



T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PC12 HÜCRE HATTINDA $A\beta_{25-35}$ İLE İNDÜKLENEN HÜCRE
SİTOTOKSİSİTESİ VE OKSİDATİF HASAR ÜZERİNE
ŞİKONİNİN ETKİLERİ**

Neslihan ÖZTAŞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Seyithan TAYSI

Gaziantep
2017

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

**PC12 HÜCRE HATTINDA A β ₂₅₋₃₅ İLE İNDÜKLENEN HÜCRE
SİTOTOKSİSİTESİ VE OKSİDATİF HASAR ÜZERİNE ŞİKONİNİN
ETKİLERİ**

Neslihan ÖZTAŞ

Tez Savunma Tarihi: 13.06.2017

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

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

Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

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

Prof. Dr. Seyithan TAYSI

Tez Danışmanı

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

Tez Jürisi

İmzası

Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU

Prof. Dr. Seyithan TAYSI

Yrd.Doç.Dr. Elif DEMİR

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olup tezin planlanması ve yazım aşamasında etik dışı davranışım olmayıp, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurullar içinde elde ettim. Bu tez çalışmasında elde edilen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynak listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edecek herhangi bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

01.06.2017

Neslihan ÖZTAŞ

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde bilgilerini, deneyimlerini ve gerekli tüm yardımlarını benden esirgemeyen ve tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı danışmanım Prof. Dr. Seyithan TAYSI' ya teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince her konuda öneri ve eleştirileriyle yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIĞLU'na, Prof. Dr. İclal GEYİKLİ ÇİMENÇİ'ye, Prof. Dr. Binnur ERBAĞCI'ya, Prof. Dr. Maher ALMOKDAD'a, Doç. Dr. Hülya ÇİÇEK'e, Yrd. Doç. Dr. Mustafa ÖRKMEZ'e ve Yrd. Doç. Dr. Elif İŞBİLEN'e teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmam boyunca ve tezimdiki deneysel çalışmaların yönlendirilmesi, sonuçların değerlendirilmesinde gerekli yardımlarını benden esirgemeyen Prof. Dr. Suat ERDOĞAN'a teşekkür ederim.

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

Hayatımın iyi ve kötü tüm zamanlarında yanımda olan, bana her konuda destek veren sevgili arkadaşlarım Elif MIZRAK BİLKAY'a, Mehmet BİLKAY'a ve Ahmet DEMİREL'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	iv
TABLO LİSTESİ.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Alzheimer Hastalığı	5
2.2. Alzheimer Hastalığı Epidemiyolojisi.....	8
2.3. Alzheimer Hastalığı'nın Nöropatolojisi ve Patogenezi.....	9
2.3.1. Amiloid Plak (AP) Oluşumu	11
2.3.2. Nörofibriler Yumaklar (NFY)	13
2.3.3. Gliyozis ve İnflamatuvar Mekanizma	15
2.3.4. Nöron ve Sinaps Kaybı.....	15
2.3.5. Kolinerjik İnevarsiyon ve Diğer Nörotransmitter Kayıpları.....	16
2.3.6. Oksidatif Hasar Mekanizması.....	17
2.3.6.1. Lipid Peroksidasyonu.....	21
2.3.6.2. Protein Oksidasyonu.....	22
2.3.6.3. Oksidatif DNA Hasarı.....	22
2.4. Şikonin	23
2.4.1. Şikoninin Biyoyararlanım ve Farmakokinetik Özellikleri.....	24
2.4.2. Şikoninin Antioksidan Etkisi.....	24
2.4.3. Şikoninin Nöroprotektif Etkisi	25
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	26
3.1. Kullanılan Gereçler ve Sarf Malzemeler.....	26
3.2. Araştırmada Kullanılan Yöntemler	28
3.2.1. PC12 Hücrelerinin in vitro Koşullarda Kültürü	28
3.2.1.1. PC12 Hücreleri.....	28
3.2.1.2. Hücre Kültür Kaplarının Poli-lizin ile Kaplanması.....	29
3.2.1.3. Donmuş Hücrelerin Çözdürülmesi.....	30

3.2.1.4. Hücrelerin Pasajlanması ve Dondurulması.....	30
3.2.2. Hücre Canlılık Testi (MTT).....	32
3.2.2.1. A β ₂₅₋₃₅ Toksisitesi ile <i>in vitro</i> Alzheimer Modelinin Oluşturulması.....	32
3.2.2.2. Şikoninin Doz Aralığının Belirlenmesi.....	33
3.2.2.3. Şikoninin A β ₂₅₋₃₅ Toksisitesine Karşı Etkilerinin Belirlenmesi.....	34
3.2.3. Oksidatif Hasar Testleri.....	34
3.2.3.1. TBARS Testi.....	36
3.2.3.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Testi.....	37
3.2.3.3. Katalaz (CAT) Testi.....	37
3.2.3.4. Süperoksit Dismutaz (SOD) Testi.....	38
3.2.3.5. Nitrit/Nitrat Kolorimetrik Testi.....	39
3.3. İstatiksel Analiz.....	39
4.BULGULAR	40
4.1. MTT Hücre Viabilite Testi Sonuçları	40
4.1.1. A β ₂₅₋₃₅ Toksisitesi ile <i>in vitro</i> Alzheimer Modelinin Oluşturulması.....	40
4.1.2. Şikonin Molekülünün Doza Bağlı Hücre Canlılığına Etkisi	41
4.1.3. Şikoninin A β ₂₅₋₃₅ Toksisitesine Karşı Etkisi	42
4.2. Şikoninin Oksidatif Hasara Karşı Korucu Etkileri.....	43
4.2.1. Lipit Peroksidasyonu-TBARS Testi Bulguları.....	43
4.2.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Testi Bulguları	43
4.2.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Testi Bulguları	44
4.2.4. Katalaz Testi Bulguları.....	45
4.3. Nitrik Oksit Testi Bulguları	45
5. TARTIŞMA	47
6. KAYNAKLAR	53

SİMGELER ve KISALTMALAR

AH	Alzheimer hastalığı
APP	Amiloid prekürsör protein
AP	Amiloid plak
ApoE	Apolipoprotein E
Ach	Asetilkolin
CAT	Katalaz
DPPH	1,1,-diphenyl-2-picryl-hydrazyl
EBAH	Erken başlangıçlı Alzheimer hastalığı
ELISA	Enzim bağlı immunosorbent yöntem
ER	Endoplazmik retikulum
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
GSH	Glutasyon
HNE	4-hidroksi-2-nonenal
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
mt-DNA	Mitokondri DNA'sı
MAP	Mikrotübül ilişkili protein
MDA	Malondialdehit
3-NT	3-nitrotirozin
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NFY	Nörofibriler yumak
NMDA	N-metil-D-aspartat
NO•	Nitrik oksit
NO ₂	Nitrojen dioksit
O ₂ • ⁻	Süperoksit radikali
OH•	Hidroksil radikali
ONOO ⁻	Peroksinitrit
PHF	Çift sarmallı flaman
RNT	Reaktif nitrojen türleri

ROT	Reaktif oksijen türleri
ROO [•]	Peroksi radikalleri
RO [•]	Alkoksil radikalleri
Se	Selenyum
SSS	Santral sinir sistemi
SOD	Süperoksit dismutaz
TRH	Tirotropin salgılatıcı hormon



TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Çalışmada kullanılan cihazlar	26
Tablo 2: Çalışmada kullanılan kimyasallar	27



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Aynı yaşa ait sağlıklı beyin (solda) ile Alzheimer Hastasına ait beyin (sağda).....	5
Şekil 2: AH tanısında DSM-IV kriterleri.....	6
Şekil 3: AH nöropatolojisinde görülen AP ve NFY oluşumları.....	10
Şekil 4: Sekretaz enzimlerinin APP'yi kesmesiyle oluşan fragmanlar.....	11
Şekil 5: Amiloid Kaskad hipotezi.....	12
Şekil 6: AH'de A β toksisitesi.....	13
Şekil 7: Tau fosforilasyonu ve NFY oluşumu.....	14
Şekil 8: AH'de oksidatif stresin olası mekanizması.....	17
Şekil 9: ROT'un ekzojen ve endojen kaynakları.....	18
Şekil 10: AH'da ROS oluşumu.....	21
Şekil 11: Şikonin ve türlerinin kimyasal yapısı.....	23
Şekil 12: PC12 hücrelerinin ters faz ışık mikroskopundaki görüntüsü, (20x) büyütme	29
Şekil 13: MTT'nin süksinat dehidrogenaz aktivitesi ile formazan kristaline dönüşümü.....	32
Şekil 14: MDA oluşumu ve MDA-TBA arasında meydana gelen reaksiyon.....	36
Şekil 15: PC12 hücrelerinin farklı konsantrasyondaki A β_{25-35} ile 24 saat inkübasyonu sonucu elde edilen MTT sonuçları	40
Şekil 16: Hücrelerin farklı A β_{25-35} konsantrasyonlarına maruziyeti, 48 saat sonra yapılan MTT sonuçları.....	41
Şekil 17: Hücrelerin farklı A β_{25-35} konsantrasyonlarına maruziyeti, 72 saat sonra yapılan MTT sonuçları.....	41
Şekil 18: Farklı konsantrasyonlarda uygulanan şikonin dozlarının 24 saatlik uygulaması sonucu elde edilen MTT sonuçları	42
Şekil 19: Şikoninin (20 μ M) A β (5 μ M) toksisitesine karşı koruyucu etkisinin MTT canlılık testi ile değerlendirilmesi	42
Şekil 20: Şikoninin lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etkisinin belirlenmesi	43
Şekil 21: Şikoninin SOD enzimi üzerine etkisinin belirlenmesi	44

Şekil 22: Şikoninin GSH-Px aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi	44
Şekil 23: Şikoninin CAT aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi	45
Şekil 24: Şikoninin NO [•] düzeyi üzerine etkisinin belirlenmesi	46



ÖZET

PC12 HÜCRE HATTINDA $A\beta_{25-35}$ İLE İNDÜKLENEN HÜCRE SİTOTOKSİSİTESİ VE OKSİDATİF HASAR ÜZERİNE ŞİKONİNİN ETKİLERİ

Neslihan ÖZTAŞ

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Seyithan TAYSI

Haziran 2017, 61 sayfa

Alzheimer Hastalığı (AH) ilerleyici hafıza kaybı ile seyreden, kronik nörodejeneratif bir hastalıktır. Şikonin antioksidan, anti-inflamatuar, anti-trombotik, anti-mikrobial, anti kanser ve yara iyileşmesi gibi birçok olumlu etkiye sahip olduğu görülmüştür. Bu tez çalışmasında PC12 hücre hattında $A\beta_{25-35}$ ile oluşturulan AH modelinde şikonin'in $A\beta$ toksisitesine ve sonucunda oluşan oksidatif hasara karşı olası koruyucu etkisinin varlığı araştırılması amaçlanmıştır. $A\beta_{25-35}$ ve şikoninin PC12 hücre canlılığı üzerine etkileri MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5 diphenyl-2H-tetrazolium bromide] yöntemi ile belirlendi. Süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (CAT) aktiviteleri, malondialdehit (MDA) ve nitrik oksit (NO^*) düzeyleri ELISA yöntemi ile analiz edildi. $5\mu M$ $A\beta_{25-35}$ ile azalan hücre viabilitesinin $20\mu M$ şikonin ilavesi ile anlamlı bir şekilde arttığı, $A\beta_{25-35}$ ile artan NO^* ve MDA düzeyleri şikonin ilavesi ile azaldığı, $A\beta_{25-35}$ ile azalan SOD ve GSH-Px enzim aktiviteleri şikonin ilavesi ile arttığı ve benzer şekilde $A\beta_{25-35}$ ile azalan katalaz enzim aktivitesi şikonin ilavesi ile arttığı gözlemlendi. $A\beta_{25-35}$ ile PC12 hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelinde şikoninin oluşan nöronal sitotoksosite ve oksidatif hücre hasarı üzerine olumlu etkilerini ortaya koymuştur. Böylece, şikoninin AH'ında önemli bir patofizyolojik mekanizma olan $A\beta$ ile indüklenen sitotoksosite ve oksidatif hasarın önlenmesinde potansiyel bir ajan olabileceği düşüncemizi desteklenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer Hastalığı, Amiloid β , oksidatif stres, şikonin

ABSTRACT

THE EFFECT OF SHIKONIN ON A β ₂₅₋₃₅ INDUCED CELL CYTOTOXICITY AND OXIDATIVE INJURY IN PC12 CELL LINE

Neslihan ÖZTAŞ

Masters thesis, Department of Medical Biochemistry

Supervisor: Prof. Dr. Seyithan TAYSI

June 2017, 61 pages

Alzheimer's Disease (AD) is a chronic neurodegenerative disorder characterized by progressive loss of memory. Shikonin has been shown to have many positive effects such as anti-oxidant, anti-inflammatory, antithrombotic, antimicrobial, anticancer and wound healing properties. In this study, using the AD model induced with A β ₂₅₋₃₅ in the PC12 cell line, we aimed to investigate the potential protective effect of Shikonin against A β toxicity and its resulting oxidative damage. The effects of A β ₂₅₋₃₅ and shikonin on PC12 cell viability was determined by MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5 diphenyl-2H tetrazolium bromide] assay. To examine the effects of A β ₂₅₋₃₅ and Shikonin oxidative stress, we analyzed the levels of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) and lipid peroxidation product, malondialdehyde (MDA) using Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) method. Nitric oxide (NO[•]) was colorimetrically analyzed by Griess method. On addition of 20 μ M shikonin, reduced cell viability noted with 5 μ M A β ₂₅₋₃₅ was significantly increased. increased levels of NO[•] and MDA by A β ₂₅₋₃₅ decreased by the addition of shikonin, increased SOD and GSH-Px enzyme activities reduced A β by the addition of shikonin. Similarly, CAT enzyme activity decreased with A β ₂₅₋₃₅ by the addition of shikonin. Results obtained from this study reveal the positive effects of shikonin on neurotoxicity and oxidative damage in A β ₂₅₋₃₅-induced AD model created in vitro in the PC12 cells We therefore are of the opinion that shikonin may be a potential agent in preventing the cytotoxicity and oxidative damage induced by A β .

Key Words: Alzheimer's Disease, Amyloid β , Oxidative stress, Shikonin.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

İlk olarak 1907 yılında Alman hekim Alois Alzheimer tarafından Alzheimer Hastalığı (AH) klinik ve nöropatolojik özellikleri ile tanımlanmıştır (1,2). AH ilerleyici hafıza kaybı ile seyreden, kronik nörodejeneratif bir hastalıktır. Günümüzde ölüm nedenleri arasında altıncı sırada yer alan bu hastalık ilerleme sürecinde, hastayla beraber hasta yakınlarını da etkilediği için sosyo-ekonomik bir problem oluşturmaktadır (3).

AH'nin görülme oranı yaşa bağlı olarak logaritmik şekilde artmaktadır (4,5). AH, demansın en sık nedeni olup 21.yüzyılda en önemli sağlık sorunlarından biri olmuştur (6). Toplum bazında hastalığın görülme sıklığı 65 yaşın altında %4 iken, 85 yaş ve üstünde %38 olarak bildirilmiştir (7).

AH ilerleyici, kronik ve geri dönüşümsüz bir nörodejeneratif hastalıktır. Ancak hastalığın kesin patofizyolojisi henüz ortaya konulamamıştır. İlerleyici sinaptik bozulma ve nöron kaybının yanı sıra, hücre dışında amiloid plakların (AP) birikimi, hücre içinde ise nörofibriler yumakların (NFY) oluşumu bu hastalığın patogenezindeki temel değişikliklerdir. AP'nin temel bileşeni amiloid beta ($A\beta$) proteini iken, NFY'lerin ana bileşeni hiperfosforile tau proteinidir. AH patogenezinde, tau proteininin hiperfosforilasyonuna yol açan hipoaktif fosfatazlar ve/veya hiperaktif kinazlar tau proteinin mikrotübüllere bağlanma yeteneğini bozarlar. Mikrotübüllere bağlanamayan fosforile tau çözilemeyen çift sarmallı filamanlara dönüşür. Bunlar zamanla intranöronal NFY'lere dönüşürler. NFY'ler aksonal transportu ve hücre iskeleti bütünlüğünü bozarak hücre ölümüne sebep olurlar (8).

AH'deki ikinci ana nöropatolojik değişiklik, temel bileşeni $A\beta$ peptidi olan, AP'lerdir. $A\beta$, diffüz plaklar şeklinde katlanır ve sonra yoğun nöritik plaklara dönüşür. Zararsız $A\beta$ içerikli gevşek plakların β kıvrımlı zararlı yoğun plaklara dönüşümü net olarak bilinmemektedir. Gevşek plaklarda $A\beta$ birikimi serbest radikallerin ve oksidatif stresin meydana gelmesine ve bu faktörlerde plakların fiziksel değişimine sebep oluyor olabilir (9). $A\beta$ 'nın oksidatif hasar, inflamasyon ve nörotoksisite gelişiminde önemli rolleri vardır. Ayrıca $A\beta$, hastalıkla ilgili bölgelerde tau hiperfosforilasyonunu artırır ve böylece NFY içinde tau proteininin agregasyonunu indükler (10).

AH patogenezi için ileri sürülen A β kaskad hipotezine göre, A β 'nin nöron hücre membranının yapısını bozarak hücre içindeki Ca⁺² konsantrasyonu arttırdığı ve böylece oksidatif stresi tetiklediği ve sonuç olarak nöronal hücre ölümüne sebep olduğu ileri sürülmektedir. Hücrede oksidatif stresin artışı ile karbohidrat, lipit, protein ve DNA gibi makromoleküllerin büyük oranda zarar gördüğü bilinmektedir (11).

Yapılan *in vivo* ve *in vitro* deneysel çalışmalar ve insan beyin çalışmaları oksidatif stresin AH'da gözlenen nörodejenerasyonda önemli rol oynadığını göstermiştir (12). Beyin, oksijen ve enerji tüketiminin fazla olması, doymamış yağ asitleri ve lipitler yönünden zengin olması ve antioksidanların düşük seviyede olması sebebiyle vücudun diğer organlarına göre oksidatif hasara karşı daha duyarlıdır (13).

Bir naftakinon türü olan şikonin, *Lithospermum erthrorhizon* Sieb. Et Zucc. (Boraginaceae) bitkisinin kurumuş köklerinden elde edilmekte ve geleneksel Çin tıbbında bitkisel ilaçların yapımında kullanılmaktadır. Yaklaşık otuz yılı aşkın süredir yapılan çalışmalar, Çin tıbbında bilimin temelini oluşturan şikoninin birçok faydalı etkilerinin olduğu görülmüştür. Özellikle de şikonin ve türleri bu ham ilaçların farmakolojik özelliklerini taşıyan temel maddelere sahiptir (14,15).

Yapılan bir çalışmada şikonin'in farelerde oluşturulan deneysel iskemi modelinde, iskemiye bağlı oluşan inflamatuvar yanıtları regüle ettiği ve Kan Beyin Bariyeri (KBB) geçirgenliğini iyileştirdiği ve böylece beyni etkin bir şekilde koruduğu görülmüştür (16). Bir diğer çalışmada yetişkin erkek farelerde oluşturulan iskemi/reperfüzyon hasarına karşı şikonin'in nöroprotektif etkiler sergilediği gösterilmiştir. Bu çalışmada şikonin'in nörolojik defisit skorlarında, infarkt büyüklüğünde ve malondialdehit, karbonil ve reaktif oksijen türlerinin seviyelerinde anlamlı bir azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda glutatyon/glutatyon disulfide oranını azaltırken süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz aktivitesinin ileri yönde artışı sağladığı ve nöronal hasarı azalttığı da bu çalışma sonucu elde edilmiştir. Yapılan bu çalışmalar sonucunda şikonin'in serebral iskemi/reperfüzyon hasarına karşı nöroprotektif ve antioksidan etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (17).

Bu tez çalışmasının amacı, PC12 hücrelerinde A β ile oluşturulan AH modelinde şikonin'in A β toksisitesine ve sonucunda oluşan oksidatif hasara karşı olası koruyucu etkisinin varlığının araştırılmasıdır.

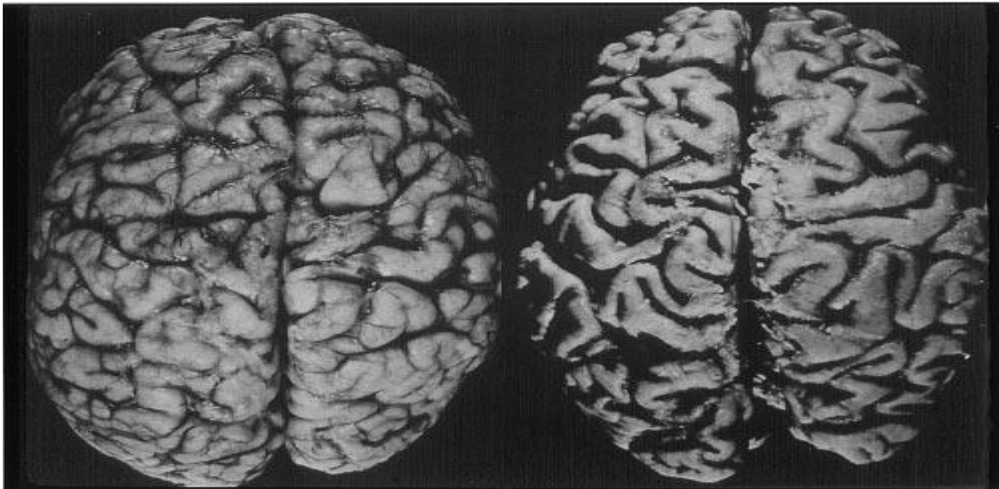
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

1907 yılında ilk olarak Alman hekim Alois Alzheimer tarafından 51 yaşında nöropsikiyatrik hastalık sebebiyle ölen bir kadının beyin organındaki değişikliklerin incelenmesi ile tanımlanan ve uzun yıllar demansın presenil formu olarak kabul edilen hastalık yaygın olarak Alzheimer Hastalığı olarak bilinmektedir (18). AH, 1907 yılından beri bilinen, günlük yaşam aktivitelerinde azalma, bilişsel işlevlerde bozulma, psikolojik ve davranışsal bozukluklarla sonuçlanan ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır (19).

Alzheimer Hastalığı, demans tablosunun görülen en sık nedeni olup, tüm demans vakalarının %50-70'ini oluşturmaktadır. Yapılan prevalans çalışmalarına göre 2000 yılı içinde dünyada 25 milyon Alzheimer hastasının bulunduğu ve yeni koruyucu-nöroprotektif tedaviler geliştirilemezse bu sayının 2050 yılına kadar 114 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (20).

Alzheimer Hastalığının henüz kesin etiyopatogenezi ortaya konulamamasına rağmen histopatolojik olarak senil amiloid plaklar (SP), nörofibriler yumak (NFY) oluşumu, sinaps-nöron kaybı ve beyinde belirgin atrofi, giruslarda daralma, sulkus ve ventriküllerde genişleme olduğu bildirilmiştir (8).



Şekil 1: Aynı yaşa ait sağlıklı beyin (solda) ile Alzheimer Hastasına ait beyin (sağda) (21)

Günümüzde bile AH'nin kesin tanısı ancak post-mortem beyin incelemesi ile gerçekleştirilebilmektedir. Klinikte belirlenen tanı ise olası AH tanısıdır. Bununla birlikte fizyolojik ve nörolojik muayene, hasta öyküsü, nöropsikolojik testler, laboratuvar incelemeleri ve görüntüleme yöntemleri ile yüksek oranda (%85-90) klinik tanı koymak mümkündür. Amerikan Nöroloji Akademisi tarafından 2001 yılında yayınlanan bir rehberle AH için standart tanı kriterleri olarak geliştirilen Uluslararası Nörolojik ve Bilişsel Hastalıklar Ulusal Enstitüsü İnme, Alzheimer hastalığı ve İlişkili Hastalıklar Birliği (NINCDS-ADRA) ve Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı-IV (DSM-IV) kriterlerinin kullanımı güvenilir bulunarak önerilmektedir (19).

A. Aşağıdakilerden her ikisinin bulunması ile belirli çoğul kognitif defisit gelişmesi
1. Bellek bozukluğu (yeni bilgiler öğrenme ya da daha önceden öğrenilmiş bilgileri anımsama yetisinde bozulma)
2. Aşağıdaki kognitif bozukluklardan birinin ya da daha fazlasının bulunması
a. Afazi (dil bozukluğu)
b. Apraksi (motor işlevlerde bozukluk olmamasına rağmen motor aktiviteleri yerine getirmede bozukluk)
c. Agnozi (duyu işlevlerinde bozukluk olmamasına karşın nesneleri tanıyamama ya da tanımlayamama)
d. Yönetiş işlevlerinde bozukluk (organize etme, sıraya koyma, tasarlama, soyutlama)
B. A ₁ ve A ₂ tanı ölçütlerindeki kognitif bozuklukların kişinin toplumsal, sosyal ve günlük işlevselliğinde bozulmaya ya da önceki işlevsellik düzeyinde azalmaya sebep olması
C. Hastalığın yavaş, sinsi, aşama aşama oluşu ve sürekli bir kognitif azalma
D. Hastanın kognitif kapasitesindeki azalmanın santral sinir sistemini ilgilendiren hastalıklara (serebrovasküler olay, Parkinson hastalığı, subdural hematoma, beyin tümörü, hidrosefali,...), demansa yol açabilecek sistemik durumlara (hipotiroidizm, vitamin B ₁₂ eksikliği, hipoglisemi,...) ya da madde bağımlılığına bağlı olmaması
E. Hasta deliryum tablosunda olmamalı
F. Hastanın klinik durumu başka bir psikiyatrik bozuklukla (şizofreni, majör depresyon,...) açıklanamamalıdır

Şekil 2: AH tanısında DSM-IV kriterleri (19).

Alzheimer Hastalığı için belirlenmiş birkaç risk faktörü ile üzerinde halen çalışılan ve hastalığın gelişimindeki rolü henüz kesin olarak aydınlatılamamış faktörler de vardır. Bu risk faktörleri içerisinde yaş en önemli risk faktörüdür. 65 yaşın altındaki popülasyonda hastalığın görülme oranı az iken 85 yaşın üzerinde yaklaşık %38' e ulaşmaktadır (7).

Genetik faktörler, büyük oranda AH'da hastalığın gelişiminde çevresel faktörlere zemin oluşturan risk faktörüdür. Çevresel ve genetik faktörlerin etkileşimi ile AH oluşur. AH oluşumu çoğunlukla sporadiktir ve tüm Alzheimer olgularının yaklaşık %5'i kalıtsal olma (basit Mendel kalıtımı ile otozomal dominant geçiş) özelliği taşır (22).

APP (amiloid prekürsör protein) genindeki mutasyonlar, ailesel AH' nın küçük oranda sebebi olup ailesel EBAH (Erken Başlangıçlı AH) olgularının %10-15'inde etkilidir ve amiloid metabolizması aracılığı ile hastalığın patogeneze ışık tutmuş ve aynı zamanda

Down sendromu ile AH arasındaki ilişkiyi de anlatmıştır. Bilindiği gibi Down sendromlu kişiler 21. kromozomun üç kopyasını taşırlar (Trizomi 21) ve bu tip kişiler 30'lu yaşlardan itibaren çoğunlukla AH'nin göstergesi olan nöropatolojik değişiklikler meydana gelir (23).

Beyinde ve plasmada kolesterol taşıyan ApoE (apolipoprotein E), temel apolipoproteinlerden biri olup Santral Sinir Sistemi (SSS)'de oluşan hasar sonucu aksonların miyelinizasyonu ve nöronal membranın onarımında gerekli olan kolesterolün salınımını ve hücrelere yeniden dağılımını kontrol eder. Beyinde ise ApoE birincil olarak astrositler ikincil olarak mikroglia ve nöronlarda sentezlenmekte ve salgılanmaktadır. İnsanlarda üç ayrı allelik formu vardır; ε2, ε3 ve ε4. Sağlıklı bireylerde ε3 sıklığı %70 iken, ε4 sıklığı %20'dir. AH kişilerde bu oran %40'a çıkmaktadır. Fakat insanlarda ApoE-ε4 allelinin varlığı her zaman AH'ye sebep olmaz ancak hastalığa duyarlılığı artırır, bu nedenle bu gen duyarlılık geni olarakta bilinmektedir (24,25). ε2 allelin ise Aβ peptid temizlenmesinde etkili olduğu ve bu nedenle koruyucu etmen olduğu bilinmektedir (26).

Risk faktörlerinden olan cinsiyet halen tartışılan bir konudur. Bazı epidemiyolojik çalışmalar sonucunda kadın cinsiyetin AH riskini arttırdığı bulunmuştur. Kadınlarda gözlenen yaşam süresinin uzunluğu ya da çoğunlukla daha düşük eğitim seviyelerine sahip olunmasının bu oranı artırdığı düşünülse, eğitim ve yaş faktörlerinin göz ardı edildiği lojistik regresyon analizi modellerinde de kadınlarda demans riskinin arttığı gözlenmiştir. Menopoz yaşı ve östrojen eksikliği gibi etmenler ile AH ilişkisi araştırılmış fakat kesin bir ilişki bulunamamıştır. Östrojen eksikliğin nöronların düzenlenmesi, serebral kan akımı, glial hücrelerin gelişimi ve ApoE ekspresyonu gibi süreçleri etkileyebileceği düşünülmektedir. Östrojenin ApoE ε4 heterozigotlarda ε4'ün ekspresyonunu baskılanarak demans başlama yaşını geciktirebildiği belirtilmiştir (24,27,28). Fakat 2003'te yayınlanan 'Women's Health Initiative' çalışmasının verilerine göre östrojen kullanan bireylerde demans riskinin arttığı gözlenmiş olup, AH tedavisi ve önlenmesinde kullanılması önerilmemiştir (29).

Cinsiyet, yaş, aile öyküsü ve Down sendromu gibi genel risk faktörlerinin dışında, dislipidemi, diabetes mellitus, hipertiroidi, hipertansiyon, B₁₂ vitamini beslenme yetersizlikleri, düşük sosyoekonomik düzey, infeksiyonlar, oksidatif hasar, inflamasyon, homosistein yüksekliği eksikliği, inme gibi birçok sayıdaki risk faktörleri son yıllarda belirlenmeye başlamıştır. Türkiye'de yapılan bir çalışmada ülkemizde AH gelişiminde

etkili risk faktörleri incelenmiş ve lojistik regresyon analizlerinde, vitamin kullanımı, yaş, cinsiyet ve depresyonun bağımsız risk faktörleri olduğu saptanmıştır (30).

Nörotoksinler, kurşun, organik çözücüler, demir, endüstriyel boyalar, çinko, bakır, glutamat, alüminyum gibi metallerin AH oluşumu ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (31,32,33). Fakat sayılan toksik maddeler ile AH arasında kesin bir ilişki gözlenmemiştir. Bununla birlikte epidemiyolojik ispatlar beyinde metal düzeylerinin yükselmesinin, AH'ın nörodejeneratif sürecin gelişimi ve ilerlemesiyle ilişkili olduğunu göstermektedir (34).

AH'de amiloid plakların oluşmasında kolesterolün rolü büyüktür. Kolesterol seviyesi ile fazla APP oluşumu arasında ilişki gösterilmiş, statinler ile kolesterol seviyesinin düşürülmesinin AH riskini %70 azalttığı ileri sürülmüştür (32,35,36).

Son yıllarda AH ile vasküler faktörler arasındaki ilişki önem kazanmaktadır. Vasküler demansa ilaveten inme varlığı AH oluşumunda önemli bir risk faktörüdür (37). AH'da diyabetin düşük bir risk faktörü olup olmadığını belirten çalışmalar vardır. Hipergliseminin amiloid agregasyonunu arttırabileceği, diyabet ve AH arasındaki ilişki NFY'lerde glikozillenmiş son ürünlerin varlığı gibi bulgularla açıklanmaya çalışılmıştır. Diğer taraftan, diyabetiklerde sık görülebilen hipoglisemilere bağlı olarak nöronal hasarın demans gelişimini tetikleyebileceği düşünülmektedir. Diyabetin AH için önemli bir risk faktörü olup olmadığı yoksa neden olduğu vasküler sorunlar ve eşlik eden dislipidemi, hipertansiyon ile dolaylı olarak mı riski arttırdığı hala bilinmemektedir (38).

Alzheimer hastalığı oluşumunda hipotiroidininde riski arttırdığı belirtilmiştir. AH bireylerin hipokampusünde tirotropini salgılatıcı hormon (TRH) konsantrasyonunda azalma saptanmış, TRH'nin hipokampüste proteinlerin fosforilasyonunu düzenlediği ve böylelikle AH patogenezinde yer alabileceği öne sürülmüştür (39).

2.2. Alzheimer Hastalığı Epidemiyolojisi

Demans toplumda ilerleyen yaş ile birlikte artış göstermektedir. Yapılan bir çalışmada, yaşlılıktaki demans prevalansının Kuzey Amerika ve Batı Avrupa'da % 6,4-% 5,4 ile en yüksek değere sahip olduğu, bunların Latin Amerika (% 4,9), Çin ve gelişmekte olan Batı-Pasifik komşularının (% 4) izlediği görülmüştür. Bu ülkelerdeki yıllık insidans oranları ise, Kuzey Amerika için % 1.05, Batı Avrupa için % 0.88, Latin Amerika için %

0.92, Çin ve gelişmekte olan Batı-Pasifik komşuları için % 0.8 olarak belirlenmiştir. Demans hastalarının yarısından fazlasının AH ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (40).

Alzheimer hastalığı yaşla ilgili demansın en yaygın formudur ve hastalığın oluşma riski yaş ile bağlı olarak logaritmik bir şekilde artmaktadır (4,5). 65 yaşın altındaki popülasyonda hastalığın görülme oranı az iken 85 yaşın üzerinde yaklaşık %38'e ulaşmaktadır (7).

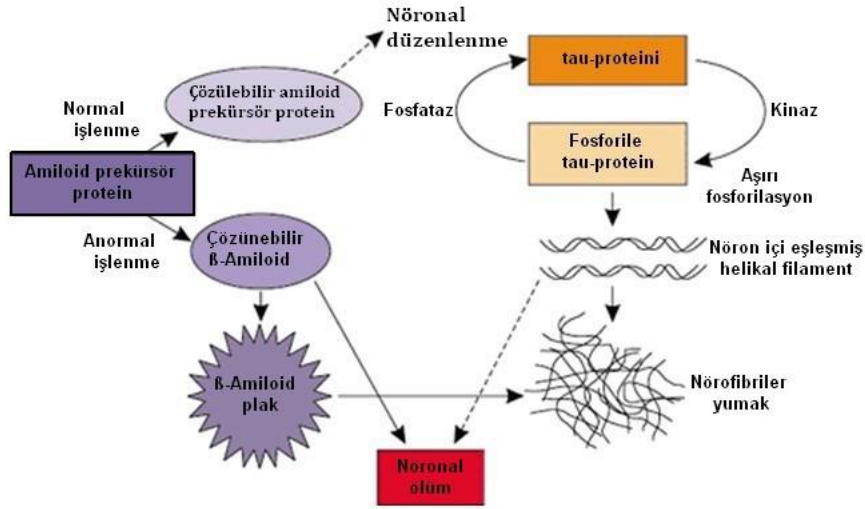
Tahminen dünyada 40 milyon insanın çoğunluğu 60 yaş üstü olup demans hastalığına sahiptir ve bu durum 2050 yılına kadar her yirmi yılda bir ikiye katlanacağı tahmin ediliyor (41).

Demansın prevalansındaki öngörülen artış, orantılı olarak çok yaşlı bir nüfusa sahip batı Avrupa ve Amerika ülkelerinden ziyade gelişmekte olan genç nüfusa sahip ülkelerde daha yüksektir. Güvenilir tahminlere göre erken başlangıçlı demans ve AH (65 yaş öncesi) prevalansı azdır. 50 yaş öncesi demansın görülme oranı 1/4000'dir ve yaklaşık olguların %30'u AH'nin oluşmasına neden olmaktadır (42).

Hastaların yaşam süresi, prevalans ve insidans oranları ile ilişkilidir. AH'nin başlangıcından sonra ilerlemesi 2 ile 16 yıl arasında değişmekle birlikte, ortalama yaşam süresi yapılan son çalışmalarda 3-7 yıl olarak belirtilmiştir. AH, ABD'de genel ölüm nedenleri arasında 6. sırada iken, 65 yaş ve üzerindeki bireylerin ölüm nedenleri arasında 5. sıradadır (7).

2.3. Alzheimer Hastalığı'nın Nöropatolojisi Ve Patogenezi

Alzheimer hastalığında histopatolojik olarak nörofibriler yumak (NFY) ve amiloid plak (AP) oluşumu, sinaps oluşumu, beyinde belirgin atrofi ve nöron kaybı mevcuttur. Her iki durumda da (AP ve NFY), normal yaşlanmada ve bazı diğer nörodejeneratif hastalıklarda görülebilir. Fakat AH'ın kesin olarak belirlenebilmesi için lezyonların belirli bir nöroanatomik dağılım göstermesi ve belirli bir miktarda olması gerekmektedir (43).



Şekil 3: AH nöropatolojisinde görülen AP ve NFY oluşumları (44)

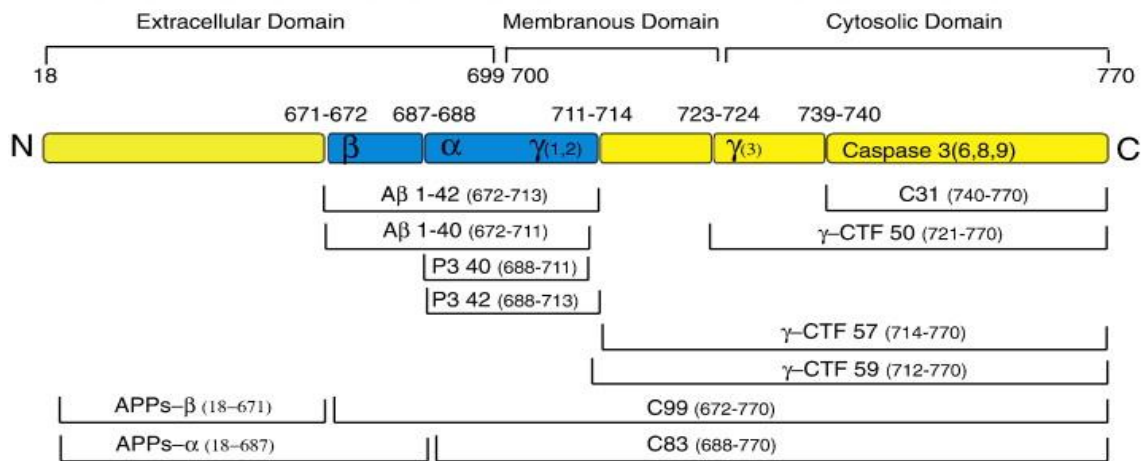
Alzheimer hastalığının patogenezi anlamak için NFY'ler ve AP'ler arasındaki ilişkiyi belirlemek kesinlikle gereklidir ve büyük olasılıkla AH fizyopatolojisindeki en büyük bilinmezi oluşturmaktadır. Tahmin edilen bağlantılardan biri ise, apoptoz başlatıcıları olan sistein aspartil proteazlarını (kaspazları) içermektedir. Büyük oranda artan kanıtlar, A β peptid birikiminin kaspazların aktivasyonunu indüklediği, böylece kaspazın tau proteininin bölünmesine neden olduğu ve bu olayın erken AH'da gerçekleştiği düşünülmektedir. NFY oluşumunda tau proteininin bölünmesi kritik bir durum olduğu görülmektedir (45).

Başka bir kurama göre AP'ler ve NFY birbirinden bağımsız olup, AH patogenezinin araçları değil, sonuç ürünleri olarak işlev görmektedir. Bu kurama göre AH, çevresel ve genetik faktörlerle yaşam süresince giderek biriken plastisite yükünün artık kaldırılmaz hale gelmesi sebebiyle, normal yaşlanma sürecinden çıkmanın sonuçlarıdır. Çoğunlukla plastisite yükünün fazla olduğu alanlarda fosfataz-kinaz dengesinin bozulması, fosforillenmiş tau proteininin defosforilasyonunun gerçekleşemeyerek patolojik katlanmasına sonrada oligomerlere dönüşmesine sebep olmaktadır (43).

AP'lerin ve NFY'lerden başka inflamasyon, gliosis, sinaps ve nöron kayıpları, kortikal kolinerjik inervasyon ve diğer nörotransmitter sistemlerde gerçekleşen kayıplar AH nöropatolojisinin yapılarını oluşturmaktadırlar (8).

2.3.1. Amiloid Plak (AP) Oluşumu

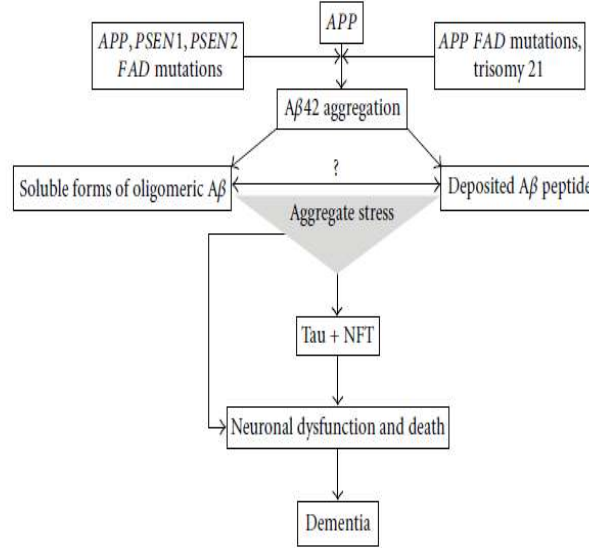
Amiloid beta 19. kromozomda kodlanır ve işlevi hala kesin olarak anlaşılamamış bir transmembran protein olan amiloid prekürsör protein (APP)'den proteolitik yolla meydana gelmektedir (9,46). APP'nin nöroprotektif ve nörotrofik aktivitesi olabilir (47). Genel anlamda A β 'nin işlevi ise bilinmemektedir. AH'deki ilk patolojik olay çözülebilir amiloid fibrillerinin meydana gelmesi ve bunların nöritik plaklara dönüşmesi olabilir. APP'nin de tıpkı transmembran proteinlerde olduğu gibi hücre içinde 28 aminoasitten oluşan bir karboksi ucu ve hücre dışında ise bir amino ucu vardır. A β , APP'nin hücre içi bölgesini de içermektedir. APP bir seri proteolitik yollarla kesilerek metabolize edilmektedir. Proteolitik yoldaki bu enzimler α , β ve γ sekretaz olarak adlandırılır. APP'yi α -sekretaz A β 'nin yaklaşık olarak ortasından keser. Bu işlem sonunda çözülebilir A β yerine sAPP ya da APP olarak isimlendirilen yeni ekstraselüler protein oluşur. Meydana gelen bu proteinlerin hücre kültürü ortamlarında nöronlar üzerine nörotrofik etkileri gösterilmiştir. β -sekretaz APP'yi amino ucundan, γ -sekretaz ise karboksi ucundan keser ve ürün olarak A β oluşur. Meydana gelen A β 'lar 40-42 aminoasit uzunluğundadır. Çok daha amiloidojenik olanı 42 aminoasit uzunlukta olup ilk çökendir (48). İlâveten diffüz plaklar halinde agrege olan A β , yoğun nöritik plaklara dönüşür (49).



Şekil 4: Sekretaz enzimlerinin APP'yi kesmesiyle oluşan fragmanlar (50)

Alzheimer hastalığında A β birikiminin primer bir rol mü oynadığı yoksa gerçekleşen bir olayın kalıntıları mı gösterdiği günümüzde hala tartışılan bir konudur. Fakat A β agregatlarının varlığı hastalığın meydana gelmesinin bir sebebi olduğuna dair artan kanıtlar mevcuttur. A β proteininin aşırı oluşması ve birikimi sonucu olası toksik etkisinin

hastalığı meydana getirici ilk faktör olduğu görüşünün kabul edilmesi “**Amiloid Kaskad Hipotezi**” olarak bilinmektedir (46,51).



Şekil 5: Amiloid Kaskad hipotezi (52)

Amiloid beta, normal nöronlar tarafından üretilmekle birlikte, AH patogenezinde nöronal lizozomlarda fazla miktarda biriktiği gösterilmiştir. Normal koşullarda Aβ'nin büyük çoğunluğu, ekstralizozomal olarak lokalize olurken, oksidatif stresin makrotofaji aktivasyonu yoluyla intralizozomal Aβ içeriğini arttırdığı ileri sürülmektedir. Bu nedenle hasarlı Aβ salınımının ve Aβ'nin intralizozomal artışının AH patolojisine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte Aβ'nin nöronlarda nasıl dağılım gösterdiği ve Aβ salınımının inhibisyonunda etkilenecek yolların neler olabileceği hala tartışılan bir konudur (53).

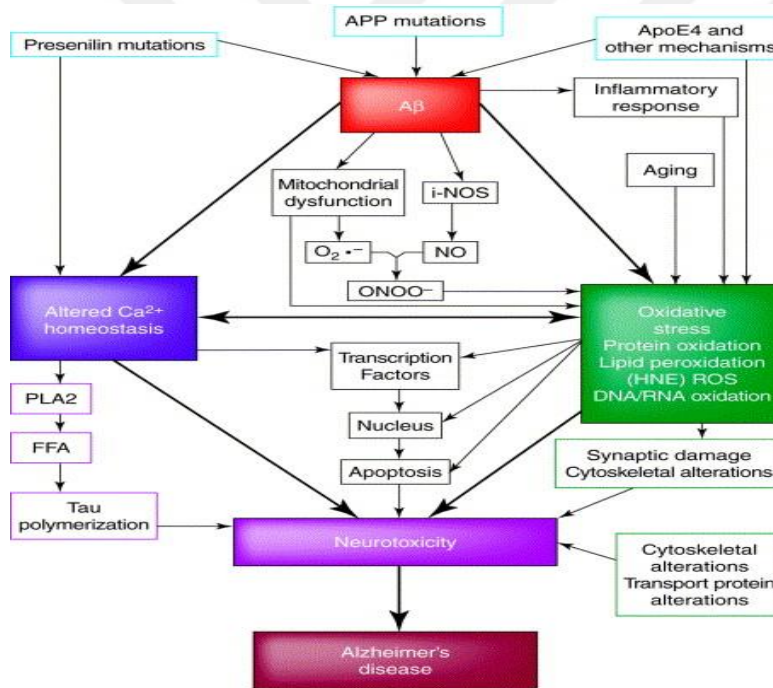
Çözünmez formdaki Aβ, β tabaka yapısında olup katı (compact) plaklara dönüşür iken, çözünür yapıdaki Aβ monomerleri çoğunlukla random coil ve α-helikal katlanmış peptid olarak bulunur. Küçük Aβ monomerlerinin çözünmez yapıdaki Aβ fibrillerinden daha fazla sitotoksik etkiye sahip olması nedeniyle küçük Aβ monomerleri dikkat çeker hale gelmiş ve bunlarla ilgili birçok farklı çalışmalar yapılmıştır (51).

Nörotoksite ve Aβ ile ilgili yapılan çalışmalarda ilk olarak dikkatler Aβ peptidlerine çekilmiş olsa da son zamanlarda düzensiz Aβ fibrillerinin nörotoksik etkili olduğu gösterilmiştir. AH olan bireylerin beyinlerinde çözünür formdaki Aβ peptid miktarı ile hastalığın belirtileri arasında çözünmez formdaki plaklar ile karşılaştırıldığında çok daha

iyi bir ilişkinin olduğu görülmüştür. Bu arada AH olan bireylerin beyin dokularında çözünür A β peptidi yoğunluğu fazla bulunmuş ve bu çözünür yapıdaki peptidlerin oluşumunun AH semptomlarının meydana gelişinden daha önce olduğu vurgulanmıştır (51).

Amiloid betanın hücre içinde artışı; mitokondri membran potansiyelinin azalması, hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artışı, inflamatuvar yanıt ile birlikte serbest radikal salınımı ile ilişkilendirilen fonksiyon değişikliklerine ve hücre ölümüne neden olmaktadır (54).

Alzheimer hastalığı ile ilişkilendirilen önemli patolojik mekanizmalarından biri de oksidatif hasardır. AH'de A β ile ilişkilendirilen serbest radikal oluşumunun hücrede oksidatif hasara neden olduğu öne sürülmektedir. Çözünür ve agregatlaşmış A β 'nın nöronal membranlara girerek lipid peroksidasyonunu, protein oksidasyonunu tetiklediği ve reaktif nitrojen türlerinin (RNT) ve reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumuna sebep olduğu kabul edilmektedir (55).

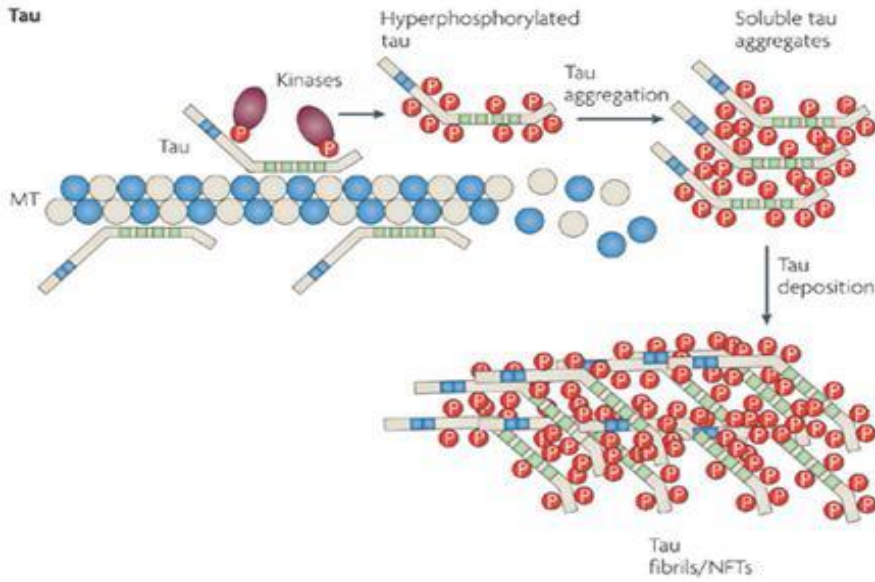


Şekil 6: AH'de A β toksisitesi (55)

2.3.2. Nörofibriler Yumaklar (NFY)

Nörofibriler yumakların ana bileşeni 17. kromozomda kodlanan 'hiperfosforile tau' proteinidir. Mikrotübül-ilişkili protein (MAP) ailesinden olan Tau proteini, hücre iskeletinin bütünlüğü, mikrotübül stabilizasyonu ve aksonal transportta önemli rol oynamaktadır. AH patogenezinde, hipoaktif fosfatazlar ve /veya hiperaktif kinazlar tau proteininin hiperfosforilasyonuna sebep olarak mikrotübüllere bağlanma yeteneğini

bozarlar. Bağlanmamış fosforile tau proteini, çözünmeyen çift sarmal filamentlere dönüşür ve oluşan bu form toksik etkili olabilir. Bu olaydan etkilenmiş nörönlör normal olarak tau proteini sentezleyerek, anormal hiperfosforillenmiş tau proteinini nörofibriler ağlara bağlayarak filament uzamasına sebep olurlar ve toksik etkili bu tau proteinine tepki gösterirler. Bu yapılar zamanla nöron içi NFY'ler halini alır. Oluşan bu NFY'ler aksonal transportu ve hücre iskeletinin bütönlüğünü bozarak hücre ölümine neden olurlar (56).



şekil 7: Tau fosforilasyonu ve NFY oluşumu (57)

Normalde proteozom sistemi tarafından yapısal bütönlüğü bozulmuş, yanlış katlanmış toksik etkiler oluşturan zararlı proteinler etkili bir şekilde yıkılmaktadırlar. Çift sarmallı flaman (PHF: Paired helical filaments)-tau, protein birikimlerine ve proteozom aktivitesinin azalmasına sebep olmaktadır. Hiperfosforile tau proteini bütönlü bu etkiler sebebiyle AH'nin patojenik yolağında etki gösteren önemli bir nörotoksik ajan olarak kabul görmektedir.

Genellikle NFY'ler kortekste ve beynin diğer bölgelerinde de bulunabilmektedirler. NFY'lerin kortekste çok yoğun olduğu bölgeler entorinal korteks ve hipokampus gibi limbik ve paralimbik bölgelerdir. NFY yoğunluğunun demansın şiddeti ile kuvvetli bir ilişkisinin olduğu düşünölmektedir.

Alzheimer hastalığı kesin tanısı için hastalığın patogenezinde ana mikroskobik değişiklikler olan AP'lerin ve NFY'lerin patolojik olarak belirlenmesi gereklidir, fakat yeterli değildir. Çünkü bu iki olgu farklı nörodejeneratif hastalıklarda ve normal sağlıklı yaşlılarda da görölebilmektedir. AH'nin kesin tanısı için her iki olgunun bulunmasından çok bunların belli bir nöroanatomik dağılımda ve miktarlarda bulunmaları gerekmektedir. 60 yaş üstü bireylerde neredeyse herkeste limbik NFY'ler ve neokortikal AP'ler

gelişmeye başlar. Fakat yapılan son araştırmalara göre AP'lerin limbik, NFY'lerin neokorteks sistemde görünür olmalarının AH için %100'e yaklaşan duyarlılık ve özgüllük ortaya koyduğunu göstermiştir (24).

2.3.3. Gliyozis ve İnflamatuvar Mekanizma

Alzheimer hastalığında A β ve tau protein agregatlarına ek olarak AP'lerin çevresinde immün sistem ile ilişkili hücrelerin ve antijenlerin varlığı bildirilmiştir. Merkezi sinir sistemindeki AP'lerin mikrogliya aktivasyonunu sağlayarak kemokin, sitokin, ROT, RNT'leri ve çeşitli proteolitik enzimler gibi potansiyel toksik ürünlerin salınmasına yol açtığı ve bunun sonucunda pro-inflamasyon kaskadını başlatarak nöronlarda dejeneratif değişikliklere neden olduğu öne sürülmektedir. Aktif olan mikrogliya hücrelerinin tau fosforilasyonuna ve NFY oluşumuna yol açabileceği düşünülmektedir. Ayrıca AH'de gliyozisin olduğu ve AP'lerin olduğu bölgede astrosit hücrelerinin de olduğu belirlenmiştir. Ancak AH'de inflamasyonun kesin rolü ve mikrogliya, astrosit ve T lenfosit hücrelerinin mekanizmaları hala araştırılmaktadır (58).

2.3.4. Nöron ve Sinaps Kaybı

Alzheimer hastalığındaki nöron kaybının anatomik dağılımı NFY'lerin anatomik dağılımı yatınlığına benzese de hücre ölümünden tek başına NFY'ler sorumlu tutulamaz. Nöron ile NFY sayısı arasındaki anlamlı negatif bağlantıyı vurgulayan birçok çalışma olmasına rağmen NFY'lerin bulunmadığı alanlarda ağır nöron kaybı da görülebilmektedir. Bu nedenle hücre ölümünde rolü olan transsinaptik dejenerasyon ve amiloid nörotoksitesi gibi diğer faktörler ön plana çıkmaktadır (43).

Alzheimer hastalığında nöron ölümünün apoptoz yolu ile gerçekleştiği ve bu yolağın aktivasyonunda A β 'nın rol oynadığı bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda A β 'nın apoptotik hücre ölümünü eksternal ve internal yollarla aktive edebileceği düşünülmektedir (59,60). Eksternal yolda hücre dışındaki A β fibrilleri membranda bulunan ölüm reseptörlerine bağlanarak kaspazların aktivasyonunu sağlamaktadır. Internal yolda ise hücre içindeki A β fibrilleri endoplazmik retikulum (ER) stresine veya mitokondride bulunan alkol dehidrogenaz enzimine bağlanarak mitokondriyal strese neden olabilmektedir. Kaspaz 3 ve 7'nin tau proteinini kesme özelliğine sahip olduğu ve bu nedenle NFY oluşumuna destek olabileceği bildirilmiştir. NFY oluşumu ile aksoplazmik ve dentritik transportun aksaması ve daha sonra trofik desteğin azalması nöronal kayıplara yol açmaktadır (59).

Yapılan çalışmalar membran reseptör değişikliklerinin bilişsel gerilemenin progresyonu üzerine önemli etkisi olduğunu göstermektedir (61). AH'li beynin korteks ve hipokampus bölgelerinde sinaptik yoğunluğun önemli derecede azaldığı görülmüştür (62). Aβ'nın asetilkolin sentezini, salınımını, postsinaptik etkinliğini azalttığı gözlenmiştir. Ayrıca AH'de kortikal serotonerjik akson terminallerinde serotonin salınımı ve geri alınımı bozulmaktadır. Bunlar dışında sinapslarda bulunan N-metil-D aspartat (NMDA), dopamin ve adrenerjik reseptörlerin de AH'nin progresyonunda spesifik rollere sahip olabileceği tahmin edilmektedir (61,63).

2.3.5. Kolinerjik İnervasyon ve Diğer Nörotransmitter Kayıpları

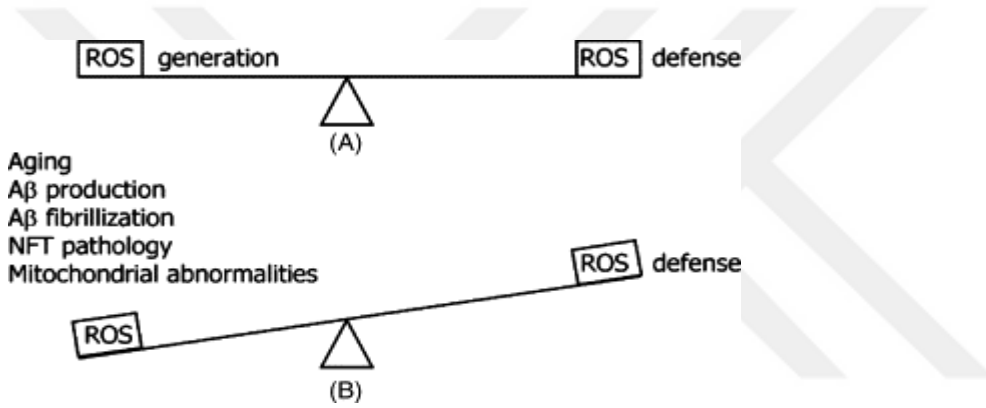
Limbik sistemin en önemli bileşeni olan Meynert'in bazal çekirdeğinden, serebral korteksin kolinerjik inervasyonu sağlanmaktadır (64). Bu çekirdek, yaşlanma esnasında nöron kaybının ve yaygın NFY oluşumunun görüldüğü önemli bir bölge olup, tau proteininin aşırı fosforillendiği ilk bölgelerden biridir. Belirtilen diğer patolojik özellikler gibi kolinerjik aksonların kaybı da Meynert'in bazal çekirdeğine bölgesel yatkınlık göstermektedir (24).

Kolinerjik inervasyon dikkat ve belleğin nöronal kontrolünde önemli bir etkiye sahiptir. Sinaptik aralıktan difüzyonla ilerleyen asetilkolin postsinaptik membranda muskarinik ve nikotinik reseptörlere bağlanarak ikincil uyarıcılar üzerinden etkisini göstermektedir. Dikkatin sağlanmasında nikotinik etkiler hücrenin uyarılabilirliğini artırır, muskarinik etkiler ise kalıcı sinaptik değişikliklerle yeni bilginin toplanması ile nöroplastisite mekanizmalarını aktif hale getirirler. Muskarinik ve nikotinik stimulasyon kaybı Aβ üretimini artırırken, öte yandan Aβ'nın kendisi de asetilkolin sentez, salınım, postsinaptik etkinliğini azaltarak kısır bir döngü meydana getirir (24).

Eş zamanda NFY ve AP'lerin varlığı diğer nörotransmitter sistemlerini de büyük oranda zayıflatır. Kortikal serotonerjik akson terminallerinde serotonin salınımı ve geri alınımı AH'de bozulur. Bu durum hastalıkta gözlenen saldırgan davranışlar ve depresyon ile ilişkilendirilebilir. Dopaminerjik, noradrenerjik kayıplar ile somatostatin üreten hücrelerde, nöropeptid Y ve/veya substans P salan nöronlarda farklı oranlarda azalmalar olabilir ve bu farklılıklar hastalıkta görülen davranış bozuklukları ile ilişkili olduğu anlaşılmıştır (65).

2.3.6. Oksidatif Hasar Mekanizması

Alzheimer hastalığı ile bağlantısı olduğu düşünülen bir diğer patolojik mekanizma oksidatif stres olup, etki mekanizması henüz net olarak aydınlatılamamıştır (66). Son yıllarda toksikolojik çalışmaların ilgi odağı haline gelen oksidatif stres, toksisitenin olası bir mekanizması olarak düşünülmektedir (67). Yapılan deneysel model ve insan beyin çalışmaları ile oksidatif stresin AH'nin nörodejenerasyonunda önemli etkiye sahip olduğu anlaşılmıştır. Beyin, antioksidanların düşük seviyede olması, çoklu doymamış yağ asitlerinin fazla olması ve yüksek oksijen kullanımı nedenlerinden dolayı vücudun diğer organlarına göre oksidatif hasarın görülme oranı daha yüksektir (12). AH'de NFY, çözünür A β , A β fibriller, mitokondriyal anormallikler ve yaşlanma oksidatif stresin oluşumunu tetiklemektedir (68).



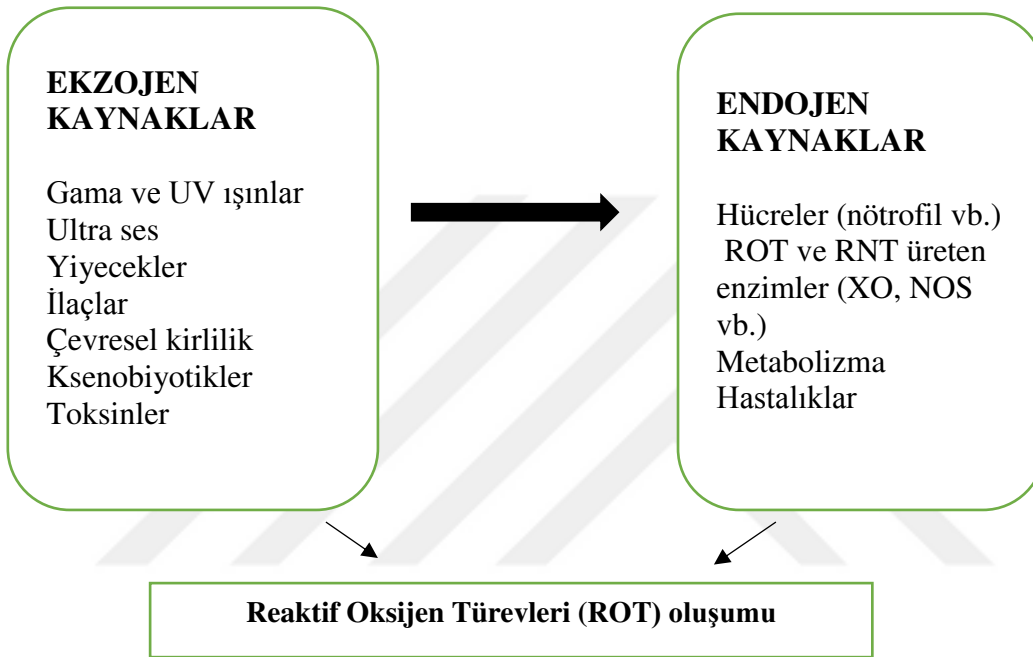
Şekil 8: AH'de oksidatif stresin olası mekanizması (68)

(A) Normal koşullar altında reaktif oksijen türleri (ROS)'un oluşumu antioksidan savunma sistemi tarafından nötralize edilir. (B) AH'de ROS düzeyinin artması oksidatif strese neden olur.

Oksidatif stres, hücrelerin lipid tabakasının peroksidasyonuna sebebiyet veren serbest radikallerin üretimi ve vücudun antioksidan savunması arasındaki dengesizlik olarak ifade edilmektedir (67). Başka bir ifade ile oksidatif hasar, oksidan ve antioksidan sistem arasındaki dengenin oksidan sistem yönüne doğru kayması durumudur. Oksidan sistem eşleşmemiş elektrona sahip oksijen veya nitrojen bazlı moleküller tarafından oluşturulan ROT ve RNT'den oluşmaktadır. Eşleşmemiş elektronları nedeniyle serbest radikaller kararsızdırlar ve yüksek reaktif özellikleri ile elektronlarını eşlemek için diğer moleküllerin elektronlarını alabilmektedirler. Eşleşmiş elektronlarını kaybettiklerinde ise serbest radikallere dönüşmektedirler (68).

Serbest radikal reaksiyonları, enerji üretiminde ve transferinde, bağışıklık sistemi hücrelerinden makrofajların ve nötrofillerin savunma mekanizmasında ve birçok metabolik işlevlerde gerekli olsa da serbest radikallerin zincir reaksiyonunun kontrolsüz davranışı ve serbest radikallerin fazla üretimi toksik etkilidir (68,69). Serbest radikaller,

santral sinir sisteminin patolojik olaylarının birçoğunda doğrudan doku hasarı oluştururlar. Serbest oksijen türleri, ekzitotoksisite, metabolik disfonksiyon ve kalsiyumun intraselüler hemostazisinde bozulma gibi çoklu mekanizmalarla doku tahribatı oluştururlar (70,71,72,73). Ortadan kaldırılmazsa veya nötralize edilmezse protein, lipit ve nükleik asitler ile reaksiyona girerek hücresel fonksiyonlarda hasar oluşturmaktadır. Bunun sonucunda ise doku hasarı ve hücre ölümü gerçekleşmektedir (68,69). ROT oluşumu ekzojen ve endojen kaynaklı olabilmektedir.



Şekil 9: ROT'un ekzojen ve endojen kaynakları (74)

Serbest radikaller, lipid peroksit, nitrik oksit, süperoksit ve hidroksil radikalleri gibi farklı kimyasal yapılara sahiptir (67). Oksijen molekülünden oluşan serbest radikaller, biyolojik sistemdeki en önemli yapılardır (72,73). RNT ise azot dioksit (NO₂) ve nitrik oksit (NO^{*}) radikalleridir (75).

Serbest radikaller, yarı ömürleri çok kısa, kararsız ve düşük molekül ağırlıklı olmalarına karşın çok etkili moleküller olarak bilinmektedirler. Mesleki açıdan kurşun ve kadmiyum gibi bazı çevre kirleticilere uzun süre maruz kalmalar, oksidatif strese sebep olabilir. (76,77).

Hidroksil (OH^{*}) en reaktif radikaldır ve biyolojik bileşenler için reaksiyon hızı sabit olup biyolojik sistemde 10⁻¹⁰ saniye kalabilmektedir. Diğer radikallerin yarı ömürleri ise kısadır fakat reaksiyon hızı çevresel ortama göre değişiklik göstermektedir. Ayrıca ROT'da radikal olmayan metabolitler de saniyeler ve saatler içinde değişen yarı ömürlere

sahiptirler. Özellikle pH, fizyolojik çevre ve diğer reaktif türlerin varlığı ROT'un yarı ömrü üzerine etki göstermektedir. Uzun yarı ömre sahip olan türler yayılmak için yeterince zamana sahiptirler. Bu sayede üretildiği bölgeden diğer bölgelere giderek moleküller ile etkileşime girebilmekte ve yüksek toksisiteye sebep olabilmektedirler (74). Flavoproteinlerin ve demir-kükürt içeren bazı yükseltgenme-indirgenme enzimleri oksijeni süperoksit grubuna indirgemektedir (72,73)

Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$) uzun yarı ömre sahip olup, kolaylıkla biyolojik membranlardan geçebilmektedir. Bu nedenle mitokondriyal membranda üretildikten sonra mitokondriyal genoma geçerek hasara sebep olabilmektedir. Kısa yarı ömre sahip olan $OH^{\bullet}$ radikalleri ise üretildiği bölgede bulunan protein, lipid, DNA, amino asit, şeker ve metaller ile etkileşime girerek hasara sebep olabilmektedirler. Bu durumda $OH^{\bullet}$ radikallerinin üretildiği bölgenin yakınlarında esansiyel biyolojik hedef yoksa radikaller oksidatif hasar oluşturmayacaklardır (78).

Hücre hasarına neden olan oldukça etkili grubu, bakırlı bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) aracılığı ile oksijen ve hidrojen peroksit (H_2O_2)'e dönüştürülür. $O_2^{\bullet-}$ grubundan daha az etkili olan H_2O_2 , dokularda bulunan glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT) gibi enzimlerle oksijen ve su gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisiz hale getirilir. SOD'un etkinliğini durduran dietilditiyokarbamat gibi maddeler, lipid peroksidasyonu hızlandırır iken, $O_2^{\bullet-}$ gruplarının zararsız hale getirilmesini sınırlandırır. Ayrıca CAT enziminin etkinliğini durduran maddeler (aminotriazol gibi herbisidler) de etkin olan oksijen gruplarına ya da bu grupları oluşturan maddelere duyarlılığı artırır (72,73).

Nitrik oksit radikali L-argininden sentezlenmektedir ve yarı ömrü ise 10-20 saniyedir. $NO^{\bullet}$ vücuttaki ROS'lar ile reaksiyona girerek güçlü bir oksidan olan peroksinitrit ($ONOO^{\bullet}$) oluşturmakta ve daha sonra bu reaktif türev $OH^{\bullet}$ radikalini meydana getirmektedir. Ayrıca, $ONOO^{\bullet}$ tirozin gibi fenolik amino asitleri nitrolayarak toksik nitro-türevleri (nitrotirozin) meydana getirmektedir (78).

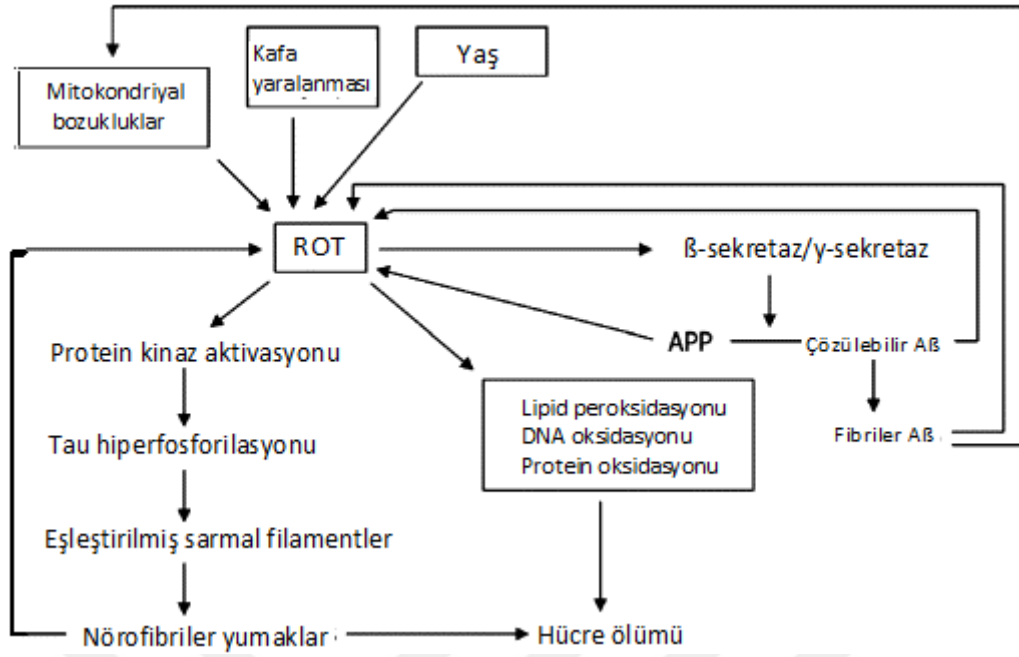
Oksidanlar aerobik metabolizma tarafından büyük oranda ve devamlı olarak üretilmektedir. Oluşan bu oksidanlar DNA, lipid ve protein makromoleküllerinin hasarına sebebiyet verirler. Bu şekildeki hasarların artması sonucu yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı dejeneratif hastalıklar meydana gelebilir (79).

ROT ve Antioksidan Sistem

Antioksidanlar, hem dolaylı hem de direkt olarak ilaçların, ksenobiyotiklerin, toksik radikal reaksiyonların ve karsinojenlerin olumsuz etkilerine karşı hücreleri koruyan maddelerdir. melatonin, Vitamin C, E, A, metallothionein, koenzim Q-10, adenosin, urat, ubiquinol, polifenoller, betakaroten, poliaminler, süperoksit dismutaz, fitoöstrojenler, flavonoidler, NADPH, sistein, homosistein, taurin, redüktaz, resveratrol, nitroksidler, glutatyon, glutatyon peroksidaz, hem oksijenaz-L ve eosinofil peroksidaz, katalaz, s adenosil-L-metionin, tioredoksin nitrik oksit sintaz bu gruba girer (80,81, 73). Tokoferoller, insan vücudu için esansiyel olan hücrelerde bulunan ve yağda çözünebilen bir antioksidandır. Temel işlevi membran fosfolipitlerinin peroksidasyonunu önleyerek hücre membranlarının hasar görmesine engel olmaktır. Glutatyon (GSH) ise, hidrofilik yapıda olup endojen antioksidanların en önemlilerinden birisidir. Aynı zamanda antioksidan enzimlerin kofaktörüdür (82).

Enzimatik antioksidanlar grubundan olan glutatyon peroksidaz, sitokrom oksidaz, süperoksit dismutaz, glutatyon redüktaz, katalaz ve glutatyon-S-transferaz hücre içi ROT ve ROT ürünlerinin etkilerini düzenleyerek gerçek nitelikte antioksidan savunmayı sağlamaktadırlar. Bakır, çinko gibi eser elementler ise bu enzimlerin aktivite gösterebilmeleri için gereklidir (83).

Alzheimer hastalığında ROT'un aşırı üretimi ve antioksidan sistemin yetersizliği nedeniyle protein, lipid ve DNA gibi makromoleküller büyük oranda hasar görmekte ve nöron hücrelerinin ölümüne se Alzheimer hastalığı sebebiyet vermektedir. Ayrıca aşırı üretilen ROT, mitokondriyal fonksiyon bozuklukları, A β ve APP üretimini ve yaşlanmayı tetikleyebilme ve sekretaz enzimlerini aktive edebilmektedir (68). Yapılan çalışmalarda serbest oksijen radikallerinin amiloid üretimini arttırıcı etki gösterdiği ve bu etkiyi serbest radikal yakalayıcılarından olan E vitamininin önleyerek korucu etki gösterdiği gözlemlenmiştir (64).



Şekil 10: AH'da ROS oluşumu (68)

2.3.6.1. Lipid Peroksidasyonu

Oksidatif stres sonucu üretilen ROS birinci hedefi membranda bulunan çoklu doymamış yağ asitleridir. Yağ asitlerinde karbonlar arasında bulunan çift bağa yakın olan metilen grubunun C-H bağları zayıf yapıdadır. Bu nedenle hidrojen, reaktif oksijen türleri tarafından kolaylıkla alınabilmektedir. Lipit peroksidasyonu sonunda $\text{OH}^\bullet$ radikali, $\text{ROO}^\bullet$ radikalleri ve alkoksil radikalleri $\text{RO}^\bullet$ gibi serbest radikaller oluşmaktadır (68). Oluşan bu serbest radikaller yaptıkları zincir reaksiyonlar ile hücre membranına büyük ölçüde hasarlar meydana getirmektedir (84). Reaksiyon sonunda malondialdehit (MDA), akrolein ve 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) gibi reaktif aldehytler meydana gelmektedir (11). Bu bileşikler ya hücrelerde metabolize edilmekte ya da yayılarak diğer hücrelere zarar vermektedir (12).

Yapılan çalışmalarda AH olgularında $\text{A}\beta$ 'nin lipit peroksidasyonunu artırarak oksidatif stresi arttırdığı görülmektedir. AH'na sahip olan beyin dokusu incelendiğinde serbest HNE, akrolein ve MDA seviyelerinin kontrole oranla yüksek olduğu gözlenmiştir. Ayrıca HNE proteinlere bağlanarak proteinlerin fonksiyonlarını ve konformasyonlarını değiştirebilmektedir. AH'de HNE'nin glutamat transporter, glutatyon-S-transferaz ve multidrug-direnç proteinine bağlandığı gözlemlenmiştir (12,68).

2.3.6.2. Protein Oksidasyonu

Protein oksidasyonu, AH'da nörodejenerasyonun önemli bir mekanizmadır (68). Proteinlerin oksidasyonu sonucunda protein yapısında katlanma ile fragmentasyonda artış, sekonder ve tersiyer yapının farklılaşması gibi değişiklikler meydana gelir. Bu değişiklikler sonucu normal fonksiyonda azalma ve proteolize yatkınlık gibi bozukluklar meydana gelir (85,86). Proteinlerin aminoasit içerikleriyle serbest radikal hasarından etkilenme durumları arasında bir ilişki vardır. Doymamış bağlar ve –SH içeren moleküller ile histidin, triptofan, sistein, metiyonin, fenilalanin ve tirozin gibi aminoasitleri içeren proteinler serbest radikallerden daha çabuk etkilenmektedirler (69).

Lipit peroksidasyonu, proteinlerle kovalent etkileşimleri sonucu HNE bağlı proteinler ve protein karboniller oluşabilmektedir. Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan bu ürünler enzim fonksiyonunun baskılanması ve kovalent etkileşim ile proteinlerin yapısal modifikasyonuna sebep olmaktadır.

Alzheimer hastalığına sahip bir beyinde protein oksidasyonu sonrası HNE-, 3 nitrotirozin (3-NT) ve karbonillenen modifiye proteinlerin sayısında artma gözlenmiştir (12). Oksidatif olarak farklılaşan ve fonksiyonunu yitirmiş çapraz bağlar meydana getiren proteinler ya proteozomal yıkıma gider ya da nörodejeneratif hastalıklarda protein birikimlerini sonucu hücrel hasarlara sebep olurlar (68,87).

2.3.6.3. Oksidatif DNA Hasarı

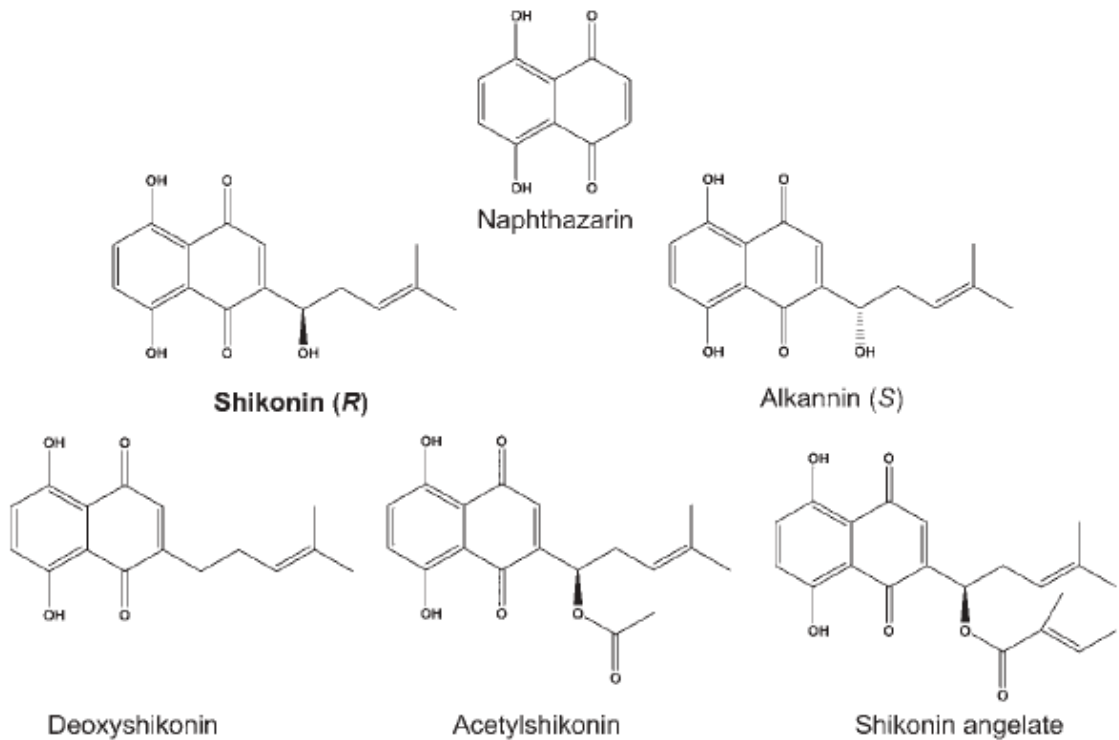
Reaktif oksijen türleri lipid, protein, karbonhidrat gibi biyomoleküllerin yanı sıra DNA'da da kimyasal olarak oksidatif hasar meydana getirebilmektedir. Meydana gelen bu değişiklikler okside şekerler, modifiye bazlar, tek veya çift zincir kırıkları ve DNA protein çapraz bağlanmaları şeklinde meydana gelmektedir (88).

Yapılan birçok araştırmada, AH'nin serbest radikal oluşumuna sebep olduğu öne sürülmektedir (89, 90). İçlerinde, canlılarda hayati öneme sahip, oksijenin bazı ara bileşenlerinin de bulunduğu serbest radikaller, hücrel düzeyde toksik etkilidirler. Mitokondri iç zarı, oksidatif fosforilasyondan dolayı ROT'ların fazlaca üretildiği yerdir. Normal metabolizma ürünleri olan ROT'lar, DNA'da birçok farklı bozulmalara hatta kopmalara sebep olurlar. Mitokondri DNA'sında (mtDNA), çekirdek DNA'sındakilerden 16 kat daha fazla oksitlenmiş bazların olduğu görülmüştür. Bu olay ROT'ların, mtDNA'da büyük oranda hasar oluşturabileceğini göstermektedir. Önemli ROT türleri, $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $OH^{\cdot}$ ve atomik oksijendir. Mitokondrideki H_2O_2 ve sırasıyla, Mn içeren SOD ve selenyum

(Se) içeren GSH-Px tarafından metabolize edilmektedir. Ayrıca antioksidanlar grubundan olan vitaminlerde ROT'ları yok etmektedir (91).

2.4. Şikonin

Şikonin, Zicao'nun aktivite gösteren temel yapılarından bir tanesi olup, *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. Et Zucc. (Boraginaceae) bitkisinin kök ekstraktından elde edilir. Yaygın olarak geleneksel Çin tıbbında anti-inflamatuar olarak kullanılmaktadır (14). *L. erythrorhizon*'un köklerinden elde edilen bu ekstraktın ilk türevi olarak asetilşikoinin ilk kez 1922'de Krudo ve Majima tarafından keşfedilmiştir. Daha sonra bu bitkiden elde edilen içlerinde şikonin'in de bulunduğu diğer türler de izole edilip, birçok kimyasal özellikleri tanımlanmıştır. Fakat izole edilen bu türlerin naphthazarin'e olan kimyasal ve fiziksel benzerliklerinden dolayı şikonin'in yapısının ilk tanımlaması yanlış yapılmıştır. Daha sonra 1936 yılında Brockmann ve Liebigs şikoninin yapısını 5,8-dihydroxy-2 [(1R)-1-hydroxy-4-methyl-3-pentenyl]-1,4-naphthoquinone olarak doğru bir şekilde tanımlamış olup, şikonin'in enantiomeri olarak alkannin'de saptamışlardır (92).



Şekil 11: Şikonin ve türlerinin kimyasal yapısı (92).

Çoğunlukla *L. erythrorhizon* bitkisinin köklerinden elde edilen şikonin, alkannin ve diğer türler, ayrıca Boraginaceae familyasının diğer türlerinin köklerinden de elde

edilmektedir. Bu türler, Echium (E. lycopsis), Onosmodium, Eritrichium ve Arnebia (such as A. euchroma) gibi cinsleri içermektedir (15).

Yaklaşık otuz yılı aşkın süredir yapılan çalışmalar, Çin tıbbında bilimin temelini oluşturan Zicao' nun birçok faydalı etkilerinin olduğu görülmüştür. Özellikle de shikonin ve türevleri bu ham ilaçların farmakolojik özelliklerini taşıyan temel maddelere sahiptir.

Bu sayıların artışı bize şikoninin anti-inflamatuvar, anti-kanser, anti-mikrobia ve yaraları iyileştirici gibi farmakolojik etkilerinden dolayı bu moleküle olan ilginin giderek arttığını göstermektedir (92).

2.4.1. Şikoninin Bioyararlanım ve Farmakokinetik Özellikleri

Zicao'nun çeşitli inflamasyon ve bulaşıcı hastalıklar için etkin tedavisi uzun bir geçmişe dayanmaktadır. Birçok çalışmalar bu etken maddenin birinci temel aktivite gösteren mekanizmasını anlamaya yöneliktir ve sonuçlar şikonin ve türevlerinin Zicao'nun temel aktif bileşeni olduğunu göstermektedir (14). Yapılan ilk çalışmalarda şikonin'in farmakolojik özellikleri ve de farmakokinetik davranışı ve toksisitesi bildirilmişti. Ne yazık ki, bu molekülün farklı türlerinin toksisitesi üzerine yapılan çalışmalar ve uygulama yöntemleri hala hatalıdır ve bu durum düzeltilmeye çalışılmaktadır.

Yüksek lipofilisite özelliğinden dolayı shikonin genellikle krem ve merhem gibi yağ bazlı maddelerin yapımında kullanılmaktadır ve düşük bioyararlanım özelliğinden dolayı suda çözünemezler (93). Ayrıca şikonin ve türevleri ısıya duyarlıdır, oksidasyon ve polimerizasyona eğilimlidir (93, 94).

2.4.2. Şikoninin Antioksidan Etkisi

Şikonin'in bitki kaynaklı bir antioksidan bileşen olduğu ve nöronal hücrelerde toksisiteye karşı koruyucu etkiye sahip olduğu düşünülmektedir. Farelerde oluşturulan iskemi modelinde yapılan bir çalışmada, şikoninin nöronal hasarı onardığı ve enfarktüs boyutunu küçülttüğü görülmüştür (17). Bu değişimler şikonin'in yardımı ile ROT seviyesinin ve nöronal hasarın azaltılması ile bağlantılıdır. Ayrıca bu modelden, şikonin'in GSH-PX-1'i de içeren antioksidan enzimlerini aktif hale getirdiği ve GSH/GSSG oranını azalttığı (17), Nrf2/ARE yolağında indükleyici ajan olarak şikoninin olası etkisinin gözlemlendiği (95,96) ve hücre içi redoks homeostazını onarması ve devam ettirmesi gibi sonuçlar elde edilmiştir (97).

Şikonin ve türevlerinin antioksidan özellikleri ve yapıları ile aktiviteleri arasındaki ilişki üzerine Assimopoulou ve arkadaşları tarafından çalışmalar yapılmış ve yaklaşık olarak

bu antioksidan etkinin nasıl gerçekleştiği saptanmaya çalışılmıştır (98). Bütün hidroksinaftakinonlar çalışılmış ve DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) radikaline karşı yüksek radikal gaz salınımının olduğu görülmüş, bu yüzden yan zincir olası küçük rol oynuyor iken, naftakinon parçasının varlığı aktiviteleri için esansiyel olduğu kanıtlanmıştır (92).

2.4.3. Şikoninin Nöroprotektif Etkisi

Şikoninin, farelerde iskemi/reperfüzyona karşı nöroprotektif etkisinin ve serebral beyin hasarlarına karşı önemli derecede koruyucu etkisinin olduğu yapılan çalışmalarla görülmüştür (17).

Şikonin ve türevlerinin (acetylshikonin, isobutyrylshikonin, isovalerylshikonin, β,β dimethylacrylshikonin, β -hydroxyisovalerylshikonin) mikrogia hücrelerinde santral sinir sisteminin inflamatuvar yanıtında ve immun sistemde birincil etkili molekül olduğu yapılan çalışmalarda görülmüştür (99). PC12 hücrelerinde de şikoninin, 6-OHDA (6 hidroksidopamin) ile indüklenmiş dopaminerjik nöron hücrelerinde oluşan nörotoksisiteye karşı koruyucu etkisinin varlığı gözlenmiştir. Ayrıca bcl-2 ekspresyonunu arttırdığı, bax ekspresyonunu ise azalttığı ve böylelikle apoptozu önlediği görülmüştür (97).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Gereçler ve Sarf Malzemeler

Çalışmamızda kullanılan kimyasallar, sarf malzemeler ve cihazlar tabloda listelenmiştir.

Tablo 1: Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihaz adı	Model-Kod
Laminer air flow	Euro Elone safemate1.2
Karbondioksit inkübatörü	Thermo Scientific model 310 series
Ters-faz ışık mikroskobu	Olympus CH-2
Santrifüj	Heraeus- Biofuge Stratos
Elisa reader	Thermo Scientific Multiskan GO
Buz makinası	Thermo Scientific
Otoklav	Hirayama HICLAVE HV-50
Derin dondurucu (-20°C)	Arçelik
Derin dondurucu (-80°C)	Thermo Forma Model
Derin dondurucu (-152°C)	Thermo Forma Model
Etüv	Thermo Heraeus
Hassas terazi	Precisa XB 220 A
Saf su cihazı	Milipore Mili-Q ZLX55003Y
Su banyosu	Nüve ST-402
Ph metre	Orion, USA Model 420

Tablo 2: Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Kimyasal Maddeler	Marka-Kod
RPMI-1640 Medium	Sigma-R8758
At serumu	Sigma-H1270
Fetal bovine serumu (FBS)	Sigma-F2442
Poli Lizin	Sigma P1149
PBS (phosphate buffered saline)	Sigma-P4417
MTT	Sigma-M2128
Tripsin-EDTA	Sigma-T4049
Penisilin/Streptomisin	Sigma-P4333
L-Glutamin	Sigma-G3126
Amiloid β fragman 25-35	GenScript-RP10008
Şikonin	Sigma-S7576
DMSO (Dimetil sülfoksid)	Sigma-D2650
Etanol	Sigma-493511
Tripan Blue	Sigma-T8154
TBARS kiti	Cayman chemical-10009055
CAT kiti	Cayman chemical-707002
SOD kiti	Cayman chemical-706002
GSH-Px kiti	Cayman chemical-703102
Nitrit/Nitrat analiz kiti	Cayman chemical-780001

3.2. Araştırmada Kullanılan Yöntemler

PC12 hücrelerinin *in vitro* koşullarda kültürü

- PC12 hücreleri
- Hücre kültür kaplarının poli lizin ile kaplanması
- Donmuş hücrelerin çözündürülmesi
- Hücrelerin pasajlanması ve dondurulması

MTT testleri

- A β ₂₅₋₃₅ toksisitesi ile *in vitro* Alzheimer modeli oluşturma
- Şikonin molekülünün doz aralığının belirlenmesi
- Şikoninin A β ₂₅₋₃₅ toksisitesine karşı etkileri

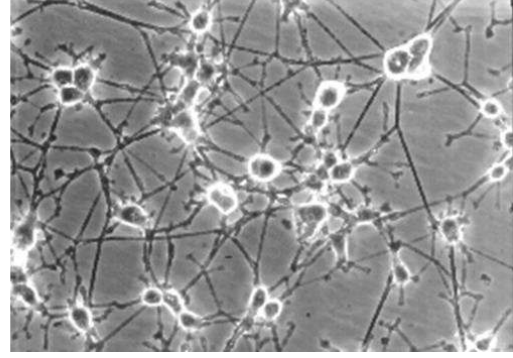
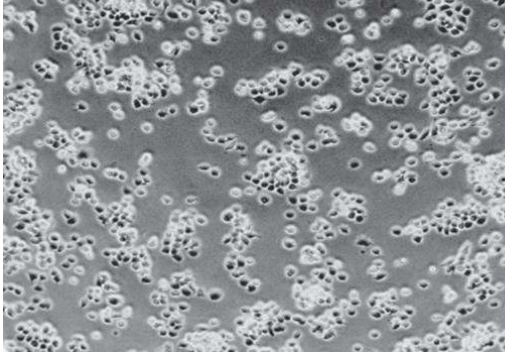
Oksidatif hasar testleri

- TBARS testi
- CAT testi
- SOD testi
- GSH-Px testi
- Nitrit/Nitrat testi

3.2.1. PC12 Hücrelerinin *in vitro* Koşullarda Kültürü

3.2.1.1. PC12 Hücreleri

İlk defa 1976 yılında Tischler ve Grene tarafından PC12 hücreleri sıçan feokromasitoma hücrelerinden elde edilmiştir. PC12 hücreleri adrenal bezin medullasından köken alan tek hücre klonudur. Feokromasitoma, nöroendokrin özelliğe sahip, nöronal krestten köken alan kromaffin hücrelerden oluşan bir tümördür. Bu hücre hattı nöronal dokudaki endokrin özellikleri göstermesi sebebiyle çalışmamızda nöronal model olarak kullanılmıştır. PC12 hücreleri morfolojik olarak poligonal görünümlü, adheran özellikte, kültür kabının yüzeyine yapışan küçük kümeler halinde çoğalan hücrelerdir. Büyüme ortamı olarak %10 at serumu %1 penisilin/streptomisin ve %5 sıgır serumu içeren RPMI-1640 kullanılır. Hücre sayılarının iki katına çıkması için ihtiyaç duyulan süre (doubling time) 50-60 saattir. Hücreler %5 CO₂ basıncı altında, nemli atmosferde 37 °C’de inkübe edilirler (62).



Şekil 12: PC12 hücrelerinin ters faz ışık mikroskopundaki görüntüsü (20x) büyütme

3.2.1.2. Hücre Kültür Kaplarının Poli-lizin ile Kaplanması

PC12 hücreleri zayıf adherent özelliğe sahip hücrelerdir ve kültür kabının yüzeyine yapışarak büyürler. Fakat plastik maddeye zayıf tutunma gösterdiklerinden dolayı tutunmalarını sağlayabilmek için kültür kaplarının yüzeylerinin poli lizin, kollagen ve laminin gibi protein yapıdaki maddeler ile kaplanması gerekmektedir. Bu nedenle hücre kültürü çalışmalarında bu hücreler kullanılmadan önce hücre kültür kapları Poli lizin ile kaplanır. Kaplama işlemi 10 µg/ml konsantrasyonda poli lizin çözeltisinin kültür kaplarında 1 saatlik inkübasyonu sonunda poli lizinin kültür kaplarına adsorbe edilmesi ile sağlanır.

İşlem Basamakları:

1. Hücre kültür kaplarının poli lizin ile kaplama işlemleri steril ortamda, laminar kabin içerisinde gerçekleştirildi.
2. 75 cm²'lik kültür kapları için 4 ml, 25 cm²'lik için 2 ml, 6 kuyucuklu plakların her bir kuyucuğuna 1 ml, 96-kuyucuklu plakların her bir kuyucuğuna 100 µl olacak şekilde 10 µg/ml konsantrasyondaki poli lizin çözeltisi eklendi.
3. Ekleme işleminden sonra kültür kapları laminar kabin içerisinde 1 saat bekletildi.
4. 1 saat sonunda kültür kaplarında kapladığımız yüzeye dokunmadan dikkatlice poli lizin çözeltisi pipet yardımı ile çekildi.
5. Yıkama işlemi için kültür kaplarına aynı miktarda otoklavlanmış distile su konuldu ve hafif çalkalama yapıldıktan sonra distile su uzaklaştırıldı. Bu işlem 2-3 kez tekrarlandı.
6. Kültür kaplarının kuruması için kapağı açık şekilde laminar kabinde kuruyana kadar (2-3 saat) bekletildi.

7. Kuruduktan sonra kültür kaplarının kapakları kapatılarak parafilm ile sarıldı ve kullanılıncaya kadar oda ısısında saklandı.

3.2.1.3. Donmuş Hücrelerin Çözdürülmesi

1. Daha önceden hazırlanmış olan, 4 °C’de muhafaza edilen %15 serum içeren ortam su banyosunda 37 °C’e ısıtıldı.
2. Daha önce poli lizin ile kaplanmış olan 25 cm²’lik kültür kabı laminar kabin içerisine alındı.
3. Hücre dondurma tüplerinde (Cryovial) bulunan hücreler -152°C’den çıkarılarak hızlıca 37°C’deki su banyosunda yaklaşık 2 dakika tutularak çözdürüldü.
4. Çözdürülmüş olan hücreler pipetle süspanse edildi ve 15 ml’lik tüplere aktarıldı ve üzerine yaklaşık 10 ml büyüme ortamı eklenerek pipet ile 2-3 defa alt üst edildi.
5. Tüpler 120 g de 5 dk santrifüj edildi.
6. Santrifüj sonrası üst faz atıldı, dipte kalan hücre kümesi önce 1 ml büyüme ortamı eklenerek pipetlemeyle çözdürüldü, sonra 2 ml daha büyüme ortamı eklenerek hücreler süspanse edildi (Pipetleme işlemi bu aşamada önemlidir, hücre kümeleri dağıtılarak mümkün olduğunca tek hücre haline getirilmesi daha kolay büyümelerini sağlayacaktır). Sonra istenilen kültür kaplarına aktarılarak üzeri büyüme ortamı ile uygun hacme tamamlandı.
7. Kültür kapları 37°C’de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi.
8. Yaklaşık bir gün sonra (16-20 saat) hücrelerin yüzeye tutunma oranları ve morfolojileri ters-fazlı mikroskop ile değerlendirildi.

3.2.1.4. Hücrelerin Pasajlanması ve Dondurulması

İşlem Basamakları:

1. Hücreler pasajlanırken, öncelikle kültür kaplarının içindeki ortam pipetle çekilip atıldı.
2. Kültür kabında arta kalan ortamı uzaklaştırmak için steril phosphate buffer saline (PBS) ile yıkama işlemi yapıldı.
3. 25 cm²’lik kültür kapları için 1.5 ml, 75 cm²’lik kültür kapları için 3 ml önceden 37°C’e ısıtılmış tripsin/EDTA ilave edilerek yaklaşık 2-3 dk kadar inkübatörde bekletildi.

4. Kùltür kabının yüzeyinden hücrelerin ayrıldığı mikroskop altında görüldükten sonra kùltür kaplarına en az tripsin/EDTA hacminin 2 katı kadar büyüme ortamı eklendi ve 2-3 defa pipetleme yapıldıktan sonra hücreler 15 ml'lik tüplere alındı.
5. Sonra tüpler 120 g de 5 dk santrifüj edildi.
6. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı.
7. Dipteki hücre pelleti 1-2 ml önceden ısıtılmış hücre ortamı ile süspanse edildi.
8. Hücre süspansiyonu içindeki hücre sayısı 'hücrelerin sayımı protokolüne' göre belirlendi.
9. Bir sonraki deney çalışmaları için gerekli hücre sayılarını elde edebilmek için hücre süspansiyonu belirli oranlarda seyreltilerek çoğalmaları için uygun kùltür kaplarına aktarıldı.
10. Sonra saklanmak istenilen hücreler $1-2 \times 10^6$ hücre/ml olacak şekilde %10 dimetil sülfoksit (DMSO) içeren ortam dondurma ortamında dondurma tüplerine eklendi.
11. Dondurma tüpleri önce -20°C 'e 2-3 saat bekletildikten sonra -152°C 'ye kaldırıldı.

Hücrelerin Sayımı:

İşlem Basamakları:

1. Hücrelerin pasajlanması işlemindeki hücrelerin tripsinle kaldırılıp, santrifüj edilip, dipte oluşan hücre pelleti elle vuruş hareketiyle çözündürölüp 5ml büyüme ortamı ile resüspanse edildi.
2. Sonra endorf tüpe hücre süspansiyonundan (20 μ l) ve tripan blue boyasından (20 μ l) 1:1 oranında eklendi.
3. Daha sonra boyalı hücre süspansiyonundan 10 μ l alındı ve Neubauer lamı kullanılarak ters-fazlı ışık mikroskobunda 20x büyütmede hücre sayımı yapıldı.
4. Sayma işlemi Neubauer lamının tüm karelerindeki hücreler sayılıp ortalaması alındı. Hücre süspansiyonunun ml'deki hücre miktarını (hücre sayısı/ml) belirlemek için hesaplama yapıldı.

Hesaplama: Ortalama sayım değeri x seyreltme faktörü x 10^4

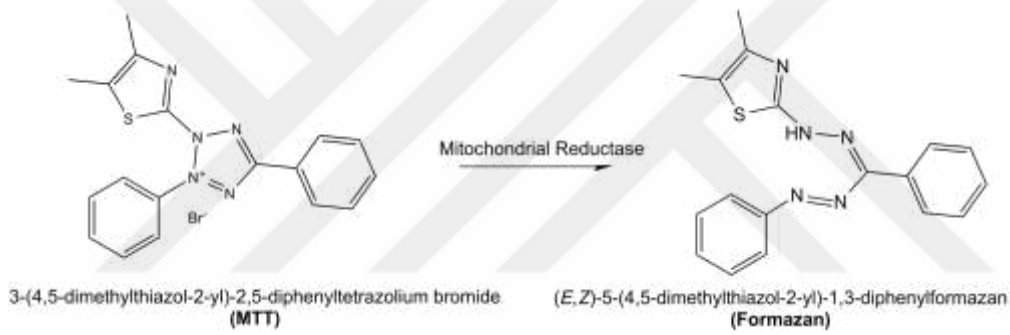
Deneylere geçmeden önce hücreler %70-80 yoğunlukta oluncaya kadar, yaklaşık olarak 2-3 günde bir %15-17 serum içeren kùltür ortamları ile beslenerek %5 CO₂ basınçlı ve nemli atmosferde 37°C 'de inkübatörde tutuldu.

Oluşturulan deneyler çalışmaya göre uygun kùltür ortamlarına ekimi yapıldıktan 24 saat sonra kimyasalların uygulanmasına geçildi.

Bütün deney koşulları kendi içerisinde üçer kez ve farklı zamanlarda en az 3 defa tekrarlanarak teyit edildi.

3.2.2. Hücre Canlılık Testi (MTT)

Bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı, MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] redüksiyonu yöntemiyle kolorimetrik olarak belirlenebilmektedir. Bu yöntem, canlı hücrelerin mitokondrilerinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi işlemidir. Bu işlem mitokondrial bir enzim olan süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağlıdır. Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Bunun sonucunda mitokondri fonksiyonu bozulmamış canlı hücreler mor renge boyanmakta, mitokondri fonksiyonu bozulmuş ölü hücreler ise boyanmamaktadır. (100, 101).



Şekil 13: MTT'nin süksinat dehidrogenaz aktivitesi ile formazan kristaline dönüşümü (102)

MTT Stok Solüsyonu Hazırlığı:

MTT boyası PBS içinde çözülerek steril ve karanlık ortamda 5mg/ml konsantrasyonda hazırlandı. Çözelti 0.22µm'lik filtre ile süzülerek hücre kalıntıları ortamdaki uzaklaştırıldı. MTT çözeltisi her analiz öncesi taze olarak hazırlandı.

Uygulama Basamakları:

1. Hücre canlılığının değerlendirileceği gün, hücrelerin inkübasyon sürelerinin ardından kültür kaplarına son konsantrasyon 5mg/ml olacak şekilde MTT çözeltisinden eklendi.
2. Kültür kabı 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 4 saat inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki süpernatant atıldı.
4. Oluşan formazan kristallerini çözmek için 200µl DMSO eklendi ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.

5. Süre sonunda 96 kuyucuklu kültür kabı Elisa plak okuyucusunda 570 nm’de absorbansları okutuldu.

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

3.2.2.1. A β ₂₅₋₃₅ Toksisitesi ile *in vitro* Alzheimer Modelinin Oluşturulması

A β ₂₅₋₃₅ çözeltisinin hazırlanması

1 mg’lık A β peptidi steril, otoklavlanmış distile su ile çözülerek 1mM’lık stok çözelti hazırlandı. Sonra 50 μ l olarak porsiyonlanıp -20°C’de saklandı. Çalışma yapılacağı zaman %1,5 serum içeren ortam ile seyreltilerek hazırlanan konsantrasyonlar her deneyden önce taze olarak hazırlandı.

PC12 hücreleri 96 kuyucuklu plakların her bir kuyusuna 2x10⁴ sayıda olacak şekilde ekimi yapıldı. Önce 16-24 saat boyunca hücrelerin tabana tutunabilmeleri için %15 serum içeren ortam, %5 CO₂ basıncı altında 37°C’deki inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Sonra hücrelerin deney boyunca serumun içerebileceği koruyucu faktörlerin etkisinden kurtulmak ve çoğalmalarını yavaşlatmak amacıyla kültür kapları içindeki ortam atılarak yerine %1,5 serum içeren ortam eklendi ve deneyde kullanılacak tüm kimyasal maddeler %1,5 serum içeren ortamda hazırlandı. Alzheimer modeli oluşturmak için hücrelere farklı konsantrasyonlarda A β ₂₅₋₃₅ (0.5, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 ve 100 μ mol) ve 24, 48 ve 72 saat gibi farklı sürelerde uygulandı. Kültür kapları 24 saatlik %5 CO₂ basıncı altında 37°C’deki inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonlar sonrası canlılık analizleri MTT yöntemi ile spektrofotometrik olarak saptandı. Kullanılan MTT yönteminin doğruluğunu ve güvenilirliğini sağlayabilmek amacıyla ölçüm sonrası alınan absorbansın 1.25 O.D. değerini geçmemesi önerilmektedir (103). Analiz sonucunda A β ₂₅₋₃₅ için uygun doz ve süre belirlendi. Tüm 96 kuyucuklu kültür kabı çalışmalarında her grup için 3’lü çalışıldı ve her test en az 3 defa tekrarlandı.

3.2.2.2. Şikoninin Doz Aralığının Belirlenmesi

Şikonin molekülünün hazırlanması

Şikonin molekülü DMSO’da çözündürülerek 1mM’lık stok solüsyon hazırlandı, sonra daha küçük hacimlere (50 μ l, 100 μ l) porsiyonlanarak -20°C’de saklandı. Çalışma yapılacağı zaman %1,5 serum içeren ortam ile seyreltilerek hazırlanan konsantrasyonlar her deneyden önce taze olarak hazırlandı.

Şikonin molekülünün A β toksisitesi üzerine etkisini görebilmek için öncelikle etkin dozunun belirlenmesi gerekmektedir. Bunun için farklı konsantrasyonlarda (5-60 μ mol) şikonin hücrelere uygulandı. Sonra kültür kapları 24 saatlik %5 CO₂ basıncı altında 37°C'deki inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda MTT testi ile hücre canlılıkları belirlendi.

3.2.2.3. Şikoninin A β ₂₅₋₃₅ Toksisitesine Karşı Etkilerinin Belirlenmesi

Amiloid beta toksitesi için uygun doz ve süre analizleri yapıldıktan ve şikoninin etkin toksik olmayan dozu belirlendikten sonra A β 'nin indüklediği sitotoksite üzerine şikoninin etkilerini araştırmak için MTT analizi yapıldı. Dört farklı deney grubu oluşturuldu.

1. grup; Kontrol grubu (Hiçbir tedaviye maruz bırakılmayan hücre grubu)
2. grup; A β uygulanan grubu
3. grup; Şikonin uygulanan grup
4. grup; A β +Şikonin uygulanan grup

3.2.3. Oksidatif Hasar Testleri

Besinlerin oksijen yardımıyla enerjiye dönüşümü esnasında reaktif moleküller olan serbest radikaller meydana gelir. Oksijen, metabolizma sırasında serbest radikal kaynağı olarak bilinmekle birlikte yaşam için önemli bir molekül olup çok fazla reaktif olan ara ürünlerin meydana gelmesine neden olabilmektedir. Antioksidan savunma sistemleri ROT olarak bilinen bu moleküllerin zararlı etkilerini önlemek için gelişmiştir. Ancak bazı durumlarda antioksidan savunma sistemi serbest radikallerin zararlı etkisini tamamen yok edemez ve oksidatif stres meydana gelir. Oksidatif stres ile birlikte oluşan bu ROT özellikle DNA, lipit ve protein gibi hücre bileşenlerine zarar verirler ve sonuçta aralarında akut renal yetmezlik, ateroskleroz, bronşit kalp hastalıkları, alkolik karaciğer hastalıkları, serebrovasküler hastalıklar, diyabet, akciğer hastalıkları, kanser, anfiyem, ve nörodejeneratif hastalıklar gibi yaşlanmaya bağlı dejeneratif bozuklukların da yer aldığı patolojik olayların oluşumuna neden olurlar (103).

Serbest radikallerin direkt ölçüm yöntemlerinin zorluğu nedeniyle serbest radikal aracılı doku hasarının belirlenebilmesi amacıyla daha çok oksidatif hasar sonucu oluşan ürünlerin ölçülmesi yoluna gidilmektedir (104,105).

Bu çalışmada oluşan oksidatif hasarın belirlenmesi amacıyla anti oksidan parametreler GSH-Px, SOD, CAT ve lipit peroksidasyon ürünü olan MDA seviyesi ELISA yöntemiyle ölçüldü. Ayrıca NO[•] analizi Griess yöntemi ile kolorimetrik olarak analiz edildi. ELISA

yöntemin prensibi antijen-antikor ilişkisine dayanmaktadır. Antijene özgü antikor ile kaplanmış kuyucuklara uygun miktarlarda standartlar ve numuneler ilave edilir. İnkübasyon ve yıkama işleminden sonra enzim ile işaretli antikor eklenir. Bağlı enzim substratla reaksiyona girerek renk değişikliğine neden olur. Reaksiyon için yeterli süre tamamlandıktan sonra reaksiyonu durdurma solüsyonu ile reaksiyon durdurulur ve renklenme spektrofotometrik yöntemle belirli dalga boyunda okuma yapılarak absorbans değerleri belirlenir. Bu renk değişikliği antijen varlığının ve düzeyinin tespit edilmesini sağlar.

ELISA yöntemi çalışması için PC12 hücrelerinden aşağıda belirtilen işlem basamakları uygulanılarak her bir örnek grubu için homojenat elde edilmiştir.

İşlem Basamakları:

1. Çalışma için kontrol, A β , Şikonin, A β +Şikonin olmak üzere 4 farklı örnek grubu oluşturuldu.
2. 6 kuyulu kültür plaklarına 1x10⁶ hücre/2 ml'de ekildi ve hücrelerin tutunması için 24 saat inkübasyonu sağlandı.
3. Süre sonunda hücrelerin üst fazı atıldı ve yerine %1.5 serum içeren ortam eklendi. Şikonin (20 μ M) ve A β (5 μ M) için stok çözeltiden %1.5 serum içeren ortam ile belirlenen konsantrasyon hazırlandı ve hücrelere uygulandı.
4. 24 saatlik inkübasyon sonrasında aşağıda belirtilen şekilde hazırlanan lizis tampon çözelti ile hücreler buz üzerinde lizis edildi.
5. Lizis olan hücreler 1.5 ml'lik ependorf tüplerine alındı ve 15.000 rpm de 15 dakika 4°C'de santrifüj edildi.
6. Santrifüj sonrasında hücre kalıntıları dibe çöktü, üst kısım ayrı ependorflara alındı.
7. Elde edilen homojenatların 1,5 ml'i çalışma için ayrıldı, kalan kısmı ise saklamak üzere -80°C'ye kaldırıldı.
8. Tiyobarbitürik asit reaksiyon ürünleri (TBARS) kit çalışması için homojenatlarla kitte belirtilen protokole uyularak deney yapıldı. Her örnek grubunda 3 defa çalışıldı.

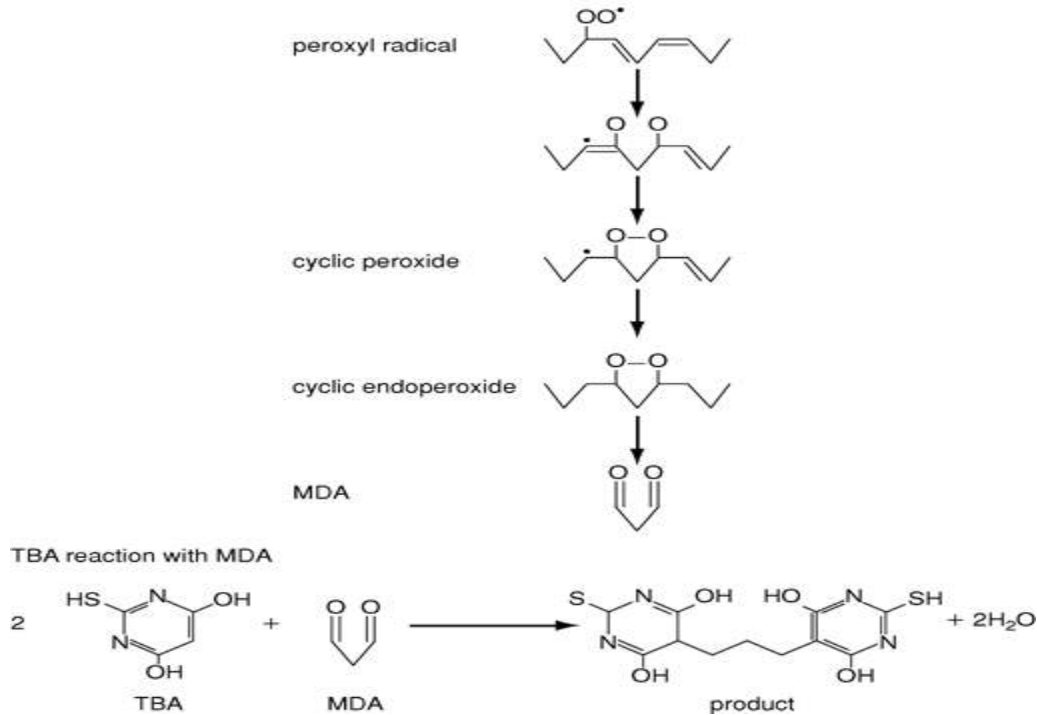
Lizis Tampon Hazırlanışı:

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

90 ml distile suyun içerisinde Tris-HCl eklenip pH=7,2'ye ayarlandı. Sonra üzerine yukarıda belirtilen diğer kimyasallar eklendi ve son hacim 100 ml olacak şekilde eksik kalan kısım tekrar distile su ile tamamlandı. Hazırlanan bu lizis tampon çözelti ile hücrelerden homojenat hazırlandı ve TBARS, CAT, GSH-Px kitlerindeki belirtilen protokole uyularak ELİSA yöntemi çalışıldı.

3.2.3.1. TBARS Testi (katalog no: 10009055)

Hücrelerin reaktif oksijen ürünlerine karşı en hassas bileşenleri lipitlerdir. Reaktif oksijen ürünleri tarafından membran lipitlerindeki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu lipit peroksidasyonu olarak bilinir. Lipit peroksidasyonunun en önemli ürünü MDA'dır. MDA düzeyi tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS) testi ile belirlendi. Bu test oksidatif hasar testlerinde lipit peroksidasyonunun belirlenmesinde en sık kullanılan yöntemlerden biridir. Tiyobarbitürik asit reaksiyon ürünleri malondialdehit (MDA) olarak ifade edildi. Testin prensibi: Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan ürünlerin asidik koşullarda tiyobarbitürik asit ile reaksiyona girmesi sonucu meydana gelen renk değişimi kolorimetrik olarak ölçülebilmektedir. Elde edilen absorbans değerleri molar ekstinksiyon katsayısı ($1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) kullanılarak hesaplandı.

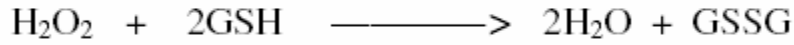


Şekil 14: MDA oluşumu ve MDA-TBA arasında meydana gelen reaksiyon (106)

3.2.3.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Testi (katalog no: 703102)

Glutasyon peroksidaz, sitozolde bulunan tetramerik bir enzimdir ve yapısında dört Se atomu vardır. Hidroperoksitler ile H_2O_2 indirgenmesini sağlar. Zar fosfolipitlerinden, fosfolipaz A2 tarafından salınan lipid hidroperoksitlere etki gösterir. Fagositik hücrelerde önemli bir etkisi vardır. Aşırı solunum esnasında serbest radikal hasarı sonrasında fagositik hücrelerin zarara uğramasını önler. GSH-Px aktivitesindeki azalma, hücre hasarına ve hidrojen peroksit birikmesine neden olur. GSH-Px, hem lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid hidroperoksitlerin metabolizmasını sağlar hem de lipid peroksidasyonunun başlamasını önler (103).

GSH-Px



3.2.3.3. Katalaz (CAT) Testi (katalog no: 707002)

Sitozolde ve peroksizomlarda bulunan ve yapısında hem grubu içeren bir protein olan katalaz, H_2O_2 'in suya ve moleküler oksijene çevrilmesini katalizler. CAT etil hidroperoksit ve metil hidroperoksit gibi küçük moleküllerin indirgenmesini de sağlar, fakat büyük molekül ağırlıklı olan lipid hidroperoksitlere karşı etki göstermez (105).

Katalaz



(Katalitik aktivite)

Katalaz

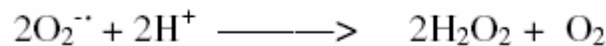


(Peroksidatik aktivite)

3.2.3.4. Süperoksit Dismutaz (SOD) Testi (katalog no: 706002)

Tüm aerobik hücreler SOD içerirler. Hem mitokondrilerde, hem de sitozolde bulunan bu enzim süperoksit radikallerini etkisiz hale getirerek, hücreleri $O_2^{\cdot -}$ zararlarından korur. SOD aktivitesi, dokularda oksijen basıncının (pO_2) yükselmesi ile artar. SOD, granülosit fonksiyonu ve fagosit edilmiş bakterilerin intraselüler olarak öldürülmesinde rol oynayan önemli bir enzimdir. İçeriğindeki metal iyonuna göre mitokondriyal tetramerik Mn-SOD ve sitozolik dimerik Cu, Zn-SOD olarak adlandırılır (103).

SOD



Bu deney için kitin protokolünde belirtilen liziz tampon çözelti ayrı olarak hazırlanıp, elisa yöntemindeki homojenat eldesi için yapılan işlem basamakları takip edilerek homojenat elde edilmiştir. Homojenat eldesinden sonra kitteki işlem basamaklarına uyularak deney yapılmıştır. Liziz tampon çözelti aşağıda belirtilen şekilde hazırlanmıştır;

Liziz tampon çözelti hazırlanışı:

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

90 ml distile su içerisine 10 mM tartılan tris-HCl eklenip pH=7,2' ye ayarlandı ve üzerine yukarıda belirtilen kimyasallar belirtilen oranlarda eklendi ve eksik kalan hacim tekrar distile su eklenerek 100 ml'e tamamlandı.

Her bir örnek grubu için homojenatlar hazırlanan bu liziz tampon ile elde edildikten sonra 3'er li olarak kitteki protokole uyularak deney yapıldı.

3.2.3.5. Nitrat/Nitrit Kolorimetrik Testi (katalog no: 780001)

Nitrik oksit, insan hücreleri tarafından biyokimyasal olarak sentezi yapılan bir endojen sinyal molekülü olmasının yanında solunumla kirlenmiş atmosferden alınan ve zararlı etkilere sahip bir ekzojen gaz molekülüdür (107). NO^{*}, yarı ömrü çok kısadır ve serbest radikal yapısına sahiptir. NO^{*}, lipofilik yapıda olup, yüksek konsantrasyonlardaki NO^{*}, oksijensiz ortamda oldukça stabildir ve suda çözünme özelliğine sahiptir. NO^{*}, üzerinde yük taşınamaması ve eşlenmemiş elektron bulundurmasından dolayı önemli bir mesajcıdır. Yani yüksüz olduğu için bir hücreden diğer hücreye hiçbir bariyerle karşılaşmadan kolaylıkla geçer ve eşlenmemiş elektrona sahip olması nedeniyle reaksiyon hızları yüksektir (108).

Nitrik oksit, L-argininden sitrülün oluşumu esnasında, L-argininin guanidin nitrojen grubunun hidroksilasyonu ile oluşan bir ara üründür. Sentez için NADPH, kalmodulin, oksijen ve dört kofaktör (hem, flavin mononükleotit, flavin adenin dinükleotit ve tetrahidrobiyopterin) gereklidir NO^{*}, vücudun birçok dokularında sentezlenmektedir. NO^{*}, endojen L-argininden nitrik oksit sentaz (NOS) enzim ailesi tarafından sentezlenir. NO^{*} sentezlendikten sonra hızlı ve kararlı bir şekilde okside edilerek son ürünler olan nitrit ve nitrat gibi inaktif bileşiklere dönüşür (108). NO^{*} oksijen ile hızla reaksiyona

girerek nitrite dönüştüğünden, “Griess Reaksiyonu” yöntemi kullanılarak nitrit/nitrat üzerinden NO[•] konsantrasyonu ölçülmektedir. Aşağıda belirtilen işlem basamakları takip edilerek NO[•] konsantrasyonu griess yöntemi ile tayin edilmiştir.

İşlem Basamakları:

1. Çalışma için kontrol, A β , şikonin, A β +şikonin olmak üzere 4 farklı örnek grubu oluşturuldu.
2. 6 kuyulu kültür plaklarına 1x10⁶ hücre/2 ml’de ekildi ve hücrelerin tutunması için 24 saat inkübasyonu sağlandı.
3. Süre sonunda hücrelerin üst fazı atıldı ve yerine %1.5 serum içeren ortam eklendi. Şikonin (20 μ M) ve A β (5 μ M) için stok çözeltiden %1.5 serum içeren ortam ile belirlenen konsantrasyon hazırlandı ve hücrelere uygulandı.
4. 24 saatlik inkübasyon sonrasında hücrelerin üstünü örten üst faz (süpernatant) ayrı ayrı ependorflara alındı.
5. 15.000 rpm de 15 dakika 4°C’de santrifüj edildi.
6. Santrifüj sonrası dipte ölü hücre kalıntıları oluştu, yeni ependorf tüplere üst faz, dibe çok gelmeden alındı.

3.3. İstatiksel Analiz

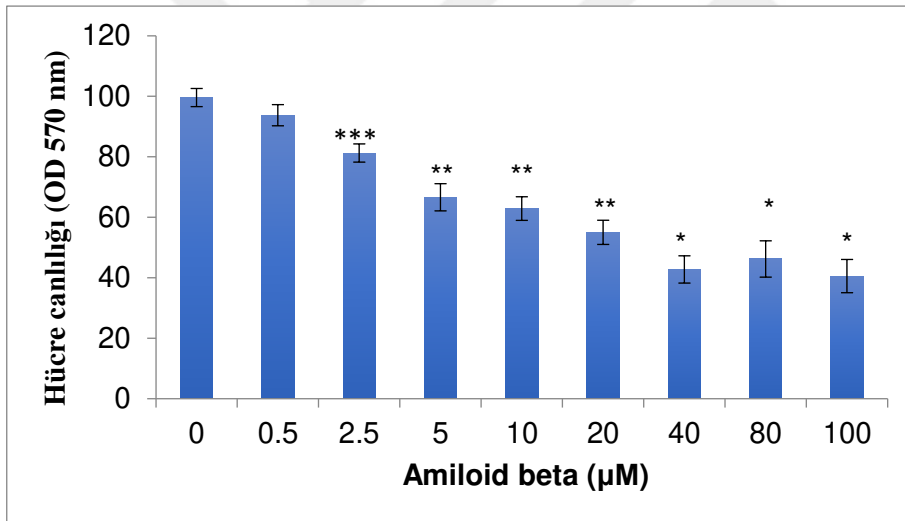
Verilerin istatiksel analizinde SPSS 16.0 (SPSS Inc.) istatistik programı kullanıldı. Sonuçlar ortalama + Standart Sapma şeklinde verildi. Hastaların ve kontrol grubunun verileri arasındaki farklar bağımsız gruplarda t testi ile analiz edildi. Gruplar arasında karşılaştırma yapmak için ANOVA ve Kruskal Wallis testi kullanıldı. Normal dağılım gösteren parametrik verilere Pearson korelasyon testi, normal dağılıma uymayan verilere ise Spearman korelasyon testi uygulandı. Tüm istatiksel değerlendirmelerde 0.05’den küçük p değeri istatiksel açıdan anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

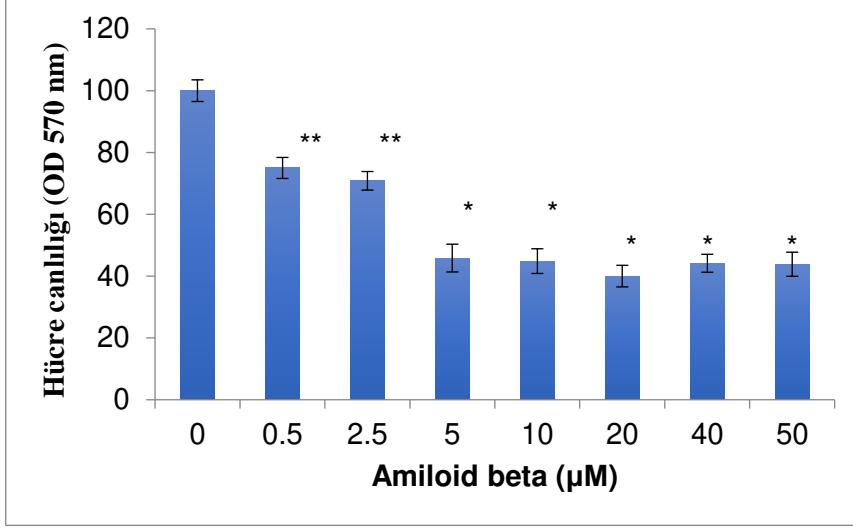
4.1. MTT Hücre Canlılık Testi Sonuçları

4.1.1. A β ₂₅₋₃₅ Toksisitesi ile in vitro Alzheimer Modelinin Oluşturulması

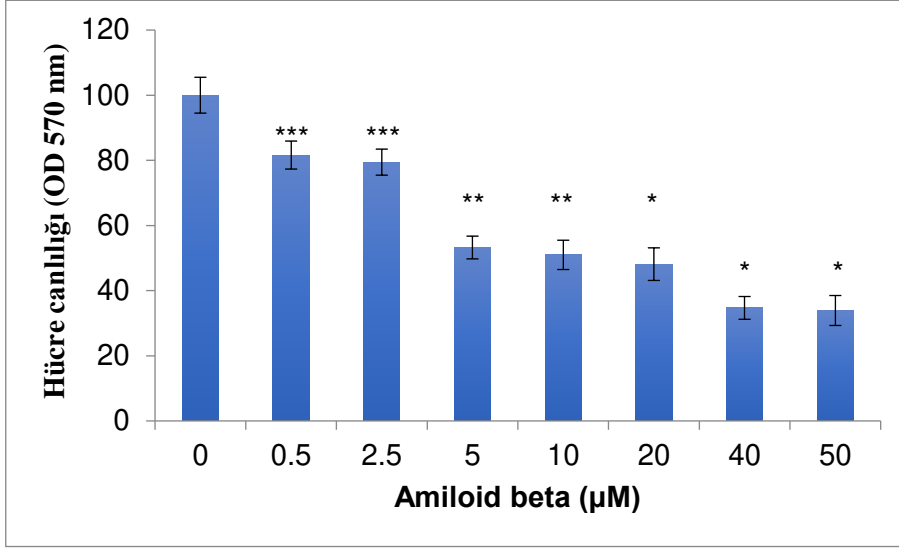
PC12 hücrelerinde A β ₂₅₋₃₅ peptidi ile nörotoksisite modeli oluşturmak için 0.5, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 ve 100 μ mol konsantrasyonlarda A β peptidi verilerek 24, 48 ve 72 saat süresince inkübasyonu yapıldı ve inkübasyon sonunda MTT testi ile hücre canlılıkları belirlendi. Analiz edilen dozlar ve süreler değerlendirildi ve 5 μ mol A β ₂₅₋₃₅'in hücrelerin yaklaşık %33'ü üzerine toksik etki göstererek hücre canlılığını azalttığı görüldü. Bu deney sonucu A β ₂₅₋₃₅ için en uygun süre ve dozun 24 saat 5 μ mol olduğu saptandı ve bu doz ve süre diğer çalışmalarda kullanıldı. Tüm 96 kuyucuklu plak çalışmalarında her grup için 3'lü çalışıldı ve her test en az 3 kez tekrar edildi.



Şekil 15: PC12 hücrelerinin farklı konsantrasyondaki A β ₂₅₋₃₅ ile 24 saat inkübasyonu sonucu elde edilen MTT sonuçları. (Kontrol vs A β ***: p<0.05, **: p<0.01, *: p<0.001).



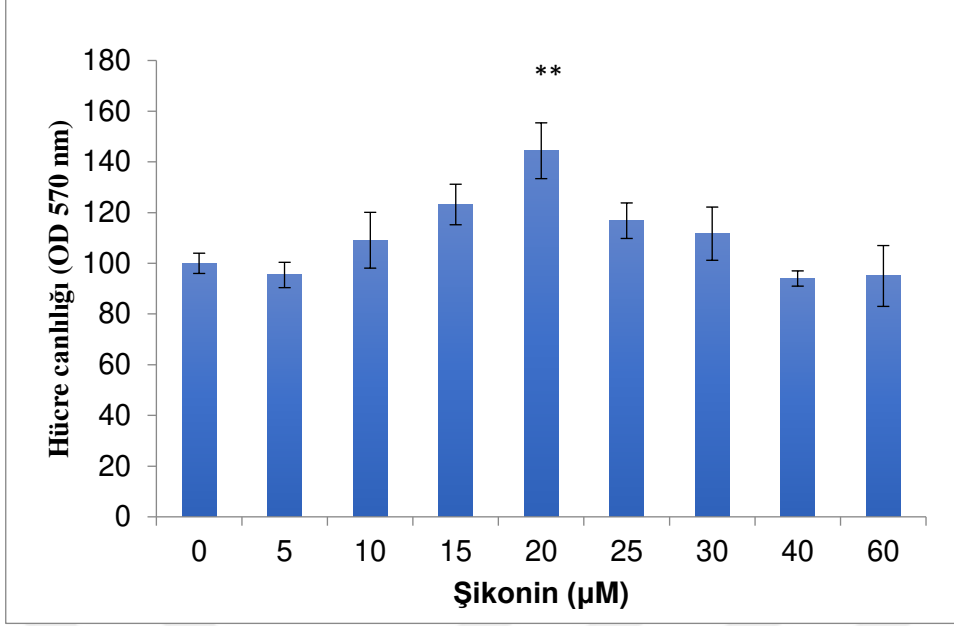
Şekil 16: Hücrelerin farklı A β_{25-35} konsantrasyonlarına maruziyeti, 48 saat sonra yapılan MTT sonuçları. (Kontrol vs A β **: p<0.01, **:p<0.001).



Şekil 17: Hücrelerin farklı A β_{25-35} konsantrasyonlarına maruziyeti, 72 saat sonra yapılan MTT sonuçları. (Kontrol vs A β ***p<0.05, **p<0.01, *p<0.001).

4.1.2. Şikonin Molekülünün Doza Bağlı Hücre Canlılığına Etkisi

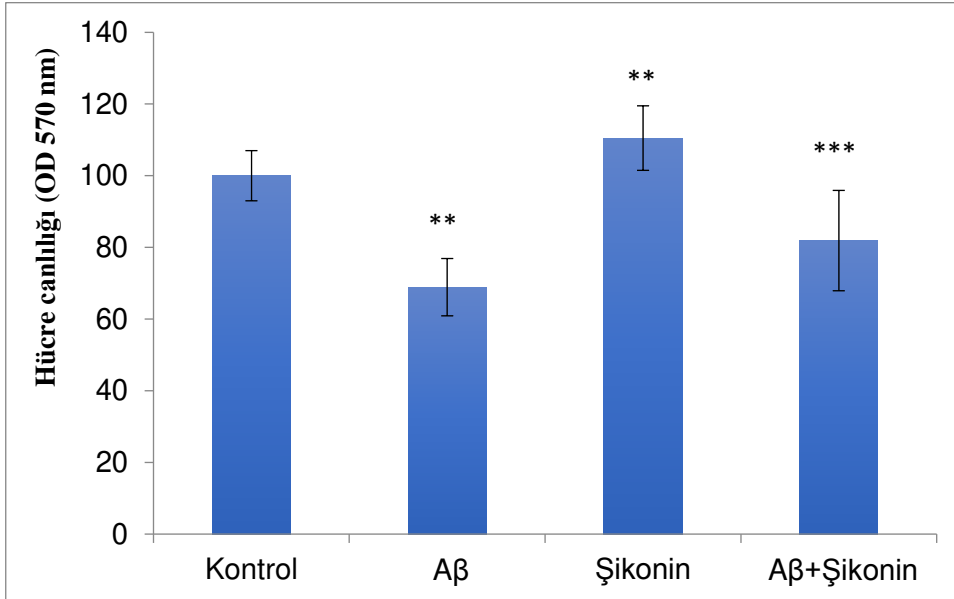
PC12 hücrelerinde şikonin molekülünün koruyucu etkisini belirlemek üzere farklı konsantrasyonlarda (5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 ve 60 μmol) uygulandı. 24 saat inkübasyonu yapıldıktan sonra MTT testi ile kullanılan tüm dozların hücre canlılığı üzerine toksik etki yapmadığı saptandı (Şekil 18). Kullanılan dozlardan canlılığı destekleyen konsantrasyonu olan 20 μmol düzeyi seçilerek çalışmada kullanıldı.



Şekil 18: Farklı konsantrasyonlarda uygulanan şikonin dozlarının 24 saatlik uygulaması sonucu elde edilen MTT sonuçları (Kontrol vs Şikonin **p<0.01).

4.1.3. Şikoninin A β ₂₅₋₃₅ Toksisitesine Karşı Etkisi

Bu aşamada, şikoninin A β ₂₅₋₃₅ toksisitesi üzerine etkinliği incelendi. Bu amaçla, hücreler 5 μ mol A β ₂₅₋₃₅'ya maruz bırakılırken bazı gruplara da 20 μ mol şikonin eklendi (Şekil 19). İnkübasyon sonunda (24 saat) yapılan canlılık analizleri, şikonin'in A β ₂₅₋₃₅ toksisitesini azaltarak hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde koruyucu etkisi olduğunu gösterdi (p<0.01).

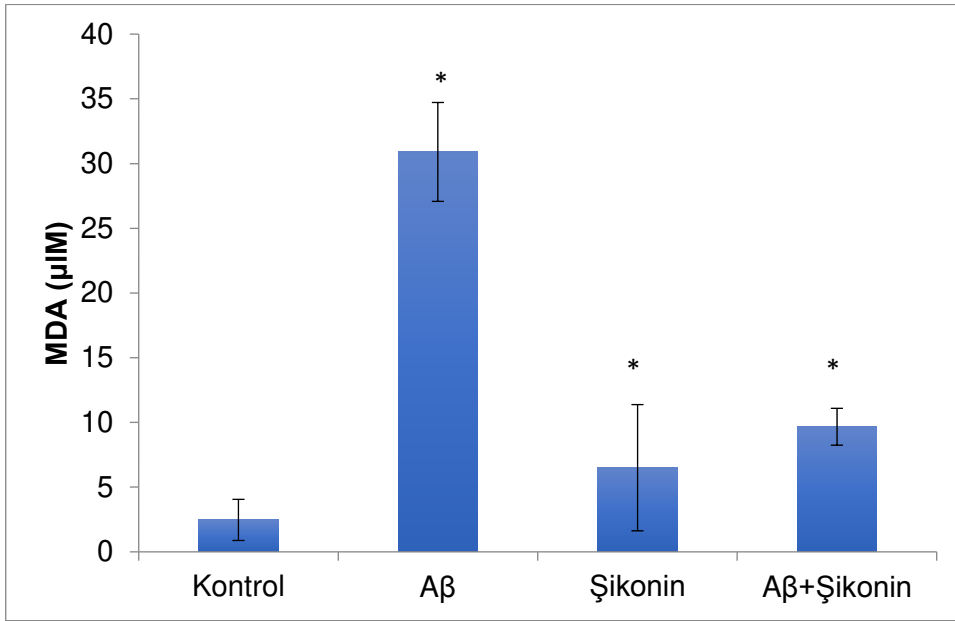


Şekil 19: Şikoninin (20 μ M) A β (5 μ M) toksisitesine karşı koruyucu etkisinin MTT canlılık testi ile değerlendirilmesi. Kontrol vs. A β **p < 0.01, A β vs. Şikonin **p < 0.01, A β vs. A β +Şikonin ***p < 0.05.

4.2. Şikoninin Oksidatif Hasara Karşı Korucu Etkileri

4.2.1. Lipit Peroksidasyonu-TBARS Testi Bulguları

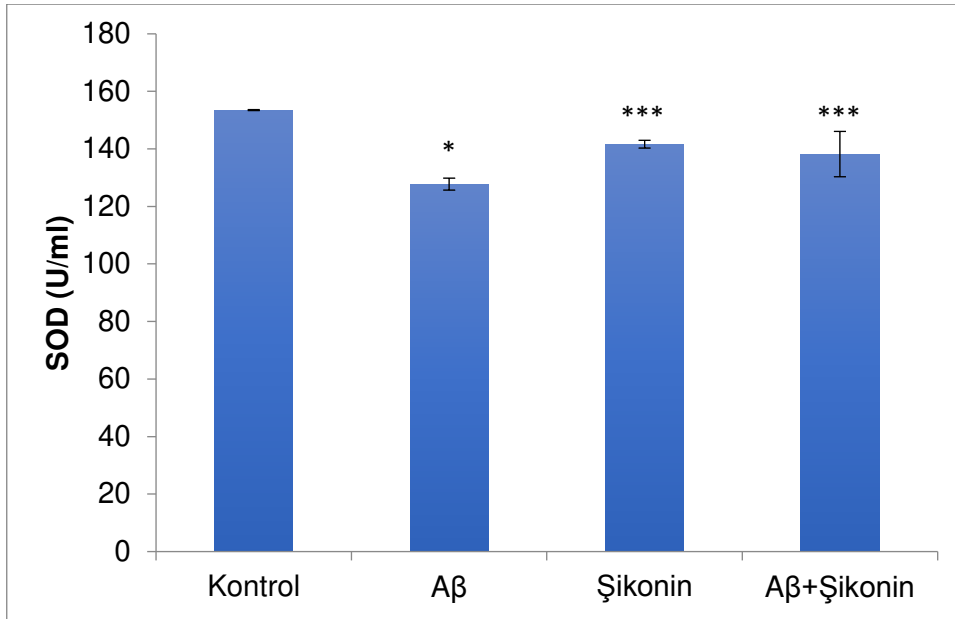
Lipit peroksidasyon ürünü olan MDA düzeyi tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS) testi ile belirlendi. Yapılan analizde, PC12 hücrelerinde $A\beta_{25-35}$, MDA üretimini belirgin düzeyde stimüle ederken ($p<0.001$), şikonin uygulamasının bu etkiyi büyük oranda düşürdüğü görülmüştür ($p<0.001$). Bu sonuç, şikoninin oksidatif hasara yani lipit peroksidasyonuna karşı koruyucu etkisini göstermektedir.



Şekil 20: Şikoninin lipit peroksidasyonuna karşı koruyucu etkisinin belirlenmesi. Kontrol vs. $A\beta$ (* $p < 0.001$). $A\beta$ vs. şikonin (* $p < 0.001$). $A\beta$ vs. $A\beta + \text{şikonin}$ (* $p < 0.001$).

4.2.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Testi Bulguları

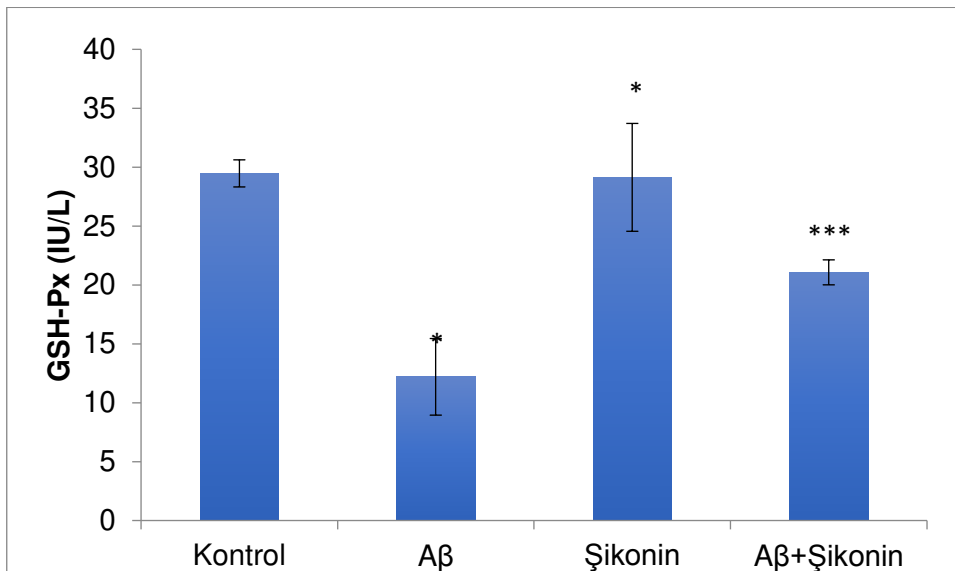
Yapılan analizde, kontrol grubuna kıyasla $A\beta_{25-35}$ 'in SOD düzeyini azalttığını ($p<0.001$), şikonin uygulamasının ise SOD düzeyini arttırdığı görülmüştür ($p<0.05$). Bu sonuç, PC12 hücrelerinde $A\beta$ toksisitesi ile oluşturulan oksidatif hasara karşı şikoninin SOD antioksidanının aktivitesini arttırarak koruyucu etkisi olduğunu göstermektedir.



Şekil 21: Şikoninin SOD enzimi üzerine etkisinin belirlenmesi. Kontrol vs. Aβ (* $p < 0.001$). Aβ vs. şikonin (** $p < 0.05$). Aβ vs. Aβ+şikonin (** $p < 0.05$).

4.2.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH Px) Testi Bulguları

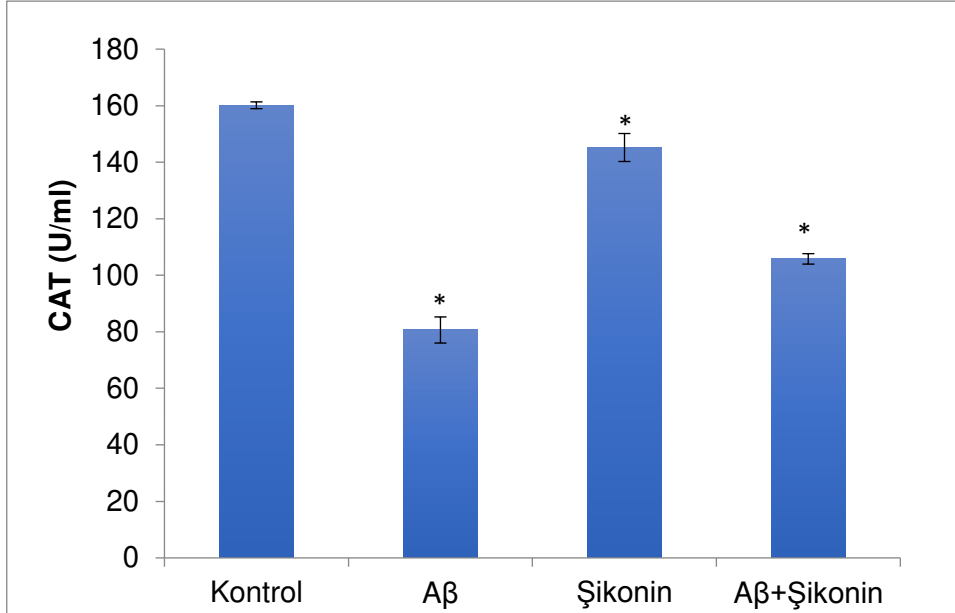
Yapılan analizde, kontrol grubuna kıyasla Aβ₂₅₋₃₅'in GSH-Px düzeyini azalttığını ($p < 0.001$), şikonin uygulamasının ise GSH-Px düzeyini arttırdığı görülmüştür ($p < 0.05$). Bu sonuç ile hücrelerde Aβ peptidi ile oluşturulan oksidatif hasara karşı şikoninin glutasyon peroksidaz enzim aktivitesini arttırarak koruyucu etkisinin varlığı gözlemlendi.



Şekil 22: Şikoninin GSH-Px aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi. Kontrol vs. Aβ (* $p < 0.001$). Aβ vs. şikonin (* $p < 0.001$). Aβ vs. Aβ+şikonin (** $p < 0.05$).

4.2.4. Katalaz (CAT) Testi Bulguları

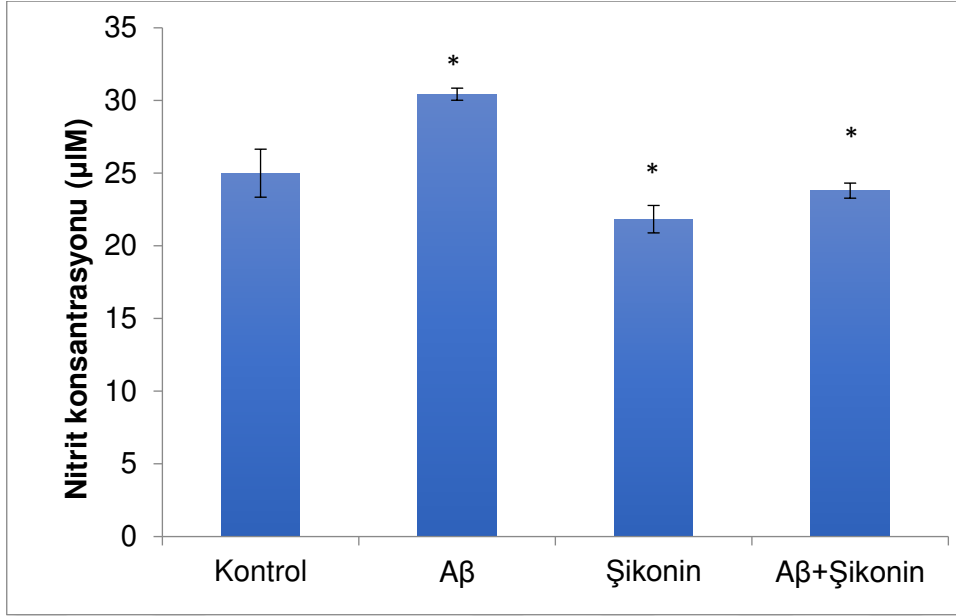
Yapılan analizde, kontrol grubuna kıyasla A β ₂₅₋₃₅'in katalaz düzeyini azalttığını (p<0.001), şikonin uygulamasının ise katalaz düzeyini arttırdığı görülmüştür (p<0.001).



Şekil 23: Şikoninin CAT aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi. Kontrol vs. A β (*p < 0.001). A β vs. şikonin (*p < 0.001). A β vs. A β +şikonin (*p < 0.001).

4.3. Nitrik Oksit Testi Bulguları

Nitrik oksit, serbest radikal yapısına sahip ve yarı ömrü çok kısa olan bir gaz molekülüdür. Bu çalışmada “Griess Reaksiyonu” yöntemi kullanılarak nitrit/nitrat üzerinden NO[•] konsantrasyonu ölçülmüştür. Analiz kolorimetrik olarak tayin edilmiştir. Yapılan analiz sonucuna göre A β 'nın NO[•] düzeyini arttırdığı, şikoninin ise NO[•] düzeyini azalttığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p < 0.001).



Şekil 24: Şikoninin NO^{*} düzeyi üzerine etkisinin belirlenmesi. Kontrol vs. Aβ (*p < 0.001). Aβ vs. şikonin (*p < 0.001). Aβ vs. Aβ+şikonin (*p < 0.001).

5. TARTIŞMA

Alzheimer Hastalığı, kortikal disfonksiyon ve ilerleyici bellek bozukluğu ile karakterize kronik nörodejeneratif bir hastalıktır. Tüm demanslar arasında en sık görülen demans tipidir ve görülme sıklığı yaşla birlikte artar. Günümüzde ölüm nedenleri arasında altıncı sırada görülmektedir ve ilerleme sürecinde hastanın yanı sıra çevresindekileri de olumsuz yönde etkileyerek toplum için sosyo-ekonomik bir problem meydana getirmektedir (3). Yapılan bir çalışmaya göre tahminen dünyada 40 milyon insanın çoğunluğu 60 yaş üstü olup demans hastalığına sahip olduğu ve bu durum 2050 yılına kadar her yirmi yılda bir ikiye katlanacağı tahmin edilmektedir (41). Bu nedenle AH patogenezi üzerine yapılan araştırmalar giderek önem kazanmaktadır.

Alzheimer hastalığının etiyopatogenezi tanımlamada kabul gören teorilerden birisi *Amiloid Kaskad Hipotezi*'dir. Bu hipoteze göre $A\beta$ 'nin aşırı üretilmesi sonucu meydana gelen agregatların toksik etki gösterdiği ve bunun sonucunda nöron ölümünün gerçekleştiği kabul edilmektedir (52). $A\beta$, beyinde çözünür ya da çözünmez yapılarda, monomerden yüksek molekül ağırlıklı oligomerlere kadar değişen formlarda hücre içinde veya dışında bulunabilmektedir (51). Senil plaklarda çözünmez formda ekstraselüler depozitler halinde birikiminin AH patogeneziinde temel mekanizma olduğuna dair artan görüşler bulunmakta ise de, $A\beta$ 'nin indüklediği toksisitenin oluşum mekanizması hala kesinlik kazanmamış durumdadır.

Alzheimer hastalığı modeli oluşturulurken $A\beta_{25-35}$ peptidi sıklıkla kullanılan bir $A\beta$ formudur (109). $A\beta_{25-35}$ peptidi 11 amino asitten oluşmaktadır. Nöronal dokuda APP'nin amiloidojenik parçalanması sonucu toksik $A\beta_{1-40}$ ve $A\beta_{1-42}$ fragmanları oluşmaktadır. Amfipatik özelliğe sahip olan $A\beta_{1-42}$ peptidinin C-terminalindeki 12-14 amino asitlik kısım hidrofobik olup, N-terminal kısmı ise hidrofiliktir. $A\beta_{25-35}$ peptidi $A\beta_{1-42}$ 'nin hidrofobik C-terminal kısmında lokalizedir (110). AH olanların beyinde $A\beta_{25-35}$ peptidin varlığı immunohistokimyasal olarak gösterilmiştir. Amiloidojenik süreçte üretilen ve toksik olan $A\beta_{1-40}$ monomerlerinin $A\beta_{25-35}$ peptidine dönüşebildiği

kanıtlanmıştır (111). Bu nedenle AH ile ilişkili mekanizmaların araştırılmasında A β ₂₅₋₃₅ peptidi sık olarak kullanılmaktadır.

Bizim çalışmamızda da *in vitro* AH modeli oluşturmak için nöronal toksisite ajanı olarak sentetik A β ₂₅₋₃₅ peptidi kullanılmıştır. A β ₂₅₋₃₅ peptidinin nöronal dokuda olası etkilerini inceleyebilmek için hücre hattı olarak PC12 (sıçan feokromasitoma) hücre hattı kullanılmıştır. PC12 hücreleri nöroendokrin özelliğe sahip kromaffin hücrelerden gelişmiş sıçan feokromasitoma hücreleri olup deneysel AH modeli oluşturmak için sık kullanılan bir hücre hattıdır (112).

PC12 hücre hattında nöronal sitotoksite oluşturmak için hangi doz ve sürede A β ₂₅₋₃₅ kullanılacağına ait literatürde farklı çalışmalarda farklı doz ve süreler bildirilmiştir. Yapılan birçok çalışmada PC12 hücrelerinde etkin A β doz ve süresi için genellikle 24 saatlik inkübasyon ile 10-20 μ mol olarak belirlenmiştir (113, 114,115). Jang JH ve ark. (2003) ise 36 saatlik inkübasyon ile 50 μ mol olarak belirlemişlerdir (116). Çalışmamızda PC12 hücrelerinde AH modeli oluşturmak için farklı konsantrasyonlarda (0.5, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 ve 100 μ mol) ve farklı sürelerde (24, 48 ve 72 saat) A β ₂₅₋₃₅ uygulanarak inkübasyona bırakıldı. Inkübasyonlar sonrası hücre canlılığı MTT testi ile analiz edildi. Yapılan MTT analizleri sonucunda 24, 48. ve 72. saatlerin sonunda hemen hemen tüm dozların kontrole göre hücre canlılığının anlamlı olarak azalmasına neden olduğu gözlemlendi (Şekil 15,16,17). Bu analizler sonucunda anlamlı nöron ölümüne yol açan doz ve süre olarak 5 μ mol ve 24 saat (hücrelerin yaklaşık %33'ü üzerine toksik etki gösteren doz) olarak seçildi (p<0.01). Bu doz ve süre ile deneylere devam edildi.

Şikonin geleneksel Çin tıbbında yaygın olarak yara iyileşmesinde kullanılmaktadır. Anti-inflamatuar, anti-trombotik, anti-mikrobial, anti-oksidan ve etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Lithospermum erthrorhizon Sieb. Et. Zucc. (Boraginaceae) bitkisinin kurumuş köklerinden elde edilmektedir. Şikonin son yıllarda ilgi odağı haline gelmiş olup birçok faydalı etkileri üzerine yapılan çalışmalar gittikçe artmaktadır (14,15).

Bu tez çalışmasında PC12 hücrelerinde A β ile oluşturulan *in vitro* AH modelinde şikonin'in A β ile indüklenen sitotoksite ve oksidatif hasara karşı olası koruyucu etkisi araştırılmıştır. Şikoninin birçok hastalıkta koruyucu rolü olduğu bilinmesine karşın,

AH'da önemli bir patofizyolojik mekanizma olan A β aracılı sitotoksite ve oksidatif hasar üzerine etkilerinin araştırıldığı bir literatür çalışması henüz bulunmamaktadır.

Amiloid beta için uygun doz ve süre analizi yapıldıktan sonra, şikoninin PC12 hücreleri üzerine etkilerini incelemek için farklı konsantrasyonlarda (5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 ve 60 μ mol) şikonin uygulandı. 24 saatlik inkübasyondan sonra yapılan MTT testi ile kullanılan tüm dozların hücre canlılığı üzerine toksik etki yapmadığı saptandı. Kullanılan dozlardan en düşük ve canlılığı destekleyen doz olan 20 μ mol seçilerek çalışmamızda kullanıldı.

Esmailzadeh E. vd. (2013), yaptıkları çalışmada şikonin'in PC12 hücrelerinde 6 OHDA ile oluşturulan nörotoksositeye karşı koruyucu etkisinin varlığını araştırmışlar ve 10 μ mol şikoninin oluşan toksisiteye karşı hücre canlılığını %70 koruduğu saptamışlardır (97).

Şikoninin PC12 hücre hattında A β ₂₅₋₃₅ toksisitesi üzerine etkilerini incelemek için MTT canlılık analizi yapıldı. MTT canlılık analizinde 20 μ mol şikoninin 5 μ mol A β ₂₅₋₃₅ toksisitesi azaltarak hücre canlılığını koruduğu saptandı (Şekil 19). Sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı idi (*p<0.001).

Alzheimer hastalığında A β ile ilişkilendirilen serbest radikal oluşumu hücrelerde oksidatif strese neden olmaktadır. Çözünür ve agregat halindeki A β 'nın nöron hücreleri membranlarına giderek lipit peroksidasyonu, protein oksidasyonunu tetiklediği ve RNT ve ROT'ların oluşumuna neden olduğu bilinmektedir. Tüm bu A β kaynaklı değişimler, E vitamini ya da diğer antioksidanlar ile inhibe edilebilmektedir (55).

Oksidatif stres, hücrelerin lipid tabakasının peroksidasyonuna sebebiyet veren RNT'lerin üretimi ile vücudun antioksidan savunma sistemi arasındaki dengesizlik olarak ifade edilmektedir (67).

Çalışmamızda şikoninin A β ₂₅₋₃₅ toksisitesine karşı koruyucu etkisi belirlendikten A β 'nın indüklediği oksidatif hasara karşı olası koruyucu etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla kontrol, A β ₂₅₋₃₅, şikonin ve A β ₂₅₋₃₅+şikonin olmak üzere 4 deney grubu oluşturuldu. Oksidatif hasarın belirlenmesi amacıyla antioksidan parametreler GSH-Px, SOD, CAT ve lipit peroksidasyon ürünü olan MDA, ELISA yöntemiyle ölçüldü. Ayrıca NO[•] analizi Griess yöntemi ile kolorimetrik olarak analiz edildi.

Hücrelerin ROT'lara karşı en hassas bileşenleri lipitlerdir. ROT'lar tarafından membran lipitlerindeki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu lipit peroksidasyonu olarak bilinir. Lipit peroksidasyonunun en önemli ürünlerinden biri MDA dır (114). Çalışmamızda

MDA düzeyi TBARS testi ile belirlendi. MDA düzeyi 4 deney grubunda ölçüldü ve elde ettiğimiz sonuçlara göre $A\beta_{25-35}$ 'in MDA düzeyini anlamlı olarak arttırdığı, ancak $A\beta_{25-35}$ 'in sebep olduğu MDA düzeyindeki artışın şikonin eklenmesi ile istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde azaldığı gözlemlendi ($p<0.001$) (Şekil 20). Bu sonuç şikonin'in $A\beta$ ile indüklenen lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etkisi olabileceğini göstermektedir.

Süperoksit dismutaz ROT karşı savunmanın ilk yoludur (17,117) hem mitokondrilerde, hem de sitozolde bulunmaktadır. Bu enzim $O_2^{\cdot-}$ radikallerinin zararlarını etkisiz hale getirerek, hücreleri $O_2^{\cdot-}$ radikallerinin zararlı etkilerinden korur. Dokularda oksijen basıncının (pO_2) yükselmesi ile SOD aktivitesi artar. İçeriğindeki metal iyonuna göre mitokondriyal tetramerik Mn-SOD ve sitozolik dimerik Cu, Zn-SOD olarak adlandırılır (103). Çalışmamızda $A\beta_{25-35}$ 'in SOD düzeyini anlamlı olarak azalttığı ($p<0.001$), ancak $A\beta_{25-35}$ 'in sebep olduğu SOD düzeyindeki azalmanın şikonin eklenmesi ile istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde arttığı gözlemlendi ($p<0.05$) (Şekil 21).

Katalaz ve GSH-Px, H_2O_2 'in moleküler oksijen ve suya dönüştürülmesini sağlayan enzimlerdir (17). CAT, peroksizomlarda ve sitozolde bulunur ve yapısında hem grubu içermektedir (103). Çalışmamızda yapılan analize göre $A\beta_{25-35}$ 'in CAT düzeyini anlamlı olarak azalttığı, ancak $A\beta_{25-35}$ 'in sebep olduğu CAT düzeyindeki azalmanın şikonin eklenmesi ile istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde arttığı gözlemlendi ($p<0.001$) (Şekil 23).

Glutatyon peroksidaz sitozolde bulunan tetramerik bir enzimdir ve yapısında dört Se atomu vardır. Hidroperoksitlerin ve H_2O_2 'in indirgenmesini sağlar. GSH-Px aktivitesindeki azalma, hücre hasarına ve H_2O_2 birikmesine neden olur. GSH-Px, hem lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid hidroperoksitlerin metabolizmasını sağlar hem de lipid peroksidasyonunun başlamasını önler (105). Yapılan analiz sonucuna göre $A\beta$ 'nın GSH-Px düzeyini anlamlı olarak azalttığı ($p<0.001$), ancak $A\beta_{25-35}$ 'in sebep olduğu GSH-Px düzeyindeki azalmanın şikonin eklenmesi ile istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde arttığı gözlemlendi ($p<0.05$) (Şekil 22). Bu sonuçlar şikonin, $A\beta_{25-35}$ aracılı oksidatif hasara karşı bu antioksidan enzim aktivitelerini artırdığı ve koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Alzheimer hastalığında aşırı miktarda $A\beta$ ve NFY birikimi sonucu oksidatif stres meydana gelmekte ve bu süreçte oksidan ve antioksidan sistem arasındaki denge bozulmaktadır (118). Bunun sonucunda ise serbest radikaller oluşmaktadır. Antioksidan savunma sistemi enzimlerinden olan SOD, CAT, GSH-Px oluşan ROT'ları zararsızlatarak oksidatif strese karşı koruyucu etki gösterirler.

Alzheimer hastalığında ROT'un aşırı üretimi ve antioksidan sistemin yetersizliği nedeniyle protein, lipid ve DNA gibi makromoleküller büyük oranda hasar görmekte ve nöron hücrelerinin ölümüne sebebiyet vermektedir. Ayrıca aşırı üretilen ROT' lar, mitokondriyal fonksiyon bozuklukları, A β ve APP üretimini ve yaşlanmayı tetikleyebilme ve sekretaz enzimlerini aktive edebilmektedir (68). Yapılan çalışmalarda serbest oksijen radikallerinin amiloid birikimini arttırıcı etki gösterdiği ve bu etkiyi bazı serbest radikal yakalayıcılarından olan E vitamininin korucu etki gösterdiği gözlemlenmiştir (64).

Bizim çalışmamıza benzer şekilde Wang Z. vd. (2010) yaptıkları çalışmada şikonin'in farelerde serebral iskemi/reperfüzyon hasarına karşı nöroprotektif etki sergilediğini saptamışlardır. Bu çalışmada şikonin'in iskemik beyin hasarına karşı koruyucu etkisinin varlığı saptanmış, lipid peroksidasyon ürünü olan MDA düzeyini azalttığı gözlenmiştir. Aynı zamanda şikonin'in SOD, CAT ve GSH-Px aktivitesini arttırdığı görülmüştür. Bu sonuçlar şikonin'in iskemi/reperfüzyon hasarına karşı nöroprotektif etkilerinin onun antioksidan etkilerinden dolayı olabileceğini göstermiştir (17).

Lu GA. vd. (2015), karbon iyon ışınlarıyla ışıplanmış farelerde oluşan beyin hasarına karşı şikonin'in koruyucu etkisini araştırmışlar ve şikonin'in farelerde karbon iyon ışınının oluşturduğu oksidatif strese karşı koruyucu etkisinin olduğunu, SOD, CAT ve GSH/GSSG oranını anlamlı derecede arttırdığını saptamışlardır (119).

Esmailzadeh E. vd. (2013), yaptıkları çalışmada PC12 hücrelerinde 6-OHDA ile oluşturulan nörotoksositeye karşı şikonin'in koruyucu etkisi araştırmışlardır. Bu çalışmada şikonin'in 6-OHDA ile oluşan nörotoksosite ve oksidatif hasara karşı koruyucu etkisinin varlığı görülmüş, ROT seviyesini ve nöronal hasarı azalttığı, antioksidan enzim aktivitesini arttırdığı (GSH-Px, SOD) gözlemlenmiştir (97).

Nitrik oksit, serbest radikal yapısına sahip olan ve yarı ömrü çok kısa bir gaz molekülüdür. NO $\cdot$ ölçümü yapılırken özellikle nitrit ölçümü tercih edilse de NO $\cdot$ metabolizması sonucu, biyolojik sistemlerde nitrit hem demiri içeren proteinler varlığında nitrata okside olmaktadır. Fizyolojik koşullarda NO $\cdot$ yaklaşık 3:2 oranında nitrit ve nitrata okside olmaktadır. Oluşum oranları örneğe bağlı olarak değişiklik gösterdiğinden, NO $\cdot$ metabolizmasının derecesinin en iyi göstergesi olarak nitrit ve nitratin birlikte ölçülmesidir (107). Bu çalışmada "Griess Reaksiyonu" yöntemi kullanılarak nitrit/nitrat üzerinden NO $\cdot$ konsantrasyonu ölçülmüştür. Yapılan analiz sonucuna göre A β 'nın NO $\cdot$

düzeyini arttırdığı, şikonin'in ise $A\beta_{25-35}$ 'in sebep olduğu NO^* düzeyindeki artışı istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.001$) bir düzeyde azalttığı gözlemlendi.

Bizim çalışmamıza benzer şekilde Prasad RG vd. (2015), lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen BV2 mikrogial hücrelerinde şikonin'in anti-inflamatuar etkisi araştırılmış ve bu çalışmada pro-inflamatuar mediatörler olan NO^* , prostoglandin E_2 , tümör nekroz faktör-a (TNF-a) düzeylerine ve de bunların temel düzenleyici genleri ve ürünleri olan indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) ve TNF-a ekspresyon düzeylerine bakılmış ve şikonin'in anti-inflamatuar etkisinin olduğu gözlemlenmiştir. Şikoninin NO^* seviyesini anlamlı derecede azalttığı görülmüştür (120).

Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar, $A\beta_{25-35}$ ile PC12 hücrelerinde oluşturulan *in vitro* AH modelinde şikonin'in oluşan nöronal sitotoksite ve oksidatif hücre hasarı üzerine olumlu etkilerini ortaya koymuştur. Böylece, şikonin'in AH'nda önemli bir patofizyolojik mekanizma olan $A\beta$ ile indüklenen sitotoksiste ve oksidatif hasarın önlenmesinde potansiyel bir ajan olabileceği düşüncemizin desteklendiğini görmekteyiz.

6. KAYNAKLAR

1. Alzheimer A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. Allg Z Psychiat 1907; 64: 146-148.
2. Alzheimer A. Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. Z Ges Neurol Psychiatr 1911; 4: 356-385.
3. Alzheimer's Association. Alzheimer's association report 2011 -Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 2011; 7(2): 208-244.
4. Katzman R, Saitoh T. Advances in Alzheimer's disease. FASEB J 1991; 5: 278-286.
5. Taneli B, Sivrioğlu Y, Taneli T. Alzheimer disease. In: H Aydın, İT Uzday eds. Gülhane Psychopharmacology Symposium. 1. Basım. Ankara: Gülhane Military Medical Academy Printing Office; 1999:31-80.
6. Scheltens P, Blennow K, Breteler M M B, Strooper de B, Frisoni B G, Salloway S, Flier W M V. Alzheimer's disease. The Lancet Volume 388, Issue 10043, 30 July–5 August 2016,505–517 [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01124-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01124-1)
7. Alzheimer's Association, Alzheimer's disease Facts and Figures, Alzheimer's & Dementia, 9 (2), 2013.
8. Öztürk GB, Karan MA. Alzheimer hastalığının fizyopatolojisi. Klinik Gelişim. 2009;22:32-46.
9. Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. Biochem Biophys Res Commun 1984; 120: 885-890.
10. Price JL, Morris JC. Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease. Ann Neurol 1999; 45: 358-368.
11. Butterfield DA, Lauderback C. Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: Potential causes and consequences involving amyloid β - peptide-associated free radical oxidative stres. Free Radical Bio Med, 2002; 32(11): 1050-1060.
12. Butterfield DA, Reed T, Newman SF, Sultana R. Roles of amyloid β - peptideassociated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. Free Radic Biol Med, 2007;43(5): 658-677.
13. Lu T, Pan Y, Kao S, Li C ve ark. Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. Nature, 2004; 429(6994): 883-891.

14. Chen X, Yang L, Oppenheim JJ, Howard OMZ. Cellular pharmacology studies of shikonin derivatives. *Phytother Res* 2002; 16: 199–209.
15. Papageorgiou VP, Assimopoulou AN, Couladouros EA, Hepworth D, Nicolaou KC. The chemistry and biology of alkannin, shikonin, and related naphthazarin natural products. *Angew Chem Int Ed Engl* 1999; 38: 270–301.
16. Wang L, Li Z, Zhang X, Wang S, Zhu C, Miao J, Chen L, Cui L, Qiao H. Protective effect of shikonin in experimental ischemic stroke: attenuated TLR4, p-p38MAPK, NF- κ B, TNF- α and MMP-9 expression, up-regulated claudin-5 expression, ameliorated BBB permeability. *Neurochemical research*. 2014 Jan 1;39(1):97-106.
17. Wang Z, Liu T, Gan L, Wang T, Yuan X, Zhang B, Chen H, Zheng Q. Shikonin protects mouse brain against cerebral ischemia/reperfusion injury through its antioxidant activity. *European journal of pharmacology*. 2010 Sep 25;643(2):211-217.
18. Mesulam M. Davranışsal ve Kognitif Nörolojinin İlkeleri Çeviri Editörü I. Hakan Gürvit Oxford University Pres. Inc. Yelkovan Yayıncılık. 2004.
19. Selekler K. Alois Alzheimer and Alzheimer's Disease. *Turkish Journal Of Geriatrics-Turk Geriatri Dergisi*. 2010 Jan 1;13:9-14.
20. Lle A, Greenberg SM, Growdon JH. Current pharmacotherapy for Alzheimer disease. *Annu. Rev. Med.*, 2006; 57: 513-533.
21. Berchtold NC, Cotman CW. Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer's disease: Greco-roman period to the 1960s. *Neurobiol Aging*, 1998; 19(3):173-189.
22. <http://www.amaassn.org/resources/doc/genetics/geneticsof alzheimers.pdf> (Aralık, 2013).
23. Goedert M, Spillantini MG. A century of Alzheimer's disease. *science*. 2006 Nov 3;314(5800):777-781.
24. Baykan B, Gürses C, Gökyiğit A. Epilepsi. *Nöroloji İ. Ü İstanbul Tıp Fak. Temel Klinik Bilimler Ders Kitapları*. Ed: A. Emre Öge. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. 2004:279-309.
25. Rowland LP, Merritt's Neurology. Onbirinci baskı ed. 2008: Güneş Tıp Kitabevleri. 771-776.
26. Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PS, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-Maclachlan DR, Alberts MJ, Hulette C. Association of apolipoprotein E allele ϵ 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*. 2011;77:950.

27. Zandi PP, Carlson MC, Plassman BL, et al. Cache County Memory Study Investigators. Hormone replacement therapy and incidence of Alzheimer disease in older women: the Cache County Study. JAMA 2002; 288: 2123-2129.
28. Tokaçer AB. Alzheimer Hastalığında hormonlar ve menopoz. Türkiye Klinikleri Nöroloji Dergisi 2003; 1: 49-54.
29. <http://www.nih.gov/news/pr/may2003/nia-27.htm>, (Aralık, 2013).
30. Cankurtaran M, Arıoğlu S, Alzheimer Hastalığı Risk Faktörleri, In: Arıoğlu S, ed. Geriatri ve Gerontoloji. 1. Basım Ankara: MN Medial ve Nobel, 953-968, 2006.
31. Karaman Y. Alzheimer Hastalığı ve diğer demanslar. 1. baskı. Ankara: Lebib Yalkın Matbaası. 2002.
32. Terry RD, Katzman R, Bick KL, Sisodia SS. Alzheimer Hastalığı. Çeviri editörü: İ. Hakan Gürvit. İstanbul: Yelkovan yayıncılık; 2001.
33. Luchsinger JA, Tang MX, Stern Y, et al. Diabetes mellitus and risk of Alzheimer's disease and dementia with stroke in a multiethnic cohort. Am J Epidemiol 2001; 154: 635-641.
34. Nizzari M, Thellung S, Corsaro A, Villa V, Pagano A, Porcile C, Russo C, Florio T. Neurodegeneration in Alzheimer disease: role of amyloid precursor protein and presenilin 1 intracellular signaling. Journal of toxicology. 2012 Feb 8;2012.
35. Souder E, Beck C. Overview of Alzheimer's disease. Nurs Clin North Am 2004; 39: 545-559.
36. Reitz C, Tang MX, Luchsinger J, et al. Relation of plasma lipids to Alzheimer disease and vascular dementia. Arch Neurol 2004; 61: 705-714.
37. Richard F, Fromentin-David I, Ricolfi F, Ducimetiere P, Di Menza C, Amouyel P, Helbecque N. The angiotensin I converting enzyme gene as a susceptibility factor for dementia. Neurology. 2001 Jun 12;56(11):1593-1595.
38. Arvanitakis Z, Wilson RS, Bienias JL, Evans DA, Bennett DA. Diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease and decline in cognitive function. Archives of neurology. 2004 May 1;61(5):661-666.
39. Ewins DL, Rossor MN, Butler J, Rogues PK, Mullen MJ, McGregor AM. Association between autoimmune thyroid disease and Familial Alzheimers disease. Clinical endocrinology. 1991 Jul 1;35(1):93-96.
40. Mayeux R, Stern Y. Epidemiology of Alzheimer disease. Cold Spring Harbor perspectives in medicine. 2012 Aug 1;2(8): a006239.
41. Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri CP. The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. Alzheimers Dement 2013; 9: 63-75.

42. Lambert MA, Bickel H, Prince M, et al. Estimating the burden of early onset dementia; systematic review of disease prevalence. *Eur J Neurol* 2014; 21: 563–569.
43. Gürvit H. Sinir Sisteminin Dejeneratif Hastalıkları. Demans Sendromu, Alzheimer Hastalığı ve Alzheimer dışı demanslar. In: Öge AE; eds. *Nöroloji*. İstanbul: Nobel Matbaacılık; 2004: 367-415.
44. Solomon B. Protective Molecules in Alzheimer 's disease: Therapeutic Antibodies, *Drug News Perspectives*, 15(7): 410, 2002.
45. Rissman RA, Poon WW, Blurton-Jones M, Oddo S, Torp R, Vitek MP, LaFerla FM, Rohn TT, Cotman CW. Caspase-cleavage of tau is an early event in Alzheimer disease tangle pathology. *The Journal of clinical investigation*. 2004 Jul 1;114(1):121-130.
46. Masters CL, Simms G, Weinman NA, et al. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 4245-4249.
47. Bird TD, Miller BL. Alzheimer's disease and other dementias. In: Kaspar DL et al.; eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 16th ed. McGraw-Hil; 2005:2393-2406.
48. Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, et al. Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron* 1994; 13: 45-53.
49. Cummings JL. Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2004; 351: 56.
50. Kaminsky YG, Marlatt MW, Smith MA, Kosenko EA. Subcellular and metabolic examination of amyloid- β peptides in Alzheimer disease pathogenesis: Evidence for A β (25 – 35). *Exp Neurol*, 2010; 221(1): 26-37.
51. Finder VH, Glockshuber R. Amyloid- β aggregation. *Neurodegenerative Diseases*. 2007 Apr 13;4(1):13-27.
52. Reitz C. Alzheimer's disease and the amyloid cascade hypothesis: A critical review. *Int J Alzheimers Dis*, 2012; 2012: 11 pages.
53. Zheng L, Cedazo-Minguez A, Hallbeck M, Jerhammar F, Marcusson J, Terman A. Intracellular distribution of amyloid beta peptide and its relationship to the lysosomal system. *Translational neurodegeneration*. 2012 Sep 26;1(1):19.
54. Li M, Chen L, Lee DHS, Yu L, Zhang Y. The role of intracellular amyloid β in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*, 2007; 83(3): 131-139.

55. Butterfield DA, Drake J, Pocernich C, Castegna A. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid β -peptide. *Trends Mol Med*, 2001; 7(12): 548-554.
56. Bennett DA, Schneider JA, Wilson RS, Bienias JL, Arnold SE. Neurofibrillary tangles mediate the association of amyloid load with clinical Alzheimer disease and level of cognitive function. *Archives of neurology*. 2004 Mar 1;61(3):378-384.
57. Götz LM, Ittner J. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurosci*, 2008; 9(7): 532-544.
58. Zotova E, Nicoll JAR, Kalaria R, Holmes C, Boche D. Inflammation in Alzheimer's disease: relevance to pathogenesis and therapy. *Alzheimers Res Ther*, 2010; 2(1): 1.
59. Dickson DW. Apoptotic mechanisms in Alzheimer neurofibrillary degeneration: cause or effect? *J Clin Invest*, 2004; 114(1): 23-27.
60. Dean E. Apoptosis in neurodegeneration: Programmed cell death and its role in Alzheimer's and Huntington's diseases. *Eukaryon*, 2008; 4: 42-47.
61. Xu Y, Yan J, Zhou P, Li J ve ark. Progress in Neurobiology Neurotransmitter receptors and cognitive dysfunction in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, 2012; 97(1): 1-13.
62. Walsh DM, Selkoe DJ. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron*, 2004; 44(1): 181-193.
63. Akan P, Çalan Ö. Nöronal hücre hatlarında amiloid β peptidinin oluşturduğu hasarda nörosteroidlerin rolü. *Dokuz Eylül Üniversitesi, Uzmanlık Tezi*, 2010.
64. Multhaup G, Ruppert T, Schlicksupp A, Hesse L, Behr D, Masters CL, Beyreuther K. Reactive oxygen species and Alzheimer's disease. *Biochemical pharmacology*. 1997 Sep 1;54(5):533-539.
65. Przedborski S, M Vila, Jackson-Lewis V. Neurodegeneration: what is it and where are we? *J Clin Invest*, 2003. 111(1): p. 3-10.
66. Ischiropoulos H, Beckman JS. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association. *The Journal of clinical investigation*. 2003 Jan 15;111(2):163-169.
67. Mercan U. Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. "*YYU Vet Fak Derg*." (2004): 1-2.
68. Chauhan V, Chauhan A. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Pathophysiology*, 2006;13(3): 195-208.
69. Altan N, Sepici Dinçel A, Koca C. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. *Türk J Biochem*, 2006; 31(2): 51-56.

70. Facchinetti F, Dawson VL, Dawson TM. Free radicals as mediators of neuronal injury. Cellular and molecular neurobiology.
71. Güven A, Erginsoy S, Kaya N. Kazlarda karbon tetraklorür zehirlenmesinin biyokimyasal ve patolojik parametrelere etkisi. Kafkas Ü. Vet. Fak. Derg. 2003; 9:131-136.
72. Kaya S, Pirinççi İ, Bilgili A. Veteriner hekimliğinde toksikoloji. Medisan yayın serisi. 1998; 35: 222-232.
73. Mates JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. Toxicology. 2000 Nov 16;153(1):83-104.
74. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. Toxicol Pathol, 2002; 30(6): 620-650.
75. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? Br J Pharmacol, 2004; 142(2): 231-255.
76. Abdollahi M, Bahreini-Moghadam A, Emami B, Fooladian F, Zafari K. Increasing intracellular cAMP and cGMP inhibits cadmium-induced oxidative stress in rat submandibular saliva. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. 2003 Jul 31;135(3):331-336.
77. Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaiee A. Pesticides and oxidative stress: a review. Medical Science Monitor. 2004 Jun 3; 10(6): RA141-7.
78. Çaylak E. Hayvanlarda ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. Tıp araştırma dergisi, 2011; 9(1): 73-83.
79. Ergin K. Yaşlanmayla İlgili Fizyolojik Değişiklikler. Ege Üniversitesi Hemşirelik Yüksek Okulu Dergisi 1992;8:75-82.
80. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınları, Konya. 1995;1.
81. Gultekin F, Delibas N, Yasar S, Kilinc I. In vivo changes in antioxidant systems and protective role of melatonin and a combination of vitamin C and vitamin E on oxidative damage in erythrocytes induced by chlorpyrifos-ethyl in rats. Archives of toxicology. 2001 Apr 10;75(2):88-96.
82. Karaca Ş, Güder H. Dermatolojide Antioksidan Sistem. Türk Dermatoloji Dergisi, 2009; 3: 32-39.

83. Halliwell B. Antioxidant characterization: Methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol*, 1995; 40(10): 1341-1348.
84. Nesil T. Sikloastragenol ve Astragalozit IV'ün PC12 hücre hattında 6-hidroksidopamin (6-OHDA) ile oluşturulan nörotoksositeye karşı nöroprotektif etkisinin araştırılması. Ege Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, 2011.
85. Butterfield DA, Koppal T, Howard B, Subramaniam R, Hall N, Hensley K, Yatin S, Allen K, Aksenov M, Aksenova M, Carney J. Structural and functional changes in proteins induced by free radical-mediated oxidative stress and protective action of the antioxidants N-tert-butyl-alpha-phenylnitron and vitamin E. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 854: 448-462.
86. Çakatay U, Telci A, Yılmaz Aİ, Akçay T, Sivas A. Yaşlanmanın plazma oksidatif protein hasarına etkisi. *Cerrahpaşa J Med* 2000; 31(4): 220-223.
87. Markesbery WR. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 1997 Dec 31;23(1):134-147.
88. Dizdaroglu M, Kirkali G, Jaruga P. Formamidopyrimidines in DNA: Mechanisms of formation, repair, and biological effects. *Free Radic Biol Med*, 2008; 45(12): 1610-1621.
89. Markesbery WR. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Rad Biol Med* 1997; 23: 134-147.
90. Yüksel M, Haklar G, Yalçın AS. Deneysel Alzheimer hastalığı modelinde reaktif oksijen türleri ve nitrik oksit düzeyleri. *Geriatrics* 2002; 5(2): 39-43.
91. Gürgöze SY, Şahin T, Durak MH. Memelilerde ortalama yaşam süresi ve yaşlanma sürecinde serbest radikallerin rolü. *İstanbul Üniv. Vet Fak Derg* 2007; 33(1): 43-49.
92. Andújar I, Ríos JL, Giner RM, Recio MC. Pharmacological properties of shikonin—a review of literature since 2002. *Planta medica*. 2013 Dec;79(18):1685-1697.
93. Albrecht A, Vovk I, Simonovska B. Addition of β -lactoglobulin produces water-soluble shikonin. *J Agric Food Chem* 2012; 60: 10834–10843.
94. Assimopoulou AN, Papageorgiou VP. Encapsulation of isohexenylnaphthazarins in cyclodextrins. *Biomed Chromatogr* 2004; 18: 240–247.
95. Yao Y, Brodie AM, Davidson NE, Kensler TW, Zhou Q. Inhibition of estrogen signaling activates the NRF2 pathway in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2010 Nov 1;124(2):585-591.
96. Zhang B, Chen N, Chen H, Wang Z, Zheng Q. The critical role of redox homeostasis in shikonin-induced HL-60 cell differentiation via unique modulation of the Nrf2/ARE pathway. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2012 Oct 15;2012.

97. Esmaeilzadeh E, Gardaneh M, Gharib E, Sabouni F. Shikonin protects dopaminergic cell line PC12 against 6-Hydroxydopamine-Mediated neurotoxicity Via both Glutathione-Dependent and independent pathways and by inhibiting apoptosis. *Neurochemical research*. 2013 Aug 1;38(8):1590-1604.
98. Assimopoulou AN, Papageorgiou VP. Radical scavenging activity of *Alkanna tinctoria* root extracts and their main constituents, hydroxynaphthoquinones. *Phytother Res* 2005; 19: 141–147.
99. Nam KN, Son MS, Park JH, Lee EH. Shikonins attenuate microglial inflammatory responses by inhibition of ERK, Akt, and NF- κ B: neuroprotective implications. *Neuropharmacology* 2008; 55: 819–825.
100. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 1983. 65(1-2): p. 55-63.
101. Boada, J., et al., MPP (+)-induced mitochondrial dysfunction is potentiated by dopamine. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. 268(3): p. 916-920.
102. http://www.wikiwand.com/en/MTT_assay.
103. www.oksante.com.tr/oksantest.pdf, oksidatif stres ve antioksidanlar, Oksante Ar-Ge Laboratuvarı 2012.
104. Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR. *Lippincott's Biyokimya* 3. Baskı s.146-147, Çeviri Ed. Ulukaya E. Nobel Tıp Kitapevleri Ltd Şti. 2007.
105. Yiğitbaşı T, Büyüksulu N. Reaktif oksijen türleri ve obezitede oksidatif stres. *Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 5(3):197-203, 2015.
106. Hall ED, Bosken JM. Measurement of oxygen radicals and lipid peroxidation in neural tissues. In: Coligan JE, Dunn BM, Speicher DW, Wingfield PT, editors. *Current Protocols in Neuroscience*, John Wiley press; 2009. Chapter 7:Unit 7.17.
107. Koşay S, Bayındır O, Ülker S. Nitrik oksit'in patolojik olaylardaki rolü. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi; 1996.
108. Fidancı Ş. Nitrik Oksit Ölçüm Yöntemleri. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2011;4 (3):1-8.
109. Li G, Ma R, Huang C, Tang Q, Fu Q, Liu H, Hu B, Xiang J. Protective effect of erythropoietin on β -amyloid-induced PC12 cell death through antioxidant mechanisms. *Neuroscience letters*. 2008 Sep 12;442(2):143-147.
110. 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.

111. Kubo T, Nishimura SY, Kaneko I. In vivo conversion of racemized beta amyloid ([D-Ser 26]A beta 1-40) to truncated and toxic fragments ([D-Ser 26]A beta 25-35/40) and fragment presence in the brains of Alzheimer's patients. *J Neurosci Res*, 2002; 70(3): 474-483.
112. Gao M, Zhou H, Li X. Curcumin Protects PC12 Cells from Corticosterone-Induced Cytotoxicity: Possible Involvement of the ERK1/2 Pathway. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 2009 Mar 1;104(3):236-240.
113. Khan A, Vaibhav K, Javed H, Khan MM, Tabassum R, Ahmed ME, Srivastava P, Khuwaja G, Islam F, Siddiqui MS, Shafi MM. Attenuation of A β -induced neurotoxicity by thymoquinone via inhibition of mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Molecular and cellular biochemistry*. 2012 Oct 1;369(1-2):55-65.
114. Fan CD, Li Y, Fu XT, Wu QJ, Hou YJ, Yang MF, Sun JY, Fu XY, Zheng ZC, Sun BL. Reversal of Beta-Amyloid-Induced Neurotoxicity in PC12 Cells by Curcumin, the Important Role of ROS-Mediated Signaling and ERK Pathway. *Cellular and molecular neurobiology*. 2016 Mar 14:1-2.
115. Qian X, Cao H, Ma Q, Wang Q, He W, Qin P, Ji B, Yuan K, Yang F, Liu X, Lian Q. Allopregnanolone attenuates A β 25-35-induced neurotoxicity in PC12 cells by reducing oxidative stress. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2015;8(8):13610.
116. Jang JH, Surh YJ. Protective effect of resveratrol on β -amyloid-induced oxidative PC12 cell death. *Free Radical Biology and Medicine*. 2003 Apr 15;34(8):1100-1110.
117. Li Y, Jiang B, Zhang T, Mu W, Liu J. Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). *Food chemistry*. 2008 Jan 15;106(2):444-450.
118. Huang WJ, Zhang X, Chen WW. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomed Rep*, 2016. 4(5): p. 519-522.
119. Lu GA, Wang ZH, Zhang H, Rong ZH, Chao SU, Yang LI, Jing SI, Liu YY, Wang ZG. Protective Effects of Shikonin on Brain Injury Induced by Carbon Ion Beam Irradiation in Mice. *Biomedical and Environmental Sciences*. 2015 Feb 28;28(2):148-151.
120. Prasad RG, Choi YH, Kim GY. Shikonin Isolated from *Lithospermum erythrorhizon* Downregulates Proinflammatory Mediators in Lipopolysaccharide-Stimulated BV2 Microglial Cells by Suppressing Crosstalk between Reactive Oxygen Species and NF- κ B. *Biomolecules & therapeutics*. 2015 Mar;23(2):110.

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Berlin/Almanya’ da doğdu. İlk orta ve lise eğitimini Gaziantep’te çeşitli okullarda bitirdi. 2007 yılında Celal Bayar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’ne başladı. 2011 yılında aynı bölümden mezun oldu. 2017 yılında Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimini tamamlamıştır.



