevari and J. B. Clark, “Alzheimer’s Disease and Cholesterol: The Fat Connection,” *Neurochem. Res.*, vol. 32, no. 4–5, pp. 739–750, Mar. 2007.
- [109] T. Hartmann, J. Kuchenbecker, and M. O. W. Grimm, “Alzheimer’s disease: the lipid connection,” *J. Neurochem.*, vol. 103, no. s1, pp. 159–170, Nov. 2007.
- [110] J. Schommer, G. Marwarha, T. Schommer, T. Flick, J. Lund, and O. Ghribi, “27-Hydroxycholesterol increases α -synuclein protein levels through proteasomal inhibition in human dopaminergic neurons,” *BMC Neurosci.*, vol. 19, no. 1, p. 17, Dec. 2018.
- [111] M. Mesulam, “The Cholinergic Lesion of Alzheimer’s Disease: Pivotal Factor or Side Show?,” *Learn. Mem.*, vol. 11, no. 1, pp. 43–49, Jan. 2004.
- [112] V. Schaeffer, L. Meyer, C. Patte-Mensah, A. Eckert, and A. G. Mensah-Nyagan, “Dose-dependent and sequence-sensitive effects of amyloid-beta peptide on neurosteroidogenesis in human neuroblastoma cells,” *Neurochem. Int.*, vol. 52, no. 6,

pp. 948–55, May 2008.

- [113] E. Barbero-Camps, A. Fernández, A. Baulies, L. Martinez, J. C. Fernández-Checa, and A. Colell, “Endoplasmic reticulum stress mediates amyloid β neurotoxicity via mitochondrial cholesterol trafficking,” *Am. J. Pathol.*, 2014.
- [114] P. ORMEN, Murat; CALAN, Ozlem GURSOY; ERGUR, Ugur Bekir; AKAN, “The Effect of Dichloronitrophenol on Amyloid Beta Toxicity and Steroid Levels.,” *J. Neurol. Sci.*, vol. 34, no. 1, pp. 16–31, 2017.
- [115] E. E. Baulieu, P. Robel, and M. Schumacher, “Neurosteroids: beginning of the story.,” *Int. Rev. Neurobiol.*, vol. 46, pp. 1–32, Jan. 2001.
- [116] P. Guarneri *et al.*, “Neurosteroids in the retina: neurodegenerative and neuroprotective agents in retinal degeneration.,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1007, pp. 117–28, Dec. 2003.
- [117] O. G. Calan, P. Akan, A. Cataler, C. Dogan, and S. Kocturk, “Amyloid Beta Peptides Affect Pregnenolone and Pregnenolone Sulfate Levels in PC-12 and SH-SY5Y Cells Depending on Cholesterol,” *Neurochem. Res.*, 2016.

8. EKLER

8.1. Ek-1 Etik Kurul Onayı

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2012/13-07	Tarih: 05.04.2012
	Doç.Dr.Pınar AKAN'ın sorumlusu olduğu "Aminoglutethimid'in Nöronal Hücre Hatlarında Steroid Sentezi ve Amiloid β Peptit Toksisitesi Üzerine Etkisi" 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.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Banu
Prof.Dr.Besti ÜŞTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Yüksek Hemşire	DEÜ Hemşirelik Fakültesi	Kadın	E ☐	H ☒	Besti
Prof.Dr.Osman AÇIKGÖZ	Fizyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	Osman
Prof.Dr.Mehtap MALKOÇ	Ph.D.Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEÜ Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksekokulu	Kadın	E ☐	H ☒	Mehtap
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU	Halk Sağlığı	DEÜ Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	Reyhan
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEÜ Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	Nejat
Prof.Dr.Adnan MENDERES	Plastik Cerrahi	DEÜ Tıp Fakültesi Plastik Cerrahi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	Adnan
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Ece
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	Hüseyin
Prof.Dr.Servet AKAR	İç Hastalıkları (Romatoloji)	DEÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Servet
Doç.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Mukaddes
Doç.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Ayşe
Doç.Dr.İşıl TEKMEK	Histoloji ve Embriyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	İşıl
Prof.Dr.Meltem Kutlu GÜRSEL	Hukuk	D.E.Ü Hukuk Fakültesi İdare Hukuku Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Meltem
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐	H ☒	İhsan

8.2. Ek-2 Özgeçmiş



CUMHUR DOĞAN

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

Kimlik Numarası	12431525328
Doğum Tarihi	29/10/1985
İletişim Adresi	Fevziçakmak Mahallesi Kuş Konmaz Sokak No:63 Daire:1
Telefon	(232) 234 57 80 (553) 242 33 00
E-posta	cumhur.dogan@windowslive.com
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri

14 Eylül 2006 - 14 Eylül 2010 (4 yıl 1 ay)
DİĞER (Ege Üniversitesi), TÜRKİYE
DİĞER, DİĞER
Diploma Numarası: 16972/2498

Yabancı Dil Bilgileri

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

Ar-Ge Yetkinlik

Makaleler

Ö. GÜRSOY ÇALAN, P. AKAN, C. DOĞAN, A. ÇATALER KARAKUŞ & A. S. KOÇTÜRK,
Amyloid Beta Peptides Affect Pregnenolone and Pregnenolone, NEUROCHEMICAL
RESEARCH, 2016, 0364-3190, 41, 1, 1700-1712.

Projeler

ULUSAL, BURSIYER, NÖRONAL HÜCRE İÇİ KOLESTROL DÜZEYLERİNİN AMİLOİD
BETA TOKSİSİTESİ VE NÖRO STEROİDLERİN SENTEZİ ÜZERİNE ETKİSİ, Yürütülen
Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER
(TÜBİTAK Başkanlık) (Yurt İçi) , 01 Mayıs 2011, 01 Mayıs 2013.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Proje Bilgileri

110S412, Nöronal hücre içi kolesterol düzeylerinin Amiloid Beta toksisitesi ve nörosteroidlerin sentezi üzerine etkisi, 1001 - Araştırma, Burslu, Sonuçlandı, ARDEB, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 01.10.2011 - 01.05.2013, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.05.2011 - 01.05.2013.

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