

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NÖRONAL HÜCRE İÇİ KOLESTEROL
DÜZEYLERİNİN
AMİLOİD BETA TOKSİSİTESİ VE
NÖROSTEROİDLERİN SENTEZİ ÜZERİNE
ETKİSİ**

ÖZLEM GÜR SOY ÇALAN

TEMEL SİNİRBİLİMLER DOKTORA PROGRAMI

DOKTORA TEZİ

İZMİR-2015

TEZ KODU: DEU.HSL.PhD-2010970081

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NÖRONAL HÜCRE İÇİ KOLESTEROL
DÜZEYLERİNİN
AMİLOİD BETA TOKSİSİTESİ VE
NÖROSTEROİDLERİN SENTEZİ ÜZERİNE
ETKİSİ**

**TEMEL SİNİRBİLİMLER DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

ÖZLEM GÜRSOY ÇALAN

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. PINAR AKAN

Bu araştırma TÜBİTAK-Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı
(1001) tarafından 110S412 proje no ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2010970081

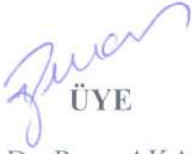
Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sinirbilimler Anabilim Dalı, Temel Sinirbilimler Doktora programı öğrencisi Özlem Gürsoy Çalan "**Nöronal Hücre İçi Kolesterol Düzeylerinin Amiloid Beta Toksisitesi ve Nörosteroidlerin Sentezi Üzerine Etkisi**" başlıklı Doktora tezini 19.03.2015 tarihinde BASARILI olarak tamamlamıştır.

BAŞKAN

Prof. Dr. Şermin GENÇ

Dokuz Eylül Üniversitesi

Sinirbilimler Anabilim Dalı



ÜYE

Prof. Dr. Pinar AKAN

Dokuz Eylül Üniversitesi

Sinirbilimler Anabilim Dalı



ÜYE

Prof. Dr. A. Semra KOÇTÜRK

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



ÜYE

Prof. Dr. Görsev YENER

Dokuz Eylül Üniversitesi

Sinirbilimler Anabilim Dalı



ÜYE

Prof. Dr. Fatma TANELİ

Celal Bayar Üniversitesi

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

ÜYE (Yedek)

Prof. Dr. İbrahim ÖZTURA

Dokuz Eylül Üniversitesi

Sinirbilimler Anabilim Dalı

ÜYE (Yedek)

Prof. Dr. Cevval ULMAN

Celal Bayar Üniversitesi

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	1
İNGİLİZCE ÖZET.....	3
1 GİRİŞ ve AMAÇ	5
2 GENEL BİLGİLER.....	7
2.1 Alzheimer Hastalığı ve Patogenezi.....	7
2.1.1 Amiloid Beta Toksisitesi.....	7
2.1.2 Kolesterol ve Alzheimer Hastalığı İlişkisi	9
2.1.3 Beyin Kolesterol Metabolizması	9
2.1.4 Kolesterol ve Amiloid Beta Toksisitesi	12
2.2 Nörosteroidler	12
2.2.1 Tanım.....	12
2.2.2 Nörosteroidlerin Biyosentezi	13
2.2.3 Nörosteroidlerin Metabolizması.....	14
2.2.4 Nörosteroidlerin Etki Mekanizmaları - Nöroaktif steroidler.....	15
2.2.5 Nöroaktif Steroidlerin Sinir Sistemindeki Fizyopatolojik Süreçlerdeki Rolü.....	16
3 GEREÇ VE YÖNTEM.....	18
3.1 Araştırmanın Tipi	18
3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı	18
3.3 Araştırma Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları	18
3.4 Çalışma Materyali	18
3.5 Araştırmanın Değişkenleri.....	18
3.6 Veri Toplama Araçları	19
3.6.1 Kullanılacak mevcut makine – teçhizat listesi.....	19
3.6.2 Hücre Kültürü.....	21
3.6.3 AB Peptit Toksisitesi.....	22
3.6.4 Hücre İçine Kolesterol Geçişinin Sağlanması	22
3.6.5 Kolesterol ve AB Peptit Uygulamasının P ve PS Düzeylerine Etkisinin Belirlenmesi.....	23
3.6.6 Hücre Canlılık Testleri.....	26
3.6.7 P ve PS Sentezindeki Değişimlerin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin İncelenmesi.	28
3.7 Araştırmanın Planı ve Takvimi	29
3.8 Verilerin Değerlendirilmesi	30
3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları.....	30

3.10	Etik Kurul Onayı	30
4	BULGULAR	31
4.1	Nöronal Hücrelerde AB Peptid Toksisitesi	31
4.2	Hücre İçine Kolesterol Geçişinin Sağlanması.....	35
4.3	Kolesterol ve AB Peptit Uygulamasının Nörosteroid Düzeylerine Etkisi.....	36
4.3.1	Pregnenolon	36
4.3.2	Pregnenolon Sülfat.....	40
4.4	AB ve Kolesterol Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi	42
4.5	Steroid Sentez İnhibitörlerinin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	43
5	TARTIŞMA	46
6	SONUÇ VE ÖNERİLER	51
7	KAYNAKLAR.....	52
8	EKLER.....	58

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1 : Çalışmada kullanılan cihazlar.....	19
Tablo 2 : Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler.....	20

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1 : Amiloid prekürsör proteinin (APP) sekretazlar ile kesimi (22).....	8
Şekil 2 : Beyin kolesterol sentezi ve metabolizması (43).....	11
Şekil 3 : Sinir sisteminde üretilen bazı nörosteroidler (57)	13
Şekil 4 : Steroid sentezinin mikrozomal ve mitokondrial kompartmandaki bölümleri(16).....	14
Şekil 5 : PS'nin prefrontal korteks ve hipokampusta glutamat salınımına etkisi (72).....	16
Şekil 6 : Pregnenolone standart eğrisi.....	24
Şekil 7 : Kolesterol ve pregnenolon için eş zamanlı oluşturulan standart eğriler.....	25
Şekil 8 : Kolesterol ve pregnenolonun kromatogramı	26
Şekil 9 : PC-12 hücrelerinde tüm AB fragmanlarının 72. saatte hücre canlılığına etkisi	31
Şekil 10 : SHSY-5Y hücrelerinde agregre AB fragmanlarının 72. saatte hücre canlılığına etkisi.....	32
Şekil 11 : PC-12 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat süresi ile 20 µM AB 25-35 uygulanması sonucunda nekrotik, apoptotik hücre oranlarının grafiksel gösterimi	33
Şekil 12 : PC-12 hücrelerine 24 saat süreyle 1.2 mM ve 9 mM kolesterol uygulanması sonrası hücreler ve kültür ortamlarının total kolesterol düzeyi değişimleri	35
Şekil 13 : PC-12 hücrelerine 72 saat süre ile AB 25-35 ve kolesterol uygulaması sonrası hücre ve kültür ortamları total kolesterol düzeyi değişimleri	36
Şekil 14 : PC-12 hücrelerinde 20 µM AB 25-35 ve kolesterol uygulamasının hücre ortamında kolesterol (mM) ve pregnenolon (mM) düzeyine etkisi.....	37
Şekil 15 : PC-12 hücrelerine 1,2 mM ve 9 mM kolesterolün 20 µM AB 25-35 fragmanının varlığında ve yokluğunda 72 saat boyunca uygulanmasının P düzeyi üzerine etkisi.....	38
Şekil 16 : Pregnenolon düzeylerinin PC-12 ve SHSY-5Y hücre hatlarında üç farklı AB uygulanması sonrası karşılaştırılması	39
Şekil 17 : PC-12 ve SHSY-5Y hücre hatlarında 9 mM kolesterol ile eş zamanlı AB peptitlerinin uygulanmasının P düzeylerine etkisi.....	39
Şekil 18 : PC-12 hücre hattında AB 1-40, AB 1-42 ve kolesterol uygulaması sonrası pregnenolon sülfat düzey değişimleri	40
Şekil 19 : PC-12 ve SHSY-5Y hücre hatlarında AB ve kolesterol uygulaması sonrası pregnenolon sülfat düzey değişimleri	41
Şekil 20 : PC-12 ve SHSY-5Y hücrelerine AB25-35 peptidi ile birlikte 1,2 mM ve 9mM kolesterol uygulanmasının hücre canlılığına etkisi.....	42
Şekil 21 : PC-12 hücre hattına AB 25-35, kolesterol ve steroid sentez inhibitörlerinin 72 saat süreyle uygulanmaları sonrası pregnenolon düzeylerindeki değişim	43
Şekil 22 : PC-12 hücrelerinde AB 25-35 ve kolesterol toksisitesine karşı steroid sentez inhibitörlerinin etkisi.....	44
Şekil 23 : PC-12 hücrelerinde AB 1-40, AB 1-42 fragmanları ve 9 mM kolesterol varlığında steroid sentez inhibitörlerinin hücre canlılığına etkisi	44
Şekil 24 : PC-12 hücre hattında AB 25-35 toksisitesine karşı DCNP'nin koruyucu etkisi.....	45
Şekil 25 : SHSY-5Y hücrelerinde AB 25-35 toksisitesine karşı DCNP'nin koruyucu etkisi	45

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1 : PC-12 hücrelerinin kontrol grubu ve 48 saat süreyle 20 µM AB 25-35 uygulaması sonrası akış sitometrik görüntüleri	33
Resim 2 : PC-12 hücrelerinin Hoechst boyası ile floresan mikroskopik görüntülenmesi	34

KISALTMALAR

AH: Alzheimer Hastalığı

AB: Amiloid beta peptidi

AP: Amiloid plak

APP: Amiloid Prekürsör Proteini

ApoE: Apolipoprotein E

BOS: Beyin omurilik sıvısı

CTF: C-ucu fragmanı

Ca²⁺: Kalsiyum

DHEA: Dehydroepiandrosterone (3 β -hydroxy-androst-5-ene-17-one)

DHEAS: Dehydroepiandrosterone Sülfat

DNA: Deoksiribonükleik asit

DCNP: 2,4-dichloro-6-nitrophenol

GABA: γ -amino bütirik asit

HST: Hidroksi steroid sülfotransferaz

3 β -HSD: 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaz/ Δ^5 - Δ^4 -izomeraz

HMGCoA redüktaz: Hidroksimetilglutaril Co-enzim A redüktaz

KBB: Kan beyin bariyeri

LDL: Düşük dansiteli lipoprotein

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

NFY: Nörofibriler yumak

NMDA: N-metil D-aspartat

PAPS: 3'-fosfoadenozin 5'-fosfosülfat

PC-12: Sıçan feokromasitoma hücre hattı

PROG: Progesteron

P: Pregnenolon (3 β -hydroxy-pregn-5-ene-20-one)

PS: Pregnenolon Sülfat

PI: Propidium iyodid

PBS: Phosphorylated buffer solution (Fosforile edilmiş tampon çözelti)

P450scc: Cytochrome P450 side chain cleavage enzim (Sitokrom P450 yan zincir koparan enzim)

SHSY-5Y: İnsan nöroblastoma hücre hattı

SSS: Santral Sinir Sistemi

VLDL: Çok düşük dansiteli lipoproteinlerin

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimimin ilk gününden itibaren bilimsel olarak bana yol gösteren, sinirbilim alanındaki merakımı keşfederek bu yolda yürümemi sağlayan ilgi ve desteğini her zaman hissettiğim değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Pınar AKAN'a,

Bilimsel birikimini benimle paylaşan ve manevi desteğini esirgemeyen Sinirbilimler Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Şermin GENÇ'e,

Engin deneyim ve bilgisinden yararlanmaktan mutluluk duyduğum Sayın Prof. Dr. A. Semra KOÇTÜRK'e,

Deneylerimin analiz aşamasında emeği geçen arkadaşlık, dostluk ve sevgilerini esirgemeyen Ayşenur ÇATALER, Cumhur DOĞAN, Kerim DOYURAN ve Nida DEMİRÇAK'a,

Hayatım boyunca beni hiç yalnız bırakmayan, yaptığım tercihlerde beni destekleyen ve emeklerini esirgemeyen sevgili annem, babama ve sabrından dolayı canım oğlum Ege ÇALAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Özlem GÜRSOY ÇALAN

NÖRONAL HÜCRE İÇİ KOLESTEROL DÜZEYLERİNİN AMİLOİD BETA TOKSİSİTESİ VE NÖROSTEROİDLERİN SENTEZİ ÜZERİNE ETKİSİ

Özlem Gürsoy Çalan

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

ÖZET

Alzheimer Hastalığı (AH) patogeneğinde temel hasar oluşum mekanizmalarından biri Amiloid beta (AB) toksisitesidir. Kolesterolün amiloid prekürsör proteinden toksik AB peptit sentezini tetiklediği veya AB peptitinin aggregasyon eşiğini düşürerek amiloid plak oluşumunu kolaylaştırdığı ileri sürülmektedir. Diğer taraftan AB peptidin kolesterol metabolizmasını ve kolesterol türevlerinin oluşumunu da etkilemesi olasıdır.

Pregnenolone (P) ve pregnenolone sülfat (PS) beyinde kolesterolden sentezlenebilen başlıca nörosteroidlerdendir. P nöronal toksisiteye karşı koruyucu etkiye sahipken, bir hafıza modülatörü olan PS 1 μ M'dan yüksek konsantrasyonlarda bir eksitotoksin gibi davranabilir. AB peptitlerinin nörotoksikite koşullarında kolesterol türevi bu steroidler üzerine etkisi henüz net olarak bilinmemektedir. Bu çalışma ile hücre kolesterol seviyelerinin AB toksisitesi, P ve PS sentezi ile olası ilişkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Toksik konsantrasyonlarda üç farklı AB fragmanı (25-35, 1-40 ve 1-42) ve periferik kan düzeylerini karşılayacak doz aralığında kolesterol PC-12 ve SHSY-5Y hücrelerine uygulandı. Uygulanan AB ve kolesterolün hücre içi kolesterol, P ve PS düzey değişimine etkileri doz ve zaman bağımlı olarak eş zamanlı belirlendi. Nöronal hücre canlılığı değişimi ve hücre ölüm tipi ayrıca değerlendirildi.

Hücrelere 72 saat AB fragman uygulamaları ile canlılık her iki hücre hattında ~%50 düzeyinde azaltıldı. Kolesterol uygulaması ile hücrenin total kolesterol düzeyi ilk 24 saatten itibaren bazal düzeyin ~5-6 katına kadar artırıldı. AB uygulaması ile birlikte hücre kolesterol düzeyindeki artış hücre canlılıklarını belirgin olarak azalttı. Kolesterol ile birlikte AB peptit uygulaması P düzeylerini sadece kolesterol uygulanan gruba göre belirgin olarak artırdı. Tüm AB fragmanları P düzeyini artırırken, PS düzeyinin fragman tipi ve kolesterol düzeyine bağlı olarak değiştiği gözlemlendi. Kolesterol ile birlikte AB uygulanan gruplarda steroid sentezinin kısmi inhibisyonunun hücre canlılığını her iki hücre hattında artırdığı belirlendi.

Bu çalışma ile AB toksisitesi, kolesterol ve P/PS düzey değişimleri hakkında yeni in-vitro veriler elde edildi. AB peptitlerinin fragman tipi ve kolesterol düzeyine bağlı olarak steroid düzeylerini ve hücre canlılığını etkilediği gösterildi Sonuç olarak kolesterolün AB toksisite oluşumunda AB sentezi ya da plak oluşumunu artırması yanı sıra nörosteroid düzeylerini etkilemesi ile de anahtar rol oynayabileceği ileri sürülebilir.

Anahtar sözcükler: Amiloid beta toksisitesi, pregnenolon, pregnenolon sülfat, nörosteroid, kolesterol, Alzheimer Hastalığı

THE EFFECT OF DIFFERENT CHOLESTEROL LEVELS IN NEURONAL CELLS ON AMYLOID BETA TOXICITY AND STEROID SYNTHESIS

Özlem Gürsoy Çalan

Dokuz Eylul University Health Science Institute

Neuroscience Department, 35340 İnciraltı, İzmir

ABSTRACT

Amyloid beta (AB) peptide toxicity is one of the initiator factors in the neurodegeneration process. It has been suggested that cholesterol induced the synthesis of AB peptide from amyloid precursor protein or facilitated the formation of amyloid plaque by lowering the aggregation threshold of the peptide. On the other hand, it is also possible that AB peptides may affect the cholesterol metabolism and the synthesis of cholesterol derivatives.

Pregnenolone (P) and pregnenolone sulfate (PS) are the major steroids produced from cholesterol in the neural tissue. P has protective effects against neuronal toxicity, PS which is a memory modulator, can behave as a natural excitotoxin in concentrations above 1 μ M. At neurotoxicity conditions, the effect of AB peptides on the synthesis of P and PS, derivatives of cholesterol, has not been clearly identified yet. The aim of this study was to investigate the possible relationship between cellular cholesterol, AB toxicity and P/PS synthesis.

Three different AB fragments (AB 25-35, AB 1-40 and AB 1-42) in toxic concentration and cholesterol compatible with peripheral blood levels were applied to PC-12 and SHSY-5Y cells. The effects of applied AB and cholesterol on intracellular cholesterol, P and PS levels were determined simultaneously in a dose and time dependent manner. Neuronal cell viability and cell death types were also evaluated.

AB fragment applications for 72 hours have reduced the cell viability level to 50% of the control cells. Total cholesterol levels of the cells were increased up to ~5-6 fold following cholesterol application for 24 hours. Treatment with AB fragments and increasing the cholesterol level caused a significant decrease in cell viability. Concurrent application of AB with cholesterol increased P levels more than the group treated only with cholesterol. While all AB fragments caused increase in P levels, PS levels were changed according to the

fragment type and cholesterol levels. The reduction of cell viability in the group treated both with AB and cholesterol can be resolved with partial inhibition of steroidogenesis.

With this study new in-vitro data about the relationship between cholesterol, P/PS and AB toxicity has been obtained. AB peptides have changed both the cell viability and neurosteroid levels depending on fragment type and cholesterol levels. Consequently, it may be suggested that cholesterol may play a potential key role in AB toxicity by affecting neurosteroid levels in addition to its effects on the formation of AB peptides or amyloid plaques.

Key words: Amyloid beta toxicity, pregnenolone, pregnenolone sulfate, neurosteroid, cholesterol, Alzheimer's Disease

1 **GİRİŞ ve AMAC**

Alzheimer Hastalığı (AH) yaş ile ilişkili, progresif ilerleme gösteren, hafıza kaybı ile sonuçlanan geri dönüşümsüz beyin hastalığı olup batı ülkelerinde 65 yaş üstü ölüm nedenleri arasında dördüncü sırada yer almaktadır. Tüm dünyada 40 milyonun üzerinde demans hastası bulunmakta ve bunların %60-70'ini AH oluşturmaktadır. Toplumun yaşam süresindeki uzamayla birlikte hastalığın görülme sıklığının yükselmesi ülkemizde de AH'nı toplum ve aileler için önemli bir sosyal ve ekonomik problem haline getirmektedir (1, 2).

AH oluşumunda Amiloid beta (AB) üretim ve birikimi nöron kaybı ile sonuçlanan temel mekanizmalardan biri olmakla birlikte hastalığın oluşum mekanizması günümüzde halen net olarak anlaşılamamıştır (3-9).

Son yıllarda ise yüksek kan ve doku kolesterol düzeyinin hastalık patogenezinde merkezi bir role sahip olabileceği ileri sürülmektedir. Bazı klinik çalışmalar ile AH görülme riskinin kan kolesterol yüksekliği ile arttığı ve önemli bir kolesterol transport proteini olan Apo E genindeki E4 mutasyonunun da AH için bir risk faktörü olduğu vurgulanmıştır. Bunun yanı sıra yapılan çoğu çalışmada da kolesterol düşürücü ilaçların hastalık prevalansını azalttığı gösterilmiştir. Hücre içi kolesterolün oksidatif stresi artırarak apoptozu tetikleyebildiği ve hücre canlılığını azalttığı ileri sürülmekle beraber kolesterolün nöronal canlılığı nasıl etkilediği henüz net olarak ortaya konmamıştır (10). Bugüne kadar ileri sürülen kolesterolün patogenezdaki rolü ile ilişkili hipotezlerden biri kolesterolün nöronal hücre membranında amiloid prekürsör protein (APP)'den toksik AB sentezini tetikleyebileceği, diğeri ise kolesterolün AB peptidin fibrillizasyon ve agregasyonu ile amiloid plak oluşumunu artırması yönündedir (11-13).

AB'nın nörotoksik etkilerini oksidatif hasarı tetikleyerek, hücre içi kalsiyumu artırarak, apoptotik ve inflamatuvar süreçleri aktive ederek gösterdiğini ileri süren çalışmalar mevcuttur (14-16). Ayrıca AB'nın sinir sisteminde sentezlenen steroid yapılı hormonlar olarak bilinen nörosteroidlerin (NS) sentezini arttırıp azaltabildikleri de bazı çalışmalar ile vurgulanmıştır (17).

Kolesterolün sinir sisteminin en belli başlı nörosteroidlerinden olan pregnenolon (P) ve pregnenolon sülfatın (PS) öncülü olduğu göz önüne alındığında ve bu iki NS'in doza bağlı nöroprotektif ve nörotoksik etkiler sergileyebildikleri (18-21) bilindiğinden, bu tez çalışması ile mevcut hipotezlerden farklı olarak, AB ve yüksek kolesterol varlığında sinir hücrelerinde P ve PS'nin düzeylerindeki değişiklik ve bunların nöronal hücre canlılığına etkilerinin

araştırılması amaçlandı. Bu şekilde AB toksisitesinin oluşumunda kolesterolün rolüne farklı bir bakış açısı getirilerek in vitro sinir hücre modelinde hücre içi kolesterol değişiminin AB toksisite oluşumu üzerine etkileri değerlendirilebilecektir.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Alzheimer Hastalığı ve Patogenezi

Alzheimer Hastalığı (AH) yaş ile ilişkili, progresif ilerleme gösteren, hafıza kaybı ile sonuçlanan geri dönüşümsüz bir beyin hastalığıdır. AH demans sendromları içinde en sık (%50-70) görüleni olup 85 yaşın üzerindeki bireylerin yaklaşık %40'ını etkilemektedir. 2012 yılı Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre tüm dünyada 40 milyonun üzerinde demans hastası bulunmakta olup bunların %60-70'ini AH oluşturmaktadır. Özellikle gelişmiş batı ülkelerinde yaşam süresindeki uzama ile beraber hastalığın görülme sıklığının artması ülkemizde de AH'nı toplum ve aileler için önemli bir sosyal ve ekonomik problem haline getirmektedir (1).

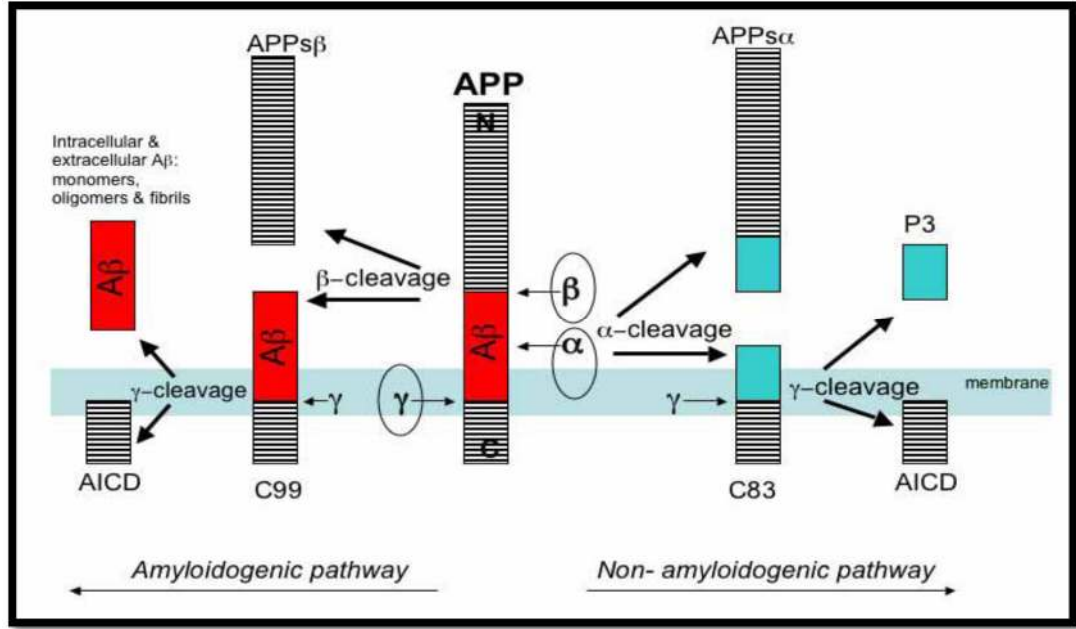
Hastalığın oluşum mekanizması günümüzde halen net olarak aydınlatılamamıştır. Şu an için sadece hastalığın gelişimine eşlik eden bazı nöropatolojik değişiklikler tanımlanmış durumdadır (2-4). Hastalık patogenezinde hücre içi nörofibriller yumak, hücre dışı amiloid plak oluşumu, inflamasyon, glutamat toksisitesi, oksidatif stres, sinaptik hasar ve kolinerjik aktivite kaybı gibi bir çok süreçler yer almaktadır. Bununla birlikte nöronal dokuda oluşan amiloid beta (AB) toksisitesinin temel mekanizma olduğu ileri sürülmektedir. (5-9).

2.1.1 Amiloid Beta Toksisitesi

Amiloid plakların temel bileşeni molekül büyüklüğü 4 kDa olan AB'dır. AB, bir transmembran protein olan amiloid öncül proteinin "Amyloid Precursor Protein"(APP) metabolizma ürünlerinden biridir. Bu ürünün birikimi AH'nın değişmez özelliğidir. Ancak yine de AH'nın patogenezindeki AB'nın oynadığı rol çok az anlaşılmıştır. Hücre kültürlerinde AB'nın nöronlara toksik olduğu gösterilmişse de AH lezyonları ile in vitro aktivite arasındaki ilişki tam olarak aydınlatılamamıştır. AB birikiminin AH'nın gelişiminde primer bir rol mü oynadığı yoksa sekonder bir olayın kalıntıları mı gösterdiği halen tartışılan bir konudur. Ancak AB agregatlarının AH'nın bir sonucu olmasından çok hastalığın sebebi olduğuna dair artan kanıtlar mevcuttur. AB peptidinin aşırı üretimi ve birikimi sonucu potansiyel toksik etkisinin hastalığı başlatıcı ilk faktör olduğu görüşünün kabul edilmesi "**Amiloid Kaskad Hipotezi**" olarak bilinmektedir (14, 15).

APP, "amiloidojenik" ve "amiloidojenik olmayan" olarak isimlendirilen iki alternatif yoldan biri ile proteazlar (α , β ve γ sekretazlar) tarafından proteolitik yıkımla metabolize

edilebilmektedir. AH histopatolojisindeki senil plakların yapı taşı, amiloidojenik yolak hipotezinin kalbi AB; APP'nin β ve γ sekretazlar ile ardışık yıkımı sonucu meydana gelmektedir (Şekil 1) (22).



Şekil 1 : Amiloid prekürsör proteinin (APP) sekretazlar ile kesimi (22)

γ -sekretaz'ın etkinlik gösterdiği kesim bölgesine göre farklı, kısa (39-40 aminoasit) veya uzun (42-43 aminoasit) AB fragmanları oluşabilir. Uzun AB çözünürlüğü olmayan lifler oluşturmaya daha yatkındır ve nörotoksisite olasılığı daha yüksektir. AB 1-40 fragmanı 40 aminoasit kalıntısından oluşan ve en sık (>%60-70) karşılaşılan AB fragmanıdır, suda ve sıvı ortamda nispeten çözünebilir yapıdadır. İkinci en sık (~%15) karşılaşılan form AB1-42 denilen 42 aminoasit kalıntısının tamamını içeren formdur (23-26). AB 25-35 fragmanı ise, 42 aminoasitlik AB peptidin hidrofobik fonksiyonel domain'ine lokalize olan 11 aminoasitlik C terminal peptididir (27). Fibrilar ve toksik fragmandır. AB 25-35 fragmanı AH oluşum mekanizmaları ile ilişkili hayvan ya da hücre hattı kaynaklı deney modelleri için uygun bir araç olarak sıklıkla kullanılmaktadır (28). Bununla birlikte AB 25-35, AB 1-40 ve AB 1-42'ın nörokimyasal ve fonksiyonel etkilerinin farklı olduğu tanımlanmıştır. (16, 17).

2.1.2 Kolesterol ve Alzheimer Hastalığı İlişkisi

AH için kesin olarak tanımlanmış birkaç risk faktörü olmakla birlikte halen üzerinde çalışılan ve hastalık gelişimindeki rolü tamamen aydınlatılamamış faktörler de mevcuttur. İlerlemiş yaş, APP, presenilin 1 (PS1) ve presenilin 2 (PS2) genleri üzerinde meydana gelen mutasyonlar, organik çözücüler, alüminyum gibi bazı toksik ve zararlı durumlara maruziyet AH ile ilişkilendirilen olumsuz bazı risk faktörleridir (29-32).

Son yıllarda kan kolesterol yüksekliği ile AH görülme riskinin arttığı ve kolesterol düşürücü ilaçlar ile hastalık prevalansının azaldığı pekçok çalışma ile gösterilmiştir (33, 34). Düşük dansiteli lipoprotein (LDL) ile birlikte önemli bir kolesterol transport proteini olan Apo E genindeki E4 mutasyonu spoadik veya ailesel AH için bir risk faktörüdür (35, 36). ApoE, plazma ve beyinde kolesterol taşıyan temel apolipoprotein olup bu proteinin mRNA'sı karaciğerden sonra ikinci olarak en fazla beyinde bulunmaktadır. ApoE beyinde primer olarak astrositler tarafından sentezlenmekte ve salgılanmaktadır ayrıca mikrogliya ve nöronlarda da bulunmaktadır. Apo E santral sinir sisteminde (SSS) oluşan bir hasar sonrası nöronal membranın onarımı ve aksonların miyelinizasyonu için gerekli olan kolesterolün salınımını, hücrelere yeniden dağılımını koordine eden bir proteindir (37, 38).

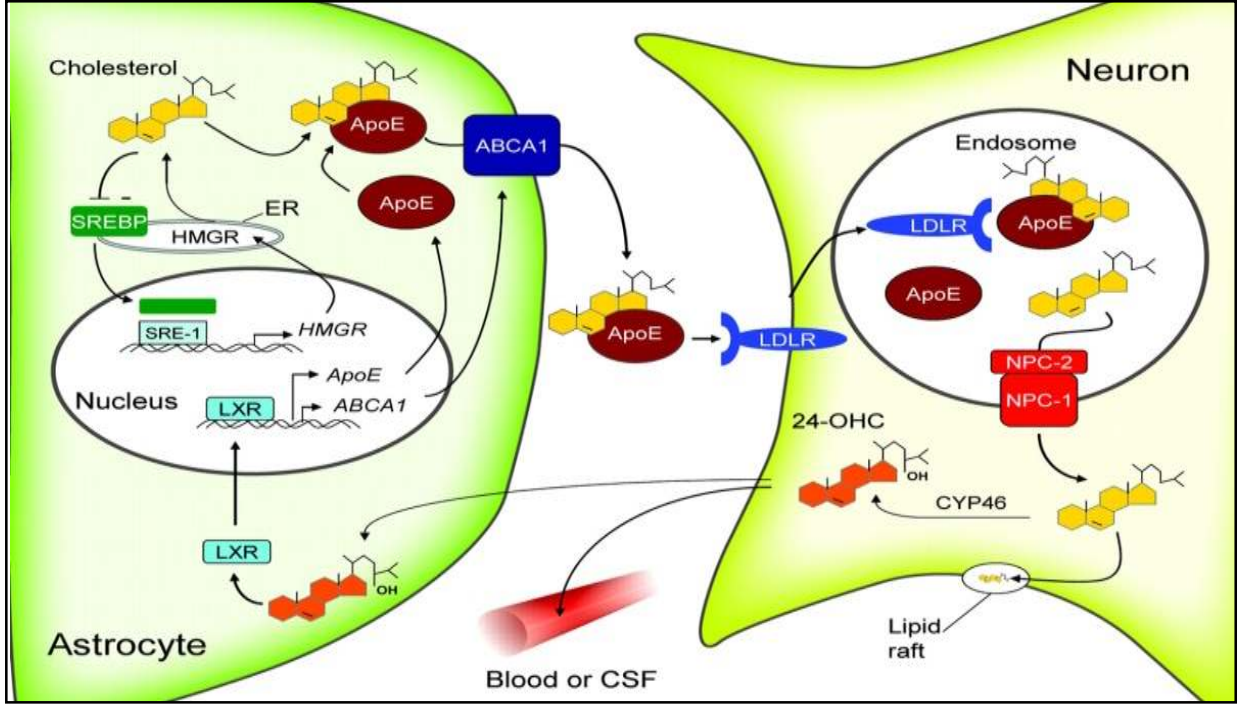
2.1.3 Beyin Kolesterol Metabolizması

Kolesterol ökaryotik hücreler için yaşamsal öneme sahiptir. Plasma membranının major komponentini oluşturarak sifingolipidlerle birlikte membran domainlerinin organizasyonu, endositozun kontrolü gibi intrasellüler sinyal yollarını etkileyebilecek bir platform oluşturabilir.

Beyin dokusu kolesterol kaynağı göz önüne alındığında genel bir yaklaşım olarak kan beyin bariyerinin (KBB) sadece çok az miktarda düşük dansiteli lipoproteinlerin geçişine imkân tanınması nedeni ile plazmadan dokuya kolesterol giriş çıkışının çok düşük miktarda olduğu ve dokuda var olan kolesterolün çoğunun dokunun kendisi tarafından sentezlendiği kabul edilmektedir (39). Hücrelerde kolesterolün çoğu serbest halde hücre membranında yerleşmiş olmasına rağmen çok az bir kısmı endoplazmik retikulum (ER), golgi cisimciği veya hücre çekirdeği gibi bölümlerde yerleşmiştir. Beyin dokusunda hücre içine yerleşmiş

kolesterolün büyük bir kısmı asetil-CoA'dan de novo sentezlenir. Kan beyin bariyerinin olmadığı diğer organlarda kolesterol dolaşımdan, esterleşmiş veya esterleşmemiş olarak LDL reseptörleri (LDLR), B sınıfı tip 1 çöpçü reseptörler (SR-BI) aracılığı ile hücre içine alınmaktadır. SSS'nde ise kan kolesterolü ancak KBB'nin hasarlandığı durumlarda beyin dokusuna geçiş olanağı bulunmaktadır. Diğer taraftan yüksek kolesterol düzeyine sahip bireylerde ise, kolesterolün oksidasyon ürünlerinin artarak kolaylıkla KBB'inden geçebilme olasılığı mevcuttur. Özellikle bir oksi-sterol olan 27 hidroksi kolesterolün KBB'ni kolaylıkla geçebildiği gösterilmiştir (35, 40, 41).

Beyin dokusu içinde astrositlerde sentezlenen kolesterol, Apo E ile konjuge olduktan sonra hücreler arası boşluğa verilmekte, ApoE ile kolesterol nöron membranındaki LDL reseptörleri aracılığı ile nöron içine alınmaktadır. Nöronda endozom içinde bulunan Apo E ile konjuge kolesterol, Apo E'den ayrılarak serbest halde Niemann-Pick-C1-benzeri-protein-1 ve 2 (NPC1L1 ve 2) aracılığı ile endozom içinden nöron sitoplazmasına salıverildiği ileri sürülmektedir. Normal aktivasyona sahip nöron sitoplazmasında kolesterol Cyp46 enzimi ile hidroksillenerek kolaylıkla hücre dışına, kana ve diğer hücrelere dağılıbilir. Dolaşımdan SSS'ne kolesterol geçişi olmamasına rağmen beyinden dolaşıma kolesterol, 24S-hidroksi kolesterol olarak geçmekte ve bunun miktarı da vücutta hareket eden kolesterolün yaklaşık % 0,9'unu oluşturmaktadır (Şekil 2). Kolesterol, konsantrasyon farkına bağlı olarak, 7 α , 24, 25 ve 27 pozisyonlarından hidroksillenerek hücre dışına çıkabilir (42) Kolesterol türevi olan 24 hidroksi ve 27 hidroksi kolesterolün KBB'ni kolaylıkla geçerek beyin kolesterol homeostazisinde etkili olduğu gösterilmiştir (41).



Şekil 2 : Beyin kolesterol sentezi ve metabolizması (43)

Beyin ve vasküler sistemi arasında direkt iletişime açık bazı bölgeler mevcuttur. Sirkum ventriküler organlar olarak isimlendirilen bu bölgeler nörohipofiz, median eminens, subfornikal organ ve lamina terminalisin vasküler organını içermektedir. Bu organlarda bulunan nöronlar ve glial hücreler kandaki hormon, kolesterol ve nörotransmitter benzeri moleküllerin konsantrasyon değişimlerine çok duyarlıdır (44-46). Ayrıca KBB başta AH olmak üzere nörodejeneratif hastalıklarda hasarlanmış durumdadır (47-51). Her ne kadar beyin kolesterolünün ağırlıklı olarak de-novo sentezlendiği kabul edilse de, gerek KBB hasarı ile gerekse hasar oluşmadan önce sirkum ventriküler organlardaki nöron ve glial hücrelerin kolesterol içeriğinin kan kolesterol değişimlerinden etkilenmesi beklenebilir. Ayrıca ApoE4 mutasyonuna sahip AH'lı bireylerde, astrositlerden salınan kolesterol nöronlar tarafından alınamayacağı için, hücreler arası boşlukta kolesterol artışı da beklenen bir durumdur.

AH'a sahip bireylerin beyin dokusunda nöron içi 24 hidroksi kolesterolün, normal bireylere göre azaldığı, 27 hidroksi kolesterolün ise arttığı gösterilmiştir. Ayrıca hücre içinde bulunan kolesterolün diğer bir metaboliti olan PS'ın AH'a sahip kişilerin beyin kortekslerindeki düzeyleri ile AB peptid düzeyleri arasında negatif korelasyon olduğu yapılan postmortem çalışmalar ile vurgulanmıştır (52).

Kolesterolün yan zincirinin koparılması ile başlayan ve bir çok farklı enzimatik basamak ile devam eden katalitik süreç ile “nörosteroidler“ olarak adlandırılan nöral aktiviteyi değiştirebilen metabolitleri oluşabileceği gibi kolesterolün gerek fizyolojik metabolik yollar esnasında gerekse oksidatif hasarla birlikte giden patolojik süreçlerde oksidasyonu ile de “oksisteroller“ olarak isimlendirilen metabolitleri oluşur (53).

2.1.4 Kolesterol ve Amiloid Beta Toksisitesi

Kolesterolün nöronal hücre membranında amiloid prekürsör proteinden toksik AB peptit sentezini tetiklediği ya da oluşmuş olan AB peptitinin fibrillizasyon ve agregasyon eşiğini düşürerek amiloid plak oluşumunu kolaylaştırdığı ileri sürülmektedir (41, 54, 55). Hücre içi kolesterolün konsantrasyon değişimlerinin hücre canlılığını etkileyebileceği ve artışının apoptotik hücre ölümünü tetikleyebileceği gösterilmekle beraber kolesterolün AH'daki rolü tam olarak ortaya konamamıştır. Nöronal AB toksisitesi ile kolesterol düzey artışı arasındaki ilişki henüz açık değildir (56) ancak sinir hücreleri içinde kolesterolden sentezlenen ve nöroprotektif / nörotoksik etkilere sahip steroid yapıları hormonların olası rolü üzerinde durulabilir. AB toksisitesi ve nörosteroid ilişkisini ortaya koymaya çalışan pekçok in vitro çalışmada AB'nin fragmanlarının progesteron sentezi üzerine azaltıcı, P sentezini artırıcı etkileri benzerken DHEA sentezi üzerine etkileri farklı bulunmuş ancak PS sentezi üzerine etkileri ise henüz net olarak açıklanmamıştır (16, 17).

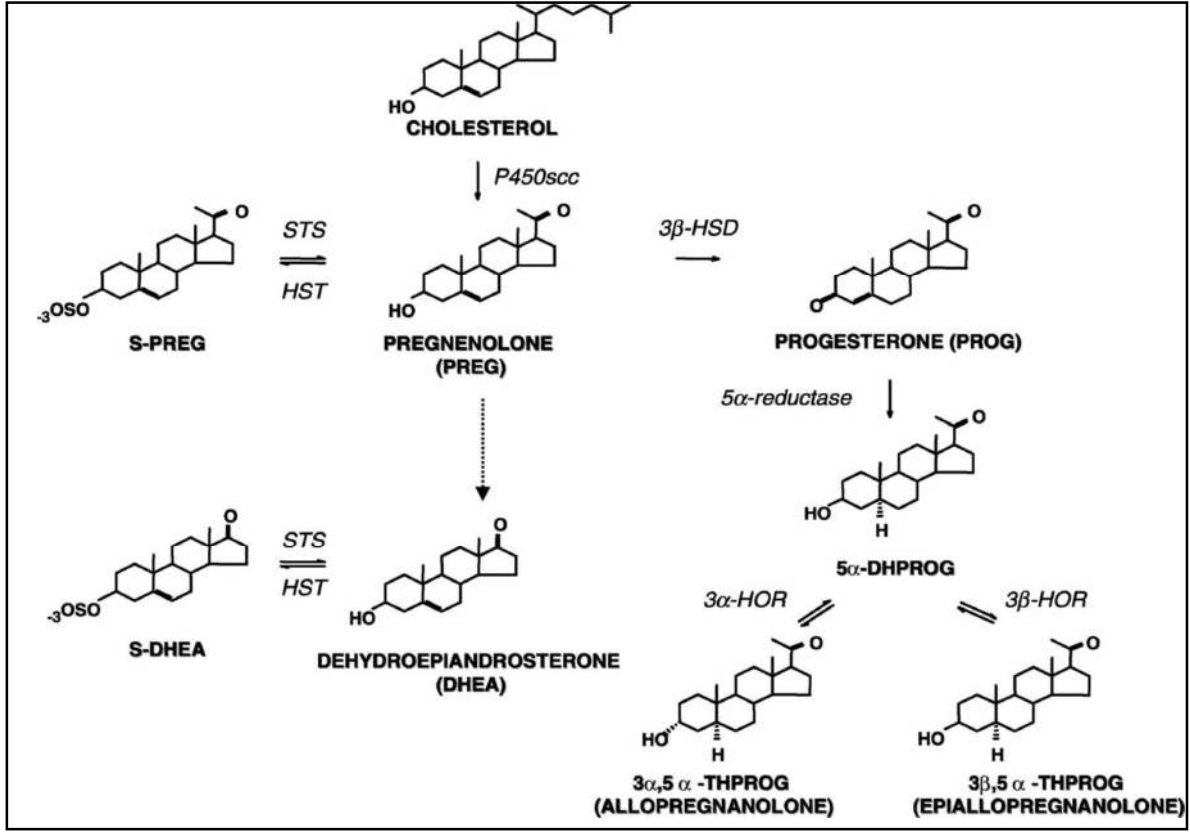
2.2 Nörosteroidler

2.2.1 Tanım

Gonadlar, adrenal korteks gibi endokrin organlardan salgılanan steroid hormonlar lipofilik yapıları nedeniyle kan-beyin-bariyerini kolaylıkla geçip SSS'ne ulaşabilirler. Ancak, bir grup steroid hormon beyinde ya da sinir sisteminde kolesterolden “*de novo*” sentezlenir, periferik kaynaklara ihtiyaç duymaz ve nöral aktiviteyi değiştirebilir. Bu nedenle bu nöroaktif steroidler alışılmışın dışında orjinleri ve farklı fonksiyonları nedeniyle “nörosteroidler” olarak isimlendirilirler (19, 53).

Şekil 3'te nöronal dokuda üretilen nörosteroidlerden (NS) bazıları (Pregnenolon (P), Pregnenolon sülfat (PS), Progesteron (PROG), Dehidroepiandrosteron (DHEA), Dehidroepiandrosteron sülfat (DHEAS), Allopregnanolon (3 α ,5 α -tetrahidroprogesteron),

Epiallopregnanolon ($3\beta,5\alpha$ -THP) gibi görülmektedir (57). Pregnenolone (P) ve pregnenolon sülfat (PS) bu nörosteroidlerin en belli başlılarından (18).



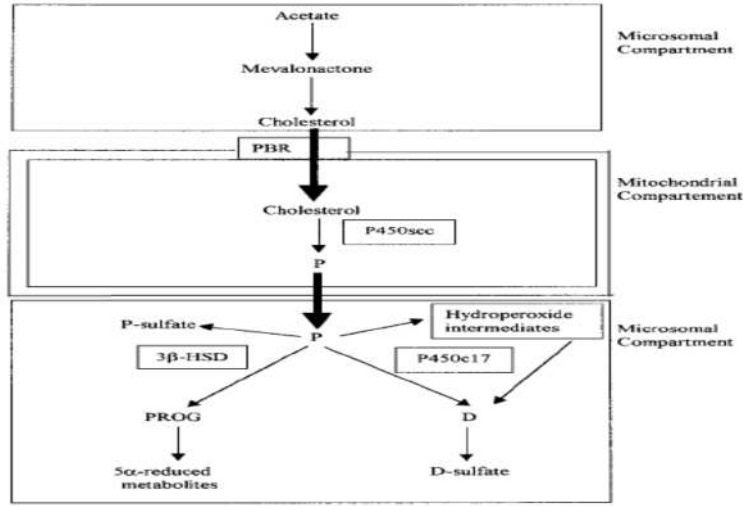
Şekil 3 : Sinir sisteminde üretilen bazı nörosteroidler (57)

2.2.2 Nörosteroidlerin Biyosentezi

Sıçanlarda adrenalectomi ve gonadektomi yapıldıktan (19, 58) ve maymunlarda da adrenal baskılanma sağlandıktan sonra (59) sinir sisteminde steroid hormon varlığının devam etmesi sinir sisteminde steroid sentezini destekleyen pek çok kanıttan biridir. Steroid sentezi kolesterolün pregnenolona dönüşüm basamağı ile mitokondride başlar. Bu basamak sitokrom P450 kolesterol side-chain cleavage (*P450scc*) enzimi tarafından katalizlenir ve tüm steroid hormonlarda olduğu gibi nörosteroidlerin sentezinde de hız kısıtlayıcı basamaktır.

Kolesterolün P'e dönüşümü sağlayan *P450scc* enzimi beyinde beyaz cevherde (60, 61) ve özellikle oligodendrositlerde (62, 63) bulunur. Mitokondri dışı zarındaki periferik benzodiazepin reseptörü (PBR) mikrozomal kompartmanda bulunan kolesterolün iç zara bağlı

P450scc enzim kompleksi ile etkileşime girmesine yardım eder ve mitokondrial kompartmanda kolesterol P'e steroid biyosentez yolağının ilk hız kısıtlayıcı basamağı olan CYP11A (P450scc) tarafından dönüştürülür (Şekil 4). Sentezlenen P mikrozomal kompartmana geçtikten sonra endoplazmik retikulumun 3 β -hidroksisteroid dehidrogenazı (3 β -HSD) ile progesterona okside olur, CYP17 (P450c17) enzimi ile de P'den DHEA oluşur (64). P ve DHEA'nın PS ve DHEAS'a dönüşümü sitozolik enzimler ailesinden hidroksisteroid sülfotransferaz (HST;EC 2.8.2.2) enzimi tarafından katalizlenir. Bu enzim 3'-fosfoadenozin 5' fosfosülfat (PAPS)'ın sülfonat kısmını steroidlerin 3-hidroksi bölümüne transfer eder (20, 65). Pregnenolonun sentezinden sonraki bu basamakların oligodendroglial hücrelerin dışında astrosit ve nöronlarda gerçekleştiği ileri sürülmektedir (16)



Şekil 4 : Steroid sentezinin mikrozomal ve mitokondrial kompartmandaki bölümleri(16)

2.2.3 Nörosteroidlerin Metabolizması

NS'lerin metabolizması yıllardır yaygın olarak incelenmiş olup çoğu çalışma şu an için daha iyi bilinen faz 1 metabolizma yolağına odaklanmış durumdadır (66, 67). Bu yolak pregnenolondan DHEA, PROG, pregnanolon, allopregnanolon, testosteron ve östrojen gibi çeşitli steroidlerin sentezi basamaklarını içermektedir. Diğer taraftan NS'lerin faz 2 metabolizması ise daha az çalışılan yeterince aydınlatılamamış bir yolaktır. Faz 2 olarak adlandırılan metabolizma süreci ise steroidlerin sırasıyla sülfotransferaz (SULT) ve glukuronoziltransferaz (UGT) ile katalizlenen sülfatlanması ve glukuronidasyonu, yani temel konjugasyon reaksiyonlarıdır. Bu enzimlerin izoenzimleri insan, maymun ve rat beyinde gösterilmiştir (68).

Sitozolik sülfotransferazlar hormonlar ve nörotransmitterler gibi küçük endojen bileşiklerin ve aynı zamanda ilaçlar ve ksenobiotiklerin sülfatlanmasından sorumlu enzimlerin bir üst ailesini oluşturmaktadır. Sülfotransferazların SULT2 ailesi tarafından gerçekleştirilen nötral steroidlerin sülfatlanması steroid sentez, taşınma ve metabolizmasında rol oynamaktadır. SULT2 ailesi iki alt familyadan oluşmaktadır. Bunlar, prototipik steroid sülfotransferaz olan SULT2A1 ve SULT2B1'dir. SULT2B1 geni SULT2B1a ve SULT2B1b olmak üzere iki izoform kodlamaktadır. SULT2B1a büyük oranda P'i sülfatlarken, SULT2B1b kolesterolü tercih etmektedir.

NS'ler kısmen sülfat, glukuronid ve yağ asidi esterleri şeklinde bulunur. Ester formları sıkça serbest steroidlerin konsantrasyonuna eşit veya daha fazladır. Serbest 3 β hidroksi steroidler (P, DHEA) ve bunların sülfat esterleri belirgin biyolojik aktivite gösterirken sinir dokusunda diğer ester formlarının aktivitesiyle ilgili çok az şey bilinmektedir (64). Kemirgen beyninde glukuronidlerin varlığının gösterilmesi glukuronidasyonun NS metabolizmasında önemli bir rol oynadığını düşündürmekte ve sinir sisteminde bu konjugasyon şeklinin incelenmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır (68).

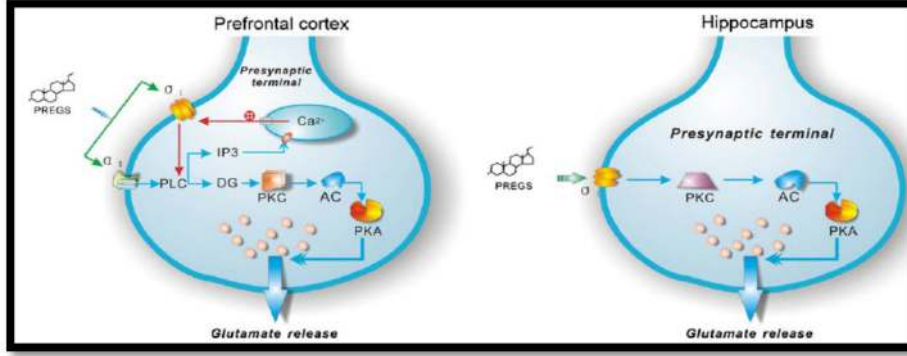
2.2.4 Nörosteroidlerin Etki Mekanizmaları - Nöroaktif steroidler

Nörosteroidler sinir sisteminde aktif nörotransmitter rolü oynamaları nedeni ile "nöroaktif steroidler" olarak adlandırılabilirler. Nöroaktif steroidler (NAS), sentez edildikleri yerden bağımsız olarak, nöral aktiviteyi değiştirebilen hormonlar olup (69) SSS içerisinde klasik/genomik ya da hızlı/genomik olmayan yollar üzerinden etki gösterirler (70).

Nörosteroidler genomik etkilerini klasik steroid hormonlar gibi hücre içi steroid reseptörlerine bağlanarak spesifik genlerin ekspresyonunun artması şeklinde gösterirler. Bu etkiler transkripsiyon ve bunu takiben protein sentezi için translasyonu içeren bir süreçte gerçekleştiğinden saatler hatta günler içinde ortaya çıkar. Genomik olmayan sinyal iletimi ise NS'lerin gama amino bütirik asit (GABA_A), N-metil D-aspartat (NMDA), sigma 1 gibi çeşitli postsinaptik reseptörleri ve bir çok ligand-kapılı ve voltaj bağımlı iyon kanallarını modüle etmeleri ile saniye veya milisaniye içinde gerçekleşir (67, 71).

NS'lerin reseptörler üzerine etkilerine ek olarak çoğu NAS'ın glutamat, GABA, asetilkolin, norepinefrin, dopamin ve serotonin (5-HT) gibi çeşitli nörotransmitterlerin salınımı üzerine düzenleyici etkileri de vardır. Bu etkilerin çoğu beyin öğrenme, hafıza,

duygu durum ve bilişsel yeti ile ilgili alanlarında ortaya çıkar. Şekil 5'te bir örneğini gördüğümüz gibi PS prefrontal korteks ve hippocampusta glutamat salınımına yol açmakta ve bu yolla çeşitli etkiler göstermektedir (72).



Şekil 5 : PS'nin prefrontal korteks ve hippocampusta glutamat salınımına etkisi (72)

2.2.5 Nöroaktif Steroidlerin Sinir Sistemindeki Fizyopatolojik Süreçlerdeki Rolü

Nörotransmitterlerin ve modülatörlerin metabolizmasının aydınlatılması beyin fonksiyonlarını anlamamızdaki anahtar noktadır. NS'ler nöromodülatörlerin önemli bir sınıfı olup pek çok beyin fonksiyonunu düzenleyen nöron-nöron haberleşmesini aktive veya inaktive edebilirler (68).

NAS'lerin ister sinir dokusunda de novo sentezlensin ister periferik endokrin bezlerden kaynaklansın yada sentetik yapıda olsun beyin fonksiyonları ve hastalıkları üzerine önemli modülatör etkileri vardır.

Endokrin organlarda yapılabildiği kadar kolayca KBB'ni geçen steroid hormonların beyin büyümesinde, gelişmesinde ve olgunlaşmasında önemli görevler üstlendiği yıllardır bilinmektedir (67). Progesteron, östradiol ve testosteron gibi bu hormonların 5HT-3 reseptörlerinde, ligand kapılı iyon kanallarında ya da farklı glutamat reseptörlerinde işlevsel antagonist olarak davranan birer NAS oldukları belirtilmektedir (73). Buna ek olarak SSS'de sentezlenen NS'lerin gelişim sırasında veya yetişkinlerde yokluğu veya azalmış konsantrasyonları nörogelişimsel, psikiyatrik ya da davranışsal bozukluklar ile ilişkili bulunmuş ve bu bileşikler ile fizyolojik ya da farmakolojik dozlarda tedavinin de nörogenezi, nöronal yaşam süresini, miyelinizasyonu, hafızada artışı ve nörotoksitede azalmayı sağlayabildikleri gösterilmiştir (20).

Fizyolojik koşullar altında NAS'lar strese cevap, seksüel ve beslenme davranışı, duygu durum, hafıza ve bilişsel yeti gibi yaygın davranışsal fonksiyonlar üzerine etkilidir. NAS'lerin davranış biyolojisinden, bilişsel performans ve hafızayı içine alan değişik etkilerinin dışında, hücrelerin nöral yollarda çoğalma ve farklılaşması, gelişim ve yaşlanma süreci ile miyelinizasyon üzerine trofik etkilere, dendritik sinaps, sinaptogenez ve nörit gelişimini tetiklemesine kadar uzanan çok geniş, oldukça karmaşık ve önemli etkilere sahip oldukları düşünülür (19, 64, 66, 74).

Patofizyolojik durumlarda NAS'lar; epilepsi, premenstrüel sendrom (PMS), şizofreni, depresyon, anksiyete, alkol bağımlılığı, multiple skleroz (MS) ve diğer nörodejeneratif hastalıklar gibi nörolojik ve psikiyatrik bozuklukların oluşumunda ve tedavi süreçlerinde önemli rol oynarlar. Nöroprotektif, sedatif, hipnotik, anksiyolitik, anestetik, antikonvülzan, antipsikotik, antidepresan ve uyku düzenleyici etkilerini inceleyen çeşitli çalışmalar da mevcuttur (71). Bu etkilerin bazılarını ligand kapılı iyon kanalları ailesinden olan GABA_A reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirmektedirler (74).

Nöroaktif steroidlerin sinir gelişimindeki koruyucu ve geliştirici özellikleri; nöronların ve glial hücrelerin hayatta kalımı ve farklılaşması, myelin proteini sentezi, PROG'un genomik etkisi ile miyelinizasyon, sinir sistemi onarımı - remyelinizasyon, serebellar gelişimde purkinje hücrelerinde dendritik büyüme ve sinaptogenez gelişimi, oligodendrosit farklılaşması, olgunlaşması, neokorteks yapılanması, oksidatif stres, eksitotoksik hasar, anoksiye karşı nöronların korunması şeklinde özetlenebilir (64, 67, 75).

3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Araştırmanın Tipi

Çalışma deneysel nitelikte in vitro bir çalışmadır.

3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Deneyler Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda Haziran 2011-2013 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.

3.3 Araştırma Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Çalışmamızda sıçan ve insan kaynaklı iki ayrı nöronal hücre kültür hattı (PC-12 ve SHSY-5Y) kullanılarak farklı deney modelleri oluşturuldu.

I- AB toksisitesi ve toksisitenin hücre canlılığı ve P / PS düzeylerine etkisi

II- Kolesterolün AB toksisitesi üzerine etkisi

III- Kolesterol ve 3 farklı AB fragmanının P / PS düzeyleri üzerine etkisi

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

3.4 Çalışma Materyali

Çalışmamızda AB peptit toksisitesi ile ilişkili hücre kültürü modellerinde sıklıkla kullanılan ve nöroendokrin karaktere sahip olduğu gösterilen iki ayrı hücre hattı (PC-12 ve SHSY-5Y hücre hatları) kullanıldı (76-79). Hatlar ticari olarak DSMZ (DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN) hücre kültür bankasından sırasıyla DSMZ ACC159 ve DSMZ ACC209 kodu ile temin edildi.

3.5 Araştırmanın Değişkenleri

Bu araştırmanın değişkenleri:

- Nörosteroid seviyeleri, hücre canlılık düzeyleri (bağımlı değişken)
- AB/kolesterol düzeyleri (bağımsız değişken)

3.6 Veri Toplama Araçları

3.6.1 Kullanılacak mevcut makine – teçhizat listesi

Çalışmamızda kullanılan cihazlar ve kimyasal malzemeler tablo 1 ve 2'de listelenmiştir.

Tablo 1 : Çalışmada kullanılan cihazlar

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

Tablo 2 : Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler

KİMYASAL MALZEME ADI	ÜRETİCİ FİRMA-KOD
Pregnenolon	Fluka 81630 / Sigma P 9129
Pregnenolon Sülfat	Sigma P 162
Aminoglütetimid (AMG) (Enzim inhibitörü)	Sigma A-123
2,4 Dichloro-6-Nitrophenol (DCNP)	Fluka 36065
Ultra saf su	Biochrom L0020
Asetik asit	Merck K24209656 728
Etanol	Riedel-de Haen 32221
Metanol	Riedel-de Haen 34860
Fetal sıgır serumu (FBS)	Biochrom S01115
Donör at serum (DHS)	Biochrom S9133
RPMI 1640	Invitrogen 21875034
Sıgır serum albumin (BSA)	Thermo 23209
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma D 5796
Poli D Lizin	Sigma P1149
PBS (phosphate buffered saline)	Biochrom L1815
MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)	Appllichem A2231,0001
Amiloid beta fragman 25-35	Sigma A4559
Amiloid beta fragman 1-40	Sigma A1075
Amiloid beta fragman 1-42	Sigma A9810
BCA Protein kiti	Pierce 23225
DMSO (Dimetil sülfoksit)	Sigma D2650
Anneksin V-FITC Apoptosis kiti	BD Pharmingen 556547

Kolesterol	Sigma C 3045
Hoechst 33342 (HO) boyası	Thermo Scientific Pierce Fluorescent Stain
Trypsin-EDTA	Biochrom L2143
Penisilin/Streptomisin	Biochrom A2210
Triton X-100	Sigma T 8787

3.6.2 Hücre Kültürü

Çalışmamızda AB peptit toksisitesi ile ilişkili hücre kültürü modellerinde sıklıkla kullanılan ve nöroendokrin karaktere sahip olduğu gösterilen iki ayrı hücre hattı kullanıldı (76-79). Bunlar;

PC-12 Sıçan feokromasitoma hücre hattı: Adrenal bezin medullasından köken alan tek hücre klonu olan nöral krestten köken alan nöroendokrin özelliğe sahip kromaffin hücrelerden gelişen bir tümör olan feokromasitoma kaynaklı hücre hattı.

SHSY-5Y İnsan nöroblastoma hücre hattı: Esas olarak sempatik sinir sistemi ve adrenal bezin medullasında bulunan embriyonik nöral krestten kaynaklanan primitif, pluripotent sempatik hücrelerden köken alan insan nöroblastoma hücre hattı.

PC-12 hücrelerinin tutunmalarını kolaylaştırmak amacıyla kültür kaplarının yüzeyleri kullanım öncesi poli-D-lizin (10 µg/mL) ile kaplandı. Büyüme ortamı olarak PC-12 hücreleri için %10 DHS, %5 FBS ve %1 penisilin-streptomisin içeren RPMI 1640 ortamı kullanıldı. SHSY-5Y hücreleri için ise %17 FBS ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM ortamı kullanıldı. Deneylere geçmeden önce hücreler %70-80 sıklıkta oluncaya kadar hücre sayısının iki katına çıkma süresine göre (katlanma zamanı) ~ 2-3 günde bir %15-%17 serum içeren kültür ortamları ile beslenerek nemli atmosfer ve %5 CO₂ basıncı altında 37 °C’de inkübatör içinde tutuldu. PC-12 ve SHSY-5Y hücreleri %70-80 sıklıkta olunca pasajlanarak deneyler için uygun 96’lı/6’lı hücre kültür kaplarına her kuyucukta 1-2x10⁴ veya 1-2x10⁶ yoğunluğunda hücre sayısı olacak şekilde ekildi. İlk 18-24 saat boyunca hücreler plak yüzeyine yapışabilmeleri için %15, %17 serumlu ortam, nemli atmosfer, %5 CO₂ basıncı altında 37 °C’de tutulduktan sonra hücrelerin deneyler süresince çoğalmasını yavaşlatmak ve serumun içerebileceği koruyucu faktörlerin etkisinden kurtulmak amacı ile, kültür kapları

içindeki ortamların yarısı çekilip atılarak (96 kuyucuklu kap için 1 mL, 6 kuyucuklu kap için 100 µL) aynı oranlarda %1.5 veya %1.7 serum içeren ortamlar (deney koşuluna göre uygun konsantrasyonda hazırlanmış olan kimyasal solüsyonlar) ile değiştirildi.

3.6.3 AB Peptit Toksisitesi

AB25-35, AB1-40 ve AB1-42 peptit solüsyonlarının hazırlanması: Ultra saf su ve DMSO kullanılarak AB fragmanları stok solüsyonları hazırlandı, stok solüsyonlar tükeninceye kadar -20°C’de saklandı. PC-12 ve SHSY 5Y hücreleri için sırası ile %1.5 ve %1.7 serum içeren ortamlar ile seri seyreltmeler yapıldı. Uygun konsantrasyonlardaki solüsyonlar her deneyden önce taze olarak hazırlandı.

AB peptidinin yapılan ön deneyler ile kontrol grubuna göre ~ %50 canlılığı azaltan konsantrasyonu toksisite uygulama dozu olarak belirlendi. PC-12 hücreleri ve SHSY5-Y hücreleri için sırası ile AB 25-35 fragmanı (20/40 µM), AB 1-40 (2,5/5 µM)ve AB 1-42 (2,5/10 µM) konsantrasyonlarda uygulandı. Fragmanlar PC-12 hücrelerine direkt olarak verilirken, SHSY5-Y hücreleri için 37°C 72 saat inkübe edilerek pre-agrege edildikten sonra hücre kültür ortamına eklendi. Eklenen tüm AB fragmanları 37°C’de hücreler ile 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edildi.

Amiloid beta nöronal toksisite modeli oluşturulurken stok solüsyonunun hazırlanmasında kullanılan DMSO’nun hücrelere toksik etki oluşturmaması için son konsantrasyonu <%0.5 olacak şekilde hesaplanarak uygulandı. Ayrıca hücrelere %2, %1, %0.5, %0.25 ‘lik DMSO uygulaması yapılarak hücre canlılığı değerlendirildi ve kontrol grubuna göre % 1 ve altında DMSO uygulaması ile hücre canlılığında anlamlı bir fark saptanmadı.

3.6.4 Hücre İçine Kolesterol Geçişinin Sağlanması

In vivo koşullar için normo-kolesterolemik ve hiperkolesterolemik durumu temsil ettiği düşünülerek kolesterolün uygulama dozu 1,2 mM ve 9 mM olarak belirlendi. Kolesterol etanol (% 0.1) ile suda çözünebilir hale getirildikten sonra hücre içine geçişini kolaylaştırmak için hücre kültür ortamına 50 µg/mL LDL ile birlikte eklendi (12, 80). Kolesterol ile muamele edilen hücrelerdeki kolesterol geçişi, 24 saatte bir 72 saat süresince hücre lizatlarında ve

kültür ortamında total kolesterol miktarının HPLC metodu ile saptanması ile doğrulandı (81-83). Tek başına etanol ve LDL eklenmiş hücreler kontrol olarak ayrıca değerlendirmeye alındı.

3.6.5 Kolesterol ve AB Peptit Uygulamasının P ve PS Düzeylerine Etkisinin Belirlenmesi

PC-12 hücre hattı için 2×10^6 , SHSY-5Y hücre hattı için 1×10^6 hücre ayrı ayrı 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekildi. Hücrelere uygulanan kolesterol ve AB peptidin steroid düzeylerine etkisini belirlemek için inkübasyon süresinin sonunda ortamlar uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin parçalanması ve steroidlerin serbest kalması için hücre zar bütünlüğünü bozacak ve hücre içindeki bu steroidleri çekitleyip, saflaştıracak ön işlemler kullanıldı. Triton X-100 ile parçalanarak içerikleri hekzana çekitlenen örnekler azot gazı altında uçurulduktan sonra analiz öncesi metanol ile çözülerek HPLC'ye enjekte edildi.

Çalışmamızda hücre hatlarına uygulanan kolesterolün ve AB peptidin, P ve PS düzeylerine etkisini saptamak amacıyla HPLC yöntemi kullanıldı (84, 85). PS düzeyi ölçümü steroid sülfatların non-polar bileşiklerle kontamine olma riski yönünden, optimum koşullarda ve standardize edilerek yapılan solvoliz yöntemi ile sülfat grubu ayrıldıktan sonra total P ölçümü üzerinden indirekt olarak hesaplandı (84). Pregnenolon sülfat (PS), enzimatik solvoliz işlemi ile sülfat grubunun uzaklaştırılmasından ($15 \mu\text{L}$ aril sulfataz ile 40°C 'de gece boyu inkübasyon) sonra tekrarlanan P analizi ile in-direkt olarak belirlendi. Tüm koşullar için elde edilen her bir örnek (hücre lizatı ve hücre kültür ortamı) eşit hacimde ikiye bölünerek P ve PS analizleri ardışık olarak gerçekleştirildi ve böylece hücre ekimi, örnek toplama, lizat eldesi vb ön işlemlerden kaynaklanabilecek farklılıkların önüne geçilmesi hedeflendi.

HPLC analizi ile farklı uygulama koşullarının hücre kültür ortamlarında eş zamanlı kolesterol ve pregnenolon düzeyine etkisini belirleyebilmek için ön çalışmalar sırasında analiz koşullarını oluştururken pek çok farklı mobil faz içeriği denendi ve her bir analit için eş zamanlı kalibrasyon yapıldı (Şekil 6 ve 7). Bu şekilde tek bir çalışmada hem kolesterol hem de pregnenolon pikini görebilmek mümkün oldu (Şekil 8).

Kolesterol ve pregnenolone ölçümleri her iki hücre hattı için aşağıda belirtilen koşullarda gerçekleştirildi.

Analiz Koşulları:

Kolon: 4.6x250mm C18 kolon

Mobil faz: Metanol/Asetik asit (v/v: 1x10⁴/1)

Mobil faz akış hızı: 2 mL/dk

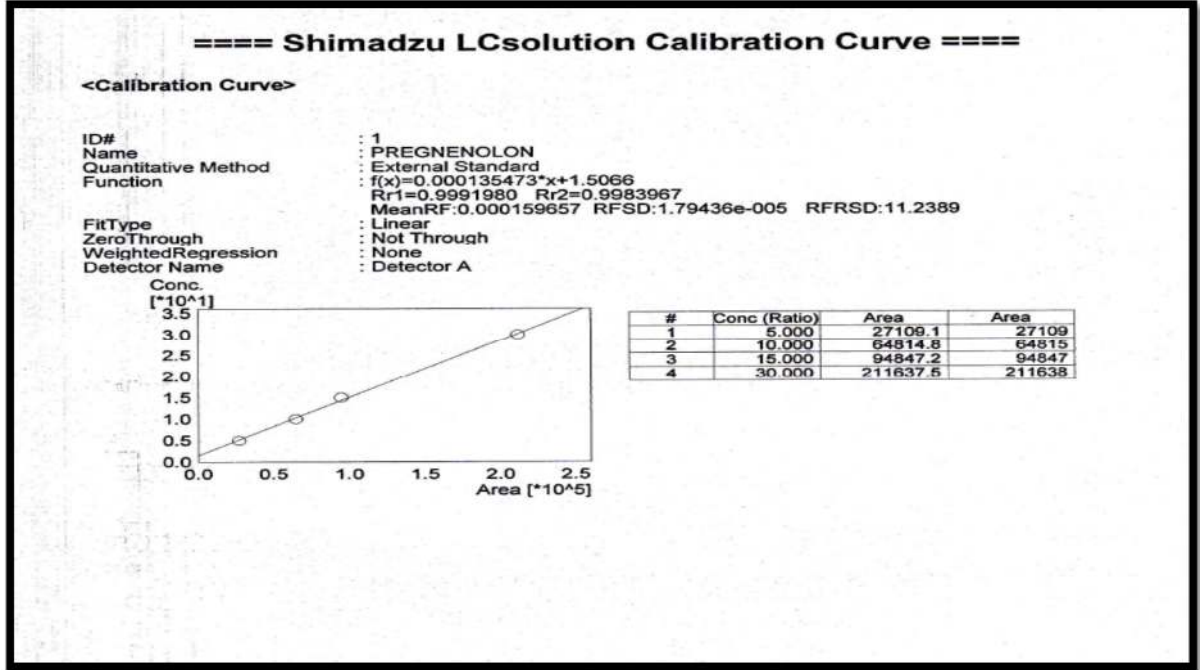
Stop Time : 18 dk

Fırın sıcaklığı: 30 °C

Dedektör: UV-VIS dedektör, 200 nm

Standart için çözgen: MetOH

Enjeksiyon volümü: 100 µL

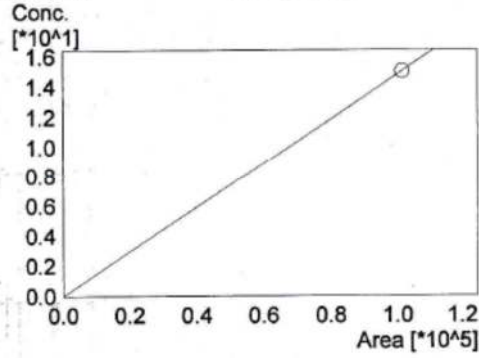


Şekil 6 : Pregnenolone standart eğrisi

==== Shimadzu LCsolution Calibration Curve ====

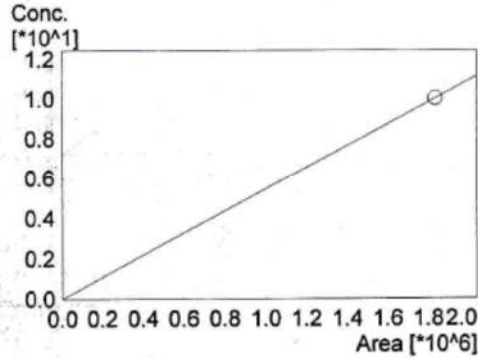
<Calibration Curve>

ID# : 1
 Name : PREG
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=0.000147823 \cdot x+0$
 $Rr1=1.0000000$ $Rr2=1.0000000$
 MeanRF:0.000147823 RFSD:0 RFRSD:0
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 WeightedRegression : None
 Detector Name : Detector A



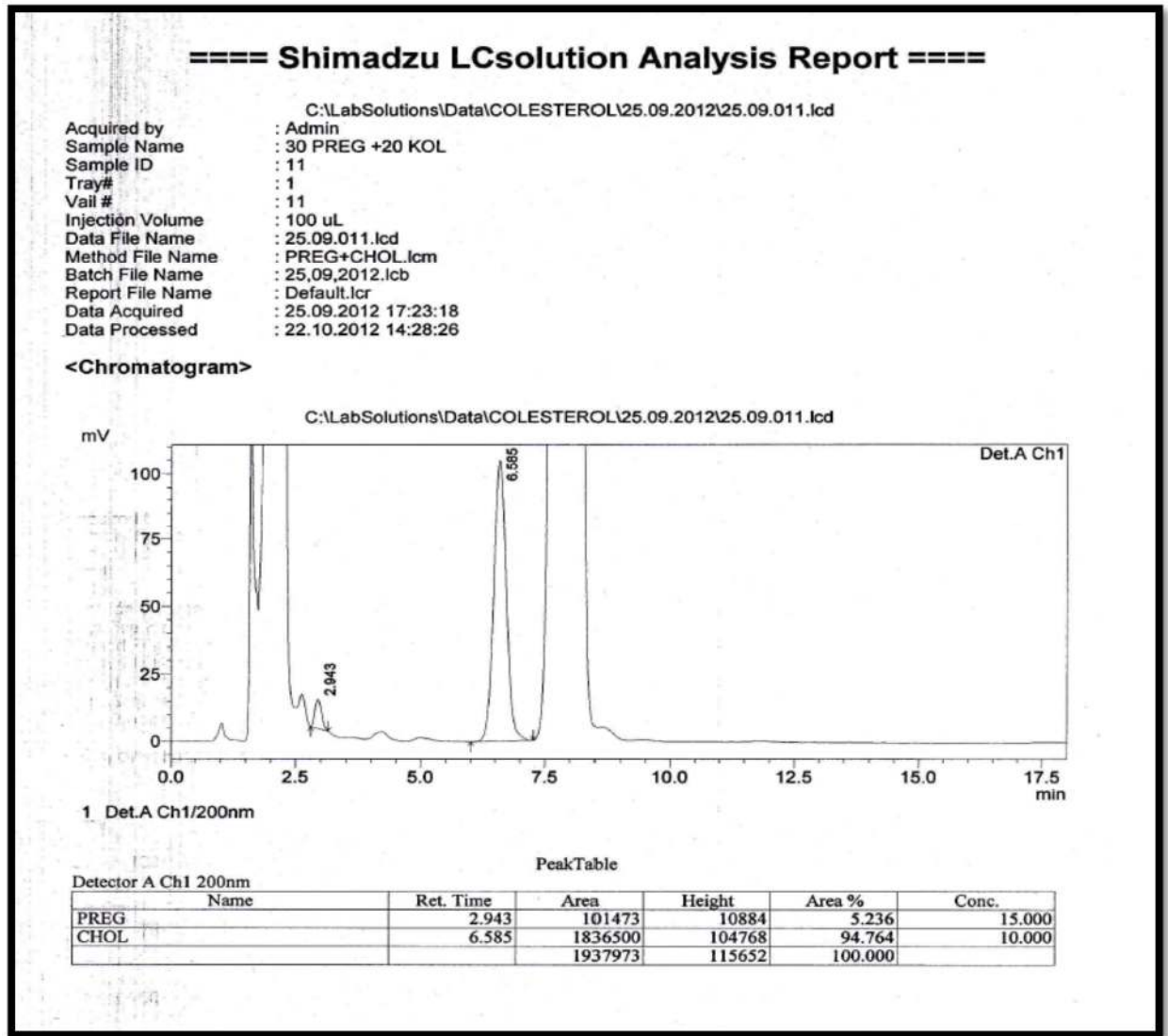
#	Conc (Ratio)	Area	Area
1	15.000	101472.9	101473

ID# : 2
 Name : CHOL
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=5.44514e-006 \cdot x+0$
 $Rr1=1.0000000$ $Rr2=1.0000000$
 MeanRF:5.44514e-006 RFSD:0 RFRSD:0
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 WeightedRegression : None
 Detector Name : Detector A



#	Conc (Ratio)	Area	Area
1	10.000	1836500.4	1836500

Şekil 7 : Kolesterol ve pregnenolon için eş zamanlı oluşturulan standart eğriler



Şekil 8 : Kolesterol ve pregnenolonun kromatogramı

3.6.6 Hücre Canlılık Testleri

Kolesterol ve AB peptit uygulamalarının hücre canlılığına etkisi ve oluşan hücre ölüm tipi sırasıyla MTT testi, Hoechst 33342 (HO) boyası ve Akış sitometrik Annexin-V/PI boyama analizi ile değerlendirildi. Kullanılan yöntemler aşağıda özetlenmiştir;

MTT Hücre Canlılık Testi:

3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) redüksiyonu yöntemiyle bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem sağlam hücrelerde mitokondrinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu reaksiyon mitokondrial bir enzim olan süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağlıdır. Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Plak kuyularına son konsantrasyon 0.5 mg/mL olacak şekilde MTT stok solüsyonu (5 mg/mL) eklenip, 37°C’de %5 CO₂, %95 hava içeren inkübatörde 3.5 saat (1-5 saat) bekletildi, 1250 rpm hızda 5 dakika santrifüj edildikten sonra üst faz atılarak MTT metabolizma ürünü olan formazan kristallerini solubilize duruma getirmek için tüm kuyulara 200 µL dimetil sülfoksit (DMSO) eklendi ve 37°C’de 30 dakika bekletildi, ELİSA plak okuyucusunda 590 nm’de absorbanları okutularak %canlılık hesaplandı.

Hoechst 33342 (HO) boyası ile Floresan Mikroskopik İnceleme:

Apoptotik hücre ölümünde kromatin kondenzasyonun saptanması apoptotik hücrenin tanımlanmasında hızlı duyarlı bir yöntem olarak belirtilmektedir. Mavi floresan Hoechst 33342 boyasının DNA’ya bağlandığında eksitasyon/emisyon dalga boyları 350/461 nm dir ve apoptotik hücrenin kondanse olmuş kromatinlerine bağlanarak apoptotik olmayan hücreye göre çok daha parlak mavi renk verirler. Çalışmamızda ters-faz mikroskop ile Hoechst 33342 boyası kullanılarak apoptotik hücreler görüntülendi. Yöntemin etkinliğini test etmek için "pozitif kontrol" olarak “staurosporine” kullanıldı.

Akış Sitometrik Analiz:

Akış sitometrik Annexin-V/PI analizi ile canlı, apoptotik ve nekrotik hücre yüzdeleri saptandı. Plazma membran fosfolipidleri membranın iç ve dış yüzüne doğru asimetrik dağılım göstermektedir. Canlı hücrelerde bir plazma fosfolipidi olan fosfatidilserin genellikle membranın iç yüzünde yerleşim göstermektedir. İç membranda bulunan fosfatidilserin'in dış membran yüzüne dönmesi apoptozu tanımlayan ilk olaylardan biri olarak tanımlanmaktadır. Kalsiyum bağımlı bir fosfolipid bağlayıcı protein olan **Annexin V**’in fosfatidilserin gibi negatif yüklü fosfolipidlere yüksek afinitesi bulunmaktadır. Bu nedenle bu proteinin bir

fluorosan madde ile çiftlendirilmesi plazma dış membranında bulunan fosfatidilserinin saptanmasına olanak sağlamaktadır. Fosfatidilserin'in dış yüzeye translokasyonu sadece apoptotik'e spesifik değildir aynı zamanda nekrotik hücre ölümünde de görülmektedir. Ancak apoptotik/nekrotik hücre ölümünün ayırımı Annexin V-FITC ve PI'in birarada kullanılmasıyla akış sitometrisinde yapılabilmektedir. Apoptotik olmayan hücreler Annexin V (-) / PI (-), erken apoptotik dönemde olan hücreler Annexin V (+) / PI (-), geç apoptotik ve nekrotik hücreler Annexin V (+) / PI (+) boyanma özelliği göstermekte ve hücre ölüm tipinin belirlenmesi mümkün olmaktadır (86, 87).

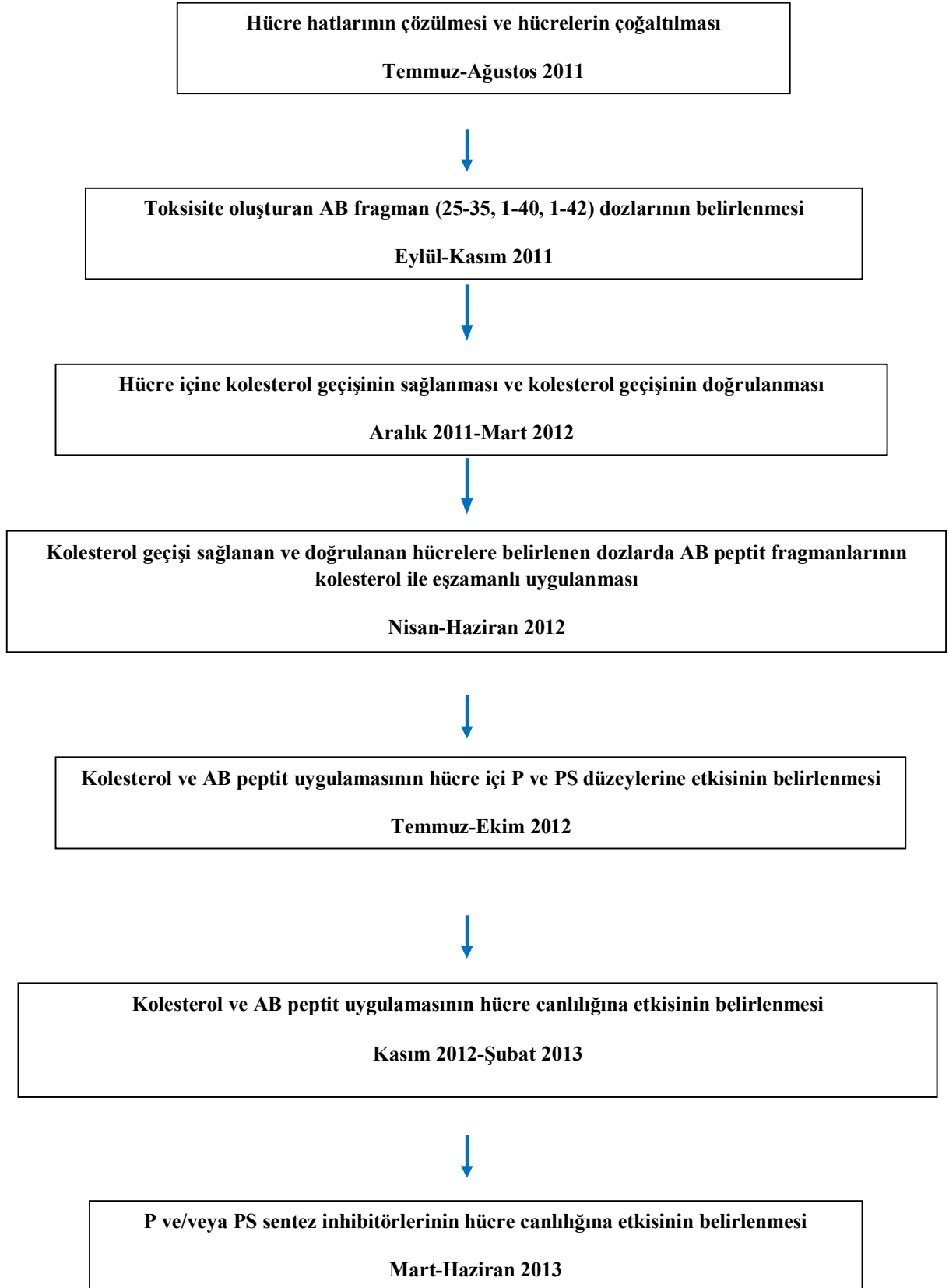
Protein Analizi:

Total protein konsantrasyonu Bisinkoninik Asit (BCA) yöntemi ile kolorimetrik olarak saptandı. Yöntemin prensibi alkali ortamda protein tarafından Cu^{+2} iyonunun Cu^{+1} iyonuna indirgenmesine (Biüret reaksiyonu) ve bisinkoninik asit içeren tek bir reaktif kullanarak Cu^{+1} 'in renk değişiminin ölçülmesine dayanır. 2 mg/mL konsantrasyonda olan sığır serum albumin (BSA) kullanılarak 25-1500µg/mL konsantrasyon aralığında standart eğrisi hazırlandı. Bisinkoninik asit ve %4 bakır sülfat içeren çalışma solusyonu ile 30 dakika 37°C'de inkübe edilmesinden sonra absorbanslar 562 nm'de okundu. Standart eğrisine göre her örneğin içerdiği protein miktarı belirlendi.

3.6.7 P ve PS Sentezindeki Değişimlerin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin İncelenmesi.

Steroid sentezinin ilk hız kısıtlayıcı enzimi olan, kolesterolün pregnenolona dönüşümü basamağını katalizleyen sitokrom P450 kolesterol side-chain cleavage enziminin (P450_{scc}; CYP11A) inhibitörü aminoglutetimid (AMG) 0,75 mM (88, 89) ayrıca P'un PS'a dönüşümünü sağlayan hidroksisteroid sülfotransferazı (HST) inhibe eden 2,4-dikloro-6-nitrofenol (DCNP) 1µM dozda (65) 72 saat boyunca hücrelere uygulandı. Steroid sentez inhibitörlerinin hücre canlılığına etkisi yukarıda anlatılan hücre canlılığı testleri ile belirlendi.

3.7 Araştırmanın Planı ve Takvimi



3.8 Verilerin Değerlendirilmesi

Oluşturulan tüm deney koşulları en az üç farklı zamanda ve çalışma içi en az üç kez tekrarlanarak çalışılmıştır. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS 16.0 yazılımı kullanılarak gruplar arası karşılaştırmalarda Kruskal-Wallis testi ve Mann Whitney-U testi kullanılmıştır. p değeri 0.05'in altında olanlar anlamlı kabul edilmiştir.

3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları

Sıçan ve insan kaynaklı iki ayrı nöronal hücre hattı (PC-12 ve SHSY-5Y) kullanarak yaptığımız bu in vitro çalışma ile elde edilen veriler oldukça kıymetli olmakla birlikte in vivo ve klinik çalışmalar ile desteklenmelidir. Bundan sonra planlanacak yeni in vitro çalışmalarda beyin dokusu kolesterol metabolizmasında oldukça önemli astrosit ve glia hücreleri de dikkate alınarak tek başına nöronal hücreler üzerinde deney modelleri kurulmamalı ko-kültür çalışmaları ile daha ayrıntılı bilgiler edinilmelidir.

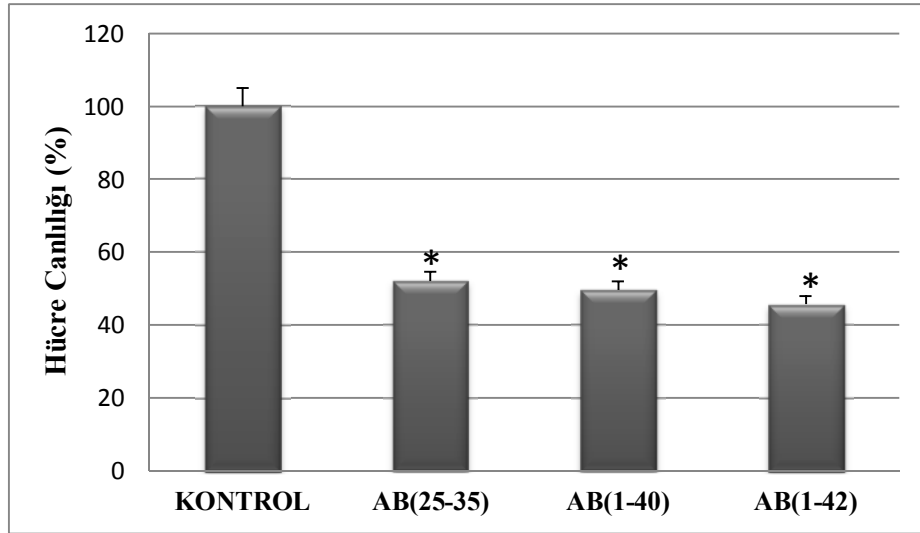
3.10 Etik Kurul Onayı

Bu çalışma 2011 yılında Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 192-GOA protokol numarası ile onaylanmıştır (Ek-1).

4 **BULGULAR**

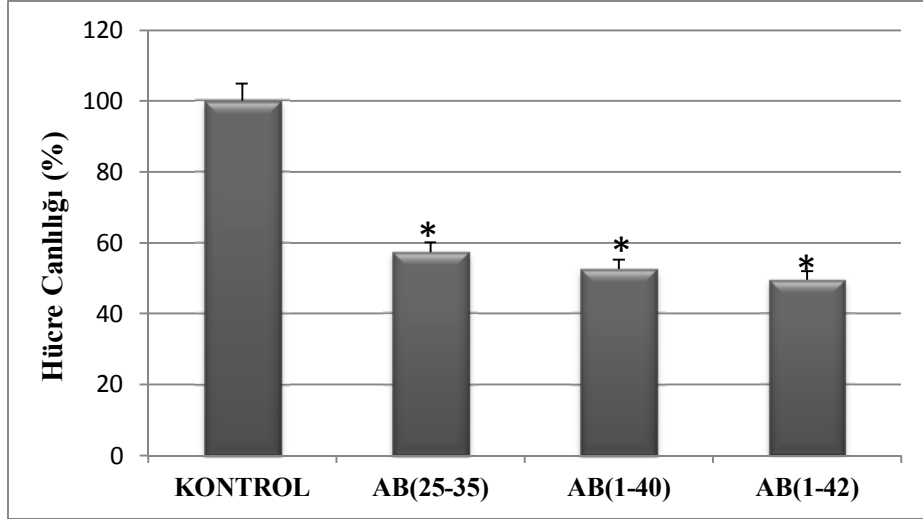
4.1 **Nöronal Hücrelerde AB Peptid Toksisitesi**

PC-12 hücrelerine 72 saat boyunca 20 μ M AB 25-35, 2,5 μ M AB 1-40 ve 2,5 μ M AB 1-42 uygulanması sonucu MTT redüksiyonu yöntemi ile değerlendirme sonucu hücre canlılığı kontrol grubuna göre yaklaşık olarak % 50 ve altında azaldı ($p < 0.05$, Şekil 9). Üç AB peptit fragmanı da uygulamadan sonra 48. saatte istatistiksel olarak anlamlı toksik etki gösterdi.



Şekil 9 : PC-12 hücrelerinde tüm AB fragmanlarının 72. saatte hücre canlılığına etkisi.
(* Kontrol grubuna göre $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı fark; AB: Amiloid beta)

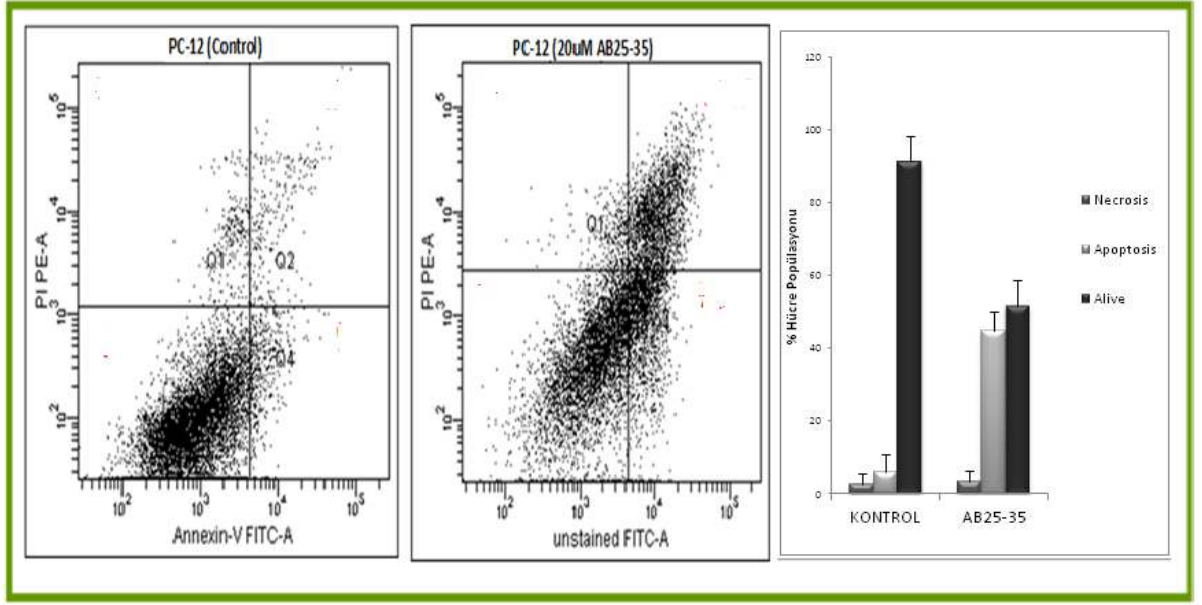
SHSY-5Y hücrelerine AB fragmanları önceden agregasyon ön işlemi yapılarak uygulandı. 72 saat 37°C’de inkübe edilerek agrege edilmiş olan 20 μ M AB 25-35, 5 μ M AB 1-40 ve 10 μ M AB 1-42 fragmanları 72 saat boyunca hücrelere muamele edildikten sonra hücre canlılığı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalmış bulundu ($p < 0.05$, Şekil 10). Toksisite PC-12 hücrelerinde olduğu gibi 48. saat sonrasında da istatistiksel olarak anlamlı idi.



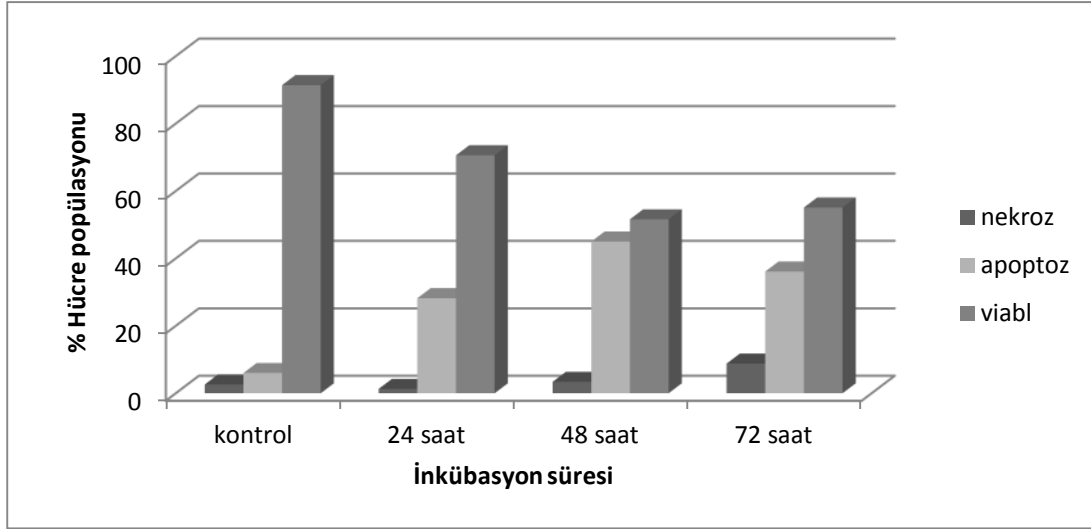
Şekil 10 : SHSY-5Y hücrelerinde agregre AB fragmanlarının 72. saatin sonunda hücre canlılığına etkisi. (Sonuçlar dokuz çalışmanın ortalaması $\pm$ SD olarak verilmiştir. * Kontrol grubuna göre $p<0.05$ düzeyinde anlamlı fark)

MTT testi ile yapılan sitotoksikite çalışmalarının verilerine göre her iki hücre hattı için de sitotoksik olduğu saptanan AB 25-35 fragmanı kullanılarak hücre ölüm tipini belirleme deneylerine devam edildi. AB 25-35 peptidinin 24, 48 ve 72 saat süreyle uygulanması sonucu hücrelerde oluşan apoptotik, nekrotik hücre oranları Annexin-V/PI boyaması yapılarak akış sitometrik analiz ile belirlendi.

Akış sitometrik analiz kadrantlarında görülen ve total hücre yüzdesine göre hesaplanmış olan % hücre değerleri incelendiğinde; hiçbir uygulama yapılmamış olan PC-12 hücre hatlarının %91,4 oranında canlı olduğu, toplam apoptotik hücre oranının %6, toplam nekrotik hücre oranının ise %2,6 düzeyinde olduğu saptandı. Canlılığı kontrol edilmiş olan PC-12 hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat süresi ile 20 μ M AB 25-35 uygulanması sonucunda apoptotik hücre ölümünün kontrol grubuna göre sırası ile %.28,2 %45,1 ve %36,1 oranında gerçekleştiği saptandı. 20 μ M AB 25-35 uygulaması ile indüklenen apoptoz oranında kontrole göre 24. ve 48. saatlerde artış, 72. saatte ise hücre ölümünün nekrotik hücre ölümüne kaydığı gözlemlendi (Resim 1, Şekil 11).

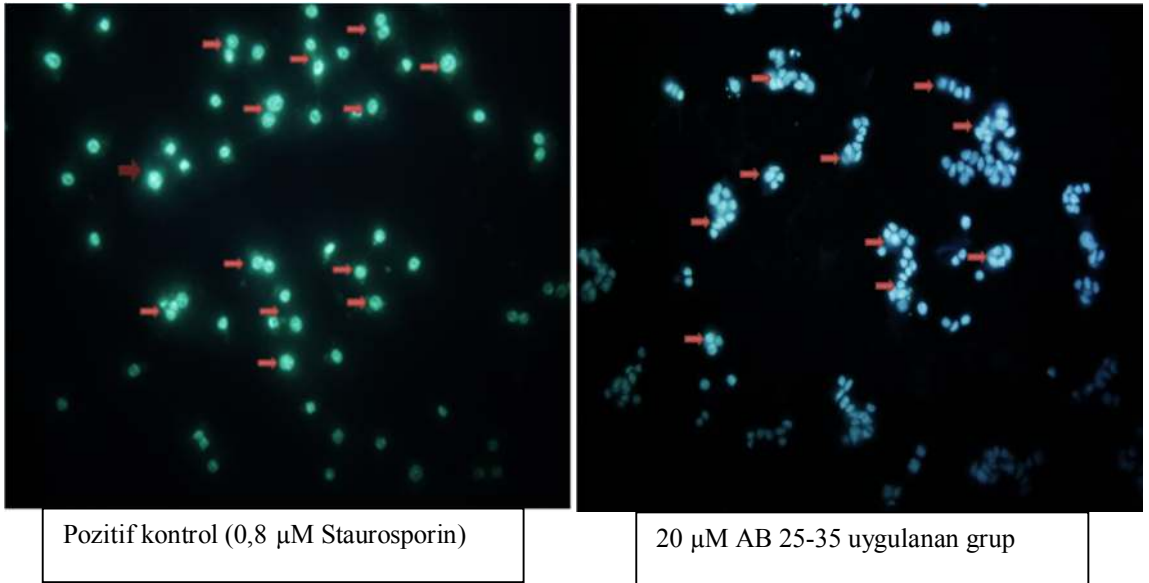


Resim 1 : PC-12 hücrelerinin kontrol grubu ve 48 saat süreyle 20 μ M AB 25-35 uygulaması sonrası akış sitometrik görüntüleri.



Şekil 11 : PC-12 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat süresi ile 20 μ M AB 25-35 uygulanması sonucunda nekrotik, apoptotik hücre ölümüne giden hücre sayısı % oranlarının kontrol grubuna göre grafiksel gösterimi.

Apoptotik hücrelerin floresan mikroskopta görüntülenmesi için DNA işaretleyici boya olan Hoechst 33342 kullanıldı. PC-12 hücreleri 20 μ M AB 25-35 ile 48 saat inkübe edildikten sonra floresan mikroskobu ile 392/440 nm Hoechst filtresinde incelendi. Hücrelerin görüntülenmesi için kurgulanan deneyde pozitif kontrol olarak çoğu hücrede apoptoz tetiklenmesini sağlayan 0,8 μ M staurosporin kullanıldı. Pozitif kontrol grubunda Hoechst boyası ile boyanmış, parlak, kromatin kondensasyonu ve nükleus fragmentasyonu gerçekleşmiş hücreler gözlemlendi. PC-12 hücrelerinin 20 μ M AB 25-35 ile 48 saat boyunca inkübasyonundan sonra elde edilen görüntülerde de Hoechst boyasını bağlayarak parlak ve kondanse görünüm sergileyen apoptotik hücreler floresan mikroskopta gözlemlendi (Resim 2). Yapılan bu çalışma ile akış sitometrik olarak saptanan apoptotik hücrelerin nükleus fragmentasyonları Hoechst boyası ile görsel olarak belirlenmiş oldu.

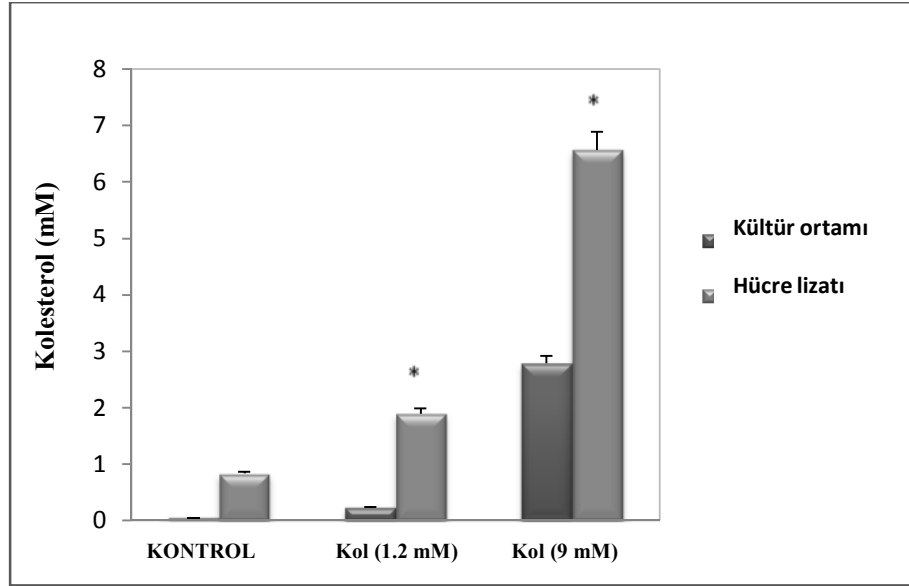


Resim 2 : PC-12 hücrelerinin Hoechst boyası ile floresan mikroskobik görüntülenmesi. 0,8 μ M staurosporin uygulanan pozitif kontrol grubu, 20 μ M AB 25-35 uygulanan grup

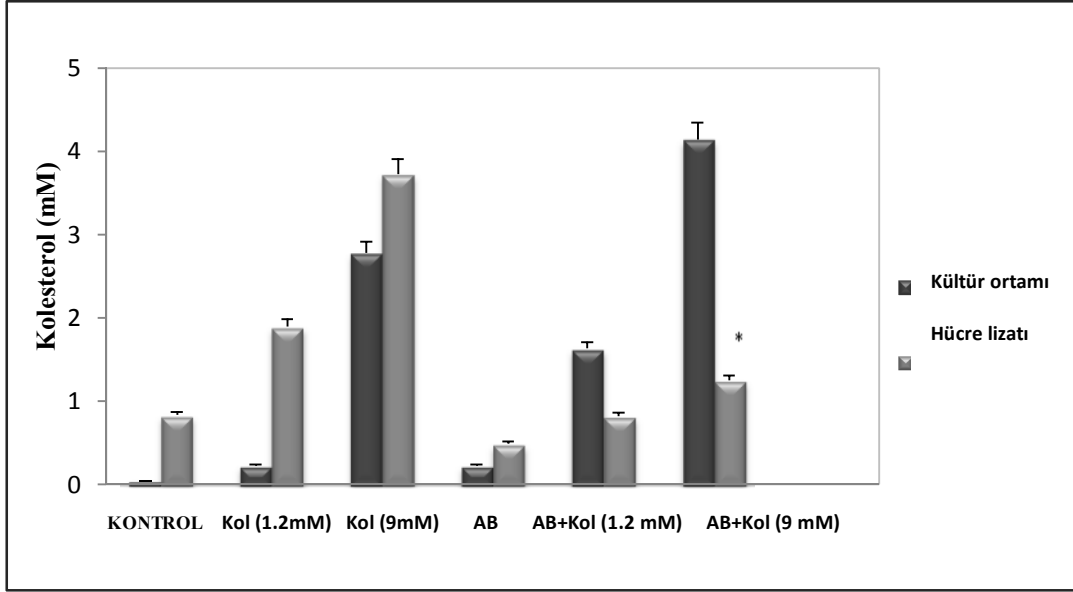
4.2 Hücre İçine Kolesterol Geçişinin Sağlanması

PC-12 ve SHSY-5Y hücrelerinde hücre total kolesterolü hücre lizatlarında yapılan HPLC analizi sonrası sırası ile ortalama $10 \pm 0,21$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein ve 65 ± 19 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein olarak bulundu. Hücrelere dışarıdan kolesterol uygulaması ile her iki hücre hattında benzer oranlarda kolesterol geçişi sağlandı. Fizyolojik koşullardaki periferik yüksek kolesterol düzeyini temsil eden 9 mM kolesterolün hücrelere 24 saat uygulanması sonrasında hücre içi kolesterol miktarı kontrol hücrelerinin yaklaşık 5-6 katı arttı (PC-12 hücre hattı için Şekil 12).

Kolesterol uygulamasının 72 saate uzatılması ile kolesterolün hücre içine geçişi bir miktar azalmakla birlikte ilk 24 saatteki oranlar ile benzer değerler bulundu. Bunun yanında hücrelere kolesterol ile birlikte AB verildiğinde, PC-12 hücre hattında 72 saat süre ile 20 μM AB 25-35 ve kolesterol uygulanması sonrası kolesterol ve AB'nin birlikte verildiği grupta hücre içi kolesterol artışının daha düşük seviyede kaldığı (~2 kat) gözlemlendi. Kültür ortamında ise kontrol grubuna göre yaklaşık 5 katlık bir artış izlendi (Şekil 13).



Şekil 12 : PC-12 hücrelerine 24 saat süreyle 1.2 mM ve 9 mM kolesterol uygulanması sonrası hücreler ve kültür ortamlarının total kolesterol düzeyi değişimleri (* Kontrol grubuna göre $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı fark, 2×10^6 hücre, Kol:Kolesterol)



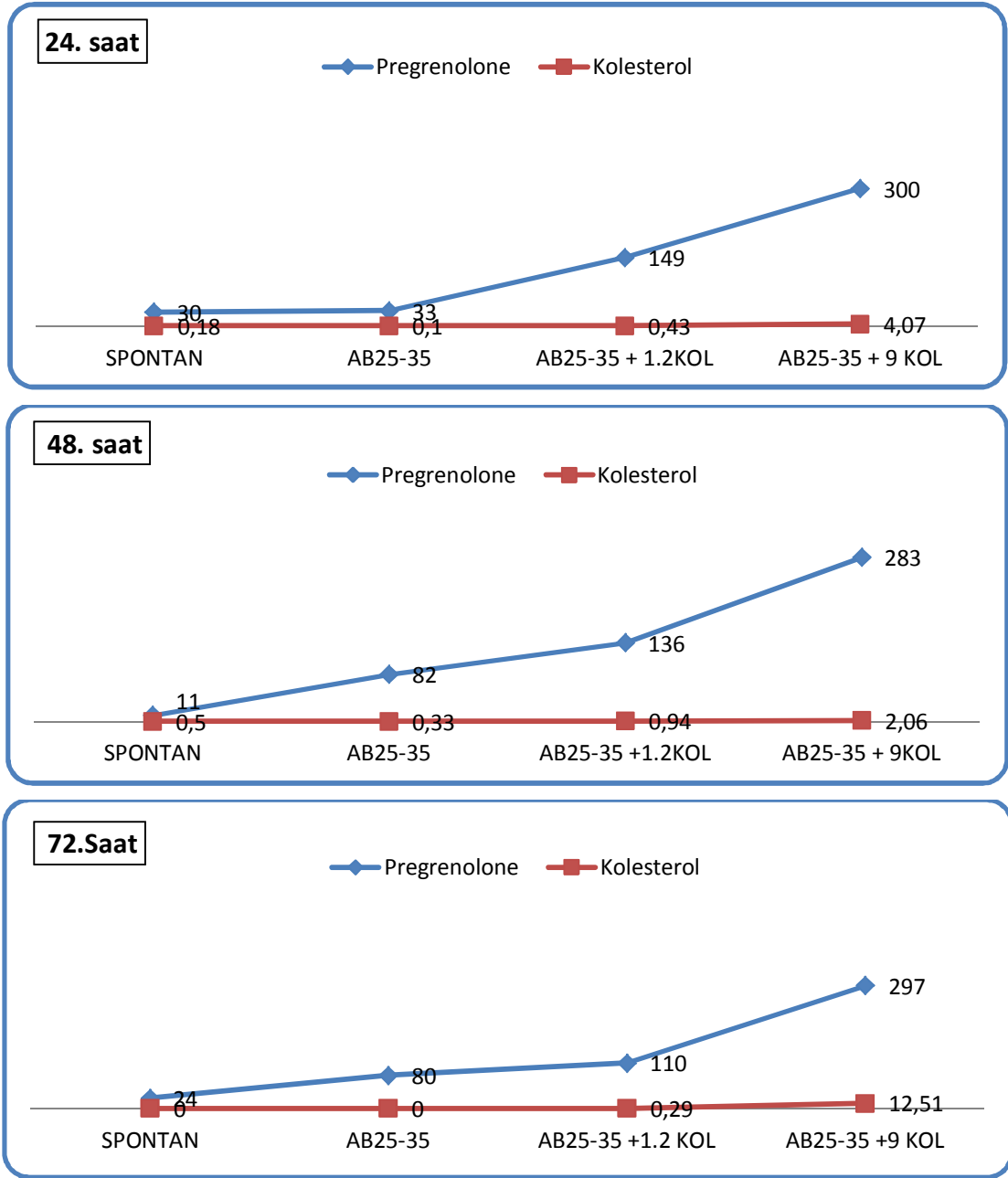
Şekil 13 : PC-12 hücrelerine 72 saat süre ile AB 25-35 (20uM) ve kolesterol uygulaması sonrası hücre ve kültür ortamları total kolesterol düzeyi değişimleri (* Kontrol grubuna göre $p<0.05$ düzeyinde anlamlı fark)

4.3 Kolesterol ve AB Peptit Uygulamasının Nörosteroid Düzeylerine Etkisi

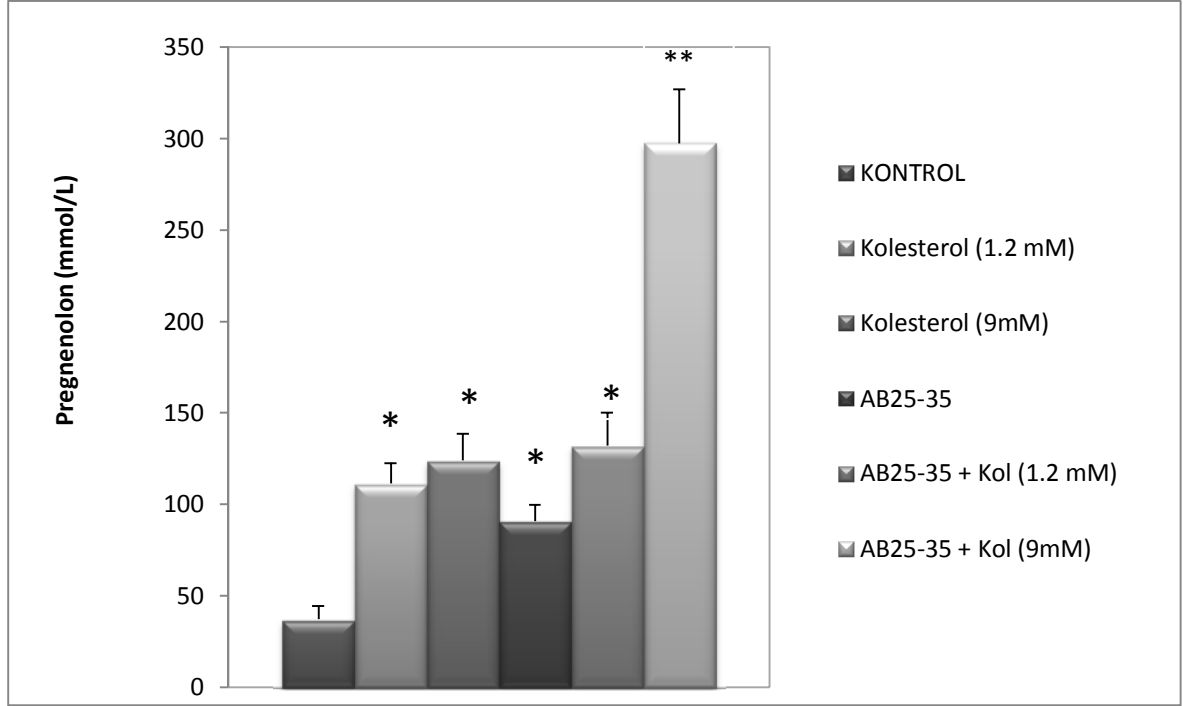
4.3.1 Pregnenolon

PC-12 ve SHSY-5Y hücre hatlarında toksisite oluşturan dozlarda uygulanan her üç AB peptidinin tek başına ya da ortamda bulunan kolesterol düzeyine bağlı olarak farklı oranlarda pregnenolon düzeylerini arttırdığı saptandı. Ayrıca P sentezini en çok tetikleyen AB fragmanının da AB 25-35 olduğu gözlemlendi.

PC-12 hücre hattında 24, 48 ve 72 saat süre ile 20 μ M AB 25-35 peptidi düşük (1,2 mmol/L) ve yüksek (9 mmol/L) düzeyde kolesterol ile birlikte uygulandıktan sonra pregnenolon (P) ve kolesterol düzeylerinin değişimleri eş zamanlı yapılan HPLC analizi ile incelendiğinde her üç inkübasyon saatinde de AB ile birlikte 9 mM kolesterol verilen grupta P düzeyinin hem kontrol hem de sadece AB verilen gruba göre anlamlı artış gösterdiği bulundu (Şekil 14). PC-12 hücrelerine 72 saat süresince tek başına kolesterol ya da AB 25-35 peptit uygulaması P sentezini kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda artırdı ancak bu üç grup arasında anlamlı fark bulunamadı. Bununla birlikte AB ile birlikte 9 mM kolesterol uygulamasının ise P sentezini tüm gruplara göre yaklaşık 2,5-3 kat oranında daha fazla arttırdığı izlendi ($p<0.05$) (Şekil 15).

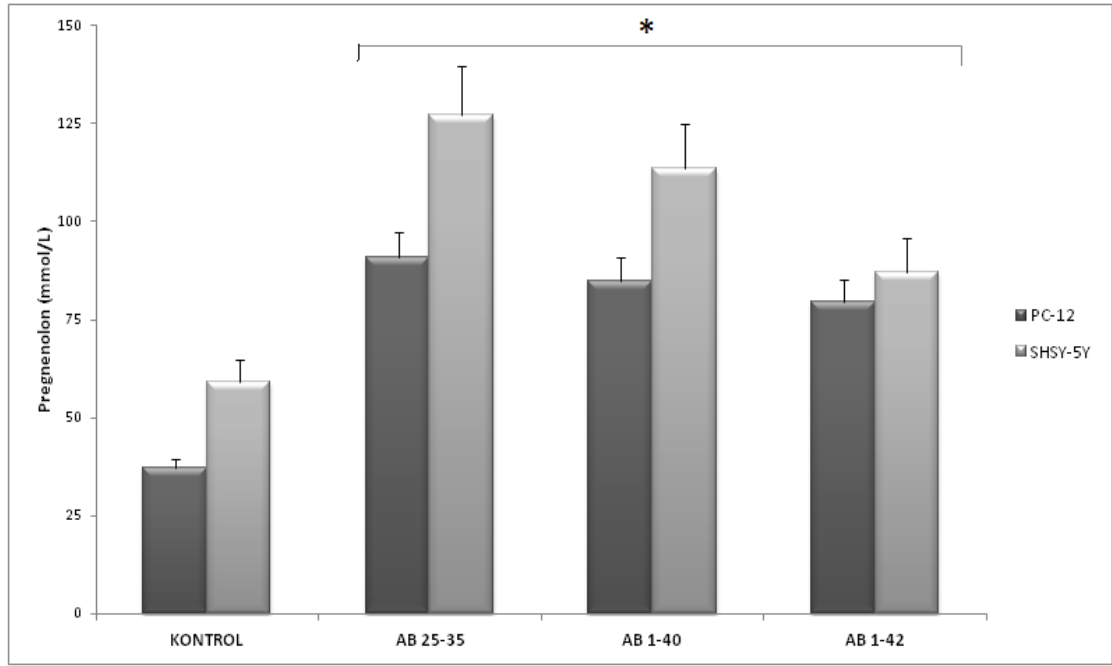


Şekil 14 : PC-12 hücrelerinde 20 μ M AB 25-35 ve kolesterol uygulamasının hücre ortamında kolesterol (mM) ve pregnenolon (mM) düzeyine etkisi. (Sonuçlar 2×10^6 hücre başına Ort $\pm$ SD olarak verilmiştir.)

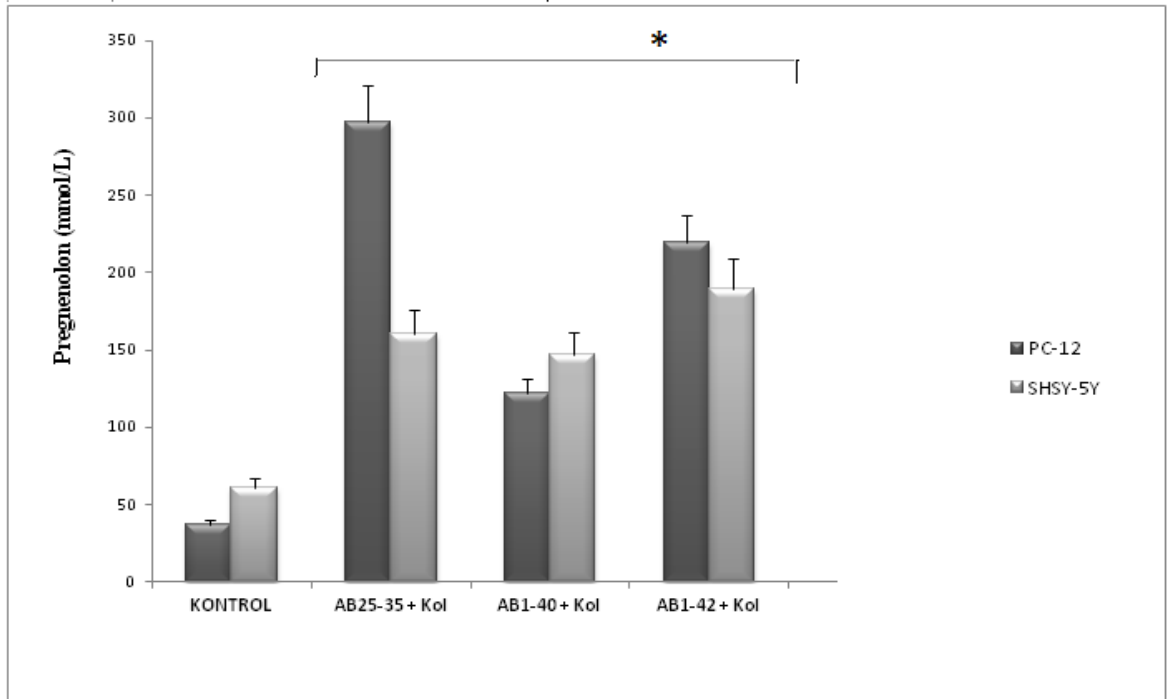


Şekil 15 : PC-12 hücrelerine 1,2 mM ve 9 mM kolesterolün 20 µM AB 25-35 fragmanının varlığında ve yokluğunda 72 saat boyunca uygulanmasının P düzeyi üzerine etkisi (Sonuçlar ort±SD olarak verilmiştir. *Kontrol grubuna göre, ** diğer tüm gruplara göre p<0.05 düzeyinde anlamlı farkı göstermektedir.)

Nörotoksisite deney modelimizde kullandığımız diğer fragmanlar olan AB 1-40 ve AB 1-42 fragmanları da AB 25-35 peptiti gibi 72 saat süreyle uygulandığında hem PC-12 hem de SHSY-5Y hücre hatlarında pregnenolon düzeyinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artışa neden oldu (Şekil 16). Ancak P'daki artışı her iki hücre hattında da AB 25-35 fragmanının diğerlerine göre daha fazla tetiklediği görüldü ($p<0.05$). Her iki hücre hattında AB fragmanları ile birlikte 9 mM kolesterol verilen gruplarda P düzeyinin hem kontrol hem de sadece AB verilen gruba göre arttığı gösterildi(Şekil 17)



Şekil 16 : Pregnenolon düzeylerinin PC-12 ve SHSY-5Y hücre hatlarında üç farklı AB uygulanması sonrası karşılaştırılması (*Kontrol grubuna göre $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı fark)

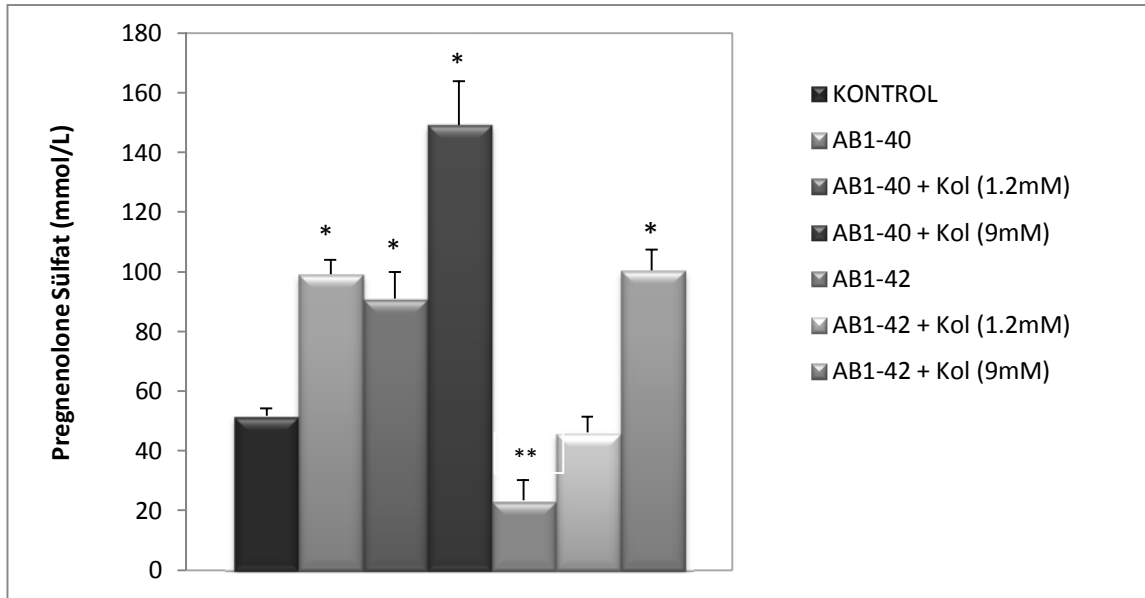


Şekil 17 : PC-12 ve SHSY-5Y hücre hatlarında 9 mM kolesterol ile eş zamanlı AB peptitlerinin uygulanmasının P düzeylerine etkisi (*Kontrol grubuna göre $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı fark)

4.3.2 Pregnenolon Sülfat

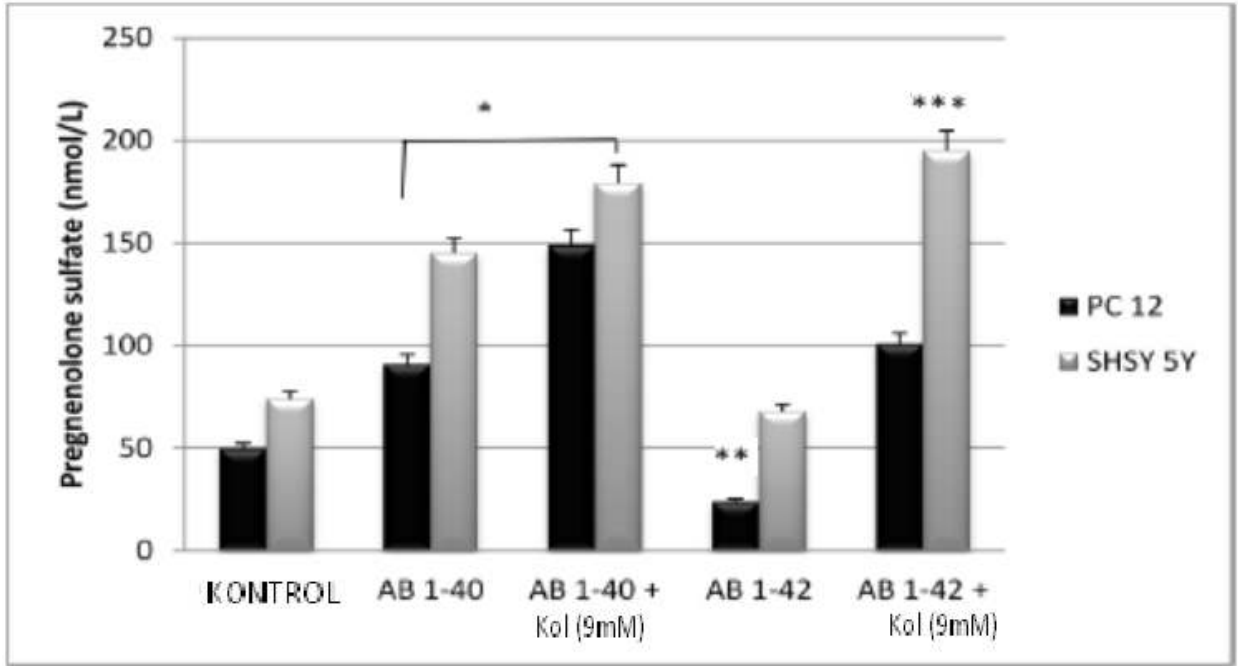
AB 25-35 fragmanı ile PC-12 ve SHSY-5Y hücre hatlarında PS düzeylerinde anlamlı bir değişim saptanmazken, AB 1-40 ve AB 1-42'nin her iki hücre hattında da PS düzeylerini farklı şekillerde etkilediği görüldü.

PC-12 hücrelerine 72 saat süre ile AB 1-40'ın tek başına ve kolesterol ile birlikte uygulanması sonucunda PS düzeylerinin kontrole göre anlamlı artış gösterdiği saptandı (Şekil 18). AB 1-42 fragmanı ise PC-12 hücrelerinde kontrol grubuna göre anlamlı PS azalması yaparken, ortama 9 mM kolesterol eklendiğinde tek başına AB 1-42 uygulamasına göre istatistiksel olarak anlamlı daha yüksek düzeyde PS elde edildi ($p<0.05$) (Şekil 18).



Şekil 18 : PC-12 hücre hattında AB 1-40, AB 1-42 ve kolesterol uygulaması sonrası pregnenolon sülfat düzey değişimleri (Sonuçlar $\text{ort} \pm \text{SD}$ olarak verilmiştir. *Kontrol grubuna göre $p<0.05$ düzeyinde anlamlı yüksek, **Kontrol grubuna göre anlamlı düşük)

SHSY-5Y hücrelerinde de AB 1-40'ın tek başına ve 9 mM kolesterol ile birlikte uygulanması sonucunda PS düzeylerinin kontrole göre anlamlı arttığı gösterildi. PC-12 hücrelerinden farklı olarak AB 1-42'nin pregnenolon sülfat düzeyini anlamlı olarak azaltmadığı saptandı. AB 1-42 fragmanı ile birlikte 9 mM kolesterol uygulandığında PC-12 hücrelerinde olduğu gibi tek başına AB uygulamasına göre istatistiksel anlamlı daha yüksek PS düzeyleri bulundu ($p<0.05$) (Şekil 19).



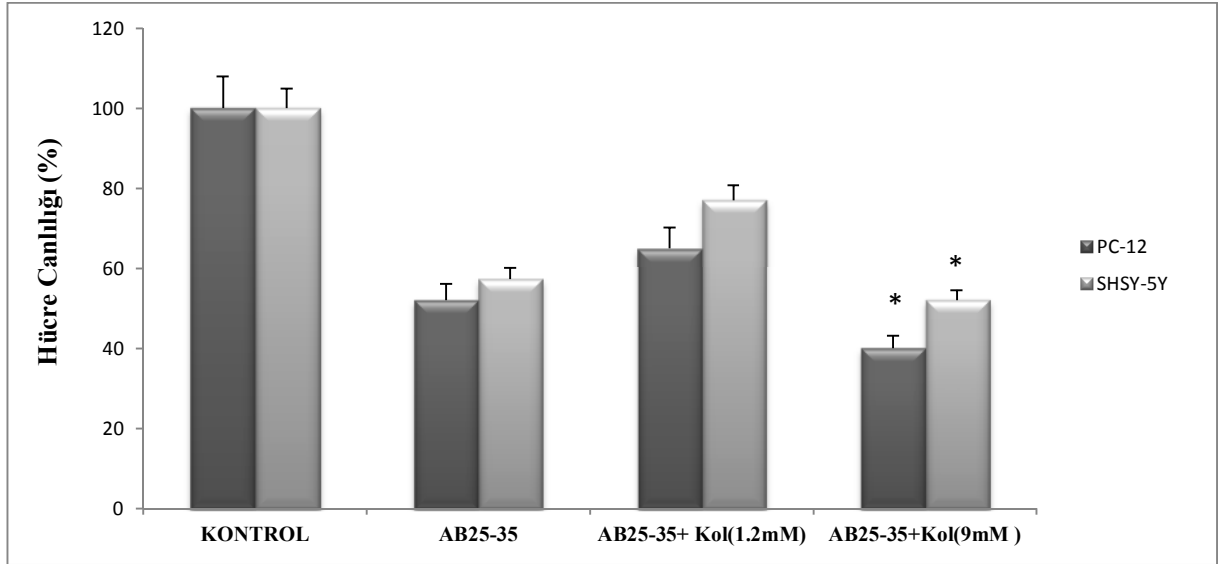
Şekil 19 : : PC-12 ve SHSY-5Y hücre hatlarında AB ve kolesterol uygulaması sonrası pregnenolon sülfat düzey değişimleri (*Kontrol grubuna göre $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı yüksek, **Kontrol grubuna göre anlamlı düşük, *AB 1-42 grubuna göre anlamlı yüksek)**

Ayrıca her iki hücre hattında sülfotransferaz enzim inhibitörü DCNP uygulaması ile PS düzeyleri anlamlı olarak baskılandı.

Çalışmamızda PS düzeyleri yöntem bölümünde ayrıntılı bir şekilde açıklandığı gibi total P düzeyi üzerinden indirekt olarak ölçüldü. Bu durum sülfat grubunun koparılması gibi ek işlemler gerektirdiği için işlemlerin standardizasyonunda oldukça güçlük çekildi. İşlemler aynı kişi tarafından ve aynı koşullarda tekrarlanarak, ölçümler arası rastgele hatalar en aza indirilmeye çalışıldı. Tüm analitik performansı artırıcı önlemlere rağmen ölçümlerin saptama sınırı daha düşük bir yöntem ile direkt PS düzeyini ölçerek tekrarlanmasının daha doğru olacağı görüşündeyiz. Bu şekilde mikromolar ve altındaki düzey değişimlerinin fark edilebileceği daha hassas sonuçlar elde edilebilecektir.

4.4 AB ve Kolesterol Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi

PC-12 ve SHSY-5Y hücrelerinde AB fragmanları ile birlikte eş zamanlı 9 mM kolesterol uygulaması hücre canlılığını sadece AB uygulanan gruba göre azaltmakta olup (Şekil 23), şekil 20'de ise AB 25-35 peptidine ait hücre canlılık oranlarındaki istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterilmiştir ($p < 0.05$).



Şekil 20 : PC-12 ve SHSY-5Y hücrelerine AB25-35 peptidi ile birlikte 1,2 mM ve 9mM kolesterol uygulanmasının hücre canlılığına etkisi (*AB uygulanan gruba göre $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı azalma)

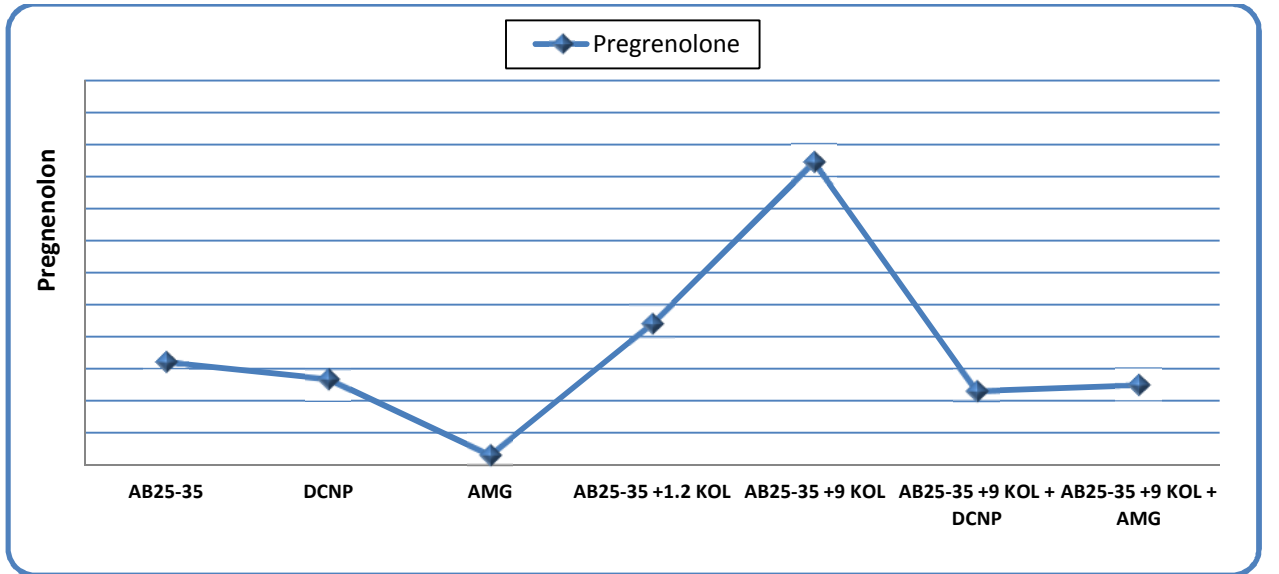
PC-12 ve SHSY-5Y hücre hatlarında AB ve kolesterol uygulamaları ile saptanan hücre canlılığındaki azalmada apoptotik ve/veya nekrotik hücre ölüm oranlarının belirlenmesi amacı ile deney gruplarında öncelikle Annexin-V/PI boyaması yapılarak akış sitometrik analizleri gerçekleştirildi. Sitotoksikite incelemelerinde AB fragmanları arasında anlamlı bir fark bulunmadığı için hücre ölüm tipinin incelendiği çalışmalarda sadece fonksiyonel fragman olan AB25-35 kullanıldı. Ancak yapılan çalışmalar sonucunda kolesterol uygulaması yapılan deney gruplarında hücreler süspanse hale getirilememiş ve bu nedenle akış sitometrik analizleri mümkün olamamıştır. Bu olayın, AB ve kolesterolün birlikte uygulaması ile hücrelerin agregasyon / birbirine yapışma özelliğinin artmasına bağlı olabileceğini düşünmekteyiz.

4.5 Steroid Sentez İnhibitörlerinin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

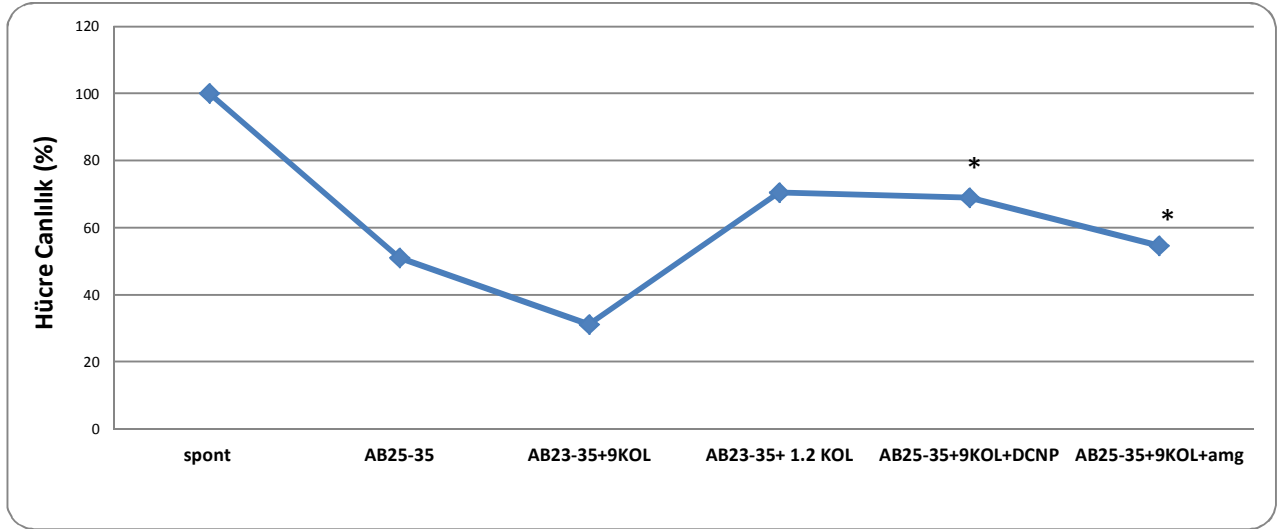
AB proteininin fragman yapısına ve kültür ortamına uygulanan kolesterol düzeyine bağlı olarak P ve PS düzeylerinin değiştiği ve hücre canlılıklarını etkilediği gösterildi. Tek başına kolesterol uygulaması P, PS düzeyini daha az oranda etkilerken, AB varlığında nörosteroidlerin belirgin olarak arttığı gösterildi. Steroid sentez inhibisyonu yapmak amacıyla sülfotransferaz enziminin non-spesifik inhibitörü DCNP ve side-chain cleavage enzim inhibitörü AMG'in aynı koşullarda kullanılarak bunların hücre canlılığı üzerine etkileri araştırıldı ve aşağıdaki bulgular elde edildi.

SHSY-5Y ve PC-12 hücrelerinde AMG total pregnenolon düzeyini baskılayarak (Şekil 21), bu inhibitörünün AB ile birlikte yüksek kolesterol uygulanan hücrelerde hücre canlılığını arttırdığı saptandı (Şekil 22 ve 23). Tek başına DCNP ve AMG uygulamaları hücre canlılığında anlamlı bir değişiklik oluşturmadı.

PC-12 hücrelerinde DCNP ve AMG'in AB 25-35 varlığında hücre kültür ortamındaki P düzeyine ve hücre canlılığına etkileri Şekil 21 ve 22'de görülebilir.

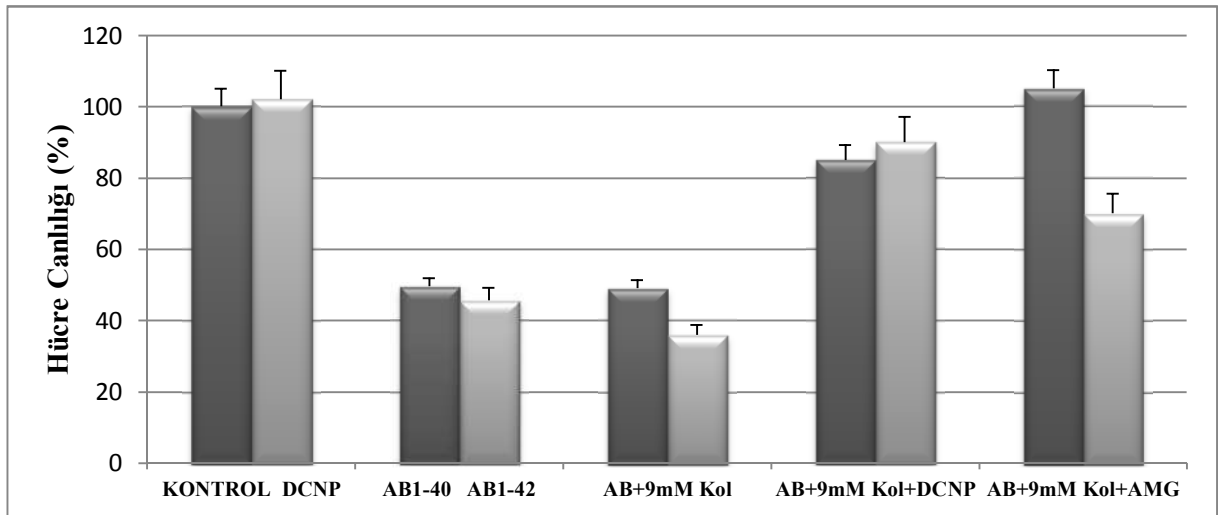


Şekil 21 : PC-12 hücre hattına AB 25-35, kolesterol ve steroid sentez inhibitörlerinin 72 saat süreyle uygulanmaları sonrası pregnenolon düzeylerindeki değişim (Sonuçlar Ort±SD olarak verilmiştir, AMG: aminogluthedimide, DCNP: dikloronitrofenol)



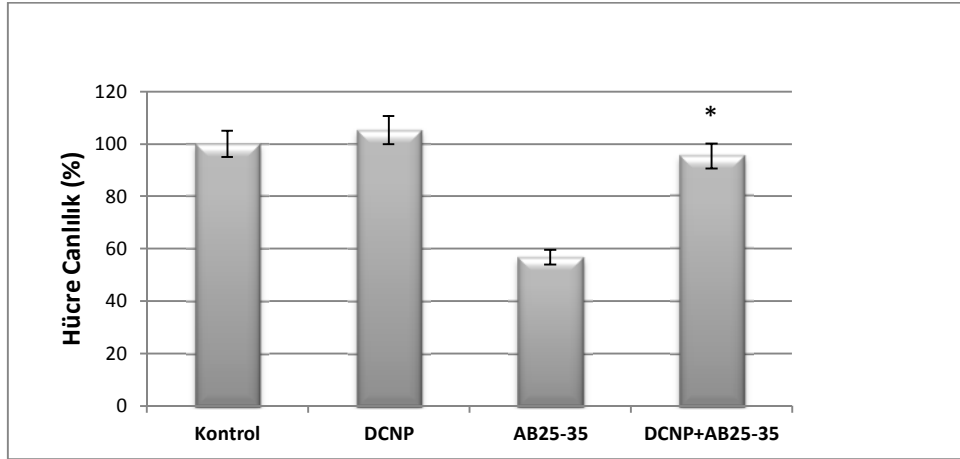
Şekil 22 : PC-12 hücrelerinde AB 25-35 ve kolesterol toksisitesine karşı steroid sentez inhibitörlerinin etkisi (Sonuçlar Ort±SD olarak verilmiştir; * AB 25-35 ve 9 mM kolesterol uygulanan gruba göre istatistiksel anlamlı yükseklik $p<0.05$)

PC-12 hücrelerinde AB 1-40 ve AB 1-42 fragmanlarının oluşturduğu toksisiteye karşı steroid sülfotransferaz enziminin non-spesifik inhibitörü DCNP ve side-chain cleavage enzim inhibitörü AMG'in etkisi ise aşağıdaki gibidir.

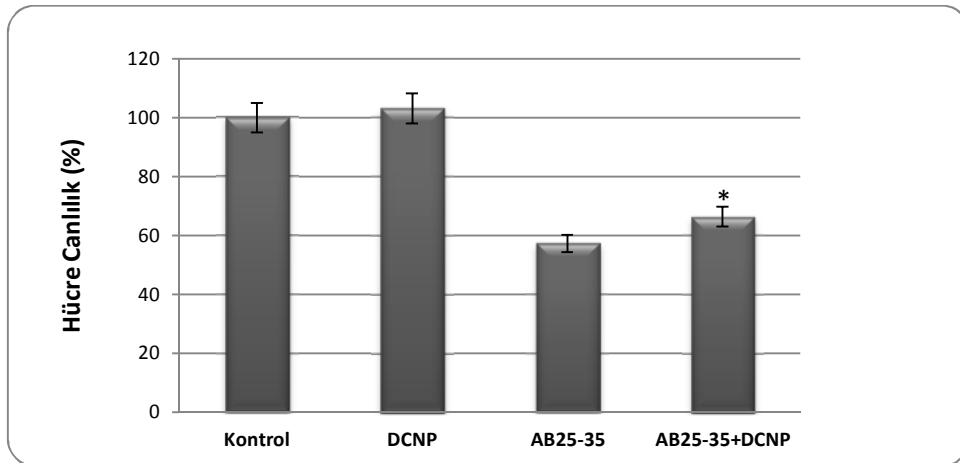


Şekil 23 : PC-12 hücrelerinde AB 1-40, AB 1-42 fragmanları ve 9 mM kolesterol varlığında steroid sentez inhibitörlerinin hücre canlılığına etkisi (Sonuçlar Ort±SD olarak verilmiştir; * AB ve 9mM kolesterol uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı yükseklik $p<0.05$)

PC-12 hücrelerinde 72 saatlik inkübasyon ile oluşturulan AB 25-35 toksisitesine karşı 1 μ M DCNP'nin etkisi MTT testi ile değerlendirildiğinde DCNP'nin AB 25-35 toksisitesine karşı koruyucu etkisi olduğu hücre canlılığını AB 25-35 uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı attırdığı bulundu, benzer bulgular SHSY-5Y hücre hattı içinde elde edildi (Şekil 24 ve 25).



Şekil 24 : PC-12 hücre hattında AB 25-35 toksisitesine karşı DCNP'nin koruyucu etkisi
(Sonuçlar Ort $\pm$ SD olarak verilmiştir; * AB 25-35 uygulanan gruba göre istatistiksel anlamlı yükseklik $p<0.05$)



Şekil 25 : SHSY-5Y hücrelerinde AB 25-35 toksisitesine karşı DCNP'nin koruyucu etkisi
(Sonuçlar Ort $\pm$ SD olarak verilmiştir; * AB 25-35 uygulanan gruba göre istatistiksel anlamlı yükseklik $p<0.05$)

MTT testi ile elde edilen AB toksisitesine karşı DCNP'nin koruyucu etkisi akış sitometri testi ile de doğrulandı. Kolesterol girişiminden ötürü kolesterol uygulanan gruplarda akış sitometrik analiz yapılamadı.

5 TARTIŞMA

Gonadlar, adrenal korteks gibi endokrin organlardan salgılanan steroid hormonlar lipofilik yapıları nedeniyle kan beyin bariyerini kolaylıkla geçip SSS'ne ulaşabilirler. Ancak, bir grup steroid hormon beyinde ya da sinir sisteminde kolesterolden “de novo” sentezlenir, periferik kaynaklara ihtiyaç duymaz ve nöral aktiviteyi değiştirebilir. Bu nedenle bu nöroaktif steroidler alışılmışın dışında orjinleri ve farklı fonksiyonları nedeniyle “nörosteroidler” olarak isimlendirilirler (19, 53).

Nöronal dokuda üretilen nörosteroidler (NS) arasında (Pregnenolon, Pregnenolon sülfat, Progesteron (PROG), Dehidroepiandrosteron (DHEA), Dehidroepiandrosteron sülfat (DHEAS), Allopregnanolon ($3\alpha,5\alpha$ -tetrahidroprogesteron), Epiallopregnanolon ($3\beta,5\alpha$ -THP) sayılabilir (57). P ve PS miktar olarak beyin dokusunda bulunan başlıca nörosteroidlerdendir (18). Çalışmamız ile nöronal hücrelerde AB ile eş zamanlı kolesterol varlığında bu iki nörosteroidin düzey değişimleri ve bu değişimin hücre canlılığı üzerine olan etkileri gösterilmiştir.

P sentezinin nöroglial hücre mitokondrisinde kolesterolden side-chain cleavage (P450_{scc}/Cyp-11a) enzim katalizi ile gerçekleştiği; hafıza ve bilişsel fonksiyonlarla yakın ilişkili bir nörotransmitter olan pregnenolone sülfatın ise sitoplazmada sülfotranferaz (SULT2) enzimi yardımı ile oluştuğu gösterilmiştir (19, 20). SSS'de P ve PS nin non-patolojik durumlarda $1\mu\text{M}$ 'dan düşük konsantrasyonlarda olduğu bilinmektedir (20). Bununla birlikte düzeyleri kolesterol konsantrasyonu, iskemi, oksidatif stres ya da glutamat gibi nörotoksinlerle değiştirilebilir (16, 19, 90, 91). AB toksisitesinin ise steroid sentezine etkisi ile ilgili çok az şey bilinmektedir. 2008 yılında Schaeffer V. ve ark.'nın yaptığı SHSY-5Y hücre hattında AB peptidinin nörosteroidogenez üzerine doza bağlı ve dizi sensitif etkilerini inceledikleri çalışmayla AB 25-35 ile AB 1-42'nin progesteron ve/veya östradiol düzeylerinde değişiklik yarattığı ancak testosteron ve 3α -androstanediol düzeylerinde değişime yol açmadığı ortaya konulmuştur, ayrıca AB 25-35'in prekürsör olarak verilen pregnenolondan progesterona dönüşümü kontrole göre anlamlı azalttığı gösterilmiştir (17). Brown ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada da AB 1-42'nin DHEA oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir (16). Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre hem PC-12 hem de SHSY-5Y hücrelerinde toksik dozlardaki tüm AB fragmanlarının (25-35, 1-40 ve 1-42) P düzeyini belirgin attırdığı bulunmuştur. Her üç AB peptidinin tek başına ya da ortamda bulunan

kolesterol düzeyine bağı olarak farklı oranlarda pregnenolon düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca P sentezini en çok tetikleyen AB fragmanının da AB 25-35 olduğu, AB 1-40 ve AB 1-42 fragmanları uygulanan SHSY-5Y hücrelerinde ise P düzeyinin PC-12 hücrelerine göre daha fazla yükseldiği ortaya konmuştur. PC-12 hücrelerine 72 saat süresince tek başına 1.2 mM / 9 mM kolesterol ya da AB 25-35 peptit uygulaması P sentezini kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda arttırmakla birlikte bu üç grup arasında anlamlı bir fark gözlenememiştir. Ancak AB ile birlikte 9 mM kolesterol uygulamasının ise P sentezini bu üç gruba göre de anlamlı bir şekilde arttırdığı, hücre canlılığını da AB uygulanan gruba göre azalttığı gösterilmiştir ($p<0.05$). Kolesterolün AB varlığında hücre canlılığını azaltıcı bu etkileri daha önce yapılmış olan ve kan kolesterol yüksekliği ile Alzheimer Hastalığı görülme riskinin arttığını, kolesterol düşürücü ilaçların hastalık prevalansını azalttığını vurgulayan klinik çalışmaların sonuçlarını destekler niteliktedir (33, 54, 92).

Orta yaş grubundaki kişilerde hiperkolesterolemi varlığının AH için bir risk faktörü olduğu son birkaç yıldır yapılan çalışmalar ile sıklıkla vurgulanmaktadır (93-95). Bu nedenle oluşturduğumuz in-vitro modelimizde hücrelere periferik düşük ve yüksek kolesterolemi durumlarını yansıtan 1.2 mM ve 9 mM kolesterol düzeyleri uygulaması yapıldı. Aslında kan beyin bariyeri nedeniyle plazmadan dokuya kolesterol giriş çıkışının çok düşük miktarda olduğu ve dokuda var olan kolesterolün çoğunun dokunun kendisi tarafından sentezlendiği bilindiğinden, bu noktada periferik kolesterol düzeylerinin beyin dokusu kolesterolünü etkiliyor oluşu oldukça şaşırtıcıdır (39, 96). SSS'de sirkum ventriküler organlar olarak isimlendirilen bazı özel bölgelerde vasküler sistem ile beyin arasında direkt iletişim mümkündür. Bu organlarda bulunan nöronlar ve glial hücreler kandaki hormon, kolesterol ve nörotransmitter benzeri moleküllerin konsantrasyon değişimlerine çok duyarlıdır (44-46). Ayrıca KBB başta AH olmak üzere nörodejeneratif hastalıklarda hasarlanmış durumdadır (47-51). Bu nedenle gerek KBB hasarı ile gerekse hasar oluşmadan önce sirkum ventriküler organların özelliği nedeniyle nöron hücrelerin kolesterol içeriğinin kan kolesterol değişimlerinden etkilenmesi beklenebilir.

Çalışmamızda 9 mM kolesterolün hücrelere 24 saat uygulanması sonrasında hücre içi kolesterol miktarı kontrol hücrelerinin yaklaşık 5-6 katı kadar arttırıldı. Kolesterol uygulamasının 72 saate uzatılması ile kolesterolün hücre içine geçişi bir miktar azalmakla birlikte ilk 24 saatteki oranlar ile benzer değerler bulundu. Bunun yanında hücrelere kolesterol

ile birlikte AB verildiğinde, PC-12 hücre hattında 72 saat süre ile 20 μ M AB 25-35 ve kolesterol uygulanması sonrası kolesterol ve AB'nın birlikte verildiği grupta hücre içi kolesterol artışının daha düşük seviyede kaldığı (~2 kat) gözlemlendi. Kültür ortamında ise kontrol grubuna göre yaklaşık 5 katlık bir artış izlendi. Bu durum AB agregatlarının kolesterolün hücre membranından geçişini engellemesine bağlı olabileceğini düşündürdü.

AH ve AB peptit toksisitesinde artmış kolesterolün rolü üzerine yapılan çalışmalarda ileri sürülen iki farklı hipoteze göre kolesterolün nöronal hücre mebranında amiloid prekürsör proteinden toksik AB peptit sentezini tetiklediği ya da oluşmuş olan AB peptitinin fibrillizasyon ve agregasyon eşiğini düşürerek amiloid plak oluşumunu kolaylaştırdığı ileri sürülmektedir (12, 13, 54, 97). Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre de nöronal hücre kolesterolünün metabolitleri olan nörosteroidlerin düzeylerini değiştirerek bunların etkilerini düzenleyebildiği ve kolesterolün AB toksisitesinde anahtar bir rol oynadığı farklı bir yaklaşımla gösterilmiştir.

NS'ler kısmen sülfat, glukuronit ve yağ asidi esterleri şeklinde bulunur. Ester formları sıkça serbest steroidlerin konsantrasyonuna eşit veya daha fazladır. Serbest 3β hidroksi steroidler (P, DHEA) ve bunların sülfat esterleri belirgin biyolojik aktivite gösterirken sinir dokusunda diğer ester formlarının aktivitesiyle ilgili çok az şey bilinmektedir (64). Nöroaktif steroidlerin glutamat, GABA, asetilkolin, norepinefrin, dopamin ve serotonin (5-HT) gibi çeşitli nörotransmitterlerin salınımı üzerine düzenleyici etkileri olup bu etkilerin çoğu beynin öğrenme, hafıza, duygu durum ve bilişsel yeti ile ilgili alanlarında ortaya çıkar. PS hafıza ve bilişsel fonksiyonlarla yakın ilişkisi olan bunun yanı sıra in vitro nöronal hücrelerde eksitotoksisiteyi tetikleyici özellikleri de olan bir nöroaktif steroidtir. Ancak AB ile eş zamanlı kolesterol varlığında PS'nin oynadığı rol günümüzde henüz açıklığa kavuşmamıştır.

Yapılan klinik çalışmalarda AH olan kişilerin beyin dokularında PS ve DHEAS düzeylerinin demansı olmayan yaşça eşleştirilmiş kontrol grubuna göre anlamlı düşük olduğu gösterilmiştir. Farklı bir çalışmada da AH'lı hastaların striatum ve serebellum dokularında AB peptit ve PS düzeyleri arasında anlamlı bir negatif korelasyon bulunmuştur (52). Bizim çalışmamızda da bu bilgileri destekler nitelikte; PC-12 hücrelerine AB 1-42 fragmanı uygulaması kontrol grubuna göre anlamlı PS azalmasına sebep olmuştur. Ancak diğer taraftan AB 25-35 fragmanı ile PC-12 ve SHSY-5Y hücre hatlarında PS düzeylerinde anlamlı bir değişim saptanmamıştır. AB 1-40 ve AB 1-42 fragmanlarının her iki hücre hattında PS

düzeylerini farklı şekillerde etkileği belirlenmiştir. Bu durum bize AB peptit diziliminin steroid sentezi ve steroidlerin konjugasyonu basamaklarında aminoasit dizilimlerine duyarlı etkileri olabileceğini ve bunun yanı sıra hücre tipine göre de farklılıklar gösterebileceğini düşündürdü.

Her iki hücre kültür ortamına 9 mM kolesterol eklendiğinde ise tek başına AB 1-42 uygulamasına göre istatistiksel olarak anlamlı daha yüksek PS düzeyleri elde edilmiştir ($p<0.05$). Ayrıca her iki hücre hattında P'den PS'e dönüşümü sağlayan sülfotransferaz enzim inhibitörü DCNP uygulaması ile PS düzeyleri anlamlı olarak baskılanmış, eş zamanlı olarak hücre canlılıkları AB ve kolesterol uygulanan gruplara göre artmıştır. Hastalığın erken evrelerinde ortaya çıkabilecek hiperkolesterolemi varlığı PS sentezini etkileyerek hücre ölümünü tetikleyebilir. Ancak nöronal hücre ölümünde PS'nin olası rolünü açıklamaya yönelik daha ileri in vivo araştırmalara ihtiyaç vardır.

Bununla birlikte çalışmamızın bir kısıtlılığı olarak PS düzeyleri total P düzeyi üzerinden indirekt olarak ölçüldü. Bu durum sülfat grubunun koparılması gibi ek işlemler gerektirdiği için işlemlerin standardizasyonunda oldukça güçlük çekildi. Analitik performansı artırıcı önlemlere rağmen yöntemin saptama sınırına bağlı olarak, deney koşulları arasında mikromolar ve altındaki düzey değişimlerinin fark edilemeyeceği göz önüne alınmalıdır.

Literatürde AB toksisitesi ile nörosteroidleri inceleyen özellikle de P ve PS düzeyleri üzerinde duran çok az çalışma vardır. Gürsoy ve arkadaşlarının 2001 yılındaki çalışmalarında ileri sürdüğü şekilde (98), grubumuzun 2009 yılında yayınladığı çalışmada da P'nin nM düzeyindeki konsantrasyonlarda AB toksisitesine karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (21). P nöroprotektif bir ajan kabul edilmekle birlikte sülfat esteri PS'de benzer etkiler gözlenmemektedir. Guarnieri ve arkadaşları tarafından P ve PS sentez artışının erken nöronal hücre ölümü habercisi olduğunu ileri sürülmüş (99) ve yine aynı grubun gerçekleştirdiği bir diğer çalışmada 50 μ M PS'nin NMDA aracılı doğal bir eksitotoksin olarak nöronal hücre ölümünü tetiklediği gösterilmiştir (100). Grubumuz tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada da hücre kültür ortamına dışarıdan verilen 10 μ M üstü konsantrasyonlardaki P ve PS'nin hücre canlılığını azalttığı ve bir nörotoksin gibi davrandığı gösterilmiştir (21). Çalışmamızda P ve PS düzeylerinin kontrole göre değişim gösterdiği koşullar olan AB ve yüksek kolesterol varlığında hücre canlılığı daha az bulunmuştur. P ve PS düzeyini düşüren steroid sentez inhibitörleri AB toksisitesine karşı hücre canlılığını artırmıştır. Bu bulgular bu iki

nörosteroidin düzey artışlarının hücre canlılığını olumsuz etkilediği tezini desteklemektedir. Ayrıca çalışmamızda 1,2 mM kolesterol'ün hücre canlılığını 9 mM kolesterol kadar azaltmadığı hatta AB ile birlikte verildiğinde hücre canlılığını artırma eğiliminde olduğu bulunmuştur. 1,2 mM kolesterol uygulaması ile P ve PS düzeylerinin anlamlı artmadığı göz önüne alındığında, hücrede düşük düzeyde P varlığının koruyucu, yüksek düzeyde ise toksik etkiye sahip olduğunu destekler niteliktedir (21, 98).

DCNP steroid sülfotransferaz enziminin non-spesifik bir inhibitörüdür ve P'den PS oluşumunu azaltması beklenmektedir. Çalışmamızda kolesterol ile birlikte uygulanan AB 25-35'in PS düzeyinde anlamlı bir artış oluşturmadığı ancak DCNP'nin AB ve kolesterol toksisitesinde koruyucu etkisi olduğu saptanmıştır. Kolesterol ile birlikte uygulanan AB 1-40 ve 1-42'in hem PS düzeyinde anlamlı bir artış oluşturduğu hem de sitotoksik etkileri olduğu saptandı. Aynı zamanda da bu sitotoksik etkiye karşı DCNP'nin koruyucu etkisi olduğu gösterildi. Bu durum PS sentezinin anlamlı düzeyde artış göstermediği AB 25-35 fragmanı için de geçerlidir. Bulgularımız fragmanlara bağlı olarak değişen sitotoksik etkide PS'nin rolü olduğunu ancak yine de DCNP'nin P'nin PS'ye dönüşüm inhibisyonu dışında farklı bir mekanizma ile de koruyucu olabileceğini desteklemektedir.

Çalışmamızda yüksek kolesterol düzeyine sahip nöronal hücrelerde AB peptit varlığında P ve PS sentez artışının nöronal hücre canlılığı üzerine olumsuz etkisi olabileceği ortaya konmuştur. Gerek AB gerekse AB ile birlikte kolesterol uygulaması ile elde edilen nöronal hücre ölümü P'nin PS'e dönüşümünü bloke eden non-spesifik steroid sülfotransferaz enzim inhibitörü (DCNP) ve kolesterolden pregnenolona dönüşümü sağlayan hız kısıtlayıcı enzimi inhibe eden aminoglutimidit ile önlenebilmiştir.

Nöronal hücrelerde AB proteininin fragman yapısına ve kolesterol düzeyine bağlı olarak P ve PS düzeylerini değiştirdiği gösterildi. Tek başına kolesterol P, PS düzeyini düşük oranda etkilerken, AB varlığında nörosteroidleri belirgin olarak artırdı. Bu durum bize AH ve kolesterol ile ilişkili mevcut hipotezlerden farklı olarak, yüksek kolesterollü bireylerde AB varlığında P / PS'e bağlı nöronal hücre ölümünün tetiklenebileceğini ve nöronal dejenerasyon oluşumunda AB peptid ve kolesterolün sinerjik etkili olabileceğini düşündürdü.

6 **SONUÇ VE ÖNERİLER**

Sonuç olarak, çalışmamız ile Alzheimer Hastalığı'nın temel hücresel patolojilerinden biri olan AB toksisitesinin oluşum mekanizmasında kolesterolün rolü hakkında yeni ve daha önce çalışılmamış olan nörosteroidler ile ilgili hipotezimizin geçerliliğini kanıtlayan in-vitro veriler elde edilmiş oldu. Saptanan bulgular aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- Nöronal hücrelerde AB proteini fragman yapısına ve kolesterol düzeyine bağlı olarak P ve PS düzeyini değiştirmektedir.
- Nöronal hücrelerde tek başına kolesterol P düzeyini düşük oranda, ancak AB varlığında belirgin olarak artırmaktadır.
- P ve PS düzey değişimlerine bağlı olarak hücre canlılığı değişmektedir.

Çalışmamız ile elde edilen bulgular öncül maddeleri kolesterolün varlığında nörosteroidlerin değişen düzeylerinin nöronal hücrelerde AB toksisitesinin oluşumunda etkili olabileceği tezimizi desteklemektedir.

Öneriler:

Çalışmamızda yüksek kolesterol varlığında steroid sentez inhibitörlerinin koruyucu etkilerinin kısmi olması ileriki çalışmalarda AB varlığında P ve PS oluşumu dışında oluşabilecek diğer toksik kolesterol metabolitleri üzerine daha detaylı çalışmalar yapılması gerektiğini düşündürmüştür. Hiperkolesterolemili AH riski taşıyan bireylerde, nöronal hasarı önlemek amacı ile nörosteroid ve sülfat esterleri arasındaki değişimin kısmi inhibisyonu gibi prognoza yardımcı olacak yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için in-vivo araştırmalar düşünülebilir. DCNP'nin AB toksisitesine karşı bulunan koruyucu etkisinin mekanizması daha detaylı araştırılmalı ve kolesterol metabolitlerinin ölçümünde standardize edilmiş çok daha etkili ölçüm yöntemleri kullanılmalıdır.

7 KAYNAKLAR

1. Reduction Rh-r-Whwacurw-r-WARDaR. World Alzheimer Report 2014: Dementia and Risk Reduction. 2014.
2. De-Paula VJ, Radanovic M, Diniz BS, Forlenza OV. Alzheimer's disease. Sub-cellular biochemistry. 2012;65:329-52. PubMed PMID: 23225010.
3. Nalivaeva NN, Turner AJ. The amyloid precursor protein: a biochemical enigma in brain development, function and disease. FEBS letters. 2013 Jun 27;587(13):2046-54. PubMed PMID: 23684647.
4. Zhu X, Perry G, Smith MA, Wang X. Abnormal mitochondrial dynamics in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Journal of Alzheimer's disease : JAD. 2013;33 Suppl 1:S253-62. PubMed PMID: 22531428. Pubmed Central PMCID: 4097015.
5. Przedborski S, Vila M, Jackson-Lewis V. Neurodegeneration: what is it and where are we? The Journal of clinical investigation. 2003 Jan;111(1):3-10. PubMed PMID: 12511579. Pubmed Central PMCID: 151843.
6. Gambelin TC, Chen F, Zambrano A, Abraha A, Lagalwar S, Guillozet AL, et al. Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Aug 19;100(17):10032-7. PubMed PMID: 12888622. Epub 2003/07/31. eng.
7. Ling Y, Morgan K, Kalsheker N. Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease. The international journal of biochemistry & cell biology. 2003 Nov;35(11):1505-35. PubMed PMID: 12824062.
8. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. Science. 2002 Jul 19;297(5580):353-6. PubMed PMID: 12130773.
9. Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. Current opinion in immunology. 2000 Feb;12(1):64-76. PubMed PMID: 10679404.
10. Tillement JP, Lecanu L, Papadopoulos V. Amyloidosis and neurodegenerative diseases: current treatments and new pharmacological options. Pharmacology.85(1):1-17. PubMed PMID: 19923873. Epub 2009/11/20. eng.
11. Cossec JC, Marquer C, Panchal M, Lazar AN, Duyckaerts C, Potier MC. Cholesterol changes in Alzheimer's disease: methods of analysis and impact on the formation of enlarged endosomes. Biochim Biophys Acta. Aug;1801(8):839-45. PubMed PMID: 20348021. Epub 2010/03/30. eng.
12. Bodovitz S, Klein WL. Cholesterol modulates alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein. The Journal of biological chemistry. 1996 Feb 23;271(8):4436-40. PubMed PMID: 8626795.
13. Tillement JP, Lecanu L, Papadopoulos V. Amyloidosis and neurodegenerative diseases: current treatments and new pharmacological options. Pharmacology. 2010;85(1):1-17. PubMed PMID: 19923873.
14. Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1985 Jun;82(12):4245-9. PubMed PMID: 3159021. Pubmed Central PMCID: 397973.
15. Finder VH, Glockshuber R. Amyloid-beta aggregation. Neuro-degenerative diseases. 2007;4(1):13-27. PubMed PMID: 17429215.
16. Brown RC, Cascio C, Papadopoulos V. Pathways of neurosteroid biosynthesis in cell lines from human brain: regulation of dehydroepiandrosterone formation by oxidative stress and beta-amyloid peptide. Journal of neurochemistry. 2000 Feb;74(2):847-59. PubMed PMID: 10646538.
17. Schaeffer V, Meyer L, Patte-Mensah C, Eckert A, Mensah-Nyagan AG. Dose-dependent and sequence-sensitive effects of amyloid-beta peptide on neurosteroidogenesis in human

- neuroblastoma cells. *Neurochemistry international*. 2008 May;52(6):948-55. PubMed PMID: 18295935.
18. Baulieu EE, Robel P, Schumacher M. Neurosteroids: beginning of the story. *International review of neurobiology*. 2001;46:1-32. PubMed PMID: 11599297.
 19. Baulieu EE. Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology*. 1998 Nov;23(8):963-87. PubMed PMID: 9924747.
 20. Mellon SH. Neurosteroid regulation of central nervous system development. *Pharmacology & therapeutics*. 2007 Oct;116(1):107-24. PubMed PMID: 17651807. Pubmed Central PMCID: 2386997.
 21. Akan P, Kizildag S, Ormen M, Genc S, Oktem MA, Fadiloglu M. Pregnenolone protects the PC-12 cell line against amyloid beta peptide toxicity but its sulfate ester does not. *Chemico-biological interactions*. 2009 Jan 15;177(1):65-70. PubMed PMID: 18926803.
 22. Cole SL, Vassar R. The Alzheimer's disease beta-secretase enzyme, BACE1. *Molecular neurodegeneration*. 2007;2:22. PubMed PMID: 18005427. Pubmed Central PMCID: 2211305.
 23. Evin G, Weidemann A. Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease Abeta amyloid peptides. *Peptides*. 2002 Jul;23(7):1285-97. PubMed PMID: 12128085.
 24. Portelius E, Zetterberg H, Gobom J, Andreasson U, Blennow K. Targeted proteomics in Alzheimer's disease: focus on amyloid-beta. *Expert review of proteomics*. 2008 Apr;5(2):225-37. PubMed PMID: 18466053.
 25. Simmons LK, May PC, Tomaselli KJ, Rydel RE, Fuson KS, Brigham EF, et al. Secondary structure of amyloid beta peptide correlates with neurotoxic activity in vitro. *Molecular pharmacology*. 1994 Mar;45(3):373-9. PubMed PMID: 8145724.
 26. Wang R, Sweeney D, Gandy SE, Sisodia SS. The profile of soluble amyloid beta protein in cultured cell media. Detection and quantification of amyloid beta protein and variants by immunoprecipitation-mass spectrometry. *The Journal of biological chemistry*. 1996 Dec 13;271(50):31894-902. PubMed PMID: 8943233.
 27. Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science*. 1990 Oct 12;250(4978):279-82. PubMed PMID: 2218531.
 28. Li G, Ma R, Huang C, Tang Q, Fu Q, Liu H, et al. Protective effect of erythropoietin on beta-amyloid-induced PC12 cell death through antioxidant mechanisms. *Neuroscience letters*. 2008 Sep 12;442(2):143-7. PubMed PMID: 18634846.
 29. Rowland LP. *Merritt's Neurology*. Onbirinci baskı ed: Güneş Tıp Kitabevleri; 2008. 771-6 p.
 30. AE Ö. *Nöroloji İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi temel ve klinik bilimler ders kitapları Nobel Tıp Kitabevleri*; 2004. 369 p.
 31. Shastri BS. Neurodegenerative disorders of protein aggregation. *Neurochemistry international*. 2003 Jul;43(1):1-7. PubMed PMID: 12605877.
 32. Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Alzheimer disease is multifactorial and heterogeneous. *Neurobiology of aging*. 2000 Nov-Dec;21(6):901-2; discussion 3-4. PubMed PMID: 11124439.
 33. Evans RM, Hui S, Perkins A, Lahiri DK, Poirier J, Farlow MR. Cholesterol and APOE genotype interact to influence Alzheimer disease progression. *Neurology*. 2004 May 25;62(10):1869-71. PubMed PMID: 15159498.
 34. Puglielli L, Tanzi RE, Kovacs DM. Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nature neuroscience*. 2003 Apr;6(4):345-51. PubMed PMID: 12658281.
 35. Gamba P, Leonarduzzi G, Tamagno E, Guglielmotto M, Testa G, Sottero B, et al. Interaction between 24-hydroxycholesterol, oxidative stress, and amyloid-beta in amplifying neuronal damage in Alzheimer's disease: three partners in crime. *Aging cell*. 2011 Jun;10(3):403-17. PubMed PMID: 21272192.
 36. Nelson TJ, Alkon DL. Oxidation of cholesterol by amyloid precursor protein and beta-amyloid peptide. *The Journal of biological chemistry*. 2005 Feb 25;280(8):7377-87. PubMed PMID: 15591071.

37. Huang Y. Apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Neurology*. 2006 Jan 24;66(2 Suppl 1):S79-85. PubMed PMID: 16432152.
38. Poirier J. Apolipoprotein E, cholesterol transport and synthesis in sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*. 2005 Mar;26(3):355-61. PubMed PMID: 15639314.
39. Martin M, Dotti CG, Ledesma MD. Brain cholesterol in normal and pathological aging. *Biochimica et biophysica acta*. 2010 Aug;1801(8):934-44. PubMed PMID: 20359547.
40. Gosselet F, Saint-Pol J, Fenart L. Effects of oxysterols on the blood-brain barrier: Implications for Alzheimer's disease. *Biochemical and biophysical research communications*. 2013 Nov 22. PubMed PMID: 24275140.
41. Prasanthi JR, Huls A, Thomasson S, Thompson A, Schommer E, Ghribi O. Differential effects of 24-hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol on beta-amyloid precursor protein levels and processing in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Molecular neurodegeneration*. 2009;4:1. PubMed PMID: 19126211. Pubmed Central PMCID: 2654562.
42. Yokoyama S. Release of cellular cholesterol: molecular mechanism for cholesterol homeostasis in cells and in the body. *Biochimica et biophysica acta*. 2000 Dec 15;1529(1-3):231-44. PubMed PMID: 11111092.
43. Benarroch EE. Brain cholesterol metabolism and neurologic disease. *Neurology*. 2008 Oct 21;71(17):1368-73. PubMed PMID: 18936430.
44. Ganong WF. Circumventricular organs: definition and role in the regulation of endocrine and autonomic function. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2000 May-Jun;27(5-6):422-7. PubMed PMID: 10831247.
45. Duvernoy HM, Risold PY. The circumventricular organs: an atlas of comparative anatomy and vascularization. *Brain research reviews*. 2007 Nov;56(1):119-47. PubMed PMID: 17659349.
46. Benarroch EE. Circumventricular organs: receptive and homeostatic functions and clinical implications. *Neurology*. 2011 Sep 20;77(12):1198-204. PubMed PMID: 21931109.
47. Kalaria RN. The blood-brain barrier and cerebrovascular pathology in Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1999;893:113-25. PubMed PMID: 10672233.
48. Zlokovic BV. Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends in neurosciences*. 2005 Apr;28(4):202-8. PubMed PMID: 15808355.
49. Desai BS, Monahan AJ, Carvey PM, Hendey B. Blood-brain barrier pathology in Alzheimer's and Parkinson's disease: implications for drug therapy. *Cell transplantation*. 2007;16(3):285-99. PubMed PMID: 17503739.
50. Zipser BD, Johanson CE, Gonzalez L, Berzin TM, Tavares R, Hulette CM, et al. Microvascular injury and blood-brain barrier leakage in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*. 2007 Jul;28(7):977-86. PubMed PMID: 16782234.
51. Hartz AM, Miller DS, Bauer B. Restoring blood-brain barrier P-glycoprotein reduces brain amyloid-beta in a mouse model of Alzheimer's disease. *Molecular pharmacology*. 2010 May;77(5):715-23. PubMed PMID: 20101004. Pubmed Central PMCID: 2872973.
52. Weill-Engerer S, David JP, Sazdovitch V, Liere P, Eychenne B, Pianos A, et al. Neurosteroid quantification in human brain regions: comparison between Alzheimer's and nondemented patients. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2002 Nov;87(11):5138-43. PubMed PMID: 12414884.
53. Compagnone NA, Mellon SH. Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2000 Jan;21(1):1-56. PubMed PMID: 10662535.
54. Colell A, Fernandez A, Fernandez-Checa JC. Mitochondria, cholesterol and amyloid beta peptide: a dangerous trio in Alzheimer disease. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 2009 Oct;41(5):417-23. PubMed PMID: 19784764.
55. Jaya Prasanthi RP, Schommer E, Thomasson S, Thompson A, Feist G, Ghribi O. Regulation of beta-amyloid levels in the brain of cholesterol-fed rabbit, a model system for sporadic Alzheimer's

- disease. Mechanisms of ageing and development. 2008 Nov;129(11):649-55. PubMed PMID: 18845178. Pubmed Central PMCID: 2629555.
56. Stefani M, Liguri G. Cholesterol in Alzheimer's disease: unresolved questions. Current Alzheimer research. 2009 Feb;6(1):15-29. PubMed PMID: 19199871.
 57. Vallee M, Purdy RH, Mayo W, Koob GF, Le Moal M. Neuroactive steroids: new biomarkers of cognitive aging. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology. 2003 Jun;85(2-5):329-35. PubMed PMID: 12943719.
 58. Robel P, Synguelakis M, Halberg F, Baulieu EE. [Persistence of the circadian rhythm of dehydroepiandrosterone in the brain, but not in the plasma, of castrated and adrenalectomized rats]. C R Acad Sci III. 1986;303(6):235-8. PubMed PMID: 2945623. Epub 1986/01/01. Persistance d'un rythme circadien de la dehydroepiandrosterone dans le cerveau, mais non dans le plasma, de rats castrés et surrenalectomisés. fre.
 59. Robel P, Bourreau E, Corpechot C, Dang DC, Halberg F, Clarke C, et al. Neuro-steroids: 3 beta-hydroxy-delta 5-derivatives in rat and monkey brain. J Steroid Biochem. 1987;27(4-6):649-55. PubMed PMID: 2961940. Epub 1987/01/01. eng.
 60. Iwahashi K, Ozaki HS, Tsubaki M, Ohnishi J, Takeuchi Y, Ichikawa Y. Studies of the immunohistochemical and biochemical localization of the cytochrome P-450scc-linked monooxygenase system in the adult rat brain. Biochim Biophys Acta. 1990 Aug 17;1035(2):182-9. PubMed PMID: 2393667. Epub 1990/08/17. eng.
 61. Le Goascogne C, Robel P, Guezou M, Sananes N, Baulieu EE, Waterman M. Neurosteroids: cytochrome P-450scc in rat brain. Science. 1987 Sep 4;237(4819):1212-5. PubMed PMID: 3306919. Epub 1987/09/04. eng.
 62. Jung-Testas I, Hu ZY, Baulieu EE, Robel P. Steroid synthesis in rat brain cell cultures. J Steroid Biochem. 1989;34(1-6):511-9. PubMed PMID: 2696851. Epub 1989/01/01. eng.
 63. Hu ZY, Bourreau E, Jung-Testas I, Robel P, Baulieu EE. Neurosteroids: oligodendrocyte mitochondria convert cholesterol to pregnenolone. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Dec;84(23):8215-9. PubMed PMID: 3479785. Epub 1987/12/01. eng.
 64. Plassart-Schiess E, Baulieu EE. Neurosteroids: recent findings. Brain research Brain research reviews. 2001 Nov;37(1-3):133-40. PubMed PMID: 11744081.
 65. Beaujean D, Mensah-Nyagan AG, Do-Rego JL, Luu-The V, Pelletier G, Vaudry H. Immunocytochemical localization and biological activity of hydroxysteroid sulfotransferase in the frog brain. Journal of neurochemistry. 1999 Feb;72(2):848-57. PubMed PMID: 9930762.
 66. Mellon SH, Griffin LD. Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. Trends Endocrinol Metab. 2002 Jan-Feb;13(1):35-43. PubMed PMID: 11750861. Epub 2001/12/26. eng.
 67. Stoffel-Wagner B. Neurosteroid metabolism in the human brain. Eur J Endocrinol. 2001 Dec;145(6):669-79. PubMed PMID: 11720889. Epub 2001/11/27. eng.
 68. Kallonen SE, Tammimäki A, Piepponen P, Raattamaa H, Ketola RA, Kostiaainen R. Discovery of neurosteroid glucuronides in mouse brain. Anal Chim Acta. 2009 Sep 28;651(1):69-74. PubMed PMID: 19733737. Epub 2009/09/08. eng.
 69. Dubrovsky BO. Steroids, neuroactive steroids and neurosteroids in psychopathology. Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry. 2005 Feb;29(2):169-92. PubMed PMID: 15694225.
 70. Melcangi RC, Panzica GC. Neuroactive steroids: old players in a new game. Neuroscience. 2006;138(3):733-9. PubMed PMID: 16343786.
 71. Rupprecht R, Holsboer F. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives. Trends Neurosci. 1999 Sep;22(9):410-6. PubMed PMID: 10441302. Epub 1999/08/11. eng.
 72. Zheng P. Neuroactive steroid regulation of neurotransmitter release in the CNS: action, mechanism and possible significance. Progress in neurobiology. 2009 Oct;89(2):134-52. PubMed PMID: 19595736.

73. Ramirez VD, Zheng J. Membrane sex-steroid receptors in the brain. *Front Neuroendocrinol*. 1996 Oct;17(4):402-39. PubMed PMID: 8905348. Epub 1996/10/01. eng.
74. Stoffel-Wagner B. Neurosteroid biosynthesis in the human brain and its clinical implications. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 Dec;1007:64-78. PubMed PMID: 14993041. Epub 2004/03/03. eng.
75. Schumacher M, Guennoun R, Mercier G, Desarnaud F, Lacor P, Benavides J, et al. Progesterone synthesis and myelin formation in peripheral nerves. *Brain Res Brain Res Rev*. 2001 Nov;37(1-3):343-59. PubMed PMID: 11744099. Epub 2001/12/18. eng.
76. Zhou YQ, Yang ZL, Xu L, Li P, Hu YZ. Akebia saponin D, a saponin component from *Dipsacus asper* Wall, protects PC 12 cells against amyloid-beta induced cytotoxicity. *Cell biology international*. 2009 Oct;33(10):1102-10. PubMed PMID: 19615455.
77. Mruthinti S, Capito N, Sood A, Buccafusc JJ. Cytotoxicity of Abeta1-42, RAGE23-54, and an Abeta-RAGE complex in PC-12 cells. *Current Alzheimer research*. 2007 Dec;4(5):581-6. PubMed PMID: 18220528.
78. Schaeffer V, Patte-Mensah C, Eckert A, Mensah-Nyagan AG. Modulation of neurosteroid production in human neuroblastoma cells by Alzheimer's disease key proteins. *Journal of neurobiology*. 2006 Jul;66(8):868-81. PubMed PMID: 16673391.
79. Guarneri P, Cascio C, Piccoli T, Piccoli F, Guarneri R. Human neuroblastoma SH-SY5Y cell line: neurosteroid-producing cell line relying on cytoskeletal organization. *Journal of neuroscience research*. 2000 Jun 1;60(5):656-65. PubMed PMID: 10820437.
80. Runz H, Rietdorf J, Tomic I, de Bernard M, Beyreuther K, Pepperkok R, et al. Inhibition of intracellular cholesterol transport alters presenilin localization and amyloid precursor protein processing in neuronal cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2002 Mar 1;22(5):1679-89. PubMed PMID: 11880497.
81. Fernandez A, Llacuna L, Fernandez-Checa JC, Colell A. Mitochondrial cholesterol loading exacerbates amyloid beta peptide-induced inflammation and neurotoxicity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009 May 20;29(20):6394-405. PubMed PMID: 19458211. Pubmed Central PMCID: 2740839.
82. Gamble W, Vaughan M, Kruth HS, Avigan J. Procedure for determination of free and total cholesterol in micro- or nanogram amounts suitable for studies with cultured cells. *Journal of lipid research*. 1978 Nov;19(8):1068-70. PubMed PMID: 731127.
83. Osman HYKC. COMPARATIVE SENSITIVITIES OF CHOLESTEROL ANALYSIS USING GC, HPLC AND SPECTROPHOTOMETRIC METHODS. *The Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 10(2), 205 - 210. 2006.
84. Schumacher M, Liere P, Akwa Y, Rajkowski K, Griffiths W, Bodin K, et al. Pregnenolone sulfate in the brain: a controversial neurosteroid. *Neurochemistry international*. 2008 Mar-Apr;52(4-5):522-40. PubMed PMID: 18068870.
85. Semeniuk T, Jhangri GS, Le Melledo JM. Neuroactive steroid levels in patients with generalized anxiety disorder. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*. 2001 Summer;13(3):396-8. PubMed PMID: 11514647.
86. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 1994 Sep 1;84(5):1415-20. PubMed PMID: 8068938.
87. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of immunological methods*. 1995 Jul 17;184(1):39-51. PubMed PMID: 7622868.
88. Shirakawa H, Katsuki H, Kume T, Kaneko S, Akaike A. Aminoglutethimide prevents excitotoxic and ischemic injuries in cortical neurons. *British journal of pharmacology*. 2006 Apr;147(7):729-36. PubMed PMID: 16474421. Pubmed Central PMCID: 1751506.

89. Zhu TS, Glaser M. Regulatory role of cytochrome P450_{sc} and pregnenolone in myelination by rat Schwann cells. *Molecular and cellular biochemistry*. 2008 Jun;313(1-2):79-89. PubMed PMID: 18373277.
90. Guarneri P, Cascio C, Russo D, D'Agostino S, Drago G, Galizzi G, et al. Neurosteroids in the retina: neurodegenerative and neuroprotective agents in retinal degeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2003 Dec;1007:117-28. PubMed PMID: 14993046.
91. Marx CE, Jarskog LF, Lauder JM, Gilmore JH, Lieberman JA, Morrow AL. Neurosteroid modulation of embryonic neuronal survival in vitro following anoxia. *Brain research*. 2000 Jul 14;871(1):104-12. PubMed PMID: 10882789.
92. Refolo LM, Malester B, LaFrancois J, Bryant-Thomas T, Wang R, Tint GS, et al. Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiology of disease*. 2000 Aug;7(4):321-31. PubMed PMID: 10964604.
93. Reiman EM, Chen K, Langbaum JB, Lee W, Reschke C, Bandy D, et al. Higher serum total cholesterol levels in late middle age are associated with glucose hypometabolism in brain regions affected by Alzheimer's disease and normal aging. *NeuroImage*. 2010 Jan 1;49(1):169-76. PubMed PMID: 19631758. Pubmed Central PMCID: 2888804.
94. Shepardson NE, Shankar GM, Selkoe DJ. Cholesterol level and statin use in Alzheimer disease: II. Review of human trials and recommendations. *Archives of neurology*. 2011 Nov;68(11):1385-92. PubMed PMID: 22084122. Pubmed Central PMCID: 3248784.
95. Hall JR, Wiechmann AR, Johnson LA, Edwards M, Barber RC, Cunningham R, et al. Total Cholesterol and Neuropsychiatric Symptoms in Alzheimer's Disease: The Impact of Total Cholesterol Level and Gender. *Dementia and geriatric cognitive disorders*. 2014 Jul 4;38(5-6):300-9. PubMed PMID: 25011444.
96. Allinquant B, Clamagirand C, Potier MC. Role of cholesterol metabolism in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2014 Jul;17(4):319-23. PubMed PMID: 24839952.
97. Cossec JC, Marquer C, Panchal M, Lazar AN, Duyckaerts C, Potier MC. Cholesterol changes in Alzheimer's disease: methods of analysis and impact on the formation of enlarged endosomes. *Biochimica et biophysica acta*. 2010 Aug;1801(8):839-45. PubMed PMID: 20348021.
98. Gursoy E, Cardounel A, Kalimi M. Pregnenolone protects mouse hippocampal (HT-22) cells against glutamate and amyloid beta protein toxicity. *Neurochemical research*. 2001 Jan;26(1):15-21. PubMed PMID: 11358277.
99. Guarneri P, Russo D, Cascio C, De Leo G, Piccoli T, Sciuto V, et al. Pregnenolone sulfate modulates NMDA receptors, inducing and potentiating acute excitotoxicity in isolated retina. *Journal of neuroscience research*. 1998 Dec 15;54(6):787-97. PubMed PMID: 9856862.
100. Cascio C, Guarneri R, Russo D, De Leo G, Guarneri M, Piccoli F, et al. Pregnenolone sulfate, a naturally occurring excitotoxin involved in delayed retinal cell death. *Journal of neurochemistry*. 2000 Jun;74(6):2380-91. PubMed PMID: 10820199.

8 EKLER

EK-1:Etik Kurul Onayı

EK-2: Özgeçmiş

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Konu: Karar hk.- 279

16.05.2011

Doç.Dr.Pınar AKAN
Dok.Öğr.Özlem Gürsoy ÇALAN

Kurulumuz tarafından 05.05.2011 tarih ve 192-GOA protokol numaralı 2011/15-05 karar numarası ile görüşülen "Nöronal hücre içi kolesterol düzeylerinin amiloid beta toksisitesi ve nörosteroidlerin sentezi üzerine etkisi" konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve teşekkürlerinizi rica ederim.


Prof.Dr.Banu ÖNVURAL
Başkan

Ek: Etik Kurul Kararı

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi İnciraltı 35340 İZMİR-TÜRKİYE
Tel:0 232 4122254 - 0 232 4122258 Faks: 0232 4122243 Elektronik posta:etikkurul@deu.edu.tr



DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
FAKS	0 232 412 22 43
E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	192-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Nöronal hücre içi kolesterol düzeylerinin amiloid beta toksisitesi ve nörosteroidlerin sentezi üzerine etkisi
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	-
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Doç.Dr.Pınar AKAN Dok.Öğr.Özlem Gürsoy ÇALAN Biyokimya A.D.
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐



KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2011/15-05	Tarih:05.05.2011
	Doç.Dr.Pınar AKAN'ın sorumlusu Dok.Öğr.Özlem Gürsoy ÇALAN'ın yürütücüsü olduğu "Nöronal hücre içi kolesterol düzeylerinin amiloid beta toksisitesi ve nörosteroidlerin sentezi üzerine etkisi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Etik Kurullar Yönetmeliği , İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>[Signature]</i>
Prof.Ph.D.Besti ÜSTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Yüksek Hemşire	DEU Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E ☐	H ☒	<i>[Signature]</i>
Prof.Dr.Osman AÇIKGÖZ	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	<i>[Signature]</i>
Prof.Dr.Mehtap MALKOÇ	Ph.D.Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksekokulu	Kadın	E ☐	H ☒	<i>[Signature]</i>
Prof.Ph.D.Zuhal BAHAR	Ph.D. Yüksek Hemşire, Halk Sağlığında doktora	DEU Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E ☐	H ☒	<i>[Signature]</i>
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	<i>[Signature]</i>
Prof.Dr.Ömer Selahattin TOPALAK	İç Hastalıkları (Gastroenteroloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	<i>[Signature]</i>
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>[Signature]</i>
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	<i>[Signature]</i>
Prof.Dr.Servet AKAR	İç Hastalıkları (Romatoloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>[Signature]</i>
Doç.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>[Signature]</i>
Doç.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>[Signature]</i>
Doç.Dr.Işıl TEKMEK	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>[Signature]</i>
Prof.Ph.D.Meltem Kutlu GÜRSEL	Hukuk	D.E.Ü Hukuk Fakültesi İdare Hukuku Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>[Signature]</i>
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐	H ☒	<i>[Signature]</i>



Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

ÖZGEÇMİŞ
Öğretim Görevlisi
(Dr.) ÖZLEM GÜRSOY
ÇALAN

TC Kimlik No / Pasaport No:	51229229888
Doğum Yılı:	1977
Yazışma Adresi :	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı 35330 İzmir/Türkiye
Telefon :	232-4124401
e-posta :	ozlemgursoycalan@yahoo.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	TIP FAKÜLTESİ	BİYOKİMYA	Tıpta Uzmanlık	2010
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	TIP FAKÜLTESİ	Tıp Doktorluğu	Lisans	2000

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Dokuz Eylül Üniversitesi	Türkiye	İzmir	TIP FAKÜLTESİ	Öğretim Görevlisi (Dr.)	2014-
Karşıyaka Devlet Hastanesi	Türkiye	İzmir	BİYOKİMYA LAB.	Yönetici	2010-2014
Ağrı Devlet Hastanesi	Türkiye	Ağrı	BİYOKİMYA LAB.	Yönetici	2010-2011
Dokuz Eylül Üniversitesi	Türkiye	İzmir	TEMEL TIP BİLİMLERİ	Araştırma Görevlisi (Dr.)	2004-2010
BALÇOVA 2 NOLU SAĞLIK OCAĞI	Türkiye	İzmir	Sağlık Ocağı		2002-2004
AKINCILAR 3 NOLU SAĞLIK OCAĞI	Türkiye	Manisa	Sağlık Ocağı		2001-2002

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Hormonların Biyokimyası , Biyokimya , Diğer , Nörofizyoloji , Moleküler Biyokimya

PROJE DENEYİMİ

Proje Adı	Kurum	Bütçe	Tarih	Görev	Proje Türü
Nöronal Hücre Hatlarında Amiloid Beta peptidin Oluşturduğu Hasarda Nörosteroidlerin Rolü	Dokuz Eylül Üniversitesi	34209	31.03.2007-30.03.2010	Araştırmacı/Uzman	Kurumsal (BAP v.b.)
Nöronal hücre içi kolesterol düzeylerinin Amiloid Beta toksisitesi ve nörosteroidlerin sentezi üzerine etkisi		217085	01.05.2011-01.05.2013	Araştırmacı/Uzman	Ulusal
Nöronal hücre içi kolesterol düzeylerinin amiloid beta toksisitesi ve nörosteroidlerin sentezi üzerine etkisi	TÜBİTAK Başkanlık	244000	01.05.2011-01.05.2013	Araştırmacı/Uzman	Ulusal
Aminoglutethimidin nöronal hücre hatlarında steroid sentezi ve amiloid beta peptit toksisitesi	Dokuz Eylül Üniversitesi	32000	11.03.2013-11.03.2015	Araştırmacı/Uzman	Ulusal
Gestasyonel Diyabetli Hastalarda Apelin, Fetuin-A ve D Vitamininin İnsülin Direnci ile Olan	Dokuz Eylül Üniversitesi	30000	03.09.2012-03.09.2014	Araştırmacı/Uzman	Ulusal
Stronsiyum ranelat tedavisi gören postmenopozal osteoporozlu hastalarda tedavinin klinik, laboratuvar ve yaşam kalitesi üzerine etkisinin gözlenmesi	Dokuz Eylül Üniversitesi	24000	02.01.2006-02.01.2007	Araştırmacı/Uzman	Ulusal

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/ üyelik vb.)		Türk Klinik Biyokimya Derneği (Üyelik)-2004	

ÖDÜLLER

Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
------------	------------------	------

YAYINLARI**SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler**

Bilgir, Ferda; Bilgir, Oktay; Calan, Mehmet; Calan, Ozlem; Isikyakar, Tolgay, Subclinical hypothyroidism: Comparison of adhesion molecule levels before and after levothyroxine therapy, 2014, JOURNAL OF INTERNATIONAL MEDICAL RESEARCH
Bilgir, Oktay; Bilgir, Ferda; Topcuoglu, Tuba; Calan, Mehmet; Calan, Ozlem, Comparison of high-sensitivity C-reactive protein and fetuin-A levels before and after treatment for subjects with subclinical hyperthyroidism, 2014, ENDOCRINE
Calan, Mehmet; Calan, Ozlem; Gonen, Mustafa Sait; Bilgir, Ferda; Kebapcilar, Levent; Kulac, Esin; Cinali, Turker; Bilgir, Oktay, Examination of Adhesion Molecules, Homocysteine and hs-CRP in Patients with Polygenic Hypercholesterolemia and Isolated Hypertriglyceridemia, 2011, INTERNAL MEDICINE
Pamuk, Baris Onder; Yilmaz, Hamiyet; Topcuoglu, Tugba; Bilgir, Oktay; Calan, Ozlem; Pamuk, Gulseren; Ertugrul, Derun Taner, Fetuin-A levels in hyperthyroidism, 2013, CLINICS
Yilmaz, Ozgur; Calan, Ozlem; Kume, Tuncay; Calan, Mehmet, The relationship of urotensin II with insulin resistance and hs-CRP in patients having PCOS, 2013, GYNECOLOGICAL ENDOCRINOLOGY

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Özkaya, Füsün; Özmen, Elvan; Akan, Pınar; Gürsoy Çalan, Özlem; Özel, Özgür; Ergürz, Sibel; Günerli, Ali; Gökmen, Ali Necati , Ratlarda Gece veya Gündüz İzofluran Uygulaması Plazma Melatonin Düzeyini Etkiler, 2013, Turk J Anaesth Reanim
Gürsoy Çalan, Ö.,Akan P. ,Bağrıyanık HA., Fadiloğlu,M., The Assesment of Vital Responses of Human and Rat Neuronal Cells Against to Amyloid Beta Peptide and Neuroactive Steroid Treatment, 2015, Journal of Neurological Sciences,

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

Beş Farklı Otoanalizörün Ürettiği Sıvı Atık İçeriklerinin Belirlenmesi, XIII. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi, 2013
Prenatal Risk Belirlemede Kullanılan İki Farklı Bilgisayar Programının Karşılaştırılması, XII. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi, 2012
Santral Erken Puberte Tanısında Serum Nörokinin B Düzeyinin Önemi ve Serum Kisspeptid ve Leptin Düzeyleri ile İlişkisi, "XVIII. Ulusal Pediatrik Endokrinoloji ve Diyabet Kongresi, 2014
The Effect of the Treatment of Amyloid Beta Peptide and Cholesterol on Neuronal Cell Viability, Uluslararası katılımlı I. Hücre Ölümü Araştırma Kongresi, 2013
Comparison of hs-CRP and Fetuin-A Levels Before and After the Treatment of Subjects with Subclinical Hyperthyroidism, 15th European Congress of Endocrinology, 2013
Comparison of Pre- and Post-levothyroxine hs-CRP and Fetuin-A Levels in Subclinical Hypothyroidism, 15th European Congress of Endocrinology, 2013
The Effect of Cholesterol on Neurosteroid Synthesis in the Presence of Neuronal Amyloid Beta Toxicity, Uluslararası katılımlı I. Hücre Ölümü Araştırma Kongresi, 2013

Prematür telarş olgularında serum nesfatin-1 düzeyinin klinik önemi ve serum leptin düzeyi ile ilişkisi, 58. Milli Pediatri Kongresi, 2014
I. Trimestr Prenatal Risk Belirlemede İki Farklı Sistemin Analitik Ve Risk Hesaplama Yöntemlerinin Karşılaştırılması, XII. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi, 2012
Gestasyonel Diyabette Maternal Fetuin-A, Leptin ve hs-CRP Düzeyi, 49.Ulusal Diyabet Kongresi, 2013
Pregnenolon ve Pregnenolon Sülfatın Sıçan ve İnsan kaynaklı Nöronal Hücre Hatlarında Vital Fonksiyonlar Üzerine Doza Bağlı Etkisi, XII. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi, 2012
Ozlem GURSOY ÇALAN , Pinar AKAN, Murat ORMEN, Meral FADİLOGLU. The Effect Of DCNP On Amyloid Beta Peptide Toxicity And Pregnenolone Sulfate Synthesis. CLİNICAL TRIALS ON ALZHEİMERS DİSEASE, TOLOUSE, FRANCE, 2010
S. Gülbabar, B. Akgün, B. Dilek, E. Şahin, M. Manisalı, H. İşlekel, Ö. Gürsoy, N. Gezer, S. Alper. Postmenapozal Osteoporozlu Hastalarımızda Kemik döngüsü Biyokimyasal Belirteçleri ile Kemik Mineral Yoğunluğu ve Vertebral Kırık Arasındaki İlişki. 3. Ulusal Osteoporoz Kongresi, Antalya, Türkiye, 2008
S. Gülbabar, E. Şahin, B. Akgün, B. Dilek, M. Manisalı, H. İşlekel, Ö. Gürsoy, G. Keser, N. Gezer, S. Alper. Postmenapozal Osteoporozlu Hastalarda Stronsiyum Ranelat Tedavisinin Kemik Mineral Yoğunluğu, Vertebral Kırık Profili ve Yaşam Kalitesi Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi. 3. Ulusal Osteoporoz Kongresi, Antalya, Türkiye, 2008
Zuhal Başkan, Binnaz Demirkan, Halil Ateş, Tevfik Demir, Özlem Gürsoy Çalan, Hüray İşlekel, Rüksan Çehreli, Tuğba Yavuzşen, Aydan Çavuşoğlu, Mehmet Alakavuklar. Metastatik Meme Kanseri Hastalarda İnflamatuvar Sitokin, Akut Faz Reaktanları, Hematolojik Parametreler, Bioelektrik İmpedans Analizleri ve Üç Kür Epirubisin ve Dosetaksel Tedaviyle Alınan Yanıt Etkisi. 3. Ulusal Tıbbi Onkoloji Kongresi, Aksu, Antalya, Türkiye, 2006
Özlem GURSOY ÇALAN, Tuncay KÜME, Canan ÇOKER. Yeni Bir Yöntemin Rutine Uyarlanması Performansın Değerlendirilmesi ve Yöntem Karşılaştırma: Laktik Asit Modeli. VI. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi, Antalya, Türkiye, 2006
Özlem GURSOY ÇALAN, Dilek ÇİMRİN, Pinar TUNCEL. 24 Saatlik İdrar Toplanması Doğruluğunun Ve İdrar Kalsiyum Analizinde Kalsiyum/Kreatinin Oranının Kullanımının Değerlendirilmesi. Osteoporoz Biyokimyasal Yaklaşım Sempozyumu, Kastamonu, Türkiye, 2005

Diğer yayınlar

Düzenleme Tarihi :02/03/2015