



T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ASTROSİT HÜCRELERİNDE OLUŞTURULAN ALZHEİMER
HASTALIĞI MODELİNDE NESFATİN-1'İN ANTİOKSİDAN
ETKİSİ**

Aysel KÖSE YETER
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Mustafa ÖRKMEZ

Gaziantep
2018

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ASTROSİT HÜCRELERİNDE OLUŞTURULAN ALZHEİMER HASTALIĞI
MODELİNDE NESFATİN-1'İN ANTİOKSİDAN ETKİSİ**

Aysel KÖSE YETER

Tez Savunma Tarihi: 12.01.2018
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışmasının bir “Yüksek Lisans” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Mustafa ÖRKMEZ
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

İmzası

Yrd. Doç. Dr. Mustafa ÖRKMEZ

Yrd. Doç. Dr. Hakim ÇELİK

Yrd. Doç. Dr. Elif İŞBİLEN

BEYAN

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

15.12.2017

Aysel KÖSE YETER

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında bilgilerini, deneyimlerini ve gerekli tüm yardımlarını benden esirgemeyen danışmanım Yrd. Doç. Dr. Mustafa ÖRKMEZ'e teşekkür ederim.

Maddi ve manevi fedakârlıkları ile bugünlere gelmemde en büyük paya sahip olan ve eğitim hayatım boyunca her konuda destek olup bana her zaman güvenen ve yanımda olan aileme ve sevgili eşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR.....	iv
TABLolar LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
ÖZET	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Alzheimer Hastalığı	4
2.2 Alzheimer Hastalığının Tarihçesi	5
2.3 Alzheimer Hastalığı'nın Epidemiyolojisi	5
2.4. Alzheimer Hastalığında Klinik Semptomlar.....	6
2.5. Alzheimer Hastalığında Tanı	7
2.6. Alzheimer Hastalığının Tedavisi ve Kullanılan İlaçlar	8
2.6.1 Kolinesteraz İnhibitörleri	9
2.6.2 Kognitif Bozukluğa Yönelik Tedaviler	9
2.6.2.1. Kolinerjik etki gösteren ilaçlar:	9
2.6.2.2. Metabolik ve vasküler etki gösteren ilaçlar:	9
2.6.2.3. Büyüme faktörleri:	10
2.6.2.4. Amiloid oluşumuna etki gösteren ilaçlar:	10
2.6.2.5. Davranış semptomlarına etki gösteren ilaçlar:.....	10
2.6.2.6. Diğerleri:	10
2.7 Alzheimer Hastalığı'nın Genetiği	11
2.8 Alzheimer Hastalığı Patolojisi	11
2.8.1. Amiloid beta (A β) ve Nörofibril Yumaklar (NFY)	13
2.9. Alzheimer Hastalığında Oksidatif Hasar	15
2.10. Astrositler.....	17
2.10.1 Astrosit Hücrelerin Fonksiyonları	18
2.11. Nesfatin-1.....	19
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	26
3.1 Çalışmada Kullanılan Araç Gereç ve Saf Malzemeler	26
3.2 Çalışmada Kullanılan Yöntemler.....	27
3.2.1 Astrosit Hücrenin in Vitro Koşullarında Kültüre edilmesi.....	28
3.2.1.1 Astrosit Hücreleri.....	28
3.2.1.2. Donmuş Hücrelerin Çözdürülmesi	29
3.2.1.3. Hücrenin Pasajlaması ve Dondurulma işlemi	29
3.2.1.4. Hücrelerin Sayımı	30
3.2.2. Hücre Canlılık Testi (MTT).....	30
3.2.2.1. A β Toksisitesi ile In vitro Alzheimer Modelinin Oluşturulması	32
3.2.2.2. Nesfatin Molekülünün Doz Aralığının Belirlenmesi	32
3.2.3. Oksidatif Hasar Testleri ve Antioksidan Parametreler	33
3.2.3.1. TBARS Testi.....	33
3.2.3.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Testi.....	34

3.2.3.3. Katalaz Testi	35
3.2.3.4. Süperoksit Dismutaz (SOD) Testi	36
4. BULGULAR.....	37
4.1. MTT Hücre Canlılığı Test Sonuçları	37
4.1.1. A β Toksitesiyle In Vitro Alzheimer Modelinin Oluşturulması	37
4.1.2. Nesfatin-1 Molekülünün Doza Bağlı Hücre Canlılığına Etkisi	37
4.1.3. Nesfatin-1'in A β Toksitesine Karşı Koruyucu Etkisi.....	38
4.2. Nesfatin-1 Oksidatif Hasara Karşı Koruyucu Etkileri	39
4.2.1. Katalaz Testi Sonuçları	39
4.2.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH Px) Testi Bulguları	40
4.2.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Testi Bulguları	40
4.2.4. Malonildialdehit (MDA) Testi Bulguları.....	41
5. TARTIŞMA	42
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	46
KAYNAKLAR	48

KISALTMALAR

ADI	Dünya alzheimer örgütü
ADNP	Aktive nöron koruyucu protein
AH	Alzheimer Hastalığı
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amiloid Prekürsör Protein
Aβ	Amiloid Beta
CAT	Katalaz
DMSO	Dimetil Sülfoksit
ELISA	Enzim Bağlı İmmüno - Sorbent Testi
GDÖ	Reisberg'in global değerlendirme ölçeği
GFAP	Glial fibriler asidik protein
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
HBSS	Hanks dengeli tuz çözeltisi
H₂S	Hidrojen sulfur
H₂O₂	Hidrojen peroksit
KOAH	Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
MDA	Malondialdehit
MMDT	Mini mental durum testi
mRNA	Messenger RNA
MTT	Hücre Canlılık Testi
NFY/NFA	Nörofibriler Yumaklar, Nörofibriler Ağlar
NUCB2	Nesfatin -1 öncül proteini (NEFA / nükleobindin2)
OSAS	Obstrüktif uyku apne sendromu
PBS	Phosphate buffered saline
PS-1	Presenilin-1
PS-2	Presenilin-2
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
SSS	Santral Sinir Sistemi
TBARS	Tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri testi
UPS	Ubikülin-Proteozom sistemi

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Çalışma araç ve gereçleri	26
Tablo 2. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve kitler.....	27



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Normal ve AH beyin hücresi farkı	4
Şekil.2. AH'da makroskokopik ve mikroskopik bulgularının görünümü	12
Şekil 3. APP' nin β sekretazlar ile işlenmesi.....	13
Şekil 4. AH'de oksidatif stresin mekanizması	16
Şekil 5. AH'de A β toksisitesi.....	17
Şekil 6. Astrosit hücreler	18
Şekil 7. Nesfatin-1 alt segmentleri	20
Şekil 8. Faz kontrast mikroskobu ile örnek primer astrosit hücre kültürü	28
Şekil. 9. MTT'nin süksinat dehidrogenaz aktivitesi ile formazan kristaline dönüşmesi	31
Şekil 10. Astrosit hücrelerinin farklı konsantrasyonlardaki A β ile 24 saat inkübasyonu sonucu elde edilen MTT sonuçları.....	37
Şekil 11. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan Nesfatin-1 dozlarının 24 saatlik uygulama sonucu elde edilen MTT sonuçları.....	38
Şekil 12. Nesfatin-1'in (10 μ M) A β (15 μ M) toksitesine karşı koruyucu etkisinin MTT ile değerlendirilmesi	39
Şekil 13. Nesfatin-1'in katalaz aktivitesi üzerine etkisi	39
Şekil 14. Nesfatin-1'in GSH Px aktivitesi üzerine etkisi	40
Şekil 15. Nesfatin-1'in SOD aktivitesi üzerine etkisi	41
Şekil 16. Nesfatin-1'in MDA aktivitesi üzerine etkisi	41

ÖZET

ASTROSİT HÜCRELERİNDE OLUŞTURULAN ALZHEİMER HASTALIĞI MODELİNDE NESFATİN-1'İN ANTIOKSİDAN ETKİSİ

Aysel KÖSE YETER

Yüksek lisans Tezi, Biyokimya AnaBilim Dalı
Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Mustafa ÖRKMEZ
Ocak 2018, 54 Sayfa

Alzheimer hastalığı (AH), beynin hipokampus ve korteks bölgelerinde geri dönüşümsüz nöron kaybı ile ortaya çıkan, ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır. 65 yaş üstü oluşan demansın en büyük nedenidir. Mikroskopik bulgulara amiloid plak, nörofibril yumakları ve granülovakuolar dejenerasyon saptanmaktadır. AH patogenezinde ilk ortaya çıkan bulgulardan biri de beyin üzerinde oksidatif strese bağlı olarak oluşan değişikliklerdir. Bu çalışmada, bir glia hücresi olan astrositlerde amiloid beta (A β) ile oluşturulan AH modelinde yeni tanımlanan anoreksijenik bir hormon olan Nesfatin-1'in hücre canlılığına ve antioksidan etkisine bakıldı. Katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSX-Px), süperoksit dismutaz(SOD), malondialdehit (MDA) seviyeleri Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemiyle ölçüldü. Astrositlerde A β ile oluşturulan AH modelinde A β , Nesfatin-1, A β + Nesfatin-1 ayrı ayrı dozlarda MTT testi ile hücre canlılığı değerlendirildi. A β eklenerek oluşturulan modelde hücre canlılığı değeri kontrol grubuna göre %100 iken, A β dozu artmasıyla beraber hücre canlılığı değerinde düşüş görülmüştür. 5 uM de %28.5, 7.5 uM de %28.93, 10 uM de %29, 12.5 uM de %30.9 15 uM de ise %32.4 oranında hücre canlılığı değeri düşmüştür. Nesfatin-1 hücre canlılığı üzerine etkisine bakıldığında, düşük dozda (1uM) hücre canlılığında düşüş görülmüş, belirli bir doza (10uM) kadar hücre canlılığında artış olmuş ve bu dozdan sonra hücre canlılığı düşmeye başlamıştır. A β uygulandığında hücre canlılığında %41 oranında düşüş görülmüş, nesfatin uygulandığında hücre canlılığında %10.3 artış görülmüş, A β ve nesfatin birlikte uygulandığında hücre canlılığında %6.8 düşüş meydana gelmiştir. Sonuçlar CAT, GSX-Px, SOD antioksidan enzimlerinin A β ile azalan değerlerinin, Nesfatin-1'in eklenmesi ile dengelendiğini ve MDA biyoaktif aldehitinin A β ile artan değerinin, Nesfatin-1 ile A β birlikteyken azaldığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Nesfatin-1, Alzheimer, amiloid β , MTT

ABSTRACT

ANTIOXIDANT EFFECT OF NESFATIN -1 İN ALZHEIMER'S DISEASE MODEL FORMED in ASTROCYTE CELLS

Aysel KÖSE YETER

Master of Science Thesis, Department of BIOCHEMISTRY

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Mustafa ÖRKMEZ

January 2018, 54 Pages

Alzheimer's disease (AD) is an irreversible, progressive neurodegenerative disease caused by irreversible loss of neurons in the hippocampus and cortex areas of the brain. It is the biggest cause of dementia over 65 years of age. Amyloid plaques, neurofibrillary tangles and granulovacuolar degeneration are detected in the microscopic findings. One of the first findings in the pathogenesis of AD is changes that occur depend on oxidative stress on the brain. In this study, effects of nesfatin-1 which is newly defined anorexigenic hormones on cell viability, and antioxidant effects was evaluated in AD model that was formed in astrocyte cells with amyloid β ($A\beta$). Catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSX-Px), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) were measured using method of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Cell viability was evaluated in AD model, that is formed in astrocyt cells with $A\beta$, for the different doses of $A\beta$, Nesfatin-1, $A\beta$ + Nesfatin-1 by MTT test. In the model formed by adding amyloid beta, cell viability value was 100% compared to the control group, but decrease in cell viability value with the increase of doses of $A\beta$ is observed. Cell viability was decreased by 28.5% at 5 μ M, 28.93% at 7.5 μ M, 29% at 10 μ M, and 30.9% at 12.5 μ M. When the effect on nesfatin-1 on cell viability was examined, there was a decrease in cell viability at low dose (1uM), an increase in cell viability up to a certain dose (10 μ M), and cell viability started to decrease after this dose. When $A\beta$ was added, the cell viability decreased by 41%. When nesfatin-1 was added, cell viability increased by 10.3%, and when $A\beta$ and nesfatin-1 were added together, cell viability decreased by 6.8%. The results show that decreased values of CAT, GSX-Px and SOD antioxidant enzymes by $A\beta$ are balanced with the addition of Nesfatin-1 and that the increased value of MDA bioactive aldehyde with $A\beta$ decreases with the addition of Nesfatin-1 and $A\beta$ together.

Key Words: Nesfatin-1, Alzheimer, amloid β , MTT

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tıbbi teknolojinin gelişmesi ve sağlık hizmetlerinin yaygınlaşmasıyla, insan doğum ve ölüm hızları düşmüş, ortalama insan ömrü uzamış ve yaşlı nüfus artmaya başlamıştır. Yaşlı nüfusun artması özellikle kronik progresif hastalıkların yaygınlaşmasına neden olmuştur. Alzheimer hastalığı da (AH) kronik nörodejeneratif bir hastalıktır. Sağlık hizmetleri bakımından maliyeti yüksektir, erken tanı ve tedaviyle bu hastaların yaşam kalitelerinin yükseltilmesi mümkündür.

AH, demansın en sık görülen nedenidir. Demans açık bir bilinç düzeyinde başta bellek olmak üzere zihinsel ve sosyal yeteneklerin kişinin günlük yaşam aktivitelerini etkileyecek derecede yıkılması şeklinde tanımlanmaktadır (1).

Kronik bir hastalık olarak AH yıkım süreci ortalama 8–10 yıl arası sürmektedir ve hastalık döneminde hastalar için yüksek bakım kalitesi gerekmektedir. Dünya Alzheimer Örgütünün (ADI) ve TÜİK 2014 yılı verilerine göre tüm dünyada 36 milyon alzheimer hastası olduğu tahmin edilmektedir. Yıllar içinde 65 yaş üstü yaşlı nüfus oranının %10'un üzerine çıkacağı ve demans hastalıklarının artacağı belirtilmektedir. 2050 yılına kadar tüm dünyada 135 milyon AH olacağı tahmin edilmektedir (2).

AH tedavisinde genel yaklaşımlar A β -peptid kaynaklı plak oluşumunun engellenmesi yönünde olmaktadır. Son yıllardada bu yönde çalışmalar artmıştır.

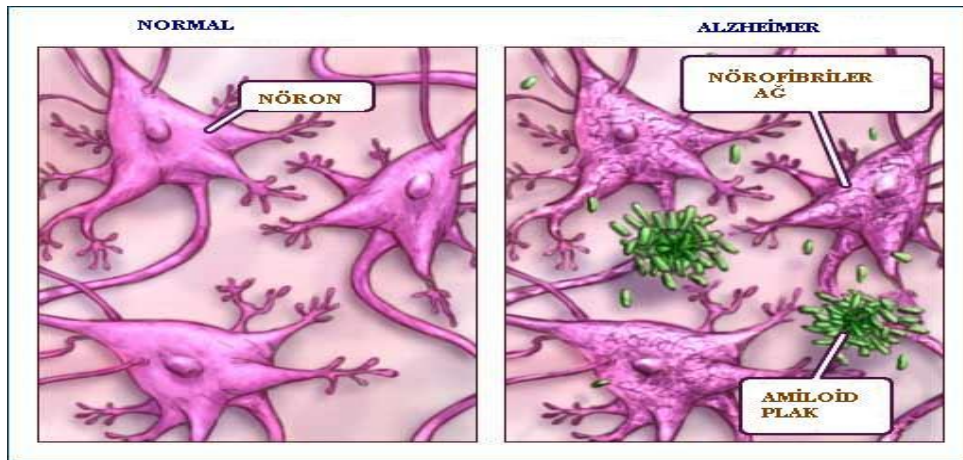
Bu çalışmada, asrositlerde A β ile oluşturulan AH modelinde, ilk kez 2006 yılında tanımlanan Nesfatin-1'in hücre canlılığı ve antioksidan parametrelerin etkilerine bakılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı, beynin hipokampus ve korteks bölgesinde geri dönüşümü olmayan nöron kaybıyla meydana gelen, nörodejeneratif bir hastalık çeşididir. Yaş artmasıyla birlikte hastalık yaygınlaşır ve daha sıklıkla görülmeye başlanır. Görülme oranı 65 yaşına kadar % 1 ve 2 kadar iken, 85 yaş ve üstünde %35'lere çıkmaktadır. Serebral kortekste kolinerjik hasar, hastalıkta gelişen bilişsel ve davranışsal bozukluklara neden olur. Semptomlar hafıza kaybı, konuşma, yön bulma, karar verme, düşünme ve yorumlamada zorluklar; kişilik ve davranış bozuklukları ile karakterizedir (3). AH tüm demans olgularının %50-80'ini oluşturmaktadır. 1960'lı yıllara kadar sıklıkla görülen bir hastalık olmadığı ve ilk tanımı yapıldığında sadece belirli bir yaş sonrası görüldüğü düşünülmüştür (4).

AH artan yaşla beraber demasta ilerleme meydana gelmektedir. Demans öğrenme, bellek, oryantasyon kişilik ve mental bozukluklar sonucu ortaya çıkan bireyin sosyal ve çalışma hayatını etkilen merkezi sinir sisteminde görülen nörodejeneratif hastalığıdır. AH erken başlangıç döneminde, otozomal dominant geçiş özelliği olduğu ve vakaların %3-5 bu nedenle meydana geldiği belirtilmektedir. AH patolojisi incelendiğinde beyinde nöronal hücrelerde bozulma, hiperfosforile olmuş tau proteinlerinden kaynaklı intraselüler NFA ve ekstraselüler A β agregatlarının olduğu gözlenmektedir (şekil 1) (5).



Şekil 1. Normal ve AH beyin hücresi farkı (6)

AH'da beyinde mikroskobik düzeyde saptanan karakteristik lezyonlar senil veya nöritik plaklar ve nörofibriler yumaklardır. Mikrotübüllerin organizasyonu ve stabilizasyonunda rol alan tau proteinlerinin hiperfosforile formları nörofibriler yumaktaki ana protein iken, amiloid prokürsör protein (APP)'den kaynaklanan A β senil plaktaki (ana peptid içeriği A β 42) ve amiloid anjiopatideki temel proteindir (7). Bu lezyonlar özellikle beynin temporal bölgelerinde ve kortikal alanlarında görülür ve bunlara nöron ve sinapslardaki dejenerasyon eşlik eder. Ayrıca nörovasküler disfonksiyon, hücre siklus anomalileri, inflamatuvar süreçler, oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyon altta yatan patogenepler arasında sayılmaktadır (8-11). Amiloid plak sayısı ile demansın şiddeti arasında da bir pozitif korelasyon saptanmıştır (12).

2.2 Alzheimer Hastalığının Tarihçesi

AH üzerine yapılan çalışmalar hastalığın başlangıç evrelerinde oluşan gen mutasyonunun neden olduğu moleküler değişim ve çevresel faktörler üzerine yapılmaktadır.

Dr. Alois Alzheimer 1901 yılında 51 yaşındaki bayan hastasını 5 yıl boyunca takip etmiştir (13). 1906 yılında hastasının ölümü üzerine Münih Psikiyatri Kliniği'nde hastanın postmortem incelemesi yapılmıştır. Otopsi gümüş boyası ile daha önce gözlemlenmeyen senil plaklar, distrofik nöritler, nörofibriler yumaklar ve serebral kortekste belirgin yaygın atrofi ve hücre kaybı tespit etmiştir. Dr. Alzheimer 1906 yılında Güney Batı Alman Akıl Hastalıkları Uzmanları Kongresinde bu bulguları serebral korteksin tuhaf bir hastalığı adıyla sunmuştur (14). Hastalığı Dr. Alzheimer klinik şefi Dr. Emil Kraepelin Alzheimer ismini vermiş ve 1911 yılında demans literatürüne girmiş ve hastalık aynı yıl Fullerin makalesinde Alzheimer Hastalığı vaka bildirisi olarak yayınlanmış ve 150 hastadan toplanan verilerle birlikte AH olarak bilinmesi sağlanmıştır (15).

2.3 Alzheimer Hastalığı'nın Epidemiyolojisi

AH ilgili yapılan araştırmalarda, Batı Avrupa ve Birleşik Amerika'da demansların %50-70'inin AH kaynaklı olmasına rağmen Rusya ve Japonyada ise multi infarkt demansların daha çok olduğu belirtilmiştir (9). 2050 yılına kadar tüm dünyada 135 milyon insanın

AH hastası olacağı düşünülmektedir (2). ABD’de 65 yaş üzerindeki insanların %13’e yakınında, 85 yaş üzerindeki insanların ise %43’lük kısmında AH olduğu tespit edilmiş ve 65-85 yaşları arasında hastalığın prevalansı beş yılda bir iki kat artacağı rapor edilmiştir. Türkiye’de 70 yaş üzeri yapılan çalışmada ise prevalansın %11 olduğu ve 250-300 bin AH’sı olduğu belirtilmiştir. Sekiz bin insan üzerinde AH’lığının genetik etkisi araştırılmış ve APOE-ε4 geni üzerine araştırma yapılmıştır ve araştırma sonucunda, cinsiyete göre önemli farklılıklar olduğu belirtilmiştir. AH kadınlarda erkeklere oranla daha fazla görüldüğü ve 65 yaşında olan her 6 kadından birinin Alzheimer hastası olurken, erkeklerde ise bu oranın 11 erkekten biri şeklinde olduğu belirtilmiştir (16).

2.4. Alzheimer Hastalığında Klinik Semptomlar

AH, son yıllarda üzerinde en fazla çalışılan hastalıklardan biridir ve sinsi başlayıp yavaş ilerleme göstermektedir. Bu yüzden hastalıktan korunmak için belirleyici diagnostik testler ve etkin bir tedavi henüz bulunamamıştır (17). AH’nın ilk aşamasındaki temel belirtisi bellek bozukluğudur ve hastalığın seyri arttıkça dil (afazi), motor işlevler (apraksi), algı (agnozi) gibi özel kognitif alanlarda ilerleyici bozulmalar meydana gelmektedir.

AH ilerleyici bir hastalıktır, bu nedenle demans şiddetine göre sınıflandırmalar yapılmıştır. Yapılan bu sınıflandırmada yaygın olarak Reisberg’in Global Değerlendirme Ölçeği (GDÖ) ya da Mini Mental Durum Testi (MMDT) kullanılmaktadır. AH’da bu evreleri klinik duruma göre 7 evreye ayrılarak tanımlama yapılmaktadır. (18)

Evre 1; başlangıç evresi sayılmakta AH’da bilişsel yönden az sayılabilecek bulgular oluşmaya başlamakta ve MSS patolojik yönden birçok farklı bulgular meydana gelmektedir.

Evre 2; bu evrede hastalarda çok hafif bilişsel bozulma meydana gelmektedir ve hasta nesnelerin yerini unutmaya başlamıştır ama iletişim becerileri devam etmektedir.

Evre 3; bu evre hafif bilişsel bozulma evresidir ve hasta tanıdıklarının isimlerini unutmaya başlamakta eşyalarını kaybetmeye ve organizasyon yetenekleri azalmaya başlamaktadır.

Evre 4; Orta bilişsel bozulma olarak değerlendirilir ve kısa bir sürede bellekte zayıflamalar meydana gelmiş hasta sosyal yönden içine kapanmaya başlamıştır

Evre 5; Orta veya şiddetli bilişsel bozulma evresi olarak değerlendirilir. Artık hasta yer ve zaman kavramları ile ilgili tam bir karışıklık yaşamaktadır. Objeleri tanımada zorluk çekmektedir (agrazi), motor becerileri bozulmuş (apraksi) ve fiziksel ihtiyaçlarını karşılamak için yardıma ihtiyaç duymaktadır.

Evre 6; Hastada şiddetli bilişsel bozulma başlamaktadır. Konuşma becerisini kaybetmeye başlamıştır (afazi). Fiziksel ihtiyaçları için dışarıdan tamamen yardıma ihtiyaç duymaktadır.

Evre 7; Çok şiddetli bilişsel bozulma evresi ve geç dönem olarak belirtilmektedir. Hastanın konuşma yeteneği tamamen kaybolmuş tam bir gözetim gerekmektedir. Evrenin son döneminde ise yutma gücüğü görülebilmektedir. AH tanı konulan hastaların çoğunda bilişsel zayıflığa ek olarak davranışlarda değişiklik ve psikiyatrik değişiklikler depresyon, anksiyete, ajitasyon, sanrılar, saldırganlık, amaçsız dolaşım gibi belirtiler ortaya çıkmaktadır ve hastaların büyük bir kısmında bradikinezi ve rijitide gibi belirtiler görülürken, hastaların küçük bir grubunda ise miyoklonus ve nöbetler görülmektedir (19-20).

2.5. Alzheimer Hastalığında Tanı

AH klinik tanı konulurken iki ölçüt kullanılmaktadır. Bunlardan birisi, Ulusal Nörolojik ve İletişim Hastalıkları Enstitüsü ve İnme-AH ve İlişkili Hastalıklar Derneği tarafından geliştirilen tanı ölçütü, diğeri ise Tanısal ve Sayımsal El Kitabı ölçütüdür ve bu ölçütler kullanılarak tanı konulabilmektedir. AH'de tanı daha çok demansın nedenini anlamaya yöneliktir. Hastaya tanıda fizik ve nöropsikolojik muayene yapılmaktadır. Nöropsikolojik muayenede en başta mini mental testler yapılmakta bu testlerle hastanın dil fonsiyonları, okuma yazma, anlama planlama, uyum gibi hafıza değerlendirilmesi yapılmakta ve ayrıca labaratuvar testlerindende faydalanılmaktadır (21).

Vitamin B₁₂, folikasit, homosistein, tiroid, böbrek fonksiyon testleri, kan şekeri, kan sayımı, elektrolidlere ve HIV serolojisine bakılmakta ve gerekli durumlarda beyin omurilik sıvısında da tau protein ve AB42 protein ölçümlerinden de faydalanılmaktadır.

Demans tanısında radyolojik görüntüleme yöntemlerine bakılmakta bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans görüntüleme, pozitron emisyon tomografi gibi yöntemler kullanılmaktadır (21).

2.6. Alzheimer Hastalığının Tedavisi ve Kullanılan İlaçlar

AH bir asırdır biliniyor olmasına rağmen radikal ve köklü bir tedavisi henüz bulunamamıştır. Fakat klinik uygulamalar kullanılarak AH bilişsel fonksiyonları iyileştirmek, duygusal ve psikolojik değişiklikleri kontrol edebilmek ve hastanın mevcut yaşam seviyesini iyileştirmek için bazı semptomatik tedavi yaklaşımları geliştirilmiştir. AH tedavisinde belirli bir protokol mevcut değildir. Nöron kaybı ve kaybın geri dönüştürülemez olması buna bağlı olan kolinerjik sistemdeki etkilerin azaltılmasıdır. Amerikan Gıda ve ilaç Dairesi (FDA) AH tedavisinde 4 tane kolinesteraz inhibitörü (takrin, donepezil, rivastigmin, galantamin) ve N-metil-D- aspartat (NMDA) antagonisti olan memantini onaylamıştır (22-23).

AH öncelikli birincil tedavisinde kolinerjik ajanlarla beyindeki kolinerjik fonksiyonların artırılması, A β oluşumunu engelleyebilmek nörofibrillerin önemli bir elementi olan tau proteinlerinin müdahale edebilmek, kolinerjik eksiklik dışındaki nörotransmitter eksikliklerine yönelik tedavi sinir büyüme faktörleri ve östrojen kullanımı ile kolinerjik atrofının önlenmesi ve antioksidanların kullanılması ile serbest radikal kaynaklı oksidatif hasarın azaltılabilmesi ve antiinflamatuvar ilaçların kullanılması ile inflamasyonun azaltılması amaçlanmaktadır (24-25).

AH ikincil tedavisinde ise amaç hastalığın ortaya çıkış sürecinde meydana gelen depresyon, sanrılar, bunaltı, ajitasyon ve uyku bozukluğu gibi semptomlara yönelik olup bu bulguların giderilmesi veya azaltılmasına ve hastanın yaşam kalitesinin artırılması, hastalığın ilerleyişini azaltmak amaçlanmaktadır (26).

AH bilişsel bozukluğun giderilmesine yönelik kullanılan ilaçların en başında kolinerjik ajanlar gelmektedir; çünkü AH korteks ve diğer beyin bölgerinde kolinerjik hücre kaybı ve bilişsel yıkım meydana gelmektedir. AH asetilkolin transferaz ezim aktivitesinin düşük olmasından dolayı en çok kolinerjik nöronlarda harabiyet meydana gelmektedir.

2.6.1 Kolinesteraz İnhibitörleri

AH serabral kortekste ve beyin sapında kolinergik sistemdeki yetersizlik sonucunda amiloid plaklar ve nörofibriler yumaklar meydana gelmektedir. Kolinesteraz inhibitörler kolinergik sistemin düzenlenmesinde ve asetilkolinin neden olduğu intrasynaptik yıkımını geciktirmekte ve etkisini uzatmaktadır. Kolinesteraz muskarinik ve nikotinik etkiyle toksik amiloid prekürsürün oluşmasını engellemeye çalışır, büyüme faktörlerinin sentezini artırır, nöronal dejenerasyonu azaltırlar, muskarinik ve nikotinik tau proteininin fosforilasyonunu azalmasında önemli etki göstermektedirler. Ayrıca orta ve hafif şiddette AH'da denenmiş bilişsel olarak yararlı olduğu belirtilmiştir (26).

2.6.2 Kognitif Bozukluğa Yönelik Tedaviler (26)

2.6.2.1. Kolinergik etki gösteren ilaçlar:

- Asetilkolin esterase inhibitörleri:
- Reversibl: Donepezil, rivastigmin, galantamin, takrine, MDL 73, MDY 745.
- İrreversibl: Phosostigmin, synapton, metrifonat, eptastigmin, suronakrin, velnakrin.
- Kolinergik agonistler: Aviva, BC-PS, ENS, CI-979.
- Muskarinik ve kolinergik reseptör agonistleri: Xanomeline, Milameline, Talsaclidin, YM796.

2.6.2.2. Metabolik ve vasküler etki gösteren ilaçlar:

- Antioksidanlar (vitamin E ve C, ginkobiloba ekstraktları, ginseng ekstraktları, pentoksifilin, propentofilin, idebenon, selenyum, L-karnitin (mitokondrilerde uzun zincirli yağ asitlerinin birikimini azaltır), Koenzim Q
- Nootropikler (pirasetam, oksarasetam, anirasetam, etirasetam, pramirasetam).

Antioksidan İlaçlar

Biyolojik sistemde serbest radikallerin etkilerini ortadan kaldırmak için kompleks bir savunma sistemi gelişmiştir ve bu sistemlere antioksidan savunma mekanizmaları ya da antioksidanlar adı verilir (27)

AH'da Aβ proteini, serbest-radikal oluşumuna neden olur. Serbest radikallerin birikimi ve lipid peroksidasyonu nöronal hasara neden olur antioksidan ilaçlar Aβ proteinin oluşturduğu toksik etkiyi azaltır. Bu durumda oluşan nöron hasarı AH beyinde kalıcı

hasara yol açmakta ve meydana gelen bu hasara bağlı olarak membran lipidleri, proteinler ve DNA' da zarar görmektedir (27).

AH oksidatif hasardan kaynaklanan nörodejenerasyonu önlemek amacıyla bir çok antioksidan kullanılmaktadır (27). Kullanılan antioksidanlar;

- Enzimler (SOD, CAT, GSH-Px)
- Proteinler (Albumin, serüloplazmin)
- Selenyum
- Askorbik asit (C vitamini)
- Tokoferoller (E vitamini)
- Karotenoidler
- Flavonoidler
- Glutasyon ve tiyoller
- Koenzim Q, ubikinon ve türevleri

Vitamin E ve C'de AH ilerleyişini yavaşlatmak için kullanılmaktadır. Ayrıca Ginkgo biloba AH kognitif düzelmede faydalı olduğu belirtilmiştir.

2.6.2.3. Büyüme faktörleri:

Sinir hücresi büyüme faktörü (NGF).

2.6.2.4. Amiloid oluşumuna etki gösteren ilaçlar:

- A β -peptid aşısı,
- Sekretaz inhibitörleri.

2.6.2.5. Davranış semptomlarına etki gösteren ilaçlar:

- Nöroleptikler (haloperidol, tioridazin),
- Antipsikotikler (risperidon, olanzapin, quetiapin, klozapin),
- Benzodiazepinler (diazepam, oksazepam, klonazepam, lorazepam),
- Antikonvülzanlar (karbamazepin, valproik asit),
- Antidepresanlar (serotonin geri alım inhibitörleri sertralin, fluoksetin, sitalopram ve trisiklik antidepresanlar)

2.6.2.6. Diğerleri:

- Nonsteroid antiinflamatuar ilaçlar (NSAİİ),
- Östrojen, monoaminoksidaz (MAO) inhibitörleri,
- Statinler, nimodipine, alkar.

2.7 Alzheimer Hastalığı'nın Genetiği

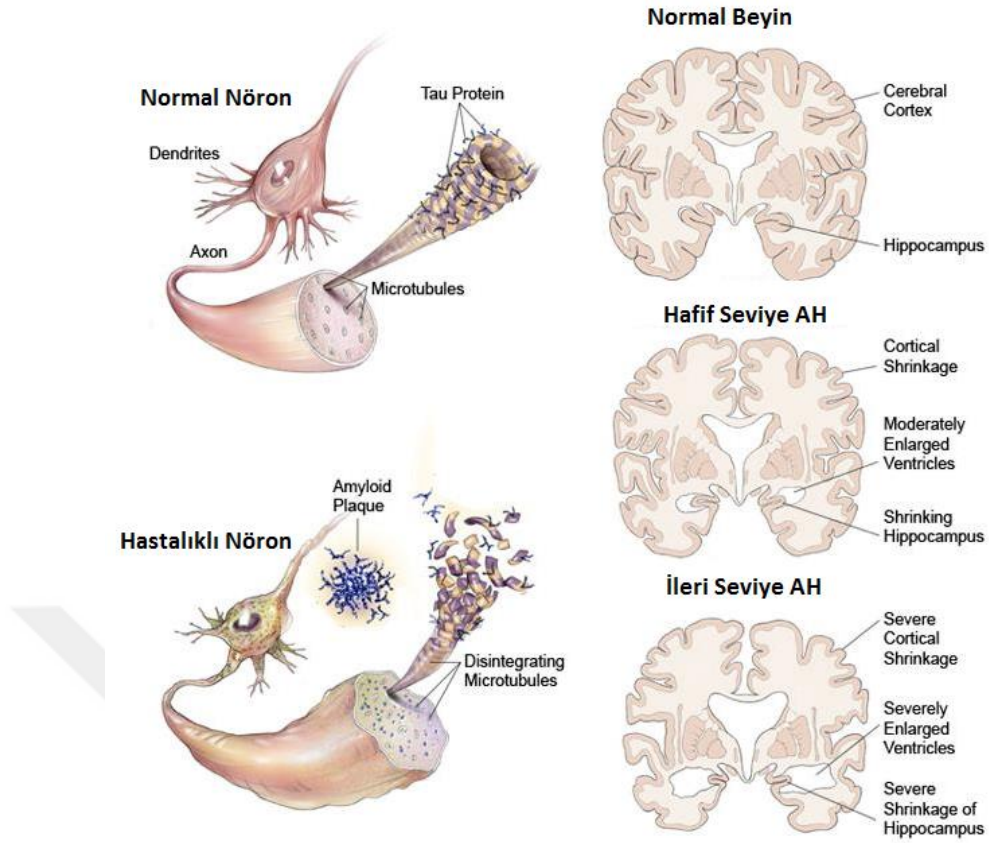
AH'da genetik faktörlerle birlikte hastalığın gelişiminde çevresel faktörlerin etkileşimi bulunmaktadır. AH'da genetik ve çevresel faktörlerin birbiri ile büyük oranda etkileşimi söz konusudur. Yapılan çalışmalarda Alzheimer hastalarının ancak %5'inin Mendelien otozomal dominant geçişli hastalığa yakalandığı belirtilmiştir (28).

AH genetik olarak incelendiğinde, değişik genlerin etkileri saptanmıştır. Bu genler amiloid prekürsör (APP), presenilin-1 (PS-1), presenilin-2 (PS-2), ve apolipoprotein E (ApoE) genleridir. Ayrıca bu genler otozomal dominant geçiş kaynaklıdır. Bu genlerin görevleri çok iyi bilinmemektedir. PS-1 geni 14 numaralı kromozomda, PS-2 geni 1 numaralı kromozomda, ApoE geni 19 numaralı kromozomun yapısında, APP ise 21 numaralı kromozomda yer almaktadır. APP'nin 21 numaralı kromozomda olması, yaşlı Alzheimer Hastalarında APP'nin artmış olması ile 40 yaş üzeri down sendromlu hastalarda nöropatolojik bulgular arasında benzerlik bulunmuş olması nedeniyle birbiriyle ilişkilendirilmiştir. Bu genlerdeki mutasyonlar her durumda APP'den metabolize edilen proteinin atılamayıp amiloid plaklar içinde biriken daha uzun bir şeklinin üretiminin artmasına yol açabildikleri belirtilmiştir (28).

2.8 Alzheimer Hastalığı Patolojisi

Alzheimer Hastalığına hem klinik hem de patolojik inceleme sonucu tanı konabilmektedir. Nöropatolojik bulgular, ancak yapılan otopsi sonucunda elde edilebilmekte ve konulan tanıda ancak postmortem süreçte rol oynamaktadır, klinik bir yararı olamamaktadır. Beyin dokusundan elde edilen patolojik örnekler makroskopik ve mikroskopik bulgular olarak sınıflandırılmaktadır. AH'nın makroskopik ve mikroskopik bulgularının görünümü şekil 2'de verilmiştir (29).

Alzheimer hastalarında, yapılan incelemelerde bulunan makroskopik bulgularda, beyinde, hipokampusta ve kortekste önemli atrofi (küçülme) görülmüştür. Mikroskopik bulgularda ise, amiloid plak, nörofibril yumakları ve granülovakuolar dejenerasyon saptanmaktadır (29).



Şekil.2. AH’da makroskokopik ve mikroskopik bulgularının görünümü (29)

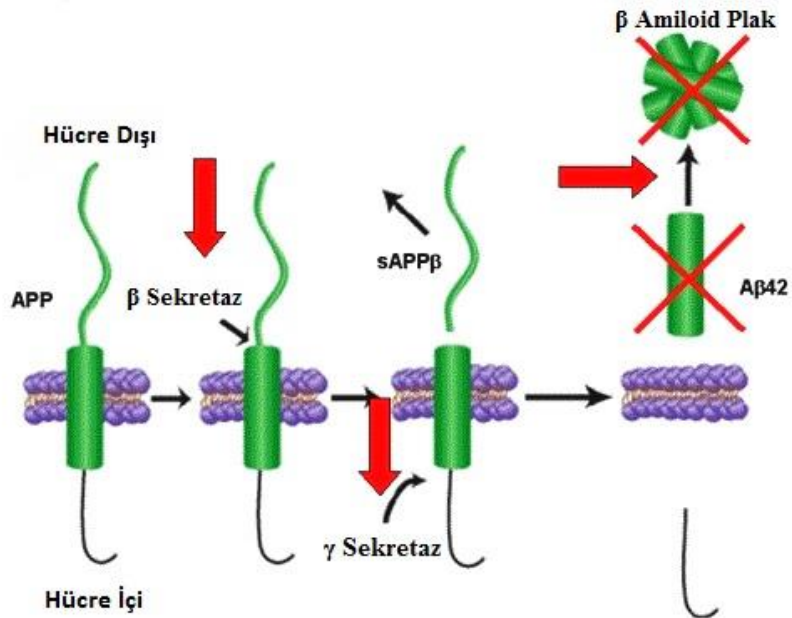
AH patogenezinde ilk ortaya çıkan bulgulardan biri de beyinde oksidatif strese bağlı olarak oluşan değişikliklerdir (29). Nöronlar oksidatif hasardan etkili bir şekilde korunulabilse, hastalığın ortaya çıkmayacağı kanısına varmışlardır.

Bu konuda çalışan araştırmacıların birçoğu, AH’nın tamamen ya da kısmen amiloidin anormal işlenmesi ve depolanmasına bağlı olarak meydana geldiğini belirtmişlerdir. Amiloidin patojenik şekli, amiloid prekürsör proteininin (APP) anormal şekilde kesilmesiyle oluşmakta ve A β 1-42 olarak isimlendirilmektedir. APP α sekretaz tarafından kesilmekte ve A β 1-42 ise, APP’nin β ve γ sekretazlarla kesilmesi sonucu oluşmakta ve çözünemeyen agregatlar olarak beyinde birikmektedir. Bu birikim sonucu inflamatuvar yanıtlar ve hücre harabiyeti meydana gelmektedir. Oluşan bu durum, dejeneratif döngünün önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Ancak bu AH patogenezindeki tek neden değildir. AH patogenezinde rol alan diğer patolojik bulgular ise tau proteininin anormal şekilde fosforillenmesi ve nörofibril yumakların oluşmasıdır (30,31).

2.8.1. Amiloid beta (A β) ve Nörofibril Yumaklar (NFY)

Amiloid β proteini, 40-42 aminoasit uzunluğundadır. A β 19. kromozom tarafından kodlanan bir transmembran protein olan APP birtakım proteolitik enzimler tarafından kesilerek ve metabolize edilmektedir ve amiloid plakların temel bileşenini oluşturmaktadır (32). A β APP'nin hücre içi bölgesi sayılan bir parçasıdır ve birtakım proteolitik enzimler tarafından kesilerek ve metabolize edilmektedir. Kesim gerçekleştiren bu enzimler α , β ve γ sekretazlardır. α sekretazlar, APP'yi A β 'nin ortasına yakın olan, ekstraselüler bir bölgeden kesmektedir ve kesim sonucunda sAPP denilen ve çözülebilir olan yeni bir ekstraselüler protein oluşturmaktadır. Kesim sonucu oluşan bu proteinin sinaptik temas, nörit uzaması gibi etkilerinin yanı sıra hücre içi kalsiyum dengesinin sağlanmasında görev aldığı belirtilmiştir (33).

β sekretazlar ise APP amino uçtan γ sekretazda karboksi uçtan kesmektedir ve A β oluşmaktadır. Kesim sonucunda A β içeren ve çözünemeyen maddeler birikerek amiloid plakları oluştururlar. Oluşan nörotoksisiteyi, β sekretaz enziminin kesimi yaptığı ve oluşan A β 'nin uzunluğunu belirlediği düşünülmektedir. Amiloid β 'nin 40 ve 42 aminoasit uzunluğunda olan iki formu bulunmaktadır. 42 aminoasitlik A β formu daha fazla birikme özelliğine sahiptir (34, 35).



Şekil 3. APP' nin β sekretazlar ile işlenmesi (36)

A β 'nin amino ucunu oluştururken, γ sekretazlar ile kesimi sonucu, karboksi ucu oluşur. α sekretaz enzimi ile kesim sonucunda ise, A β oluşumu engellemektedir(şekil 3).

John Hardy, AH ile ilgili olarak 2002 yılında 'Amiloid Hipotezi' ni ortaya atmıştır. Bu hipoteze göre A β birikimi AH progresyonunu tetikleyen ilk patolojik bulgudur (37). Bu nedenle son yıllarda AH için geliştirilen tedavi protokolleri özellikle A β nörotoksisitesi üzerine yoğunlaşmıştır.

Nörofibril yumaklar, nöronların sitoplazmasında bulunan hücre içi yapılarıdır ve 17 kromozomda kodlanmaktadır (38). Temel yapıları fosforile olmuş tau proteindir. Tau proteini, mikrotübül ilişkili protein ailesinin üyelerindendir. Tau proteini; aksonal transport, mikrotübül kararlılığı ve hücre iskelet bütünlüğünde rol oynamaktadır. AH'da aşırı aktif kinazlar ve etkinliği azalmış fosfatazlar, tau proteininin hiperfosforile olması sonucu mikrotübüle bağlanma yeteneğinin bozulmasına neden olurlar. Mikrotübüle bağlanamayacak duruma gelen fosforile olmuş tau, çözünemeyen çift sarmallı filamentler halinde polimerize olurlar. Bu filamentler birikerek, zaman içerisinde intranöronal nörofibril yumaklar haline gelirler.

(39).

Yapılan çalışmalarda, apoptozda rol alan Bcl-2 ailesi proteinlerin (Bax, Bak, Bcl-2, Bim, Bcl-w ve Bcl-x) ekspresyon seviyelerinin AH'nda hasar gören nöronlarda değişmiş olduğu gösterilmiştir (40). Bax ve Bak, pro-apoptotik ailenin üyeleridir. Hücrede mitokondri membranına transloke olarak sitokrom C salınımını başlatır ve hızlandırır. Bu olayların akabinde de apoptoz gelişir. Bcl-2 ve Bcl-XL ise anti apoptotik ailesinin üyesidir. Nöronların da dahil olduğu birçok hücre tipinde apoptotik hücre ölümünü önlemektedir (41).

Oligomerik A β 'nin Bcl-2, Bim ve Bax'ın ekspresyon seviyelerini değiştirdiği ve Bax'ın aktivitesinin genetik ve farmakolojik ablasyonunun in vitro ve in vivo ortamda oligomerik A β aracılığı ile süprese edildiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar, Bax'ın oligomerik A β 'nin sebep olduğu nöronal ölümü indklemede önemli bir rolü olduğunu göstermektedir (42).

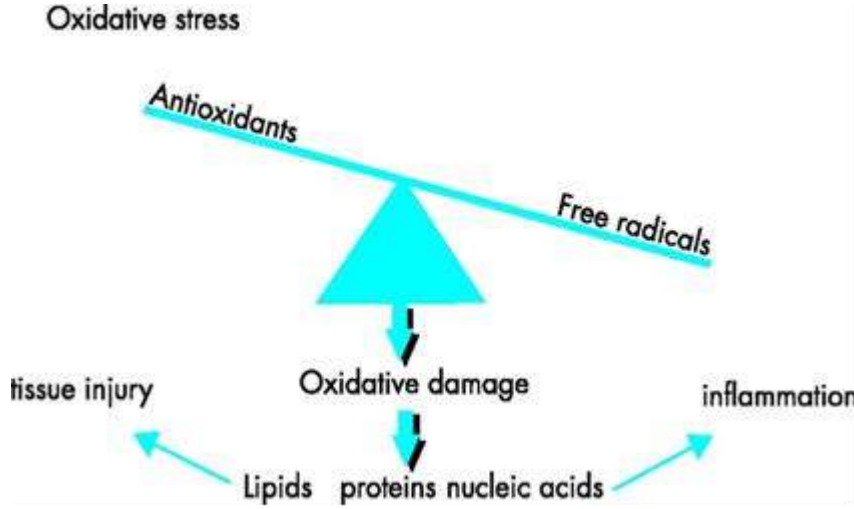
A β yapmış olduğu primer nörotoksik ve apoptotik etkinin yanı sıra AH progresyonuna katkıda bulunan nöroinflamasyon gibi sekonder santral etkiler de göstermektedir. Mikroglialar beyindeki ana bağışıklık hücreleridir. A β 'nin indüklediği nöroinflamasyon santral olarak mikrogilayal aktivasyona neden olmaktadır (43).

Mikroglial aktivasyon AH'nın gelişim sürecinde iki yönlü etki göstermektedir. Bir taraftan uzun süreli A β stimülasyonu mikroglial disfonksiyona neden olmaktadır. Bunun sonucunda artmış olan proinflatuvar sitokin üretimi nöronal ve sinaptik hasara neden olmaktadır. Diğer taraftan ise A β uyarısı ile aktive olan mikroglialar A β fagositozuna katılmaktadır. Böylece A β birikimini ve amiloid plak oluşumunu önlemektedir (44).

2.9. Alzheimer Hastalığında Oksidatif Hasar

Serbest radikaller, besinlerin oksijenle yakılarak enerjiye çevrilmeleri sırasında oluşan reaktif moleküllerdir. Oksijen molekülleri yaşam için önemli bir molekül olmakla birlikte, metabolizma sırasında serbest radikal kaynağı olarak bilinmektedir ve son derece reaktif olan ara ürünler oluşmasına neden olabilmektedir. Reaktif oksijen türleri olarak bilinen bu moleküllerin zararlı etkilerine engel olmak üzere antioksidan savunma mekanizmaları gelişmiştir. Fakat bazı durumlarda mevcut antioksidan savunma sistemi serbest radikallerin etkisini tamamen önleyemez ve oksidatif stres meydana gelir. Oksidatif stres, vücudun antioksidan savunması ile hücrelerin yağ tabakasının peroksidasyonuna sebebiyet veren serbest radikallerin üretimi arasındaki dengesizlik olarak ifade edilir (Şekil 4).

Serbest radikaller dış yörüngelerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron bulundurlar ve organik ve anorganik moleküller olarak yer alabilirler. Oksidasyon sistemi, oksijen veya azot bazlı moleküllerin eşleşmeyen elektronlarla oluşturduğu ROS ve RNS'den oluşur. Eşleşmeyen elektronlardan dolayı, serbest radikaller kararsız davranırlar ve diğer moleküllerin elektronlarını elektronlarıyla eşleştirebilmek için fazla reaktif özellikleriyle alabilirler. Eşleşen elektronları kaybederek serbest radikal haline gelirler (45).



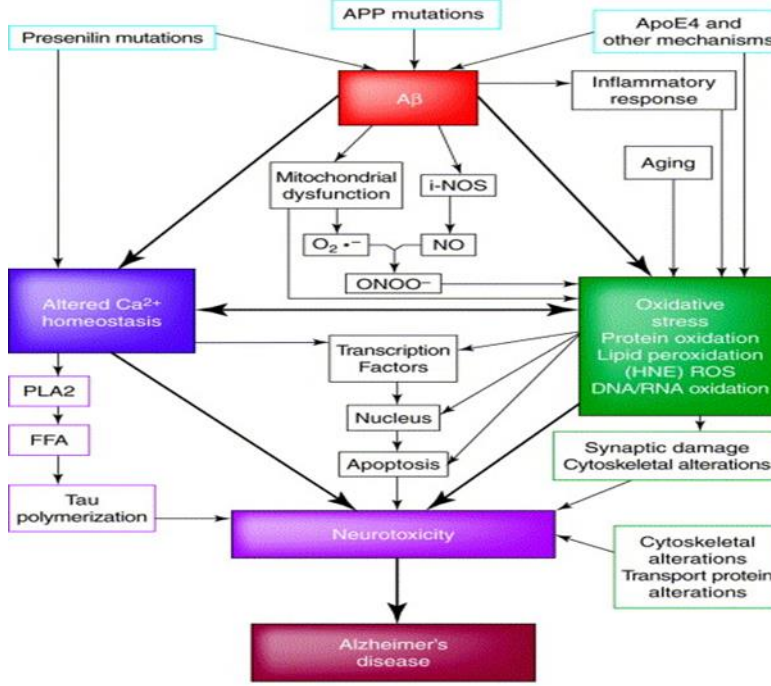
Şekil 4. AH'de oksidatif stresin mekanizması (46).

Oksidatif stresle birlikte bulunan bu reaktif oksijen türleri, çoğunlukla proteinlere ve DNA'ya hasar vermektedir ve ateroskleroz, kalp rahatsızlıkları, kanser, nörodejeneratif hastalıklar, şeker hastalığı, akut böbrek yetmezliği, akciğer hastalıkları, bronşit ve alkole bağlı karaciğer hastalıkları gibi yaşlanma ile ilişkili patolojik durumlar ortaya çıkmasına sebep olur (27).

Serbest radikallerin doğrudan ölçme metodlarının zor oluşundan dolayı, serbest radikale bağlı doku hasarlarının tesbiti amacıyla oksidatif hasar sonucu oluşan ürünlerin ölçülmesi yoluna gidilmektedir (47).

ROS tarafından yapılan harap edici etki AH'da çok belirgin olmaktadır. Oksidatif hasara maruz kalan nöronlarda lipid peroksidasyonu, nitrasyon, reaktif karbonillerin oluşumu ve nükleik asit oksidasyonu artmaktadır. Oksidatif hasara bağlı bulgular, AH'na bağlı diğer bulgu ve semptomlar ortaya çıkmadan önce saptanmaya başlanır. Yani oksidatif stres, AH karakteristik bulgularının oluşmasına öncülük etmektedir. Oksidatif stres belirteçleri, A β birikimi başlamadan önce AH'da saptanmaktadır (29). Birçok araştırmada, AH'nin serbest radikal oluşumuna sebep olduğu öne sürülmektedir. AH'da beyinde demir, alüminyum ve civa yoğunluklarının artması artmış lipid peroksidasyonu, artmış protein ve DNA oksidasyonu, beyinde bozulmuş enerji metabolizması, nörofibriler yumakta saptanan glikolizasyon son ürünleri, MDA, peroksinitrit, karbonil, artmış nitrik oksit ve süperoksit radikalinin etkileşimi ile oluşan

nöron dejenerasyonu oksidatif stresi destekleyen kanıtlar olduğu belirtilmiştir (7). AH'de A β toksisitesi şekil 5'de verilmiştir.

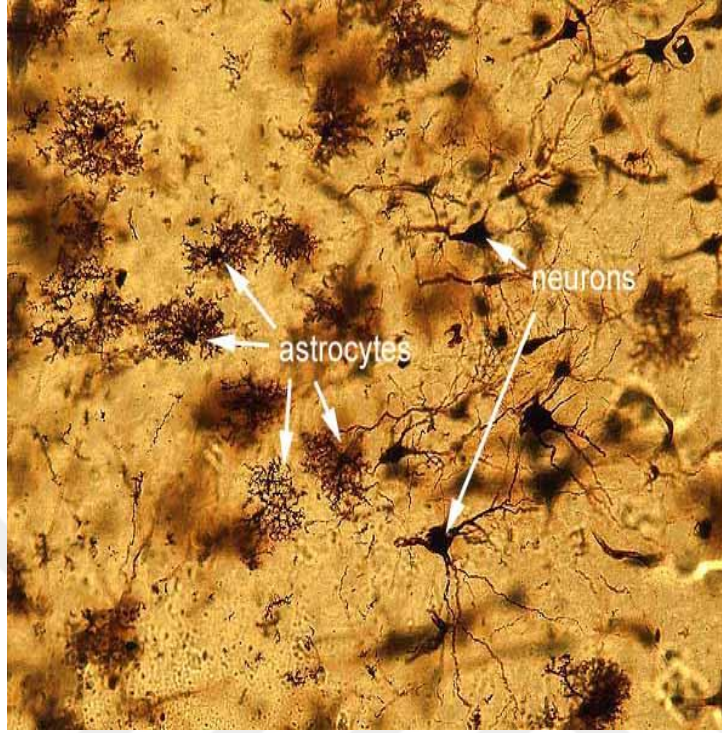


Şekil 5. AH'de A β toksisitesi (48)

2.10. Astrositler

Glia hücreleri arasında astrositler sayı olarak en fazla bulunandır. Astrositler yapısal destek sağlamakta, onarımlar sırasında ve metabolik faaliyetler sırasında görev almaktadırlar. Ayrıca kan beyin bariyeri elamanıdır. Astrositler bulundukları bölgeye göre ikiye ayırabiliriz. Gri madde içinde bulunan protoplazmik astrositler ve beyaz madde içinde yer alan fibriler astrositlerdir. Aralarındaki fark yapıları ve yerleşim yerleridir. Protoplazmik astrositler ince dallanmalar ve küresel dağılıma sahiptirler, fibriler astrositler ise uzun ve lif şeklinde dağılım gösterirler. Astrositler yıldız şeklinde olup, küçük hücrelerdir (Şekil 6). Çekirdekleri geniş, küresel veya eliptik şeklindedir. Sitoplazmasında hücre uzantılarına doğru glial fibriler asidik protein (GFAP) içeren glial iplikler bulunur. Beyin parankimal hasar olgularında, astrositer hücreler; yoğun hücresel çıkıntılar şeklinde ağ meydana gelir. Astrositler hücreler kollajen yapamazlar. Sitoplazmik hasara yanıtı hücrenin iskelet proteini olan GFAP sentezinin artmasıyla şişebilirler. Bu tür hücrelerin sitoplazması, çekirdeğin etrafındaki bölümlerde kolaylıkla

gözlemlenebilen eozinofilik boyama ile karakterize edilir ve gemistositik astrosit hücreler olarak isim verilmektedir. (49, 50).



Şekil 6. Astrosit hücreler

2.10.1 Astrosit Hücrelerin Fonksiyonları

Astrositler beyinde nörotrasmitlerin hemostazisinde ve oksidatif strese karşı oluşacak nöronal hasarı önlemede önemli görev alırlar (51, 52).

Astrositler ROS'lara karşı savunma mekanizması olarak nöronlardan daha güçlüdür. Astrositlerin oksidatif strese karşı daha güçlü olması antioksidatif etkilerinin sebebi olarak GSH, Askorbat, Vitamin E ve antioksidanlarla CAT ve ROS detoksifikasyon enzimlerinden kaynaklandığı belirtilmiştir. GSH beyinde bulunan önemli bir antioksidandır ve glutamat, sistein ve glisin amino asitlerinden meydana gelen bir tripeptittir. Nöronlar ve astrositler kendi GSH'larını sentezleyebilirler ama nöronlar sistein ihtiyacını karşılayabilmek için astrositlere bağımlı durumdadırlar.

Asrositler tarafından sentezlenen ve salınımı sağlanan antioksidan ise hidrojen sülfürdür (H_2S). H_2S vücudun bazı bölgelerinde üretilen özellikle sinir sistemi gibi bazı sistemlerde önemli görevleri bulunmaktadır. H_2S nöronları oksidatif strese karşı korumaktadır. H_2S astrositleri hidrojen peroksit (H_2O_2)'in neden olduğu nöronal hasara karşı korumaktadır (53). Astrositler tarafından salınan diğer bir molekülde aktive nöron

koruyucu protein (ADNP)'dir. ADNP beyin gelişiminde önemli rol oynar ve sinir sistemini güçlendirdiği belirtilmiştir (54-56).

Astrositlerdeki diğer bir molekülde beyinde ana inhibitör ve nörotransmitter olan GABA'dır. GABA'nın sentezi sadece nöronlarda değil astrositlerde de GABA'nın salınımı belirtilmiştir (57-58).

Astrositler kan damarlarının etrafını çevreleyerek metabolik olarak destek sağlarlar nöronlar için önem taşıyan enerji kaynağı olan laktat molekülünün temin edilmesinde görev alırlar. Nöronlar hücre dışından glukozu direk alabilirler ama nöronal aktivitenin artmasıyla daha fazla enerjiye ihtiyaç duyarlar ve bu ihtiyacı karşılamada astrositlerden yardım alırlar (59-62).

Astrositler diğer bir özelliği glukozu glikojen şeklinde depolama özellikleridir ve Santral Sinir Sistemi (SSS) gerekli glikojenin tamamını astrosit hücrelerinin depoladığı belirtilmiştir (59, 62).

Nöronlarda glikojen sentezi için ihtiyacı olan enzimler bulunmasına rağmen bu enzimler baskılandığı için enzimleri kullanamamakta ve nöronlarda bu enzimler Ubikülin-Proteozom sistemi (UPS) enzimleri tarafından yıkılıp parçalanmaktadır. Bu enzimlerin baskılanması sebebiyle glukoz glikojen şeklinde depo edilmemekte ve okside olmaktadır. Nöronlarda oksidatif strese karşı molekül sentezi başlamaktadır. Hücre içinde glikojenin artmasıyla nöronal toksite artmakta ve nöronal apoptoz meydana gelmektedir (59, 63-64).

Astrositlerde enerji şeklinde depo edilen glikojen nöronal enerji ihtiyacını karşılamaya çalıştığı belirtilmiştir (59,64).

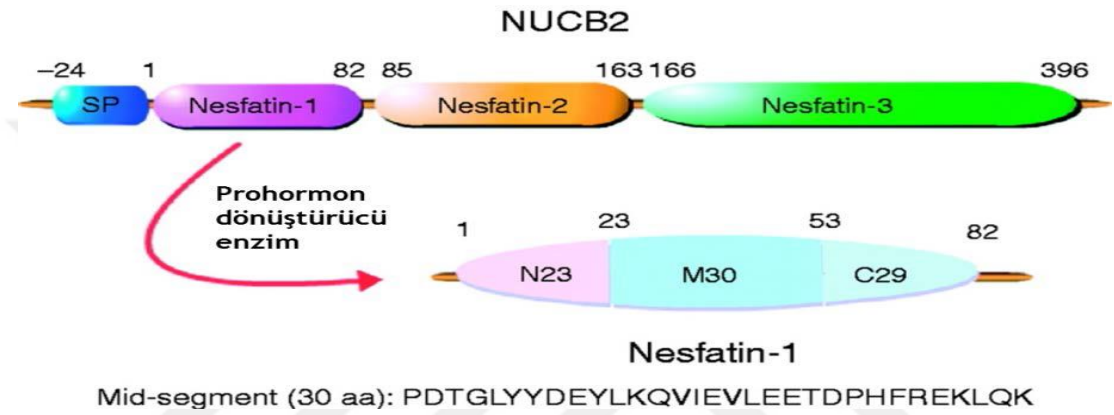
2.11. Nesfatin-1

Nesfatin-1, 2006 yılında ilk olarak Oh ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Nesfatin-1, 82 amino asitten oluşmaktadır. Moleküler ağırlığı 9,7 kDa'dır ve hipotalamusta yer alan tokluk molekülü olduğu belirtilmiştir (65).

Oh ve ark. tarafından, Nesfatin-1'in, NEFA / nükleobindin2 (NUCB2)'den türeyen bir amino-terminal fragmenti olduğunu bildirilmiştir. NUCB2, toplam 396 amino asitten oluşan bir protein olup, 24 amino asitlik kısmı bir sinyal peptidini oluşturmakta ve iştahın kontrolünde görev almaktadır (65, 66).

NUCB2 molekülünün C-terminal fragmenti besin düzenlenmesinde görev almaktadır. N terminali ise besin alınımında önemli görev almaktadır ve nesfatin-1'de NUCB2'nin N terminal bölgesinden kaynaklanan bir fragmenttir (66).

Şekil 7'de verildiği üzere, NUCB2'nin 396 amino asidinden ilk 1 ile 82 aminoasit kısmı nesfatin-1'i, 85 ile 163 aminoasit kısmı nesfatin-2'yi, 166 ile 396 aminoasit kısmı ise nesfatin-3'ü oluşturmaktadır (67). Nesfatin-1'in; N23 (1 ile 23), M30 (24 ile 53), C29 (54 ile 82) olmak üzere 3 alt kısmı bulunmaktadır. Bu 3 alt kısımdan M30; nesfatin-1'in besin alınımında etki gösteren kısmıdır.



Şekil 7. Nesfatin-1 alt segmentleri (65).

NUCB2 prohormon konvertaz tarafından bazı proteolitik işlemlerden geçirilmektedir. Sonuçta nesfatin-1 (1 ile 82 amino-asit rezidüsü), nesfatin-2 (85 ile 163 amino-asit rezidüsü) ve nesfatin 3 (166 ile 396 amino-asit rezidüsü) meydana gelmektedir. Nesfatin-1, karanlık fazda yeme isteğinin azalması, kilo alımı ve yağlanma üzerine santral etkiler göstermektedir (68).

Beyinin birçok bölgesinden sentez edildiği gösterilen nesfatin-1'in yapılan çalışmalarda sadece beyinde değil, yağ doku, mide, pankreas, kolon, karaciğer, testis gibi periferik dokularda da bulunduğu gösterilmiştir. Nesfatin-1 kan beyin bariyerini iki yönlü olarak ve sature olmayan mekanizmalarla geçmektedir. Yarı ömrü yaklaşık 9-10 dakikadır (69,70).

Rat ve farelerde yapılan çalışmalarda hipotalamusta paraventricüler nükleusta, supraoptik nükleusta, lateral hipotalamik alanlarda, arkuat nükleusta nesfatin sentezlendiği gösterilmiştir (65).

Ayrıca strese yanıtta rol alan limbik, pontin ve kortikal nukleuslarda ve vagus sinirinin dorsal motor nukleusunda ve spinal kordun pregangliyonik sempatik ve parasempatik nöronlarında da sentezlenmektedir (71-73).

Santral sinir sistemindeki bu yaygın dağılımının yanında periferde hipofizde, midede, pankreasta, testiste ve yağ dokusunda sentezlendiği kemirgenlerde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (74, 75).

İmmüno boyama araştırmalarında; sıçanların NUCB2/nesfatin-1 içeren proteinleri iştah ve metabolizmanın düzenlenmesinde önemli rol oynayan hipotalamusun paraventriküler, arkuat, supraoptik ve traktus solitarius çekirdeklerinde, lateral hipotalamik alan, dorsomedial hipotalamik çekirdek, zona inserta, spinal kordun hücre gövdeleri (akson terminalinde bulunmamaktadır), vagusun dorsal çekirdeği ve hipofiz bezinde bulunduğu gösterilmiştir (65, 68, 71-73, 76-78).

Santral salınımı indüklenen nesfatin-1 korku ve anksiyete davranışlarına, hipertansiyona, sempatik aktivasyona ve gastrik boşalmanın gecikmesine neden olmaktadır (79-82). Bu bulguları destekleyen başka çalışmalar da vardır. Abdominal cerrahi, lipopolisakkarit enjeksiyonu ve diğer baskılayıcı stres etkilerine maruz kalma durumunda santral nesfatin-1 immunoreaktif nöronların aktive olduğu saptanmıştır. (68, 80, 83-84).

Üretan-anestezi uygulanmış sıçanlarda, nesfatin-1'in intraserebroventriküler enjeksiyonunun, böbrek üzerindeki sempatik sinir çıkışına etkisini incelemiştir. Nesfatin-1'in intraserebroventriküler enjeksiyonu renal sempatik sinir aktivitesini ve kan basıncını doza bağımlı bir şekilde uyardığı görülmüş ve melanokortin sisteminin nesfatin-1 enjeksiyonunun neden olduğu sempatik eksitasyon üzerindeki rolünü araştırılmıştır. Melanokortin-3/4 reseptör antagonisti SHU9119 ile ön işlem, nesfatin-1'in neden olduğu sinir aktivitesi ve kan basıncındaki artışı ortadan kaldırdığı görülmüştür. Sonuç olarak, nesfatin-1 uygulamasının böbreğin sempatik sinir aktivitesi üzerindeki uyarıcı etkileri merkezi melanokortin sistemine bağlı olabileceği düşünülmektedir (80).

Obsesif bozukluk tanısı olan hastalarda ve hasta olmayan bireylerde plazma nesfatin-1 düzeyleri ölçülmüştür. Obsesif bozukluk tanısı konulan hastalarda plazma nesfatin-1 düzeyinin yüksek olduğu ve bu peptidin önceden bilinen anoreksijenik etkilerinin dışında anksiyete durumlarında potansiyel rolünün olabileceği de düşünülmektedir (85).

Adriamisin uygulamasının rat kalp dokusunda Nesfatin-1 immün reaktivitesi etkilerini araştırılmış ve bu çalışmada, Wistar albino erkek sıçanlara geniş spektrumlu bir kanser ilacı olan ve istenmeyen etkilerinde kalp yetmezliği ve kardiyomyopati olan adriamisin uygulanmıştır. Bu çalışma, oksidatif stresin adriamisin kardiyotoksitesini patogenezi için gerekli olduğunu ortaya koymaktadır. Rat kalp dokusuna nesfatin-1 salınımının olduğu deneysel adriamisin uygulamasının nesfatin-1 immün-reaktivitesini azalttığı, bunda adriamisinden kaynaklı miyosit hasarından dolayı oluşabileceği düşünülmektedir (86).

Oksidatif hasara bağlı hücrede mitokondriyal sızıntı sonucu proapoptotik protein olan sitokrom C düzeyi artmakta. Ayrıca sızan sitokrom C kaspaz3, aracılı apoptoza da neden olmaktadır. Yapılan diğer bir çalışmada, nesfatin-1'in rotenon uygulanmış MES23.5 dopaminerjik hücreler ve altındaki mekanizmalar üzerindeki nöroprotektif etkileri araştırılmıştır. Yapılan çalışmanın sonucunda, nesfatin-1 eklenmesiyle rotenon kaynaklı hücre kaybının önemli derecede azaltığı belirtilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmada, nesfatin -1'in mitokondriyal disfonksiyonu ve anti-apoptik özelliklerini iyileştirerek nöroprotektif etkisini rotenon'a karşı dopaminerjik hücreler üzerine uyguladığı gösterilmiştir. Ayrıca, nesfatin-1 tedavisi ile mitokondrinin korunduğu ve sitokrom C sızıntısının bloke edildiği gösterilmiştir (87).

Leptin gen bozukluğu olan Zucker sıçanlarına intra-serebroventriküler yoldan nesfatin-1 uygulanması gerekli olan besin alımında önemli derecede azalışa sebep olmuş ve sıçanlara nesfatin-1 antikorunun uygulanması ve leptin enjekte edilmesi sonucu azalışı düşünülen besin alım oranında değişiklik meydana gelmemiştir. Ancak, melanokortin peptidinin enjekte edilmesi ise hipotalamusta paravizüel paraventriküler çekirdeği nöronlarındaki NUCB2'yi kodlayan genin miktarını önemli bir oranda yükseltmiştir. Bu sonuçlar, nesfatin-1'in anoreksijenik faktör olduğunu belirtmektedir (65, 66, 82).

Panik bozukluk tanısı olan hasta grubu ile sağlıklı grup arasında nesfatin -1 plazma düzeyleri karşılaştırılmış, panik bozukluk olan hastalarda plazma nesfatin-1 düzeyi kontrol grubundan daha yüksek bulunmuştur. Panik bozukluk olan hastalarda, anksiyetenin plazma nesfatin-1 düzeyi üzerinde etkili olabileceği düşünülmüştür (88). İnsan ve sıçan yağ dokusu depolarında NUCB2 / nesfatin-1 geni ve protein ekspresyonunu araştırılmıştır. Ayrıca, insülin, deksametazon ve enflamatuvar sitokinlerin etkileri ve gıda yoksunluğu ve obezitenin nesfatin-1 ekspresyonu üzerine

etkisi niceliksel RT-PCR ve Western blotlama ile incelenmiştir. Yağ dokusu NUCB2 / nesfatin-1 ekspresyonu obezite ile birlikte artışı ve beslenme ve açlık durumlarında değişime uğradığı görülmüştür (89).

Nesfatin 1'in glukoz-insulin düzenlenmesinde de rolü olduğu saptanmıştır. Yapılan hücre kültürü çalışmalarında izole fare pankreas adacık hücrelerinde, nesfatin 1'in glukoz bağımlı insulin salınımını ve preproinsulin mRNA ekspresyonunu artırdığı saptanmıştır (90). Ayrıca in vivo olarak aynı bulgular saptanmıştır. Hiperglisemik farelere intra venöz olarak nesfatin-1 enjeksiyonu yapılmış ve kan glukoz düzeyinin düştüğü saptanmıştır (91). Nesfatin-1 antihiperglisemik etkisinin zamana, doza, insüline bağlı olduğu yapılan bu çalışmada gösterilmiştir.

Tarafından yapılan çalışmada, travmatik beyin hasarı sonrası, nesfatin-1'in iltihaplanma yanıtları ve nöronal hücre apoptozisi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Wistar sıçanlara, kafa travmasından 0.5, 2, 4 veya 8 saat sonra intraperitoneal olarak 5, 10 veya 20 g / kg nesfatin-1 uygulanmıştır. Çalışma sonucunda, Nesfatin-1'in, bu sıçanlarda travmatik beyin hasarından sonra nükleer faktör kappa-B'ye bağlı inflamatuvar cevapları inhibe edebildiği ve kaspaz-3 aracılı nöronal hücre apoptozunu azalttığı görülmüştür. (92)

Dopaminerjik nöronların alışılmadık elektrofizyolojik özelliklerinin Parkinson hastalığının savunmasızlığından sorumlu olduğu belirtilmiştir. Yapılan bir diğer çalışmada, Nesfatin-1'in sıçan nigral dopaminerjik nöronlarının elektriksel aktivitesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Sonuç olarak, nesfatin-1'in nigral dopaminerjik nöronların elektriksel aktivitesini postsinaptik olarak inhibe ettiği görülmüştür (94).

Nesfatin-1'in uyku düzenlenmesi üzerine etkisini araştırmışlardır. Melanin konsantrasyon hormonu ve nesfatin-1 / NUCB2 (nesfatin) hem gıda alım regülasyonunda hem de depresyonda rol oynamaktadır. Yapılan bu çalışmada, MCH, daha önce hipnojenik bir faktör olarak kabul edildiğinden, nesfatinin uyanıklık üzerindeki potansiyel rolü analiz edilmiştir. Hızlı göz hareketi uykusu mimarisi ile dorsolateral hipotalamusta ve zona incertada nesfatin ekspresyonu arasında yakın bir ilişki olduğunu ortaya konulmuştur (95).

Nesfatin-1 mRNA, hipotalamusun paraventriküler çekirdeğinde tespit edildiğinden ve gıda alımını değiştiren birçok peptidin de kardiyovasküler fonksiyonu etkilediğinden, merkezi olarak verilen nesfatin-1'in serbest hareket eden sıçanlarda ortalama arter basıncını etkileme yeteneğini test etmişlerdir. Bu çalışmada, Nesfatin-1'in

intraserebroventriküler uygulanmasından sonra ortalama arter basıncında belirgin artışlar gözlenmiştir. Çalışmada, melanokortin-3/4 reseptör antagonisti olan SHU9119 veya alfa-adrenerjik antagonist olan fentolamin ile ön-muamelenin, nesfatin-1 tarafından uyarılan ortalama arter basıncının artışını ortadan kaldırdığı görülmüştür. Böylece, anoreksijenik etkilere ek olarak, otonom sinir sistemi aktivitesini uyarmak için nesfatin-1'in yeni bir fonksiyonu tespit edilmiştir (96).

Epilepsi hastalarında yapılan çalışmada bu hastalardan alınan serum ve tükürük numunelerinde, Enzim Bağlı İmmüno - Sorbent Testi (ELISA) ile nesfatin-1 düzeyleri ölçülmüştür. Bu çalışmanın amacı, tükürük ve serum örneklerinde, epilepsi hastaları ile normal kontroller arasındaki nesfatin-1 ve ghrelin konsantrasyonlarında farklılıklar olup olmadığı ölçülmek ve nesfatin-1'in tükürük bezleri tarafından yerel olarak üretilip üretilmediğini belirlemektir. Çalışma sonucu, nesfatin-1 seviyesinin antiepileptik tedavi ile azaldığı görüldüğünden, artmış nesfatin-1 konsantrasyonunun epilepsi ile ilişkili olabileceği ve tükürük ve serum nesfatin-1 konsantrasyonlarının epilepsi hastalarında, antiepileptik tedavilerin etkilerini izlemek için biyolojik belirteç olabileceği belirtilmiştir. Ayrıca nesfatin-1'in tükürük bezi tarafından üretildiği fakat üretilen miktarın beyin dokularından üretilenden 12 kat az olduğu belirlenmiştir (97).

Intraperitoneal nesfatin-1'in subaraknoid kanama ile indüklenen oksidatif beyin hasarı ve buna bağlı nörolojik semptomlar üzerine olası koruyucu etkilerini biyokimyasal, nörolojik ve histopatolojik yaklaşımları kullanarak araştırmışlardır. Bu çalışmanın sonuçları, subaraknoid kanamanın nörolojik bozulma ve oksidatif beyin hasarının nesfatin tedavisi ile iyileştiğini ortaya koymaktadır (98).

Nesfatin-1'in serbest asit kullanımı uyararak tip 2 diabetes mellitus (T2DM) üzerinde rol oynadığı ve çalışmada, diyabet farelerinde, nesfatin-1 (hem 1 mg / kg hem de 10 mg / kg dozlarında) tedavisi ile kan glikozu ve insülin direnci katsayısının düştüğü bulunmuştur (99).

Nesfatin-1, beta hücrelerinde glukagon salgılanması için yeni uyarıcı bir madde olarak tanımlanmış ve Tip 2 diyabet adacıklarında nesfatin-1'in azalmış ekspresyon seviyesinin, hiperglisemiye aşmak için telafi edici bir mekanizma sağlayabileceğini göstermişlerdir (100).

Nesfatin-1'in azalmış serum seviyesinin, anti-inflamatuar etki ile sonuçlanan obstrüktif uyku apne sendromu (OSAS) ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmaya OSAS'lı

toplam 196 hasta ve 104 sağlıklı birey alınmış ve Nesfatin-1 serum seviyeleri enzim bağlantılı immünosorbent assay ile ölçölmüşür. OSAS hastalarında serum nesfatin-1 düzeylerinin sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir (101).

Kronik obströktif akciğer hastalığı (KOAİ) hastalarını inceleyen çalışmada, NUCB2/nesfatin-1'in KOAİ'ta sistemik inflamasyon ile ilişkili yeni bir faktör olabileceğini ve stabil amfizem tipi KOAİ'ta yeni bir enflamasyon faktörü olarak kullanılabileceğı önerilmektedir. Çalışmada, KOAİ'lı 43 erkek hastada plazma NUCB2 / nesfatin-1 ve visfatin düzeyleri birlikte ölçölmüşür (102).

Yapılan diğer bir çalışmada, Nesfatin-1'in dolaşımdaki seviyeleri ile supraventriküler taşikardi arasındaki ilişki araştırılmışır. Çalışmada 80 hasta ve 40 kontrol grubu olmak üzere 120 hasta kullanılmışır. Cinsiyet ayrımı yapılmaksızın paroksizmal supraventriküler taşikardi olan hastalar, nesfatin-1 düzeyi, komorbid hastalıklar, serum böbrek fonksiyonu değerleri ve hastaların hayati bulguları açısından kontrol grubu ile karşılaştırılmışır. Çalışma sonucunda, Serum nesfatin-1 düzeyi ile supraventriküler taşikardi arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunmuştur (103).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 Çalışmada Kullanılan Araç Gereç ve Saf Malzemeler

Bu çalışmada, bir glia hücresi olan astrositlerde A β ile oluşturulan AH modelinde yeni tanımlanan bir hormon olan nesfatin-1 antioksidan etkilerini saptamak için hücrelere uygulanmıştır ve hücre canlılığı ile antioksidan parametrelerin düzeylerine bakılmıştır. Çalışmada kullanılan gereçler Tablo 1’de ve kimyasallar Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 1. Çalışma araç ve gereçleri

Cihaz adı
Laminer air flow
CO ₂ inkübatörü
Tersfaz ışık mikroskop
Santrifüj
Elisa okuyucu
Buz üretici
Otoklav
Derin dondurucu (-20, -80 ve -152°C)
Etüv
Hassas teraziler
Saf su cihazı
Su banyosu
Ph metre

Tablo 2. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve kitler

Kimyasal maddeler
RPMI-1640 Medium
At serumu
Fetal sığır serumu (FBS)
PBS (phosphate buffered saline)
MTT
Trypsin-EDTA
Penisilin/Streptomisin
DMSO (Dimetil sülfoksit)
Tripan Blue
Etanol
GSX-Px kit
MDA kit
CAD kit
SOD kit

3.2 Çalışmada Kullanılan Yöntemler

Çalışmada aşağıda sıralanan yöntemler kullanılmıştır.

Astrosit Hücrelerinin in Vitro Koşullarda Kültürü

- Astrosit hücrelerde hücre kültürü
- Donmuş hücre çözündürülmesi
- Hücrel pasajlama ve hücre dondurulması

Hücre Canlılık Testi (MTT)

- A β Toksisitesi ile In vitro Alzheimer Modelinin Oluşturulması
- Nesfatin molekülünün Doz Aralığının Belirlenmesi

Oksidatif hasar testleri

- Katalaz,
- Glutasyon peroksidaz,
- Süperoksit dismutaz,
- Malondialdehit kullanılmıştır.

3.2.1 Astrosit Hücrenin in Vitro Koşullarında Kültüre edilmesi

3.2.1.1 Astrosit Hücreleri

Primer hücre kültüründe 2-3 günlük yeni doğmuş sıçan beynin mekanik ve enzimatik yöntemler kullanılarak modifiye edilmesiyle astrosit hücreler elde edilir ve astrositler yapısal olarak belirli antioksidanları yüksek konsantrasyonlarda bulundurmaktadır. Ayrıca nöronlardan daha dirençli oldukları da belirtilmiştir. Astrosit hücre kültüründe sıçan yavrularına Mc Carthy ve Vellis yöntemi kullanılarak anestezi madde verilmeden steril ortamda servikal dislokasyon ve dekapitasyon işlemi uygulanmaktadır. Bu yöntemle beyin dokusu çıkarılarak hanks dengeli tuz çözeltisi (HBSS) ve antibiyotik içeren kültür kabına alınır ve doku jöle kıvamına gelene kadar mekanik olarak parçalanıp HBSS ile yıkanır ve Tripsin-DNAligaz eklenir. 37°C’de % 5 CO₂ basınçta ve % 95 nem içeren ortamda inkübe edilmektedir. Astrositler tek tabakalı ve yüzeye yapışarak çoğalırlar. Büyüme ortamı için,

% 10 at serumu

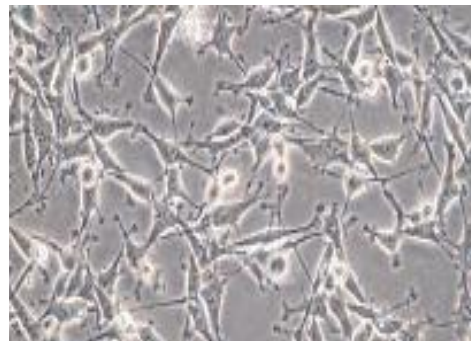
% 5 sığır serumu

% 1 penisilin/streptomisin kullanılmaktadır.

Besi yeri 2-3 gün aralıklarla değiştirilmelidir ve astrosit hücreler yüzeye yapışır ve bitişik duruma gelip çoğaldıktan sonra 1/3 oranında pasajlanarak hücre kültürünün devamı sağlanabilmektedir.



A: x40



B: x100

Şekil 8. Faz kontrast mikroskobu ile örnek primer astrosit hücre kültürü

3.2.1.2. Donmuş Hücrelerin Çözdürülmesi

İşlem basamakları

1. Daha önce hazırlanmış olan +4°C’de saklanan medium 37 °C ‘de ısıtıldı.
2. Dondurma tüpleri -152°C ‘den çıkarılarak yaklaşık 2 dakika su banyosunda tutularak çözdürüldü.
3. Çözdürülmüş olan hücreler pipet yardımıyla süspanse edildi.15 ml tüplere aktararak üstüne 10 ml büyüme ortamı ilave edildi.
4. Tüpler 120 g’da beş dakika boyunca santrifüj edilerek işlem sonrası güvenlik kabinine alındı
5. Üst faz uzaklaştırıldı ve dipteki çökelti halindeki hücre kümesine 1 ml’lik büyüme ortamı ilave edilerek pipet yardımıyla çözdürülmeye çalışıldı. Sonraki aşama olarak, 2 ml’lik büyüme ortamı ilave edilerek hücreler süspanse yapıldı. Hücreler uygun hacme getirilerek, kültür kaplarına alındı.
6. Kültür kapları 37 °C sıcaklıkta bulunduran inkübatör içinde inkübe yapıldı.
7. 24-saat sonra ters fazlı mikroskopla hücrelerin yüzeye tutunmaları takip edildi.

3.2.1.3. Hücrenin Pasajlaması ve Dondurulma işlemi

İşlem basamakları

1. Hücrelere pasajlama işlemi yapılırken, kültür kaplarındaki ortam uzaklaştırıldı.
2. 25 cm²’lik kültür kaplarına 1,5 ml, 75 cm²’lik kültür kaplarına 3 ml 37°C sıcaklığa getirilen tripsin/EDTA eklenerek 2-3 dk 37°C’de inkübatörde bekleme işlemine tabi tutuldu.
3. Hücrelerin bulunduğu kültür kablari mikroskopla incelenip, hücrelerin yüzeyden ayrıldığı gözlemlendi. Bu gözlemden sonra tripsin/EDTA’nın hacim olarak 2 katı büyüme ortamı ilave edildi. Birkaç pipetleme işlemi sonrası, ayrılan hücreler 15 ml tüplere konuldu.
4. Tüpler 120 g’de 5 dk. boyunca Santrifüje tabi tutuldu.
5. Santrifüjden sonra üst kısım uzaklaştırıldı.
6. Altta kalan hücre pelleti 1-2 ml ısıtılan hücre ortamıyla süspanse yapıldı.
7. Hücre süspansiyonundaki hücre sayısı ‘hücrelerin sayım protokolü’ kullanılarak tespit edildi.

8. Analiz koşullarına uygun hücre sayılarını sağlayabilmek için hücre süspansiyonu belirli oranlarda seyreltildi ve tekrar çoğalabilmeleri için uygun hücre kültür kaplarına konuldu.

9. Daha sonra saklanması planlanan hücreler $1-2 \times 10^6$ hücre/ ml olacak şekilde yeni hazırlanan %10 DMSO içeren dondurma ortamına konuldu.

10. Dondurma tüpleri önce $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 2 saat bekletildikten sonra, uygun sıcaklığa kaldırıldı.

3.2.1.4. Hücrelerin Sayımı

Hücre sayımında amaç hücre canlılığının belirleme işlemidir ve işlemde tripan blue boyası kullanılmaktadır. Tripan blue negatif yüklü ve hücre membranı zarar görmemiş ve canlı ise boya hücre içine giremez. Canlı olmayan hücre ise boyayı emer ve mikroskopda mavi renk olarak görünür.

İşlem basamakları

1. Hücrelerin pasajlanması işlemindeki hücrelerin tripsinle kaldırılıp, santrifüjlenip, resüspanse edildikten sonra hücre süspansiyonundan 20 μ l alınıp bir ependorf tüpe konuldu ve hücre büyüme ortamı kullanılarak uygun seyreltmeleri (10-20 kat) yapıldı.
2. Uygun seyreltme yapıldıktan sonra ependorf tüpe hacimce 1:1 oranında tripan blue boyası ilave edildi.
3. Daha sonra boyalı hücre süspansiyonunun 10 μ l'lik kadarı alınarak, Neubauer lamıyla ters-fazlı ışık mikroskopuyla 20 x kadar büyütülerek hücre sayım işlemi gerçekleştirildi.

Canlı hücre oranının hesabında aşağıdaki denklem kullanılır.

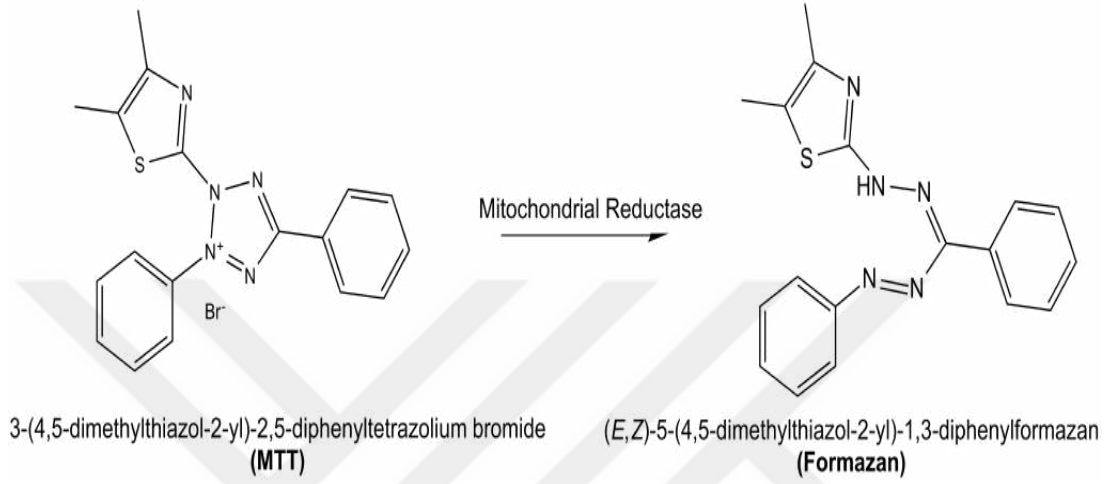
$$\text{Canlı hücre oranı (\%)} = \frac{\text{Boya almamış hücrelerin sayısı}}{\text{Toplam hücre sayısı}} \times 100$$

3.2.2. Hücre Canlılık Testi (MTT)

MTT testi [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] redüksiyonu olup, MTT testi hücre kültürü ortamında indirekt olarak hücrenin büyümesini, canlılığını veya ölümü değerlendirilen hücre kültürü ortamında yapılan ilaç duyarlılık testidir. Ayrıca mitokondriyal aktiviteleri ölçmektedir. Bu test sağlıklı

hücrelerin mitokondrial redüktaz tarafından MTT’de tetrazolium halkasını parçalamasına bağlıdır. Mitokondrial enzim olan süksinat dehidrogenaz sağlam hücrede tetrazolium halkasının parçalanmasıyla sarı soluk renkten koyu mor formazona dönüşmektedir.

MTT testinde canlı hücrelerin oranını spektrofotometrik yöntemle kantitatif olarak saptanabilmektedir.



Şekil. 9. MTT’nin süksinat dehidrogenaz aktivitesi ile formazan kristaline dönüşmesi

yöntem basamakları:

- 1.Hücre canlılığını değerlendirmek için hücrelerin inkübasyon sürelerinin ardından hücre kültür kabı 96 kuyucuklu plaklara 1mg/ml konsantrasyon olacak şekilde MTT çözeltisi ilave edildi.
- 2.Kültür kabı 37°C sıcaklıkta %5 karbondioksit ve %95 hava bulunduran inkübatör içerisinde yaklaşık 3 h kadar bekletildi.
- 3.Yaklaşık 3 saat sonra kuyucukların dibinde siyahlaşma gözlemlendi
4. Plaklar İnkübatörden çıkarıldı ve içindeki besi yeri atıldı.
- 5.MTT metabolizma ürünü olan formazan kristallerinin çözebilmesi için 200µl Dimetil Sülfoksit (DMSO) ilave edildi ve 37°C sıcaklıkta 30 dk bekletildi.
- 6 . Daha sonra hücrelerin koyu mor renge dönüştüğü gözlemlendi
7. 96 kuyucuklu plakların absorbans değerleri ELİSA cihazında 590nm dalga boyunda okutuldu.
- 8.Okunan absorbans değerleri %100 kabul edildi ve canlılık değeri hesaplandı.

Yüzde Canlılık = $(\text{Örnek Abs} - \Delta\text{Kontrol II Abs} / \Delta\text{Kontrol I Abs} - \Delta\text{Kontrol II Abs}) \times 100$

3.2.2.1. A β Toksisitesi ile In vitro Alzheimer Modelinin Oluşturulması

1mg A β peptidini steril, otoklavlama işlemi görmüş distile suyla çözündürülerek 1mM çözelti hazır hale getirildi. Deney öncesinde, %1,5 serum bulunduran ortam seyreltilerek hazırlandı. 96 kuyucuklu plakalara, her bir kuyucukta 2×10^4 astrosit hücresi bulunacak şekilde hücrelerin ekimleri yapıldı.

İlk 18-24 saat süresince hücrelerin plakalardaki kuyucuklara yapışabilmelerini sağlayabilmek için %15'lik serum bulunduran ortam, %5 karbondioksit basıncında 37°C sıcaklıkta inkübatörde inkübasyon gerçekleştirildi. AH modellemesi için hücrelere 24, 48 ve 72 saatlerde 0.5, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 ve 100 μmol A β dozları uygulandı. Hazırlanan kültür 24 saat boyunca %5 karbondioksit basıncında 37°C sıcaklıkta inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Bu işlemlerden sonra hücre canlılığı MTT testiyle spektrofotometrik olarak belirlendi. Analiz sonucunda A β için enuygun doz tespit edildi. Bütün çalışmalar 96 kuyucuğa sahip plaklarda ve 6'lı grup şeklinde çalışıldı.

3.2.2.2. Nesfatin Molekülünün Doz Aralığının Belirlenmesi

Nesfatinin hazır hale getirilmesi için öncelikle, nesfatin DMSO ile çözündürüldü ve 1mM solüsyon oluşturuldu. Her deney öncesinde %1,5 serumdan oluşan ortamla seyreltilen konsantrasyonlar yeniden hazırlandı. Amacımız Nesfatinin A β toksisitesine etkilerini değerlendirmek ve bu amaç için en uygun dozun tespit edilmesidir. Uygun dozun tesbitini sağlamak için 1 ile 100 μmol arasındaki değerlerde nesfatin molekülü hücrelere eklendi. İşlem sonrasında nesfatin eklenen hücreler kültür kapları içerisinde 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saatlik zaman sonunda MTT testiyle hücre canlılığı değerlendirildi.

Nesfatin molekülünün A β toksisitesine karşı uygun doz belirlemek için kontrol, A β uygulanan, nesfatin uygulanan ve A β + nesfatin uygulanan olmak üzere dört farklı örnek grubu oluşturuldu ve MTT analizi yapıldı.

3.2.3. Oksidatif Hasar Testleri ve Antioksidan Parametreler

Bu çalışmada oluşan oksidatif hasarın belirlenmesi amacıyla antioksidan parametreler olarak CAT, GSX-Px, SOD, MDA kullanıldı ve ELISA yöntemi kullanılarak ölçüm yapıldı. Bu testin temel prensibi antijen ve antikor arasındaki ilişkiye dayalıdır. Test sırasında antijene uygun antikorla kaplanan kuyucuklara yeterli oranda örnek eklenerek inkübasyondan sonra yıkama işlemleri yapılır ve enzimle işaretlenmiş antikorlar ortama verilir. Daha sonra enzimle bağlanmış substrat tepkimeye girer ve ortamda renk değişikliği meydana gelir. Tepkime sonrası oluşan renk değişikliği spektrofotometre ile uygun dalga boyunda okutulur ve absorbans değerinin ölçümü yapılır. Tepkime sonucunda meydana gelen renk değişikliği antijenin tespit edilebilme imkanı sağlamaktadır.

3.2.3.1. TBARS Testi

Lipitler, hücrelerin reaktif oksijen ürünlerine karşı duyarlı olan bileşenleridir. Membran lipitlerindeki doymamış yağ asitlerinin reaktif oksijen ürünleri tarafından oksidasyonuna, lipit-peroksidasyonu denmektedir. MDA lipit per-oksidasyonunun en önemli ürünüdür. MDA oranı tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS) testi ile belirlenmektedir. Oksidatif hasar testleri arasında lipit peroksidasyonunun belirlenmesinde sıklıkla kullanılan testlerden biri TBARS testidir.

Tbars testi (katalog no cayman kit: 10009055) kitte belirtilen protokole uyularak yapıldı.

Testin prensibi: Lipit peroksidasyonundan sonra ve malondialdehitin, asidik ortamda tiyobarbitürik asitle tepkimeye girmesiyle oluşan renk değişikliği kolorimetrik ve florometrik şekilde ölçülmektedir. TBARS düzeyleri, standart eğriden alınan MDA denkleminde hesaplanmaktadır.

İşlem Basamakları:

1. Çalışmada kontrol, A β , nesfatin ve A β +nesfatin olmak üzere 4 farklı deney grubu kullanıldı.
2. 6 kuyucuklu kültür plakları 1x10⁶ hücre/2 ml olarak ekim yapıldı ve kullanılan hücrelerin yüzeye yapışabilmesi için bir gün süreyle inkübe edildi.

3. İnkübasyon işleminden sonra hücrenin üst faz kısmı ortamdan uzaklaştırıldı ve %1,5 serum ortamı ilave edildi.
Nesfatin (10Um) ve Aβ (5Um) için hazır çözelti içerisinde %1,5 serum ortamı konsantrasyon hazırlanarak hücrelere eklendi.
4. Bir günlük inkübasyondan sonra hazırlanan lizis tampon çözeltisiyle hücreler buz üstünde lizis işlemi yapıldı.
5. Lizis işlemi gören hücreler 1,5 ml olan ependorf tüpleri içerisine konuldu ve 15 dk. Boyunca 15000 rpm hızda ve 4°C sıcaklıkta santrifüjleme işlemine tabi tutuldu.
6. Santrifüjleme işlemi sonrası hücre artıkları dibte birikti ve hücre üst kısmı ise fark ependorf tüplerine konuldu.
7. Homojenatların 1,5 ml'si çalışmada kullanılmak üzere alındı, diğer kısım -80°C sıcaklıkta saklandı.

TBARS kit çalışmasında homojenatlar kullanılarak kitte verilen protokollere uygun şekilde deneyler gerçekleştirildi.

Lizis Tamponunun Hazırlanma prosedürü:

90 ml distile su içine Tris-HCl ilave edilerek pH'nın 7,2 olması sağlandı. Bu işlem sonrasında bu karışıma aşağıda verilen kimyasal maddeler ilave edildi. Toplam hacmin 100 ml olması için bu karışıma yeniden distile su ilave edildi. Elde edilen Lizis tampon çözeltisiyle hücrelerin homojenatı hazırlanarak TBARS, katalaz, glutatyon peroksidaz testleri çalışıldı.

- 10mM Tris-HCl
- 25mM EDTA
- %0,1 Triton X-100
- 1mM DTT

3.2.3.2. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) Testi

Glutatyon peroksidaz hidroperositleri etkisizleştirmede görev alan bir tetramerik bir enzimdir ve sitozolde bulunur. 1957 yılında Mills tarafından memeli erotrositlerinde bulunmuştur. Molekül ağırlığı 85000 daltondur ve birbirine benzeyen dört alt birimden oluşmaktadır. Bu alt birimlerin her birinde dört selenyum (Se) atomu bulunmaktadır. Bu

nedenle hücreleri çeşitli hasara karşı koruduğu düşünülmektedir. Hidrojen peroksitle organik peroksitlerin indirgenmesini sağlamaktadır. Zar fosfolipitlerinden, fosfolipaz A2 tarafından salınmakta olan lipid hidroperoksitlerine karşı etkisi bulunmaktadır. GSH-Px aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksitlerin birikmesine ve hücreni hasar görmesine neden olur. GSH-Px, lipid peroksidasyonunun başlamasına engel olmakta ve lipid peroksidasyonundan sonra meydana gelen lipid hidroperoksitlerin metabolizmasını sağlamaktadır (27).



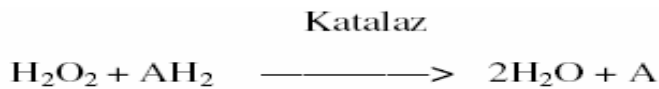
Ayrıca tümörlerde H_2O_2 ve peroksitlere karşı savunma sisteminde GSH-Px değerlerinde belirgin şekilde artış olduğu tespit edilmiştir.

GSH-Px Testi (katalog no cayman kit: 703102) kitte belirtilen protokole uyularak yapıldı.

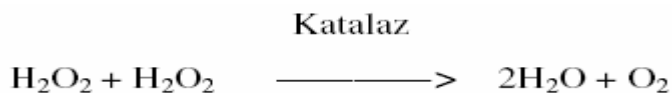
3.2.3.3. Katalaz Testi

Peroksizomlarda ve sitozolde bulunan CAT'ın molekül ağırlığı yaklaşık 248,000 Dalton'dur. Yapısında dört tane hem bulunduran bir hemoprotein katalaz, H_2O_2 'nin moleküler oksijene ve su molekülüne çevrilmesi sırasında katalizer olarak görev yapar. Katalaz ayrıca, metil-hidroperoksit ve etil-hidroperoksit gibi küçük moleküllerin indirgenmesini sağlamakta, ancak büyük molekül ağırlıklığına sahip lipid hidroperoksitlere etki gösterememektedir (27).

(katalitik aktivite)



(peroksidatik aktivite)



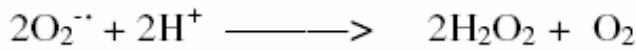
Katalaz enziminin birçok kanser türünde dokularda belirgin şekilde yüksek değerlerde olduğu belirtilmiştir.

CAT Testi (katalog no cayman kit: 707002) kitte belirtilen protokole uyularak yapıldı.

3.2.3.4. Süperoksit Dismutaz (SOD) Testi

Aerobik bütün hücreler SOD içermektedir. Sitozol ve mitokondrilerde bulunmakta olan SOD süperoksit radikallerini etkisiz hale getirerek, hücreleri süperoksit radikallerinin zararlı etkilerinden korumaktadır. Dokulardaki oksijen basınç değerinin artmasıyla SOD aktivasyonu artmaktadır. SOD, fagosit olmuş bakterilerin intraselüler biçimde öldürülmesi sırasında görev alır ve granülosit fonksiyonu açısından önemli bir enzimdir. İçeriğindeki metal iyonuna göre sitozolik dimerik Cu, Zn-SOD ve mitokondriyal tetramerik Mn-SOD şeklinde isimlendirilir (27).

SOD



Bu deneyde kullanılmak üzere kit protokole göre lizis tampon çözeltisi hazırlanarak, SOD Testi (katalog no cayman kit: 706002) kitde verilen protokole uygun olarak deneyler yapıldı. Lizis tampon çözelti aşağıda belirtilen şekilde hazırlanmıştır;

Lizis Tamponunun Hazırlanma prosedürü:

90 ml distile su içine Tris-HCl ilave edilerek pH'nın 7,2 olması sağlandı. Bu işlem sonrasında bu karışıma aşağıda verilen kimyasal maddeler ilave edildi. Toplam hacmin 100 ml olması için bu karışıma yeniden distile su ilave edildi. Elde edilen Lizis tampon çözeltisiyle hücrelerin homojenatı hazırlanarak kitteki protokole göre deney yapıldı.

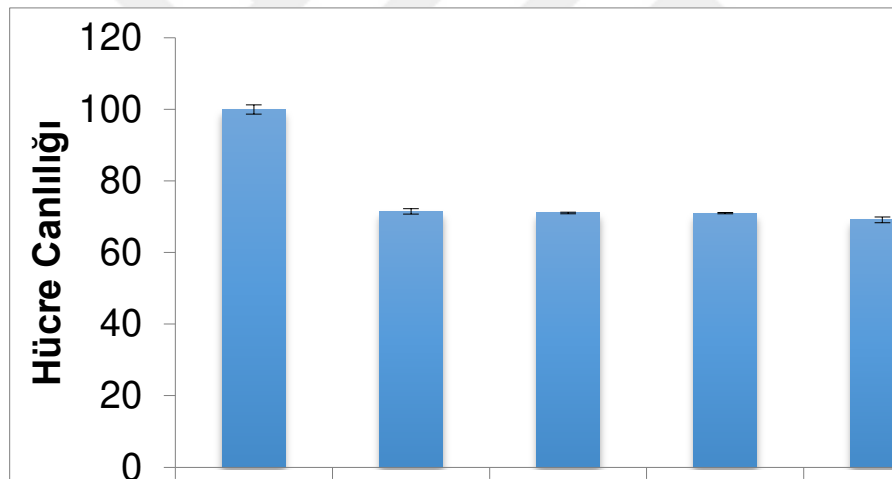
- 10mM Tris-HCl
- 25mM EDTA
- %0,1 Triton-X-100
- 100Mm Sukroz

4. BULGULAR

4.1. MTT Hücre Canlılığı Test Sonuçları

4.1.1. A β Toksitesiyle In Vitro Alzheimer Modelinin Oluşturulması

Astrosit hücrelerinde A β peptidi ile nörotoksitite modeli oluşturmak için 0, 5, 7.5, 12.5 ve 15 μ M konsantrasyonunda A β peptidi verilerek 24 saat süresince inkübasyonu yapıldı ve inkübasyon sonunda MTT ile hücre canlılıkları belirlendi. Şekil 10'da görüldüğü üzere A β peptidi eklenerek oluşturulan modelde hücre canlılık değeri kontrol grubuna göre % 100 iken, A β dozu artmasıyla beraber hücre canlılık değerinde düşüş görüldü. 5 μ M'de %28.5, 7.5 μ M'de %28.93, 10 μ M'de %29, 12.5 μ M'de %30.9 ve 15 μ M'de ise %32.4 düşüş görüldü. Bu deney sonucunda A β için en uygun dozun 15 μ M olduğu saptandı ve bu doz diğer çalışmalarda kullanıldı.

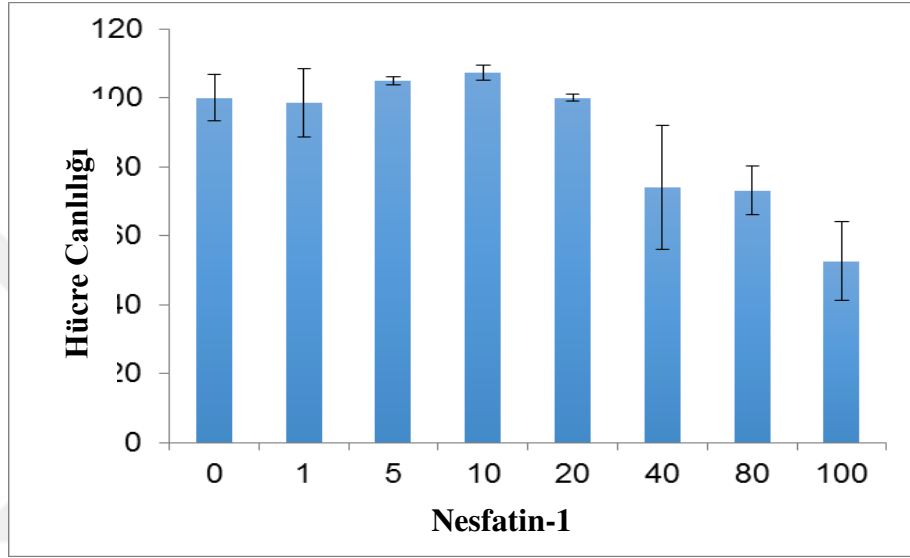


Şekil 10. Astrosit hücrelerinin farklı konsantrasyonlardaki A β ile 24 saat inkübasyonu sonucu elde edilen MTT sonuçları

4.1.2. Nesfatin-1 Molekülünün Doza Bağlı Hücre Canlılığına Etkisi

Astrosit hücrelerinde Nesfatin-1 molekülünün koruyucu etkisini belirlemek üzere farklı konsantrasyonlarda (0, 1, 5, 10, 20, 40, 80, 100 μ M) uygulandı. 24 saat inkübasyon sonrasında MTT ile Nesfatin-1 hücre canlılığı üzerine olan etkisi incelendi. Şekil 11' de görüldüğü üzere kontrol grubu %100 olarak alındığında, 1 μ M uygulanan Nesfatin-1

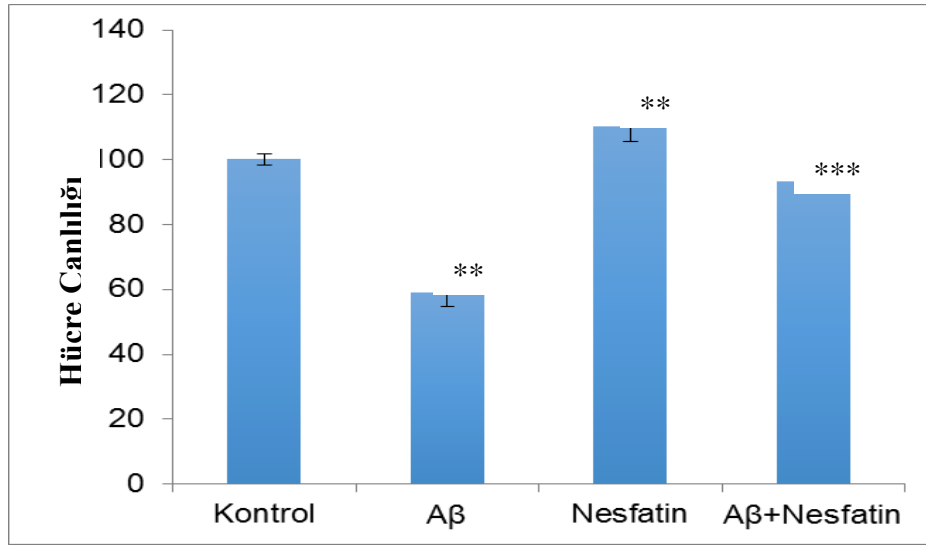
dozunda % 1,4 oranında kontrol grubuna göre hücre canlılığında düşüş görüldü. 5 μ M uygulanan Nesfatin-1 dozunda % 5 artış görüldü ve 10 μ M’de % 7.2 oranında artış görüldü. 20 μ M uygulanan Nesfatin-1 dozunda ise hücre canlılığı yaklaşık olarak kontrol grubuyla aynı değerdedir. 40 μ M Nesfatin-1 değeri için %26.1, 80 μ M Nesfatin-1 değeri için %26.9 ve 100 μ M için ise %47.3 oranında olmak üzere, hücre canlılık değerinde belirgin düşüşler meydana gelmiştir. Kullanılan dozlardan canlılığı destekleyen 10 μ M dozu seçilerek diğer çalışmalarda kullanıldı.



Şekil 11. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan Nesfatin-1 dozlarının 24 saatlik uygulama sonucu elde edilen MTT sonuçları

4.1.3. Nesfatin-1’in A β Toksitesine Karşı Koruyucu Etkisi

Bu çalışmada, Nesfatin-1’in A β toksitesine karşı koruyucu etkisi incelendi. Bu amaçla hücreler 15 μ M A β toksitesine maruz bırakılırken, yalnızca Nesfatin-1 grubu ve A β +Nesfatin-1 grubuna 10 μ M Nesfatin-1 eklendi. Şekilde 12’de görüldüğü üzere A β uygulandığında hücre canlılığında %41 oranında düşüş görülmüş, Nesfatin-1 uygulandığında hücre canlılığında % 10.3 artış görülmüş ve A β +Nesfatin-1 birlikte uygulandığında hücre canlılığında % 6.8 düşüş meydana gelmiştir. İnkübasyon sonucunda canlılık analizleri, Nesfatin-1’in A β toksitesini azaltarak hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde koruyucu etkisi olduğunu gösterdi.

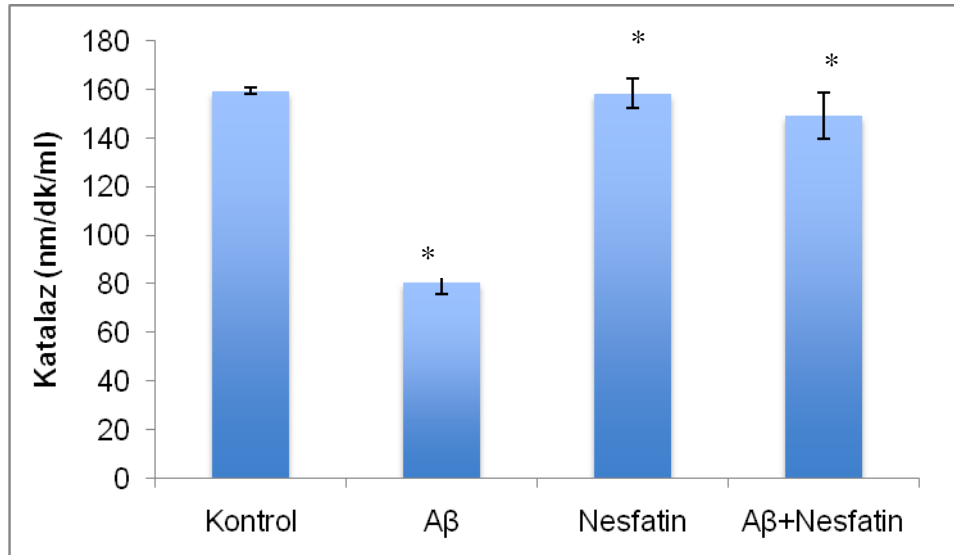


Şekil 12. Nesfatin-1'in (10 μ M) A β (15 μ M) toksitesine karşı koruyucu etkisinin MTT ile değerlendirilmesi (*Kontrol vs A β ** : $p < 0.01$, A β vs Nesfatin-1** : $p < 0.01$, A β vs A β +Nesfatin-1*** $p < 0.05$*)

4.2. Nesfatin-1 Oksidatif Hasara Karşı Koruyucu Etkileri

4.2.1. Katalaz Testi Sonuçları

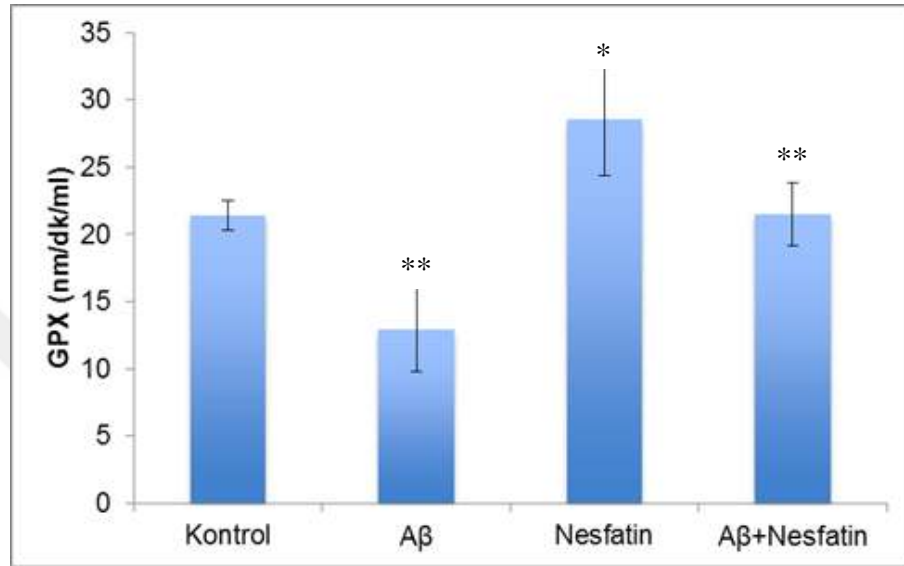
Yapılan deneylerde kontrol grubuna kıyasla A β 'ın katalaz düzeyini azalttığı (%48 düşüş), Nesfatin-1+A β grubunda ise bu azalmanın minimal sınırdaki olduğu (% 6.3 düşüş) görülmüştür.



Şekil 13. Nesfatin-1'in katalaz aktivitesi üzerine etkisi (*Kontrol vs A β * : $p < 0.001$, A β vs Nesfatin-1* : $p < 0.001$, A β vs A β +Nesfatin-1* : $p < 0.001$*)

4.2.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH Px) Testi Bulguları

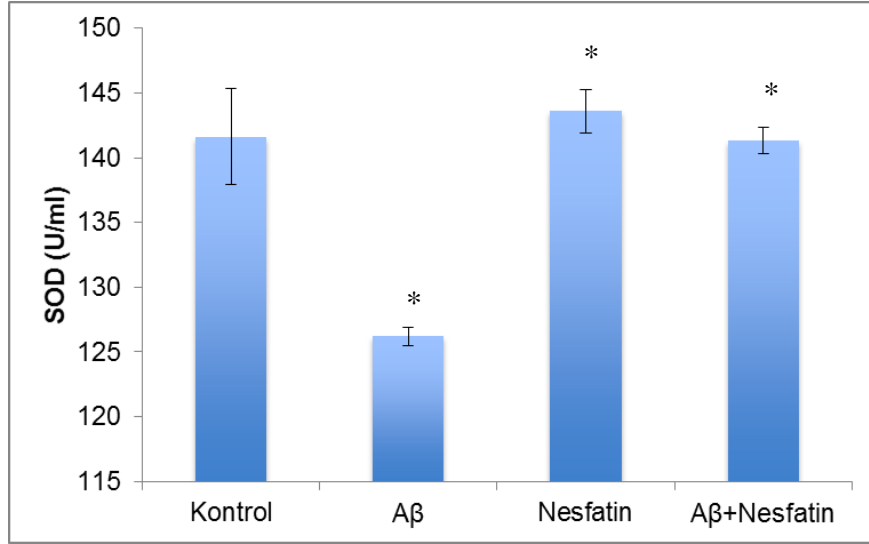
Yapılan deneylerde, kontrol grubuna kıyasla A β 'nın GSH Px düzeyini azalttığını ($p < 0,01$), Nesfatin-1 uygulamasının ise GSH Px düzeyini artırdığı görülmüştür ($p < 0,001$). Bu bulgular ile astrosit hücrelerinde A β ile oluşturulan oksidatif hasara karşı Nesfatin-1'in GSH Px düzeyini artırarak koruyucu etkisi olduğu gözlemlendi.



Şekil 14. Nesfatin-1'in GSH Px aktivitesi üzerine etkisi (*Kontrol vs A β ** : $p < 0.01$, A β vs Nesfatin-1* : $p < 0.001$, A β vs A β +Nesfatin-1** : $p < 0.01$)*

4.2.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Testi Bulguları

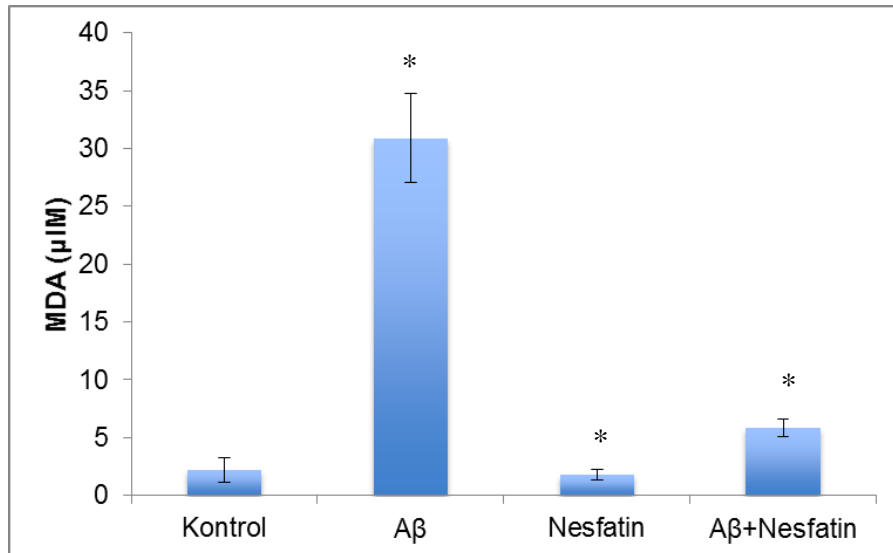
Yapılan deneylerde, kontrol grubuna kıyasla A β 'nın SOD düzeyini azalttığını ($p < 0.001$), Nesfatin-1 uygulamasının ise SOD düzeyini artırdığı görülmüştür ($p < 0.001$). Bu bulgular ile astrosit hücrelerinde A β ile oluşturulan oksidatif hasara karşı Nesfatin-1'in SOD düzeyini artırarak koruyucu etkisi olduğu gözlemlendi.



Şekil 15. Nesfatin-1'in SOD aktivitesi üzerine etkisi (*Kontrol vs Aβ* : p < 0.001, Aβ vs Nesfatin-1* : p < 0.001, Aβ vs Aβ+Nesfatin-1* : p < 0.001*)

4.2.4. Malonildialdehit (MDA) Testi Bulguları

Yapılan deneylerde, kontrol grubuna kıyasla Aβ'nın MDA düzeyini belirgin bir şekilde artırırken ($p < 0.001$), Nesfatin-1 uygulamasının ise MDA oluşumunu azalttığı görülmüştür ($p < 0.001$). Bu bulgular Nesfatin-1'in oksidatif hasara karşı koruyucu etkisi olduğunu göstermektedir.



Şekil 16. Nesfatin-1'in MDA aktivitesi üzerine etkisi (*Kontrol vs Aβ* : p < 0.001, Aβ vs Nesfatin-1* : p < 0.001, Aβ vs Aβ+Nesfatin-1* : p < 0.001*)

5. TARTIŞMA

Alzheimer Hastalığı (AH) beynin hippocampus ve korteks bölgelerinde geri dönüşümsüz nöron kaybı ile ortaya çıkan ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır. Serebral kortekste kolinerjik hasar AH'da gelişen bilişsel ve davranışsal bozukluklara neden olur. Semptomlar hafıza kaybı, konuşma, yön bulma, karar verme, düşünme ve yorumlamada zorluklar; kişilik ve davranış bozuklukları ile karakterizedir (3).

Yaklaşık 40 yıl sonra nüfusun giderek yaşlanacağı ülkemiz içinde önemli bir sağlık sorunu olabileceği tahmin edilmektedir. Batı ülkelerinde ise AH ölüm nedenleri arasında 4 sırada yer almaktadır. Hastalığın ortaya çıkma sıklığı yaşla orantılı olarak artış göstererek, AH'da 85 yaşın üzerinde %30'lara kadar çıkmaktadır. Toplumda yaşlı oranı arttıkça giderek artan bir sorun haline gelmektedir.

AH'da yapılan incelemede elde edilen makroskobik bulgulara, total beyin hacminde, hippocampusta ve kortekste ciddi oranda atrofi bulunmuştur. Mikroskobik bulgulara ise, amiloid plak, nörofibril yumakları ve granülovakuolar dejenerasyon saptanmaktadır (29). Nunomura ve ark. tarafından yapılan çalışmada, AH patogeneğinde ilk ortaya çıkan bulgulardan biri de beyin üzerinde oksidatif strese bağlı olarak oluşan değişiklikler olduğu gösterilmiştir (29).

Bu çalışmada, bir glia hücresi olan astrositlerde amloid β ile oluşturulan deneysel AH modelinde yeni tanımlanan anoreksijenik hormon olan diyabet, obezite, anoreksia nervoza, psikiyatrik bozukluklar ve nörojenik hastalıklar ile yakından ilişki gösteren nesfatin-1 antioksidan etkilerini saptamak için hücrelere uygulanmıştır. Hücre canlılığı ile antioksidan parametrelerin düzeylerine bakılmıştır.

ROS tarafından yapılan harap edici etki AH'da çok belirgin olmaktadır. Hücreler ROS neden olduğu hasarı önlemek için antioksidan üretirler. Bu çalışmada, antioksidan parametreler olarak katalaz, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve biyoaktif aldehit malondialdehit Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemiyle ölçüldü.

Bu çalışmanın ilk kısmında hazırlanan modelde A β dozuna, nesfatin dozuna ve A β + nesfatin dozuna göre hücre canlılığına bakıldı. A β p < 0,01 olarak, nesfatin p < 0.01, A β + nesfatin p < 0.05 anlamlı değer olarak değerlendirildi.

Mohandas ve ark. hücrelerde biriken A β mitokodriyal ve sinaptik hasara yol açarak hücre fonksiyonlara zarar verdiğini belirtmiştir (104). Yaptığımız bu çalışmada, A β eklenerek oluşturulan modelde hücre canlılık değeri kontrol grubunda %100 iken, A β dozu artmasıyla beraber hücre canlılık değerinde düşüş görülmüştür. 5 uM'de %28.5, 7.5 uM'de %28.93, 10 uM'de %29, 12.5 uM'de %30.9 ve 15 uM'de ise %32.4 düşüş görülmüştür. Bu A β eklenerek oluşturulan modellerde uygulanan dozların hücre canlılığına etkisinin yaklaşık olarak aynı olduğunu göstermektedir.

Uygulan Nesfatin dozunda ise hücre canlılığındaki en fazla artış 10 uM uygulanan modelde görülmüştür. 1uM uygulanan dozda hücre canlılığında kontrol grubuna göre %1.4 oranında düşüş görüldü. 5uM %5 artma görüldü ve 10uM %7.2 oranında artış görüldü. 20uM değerinde ise hücre canlılığı kontrol grubuyla yaklaşık olarak aynı değerdedir. 40uM nesfatin değeri için %26.1, 80uM için %26.9 oranında hücre canlılığında düşüş görülmüştür. En fazla düşüş %47.3 ile 100uM doz oranında görülmüştür. Bu sonuçlara göre eklenen Nesfatin-1 değerinin belli bir doz oranına kadar hücre canlılığını artırdığı, belirli doz oranından sonra ise belirgin bir şekilde düşürdüğü görülmektedir.

A β , nesfatin ve A β + nesfatin hücre canlılığına bakıldığı sonuçlarda; Kontrol grubu %100 olarak alındı A β %41 oranında hücre canlılığında düşme görülmüş, nesfatin dozunda ise %10.3 hücre canlılığında artış görülmüş ve A β + nesfatin dozunda %6.8 düşüş meydana gelmiştir.

Fisher ve Hanin. AH'da asetilkolinin azalmasıyla CAT enzim miktarında azaldığını ve korteks ve hipokampus projekte olan nöronlarda kayıpların meydana geldiğini belirtmiştir (105). Yaptığımız bu çalışmada, A β , nesfatin ve A β +nesfatinin katalaz üzerine etkisine bakıldığı sonuçlarda; A β eklenince katalaz değerinde kontrol grubuna göre yaklaşık %50 oranında azalma, nesfatin-1 eklenince %0.6 oranında azalma, A β ve nesfatin eklenen modelde ise %6.3 oranında azalma görülmüştür. Bu sonuç Katalaz antioksidan enziminin A β ile azalan değerinin, Nesfatin-1 eklenmesi ile dengelendiğini göstermektedir.

Tamer ve ark. tarafından yapılan çalışmada epileptik nöbetlere bağlı oluşan beyin hasarında nesfatin-1 iyileştirici etkisi araştırılmış ve sonuçta beyin dokusunda nesfatin-1'in NO ve ROS inhibe ettiği GSH düzeyinin korunduğu oksidatif hasarın hafiflediği rapor edilmiştir (106). Yaptığımız çalışmada, A β , nesfatin-1 ve A β ve nesfatinin

glutasyon peroksidaz (GSX-Px) üzerine etkilerine bakıldığı sonuçlarda; A β eklenen modelde GSX-Px değerinde kontrol grubuna göre %39.4 oranında azalma, nesfatin-1 eklenen modelde GSX-Px değerinde %25 oranında artma görülmüştür. A β ve nesfatin eklenen modelde ise GSX-Px değeri kontrol grubuyla yaklaşık olarak aynı değerdedir. Bu sonuç GSX-Px antioksidan enziminin A β ile azalan değerinin, Nesfatin-1 eklenmesi ile dengelendiğini göstermektedir.

Oksidatif strese karşı ilk SOD etki gösterir, bu sebeple savunma enzimi olarak adlandırılır ve santral sinir sisteminde yaygın olarak bulunur (107). Bu çalışmada A β , nesfatin ve A β ve nesfatinin SOD üzerine etkilerine bakıldığı sonuçlarda; A β eklenen modelde SOD değerinde kontrol grubuna göre %10.9 oranında azalma, nesfatin eklenen modelde %1.36 oranında artma görülmüştür. A β ve nesfatin eklenen modelde ise yaklaşık olarak aynı değerdedir. Bu sonuç SOD antioksidan enziminin A β ile azalan değerinin, Nesfatin-1 eklenmesi ile dengelendiğini göstermektedir.

AH beyinlerinde serbest radikal oluşumunu uyaran demir, civa konsantrasyonlarının arttığı reddy ve ark. tarafından bildirilmiştir (11). Markesbery tarafından yapılan çalışmada ise, oksidatif hasara maruz kalan nöronlarda lipid peroksidasyonu, nitrasyon, reaktif karbonillerin oluşumu ve nükleik asit oksidasyonu arttığı bildirilmiştir (7). Oksidatif hasara bağlı bulgular AH'na bağlı diğer bulgu ve semptomlar ortaya çıkmadan önce saptanmaya başlar (15). Yani oksidatif stres AH katrakteristik bulgularının oluşmasına öncülük etmektedir. Oksidatif stres belirteçleri A β birikimi başlamadan dekadlar önce Alzheimer hastalarında saptanmaktadır. Yaptığımız çalışmada, A β , nesfatin ve A β ve MDA üzerine bakıldığı sonuçlarda; A β eklenen modelde MDA değerinde kontrol grubuna göre %1326 oranında artma, nesfatin eklenen modelde %16.9 oranında azalma görülmüş, A β ve nesfatin eklenen modelde ise %169 artış görülmüştür. A β ve nesfatin eklenen model ile A β eklenen model karşılaştırıldığında artış oranının %87 görülmüştür. Bu sonuç MDA biyoaktif aldehitinin A β ile artan değerinin, Nesfatin-1 ile A β birlikteyken azaldığını göstermektedir.

Bu çalışmada, bir glia hücresi olan astrositlerde amloid β ile oluşturulan AH modelinde multidisipliner bir hormon olan nesfatin-1 antioksidan etkileri araştırılmıştır. Sonuçlar katalaz (CAT), glutasyon peroksidaz (GSX-Px), süperoksit dismutaz (SOD) antioksidan enzimlerinin A β ile azalan değerlerinin, Nesfatin-1'in eklenmesi ile dengelendiğini ve

malondialdehit (MDA) biyoaktif aldehitinin A β ile artan değerinin, Nesfatin-1 ile A β birlikteyken azaldığını göstermektedir.



6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Nörodejeneratif hastalıklar klinik olarak ortaya çıkmadan önce belirteçlerini saptayıp patalojisinin ilerlemesini durdurabilecek tedaviler geliştirmek gerekmektedir. Bu tür hastalıkların genelinde ortaya çıkan bulguların en önemlisi beyin üzerinde oksidatif strese bağlı olarak oluşan değişikliklerdir. Bu hastalıkların temelinde nöranal ölüme yol açan patogenetik mekanizmalar rol oynamaktadır. Nöronlar oksidatif hasardan etkili bir şekilde korunabilse belki bu hastalıklar hiç ortaya çıkmayacak veya ilerlemeyecektir.

Bu çalışmada bir glia hücresi olan astrositlerde A β ile oluşturulan AH modelinde Nesfatin-1'in antioksidan etkilerine bakılmıştır, sonuçlar ve öneriler aşağıdaki gibi özetlenmiştir.

1. A β eklenmesiyle beraber hücre canlılık değerinde düşüş görülmüştür. Eklenen dozların hücre canlılık değerini yaklaşık olarak aynı oranda etkilediği görülmüştür.
2. Nesfatin-1 eklenmesi ile hücre canlılık değeri artmıştır ve bu artış bu mekanizmaların korunmasında etkili olacağının bir göstergesidir.
3. Uygulanan Nesfatin-1 dozları arasında hücre canlılığındaki en fazla artış 10 uM uygulanan modelde görülmüştür. Nesfatin-1 değerinin belli bir doz oranına kadar hücre canlılığını artırdığı, belirli doz oranından sonra ise belirgin bir şekilde düşürdüğü görülmektedir. Bu yapılan uygulamanın doza bağımlı olduğunun bir göstergesidir ve yapılacak çalışmalarda veya uygulamalarda doz oranına dikkat etmek gerektiğini göstermektedir.
4. CAT, GSX-Px, SOD antioksidan enzimlerinin A β ile azalan değerlerinin, Nesfatin-1'in eklenmesi ile dengelendiği görülmüştür. Bu sonuç A β ile azalan antioksidan kapasitenin düzenlenmesinde Nesfatin-1'in etkili olduğunun bir göstergesidir.
5. MDA biyoaktif aldehitinin A β eklenmesi ile artan değerinin, Nesfatin-1 ile A β birlikte uygulandığında azaldığı görülmüştür. Bu sonuç ise MDA biyoaktif aldehitinin zararlı etkisinin en azından hücredeki miktarının azalmasına yardımcı olarak Nesfatin-1 ile düzenlenebileceğini göstermektedir.

6. Bu çalışma sonucu olarak ve ileride yapılacak çalışmalar da benzer sonuçlar gösterir ise Nesfatin-1'in AH için potansiyel bir koruyucu ve/veya tedavi edici ajan olabileceği ve AH ve birçok nörodejeneratif olarak oluşan hastalıkların öngörülmesinde ve ilerleyişini önlemede yardımcı olabileceği öngörülmektedir.
7. Bu çalışma ile AH 'da etkili olduğu görülen Nesfatin-1'in, Parkinson vb. nörodejeneratif hastalıklarda da in vivo ve in vitro modellerde çalışılarak, bu hastalıkların öngörülmesinde ve ilerleyişini önlemede etkili olup olmayacağı araştırılabilirliği düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

1. Eker E.. Alzheimer Hastalığı Ve Diğer Demanslar Türkiye Klinikleri Dahili Tıp Bilimleri Dergisi Psikiyatri 1. 2005; 29: 3-16.
2. <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2014.pdf> (24.05.2016)
3. Esen S. Alzheimer hastalığı patofizyolojisi: deneysel ve genetik bulgular. Türk Geriatri Dergisi J Neuroimmunol 2010; 13: 21-26
4. İcelli İ. Demans ve Komorbid Durumları. Psikiyatri Dünyası 2001; 5: 49-54.
5. Torreilles, F., Touchon, J. Pathogenic theories and intrathecal analysis of the sporadic form of Alzheimer's disease. Progress in Neurobiology. 2002; 66: 191–203.
6. ÖZER E. Ö. Alzheimer hastalığında oluşan beta-amiloid fibrillerin yeni sentezlenen kolinesteraz inhibitörleri ile destabilizasyonu. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, Ankara. 2012,.
7. Markesbery, W. Oxidative Stress Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 23, 1 (1997), 134-147.
8. Webber KM, Raina AK, Marlatt MV, Zhu X., Prat MI, Morelli L., Casadesus, G., Perry, G. and Smith, MA. (2005). The cell cycle in Alzheimer disease: A unique target for neuropharmacology. *Mechanisms of Ageing and Development*, 126(10), pp.1019-1025.
9. Aisen, P. The potential of anti-inflammatory drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*. 1, 5 (2002), 279-284.
10. Gibson GE, Huang HM. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2005; 26: 575–78.
11. Reddy, P. ve Beal, M. 2005. Are mitochondria critical in the pathogenesis of Alzheimer's disease?. *Brain Research Reviews*. 49, 3 (2005), 618-632.
12. Blessed G, Tomlinson BE, Roth M. The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects. *Br J Psychiatry* 1968; 114: 797–811
13. Selekler K (2003) Alzheimer Hastalığı: patoloji, klinik, tanı ve ayırıcı tanı. Modern Tıp Semineri.26. Alzheimer ve diğer demanslar. Ed. Kaynak Selekler. Ankara: Güneş Kitabevi Ltd. Şti
14. Kaynak S. Alois Alzheimer ve Alzheimer Hastalığı. Türk Geriatri Dergisi 2010; 13(3): 9– 14.
15. Özgör C, Soylu C, Arsoy E, ve ark. Alzheimer Hastalığının kronolojik olarak incelenmesi. İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Sinirbilim Anabilim Dalı, İstanbul, 2003.
16. Altmann A, Tian L, Henderson VW, Greicius MD. Sex modifies the APOE-related risk of developing Alzheimer disease. *Ann Neurol* 2014; 75: 563–73.
17. Maltsev, A.V., Bystryak, S., Galzitskaya, O.V. The role of β -amyloidpeptide in neurodegenerative diseases. *Ageing Research Reviews*. 2011; 10: 440–452.
18. Öge AE, Nöroloji _İstanbul Tıp Fakültesi Temel Ve Klinik Bilimler Ders Kitapları Nobel Tıp Kitapevleri 2004;369]
19. Gilman S. Alzheimers disease. 1997;40(2):230-45.

20. Friedlander AH, Norman DC, Mahler ME, Norman KM, Yagiela JA. Alzheimer's disease: psychopathology, medical management and dental implications. *J AmDent Assoc* 2006;137(9):1240-51.
21. AKDEMİR, Ü. Özgür; KAPUCU, L. Özlem. Demans Hastasının Değerlendirilmesinde Nükleer Tıp Yöntemleri. *Türkiye Klinikleri Journal of Psychiatry*, 2003, 4.1: 42-51.
22. Lleo A, Greenberg S, and Growdon J. Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Med.* 2006; 57: 513–533.
23. Williams M. Progress in Alzheimer's disease drug discovery: an update. *Current Opinion in Investigational Drugs* (London, England: 2000) 2009; 10(1): 23–34.
24. Trojanowski JQ, LEE VMY. Phosphorylation of Neuronal Cytoskeletal Proteins in Alzheimer's Disease and Lewy Body Dementias. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1994; 747(1): 92– 109.
25. Schneider LS. New therapeutic approaches to cognitive impairment. *Journal of Clinical Psychiatry* 1998; 59 (Suppl 11): 8– 13.
26. Seleker K, Topçuoğlu E. Alzheimer Hastalığı. *Geriatri* 1998; 1 (2): 63–67.
27. Cankurtaran M, Arıoğlu S. Alzheimer Hastalığı ve Demans Tedavisinde Yenilikler. *Türkiye Tıp Dergisi* 2002; 9(3): 128-136
28. <http://www.oksante.com.tr/oksantest.pdf> (01.12.2016)
29. Lewy-Lahad E ve Bird TD. Genetic factors in Alzheimer's disease: a review of recent advances. *Ann Neurol* 1996; 40:829–840.
30. Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, . . . Smith MA. Oxidative Damage Is the Earliest Event in Alzheimer Disease. *J Neuropathol Exp Neurol Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 2001; 60(8): 759-767.
31. Oh-I S., Shimizu H., Satoh T., ve Okada S. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature* 2006; 443: 709-12.
32. Shimizu H., Oh-I S., Hashimoto K. Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: the leptin-independent mechanism. *Endocrinology* 2009;150: 662-671.
33. Gonzalez R., Kerbel B., Chun A., ve Unniappan S.. Molecular, cellular and physiological evidences for the anorexigenic actions of nesfatin-1 in goldfish. *Plos One* 2010; 5.
34. Brailoiu GC, Dun SL, Brailoiu E, Inan S, Yang J, Chang JK, Dun NJ. Nesfatin-1: distribution and interaction with a G protein-coupled receptor in the rat brain. *Endocrinology* 2007; 148:5088–5094.
35. Foo K, Brismar H, Broberger C. (2008). Distribution and neuropeptide coexistence of nucleobindin-2 mRNA/nesfatin-like immunoreactivity in the rat CNS. *Neuroscience* 2008;156(3): 563–79.
36. Goebel M, Stengel A, Wang L, Lambrecht NW, Tache Y. Nesfatin-1 immunoreactivity in rat brain and spinal cord autonomic nuclei. *Neurosci Lett* 2009; 452(3): 241–246.
37. (<http://www.epgonline.org/images/axura/img1.gif>).
38. Hardy J. ve Selkoe D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002;297 (5580): 353–356.

38. Inchoff T, Stengel A, Peter L, eve ark. (2010). Novel insight in distribution of nesfatin-1 and phospho-mTOR in the arcuate nucleus of the hypothalamus of rats. *Peptides*, 31(2): 257–62.
39. Gendron T. F. ve Petrucelli, L. The role of tau in neurodegeneration. *Molecular Neurodegeneration*. 2009; 4: 13.
40. Kitamura Y, Shimohama S, Kamoshima W, Ota T, Matsuoka Y, Nomura Y ve ark. Alteration of proteins regulating apoptosis, Bcl-2, Bcl-x, Bax, Bak, Bad, ICH-1 and CPP32, in Alzheimer's disease. *Brain Res*. 1998; 780: 260–269.
41. Zornig M, Hueber A, Baum W, Evan G. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1551: F1–37.
42. Kudo W, Lee HP, Smith MA, Zhu X, Matsuyama S, Lee HG. Inhibition of Bax protects neuronal cells from oligomeric A β neurotoxicity. *Cell Death Dis*. 2012 17;3.
43. Cameron B ve Landreth GE. Inflammation, microglia, and alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease* 2010; 37(3): 503–509.
44. Ying L, Meng-Shan T, Teng J, Tan L. Microglia in Alzheimer's Disease. *BioMed Research International* 2014; 2014:1-7.
45. Chauhan, Ved; Chauhan, Abha. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Pathophysiology*, 2006, 13.3: 195-208.
46. Frank J Kelly *Occup Environ Med* 2003;60:612–616
47. Aktaş M., Değirmenci U., Yıldırım H., Ercan S. K., Tamer L., Atik U. Mda Ölçümünde Hplc Ve Spektrofotometrik Yöntemlerin Karşılaştırılması., *Mersin Üniv. Tıp Fak. Dergisi* 2004; 4: 365-370
48. Butterfield, DA., Lauderback, CM., “Lipid peroxidation and protein oxidation in disease brain: potential causes and consequences involving amiloid β -peptide associated free radical oxidative stres”, *Free Rad Biol Med*. 32(11): 1050-1060,2002.
49. Sternberg SS: *Central Nervous System. Histology for Pathologists*, 2.basım, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1997, 243-285.
50. Kumar V., Cotran R., Robbins SL. *Sinir sistemi. Temel Patoloji*, 6, Nobel Kitabevi, İstanbul, 2000, 713-745.
51. Dringen, Ralf. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in neurobiology*, 2000, 62.6: 649-671.
52. Verkhratsky, A., Olabarria, M., Noristani, H. N., Yeh, C. Y., and Rodriguez, J. J. Astrocytes in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*, 2010, 7.4: 399-412.
53. Kimura, Yuka; Kimura, Hideo. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *The FASEB journal*, 2004, 18.10: 1165-1167.
54. Bassan, M. , Zamostiano, R. , Davidson, A. , Pinhasov, A. , Giladi, E., Perl, O. et al. (1999). Complete sequence of a novel protein containing a femtomolar-activity-dependent neuroprotective peptide. *Journal of Neurochemistry* 72: 1283-1293.
55. Gozes I. (2007). Activity-dependent neuroprotective protein: from gene to drug candidate. *Pharmacol. Ther.* 114: 145-153
56. Montesinos Rafael-Fernandez, Torres Manuel, David Baglietto-Vargas, Gutierrez Antonia, Gozes Illana, Vitorica Javier, Pozo David. (2010). Activity-Dependent Neuroprotective Protein (ADNP) Expression in the Amyloid

- Precursor Protein/Presenilin 1 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J. Mol. Neurosci.* 41: 114-120
57. Angulo MC, Le Meur K, Kozlov AS, Charpak S, Audinat E. (2008). GABA, a forgotten gliotransmitter. *Prog. Neurobiol.* 86(3): 297-303.
 58. Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 22: 208-215.
 59. Bélanger Mireille, Magistretti Pierre J. (2009). The role of astroglia in neuroprotection *Dialogues Clin Neurosci.* 11: 281-295.
 60. Pellerin Luc and Magistretti Pierre J. (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: A mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization *Proc. Natd. Acad. Sci. USA Neurobiology.* 91: 10625-10629.
 61. Pellerin L, Bouzier-Sore AK, Aubert A, et al. (2007). Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia.* 55: 1251-1262.
 62. Pellerin Luc and Magistretti Pierre J. (2012). Sweet sixteen for ANLS. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.* 32: 1152–1166.
 63. DiNuzzo M, Maraviglia B, Giove F. (2011). Why does the brain (not) have glycogen? *Bioessays.* 33(5): 319-326.
 64. Herrero-Mendez A, Almeida A, Fernández E, Maestre C, Moncada S, Bolaños JP. (2009). The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. *Nat. Cell Biol.* 11(6): 747-752.
 65. Oh-I S, Shimizu H, Satoh T, Okada S, Adachi S, Inoue K, Eguchi H, Yamamoto M, Imaki T, Hashimoto K, Tsuchiya T, Monden T, Horiguchi K, Yamada M, Mori M. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature* 2006; 443(7112): 709–712.
 66. Shimizu H., Oh-I S., Hashimoto K. Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: the leptin-independent mechanism. *Endocrinology* 2009;150: 662-671.
 67. Gonzalez R., Kerbel B., Chun A., ve Unniappan S.. Molecular, cellular and physiological evidences for the anorexigenic actions of nesfatin-1 in goldfish. *Plos One* 2010; 5.
 68. Stengel A, Goebel M, Wang L, Tache' Y. Abdominal surgery activates nesfatin-1 immunoreactive brain nuclei in rats. *Peptides* 2010; 31:263–270.
 69. Pan W, Hsueh H, Kastin AJ. Nesfatin-1 crosses the blood-brain barrier without saturation. *Peptides.* 2007;28(11):2223-2228.
 70. Price CJ, Samson WK, Ferguson AV. Nesfatin-1 inhibits NPY neurons in the arcuate nucleus. *Brain Res.* 2008;1230:99-106.
 71. Brailoiu GC, Dun SL, Brailoiu E, Inan S, Yang J, Chang JK, Dun NJ. Nesfatin-1: distribution and interaction with a G protein-coupled receptor in the rat brain. *Endocrinology* 2007; 148:5088–5094.
 72. Foo K, Brismar H, Broberger C. (2008). Distribution and neuropeptide coexistence of nucleobindin-2 mRNA/nesfatin-like immunoreactivity in the rat CNS. *Neuroscience* 2008;156(3): 563–79.
 73. Kohno D, Nakata M, Maejima Y, Shimizu H, Sedbazar U, Yoshida N, Dezaki K, Onaka T, Mori M, Yada T. Nesfatin-1 neurons in paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus coexpress oxytocin and vasopressin and are activated by refeeding. *Endocrinology* 2008; 149(3): 1295–301.

74. Stengel A, Goebel M, Yakubov I, Wang L, Witcher D, Coskun T, Tache' Y, Sachs G, Lambrecht NW. Identification and characterization of nesfatin-1 immunoreactivity in endocrine cell types of the rat gastric oxyntic mucosa. *Endocrinology* 2009; 150: 232–238.
75. Gonzalez R, Tiwari A, Unniappan S. Pancreatic beta cells colocalize insulin and pronesfatin immunoreactivity in rodents. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 381:643–664.
76. Goebel M, Stengel A, Wang L, Lambrecht NW, Tache Y. Nesfatin-1 immunoreactivity in rat brain and spinal cord autonomic nuclei. *Neurosci Lett* 2009; 452(3): 241–246.
77. Inchoff T, Stengel A, Peter L, eve ark. (2010). Novel insight in distribution of nesfatin-1 and phospho-mTOR in the arcuate nucleus of the hypothalamus of rats. *Peptides*, 31(2): 257–62.
78. Zhang AQ, Li XL, Jiang CY, Lin L, Shi RH, Chen JD, Oomura Y. (2010). Expression of nesfatin-1/NUCB2 in rodent digestive system. *World J Gastroenterol*, 16(14):1735-41.
79. Merali Z, Cayer C, Kent P, Anisman H. Nesfatin-1 increases anxiety- and fear-related behaviors in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 2008; 201:115–123.
80. Tanida M, Mori M 2011 Nesfatin-1 stimulates renal sympathetic nerve activity in rats. *Neuroreport* 22:309–312.
81. Stengel A, Tache' Y 2010 Corticotropin-releasing factor signaling and visceral response to stress. *Exp Biol Med (Maywood)* 235:1168–1178.
82. Stengel A, Goebel M, Wang L, Rivier J, Kobelt P, Mo'nnikes H, Lambrecht NW, Tache' Y. Central nesfatin-1 reduces darkphase food intake and gastric emptying in rats: differential role of corticotropin-releasing factor2 receptor. *Endocrinology* 2009; 150: 4911–4919.
83. Yoshida N, Maejima Y, Sedbazar U, Ando A, Kurita H, Damdindorj B, Takano E, Gantulga D, Iwasaki Y, Kurashina T, Onaka T, Dezaki K, Nakata M, Mori M, Yada T. Stressor-responsive central nesfatin-1 activates corticotropin-releasing hormone, noradrenaline and serotonin neurons and evokes hypothalamic-pituitary- adrenal axis. *Aging (Albany NY)* 2010; 2:775–784.
84. Goebel M, Stengel A, Wang L, Tache Y. Restraint stress activates nesfatin-1-immunoreactive brain nuclei in rats. *Brain Res* 2009;1300:114–124.
85. Bez Y., Arı M., Oztürk H., Oktar S., ve Yeşim C. Increased plazma nesfatin-1 levels in patients with obsessive compulsive disorder 2012; 5-9.
86. Kuloğlu T, Artaş G., Adriamisin uygulamasının sıçan kalp dokusunda Nesfatin-1 immünreaktivitesi Üzerine Etkileri. *Fırat Tıp Dergisi* 2015; 20(2): 81–85.
87. Tan, Z., Xu, H., Shen, X., ve Jiang, H. (2015). Nesfatin-1 antagonized rotenone-induced neurotoxicity in MES23. 5 dopaminergic cells. *Peptides*, 69, 109-114.
88. Bez ve ark. Plazma Nesfatin-1 Level May Be Associated with Disease Severity in Patients with Panic Disorder. *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni* 2010; 20:288-292.
89. Ramanjaneya, M., Chen, J., Brown, J. E., Tripathi, G., Hallschmid, M., Patel, S., ve Randeva, H. S. (2010). Identification of nesfatin-1 in human and murine adipose tissue: a novel depot-specific adipokine with increased levels in obesity. *Endocrinology*, 151(7), 3169-3180.

90. Gonzalez R, Reingold BK, Gao X, Gaidhu MP, Tsushima RG, Unniappan S. Nesfatin-1 exerts a direct, glucose-dependent insulinotropic action on mouse islet and MIN 6 cells. *J Endocrinol* 2011;208:R9–R16.
91. Su Y, Zhang J, Tang Y, Bi F, Liu JN. The novel function of nesfatin-1: anti hyperglycemia. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;391:1039–1042.
92. Tang, C. H., Fu, X. J., Xu, X. L., Wei, X. J., ve Pan, H. S. (2012). The anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of nesfatin-1 in the traumatic rat brain. *Peptides*, 36(1), 39-45.
93. Sulzer, D. (2007). Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. *Trends in neurosciences*, 30(5), 244-250.
94. Li, C., Zhang, F., Shi, L., Zhang, H., Tian, Z., Xie, J., ve Jiang, H. (2014). Nesfatin-1 decreases excitability of dopaminergic neurons in the substantia nigra. *Journal of Molecular Neuroscience*, 52(3), 419-424.
95. Vas, S., Ádori, C., Könczöl, K., Káta, Z., Pap, D., Papp, R. S., ... ve Tóth, Z. E. (2013). Nesfatin-1/NUCB2 as a potential new element of sleep regulation in rats. *PLoS One*, 8(4), e59809.
96. Yosten, G. L., ve Samson, W. K. (2009). Nesfatin-1 exerts cardiovascular actions in brain: possible interaction with the central melanocortin system. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 297(2), R330-R336.
97. Aydın, S., Dag, E., Ozkan, Y., Erman, F., Dagli, A. F., Kilic, N., ve Kendir, Y. (2009). Nesfatin-1 and ghrelin levels in serum and saliva of epileptic patients: hormonal changes can have a major effect on seizure disorders. *Molecular and cellular biochemistry*, 328(1-2), 49.
98. Özsavcı, D., Ersahin, M., Sener, A., Özakpınar, Ö. B., Toklu, H. Z., Akakın, D., . ve Yegen, B. Ç. (2011). The Novel Function of Nesfatin-1 as an Anti-inflammatory and Antiapoptotic Peptide in Subarachnoid Hemorrhage-Induced Oxidative Brain Damage in Rats. *Neurosurgery*, 68(6), 1699-1708.
99. Dong, J., Xu, H., Wang, P. F., Cai, G. J., Song, H. F., Wang, C. C., ... ve Jiang, Z. Y. (2013). Nesfatin-1 stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase in STZ-induced type 2 diabetic mice. *PloS one*, 8(12), e83397.
100. Riva, M., Nitert, M. D., Voss, U., Sathanoori, R., Lindqvist, A., Ling, C., ve Wierup, N. (2011). Nesfatin-1 stimulates glucagon and insulin secretion and beta cell NUCB2 is reduced in human type 2 diabetic subjects. *Cell and tissue research*, 346(3), 393-405.
101. Shen P, Han Y, Cai B, Wang Y. Decreased levels of serum nesfatin-1 in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep Breath*. 2015;19:515–522.
102. Leivo-Korpela S, Lehtimäki L, Hämäläinen M, Vuolteenaho K, Kivi L, Järvenpää R, Kankaanranta H, Saarelainen S, Moilanen E. Adipokines NUCB2/nesfatin-1 and visfatin as novel inflammatory factors in chronic obstructive pulmonary disease. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:232167
103. Celik, A., Gurger, M., Can, C., Balin, M., Gul, E., Kobat, M. A., ve Aydın, S. (2013). The effect of nesfatin-1 levels on paroxysmal supraventricular tachycardia. *Journal of Investigative Medicine*, 61(5), 852-855.
104. Mohandas, E., Rajmohan, V., & Raghunath, B. (2009). Neurobiology of Alzheimer's disease. *Indian journal of psychiatry*, 51(1), 55.

- 105.Fisher, A. ve Hanin, I. Potential animal models for senile dementia of Alzheimer's type, with emphasis on AF64A-induced cholinotoxicity. Annual review of pharmacology and toxicology, 1986, 26.1: 161-181.
- 106.Tamer, S. A., Koyuncuoglu, T., Karagoz, A., Akakin, D., Erzik, C., Yuksel, M., & Yegen, B. C. . The Combination of Nesfatin-1 and Phenytoin Has a Synergistic Effect in Improving Seizure-induced Neuronal Damage and Memory Dysfunction in Rats. In ACTA PHYSIOLOGICA 2016; 218: 9-9.
- 107.Huang X, Moir RD, Tanzi RE et al. Redox-active metals, oxidative stress and Alzheimer's diseasepathology. Ann. NY. Acad. Sci. 1012: 153–163 2004

