

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN AMİLOİD BETA
PLAK ÇÖZÜNDÜRME ETKİNLİKLERİNİN
DİFERANSİYE-SH-SY5Y HÜCRELERİNDE
ARAŞTIRILMASI VE DİFERANSİYE
HÜCRELERİN KAN-BEYİN BARIYER
BÜTÜNLÜĞÜNE ETKİSİNİN İN VİTRO
OLARAK İNCELENMESİ**

BELGİN SERT SERDAR

BİYOKİMYA
DOKTORA TEZİ

İzmir-2019

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2014970136

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN AMİLOİD BETA
PLAK ÇÖZÜNDÜRME ETKİNLİKLERİNİN
DİFERANSİYE-SH-SY5Y HÜCRELERİNDE
ARAŞTIRILMASI VE DİFERANSİYE
HÜCRELERİN KAN-BEYİN BARIYER
BÜTÜNLÜĞÜNE ETKİSİNİN İN VİTRO
OLARAK İNCELENMESİ**

**BİYOKİMYA
DOKTORA TEZİ**

BELGİN SERT SERDAR

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. A.Semra KOÇTÜRK

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
2017.KB.SAG.004 numarası ile desteklenmiştir.

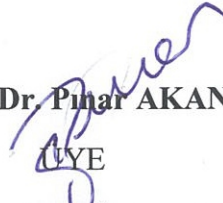
TEZ KODU:DEU.HSI.PhD-2014970136

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı,
Biyokimya Doktora programı öğrencisi Belgin SERT SERDAR ‘**Polifenolik Bileşiklerin
Amiloid Beta Plak Çözündürme Etkinliklerinin Diferansiye-SH-SY5Y Hücrelerinde
Araştırılması ve Diferansiye Hücrelerin Kan-Beyin Bariyer Bütünlüğüne Etkisinin İn
Vitro Olarak İncelenmesi**’ konulu Doktora tezini 21/10/2019 tarihinde başarılı olarak
tamamlamıştır.


Prof. Dr. A. Semra KOÇTÜRK

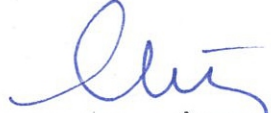
BAŞKAN

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi


Prof. Dr. Pınar AKAN

ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi


Prof. Dr. Hüray İŞLEKEL

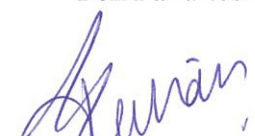
ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi


Doç. Dr. Ayten NALBANT

ÜYE

İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü
Fen Fakültesi


Prof. Dr. Ferhan GİRGIN SAĞIN

ÜYE

Ege Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Doç Dr. Güliz ARMAĞAN

YEDEK ÜYE

Ege Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi

Doç. Dr. Tuncay KÜME

YEDEK ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
TABLO LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
KISALTMALAR	x
TEŞEKKÜR	xiii
ÖZET	xivv
ABSTRACT	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi	1
1.2. Araştırmanın Amacı	1
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	3
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. ALZHEİMER HASTALIĞI	4
2.1.1. Alzheimer Hastalığında Kabul Edilen Moleküler Mekanizmalar	5
2.2.2. Alzheimer Hastalığında Tedavi Stratejileri	10
2.2. ALZHEİMER HASTALIĞINDA POLİFENOLLERİN ÖNEMİ	11
2.2.1. Polifenoller	11
2.2.1.1. Epigallocatekin-3 gallat	13
2.2.1.2. Punicalagin ve Ellagic asid	14
2.2.1.3. Gastrodin	16
2.3. KAN BEYİN BARIYERİ (KBB)	17
2.3.1. Endotel hücreleri	18
2.3.2. Perisitler	22
2.3.3. Astrositler	22
2.3.4. Bazal Membran	23
2.3.5. Nöronlar	23
2.4. <i>İn vitro</i> KAN BEYİN BARIYERİ	24

2.4.1. KBB Modelleri.....	26
2.4.1.1. İzole Beyin Mikrodamarları	26
2.4.1.2. İn Silico Modeller.....	26
2.4.1.3. Mikroakışkan Sistemler	27
2.4.1.4. Sferoid ve Ekstraselüler Matriks Temelli Modeller.....	27
2.4.1.5. Transwell Sistemler	27
2.4.2. İn Vitro KBB Modellerinin Doğrulanması.....	32
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	35
3.1. Araştırmanın Tipi	35
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	35
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları.....	35
3.4. Çalışma Materyali.....	35
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	35
3.6. Veri Toplama Araçları.....	35
3.6.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler.....	35
3.6.2. Yöntemler.....	38
3.6.2.1. Hücre Kültürü	38
3.6.2.1.1. Hücrelerin Dondurulması ve Çözülmesi	39
3.6.2.1.2. Hücre Sayımı ve Canlılık Kontrolü	40
3.6.2.2. SH-SY5Y Hücrelerinde Farklı Ortamların Diferansiyasyona Etkisinin İncelenmesi	40
3.6.2.3. Diferansiyasyonun Değerlendirilmesi	41
3.6.2.3.1. Morfolojik Değişikliğin Işık Mikroskobu ile Değerlendirilmesi.....	42
3.6.2.3.2. Nörit Uzunluğu Analizi.....	42
3.6.2.3.3. İmmünofluoresan Analizi	42
3.6.2.4. Diferansiye SH-SY5Y Hücrelerinin Stabilitésinin Değerlendirilmesi	42
3.6.2.5. Aβ₁₋₄₂ Plaklarının Hazırlanması	43
3.6.2.5.1. A β ₁₋₄₂ Fibril ve Plakların Oluşturulması.....	43

3.6.2.5.2. Tiyo flavin T Floresan Ölçümü	43
3.6.2.5.3. Alan Emisyon Taramalı Elektron Mikroskopi Görüntüleme (FESEM).....	44
3.6.2.5.4. Agrege A β ELISA Testi.....	44
3.6.2.6. Diferansiye SH-SY5Y Hücrelerinde Aβ₁₋₄₂ Plaklarının Toksisitesinin Belirlenmesi..	
.....	45
3.6.2.6.1. WST-1 Analizi.....	45
3.6.2.6.2. Laktat Dehidrojenaz Salınımının Belirlenmesi	46
3.6.2.7. Polifenollerin Diferansiye SH-SY5Y Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi	
.....	47
3.6.2.7.1. Polifenollerin Hazırlanması	47
3.6.2.7.2. WST-1 Analizi.....	47
3.6.2.7.3. Laktat Dehidrojenaz Salınımının Belirlenmesi	47
3.6.2.8. Polifenol ve Aβ₁₋₄₂ Birlikte Uygulamasının Diferansiye SH-SY5Y Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri	48
3.6.2.9. Polifenollerin Aβ₁₋₄₂ Plaklarını Çözündürme Etkinliklerinin İncelenmesi	48
3.6.2.9.1. Tiyo flavin T Floresan Ölçümü	48
3.6.2.9.2. FESEM Görüntüleme	48
3.6.2.9.3. ELISA Testleri	48
3.6.2.10. Polifenol Kombinasyonları ve Aβ₁₋₄₂ Birlikte Uygulamasının Diferansiye SH-SY5Y Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi	48
3.6.2.11. Polifenol Kombinasyonlarının Aβ₁₋₄₂ Plaklarını Çözündürme Etkinliklerinin İncelenmesi.....	49
3.6.2.11.1. Tiyo flavin T Floresan Ölçümü	49
3.6.2.11.2. FESEM Görüntüleme	49
3.6.2.11.3. Agrege A β ₁₋₄₂ ELISA Testleri	49
3.6.2.12. İn Vitro KBB Modelinin Oluşturulması	49
3.6.2.12.1. İn vitro KBB Modelinin Doğrulanması	51
3.6.2.12.1.1. Transepitelyal/Transendotelyal Elektrik Direncinin (TEER) Ölçümü	51
3.6.2.12.1.2. Transendotelyal Geçirgenlik Katsayısının Belirlenmesi	52

3.6.2.13. Üçlü Kültür Kan Beyin Bariyeri İle Alzheimer Modeli	53
3.6.2.14. Üçlü Kültür Kan Beyin Bariyerine Polifenollerin Uygulanması	53
3.6.2.14.1. Polifenol ve Polifenol Kombinasyonlarının Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri	53
3.6.2.15. Polifenollerin KBB Modelinden Geçişinin Değerlendirmesi	54
3.6.2.16. Alzheimer KBB Modeline Polifenol/Polifenol Kombinasyonlarının Uygulanması..	55
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi	56
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	57
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	57
3.10. Etik Kurul Onayı	57
4. BULGULAR	58
4.1. Diferansiyasyonun Değerlendirilmesi	58
4.1.1. Morfolojik Değişikliğin Değerlendirilmesi	58
4.1.2. Nörit Uzunluğunun Değerlendirilmesi	59
4.1.3. Nöronal Belirteçlerin Analizi	59
4.2. Diferansiye Hücrelerinin Stabilizasyonun Değerlendirilmesi	63
4.2.1. Işık Mikroskopi Görüntüleri	63
4.2.2. Nörit Uzunluğunun Değerlendirilmesi	63
4.3. A β ₁₋₄₂ Fibril ve Plak Oluşumun Doğrulanması	64
4.3.1. A β ₁₋₄₂ Fibril ve Plakların Tiyoflavin T Analizi	64
4.3.2. A β ₁₋₄₂ Fibril ve Plakların FESEM Görüntülemesi	65
4.3.3. A β ₁₋₄₂ Fibril ve Plakların Agrege A β Düzeyinin Belirlenmesi	66
4.4. Oluşturulan A β ₁₋₄₂ Plaklarının Diferansiye Hücreler Üzerine Toksisitesinin Belirlenmesi	68
4.4.1. A β ₁₋₄₂ Plaklarının Hücre Canlılığına Etkisi	68
4.4.2. A β ₁₋₄₂ Plaklarının Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi	68
4.5. Polifenollerin Diferansiye SH-SY5Y Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri	69
4.5.1. Polifenollerin Hücre Canlılığına Etkisi	69

4.5.2. Polifenollerin Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi.....	72
4.6. Polifenol ve A β ₁₋₄₂ Birlikte Uygulamasının Diferansiye SH-SY5Y Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri.....	73
4.7. Polifenollerin A β ₁₋₄₂ plaklarını çözündürme etkilerinin incelenmesi.....	74
4.7.1. Tiyoflavin T Analizi.....	74
4.7.2. FESEM	75
4.7.3. Polifenollerin Çözündürme Etkisinin Agregate A β ₁₋₄₂ ELISA Analizi ile İncelenmesi.....	76
4.8. Polifenol Kombinasyonları ve A β ₁₋₄₂ Birlikte Uygulamasının Diferansiye SH-SY5Y Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri	77
4.9. Polifenol Kombinasyonlarının A β ₁₋₄₂ plaklarını çözündürme etkilerinin incelenmesi	79
4.9.1. Tiyoflavin T Analizi.....	79
4.9.2. FESEM	79
4.9.3. Polifenol Kombinasyonlarının Çözündürme Etkisinin Agregate A β ₁₋₄₂ ELISA Analizi ile İncelenmesi.....	80
4.10. In-vitro KBB'i modelinin Doğrulanması	81
4.10.1. TEER Ölçümü	81
4.10.2. Transendotelial Geçirgenlik Katsayısının Belirlenmesi.....	83
4.11. Endotel ve Astrosit Hücre Canlılıklarına Polifenol ve Polifenol Kombinasyonlarının Etkisinin İncelenmesi.....	84
4.12. Polifenollerin üçlü KBB modelinden geçişinin değerlendirilmesi.....	87
4.13. Üçlü KBB modeline AB ve Polifenol/Polifenol Kombinasyonlarının Uygulanması.....	89
5. TARTIŞMA	91
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	102
7. KAYNAKLAR.....	103
8. EKLER.....	123
EK-1 ETİK KURUL ONAYI	123
EK-2 ÖZGEÇMİŞ	127
EK-3 MAKALE.....	130

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. İn vitro KBB modellerinin avantaj, sınırlılık ve önerilen uygulamaları.	34
Tablo 2. Projede kullanılan kimyasal malzemelerin, kitlerin marka ve kod numaraları.	36
Tablo 3. Projede kullanılan cihazların marka ve kod numaraları.	38
Tablo 4. Polifenollerin KBB modelinden geçişlerinin gallik asit eşdeğeri	88



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. APP metabolizmasında non-amiloidojenik ve amiloidojenik yolak.....	6
Şekil 2. A β fibril/ plak agregasyonun oluşumunun gösterimi.....	7
Şekil 3. A β ₁₋₄₂ fibril/ plak yapısal görüntüsü.	8
Şekil 4. Polifenollerin sınıflandırılması	12
Şekil 5. (-)- Epigallokatekin-3 gallat'ın kimyasal yapısı	14
Şekil 6. Punicalagin ve Ellagic asid'in kimyasal yapısı.....	15
Şekil 7. Gastrodin'in kimyasal yapısı.....	16
Şekil 8. Nörovasküler ünitenin şematik gösterimi. Endotel hücrelerine komşu astrosit, perisit ve nöron hücreleri.....	18
Şekil 9. KBB'deki sıkı bağlantılar (TJ), adheran bağlantılar (AJ).....	20
Şekil 10. KBB'de taşıyıcı sistemler	22
Şekil 11. Transwell sistemleri	28
Şekil 12. Kültüre edilen rodent embriyonik hipokampal piramidal nöronlarının polarizasyon evreleri.....	30
Şekil 13. Ohm direnç TEER ölçümü.....	32
Şekil 14. Diferansiyasyon deney grupları ve diferansiyasyonun değerlendirilmesi.	41
Şekil 15. Tiyoflavin T (ThT) - A β ₁₋₄₂ etki mekanizması.....	43
Şekil 16. WST-1 reaktifinin formazan yapısına dönüşümünün gösterimi.	45
Şekil 17. LDH yönteminin iki basamaklı enzimatik reaksiyonu.....	47
Şekil 18. Üçlü KBB modelinin oluşturulması.....	50
Şekil 19. İkili KBB modelinin (Endotel ve Diferansiye SH-SY5Y) oluşturulması	50
Şekil 20. İkili kan beyin bariyer modelinin (Endotel ve astrosit) oluşturulması.....	51
Şekil 21. A) EVOM2 direnç ölçer B) STX2 elektrodu C) insertte uygulama şeklinin gösterimi.	52
Şekil 22. Üçlü kültür kan beyin bariyerinde Alzheimer modeli.....	53
Şekil 23. Alzheimer üçlü kan beyin bariyer modeline polifenol/polifenol kombinasyonlarının uygulanması.....	55
Şekil 24. Deney akış şeması.	56
Şekil 25. Diferansiye ve diferansiye edilmemiş SH-SY5Y hücrelerinde görülen morfolojik değişiklikler.	58
Şekil 26. Nöron J programı ile nörit uzunluğu analizi.	59

Şekil 27. β -Tubulin III immüno Floresan sonuçları..	60
Şekil 28. β -III Tubulin sinyal yoğunluğu.	60
Şekil 29. MAP2 immüno Floresan sonuçları..	61
Şekil 30. MAP2 sinyal yoğunluğu..	61
Şekil 31. NF-H immüno Floresan sonuçları.....	62
Şekil 32. NF-H sinyal yoğunluğu.....	62
Şekil 33. Ters faz mikroskop görüntüleri.....	63
Şekil 34. Nörit uzunluğu analizi.....	64
Şekil 35. 10 μ M $A\beta_{1-42}$ örneklerinde ThT miktarının süreye bağlı değişimi.	65
Şekil 36. Farklı zaman dilimlerinde $A\beta_{1-42}$ fibril ve plaklarının FESEM görüntüleri.	66
Şekil 37. Agrege $A\beta$ standart grafiği.....	67
Şekil 38. Farklı inkübasyon sürelerinde agregre $A\beta$ düzeyleri.	67
Şekil 39. Diferansiye SH-SY5Y hücre hattında 10 ve 20 μ M $A\beta_{1-42}$ konsantrasyonlarının 24-72 saat inkübasyonu ile % canlılık değerlerinin değişimi..	68
Şekil 40. Diferansiye SH-SY5Y hücrelerinde 10 ve 20 μ M $A\beta_{1-42}$ konsantrasyonlarının 24-72 saat inkübasyonu ile % sitotoksosite değerlerinin değişimi	69
Şekil 41. Diferansiye SH-SY5Y hücrelerinde 0-20 μ M EGCG konsantrasyonlarının 24-48 saat inkübasyonu ile % canlılık değerlerinin değişimi.	70
Şekil 42. Diferansiye SH-SY5Y hücrelerinde 2-10 μ M Punicalagin konsantrasyonlarının 24-48 saat inkübasyonu ile % canlılık değerlerinin değişimi.	71
Şekil 43. Diferansiye SH-SY5Y hücrelerinde 10 -100 μ M Ellagic asid konsantrasyonlarının 24-48 saat inkübasyonu ile % canlılık değerlerinin değişimi.....	71
Şekil 44. Diferansiye SH-SY5Y hücrelerinde 10-100 μ M Gastrodin konsantrasyonlarının 24-48 saat inkübasyonu ile % canlılık değerlerinin değişimi	72
Şekil 45. Diferansiye SH-SY5Y hücrelerinde polifenollerin konsantrasyonlarının 24-48 saat inkübasyonu ile % LDH salınım değerleri..	73
Şekil 46. Polifenol ve $A\beta_{1-42}$ 'nin diferansiye SH-SY5Y hücrelerinde 24, 36 ve 48 saat inkübasyonu ile % canlılık değerlerinin değişimi..	74
Şekil 47. Polifenollerin $A\beta_{1-42}$ plaklarını çözünme etkinliği.	75
Şekil 48. Polifenollerin $A\beta_{1-42}$ plak çözündürme etkinliklerinin FESEM görüntüleri.	76
Şekil 49. Polifenollerin $A\beta_{1-42}$ plak çözündürme etkinliğine ait agregre $A\beta$ ELISA sonuçları..	77

Şekil 50. Polifenol kombinasyonları ve A β ₁₋₄₂ 'nin diferansiye SH-SY5Y hücrelerinde 12, 24 ve 36 saat inkübasyonu ile % canlılık değerlerinin değişimi.	78
Şekil 51. Polifenol kombinasyonlarının 12 ve 24 saat inkübasyonunda agrege A β ₁₋₄₂ plaklarını çözündürme etkinliği	79
Şekil 52. Polifenol kombinasyonlarının A β ₁₋₄₂ plak çözündürme etkinliklerinin FESEM görüntüleri.	80
Şekil 53. Polifenol kombinasyonlarının A β ₁₋₄₂ plak çözündürme etkinliğine ait ELISA sonuçları.	81
Şekil 54. KBB modellerinde TEER ölçümü.	82
Şekil 55. KBB üçlü modelinde günler arasındaki TEER ölçümünün değerlendirilmesi.	83
Şekil 56. Üçlü KBB modelinde geçirgenlik analizi.	84
Şekil 57. hCMEC/d3 hücre hattında EGCG, PU, EA ve GA'nın 24 saat inkübasyonu ile % canlılık değerleri	85
Şekil 58. Astrosit hücre hattında (HA) EGCG, PU, EA ve GA'nın 24 saat inkübasyonu ile % canlılık değerlerinin değişimi.	86
Şekil 59. hCMEC/D3 ve HA hücrelerinde polifenol kombinasyonunun 24 saat inkübasyonu ile % canlılık değerlerinin değişimi.	87
Şekil 60. Gallik asit standart grafiği.	87
Şekil 61. KBB modelline A β ₁₋₄₂ ve polifenol uygulamaları sonrası 6. günde TEER değerleri.	89
Şekil 62. KBB modeline uygulanan polifenol/kombinasyonlarının A β ₁₋₄₂ plaklarını çözündürme etkinliği.	90

KISALTMALAR

A β : Amiloid beta peptidi

A β ₁₋₄₂: Amiloid beta peptid -1-42 aminoasit

AGF: Astrosit büyüme faktörü

AH: Alzheimer hastalığı

AICD: Amiloid prekürsör protein intraselüler domain peptid

AJ: Adheran bağlantılar

AM: Astrosit besiyeri

ApoE: Apolipoprotein E

APP: Amiloid prekürsör protein

BDNF: Beyin türevli nörotrofik faktör

CREB: cAMP response element binding

β -III Tubulin: Beta-III Tubulin

dc-AMP: Dibütiril siklik adenosin monofosfat

DMSO: Dimetil sülfoksit

EA: Ellagic asid

ECM: Ekstraselüler matriks

EGCG: (-)- Epigallokatekin-3 gallat

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent metodu

ERK: ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz

FBS: Fetal sığır serum

FC: Folin-Ciocalteu

FESEM: Alan emisyon taramalı elektron mikroskopi

FDA: Amerikan ilaç ve gıda dairesi

GA: Gallik asit

GAE: Gallik asit eşdeğeri

hCMEC/D3: İnsan Beyin Mikro Kapiller Endotel hücre hattı

HA: İnsan astrosit hücre hattı

HO-1: Hem oksijenaz-1

LDH: Laktat dehidrogenaz

LiCl: Lityum klorür

LRP-1: Düşük dansiteli lipoprotein reseptör ilişkili protein-1

KBB: Kan beyin bariyeri

KCl: Potasyum klorür

Kom 1: EGCG+PU kombinasyonu

Kom 2: EGCG+ EA kombinasyonu

Kom 3: EGCG+GA

Kom 4: PU+EA

Kom 5: PU+GA

Kom 6: GA+EA

IL-6: İnterlökin 6

IL-1 β : İnterlökin

MAP2: Mikrotübüler ilişkili protein-2

Mix Medium: KCl, dc-AMP, Glutamax, B27, Neurobasaldan oluşan kültür ortamı

NA-F:Sodyum fluoresein

NF-H: Nörofilament ağır zincir polipeptidi

NF- κ B: nükleer faktör kappa

NFY: Nörofibril yumak

NMDA: N-metil-D-aspartat

PBS: Fosfat tamponu

Pe: Transendotelyal geçirgenlik katsayısı

PI3K/AKT: Fosfoinozitid 3-Kinaz/AKT

PKC: Protein kinaz C

PS1: Presenilin 1

PS2: Presenilin 2

PU: Punicalagin

RA: Retinoik asit

RHT: Ringer HEPES tamponu

SH-SY5Y: İnsan nöroblastoma hücre hattı

SLC: Çözünen taşıyıcı

SOD: Süperoksid dismutaz

SSS: Santral Sinir Sistemi

sAPP α : APP α -sekretaz ile kesildiğinde açığa çıkan N-Terminal Fragment

sAPP β : APP β -sekretaz ile kesildiğinde açığa çıkan N- Terminal Fragment

TJ: Sıkı bağlantılar

TEER: Transepitelyal /Transendotelyal elektrik direnci

ThT: Tiyoflavin T

WST: (4-[3-(4-iyodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolyum]-1,3-benzen disülfonat)

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimi sonsuz bilgileri ile şekillendiren ve güzelleştiren, öğrencisi olmaktan hep gurur duyduğum, zorlandığım her noktada destek veren, cesaretlendiren, bilimsel çalışma kültürünü bana öğreten saygıdeğer Danışmam Hocam, Prof. Dr. Semra KOÇTÜRK'e

Doktora tezim ve araştırmalarımda bana destek olan, sorularıma çözüm aradığımda kapılarının hep açık olduğunu bildiğim, bilgilerinden ve tecrübelerinden çok şey öğrendiğim sevgili Hocalarım Prof. Dr. Pınar AKAN'a, Prof. Dr. Sami Kemal KORKMAZ'a, Doç. Dr. Ayten NALBANT'a ve Doç. Dr. Özlem GÜRSOY DORUK'a

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Sezer Uysal'a ve diğer Öğretim Üyelerine, tüm evrak işlerimizi büyük bir özveri ile yapan anabilim dalımız sekreteri EDA OLUM'a, karşılaştığımız tüm sorunlara kısa sürede çözüm bulan EMİN ÇAVUŞLU'ya

Laboratuvar çalışmalarımdayki desteklerinden dolayı Samar AHMED'e ve Tuğba ERKMEN'e, bu zor yolda bana destek olan ve her zaman yanımda olduğunu bildiğim değerli arkadaşlarım Didem KELEŞ BARTIK'a, Murat SİPAHİ'ye ve Şeniz İNANÇ SÜRER'e

Her türlü laboratuvar imkanı sağlayan İzmir Uluslararası Biyotip ve Genom Merkezine başta Defne ÖZTÜRK 'e olmak üzere tüm çalışanlarına,

Doktora eğitimime "BİDEB 2228- B Yüksek Lisans Öğrencileri İçin Doktora Burs Programı" ile tarafıma vermiş olduğu maddi destekten dolayı TÜBİTAK'a,

Tüm hayatım boyunca desteklerini hiç esirgemeyen, düştüğüm her an azmimi ve inadımı yeşerten, her zaman yanımda olan canım Annem Hayrünnisa SERT'e ve Babam Sıtkı SERT'e, biricik kız kardeşim Pelin SERT'e, başarılarıma ve hayallerime benden daha çok inanan, bana her zaman destek olan sevgili Eşim Emre SERDAR'a ve çok sevdiğim canım Abim Engin SERT'e teşekkür ederim.

Belgin SERT SERDAR

POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN AMİLOİD BETA PLAK ÇÖZÜNDÜRME ETKİNLİKLERİNİN DİFERANSİYE-SH-SY5Y HÜCRELERİNDE ARAŞTIRILMASI VE DİFERANSİYE HÜCRELERİN KAN-BEYİN BARIYER BÜTÜNLÜĞÜNE ETKİSİNİN İN VİTRO OLARAK İNCELENMESİ

Belgin SERT SERDAR,

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı,
35340 İnciraltı/ İzmir

ÖZET

Giriş: Alzheimer hastalığı (AH), özellikle beyin hipokampus ve korteks bölgelerini etkileyen nörodejenereatif bir hastalıktır. AH'nın kompleks patogenezi nedeniyle günümüzde henüz bir tedavisi bulunmamaktadır. Son yıllarda AH'de rol oynayan amiloid plak oluşumunu engelleyen/çözünmesini sağlayan çalışmalara odaklanılmıştır. Doğal polifenoller de sahip oldukları özellikleri ile bu alanda potansiyel ajanlar olarak öne çıkmaktadırlar.

Amaç:

- Farklı ajanlar kullanılarak SH-SY5Y hücrelerinde en iyi nöronal diferansiyasyonu sağlayan uygulamanın ve süresinin belirlenmesi.
- EGCG, Punicalagin, Ellagic asid, Gastrodin/kombinasyonlarının A β agregasyonu çözündürme etkinliklerinin belirlenmesi.
- Diferansiye edilmiş nöronal hücreler ile *in vitro* ikili, üçlü hücre kültürü ile kan beyin bariyer (KBB) modellerinin oluşturulması ve modellerin karşılaştırılması.
- Polifenollerin A β_{1-42} plaklarını çözündürme etkinliklerinin oluşturulan KBB'inde incelenmesi.

Yöntem: SH-SY5Y hücrelerinin diferansiyasyonu morfolojik inceleme ve immunfluoresan mikroskopi ile doğrulandı. Polifenollerin ve A β_{1-42} plaklarının diferansiye SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi WST-1 analizi ile saptandı. EGCG, Punicalagin, Ellagic asid, Gastrodin/kombinasyonlarının A β agregasyonunu çözündürme etkinlikleri alan emisyon taramalı elektron mikroskopi, Tiyo flavin T ve agregate A β ELISA yöntemleri ile belirlendi. Üçlü

ve ikili hücreler kullanılarak KBB modeli oluşturuldu ve KBB bütünlüğü transendotelial elektrik direnci (TEER) değerleri ile değerlendirildi. Oluşturulan KBB'den polifenollerin geçişi Folin Ciocalteu yöntemi ile, A β çözündürme etkinlikleri Tiyoflavin T ve agrege A β ELISA analizleri ile değerlendirildi.

Bulgular: SH-SY5Y hücrelerinin diferansiyasyonun RA+BDNF+dc-AMP+KCI+B27'den oluşan ortam içeriği ile 10 gün muamele edilmesi sonucunda gerçekleştiği saptandı. Polifenollerin hücrelerde % 90 canlılık gösteren dozlarında A β ₁₋₄₂ çözündürme etkinlikleri farklı zaman dilimlerinde değerlendirildi. Tüm polifenollerin farklı dozlarda A β plaklarını çözüldürdüğü saptandı. Kombinasyon-1 ve Kombinasyon-2'nin tekli polifenol uygulanmalarına oranla 24 saate daha fazla oranda A β çözündürme etkisi olduğu saptandı (sırasıyla, %75 ve %64). Oluşturulan üçlü kültür modelinin, ikili modellere göre daha yüksek TEER değerine sahip olduğu saptandı ve KBB modeli için daha uygun olduğuna karar verildi (p<0,05). A β ₁₋₄₂ toksisitesi oluşturulan KBB modelinde, uygulanan polifenoller ile TEER değerlerinde artış olduğu ve membran bütünlüğünde iyileşme olduğu saptandı.

Sonuç: Yapılan çalışmalar sonucunda, diferansiye SH-SY5Y hücreleri ile üçlü kültür sistemi kullanılarak *in vitro* AH modelini yansıtan bir KBB'i oluşturulmuştur. Oluşturulan üçlü KBB modelinde belirlenen Kom 1 ve Kom 2 polifenol uygulamalarının KBB'inden geçerek A β ₁₋₄₂ plaklarını çözüldürdükleri saptanmıştır. Diferansiye hücreler ile ilk kez oluşturulan ve doğrulanan üçlü KBB modelinin ve polifenol kombinasyonlarının *in vivo*'ya daha yakın sonuçların elde edileceği *in vitro* araştırmalara ve AH tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Anahtar Sözcükler: Alzheimer Hastalığı, Diferansiye SH-SY5Y hücreleri, A β ₁₋₄₂, Polifenol, Kan Beyin Bariyer Modeli.

INVESTIGATION OF THE EFFECTIVENESS OF POLYPHENOLIC COMPOUNDS ON AMYLOID BETA PLAQUE DISSOCIATION IN DIFFERENTIATED-SH-SY5Y CELLS AND THE EFFECTS OF THE DIFFERENTIATED CELLS ON BLOOD-BRAIN BARRIER INTEGRITY IN VITRO

Belgin SERT SERDAR,
Dokuz Eylul University, Institute of Health Sciences,
Department of Medical Biochemistry, 35340
Inciralti/ Izmir

ABSTRACT

Introduction: Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease that affects the hippocampal and cortical regions of the brain. Due to the complex pathogenesis of AD, currently, there is no treatment. In recent years, studies have focused on preventing or dissolving amyloid plaques that play an important role in AD. Due to their various properties, natural polyphenols might be used as potential agents in this field.

Objective:

- Determination of the time and administration using different agents the best neuronal differentiation in SH-SY5Y cells.
- Determination of effect on A β aggregation dissociation of EGCG, Punicalagin, Ellagic acid, Gastrodin / combinations.
- Forming and comparing blood-brain barrier (BBB) models with in vitro co-, and tri- cell culture with differentiated neuronal cells.
- Investigation of the dissociation efficacy on A β ₁₋₄₂ plaques of polyphenols in the tri-cell culture BBB model.

Method: The differentiation of SH-SY5Y cells was confirmed by morphologic changes with light microscopy, neurite length using neuron j program, and neuronal markers with immunofluorescence assay. The effect of polyphenols and A β ₁₋₄₂ plaques on differentiated SH-SY5Y cell viability was determined by WST-1 analysis. EGCG, Punicalagin, Ellagic acid, Gastrodin or combinations to dissociation efficiencies of A β aggregation were determined by

Field emission scanning electron microscopy, Thioflavin T and aggregated A β ELISA methods. BBB model was constructed using tri- and co-cell culture, and transendothelial electrical resistance (TEER) values were compared to each other. Transition of polyphenols from the formed BBB was evaluated by Folin Ciocalteu methods and the effects of polyphenols on BBB model with A β toxicity were examined by ELISA and TEER values.

Results: It was observed that the treatment time of differentiation of SH-SY5Y cells was 10 days and using the content of the media consisting of RA + BDNF + dc-AMP + KCI + B27 was similar and closer to the *in vivo* results. A β_{1-42} plaque dissolving efficacies of polyphenols whose doses resulted in 90% viability of the cells were evaluated at different time periods. All polyphenols were found to dissolve A β plaques at different doses. Combination-1 and Combination-2 were found to have more than 24 hours of A β dissolution effect (75% and 64%, respectively) than single polyphenol treatment ($p < 0.05$). The triple culture model was found to have higher TEER value than the co-culture models and it was found to be more suitable for the BBB model ($p < 0.05$). In the BBB model with A β_{1-42} toxicity, it was determined that TEER values increased with polyphenols and membrane integrity improved.

Conclusion: As a results of the studies, reflecting the *in vitro* AH model BBB was created by using a triple culture system with differentiated SH-SY5Y cells. Kom 1 and Kom 2 polyphenol treatments were found to dissolve A β_{1-42} plaques through the triple BBB model. According to the results obtained, the first triple BBB model and polyphenol combinations created with differentiated cells and confirmed for the first time will contribute to *in vitro* research and development of AD treatment strategies that might be yield closer *in vivo* results.

Key Words: Alzheimer Disease, Differentiated SH-SY5Y cells, A β_{1-42} , Polyphenol, Blood Brain Barrier Model.

1. GİRİŞ VE AMAC

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Alzheimer hastalığı (AH) günümüzde demans vakalarının % 75' inden sorumlu olan ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır [1]. Hastalık patogeneğinde, Amiloid beta ($A\beta$) peptidin aşırı üretimi, birikimi ve nörofibriller yumakların (NFY) oluşumu ile tetiklenen toksik etki, hastalığı başlatıcı ilk faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir. $A\beta$ 'nın nörotoksik etkilerini, oksidatif hasarı tetikleyerek, hücre içi kalsiyumu artırarak, apoptotik ve inflamatuvar süreçleri aktive ederek gösterdiği ileri sürülmektedir [2][3][4]. Amiloid plakların oluşumunun engellenmesi veya var olanların ortadan kaldırılması AH tedavisinde güncel ve potansiyel bir araştırma alanıdır. Günümüzde AH tedavisinde kullanılan ilaçlar genellikle hastaların konforunu arttırmaya, süreci yavaşlatmaya yöneliktir. Bu nedenle, yeni terapötik tedavi ajanlarının belirlenmesine yönelik araştırmalar sürmektedir. Son yirmi yıldır doğal bitkisel ürünler ve türevlerinden yararlanmak bu alanda özellikle odaklanılan araştırma alanlarından biridir. Doğal bitkisel ürünler kapsamında yer alan polifenollerin antioksidan, serbest radikal temizleyici, antiproliferatif, apoptotik ve geçiş metalleri ile etkileşim sağlayabilme özellikleri başta Alzheimer olmak üzere pek çok nörodejeneratif hastalık sağaltımında kullanılabilirliklerinin araştırılmasına yol açmaktadır. Polifenollerin $A\beta$ oluşumunu inhibe ettiği ve bilişsel bozukluğu azalttığını vurgulayan çalışmalar, polifenollerin AH tedavisinde kullanılabilme potansiyelini ortaya koymaktadır [5][6]. Uzun yıllardır gıda olarak tüketilen nar meyve suyu ekstratında yüksek oranda bulunan polifenolik yapılardan Punicalagin ve Ellagic asid, yeşil çayın etken maddelerinden biri olan Epigallocatekin-3 gallat ve orkide familyasında bulunan Gastrodin, yüksek polifenolik yapıları gereği terapötik amaçlarla kullanılma potansiyeli yüksek olan polifenollerdir. Bununla birlikte bu polifenollerin amiloid plakları çözünür hale getirme etkileri ve etkiledikleri sinyal ileti yollarını araştıran çalışma verileri tek bir polifenolik ajanın AH'da $A\beta$ 'nın çözündürülmesi için yeterli olamayacağını öngörmektedir. Bu nedenle, bir veya daha fazla polifenolik etken madde bileşenlerinin daha etkili bir tedavi oluşturabileceği, güncel ve umut verici bir yaklaşımdır [7][8].

1.2. Araştırmanın Amacı

Alzheimer hastalığının sağaltımında hedeflenen, $A\beta$ plakların etkin olarak çözünmesini ve/veya oluşumunun önlenmesini sağlayacak bir terapötik ajanın belirlenmesidir. Bu alanda yapılan araştırmaların birinci basamağı *in-vitro* araştırmalardır. *In vitro* araştırmalardan elde edilen verilerin *in vivo* araştırmalara ışık tutması kullanılan deney modelinin *in-vivo* ortamı

yansıtma düzeyine bağlıdır. Alzheimer hastalığı ile ilgili araştırmalarda sıklıkla kullanılan hücre insan nöroblastoma (SH-SY5Y, ATCC CRL-2266) hücre hattıdır ancak araştırmaların pek çoğunda bu hücrelerin, bazı nöronal özelliklerden yoksun olduğunu belirtmektedir. Bu nedenle son yıllarda SH-SY5Y hücreleri ile yapılan *in vitro* araştırmalarda hücrelerin çeşitli diferansiye edici ajanlara maruz bırakılarak nöronal karakteristiklerinin kazandırılması gerektiği vurgulamakta ancak hücrelerin diferensiasyonunu sağlayan ortamın içeriği hakkında da kesin bir bilgi bulunmamaktadır [9][10][11]. Bu nedenle, yapmış olduğumuz araştırmada birinci basamak SH-SY5Y hücrelerinin diferansiyasyonunu sağlayan ortamın ve diferansiyasyon süresinin belirlenmesi olmuştur. Santral sinir sistemine (SSS) yönelik terapötik araştırmalarda göz önüne alınması gereken ve pek çok maddenin geçişini engelleyen kan beyin bariyerinin (KBB) varlığıdır. Bu nedenle elde edilecek diferansiye SH-SY5Y hücreler ile *in vivo* KBB'ine en yakın modeli oluşturmak için nöron-endotel-astrosit hücrelerinin üçlü kültüre edilmesi ile *in vivo*'ya yakın bir *in vitro* KBB modelinin oluşturulması gerekmektedir. Bu nedenle araştırmamızın ikinci basamağı, *in vivo* modele en yakın bir *in vitro* KBB modelinin oluşturulması ve doğrulanması olarak planlanmıştır.

Diferansiye nöronal hücreler ile üçlü kültür modeli kullanılarak oluşturulan *in vitro* KBB modelinde A β ₁₋₄₂ toksisitesinin oluşturulması ve KBB'inin bütünlüğünü bozmadan bu toksisitenin oluşumunu önleyecek, A β plaklarının çözünmesini sağlayacak polifenol ve/veya kombinasyonlarının belirlenmesi ise araştırmanın üçüncü ve son basamağı olarak hedeflenmiştir.

Bu hedefler doğrultusunda; yapılan araştırmamızın birincil amacı *in vivo*'yu en iyi yansıtan *in vitro* KBB modelinin belirlenmesi, ikincil amacı ise bu model kullanılarak seçilen potansiyel polifenolik bileşiklerin ve kombinasyonlarının (EGCG, Punicagin, Ellagic Asid, Gastrodin) A β ₁₋₄₂ plaklarını çözündürme etkinliklerinin incelenmesidir.

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

Bu bağlamda araştırmamızın hipotezleri:

- ✓ *İn vivo* KBB sistemini en iyi yansıtan *in vitro* model üçlü kültür kullanılarak oluşturulan KBB modelidir.
- ✓ EGCG, Punicalagin, Ellagic Asid, Gastrodin polifenollerinin ve/veya kombinasyonlarının *in vitro* KBB'ini geçerek A β ₁₋₄₂ plaklarını çözündürme etkisi vardır.

Belirtilen hipotezler doğrultusunda gerçekleştirilen çalışmalar aşağıdaki gibi özetlenebilir:

1. SH-SY5Y hücrelerini en iyi diferansiye eden ortam içeriği ve inkübasyon süresi belirlendi.
2. *İn vitro* A β ₁₋₄₂ plak oluşumunun süresi belirlendi ve plak oluşumu doğrulandı.
3. Diferansiye- SH-SY5Y hücrelerinde A β ₁₋₄₂ toksisitesi oluşturuldu.
4. A β ₁₋₄₂ varlığında polifenollerin diferansiye SH-SY5Y hücrelerine toksik etkiyi arttırmayan doz aralığı belirlendi.
5. Belirlenen doz aralığında kullanılan polifenolik bileşiklerin/kombinasyonlarının A β ₁₋₄₂ plaklarını çözündürme etkinliği zamana bağlı incelendi.
6. İnsan endotel, astrosit ve diferansiye-SH-SY5Y hücreleri kullanılarak ikili ve üçlü kültür ile *in vitro* KBB modeli oluşturuldu ve KBB bütünlükleri değerlendirildi.
7. Üçlü kültür ile yapılan *in vitro* KBB modelinde A β ₁₋₄₂ toksisitesi oluşturulan KBB modeli oluşturuldu.
8. Polifenollerin *in vitro* KBB modelinden geçişleri değerlendirildi.
9. Polifenol ve polifenol kombinasyonlarının A β ₁₋₄₂ uygulanan KBB model bütünlüğüne olası etkileri incelendi.
10. Polifenol ve polifenol kombinasyonlarının A β ₁₋₄₂ uygulanan KBB modelinde A β ₁₋₄₂ plaklarını çözündürme etkinliği incelendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ALZHEİMER HASTALIĞI

Alzheimer hastalığı, beynin hipokampus ve korteks bölgelerinde ilerleyici geri dönüşümsüz bir nörodejeneratif hastalıktır ve yaşlı popülasyonda demansın en sık nedenidir. İlk kez 1906'da Almanya Tübingende düzenlenen bir konferansta, psikiyatrist Dr. Alois Alzheimer tarafından 51 yaşındaki kadın hastasının beyin otopsi sonuçlarına dayanarak elde ettiği “serebral korteksin kendine özgü ciddi bir hastalık süreci” olarak tanımlanmasına dayanmaktadır [12]. Bugün dünya çapında 50 milyon vakanın olduğu bilinmekle birlikte, 2050 yılında bu sayının 152 milyon olacağı düşünülmektedir [13]. Hastalık hafıza kaybı, konuşmada, karar vermede, öğrenmede, problem çözmede zorluk, zaman ve mekan algısında bozulma semptomları ile karakterizedir ve patogeneğinde, özellikle beynin temporal ve parietal loblarında olmak üzere nörokorteksteki ekstraselüler sinaptik boşluklarda amiloid beta ($A\beta$) senil plaklarının birikmesi, intraselüler hiperfosforile tau protein birikimi ile nörofibriller yumakların (NFY) oluşması önem taşımaktadır [14].

Alzheimer hastalığı erken başlangıçlı (ailesel) ve geç başlangıçlı (sporadik) olmak üzere iki tipten oluşmaktadır. Alzheimer hastaların büyük çoğunluğu geç başlangıçlı, 65 yaşından büyük olsa da hastaların % 2-10'unda erken başlangıçlı hastalık görülebilmektedir. Erken başlangıçlı hastalık veya ailesel AH, 14. kromozomda bulunan presenilin 1 (PS1) geni, 1. kromozomda bulunan presenilin 2 (PS2) geni ve 21. kromozomda bulunan amiloid prekürsör protein (APP) geni üzerinde meydana gelen mutasyonlara bağlı otozomal-dominant olarak oluşmaktadır [15][16]. PS1 ve PS2 mutasyonları γ -sekretaz aktivitesini artırarak APP'nin kesimi sonucunda $A\beta_{1-42}$ peptidinin üretimini arttırmaktadır. Bunun yanı sıra beslenme şekli, insülin direnci, inflamasyon, hipertansiyon, kalp hastalığı, hiperkolesterolemi, obezite ve hava kirliliği gibi çeşitli faktörlerin de etkili olduğu ileri sürülmektedir [17][18]. Yapılan çalışmalar; plazma ve beyinde kolesterol taşınmasında temel apolipoproteinlerden biri olan apolipoprotein E (apoE)'nin $\epsilon 4$ allelinin AH'de önemli bir risk faktörü oluşturduğunu göstermektedir [19][20]. ApoE, beyinde primer olarak astrositlerden, az miktarda mikrogliyalardan çok az miktarda da nöronlarda sentezlenmektedir. ApoE, santral sinir sisteminde (SSS) oluşan hasar sonrasında, nöronal membranın onarımı ve aksonların miyelinizasyonu için gerekli olan kolesterolün salınımında ve sinir dokusunun rejenerasyonunda görev almaktadır. ApoE geni, farklı izoformları kodlayan (ApoE2, ApoE3 ve ApoE4) tek bir gen loküsünde üç ana alel formunu

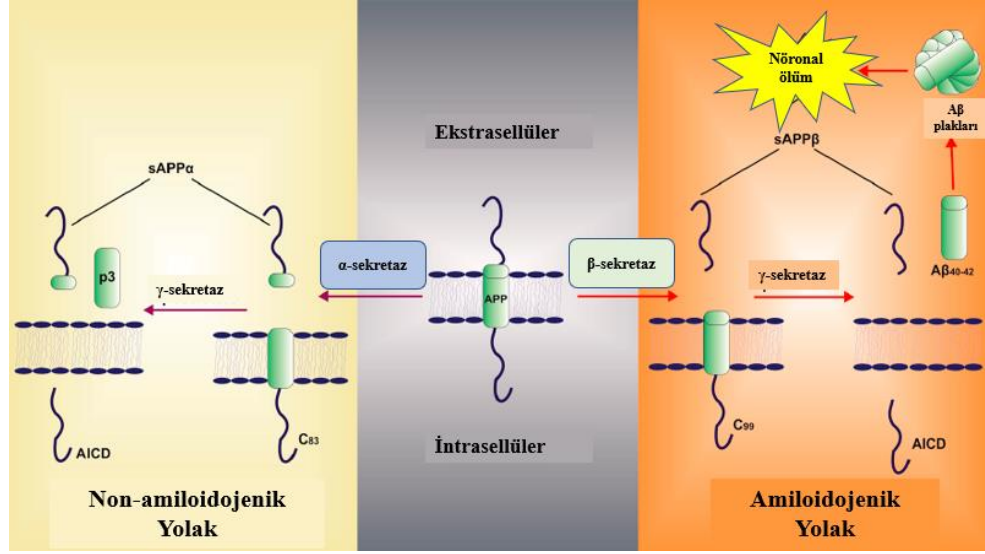
($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$) içermektedir. ApoE $\epsilon 4$ allelinin erken başlangıçlı ve geç başlangıçlı AH riskini arttırdığı ancak hastalığa neden olmak için yeterli tek sebep olmadığı belirtilmektedir. Bunun yanı sıra, Apo E $\epsilon 4$ allelinin A β 'ya bağlanıp, çözünür ve agrege A β 'yı arttırdığını, diğer taraftan; $\epsilon 2$ allelinin A β peptid temizlenmesinde etkin ve AH patogenezinin karşı koruyucu bir faktör olduğu da belirtilmektedir [20][21][22].

2.1.1. Alzheimer Hastalığında Kabul Edilen Moleküler Mekanizmalar

Alzheimer hastalığının mekanizmaları üzerine çalışmalar halen devam etmekte ve pek çok hipotez ortaya atılmasına rağmen, hastalığın başlangıcı ve ilerlemesi ile ilgili mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. AH ile ilişkili moleküler mekanizmaların ve hastalığın ilerlemesinde etkin olan patofizyolojik yolların açıklanmasına gereksinim duyulmaktadır. Günümüzde kabul edilen hipotezler; A β , Tau, kolinerjik (asetilkolin düzeylerinin düşmesi), eksitoksisite, oksidatif stres, ApoE, CREB (*cAMP response element binding*), insülin direnci vb. mekanizmalar üzerinden açıklanmaktadır ancak hiçbir mekanizmanın tek başına yeterli olmadığı ve AH gelişiminde birçok mekanizmanın geçerli olabileceği tartışılmaktadır [14][23].

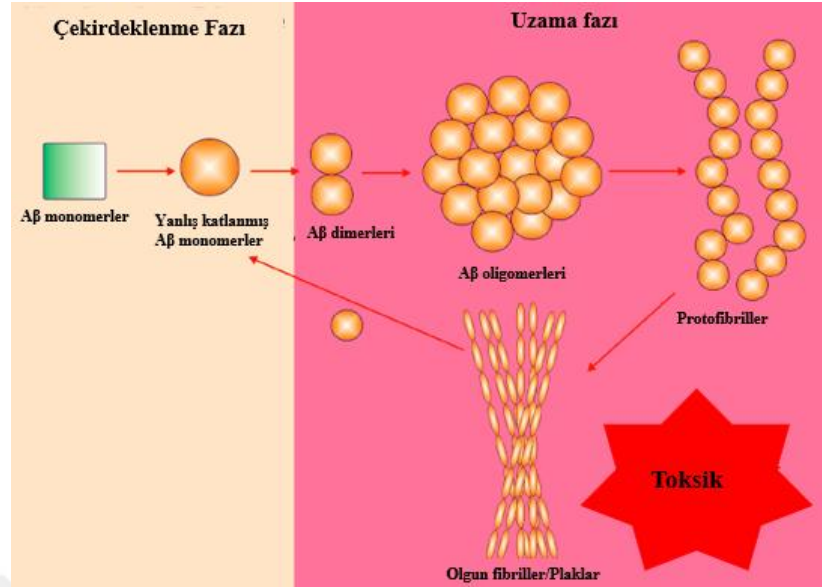
Son yıllarda en kabul gören ve çeşitli çalışmalarla desteklenen hipotez ‘‘amiloid hipotezi’’dir. Bu hipotez, APP'nin β -sekretaz ile kesime uğramasıyla ortaya çıkan A β peptidleri tarafından tetiklendiği ve hastalığın ilerlemesinde bu peptidlerin toksisitesinin önemli rol oynadığı kabul edilmektedir. Pek çok çalışmada da, A β 'nın toksik özelliğini oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon, membran permeabilitesinin değişikliği, inflamasyon, sinaptik disfonksiyon, bazı nörotransmitter reseptörleri ile etkileşerek gerçekleştirdiği belirtilmektedir [24][25][26].

A β proteini, transmembran amiloid prekürsör proteininin (APP) ardışık olarak proteolitik kesilmesi ile oluşan küçük bir fragmandır. APP'nin farklı yerlerden kesilmesinden sorumlu iki tip sekretaz enzim bulunmaktadır: alfa-sekretaz (α -sekretaz) ve beta-sekretaz (β -sekretaz). APP α -sekretaz ile kesildiğinde, çözünebilir salgısal bir formu olan (N)-terminal ektodomain sAPPa ve C-terminal fragmenti (C83) ortama salınır. Bu yolak ‘‘non-amiloidojenik’’ yolak olarak adlandırılmaktadır. Diğer taraftan, amiloidojenik yolakta APP, β -sekretaz ile kesildiğinde N-terminalinden kesilmekte ve çözünür N-terminal fragmenti (sAPPb) ve kalan C-terminal bölgesi (b-CTF 99) ortama salınmaktadır. Bu enzim aktivitelerinin ardından AICD'nin (*APP intracellular domain peptides*) γ -sekretaz tarafından kesilmesi toksik A β plaklarına neden olan 40-42 aminoasit fragmentini oluşturmaktadır (Şekil 1)[27][28].



Şekil 1. APP metabolizmasında non-amiloidojenik ve amiloidojenik yolak (Sharma P, 2019'dan modifiye edilmiştir).

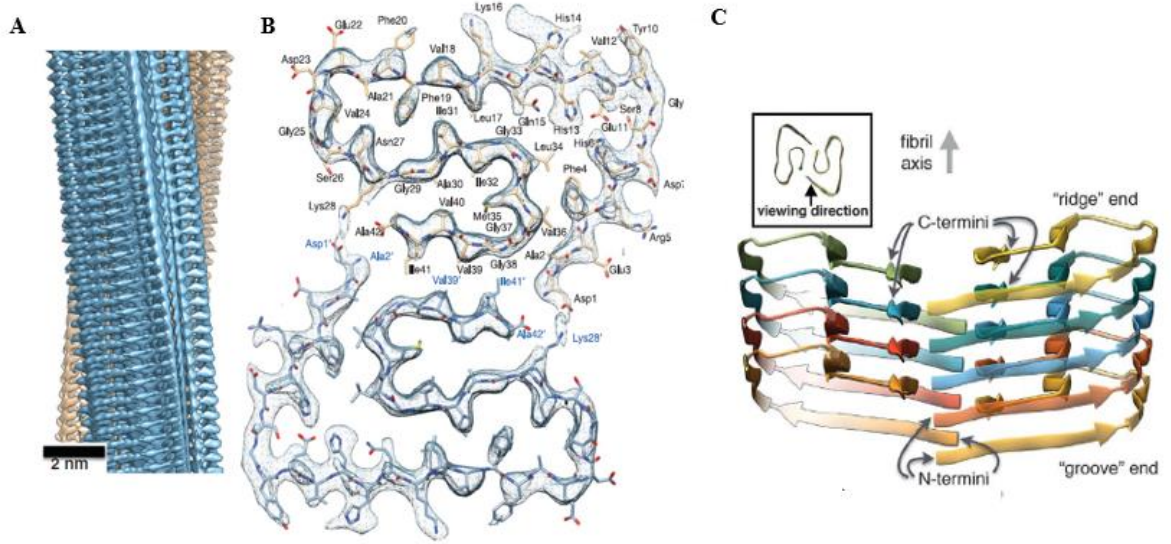
A β ₁₋₄₂, beyinde biriken ve amiloid plakları ve birikintileri oluşturma eğilimi en yüksek olan fragmandır. A β 'nın monomer, dimer, oligomer gibi çeşitli fibril polimerleri bulunmaktadır. A β kendiliğinden çözünür oligomerlere agregre olabilmekte ve çözünmeyen beta-sheet konformasyonunda fibriller oluşturmak üzere bir araya gelerek diffüz senil plakları oluşturabilmektedir. A β 'nın bu agregasyon süreci çekirdeklenme aşaması ve uzama aşaması olarak iki basamağa ayrılmaktadır [29]. Çekirdeklenme aşaması monomerlerdeki konformasyonel değişiklikleri ve yanlış katlanmayı içerirken, uzama aşaması yanlış katlanmış monomerlerin β -sheet yapısından zengin olan büyük dimerler ve oligomerler oluşturmak üzere biraraya gelmelerini kapsamaktadır. Oluşan bu büyük oligomerlerin biraraya gelmesi de protofibrillerin ve olgun fibrillerin bir araya gelmesini hızlandırarak plak oluşumuna neden olmaktadır. Olgun fibriller ayrıca, bir ikincil çekirdeklenme işlemi yoluyla difüze edilebilir monomerleri üretmek için bir şablon olarak işlev görebilmektedir (Şekil 2). A β 'nın fibril polimerleri ve plak oluşturma eğiliminin yapısındaki amino asid dizilimine ve amino asidlerin karakterine bağlı olduğu yapılan ileri analizlerle aydınlatılmaya çalışılmaktadır.



Şekil 2. Aβ fibril/ plak agregasyonunun oluşumunun gösterimi (Sharma P, 2019'dan modifiye edilmiştir).

Aβ₁₋₄₂ fibril yapısı Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) ve kriyo elektron mikroskopi (Cryo-EM) yöntemleri ile aydınlatılmıştır [30]. Peptid yapısındaki her bir aminoasitin yapı üzerinde önemli bir etkisi bulunmaktadır. Özellikle yapıdaki üç hidrofobik subunitin konformasyonu stabilize ettiği düşünülmektedir; bunlar i) Ala2, Val36, Phe4, Leu34; (ii) Leu17, Ile31 ve Phe19; ve (iii) Ala30, Ile32, Met35, Val40 dir. Bu hidrofobik kümeler, fibril eksenini boyunca istiflenmiş subunitleri genişleterek fibril yapısının stabilizasyonuna katkıda bulunmaktadır. NMR ve kriyo-EM verilerinin analizleri, Asp1 ile Lys28, Asp7 ile Arg5 ile Glu11 ve His6 ile His13 arasındaki tuz köprüleri olduğunu göstermektedir. Ayrıca subunitlerin kademeli düzenlenmesi de fibril büyümesinde doğrudan etkilere sahiptir. Subunitler düzlemsel değildir; bunun yerine, zincir fibril eksenini boyunca N terminalden C terminale yükselirler ve bu bağlanma da ara yüzlerde oluklar (groove) ve tepeler (ridge) oluştururlar. Aβ'nın N - terminali çeşitli yüklü gruplar içermesi nedeniyle daha hidrofilik iken, C- terminal bölgesi daha hidrofobiktir. N-terminal bölgelerinde oluşan etkileşimlerin değişmesinin Aβ agregasyonuna da önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. β iplikçikleri, fermuar benzeri bir şekilde birbirleriyle ilişki içindedir. Düzenli heliks simetrisi, fibril uzama mekanizması için doğrudan etkilere sahiptir ve farklı subunit katmanları arasındaki temaslar monomerik Aβ için farklı bağlanma bölgeleri ile sonuçlanmaktadır. Amiloid proteinlerinin küçük bir bölümü olan amiloid-benzeri protofilamentlerin, fibrillerin ilişkili amid grupları ile fibrillerin yukarı ve aşağı hidrojen

bağlarının merdivenlerini oluşturan asparajin arasındaki hidrojen bağının yapısı oluşturduğu düşünülmektedir (Şekil 3) [31]. A β ₁₋₄₂ yapısındaki çeşitli bağ ve etkileşimlerin yapının sıkı bir şekilde istiflenmesini sağladığını ve bu yapının bozulmasının zor olduğu vurgulanmaktadır.



Şekil 3. A β ₁₋₄₂ fibril/ plak yapısal görüntüsü.

A) A β ₁₋₄₂ fibrilinin iki protofilament yapısı (mavi ve kahverengi) ve β -iplikçiklerinin ayrımı kriyo elektron mikroskobu ile üç boyutlu görüntüsü **B)** Her bir protofilamentten iki subunitin elektron mikroskobu yoğunluk haritasının gösterimi. **C)** Atomik modelin, düzlemsel olmayan alt birimlerin kademeli düzenini gösteren yandan görünümü. (Gremer L 2017'den modifiye edilmiştir).

Oldukça sıkı bağ ve katlanmaları içeren A β proteininin oluşturduğu toksisite ile ilgili yapılan *in vivo* ve *in vitro* araştırmalar amiloid peptidlerin doğrudan hücre membranına bağlanarak hücre membran proteinlerinde, dolayısı ile membran yapısında değişikliğe neden olarak membran yüzeyinde gözenek oluşturduğu ileri sürülmektedir. Oluşan gözeneklerden hücreye çok sayıda molekül ve katyonun (Ca²⁺) geçişi ile, özellikle kalsiyum homeostazının bozulduğu, oksidatif stresin tetiklendiği ve sinaptik sinyallemeği değiştirerek nöronal hücre ölümüne yol açtığı gösterilmiştir [2][3][4]. Amiloid beta plaklarının neden olduğu oksidatif stres ile lipid peroksidasyonun gerçekleştiği ve mitokondri membran yapısının bozulduğu ve kaspazların aktivasyonu ile apoptozun indüklendiği belirtilmektedir [32][33].

Bunun yanı sıra, yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar; A β peptidlerinin nükleer faktör kappa (NF- κ B) yolağını aktive ettiğini ve aktive olan protein kinazların inflamatuvar sitokinlerin

salınmasına (interlökin (IL-1 β), interlökin 6 (IL-6), tümör nekroz faktör (TNF)- α , kemokinlerin interlökin 8 (IL-8)) ve enzimlerin (iNOS ve COX-2) aktivasyonuna neden olduğu belirtilmektedir [34][35]. Salınan sitokinlerin de, amiloid protein işlenmesinde rol alan genleri upregüle edilerek, A β plaklarının üretimini daha da arttırdığını, sitokinler ile oluşan nöroinflamasyonun nöronal ağın bozulmasına, sinaptik kaybına ve nöronal hücre ölümüne neden olduğu savunulmaktadır.

Tau, fizyolojik şartlarda aksonlarda çok miktarda bulunan ve mikrotübüllerin stabilizasyonunu, hücre iskeleti bütünlüğünü sağlayarak aksonal iletide önemli rol oynayan bir proteindir. Alzheimer hastalığı patogenezinde ise tau hiperaktif kinazlar ve/veya hipoaktif fosfatazlar tarafından hiperfosforilasyona uğrayarak, mikrotübüllerden ayrılmakta ve çift sarmal filamentler ve düz filamentler halinde beynin somatodendritik bölümünde birikmektedir [36]. Hücre içi birikimli NFY'lerin önemli bir bileşeni, hiperfosforile tau proteindir. Bu özellikleri nedeniyle hiperfosforile tau proteini AH'de önemli bir patogeneze olarak kabul edilmektedir.

Alzheimer hastalık mekanizmasında kabul görülen diğer bir hipotez de "kolinerjik" hipotezidir. Bu hipotez 1970'lerin ortalarında AH'lı hastanın postmortem beyin çalışması sonucunda kolinasetil transferaz düzeyinin düşük bulunması ile ortaya çıkmıştır [37][38]. Kolinasetil transferaz enzimi, beyin, öğrenme, hafıza ve bilişsel işlevlerin nöral kontrolünde önemli rol oynayan bir nörotransmitter olan asetilkolin sentezinden sorumludur. Alzheimer hastaları üzerinde yapılan çalışmalarda kolinasetil transferaz'ın, kolin taşınımı, asetilkolin salınımı, nikotin ve muskarinik reseptör ekspresyonu gibi kolinerjik anormallikler ile bilişsel bozukluklara katkı sağladığı ortaya konmuştur [39]. Kolinerjik hipotez, AH'nin erken evresinde kolinerjik nöronların kolinerjik fonksiyonlarını asetilkolin sentezindeki azalmaya bağlı olarak kaybetmesi ile ilişkilendirilmektedir. Bilişsel, öğrenme ve hafıza işlevlerinden sorumlu olan önemli bir uyarıcı nörotransmitter de glutamattır ve AH'de etkili olduğu düşünülmektedir. Glutamat çoğunlukla beynin hipokampus ve korteks bölgelerinde bulunmaktadır ve iki tip reseptörü vardır; 1) İyon kanalı tipi (İyonotropik) reseptörler ve 2) G-protein kenetli (GPCR, Metabotropik) reseptörler. Glutamat çoğunlukla N-metil-D aspartat (NMDA) reseptörleri olarak adlandırılan iyonotropik reseptör alt tiplerine bağlanır ve nöronal hücrelere kalsiyum ve sodyum akışının regülasyonuna neden olmaktadır. Normal fizyolojik koşullar altında, glutamat NMDA reseptörüne bağlanır ve depolarizasyon devam eder, ardından magnezyum iyonları dinlenme aşamasında kalsiyum iyonlarının girişini önlemek için katyonik kanalın kapanmasına

aracılık eder. Alzheimer'da nöronal hücrelerdeki NMDA aktivasyonu artmıştır ve bu durum nöronal hücrelere kalsiyum iyonunun sürekli girişine neden olmaktadır. Aşırı kalsiyum iyon girişi nöron hücrelerine zarar vererek, hücre ölümü, nörodejenerasyon ve nörit hasarına neden olmaktadır [40][41]. Süreçlerin ardından oluşan sinaptik hasar, nöritlerin ve sinapsların bozulması ile bağlantılı olan şiddetli atrofi, kolinerjik ve diğer nörotransmitterlerin kayıplarının da (serotonin, Gama aminobütirik asit (GABA), norepinefrin ve histamin) bu hastalığın ilerlemesine eşlik ettiği bilinmektedir [1][23].

Alzheimer hastalığının moleküler patogenezi oldukça kompleks olmasına karşın yanlış katlanmış/agrege olmuş proteinlerin oluşumunun engellenmesi ve/veya çözündürülmesi bu konuda yapılan *in vitro* ve *in vivo* araştırmaların önemli bir bölümünü oluşturmaktadır ve protein birikiminin önlenmesine yönelik terapötik stratejilerin geliştirilmesi gerekliliği vurgulanmaktadır [42][43].

2.2.2. Alzheimer Hastalığında Tedavi Stratejileri

Alzheimer hastalığının keşfi ve hastalığın mekanizmalarına ait yoğun araştırmalar yapıyor olmasına karşın, tedavisi için bir ilaç henüz geliştirilememiştir. Günümüz tedavi protokolleri, AH'nin daha çok semptomlarını gidermeye/yavaşlatmaya yöneliktir. Bunun sebebinin iki nedene bağlı olduğu belirtilmektedir. 1) Hastalığın mekanizmasının tam olarak aydınlatılamaması 2) Kan Beyin Bariyerinin (KBB) ilaç etkinliğini azaltmasıdır.

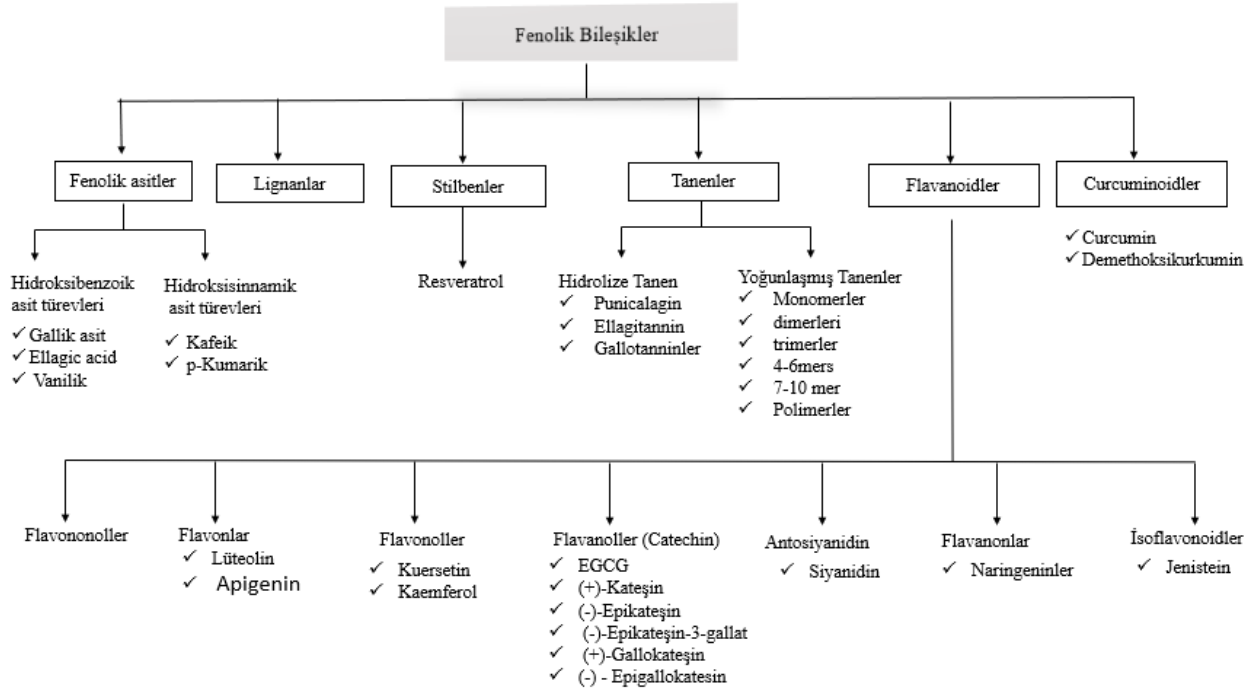
Alzheimer hastalığı için geliştirilen terapötik stratejilerin başında, Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi (FDA) onaylı kolinesteraz inhibitörleri ve NMDA reseptör antagonistleri gelmektedir [43]. Bunun yanı sıra, serotonin, histaminerjik ve adenozin reseptörlerinin regülasyonu da yer almaktadır. Günümüzde, kolinesteraz inhibitörleri AH kognitif bozukluğu tedavisi için onaylı tek ilaçtır. Diğer bir tedavi stratejisi; Tau fosforilasyonunun inhibisyonu ile tau oligomerizasyonunun bloklanması ve mikrotübüllerin stabilizasyonunun sağlanması, Tau degradasyonunun artırılması ve Tau temelli immünoterapi yer almaktadır [1]. Mitokondri hedefli tedavi, ekzojen antioksidan desteği ve endojen korunmanın artırılması ile oksidatif stresin azaltılmasına dayanmaktadır ve bunun yanı sıra anti-inflamatuar terapi ve hücrel Ca^{+2} homeostazın düzenlenmesi diğer terapi stratejileri arasındadır. Bütün bu yaklaşımların yanı sıra, A β fibrillerinin birçok intraselüler yolağı aktive etme özelliğine dayanarak, anti-inflamatuar ajanlar, statinler, östrojen, mikrogial aktivasyonunun inhibisyonu gibi çeşitli tedavi stratejileri denenmektedir [43][44].

Amiloid temelli tedavi stratejilerinde ise, sekretaz enzimlerinin düzenlenmesi, amiloid agregasyonunun engellenmesi, amiloid plaklarının çözündürülmesi, amiloid temelli immünoterapilerden oluşmaktadır. Son yıllarda, fibril agregasyonu oluşmadan önce A β α -heliks doğal yapısını stabilize etmek veya β -sheet yapısını destabilize eden bileşiklerin tanımlanması amiloidojenik patolojik durumun tedavisi için araştırılan terapötik yaklaşımdır. Bu yaklaşım ile amiloidozun patojenik prosesinde yer alan, toksik oligomerlerin oluşumunu önleyen ya da çözünmez fibril ve agregatların çözünmesini sağlayabilen yeni bileşiklerin belirlenmesi hedeflenmektedir [45][46][47][48][49]. Bu yönü ile antioksidan, anti-inflamatuar ya da nöroprotektif ve çoklu biyolojik aktiviteye sahip olan doğal polifenoller amiloidojenik proteinlerin birikimi sonucu patolojik reaksiyonlardan korunma stratejisinde öne çıkan bileşikler olmaktadır [5][6][45][50][51][52].

2.2. ALZHEİMER HASTALIĞINDA POLİFENOLLERİN ÖNEMİ

2.2.1. Polifenoller

Polifenoller, meyve, sebze, tohum ve yağlarda yüksek miktarda bulunan sekonder metabolitleridir. Günümüzde 10.000'den fazla doğal polifenol tanımlanmış olup, fenolik halka sayısı ve bu halkaları bağlayan yapısal elemanların sayısına göre çeşitli gruplara ayrılırlar. Bunlar başlıca, flavanoidler, fenolik asitler ve türevleri, stilbenler, curcuminoidler, lignanlar ve tanenler olup bunlar da çeşitli alt gruplara ayrılmaktadır (Şekil 4) [53][54].



Şekil 4. Polifenollerin sınıflandırılması (Shahidi F. 2015’den modifiye edilmiştir).

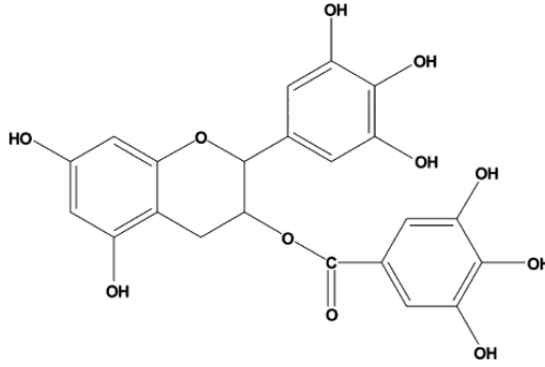
Tüm polifenollerin temel ortak özelliği, redoks reaksiyonları için gerekli olan orto veya para pozisyonlarında hidroksil gruplarının bulunması ve birden fazla fenolik halka içermeleridir. Bu doğal bileşikler, reaktif oksijen türleri tarafından üretilen serbest radikalleri temizleme ve metal şelatlama özellikleri nedeniyle, oksidatif hasara karşı koruyucu etki gösteren güçlü bir antioksidan özelliğine sahiptirler [45][53].

Pek çok çalışma, polifenollerin yaşlanma karşıtı, kalp damar sistemini koruyucu, anti-inflamatuar özellikleri ile Alzheimer, Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklarda nöroprotektif etki yaratabileceği, A β oluşumunu önleyebileceği ve A β üretimi ile oksidatif stres arasındaki kısır döngüyü baskılayabileceğini öngörmektedir [45][55]. Yapılan çalışmalar; tüm polifenollerin amiloid yapı üzerinde monomerik, oligomerik yada fibril formlar gibi farklı amiloid formlarıyla etkileşerek farklı etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Bu bileşiklerin amiloidojenik protein yapısında bulunan aromatik halkaların arasına girerek birikim prosesini bloke ettiği belirtilmektedir [5][6]. Ayrıca polifenollerin α -sekretaz yolunu uyarma ve β - ve γ -sekretaz yolunu inhibe etme özellikleri olduğu ve bu yolla da A β üretimini modüle edebilme kapasitesine sahip oldukları savunulmaktadır [56][57][58]. Yapılan araştırmalarda bazı polifenollerin A β üretim kaskadında güçlü enzimatik inhibisyon gösterdiklerini bazılarının ise amiloid agregasyonunu ve fibril oluşumunu belirgin şekilde önlediği belirtilmektedir [45][50].

Örneğin; en bilinen doğal polifenollerden olan, kuersetin ve mirisetin'in, A β agregasyon ve fibrillerin çözündürülmesi üzerine etkili olmadığı ancak β -sekretaz enzimini inhibe ederek önemli etki gösterdikleri savunulmaktadır. Diğer taraftan, iyi bilinen polifenollerden olan Epigallokatekin-3 gallat (EGCG), Resveratrol, Curcumin'in ise A β peptidi ile non-kovalent kompleks oluşturarak amiloid agregasyonunu inhibe ettikleri ve aynı zamanda da sekretazlar veya siklooksigenaz yolağı ile etkileşim gösterebildikleri belirtilmektedir [58] Amiloid beta oluşum sürecinde hidrofobik güçlerin, aromatik istiflenme, elektrostatik ve aromatik etkileşimlerin rol aldığı ve polifenolik bileşiklerin bu şekilde oluşan A β 'ya konjuge olabileceği öngörülerek mekanizmasının araştırılması gerektiği vurgulanmaktadır [59][60].

2.2.1.1. Epigallokatekin-3 gallat

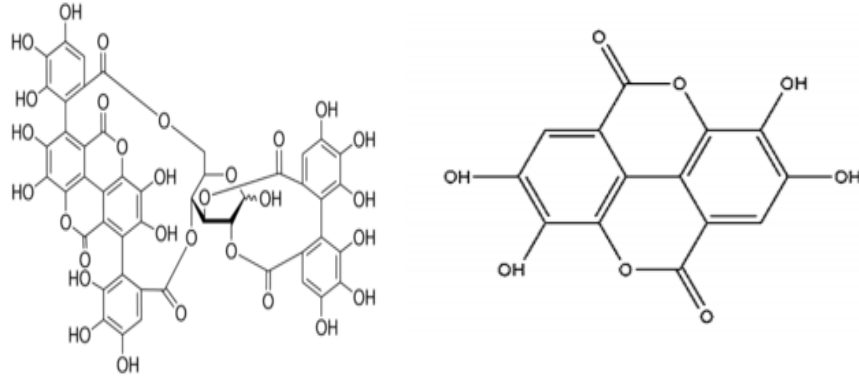
Yeşil çayın %30-42'sini katekinler oluşturmaktadır. Bu katekinler; (-)- Epigallokatekin-3 gallat (EGCG), Epigallokatekin (EGC), Epikatekin-3-gallat (ECG) ve Epikatekin (EC)'dir. EGCG, yeşil çayda bulunan fenolik yapıdaki katekinlerin en bol bulunanı ve en önemlilerinden biridir (Şekil 5.) EGCG birçok hastalık için antioksidan, antikanserojen ve anti-inflamatuar olarak bilinmektedir. Ayrıca peptidile ilgili çeşitli hastalıkta anti-amiloidojenik reaktif özellik göstermektedir [57][61][62][63][64][65][66]. Levites ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, EGCG'nin PC12, SH-SY5Y hücreleri ve C57/BL fareleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu polifenolün hem hücre hatlarında hemde fare hipokampusunda non-amiloidojenik α -sekretaz yolağına teşvik ederek, çözünür APP salınımını arttırdığı belirtilmiştir. Ayrıca, EGCG'nin protein kinaz C (PKC) fosforilasyonunu indükleyerek, non-amiloidojenik yolağı aktive ederek gerçekleştirdiği vurgulanmaktadır [67]. Ehrnboefer ve arkadaşları ise, EGCG'nin, kararlı hidrojen bağıyla doğal katlanmamış polipeptidlere bağlanarak, A β 'nın fibril/plak oluşumunu etkili şekilde engellediğini ortaya koymuşlardır [63]. EGCG'nin PS2 mutant fareler üzerine etkisini araştıran bir çalışmada da EGCG'nin NF- κ B ve ERK yolaklarını inhibe ederek A β 'nın neden olduğu kognitif disfonksiyonu engellediği ayrıca β veya γ -sekretaz enzim aktivitelerini inhibe ederek (ve/veya α -sekretaz enzim aktivitesinin artışıyla) A β peptid üretimini azattığı belirtilmektedir [56]. Yapılan çalışmaların bazılarında da EGCG'nin büyük A β fibrillerini non-toksik etki gösteren küçük şekilleri haline dönüştürdüğü, böylelikle A β agregasyonunu önemli derecede engellediği vurgulanmaktadır. Biesche ve arkadaşlarının yaptığı araştırmada, A β fibrillerini, küçük toksik olmayan amorf protein agregasyonlarına dönüştürme yeteneğine sahip olduğu belirtilmektedir [62]. Ayrıca EGCG'nin amiloid benzeri protein modifikasyonlarıyla kovalent bağ yaparak fibril oluşumunu doğrudan inhibe ettiği de savunulmaktadır [64].



Şekil 5. (-)- Epigallokatekin-3 gallat'ın kimyasal yapısı [57].

2.2.1.2. Punicalagin ve Ellagic asid

Nar (*Punica granatum*) pek çok kültürde eski tarihlerden beri tedavi edici olarak kullanılan bir meyvedir [68]. Nar meyvesinde bulunan polifenollerin büyük bir bölümünü çoklu fenolik halkaya sahip ve çok sayıda hidroksil grubu içeren polifenoller oluşturmaktadır. Nar suyunun antioksidan aktivitesinin antioksidan özelliği iyi bilinen kırmızı şarap, yeşil çaydan elma, limon, yaban mersini, siyah üzüm gibi meyvelerden daha fazla olmasının nedeninin içerdiği fenolik bileşiklere bağlı olduğu ifade edilmektedir [69][70]. Nar meyve ekstratında çeşitli polifenolik bileşikler bulundurmasına karşın daha yoğunluklu olarak başlıca iki tipi bulunmaktadır: hidrolize olabilen tannin'ler (punicalin, pedunculagin, punicalagin, glukoz esterleri fenolik asitler grubundan ellagic asid vb.) ve meyveye kırmızı rengini veren antosiyaninler (delfinidin, siyanidin ve pelargonidin vb.)[70][71]. Nar meyve suyu ekstratında bulunan polifenolik yapıların antioksidan, anti-inflamatuar, antiangiogenez, antikarsinojen, ve nöroprotektif etkilerinin belirlenmesi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanımlarına yönelik araştırmaları arttırmıştır [72].



Şekil 6. Punicalagin ve Ellagic asid'in kimyasal yapısı [Das S, 2016 ve Feng Y 2009'dan modifiye edilmiştir].

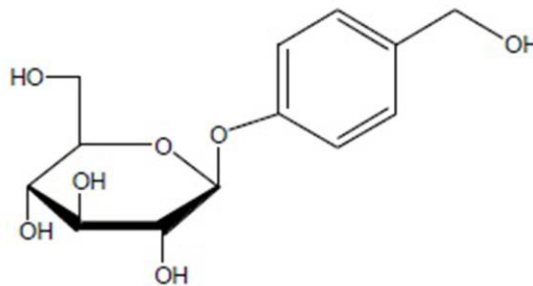
Feng ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; Ellagic asitin SH-SY5Y hücrelerine uygulanması sonucu A β plak oluşumunu engelleyerek fibril oluşumunun arttığı ve A β toksisitesinin azaldığı ortaya konmuştur [73]. Nar suyunun transgenik fareler (APP(sw)/Tg2576) üzerindeki etkisinin incelendiği çalışmada ise 6-6,5 ay nar suyu kullanımının hippocampustaki amiloid birikiminin kontrol grubuna göre yaklaşık %50 oranında azaldığı belirtilmiştir. Bunun yanı sıra, farelerin daha hızlı öğrendiği ve su labirent testinde kontrol grubundan daha iyi performans gösterdikleri belirlenmiştir [74]. Nar polifenollerinin ve ekstratının hem *in vitro* hemde *in vivo* (APP/PS1 transgenik fare) etkisinin incelendiği diğer bir çalışmada da punicalagin ve ellagic asitin A β tarafından uyarılan TNF- α salgılanmasını azalttığı savunulmuştur. Bu bulgular beyinde anti-inflamatuvar etkisi olan narın günlük tüketiminin AH sürecini hafifletebileceği hipotezini oluşturmuştur [75]. Buna karşın diğer bir çalışmada nar suyu ekstratı (100 ve 200 mg/kg) 3 hafta boyunca transgenik farelere (Swedish R1.40 fareler 24-30 aylık) uygulanmış ve ekstratın A β_{42} ve A β_{40} peptid oranlarını değiştirdiği fakat bilişsel performansı geliştirmediği gözlenmiştir. Çalışma bulguları yaşlı hayvan modelinde de nar ekstratının spesifik anti-amiloidojenik mekanizmayı desteklediğini vurgulamaktadır [76]. Ellagic asidin (50 mg/kg/gün) 60 gün uygulandığı transgenik farelerde hafıza bozukluğunu ve öğrenmeyi iyileştirdiği, ayrıca hipokampüste A β birikiminin ve nöronal apoptozun azaldığı yapılan bir araştırma ile ortaya konmuştur [77].

Polifenollerin A β 'nın yapısı üzerine etkilerini açıklamak amacı ile *in silico* etkileşimli modelleme araştırmaları yürütülmekte ve polifenollerin oldukça kompleks olan A β ile olan bağ etkileşimlerine bir açıklık getirilmesi için çalışılmaktadır. Yapılan bir çalışmada, seçilen dört

doğal polifenolün (punicalagin, mirisetin, luteolin ve honokiol) PC12 hücrelerinde A β 'nın nöronal toksisitesi ve anti-agregasyon özelliği üzerindeki etkileri incelenmiştir. İn silico modelleme sonuçları bu dört polifenolün başlıca stearik ve hidrojen bağ etkileşimleri aracılığıyla A β ₁₋₄₂'e bağlandığını göstermiştir. Sonuçlar; her bir polifenolün nörotoksisteyi önemli derecede inhibe ettiğini, mirisetin, luteolin ve honokiol'un amiloidin belirli bir pentamer dizine (Glu3, His6, Ap7, Gly9 ve Try10) punicalagin ise Leu17den Val39 dimerlerinden zengin bölgeye bağlanarak agregasyonunu azalttığını savunmaktadır [78]. Zhong ve ark.larının transgenik farelerde yaptığı çalışmada, ellagic asid uyguladıklarında farelerin öğrenme ve hafızalarında iyileşme etkisi görüldüğü ve hipokampusta nöronal apoptoz ve A β üretiminin önemli ölçüde azaltıldığı belirtilmiştir. Bunun yanı sıra, ellagic asidin tau hiperfosforilasyonunu tau fosforilasyonuna katılan glikojen sentaz kinaz (GSK) 3 β aktivitesini önemli ölçüde azaltarak yaptığı belirtilmiştir [77].

2.2.1.3. *Gastrodin*

Gastrodin, orkide familyasına ait bir bitki olan *gastrodia elata blume*'in aktif bir bileşenidir ve geleneksel çin tıbbında sıklıkla anti-inflamatuar, antioksidan, analjezik, baş ağrısı, migren, hipertansiyon, nörodejeneratif hastalılar, kardiyovasküler ve epilepsi tedavisinde kullanılmaktadır (Şekil 7)[79][80]. Gastrodinin KBB'den geçtiği, hızlıca sistematik dolaşıma ve beyne ulaşabildiği çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur [79][81]. Fenolik glikozid grubunda yer alan gastrodin'in enfarktüs hacmini ve beyindeki ödem hacmini önemli derecede azalttığı, orta serebral arter tıkanıklığı oluşturulan sıçan iskemik modelinde beyinsel hasarı ve nörolojik skorlamayı iyileştirdiği gösterilmiştir [82]. Gastrodin ön tedavisi uygulanan hipoksiye maruz kalmış sıçan kortikal nöronlarından alınan primer hücrelerde yapılan diğer bir çalışmada ise hücre canlılığını önemli ölçüde arttırdığı görülmüştür [83].



Şekil 7. Gastrodin'in kimyasal yapısı [79].

Yapılan pek çok *in vitro* araştırma sonuçları, Gastrodinin oksidatif stresi ve laktat dehidrogenaz (LDH) salınımını azaltarak, MAPK /Nrf-2 sinyal yolağının aktivasyonu ile bir antioksidan enzim olan hem oksijenaz-1'in (HO-1) ekspresyonunu arttırarak, apoptozu inhibe ettiği ve nöroprotektif etki gösterdiğini ortaya koymuştur [84][85].

Transgenik fareler üzerinde yapılan araştırma sonuçları ise, gastrodinin A β plak düzeyini β ve γ sekretaz aktivitelerini inhibe ederek azalttığını, ERK1/2-Nrf ekspresyonunun upregülasyonu ile antioksidan etki gösterdiğini ve A β kaynaklı mikrogial aktivasyonu inhibe ettiğini göstermiştir [86][87][88]. Belirlenen bu özelliklerine bağlı olarak Gastrodin AH'in tedavisinde potansiyel bir ajan olabileceği önerilmektedir [79].

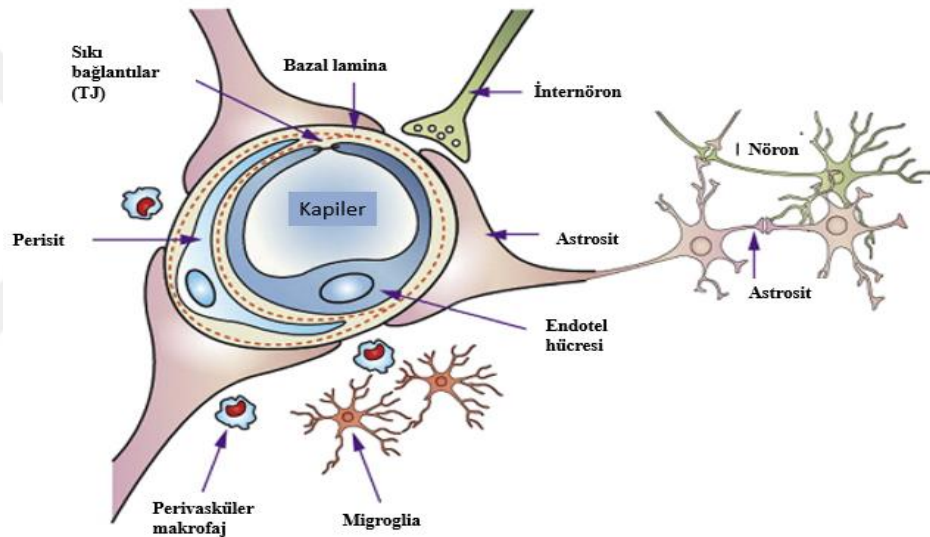
Bununla birlikte, özellikle son yıllarda polifenollerin tek kullanımının yanı sıra, polifenol kombinasyon uygulamalarının bir sinerjik etki yaratarak daha etkin olabilecekleri öngörülmektedir. Polifenollerin sinerjik etkisi ile ilgili yapılan ilk araştırmalar, nöronal PC12 hücrelerine resveratrol ile katekinden oluşan kombinasyon uygulamasının, bireysel etkilerinin toplamından daha fazla bir A β toksisitesine karşı koruma sağladığı belirlenmiştir [7]. Benzer başka bir çalışmada da; Alzheimer transgenik farelere EGCG ve ferulik asitin kombinasyon uygulamasının tek tek uygulamaya oranla; beyin parankimal ve serebral vaskülerde A β birikimi, oksidatif stres, nöroinflamasyonda azalma ve kognitif bozuklukta iyileşme gözlemlenmiş ve kombinasyon uygulamasının non-amiloidojenik yolaktaki α -sekretaz ekspresyonunu arttırdığı, β -sekretaz ekspresyonunu azalttığı saptanmıştır [8].

Yapılan tüm *in vitro* çalışmaları temel alan *in vivo* çalışmalarda karşılaşılan güçlük; etkinliği belirlenen polifenollerin *in vivo* ortamda etkinliğinin veya KBB'den geçişinin yeterli olup olmadığıdır. Bu nedenle yapılan *in vitro* araştırmaların tek hücre hattından ziyade KBB modelleri üzerinde yapılmasının verilerin *in vivo*'ya uyumluluğu açısından önem taşıdığı vurgulanmaktadır. Bu nedenle, *in vivo*'ya daha yakın verilerin elde edilmesi için *in vivo*'yu taklit eden en yakın KBB modellerinin oluşturulması üzerine araştırmalar yoğunlaşmıştır.

2.3. KAN BEYİN BARIYERİ (KBB)

Kan beyin bariyeri, serebral hücre fonksiyonları için gerekli besinlerin geçişine izin veren ve metabolitlerin uzaklaşmasını sağlayan özelleşmiş sellüler bir sistem olup, dolaşım ve SSS arasındaki aktif bir arayüzdür. Böylelikle SSS'ni kandaki zararlı maddelerden ve toksinlerden korumaktadır [89]. Kan beyin bariyerinin normal fonksiyon göstermesi için gerekli olan nörovasküler ünite veya mikroçevre; kapiller damar endoteli hücresi, astrosit

ayaklar, hücre dışı matriks, perisitler, mikroglialar, bazal membran, damar düz kası, glial hücreler, perivasküler makrofaj, nöronlar ve dolaşımdaki kan bileşenleri ile oluşan karmaşık bir hücresel sistemdir (Şekil 8). SSS nöronlarının mikroçevresi ile ilişkisinin kontrol altında olması gereklidir ve kontrolü sağlayan en önemli eleman kan beyin bariyeridir [90][91][92]. Nörovasküler ünite de bulunan hücreler arasındaki etkileşimin beyin gelişimi ve sinaptik aktiviteyi düzenlediği ve KBB'nin geçirgenlik özellikleri üzerinde oldukça etkili olduğu bildirilmiştir. Özellikle nörovasküler ünitenin KBB bölümü, beyin parankimindeki nöronal fonksiyonlar için stabil bir çevre sağlarken, iyon kanalları ve taşıyıcılar sayesinde de optimal sinaptik sinyal fonksiyonlarına destek vermektedir.



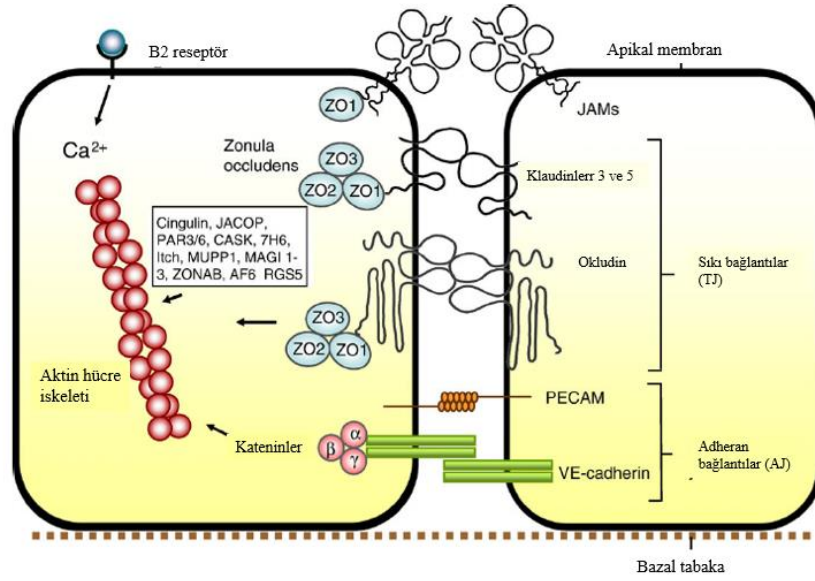
Şekil 8. Nörovasküler ünitenin şematik gösterimi. Endotel hücrelerine komşu astrosit, perisit ve nöron hücreleri [Abbott NJ 2006'dan modifiye edilmiştir].

2.3.1. Endotel hücreleri

Endotel hücreleri mezodermden köken alan basit skuamöz hücrelerdir ve tüm kan damarlarının duvarlarını oluştururlar. Bir arayüz gibi bulunan endotel hücreleri KBB'nin yapısal özelliklerine önemli katkı sağlamaktadır. Serebrovasküler endotel hücreleri periferaldeki endotel hücrelerinden birkaç yönüyle farklılık göstermektedir. Endotel hücrelerinin lüminal ve bazolateral membranları arasındaki taşıma sistemleri asimetriktr. Endotel hücrelerinde asimetrik dağılım gösteren P-glikoprotein (PGP), glukoz taşıyıcı-1 (GLUT-1) gibi bazı enzim ve reseptörlerin varlığı, KBB'deki endotel hücrelerinin luminal ve

abluminal membran yüzeyleri arasında polarite farklılığını yaratmakta ve bu özelliği ile moleküler ve hücrel geçiş regüle edilmektedir [90][93][94]. Endotel hücrelerinin diğer özelliği, sınırlı paraselüler geçirgenlik göstermeleri, fenestrasyon bulundurmamaları, oldukça yüksek mitokondriyal yoğunluğa sahip olmaları, hücre kalınlığının düşük olması (periferik endotel hücrelerinden % 61 daha ince) ve düşük transsitoz aktiviteye sahip olmalıdır [95].

Beyin kapillerini oluşturan endotel hücreler arasındaki interendotelial sıkı bağlantılar (Tight Junction, TJ) bulunmaktadır ve bu özellik hücrelerin çok sıkı ve selektif bir bariyer oluşturmaya neden olmaktadır. Bu sıkı bağlantılar KBB’de özellikle polar maddelerin paraselüler geçişini belirgin şekilde azaltmaktadırlar. Bunun yanı sıra, endotel hücreleri arasındaki TJ bağlantıları bu hücrelerde yüksek bir elektrik direnci oluşturmaktadırlar (Ör: diğer dokularda 3-30 Ωcm^2 gözlenirken, KBB’de 1500-2000 Ωcm^2 dir). Sıkı bağlantılar, yoğunlukla zonula okludens (ZO)-1,2,3, proteini, kladinlerden ve okludin proteinlerinden oluşturmaktadır. TJ yapıları içinde de bağlantı adezyon molekülleri (Adhesion Molecule, JAM) da bulunmaktadır. Ayrıca, endotel hücreleri arasında adheran bağlantılar (Adherens Junction, AJ) da bulunmaktadır. Trombosit endotel hücre adezyon molekül-1 (PECAM-1), anjiyogenez düzenleyen N-kadherin ve vasküler endotelyal (VE) kadherin gibi kadherin aile üyeleri bu bağlantıları oluşturan önemli proteinlerdir. Bu bağlantılar endotel hücrelerine yapısal destek sağlamak, endotel hücrelerin plastisitesinden sorumlu olma ve TJ oluşması için gerekmektedir. Adheran bağlantılar ve TJ, KBB’nin taşıma sistemleri için hayati ve damar bütünlüğünün korunmasında, damar geçirgenliğinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bağlantılarda ortaya çıkan bir bozulma kan bariyer bütünlüğünün kaybolmasına neden olmaktadır (Şekil 9) [96][97].

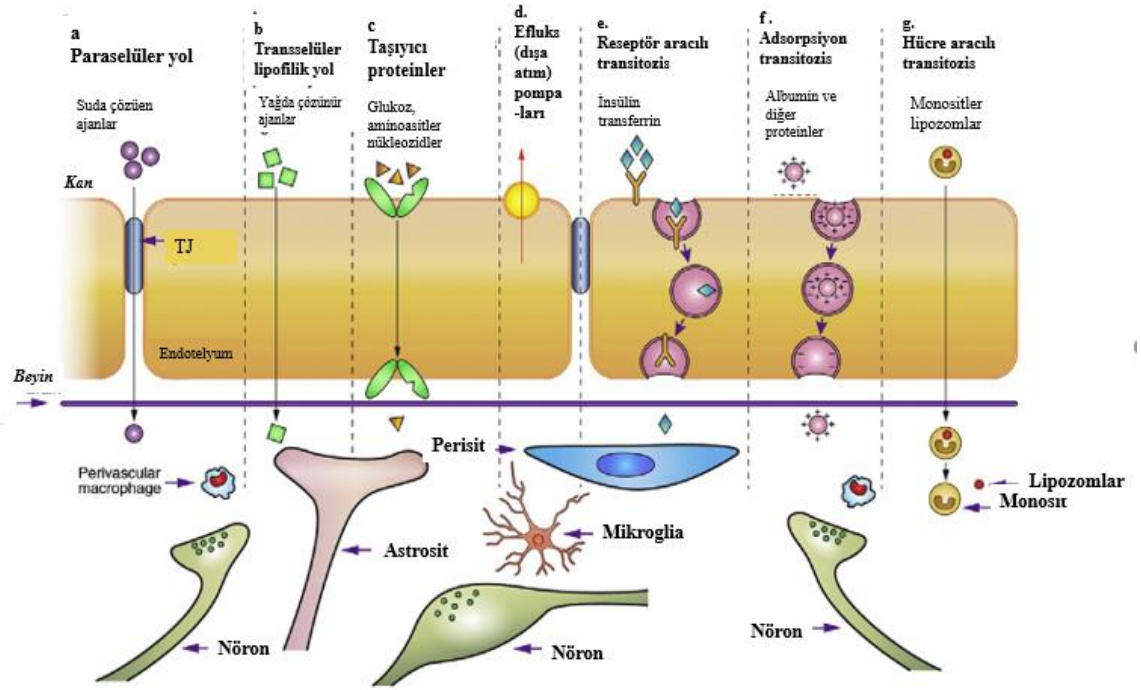


Şekil 9. KBB'deki sıkı bağlantılar (TJ), adheran bağlantılar (AJ). [Abbott NJ 2009'dan modifiye edilmiştir].

Endotel hücrelerinin yapısal özellikleri KBB'de bulunan transport sistemlerinde önemli rol oynamasının nedenidir (Şekil 10) [97]. Mikroglia ve astrositler de dahil olmak üzere KBB sisteminde bulunan diğer hücrelerin de TJ düzenliğini ve bariyer geçirgenliğinde etkili olduğu bilinmektedir. Taşıma sistemleri genellikle KBB'nin luminal yüzünde yer almasına karşın, moleküllerin beyinden kana geçişine izin veren sistemler KBB'nin abluminal yüzüne yerleşmiştir. Maddelerin KBB'den geçişinde, maddelerin molekül ağırlığı, molekül yükü yapısal konformasyonu, lipofilik özelliği, konsantrasyon gradiyenti gibi faktörler oldukça etkilidir. Beyine maddelerin difüzyonu genel olarak, paraselüler ve transselüler yol olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Paraselüler yol, suda çözünür moleküllerin hücreler arası yollardan sıkı bağlantılar aracılığı ile serbest difüzyonuna dayanmaktadır ancak sadece küçük moleküller için geçerlidir. Alkol ve steroid hormonları gibi nötr ve <400 Da küçük lipide çözünür maddeler, lipid plazma membranında çözünerek enerji gerektirmeyen transselüler olarak geçiş sağlamaktadırlar. Moleküllerin sıkı bağlantılar aracılığıyla, hücreler arasından geçmesinde etkin olan başka bir yol ise, moleküllerin KBB'yi oluşturan endotelial hücreler aracılığıyla beyne geçebilmeleridir. Glukoz ve amino asitler gibi temel moleküller de dahil hemen hemen tüm diğer maddeler için taşıma proteinleri, spesifik reseptör aracılı veya veziküler mekanizmalar (adsorptif transsitoz) ile KBB'yi geçmektedir [98]. Bu taşıyıcıların çoğu, çözünür taşıyıcı (SLC) ailesindeki genler tarafından kodlanmakta ve bu nedenle

genellikle SLC taşıyıcıları olarak adlandırılmaktadır. Bu taşıyıcılar arasında, GLUT1 ve nötr amino asitleri taşıyan LAT1 yer almaktadır. Elektrokimyasal gradientinin tersine olan, enerji gerektiren aktif transport ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcılarıyla gerçekleşmektedir. En yaygın ABC taşıyıcıları, P-glikoprotein, çoklu ilaç direnci bağlantılı proteini (MRP) ve meme kanseri direnç proteinidir (BCRP) [99][100]. Hücreden dışa atım taşıyıcıları (ABC taşıyıcıları) ve hücre içine alım taşıyıcıları (SCL) birbirlerine göre zıt etkilere sahiptirler. Sonuç olarak, ABC taşıyıcıları KBB'yi geçen potansiyel ilaçların alım oranının düşürülmesinden ve KBB'nin bariyer özelliklerinin arttırılmasından sorumludur [101]. Boyutları ve KBB'deki TJ'lerin varlığı nedeniyle, makromoleküller genellikle bariyeri pasif olarak veya taşıyıcılar aracılığıyla geçemez. Bunun yerine endositotik mekanizmalar yoluyla transitozlar aracılığıyla geçebilmektedirler. Reseptör aracılı transsitoz, makromoleküllerin seçici alımı için bir yol sağlamaktadır. Bu noktada endotel hücreleri, büyüme faktörleri, enzimler ve plazma proteinleri gibi birçok farklı ligand türünün hücre içine alımı için rol oynamaktadır. Demir transferrin, leptin, epidermal büyüme faktörü, insülin gibi çoğu makromolekül kandan beyine taşınır ancak düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol (LRP-1 ve 2) ve A β gibi bazı bileşikler bariyerden çift yönlü olarak taşınabilmektedir [97].

Diğer bir taşıma sistemi olan pinositoz veya adsorptif aracılı transsitoz, negatif yüklü plazma membran yüzeyi ile pozitif yüklü bir madde arasındaki elektrostatik etkileşimle tetiklenen yoldur. Katyonik lipitler, polimerler, dendrimerler, heparin sülfat proteoglikanları ve albümin gibi bazı pozitif yüklü maddelerin KBB'yi bu yol aracılığıyla geçtiği bilinmektedir. Adsorptif aracılı taşıma, daha düşük bir afiniteye sahip olmasına karşın, reseptör aracılı transsitoz den daha yüksek bir kapasiteye sahiptir. Lökositler, monositler ve makrofajlar da KBB'de ve periferel endotelial bariyerlerde transitozis taşıma sistemini kullanmaktadır [98].



Şekil 10. KBB’de taşıyıcı sistemler [Chen Y, 2012’den modifiye edilmiştir].

2.3.2. Perisitler

Perisitler, mikrodamarların abluminal yüzeyini kaplayan duvar hücreleridir. Serebral endotelialin bariyer bütünlüğünü desteklemektedir. Nörovasküler üitedeki perisitler, kendilerini endotel hücreleri ve astrositlerin ayaklarından ayıran ince bir bazal membran tabakasına gömülüdür. Perisitlerin endotel hücrelerinin çoğalmasında, farklılaşmasında, hayatta kalmasında ve damarsal dallanmanın düzenlemesinde etkili olduğu düşünülmektedir. Bunun yanı sıra perisitlerin, kan akışını, KBB geçirgenliğini ve anjiyogenezi düzenleyen transforme edici büyüme faktörü (TGF- β), angiopoetin-1 (ANG-1) ve (2), PDGF (Platelet derived growth factor) ve sfingozin-1 fostat gibi çok sayıda büyüme faktörü salgıladığı pek çok çalışmayla ortaya konmuştur [102].

2.3.3. Astrositler

Astrosit hücreleri yıldız şeklinde olan, nörovasküler üitedeki glial hücrelerin en büyük olanıdır. Başlıca özellikleri soluk ve düzensiz biçimli çekirdekleri, soluk sitoplazmaları, kısa ve izole granür endoplazmik retikulumları ve sitoplazmalarındaki ara filamet demetlere (glial fibriller asidik protein, GFAP) sahip olmalarıdır [103]. Astrositler sinir dokusuna destek olmak ve nöronal uzantılara iskelet sağlamanın dışında çok sayıda önemli fonksiyona da sahiptir. KBB özelliklerinin ve endotel hücrelerin işlevlerinin sürdürülmesinde biyokimyasal destek

sağlamaktadır [90]. Astrositler ayrıca, sırasıyla ksenobiyotik akışından ve glukozun beyin parankimisine taşınmasından sorumlu olan P-gp ve glukoz taşıyıcı-1 (GLUT1) gibi taşıyıcıların polarizasyona ve ekspresyona neden olmaktadır. Astrositler, nöronal uyarıların iletimi sırasında nöron ve aksonların zarlarından dışarı sızan K^+ iyonlarının ekstraselüler konsantrasyonu artışında ve ekstraselüler sıvının iyonik dengesinin sağlanmasında önemli rol oynamaktadır. Çok sayıda K^+ kanallıyla donanmış olan astrositler ekstraselüler K^+ iyonlarını alarak iyonik dengenin sağlanmasını ve böylelikle K^+ fazlalığının nöronları hipereksite etmesini önlemektedir. Ayrıca astrositler, transendotelyal elektrik direncinin (TEER) artması, geçirgenliğin azaltılması ile KBB'nin oluşumunda ve bütünlüğünde önemli bir rol oynamaktadır [104].

2.3.4. Bazal Membran

Nörovasküler üniteye bazal membranlar da birkaç mekanizma yoluyla KBB bütünlüğüne önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır. Serebrovasküler bazal membranın çoğunluğunu, nörovasküler üniteye hücreler tarafından üretilen hücre dışı matriks proteinleri kollajen IV, laminin, perekan, nidojen ve fibronektin oluşturmaktadır [105]. Üniteye iki tip bazal membran bulunmaktadır 1) endotel ve perisit hücreleri tarafından üretilen ekstraselüler matriksten oluşan endotel bazal membranı 2) astrositler tarafından üretilen parankimal bazal membranı. Endotel bazal membran laminin α -4 ve α -5 bakımından zengin, bazal membran laminin α -1 ve α -2 izoformlarından zengindir. Bazal membranlar endotel hücrelerinin abluminal yüzeyini çevreleyen fiziksel bir bariyer görevi görmektedir ve endotel ve perisit hücrelerinin çeşitli sinyalleri aracılığıyla ekstraselüler matrikste KBB'nin regülasyonuna katkıda bulunmaktadır. Bazal membran bileşenlerinin endotel hücrelerinde bulunan okludinin hücresel lokalizasyonunu düzenlediği ve böylece bariyer stabilitesini etkilediği de vurgulanmaktadır [97].

2.3.5. Nöronlar

Nöronlar duyu algılanması, motor ve duyu cevapların oluşturulması, öğrenme ve hafıza gibi fonksiyonların yerine getirilmesini sağlayan hücrelerdir. Bu hücrelerin uyarılabilirlik özelliği vardır. Başlıca; hücre gövdesi, akson, dendritler ve sinaptik terminallerden oluşmaktadır. Nöronların gövdesi nükleus ve sitoplazmadan oluşmaktadır ve hücre gövdesinin dendrit ve akson olmak üzere iki tip uzantısı bulunmaktadır. Dendritler dallanarak diğer nöronların uzantıları ile bağlantı kurar ve bu nöronlardan gelen impulsların hücre gövdesine

iletilmesini sağlar. Aksonlar ise, genellikle dendritlere göre daha uzun olup, hücre gövdesinden gelen impulsların diğer nöronlara veya efektör organlara iletilmesini sağlar [106]. Nöronlar, serebral kılcal damarlarda farklı noradrenerjik, serotonerjik veya kolinerjik özellikleri ile KBB'ini dolaylı olarak destekleyen hücrelerdir [92]. Nöronların serebral endotel hücrelerinde KBB ile ilişkili enzimlerin ekspresyonunu uyarabildiği belirtilmektedir [107].

2.4. *In vitro* KAN BEYİN BARIYERİ

Nörodejeneratif hastalıklara ilişkin terapötik ajanların geçiş yollarını optimize etmek, ilaç oluşturmak, taşıma ve toksisite uygulamaları için çok sayıda model mevcuttur. Yıllardır, hayvan modellerindeki *in vivo* çalışmalar, KBB geçirgenliğini incelemek için en güvenilir deney platformu olarak kabul edilmiştir ve hala altın standart olarak kabul edilmektedir [108], ancak insan ve fareler arasındaki önemli genetik, moleküler, immünolojik ve hücresel farklılıkların olması ve hayvan modellerinin de klinikte başarısızlık oranlarına sahip olması, bu modellerin insan patolojileri tedavisinde ilaç geliştirmede etkili bir platform olarak kullanıma yeteneklerini azaltmaktadır. Hayvan modellerinde doğrulanan aday ilaçların denemelerinde ilaçların >% 80 'i klinik testlerde başarısız olmaktadır [109][110]. *In vivo* hayvan testlerinin yoğun emek gerektirmesi, etik sorunları ve pahalı olması gerçeğiyle birlikte, son zamanlarda araştırmacılar etkili ilaçların geliştirilmesinde, etkinliği arttırmak için *in vitro* insan fizyolojisi modellerinin kullanımına yönelmektedir. *In vitro* KBB modeli pek çok fizyolojik ve patolojik uyarıya yanıt olarak serebrovasküler mekanizmaların anlaşılmasında araştırmacılara önemli ölçüde yardımcı olan bir modeldir. KBB dinamik olarak fizyolojik ve patolojik olaylara (akut beyin hasarına bağlı bozukluk ve proinflatuar uyarı) yanıt vermekte ve nörolojik hastalıkların (epilepsi, multiple skleroz, AH gibi çoğunlukla artmış KBB geçirgenliği ile ilişkili durumların) patogeneze ve progresyonunda rol oynamaktadır [111].

In vitro KBB modeli 1980'lerde gün ışığına çıkmaya başlamıştır. Son 40 yıldır KBB modellemesi alanındaki gelişmeler, primer olarak beyin çevresini regüle eden kompleks moleküler mekanizmalarla ilgili bilinenleri daha da geliştirmek ve SSS'ni hedefleyen alternatif farmakolojik stratejilerin geliştirilmesi amacıyla yöneliktir. *In vivo* da yaşanabilecek etik sorunların *in vitro* KBB modeller sayesinde azalacağı, etkili görülen ilaç adaylarının *in vivo* çalışmalar için kullanımına olanak sağlayabileceği düşünülmektedir. Bunun yanı sıra *in vitro* KBB modeli kullanımı, araştırmacılara *in vivo* araştırmalara göre maliyet etkinliği ve çok yönlülük gibi birçok avantaj katmaktadır. Nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili tedavi startijlerinde önemli diğer bir husus, KBB'den seçilen aday ilacın/bileşiğin KBB'den geçip

geçmediğidir. Bu bileşiklerin KBB'den geçişleri ve glial ve nöron hücreleri ile etkileşimleri, nöroprotektif ve diğer özelliklerini göstermeleri açısından önem arz etmektedir. Çeşitli özellikleri nedeniyle pek çok nörodejeneratif hastalık modelinde kullanılan polifenollerle ilgili yapılan araştırmalar incelendiğinde, kalp ve akciğer gibi organların kılcal damar gözenekleri içinden kolaylıkla geçmelerine karşın beyindeki TJ nedeniyle KBB'yi kolaylıkla geçemeyecekleri belirtilmektedir.

Polifenollerin kan beyin bariyerini geçmeleri çözünürlükleri, molekül ağırlıkları ve hangi taşıma sistemini kullandıklarına (pasif difüzyon, taşıyıcı aracılı transport, endositoz gibi) bağlıdır [112]. Bu nedenle polifenol ile ilgili araştırmalarda her polifenolün kendine özgü etkinliğinin belirlenmesi, KBB geçişinin değerlendirilmesi açısından büyük öneme sahip olmaktadır. Örneğin, antosiyaninler grubu ile (yaban mersini) 4 hafta beslenen domuzların hem korteks hem de serebellumda antosiyaninlerin varlığı tespit edilmiştir [113]. Yapılan çalışmalar antosiyaninlerin KBB'yi geçebildiğini ve SSS 'de biriktiğini ortaya koymuştur. Bu bulgular SSS'ni hedefleyen ilaçların genellikle lipofilik olduğu temeline ters düşmektedir çünkü antosiyaninler ve diğer flavonoidler hidrofilik moleküllerdir. Yapılan bazı hayvan çalışmaları sonucunda polifenollerin KBB'yi geçebildikleri vurgulanmaktadır. Oral yolla verildikten sonra epigallokatekin gallat, epikatekin ve antosiyaninler beyinde, oral uygulama ile naringenin ve glukuronid türevleri serebral kortekste, intravenöz uygulamadan sonra hesperetin de beyinde, özellikle striatumda tespit edilmiştir.

Flavonoidlerin KBB'den transferini incelemek için sıklıkla endotel hücreleri ile oluşturulan *in vitro* hücresel modeller kullanılmaktadır [114]. Bazı flavonoidlerin ve onların dolaşımdaki önemli metabolitleri olan glukuronitler ve O-metillenmiş türevlerinin, endotel hücre katmanına geçişi ortaya konulmuştur [115]. Bununla birlikte flavonoidlerin KBB'yi geçiş yollarının basit difüzyon veya taşıyıcı aracılı olup olmadığı henüz net değildir. Bugüne kadar, flavonoid ailesinin her birinden sadece birkaç bileşik alt sınıfı çalışılmıştır ve flavonoid yapının beyin düzeyinde biyoyararlanım etkileri hakkında hala sınırlı bilgi bulunmaktadır [116]. Bu nedenle flavonoidler, dolaşımdaki ve KBB ile etkileşime giren metabolitleri sinirbilim araştırmalarında hala sıcak bir konu olmaya devam etmektedir [114]. Flavonoidlerin KBB'den geçişinin geçirgenliği açısından bakıldığında, P-gP, MRP ve BCRP gibi ABC süper ailesinin ve çözünen taşıyıcılar ailelerinin üyeleri aracılığıyla sağlamaktadır. Bu taşıyıcıların kesin yerlerinin, yönelimlerinin, ekspresyon profillerinin ve işlevlerinin KBB'nin geçirgenlik özelliklerini büyük ölçüde belirledikleri ve flavonoidlerin kandan beyine veya beyinden

periferik kana aktarımında etkili olduğu düşünülmektedir. Günümüzde polifenollerin hangi transport moleküler mekanizma aracılığı ile geçiş sağladığının ortaya konulmasının önemli bir araştırma alanı olduğu düşünülmektedir.

2.4.1. KBB Modelleri

Oluşturulan KBB modellerinin fizyolojik KBB'yi oluşturan önemli hücre bileşenlerini (endotel, astrosit, perisit gibi) içermesi gerekmektedir. Her bir hücrenin farklı özellikleri sayesinde KBB bütünlüğü sağlanmaktadır. Literatürde yer alan pek çok farklı *in vitro* KBB modeli bulunmaktadır. Bu modeller, izole beyin mikrodamarları ile oluşturulan, *in silico*, mikroakışkan sistemleri, sferoid ve ekstraselüler maktriiks temelli ve transwell sistemler olarak sıralanabilir.

2.4.1.1. İzole Beyin Mikrodamarları

İzole beyin mikrodamarlarından *in vitro* KBB modeli yaklaşımı ilk olarak Joo F. tarafından 1985'te, izole rat beyin dokusundan mekanik homojenizasyon, enzimatik sindirim ve çeşitli filtrasyon ve/veya yoğunluk gradiyenli santrifüjleme teknikleri ile izole edilerek gerçekleştirilmiştir [117]. Bu model kolayca erişilebilir ve KBB' nin birçok yapısal ve işlevsel özelliğini koruması açısından avantajlı olmasına karşın, mikrodamarların izolasyonu emek isteyen zor bir süreçtir. Ayrıca mikrodamarların canlılığı genellikle sürdürülememektedir ve hücrel göç ve transport mekanizmaları ile ilgili çalışmalara uygun olmamaktadır. Bununla birlikte, 1980 'lerin başında gerçekleştirilen bu beyin kaynaklı endotel hücrelerin izolasyonu ve üretim teknikleri *in vitro* KBB araştırmalarını kolaylaştırılmış ve geliştirilmiştir. Bu yaklaşımlar, KBB 'nin *in vitro* modellerinde basitleştirilmiş, düşük maliyetli, oldukça esnek ve kolay kontrol edilebilen bir yapıya olanak sağlamaktadır [118].

2.4.1.2. İn Silico Modeller

Bilgisayar temelli *in silico* modeller zaman etkinliğini arttırmak ve maliyeti azaltmak için en iyi adaylardandır. Özellikle farmasötik ve biyoteknolojik araştırmacılar maliyet etkin ve yüksek verimliliği olan sistemleri hedef almaktadır. Bu yönü ile *in silico* modeller, SSS'de etkinlik ve biyoyararlanımın öngörülerek ilaç geliştirilmesi için potansiyel olarak en uygun başlangıç yöntemidir. Pek çok ilaç firması, bu teknolojiyi halihazırda iyi tolere edilen, güvenli ve etkili bileşiklerin belirlenmesine yardımcı olan ilaç geliştirme programlarında bilgisayar temelli olarak uygulamaktadır [119].

2.4.1.3. Mikroakışkan Sistemler

Mikroakışkan sistemler günümüzde *in vivo* ve *in vitro* modellerin birçok avantajlarının birleştirilmesine olanak sağlamaktadır. Bu sistemlerin en önemli özelliklerinden biri bilgisayar kontrollü bir pompa mekanizması ile laminar akış sağlanarak endotel hücreleri üzerinde fizyolojik bir sürtünme gerilimi sağlamalarıdır. Bu sistemlerde, hücreler ekstrasellüler matriks proteinleri ile kaplanmış, gözenekli, cam veya plastik içi boş fiberlerin içinde kültüre edilmektedirler. İçi boş fiberlerden oluşan yapı, luminal ve abluminal bölümler olarak ikiye ayrılmaktadır. Bu modelde pompa aracılığı ile gaz değişimi sayesinde, sürekli bir boru içerisinde yaratılan akış ile kan akışını simüle ederek, hazne içerisindeki medium ile endotel hücrelerin yaşamı sağlanarak model oluşturulmaktadır [119].

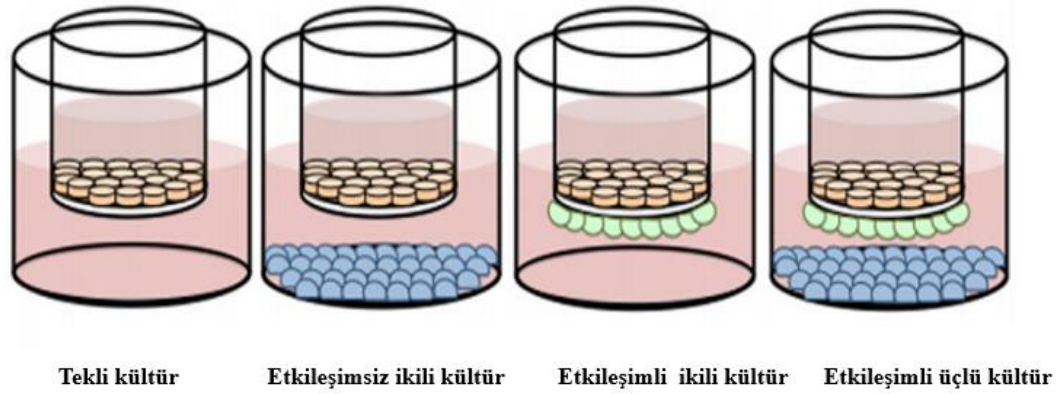
2.4.1.4. Sferoid ve Ekstrasellüler Matriks Temelli Modeller

İki boyutlu hücre sistemlerinde, hücre-hücre etkileşimlerinin endotel hücrelerde "fenotipik kaymalara" yol açabileceği ve reseptör aracılı taşıma sistemlerinin bozulabileceği öne sürülmüştür [120][121]. Sferoid ve ekstrasellüler matriks (ECM) gibi üç boyutlu modeller ise hücre-hücre etkileşimleri açısından *in vivo* KBB organizasyona benzerliği yönüyle öne çıkmaktadırlar. Ekstrasellüler matriks sistemlerinde hücreler, serbest göç ve etkileşime olanak veren matrijel matrislerinin içinde büyütülmektedir. Bu nedenle özellikle Matrijel sisteminde, endotel, perisit ve astrosit hücreleri tüp benzeri yapıların etrafına yerleştirilirken sferoid modelde hücreler, kendi kendine etkileşimde bulunarak bir iskele malzemesi olmadan hücresel kümeler oluşturmaktadır. Sferoid sistemde hücrelerin kendiliğinden kümeleşmesi sırasında; astrositlerin sferoidlerin çekirdeğinde olduğu ve bu hücrelerin perisitlerden oluşan bir hücre tabakası ile çevrildiği ve en dışında da endotel hücrelerinin yer aldığı belirtilmektedir [121]. Üç boyutlu modellerin belirgin avantajları olmasına rağmen, kurulumlarının zor, tekrarlanabilirliklerinin düşük olması ve pahalı olmaları dezavantajları arasında sayılmaktadır.

2.4.1.5. Transwell Sistemler

Transwell sistemleri; tekli, ikili (etkileşimli veya etkileşimsiz) veya üçlü kültür modellerinden oluşmaktadır (Şekil 11). En basit olanı, tekli kültür (endotel hücreleri) sistemidir ve sadeliği nedeniyle pek çok araştırmacı tarafından tercih edilmektedir. KBB modelleri üzerinde yapılan araştırmalar, sadece tekli kültür ile endotel hücrelerinin kullanılmasının yeterli olmayacağı, nörovasküler üniteye ait olan diğer destekleyici hücreler ile birlikteliğin *in vivo* 'ya daha yakın özellikleri sergileyebileceğini vurgulamaktadır. Bu nedenle astrosit ve/veya perisit hücrelerinin de dahil edildiği ikili veya üçlü kültür modelleri oluşturulmasının gerekliliği

üzerinde durulmaktadır [111][122][123][124]. Bu sistemlerin oluşturulmasında insan (insan (hMEC/D3, TY10 ve BB1929), fare (bEnd.3, bEnd.5 ve RBE4), maymun, tavşan, domuz kökenli endotel hücreleri kullanılmaktadır. Bu hücre hatları büyütme kolaylıkları ve maliyet düşüklüğü gibi avantajları nedeniyle tercih edilmektedirler ancak kullanım pasaj aralıklarının sınırlı olması da bir dezavantaj yaratmaktadır. En yaygın kullanılan insan temporal lob mikrodamarlarından türev alan, ölümsüzleştirilmiş hCMEC/D3 endotel hücre hattıdır ve beyin endotel fenotipi için kapsamlı bir şekilde karakterize edilmiştir [125].



Şekil 11.Transwell sistemleri [Abraham J.Al-Ahmad 2017'den modifiye edilmiştir].

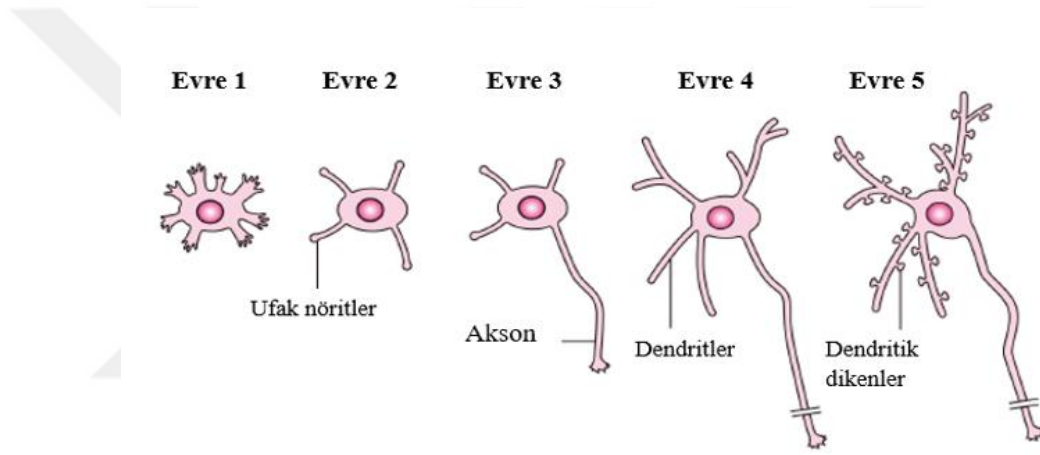
Endotel hücreleri ile astrosit/perisit/nöron veya glial hücrelerle birlikte ikili kültür modellerinin oluşturulmasının TJ bağlantılarının oluşumunu destekleyebileceği, daha yüksek Transepitelyal/Transendotelyal elektrik direnci (TEER) sonuçları elde edilebileceği ve nörovasküler üniteye gözlenen hücresel iletişimi daha iyi sağlayabileceği belirtilmektedir [126][127][128]. 1987 yılında Janzer and Raff çalışmalarında endotel hücreleri ile astrosit hücrelerinin ikili kültürde kullanımının KBB benzeri TJ karakterlerini indükleyebildiğini belirtilmiştir aynı yıl Tao-Cheng ve ark.ları da astrositlerin beyin endotelindeki TJ'lerin arttırdığını bildirmiştir [129][130]. Bunun yanı sıra, endotel, astrosit ve perisit hücrelerinden oluşturulmuş üçlü kültür sistemleri de literatürde yer almaktadır. Üçlü kültür modelinde, astrositler ve endotel/perisitler arasında doğrudan hücre-hücre iletişimi eksik olsa da, astrositlerin KBB düzenlemesinde salgılanan çözünür faktörler yoluyla dolaylı etkisinin olduğu düşünülmektedir. Oluşturulan bu üçlü kültür modeli, yüksek TEER ve düşük geçirgenliğe sahiptir, bu da perisitlerin ve astrositlerin KBB'nin bütünlüğüne katkıda bulunduğunu ortaya koymaktadır [94][93][131][132].

In vitro araştırmalarda primer hücre kullanımında karşılaşılan etik sorunlar, üretim ve kullanım sınırlılığı gibi zorluklardan dolayı sinir bilimleri ile ilgili çalışmalarında PC12 (sıçan), SH-SY5Y (insan) gibi çeşitli ölümsüzleştirilmiş hücre hatları kullanılmaktadır. SH-SY5Y hücreleri 1970 yılında SK-N-SH hücreleri olan metastatik nöroblastomalı dört yaşındaki bir kızın kemik iliğı biyopsisinden alt klonundan elde edilmiştir ve Alzheimer ve Parkinson gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıklarla ilgili *in vitro* çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Bu hücreler, hem nöron-benzeri (N-tip) fenotip hemde endotel-benzeri fenotipi (S-tip) içermektedirler [133][134]. Bu hücrelerin orta düzeyde dopamin hidroksilaz enzim aktivitesine sahip olduğu ve tirozin hidroksilaz eksprese ettiği belirtilmektedir [135].

SH-SY5Y hücrelerinin dopaminerjik karakterlerinden dolayı Parkinson hastalık modeli için uygun olmasına rağmen, çeşitli ajanlar ile diferansiye edilerek, bir baskın kolinerjik fenotip oluşturulması ile Alzheimer modeli çalışmaları için daha uygun hale gelebileceğı vurgulanmaktadır [136]. Son yıllarda yapılan çalışmalar da diferansiye edilmiş ve edilmemiş SH-SY5Y hücreler arasındaki önemli farkları ortaya koymaktadır. SH-SY5Y hücre hattı kullanılarak yapılan çalışmaların nöronal hücre özelliğini yansıtamayabileceğini ve elde edilen verilerin tartışılması gerektiğı vurgulanmaktadır [9]. Diferansiye edilmemiş SH-SY5Y hücreleri, kanser kökenli bir hücre hattı olduğundan, onkojenik ve mitojenik olma gibi özelliklerine de sahiptirler. Diferansiye edilmemiş SH-SY5Y hücrelerinin, non-polarize özellik gösterdiği, nöron spesifik belirteç ekspresyonlarının daha az olduğu ve nöronları tanımlayan birçok özelliğı bulundurmadığı belirtilmiştir. Diferansiye edilmiş SH-SY5Y hücrelerinin ise; nöron benzeri hücrelere dönüşüp proliferasyon özelliklerinin azaldığı, sinir hücresi uzantılarının (nörit) oluştuğı, nörona özgü fonksiyonel aktivitesinin arttığı ve polarize özellik kazandığı çalışmalarda ortaya konmuştur [9][10][11].

Nöronal polarite, nöronal ağların oluşturulması ve sinyallerin yayılması için özellikle önemlidir. Nöron hücreleri, yuvarlak nöronal küreler halinden uzun bir akson ve birkaç kısa dendrit oluşturarak sinapslar aracılığıyla diğer nöronlara bağlanmaktadır. Potansiyel iletimi, akson başlangıcından başlayarak akson boyunca ilerlemekte ve hareket potansiyelini tetikleyerek dendritik dallanma ile entegre haldedir [137]. Nöronlar, yaşamları boyunca polaritelerini farklı hücre içi mekanizmalar ve moleküler sinyaller ile korurlar. Son on yılda, hücre biyolojik ve moleküler yaklaşımları, nöronal polariteyi düzenleyen moleküllerin ve sinyal mekanizmalarının keşfedilmesine oldukça yardımcı olmuştur [138][139].

Nöronal polaritenin incelenmesi için kabul edilen en yaygın model, kültüre edilen rodent embriyonik hipokampal piramidal nöronlarıdır (Şekil 12). Bu modelin nöronal polarizasyon için oldukça önemli bir deney modeli olduğu pek çok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur [140]. Bu model kullanılarak belirlenen nöronal morfolojik değişiklikler beş aşamada sınıflandırılmaktadır. Hipokampal nöronlar öncelikle filopodiyalarını uzatırlar (evre 1) daha sonra bu uzantıların boyutları değişerek çok sayıda küçük nöriti oluşturmaktadır (evre 2). Oluşan bu küçük nöritlerden biri akson olmak için hızla büyüyerek (evre 3) nöronların polarizasyonlarını belirlemektedir. Kalan kısa nöritler ise daha sonra dendritlere dönüşerek (evre 4), dendritik dikenleri oluşturmakta ve sinaptik temasların kurulmasını sağlamaktadır (evre 5).



Şekil 12. Kültüre edilen rodent embriyonik hipokampal piramidal nöronlarının polarizasyon evreleri [Takano 2019'dan modifiye edilmiştir].

Son 20 yılda da nöronal polaritenin düzenlenmesinde pek çok sinyal ağının etkili olduğu ortaya konulmuştur. Bu nedenle pek çok araştırmacı sıklıkla kullanılan SH-SY5Y hücrelerini çeşitli kimyasallar ile diferansiye ederek nöronal hücreye benzer karakter kazanmalarına katkı sağlayamaya çalışmaktadırlar. Diferansiye etmek için sıklıkla kullanılan kimyasal madde retinoik asit (RA) dir. SH-SY5Y hücrelerine retinoik asitin uygulamasının yanı sıra, beyin türevli nörotrofik faktör (BDNF), norepinefrin, dibütiril siklik adenosin monofosfat (dc-AMP), Vitamin D3, forbol esterleri, sinir büyüme faktörü (NGF), kolesterol, estradiol, 12-Otetradekanoil-forbol-13-asetat'ın da tek tek veya retinoik asit ile kombine edilerek kullanıldığı çeşitli çalışmalar da literatürde yer almaktadır [134][141][142]. Genel olarak 10 μ M retinoik

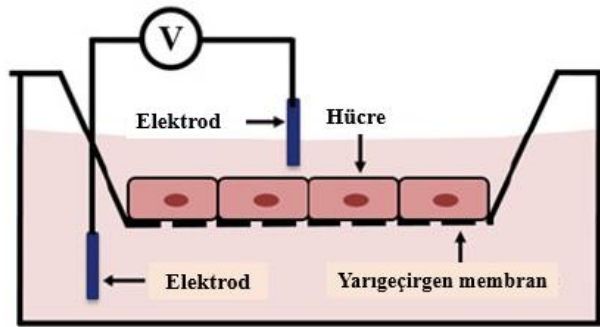
asit kullanılmasına rağmen, uygulanması gereken süre ve ortam içeriği hala tartışılmaktadır [134]. Ortak kullanılan bir protokolün olmaması, literatür sonuçlarının doğru bir şekilde karşılaştırılamamasına ve değerlendirilememesine neden olmaktadır.

Retinoik asitin biyolojik etkisini all-trans-RA (ATRA) ve retinoid X (9-cis-RA) reseptörlerine (RARs ve RXRs) bağlanarak gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Jingbo ve arkadaşları SH-SY5Y hücrelerinde yaptığı diferansiyasyon çalışmasında da, RA uygulamasının, diferansiye nöronal hücre karakteristiği olan proliferasyon baskılanmasını, hücre döngüsünü baskılayarak gerçekleştirdiği ve PI3K/AKT ve ERK yolağının aktivasyonu ile nörit uzamasında önemli bir rol oynadığını belirtmişlerdir [143]. RA ile birkaç gün indüklenen SH-SY5Y hücrelerde bu süre sonunda, morfolojik değişiklikler meydana gelmektedir. Ancak nöronal karakterizasyonu değerlendirmek için çeşitli nöronal belirteçlere bakılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Diferansiye olan SH-SY5Y hücrelerinde, nörotransmitterlerinde (dopamin gibi katekolaminler), nöron spesifik enzim sentezinde (asetilkolinesteraz gibi) ve hücre iskeleti belirteçlerinde artış olmaktadır[10][144]. Tirozin hidroksilazın dopamin ve diğer katekolaminlerin sentezini sağlayan enzimdir ve bu nedenle dopaminerjik nöronlar için tercih edilen bir belirteç olarak kabul edilmektedir. Bunun yanı sıra, SH-SY5Y hücrelerinin diferansiyasyonu sonrası ekspresyonları artan bazı proteinler nöronal belirteç olarak kabul edilmektedir. β -Tubulin III, mikrotübüler ilişkili protein 2 (MAP2), neurofilament ağır/hafif polipeptid (NF-H, NF-L), nöron-spesifik enolaz (NSE), büyüme ilişkili protein-43 (GAP-43), sinaptofizin ve nöronal nükleu (NeuN) sıklıkla kullanılan nöronal diferasyon belirteçleridir [9][10][145]. Mikrotübüler ilişkili protein 2 (MAP2) mikrotübülleri stabilize eden ve tubulinlere bağlanan bir nöronal hücre iskeleti proteindir ve bu nedenle hücre iskeleti dinamiğinde, nöronal morfolojinin sürdürülmesinde ve gelişmesinde hayati rol oynamaktadır [146]. β -Tubulin III ise, nöron spesifik bir tubulin sınıfıdır. Gelişme sırasında, bu proteinin artması nöronal farklılaşma oranı ile artmaktadır. Nörofilamentler ağır polipeptid (NF-H), aksonlarda bol miktarda bulunan bir intermediyan filamentler türüdür ve ekspresyonu hücrelerin distal ve proksimal arasında bir gradyan sağlayarak hücre iskeleti ağına destek vermektedir [147][148].

2.4.2. *In Vitro* KBB Modellerinin Doğrulanması

In vitro KBB modeli oluşturulduktan sonra, bütünlüğü, modelin uygulanabilir olduğu ve büyük moleküllere geçirgenliğin artış göstermediği çeşitli parametrelerle test edilmelidir. Genel olarak, *in vitro* KBB modelinin fonksiyonel analizi Transepitelyal/Transendotelyal elektrik direnci (TEER), geçirgenlik (Pe) ile, dışa atım ve TJ proteinlerinin ekspresyon analizleri ile yapılmaktadır [149].

Transepitelyal/Transendotelyal elektrik direnci, *in vitro* hücresel bariyerlerin, doğrulamasında ve bariyer bütünlüğünün değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan invaziv olmayan, güvenilir ve çok hassas bir tekniktir [150]. TEER kullanılarak yaygın şekilde karakterize edilen bariyer modellerin bazıları KBB, gastrointestinal kanal ve pulmoner modelleri içermektedir [151]. TEER epitel hücrelerinin apikal ve bazolateral bölümleri arasındaki iyon akışının difüzyonunu sınırlandırılarak oluşturulan direncin ölçülmesidir. Bu direnç, ticari olarak kullanılan EVOM2 (World Precision Instrument, Sarasota, FL, USA) veya CellZScope (NanoAnalytics, Münster, Germany) gibi araçlarla ölçülebilir. TEER ölçümü ohm yasasını temel alan ohm direnç ölçümüne dayanmaktadır. Elektrotlar, gözenekli membranla ayrılan üst (apikal) ve alt (bazolateral) bölümlerin her iki tarafına yerleştirilir. Ohm direnç (Ω), hücresel tabakanın her iki tarafında yerleşmiş elektrodla akım uygulanarak belirlenmektedir (Şekil 13). TEER ölçümü; sıcaklık, hücre kültür içeriği, gözenekli membran boyutu, kültür periyodu, elektrodun ölçüm yeri ve pozisyonu, kültürün tekli, ikili veya üçlü olması gibi çeşitli faktörlerden etkilenebilmektedir ve bu nedenle literatürdeki sonuçlar oldukça çeşitlilik göstermektedir.



Şekil 13. Ohm direnç TEER ölçümü (Srinivasan B. 2019'dan modifiye edilmiştir).

Transendotelyal geçirgenlik katsayısı (Pe) bariyer sıklığını değerlendirme için kullanılan bir parametredir ve genellikle sodyum fluorescein (NA-F), dekstranlar, lucifer sarısı,

evans mavi boyası, horseradish peroksidaz, radyoaktif işaretli manitol/sakaroz/ inulin gibi kimyasallar belirteç olarak kullanılmaktadır [89] [152].

P-glikoprotein, BCRP ve LRP-1, GLUT-1 gibi taşıyıcı proteinlerin ekspresyonları KBB'nin geçirgenliğinin değerlendirilmesinde önem arz etmektedir. Bunun yanı sıra, TJ'nin önemli proteinleri olan okludin, klaudin-5 ve ZO-1'in ekspresyonlarının varlığı ile de KBB modellerin bütünlüğü ispatlanabilir [124].

Literatürde yer alan pek çok *in vitro* KBB modellerinin özellikleri yukarıda belirtilmiştir. Oluşturulan *in vitro* KBB modelinin TJ, geçirgenlik gibi çeşitli parametrelerle doğrulanması oldukça önem arz etmektedir. Bu modellerin çeşitli avantaj ve sınırlılıklarının olmasının yanı sıra uygulanım alanları da farklılık göstermektedir. KBB modellerinin avantaj, sınırlılık ve önerilen uygulamaları Tablo 1'de yer almaktadır [118] [122].

Tablo 1. *In vitro* KBB modellerinin avantaj, sınırlılık ve önerilen uygulamaları.

Model	Avantajlar	Sınırlılıkları	Önerilen Uygulamalar
İzole beyin mikrodamarları	✓ Kolay ulaşılabilir. ✓ KBB 'in yapı/fonksiyon özelliklerini gösterir.	✓ Emek gerektirir, işçilik gerektirir. ✓ İzolasyon protokolü zordur. ✓ Canlılığı sürdürmek zor ✓ Hücre migrasyon ve doğrudan transport çalışmalarına uygun değildir.	✓ Morfolojik karakteri ışık, elektron ve floresan mikroskobu ile incelenebilir.
İn silico modeller	✓ Az zaman alıcı ve ucuzdur. ✓ Pek çok defa tekrarlanabilir.	✓ Karmaşıktır. ✓ Günümüzde sınırlı parametreler mevcuttur.	✓ İlaç etkinliği ve biyoyararlanımının saptanmasında kullanılabilir.
Mikroakışkan sistemler	✓ Daha az hücre sayısı gerekmektedir. ✓ <i>Shear stress</i> uygulaması oluşturmaktadır. ✓ KBB 'nin yapı /fonksiyon özelliklerini göstermektedir. ✓ Üç boyutlu sistemleri oluşturur.	✓ Pahalıdır. ✓ Kurumu zordur. ✓ Uzman kişiler tarafından kullanılmaktadır.	✓ Hücre migrasyonu ve adezyonu çalışmaları ve <i>shear stress</i> deneylerinde kullanılabilir.
Sferoid ve ECM Modelleri	✓ 3D hücre organizasyonu sağlar. ✓ Scaffold materyeline ihtiyaç yoktur. ✓ Pahalıdır. ✓ Oluşturulması zahmetlidir.	✓ Shear-stress uygulaması yoktur.	✓ Transport reseptörlerin, adezyon moleküllerin ekspresyon çalışmaları için uygundur.
Transwell sistemler	✓ Maliyet azdır. ✓ Yaygın olarak kullanılmaktadır. ✓ Kontrolü kolaydır. ✓ KBB-immün hücreleri etkileşimini en iyi yansıtan modeldir.	✓ KBB karakteristik fenotip kayması hızlıdır. ✓ Kısa süreli kültür çalışmaları için daha uygundur.	✓ İmmün hücreleri-KBB etkileşimi, migrasyon, geçirgenlik ve TEER ölçümleri için uygundur.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırmanın tipi deneysel (*in vitro*) bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma literatür taraması ile Şubat 2015'te başlamış, Ekim 2019'da tez savunması ile sonlanmıştır. Araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarları ve İzmir Biyotıp ve Genom Merkezinde gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Çalışma *in vitro* hücre kültürü çalışması olması nedeniyle bir evreni ve örneklemi bulunmamaktadır.

3.4. Çalışma Materyali

İnsan beyin mikro kapiller endotel hücre hattı (hCMEC/D3) Cederlane firmasından, insan astrosit hücre hattı (HA) Sciencell firmasından ve insan nöroblastoma hücre hattı (SH-SY5Y) ATCC firmasından ticari olarak satın alınmıştır. Her bir hücre hattı için gerekli koşullar üretici firmanın talimatlarına göre yapılmıştır.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

- ✓ Kan Beyin Bariyer modelinde A β ₁₋₄₂ plak çözünürlüğü (bağımlı değişken)
- ✓ EGCG, Punicalagin, Ellagic asid, Gastrodin, Kombinasyon 1 (EGCG + Punicalagin), Kombinasyon 2 (EGCG + Ellagic asid) (bağımsız değişken)

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve kitler Tablo 2'de cihazlar ise Tablo 3'de belirtilmiştir.

Tablo 2. Projede kullanılan kimyasal malzemelerin, kitlerin marka ve kod numaraları.

<i>Malzeme/Cihaz Adı</i>	<i>Markası</i>	<i>Model/Kod numarası</i>
Dimetil Sülfoksit	Applichem	A7248
EBM-2 Endothelial Basal Medium	Lonza	190860
Punicalagin	Sigma	P0023
Ellagic acid	Sigma	E2250
Gastrodin	Sigma	SMB00313
EGCG	Sigma	E4143
PBS (Fosfat Tamponu 1X)	Biochrom	L2143
Potasyum klorür	Fisher	BP366
DMEM:F12 kültür ortamı	Biochrom	F4815
WST-1	Roche	11465007001
BDNF	Sigma	B3795
Dibütiril siklik adenzin monofosfat	Sigma	D0627
Hoescht Boyası	Sigma	H6024
Anti-MAP2 Antikor	Abcam	ab5392
Nörofilament antikor	Abcam	ab4680
β -III Tubulin	Santa cruz	sc-80005
Anti-mouse Alexa 488	Santa cruz	sc-516176
Penicilin/Streptomisin	Biochrom	A2213
EndoGRO-MV Complete Culture Media Kit	Milipore	SCME004
GlutamaxI	Thermo	35050-61
Retinoik Asit	Sigma	R2625
Trypsin/EDTA	Sigma	T4049
B27 Serum Free Supplement (50x)	Thermo	17504-044
Kollajen I	Gibco	A10483-01
SH-SY5Y hücre Hattı	ATCC	CRL-2266
İnsan Beyin Mikro Kapiller Endotel Hücre Hattı (hCMEC /D3)	Cedarlane	

Trypsin/EDTA	Sciencell	0103
İnsan Astrosit Hücre Hattı (HA)	Sciencell	1800
Astrosit Basal Medium	Sciencell	1801
DPBS	Sciencell	0303
Trypsin Nötralize edici solüsyon	Sciencell	0113
Poly-L-Lysine (PLLL)	Sciencell	0403
Neurobasal medium	Thermo	21103049
Amiloid β Fragman ₁₋₄₂	Anaspec	AS-20276
Tiyoflavin T	Sigma	T3516
Laktad Dehidrogenaz Kiti	Roche	11644793001
Amiloid Beta (Aggregated) ELISA Kit	Thermo	KHB3491
Fetal Dana Serum (FBS)	Cegregon	
L-Glutamin	Biochrom	K0283
Human Basic Growth Factor	Sigma	F0291
Anti-chicken Sekonder Antikor	Abcam	ab150169
Tripan mavisi	Biochrom	L-6323
Fluorescein Sodyum tuzu	Sigma	F6377
Poly-D-Lizin	Sigma	P1149
Trypsin / EDTA	Sigma	T4049
DMEM	Gibco	31053-028
Folin Ciocalteu	Sigma	F9252
Asetik asit	Ridedel de Haen	27225

Tablo 3. Projede kullanılan cihazların marka ve kod numaraları.

<i>Malzeme/Cihaz Adı</i>	<i>Markası</i>	<i>Model/Kod numarası</i>
Laminar Akımlı Kabinet	ESCO	LP2-4S1
CO ₂ İnkübatörü	Thermo Scientific	311
Salınımlı Santrifüj	Eppendorf	5810R
Ters-Faz Işık Mikroskobu	Olympus	CKX40
Plak Okuyucu	BioTek	ELX800
Hassas terazi	Precisa	XB 220A
Floresans Mikroskop	Leica	-
Plak Okuyucu (fluorometre)	Thermo	N06354
Çalkalayıcı	Stuart	SSL3
pH metre	J.P Selecta	4120500
Etüv	Thermo Scientific	Heraeus
Otoklav	Hirayama	HICLAVE HV-50
Spinner	Labnet	C1301B-230V
37 ° C Çalkalayıcı	Stuart	SI500
Vorteks	Aldrich	IKA® MS1 shaker Z404047
Derin Dondurucu -20 °C	Vestel	FT 145
Derin Dondurucu -80 °C	Thermo Scientific	Forma Model 705
Buzdolabı	Vestel	RT 455
Direnç Ölçer	Endohm	
ELISA plak yıkayıcısı	BioTek	ELx50

3.6.2. Yöntemler

3.6.2.1. Hücre Kültürü

Deney modelimizde insan nöroblastoma SH-SY5Y (ATCC-CRL-2266), insan beyin mikro kapiller endotel hCMEC/D3 (CEDERLANE) ve insan astrosit (Cat no: 1800-1, Sciencecell) olmak üzere 3 adet hücre hattı kullanıldı. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattına özgü kültür şartları ve gereksinimler için ATCC referans olarak kullanıldı. Hücreler %10 Penisilin (100 U/ml) /Streptomisin (100 µg/ml), %10 inaktif fetal dana serumu (FBS) ve %1 L-Glutamin (2mM) içeren DMEM:F12 kültür ortamında 37°C’de 5%CO₂ ile inkübasyona bırakılarak çoğaltıldı. İnsan beyin mikro kapiller endotel hücre hattı hCMEC/D3 için hücrelerin ekimi

yapılmadan önce flasklar 150 µg/ml kollajen ile kaplandı. Hücreler, %1 Penicilin-Streptomisin, bFGF (200 ng/mL), EndoGRO™-MV Supplement Kit (EndoGRO-LS Supplement (% 0,2) rhEGF (5 ng/ml), L-Glutamine (10 mM), hidrokortizon hemisüksinat (1,0 µg/ml), heparin sülfat (0.75 U /ml), askorbik asit (50 µg/ml), FBS (% 5)) ve EndoGRO™ basal ortam içinde 37°C'de 5% CO₂ içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnsan astrosit hücreleri için ekimi yapılmadan önce flasklar 5 µg/cm² poli-L-lizin ile kaplandı. Hücreler, 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin, %10 oranında FBS ve %1 oranında astrosit hücresi büyüme faktörü (AGF) içeren özel ortam ile (AM) 37°C'de 5% CO₂ içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Tüm çalışmalar aseptik koşullar altında, sınıf II Laminar Flow içerisinde gerçekleştirildi. Tüm deneyler için gereken hücre miktarı 96 kuyulu, 25 cm², 75 cm²'lik kültür kaplarına gerekli olan sayılarda ekildi.

3.6.2.1.1. Hücrelerin Dondurulması ve Çözülmesi

hCMEC/D3 ve SH-SY5Y hücrelerinin içinde bulunduğu her bir flaskın içindeki eski ortam atıldı ve flasklar 1X PBS ile yıkandı. Flaska yeterli miktarda Tripsin/EDTA eklenip, hücreler kalkıncaya kadar (yaklaşık 1-2 dakika) 37°C'deki inkübatörde bekletildi. Hücrelerin flask yüzeyinden ayrıldığı mikroskop altında izlendikten sonra Tripsin EDTA'yı inhibe etmek amacıyla 1:1 oranında kültür ortamı eklendi ve hücreler steril bir falkon tüpe aktarıldı. Flaskın yüzeyi 1 XPBS ile tekrar yıkanarak toplanan hücreler aynı falkona ilave edildi. hCMEC/D3 2200 rpm'de 10 dakika, SH-SY5Y 1500 rpm'de 5 dakika 25°C'de santrifüj edilerek çöktürüldü. Bu aşamada hCMEC/D3 hücreleri için %95 FBS + %5 dimetil sülfoksitden (DMSO) oluşan dondurma ortamı ve SH-SY5Y hücreleri için %5 DMSO ve %95 (%20 FBS, % 2mM L-glutamin, %100 U/ml Penisin-100 µg/ml streptomisin içeren DMEM:F12 ortamı) hazırlandı. Hücre pelleti hazırlanan dondurma ortamında süspanse edildi. Dondurma tüplerine 1 ml (1x10⁶ hücre /mL) hücre süspansiyonundan konuldu ve -20 °C'de 1 saat bekletildikten sonra, hücreler kademeli olarak dondurulmalarını sağlayan kutuya (Mr. Frosty™ Waltham, MA USA) konularak -80 °C'de 1 gün bekletildikten sonra sıvı azot tankında saklandı. Astrosit hücreleri için ise bulundukları flaskların içindeki eski ortam atıldı ve flask 1XDPBS ile yıkandı ardından flask'a 1XDPBS eklenerek üzerine Tripsin/EDTA eklendi. Hücreler kalkıncaya kadar (yaklaşık 1-2 dakika) 37°C'deki inkübatörde inkübe edildi. Hücrelerin flask yüzeyinden ayrıldığı mikroskop altında izlendikten sonra Tripsin EDTA'yı inhibe etmek amacıyla tripsin nötralize edici ortam (TNS) eklendi. Steril bir falkon tüpe FBS eklenerek, hücreler bu falkona aktarıldı. Boş flask tekrar 1-2 dakika 37°C inkübatörde bekletilerek, yüzeyinde kalan hücrelerin

toplanması için 1 X DPBS ile yıkanarak hücreler aynı falkona toplandı. Hücreler 1000 rpm 'de 5 dakika, 25°C'de santrifüj edilerek çöktürüldü. Bu aşamada %90 FBS+ortam ve %10 DMSO'den oluşan dondurma ortamı hazırlandı. Hücre pelleti hazırlanan dondurma ortamında süspanse edildi ve dondurma tüplerine 1 ml ($\sim 5 \times 10^5$ hücre /mL) bu hücre süspanسیونundan konuldu. Hücreler -20°C'de 1 saat bekletildikten sonra, kademeli olarak dondurulmalarını sağlayan kutuya (Mr. Frosty Waltham, MA USA) konularak -80 °C'de 1 gün bekletildikten sonra sıvı azot tankında saklandı.

Hücrelerin çözündürülmesinde ise sıvı azot tankında veya -80°C'deki dondurucuda saklanan hücreler çıkarılarak 37°C'deki su banyosunda hızlı bir şekilde çözünmeleri sağlandı ve elde edilen hücre süspanسیونu 5 ml kültür ortamı içeren bir 15 ml lik tüplere aktarıldı. Hücre süspanسیونları hücrelere özgü protokollere uygun olarak çöktürüldü. Süpernatantlar uzaklaştırıldı ve pelletler uygun kültür ortamlarında süspanse edildi. Hücre sayımı yapılarak hücre canlılığının kontrol edilmesinin ardından hücre süspanسیونu 25 cm² 'lik flasklara ekildi [153][154][155].

3.6.2.1.2. Hücre Sayımı ve Canlılık Kontrolü

Hücre sayımı ve canlılığı % 0,5 'lik tripan Mavisi çözeltisi kullanılarak Neubauer lamında mikroskopik olarak değerlendirilmiştir. Prensibi, membran bütünlüğü bozulmuş hücrelerin içerisine tripan mavisi boyasının girmesi ve hücrenin mavi boyanmasına dayanmaktadır. Neubauer lamında bulunan 4 alan sayıldı (her bir alan için 16 kare) ve dört sayımın ortalaması alınarak hücre sayısı belirlendi. Elde edilen hücre sayısı aşağıdaki formül kullanılarak seyrelme faktörü ile birlikte mililitredeki hücre sayısı olarak ifade edildi.

$$\text{Hücre sayısı (hücre sayısı /ml)} = \text{Ortalama } 1\text{mm}^2 \text{ hücre sayısı} \times \text{seyreltme faktörü} \times 10^4$$

3.6.2.2. SH-SY5Y Hücrelerinde Farklı Ortamların Diferansiyasyona Etkisinin İncelenmesi

SH-SY5Y hücrelerine uygulanan farklı içerikli ortamların ve uygulama sürelerinin diferansiyasyona etkilerinin incelenmesi için aşağıdaki şekilde deney grupları oluşturuldu (Şekil 14).

Grup 1: Kontrol grubu; %1 FBS, %1 Penisilin/Streptomisin, %1 L-glutamin içeren DMEM:F12 kültür ortamının 10 gün boyunca uygulanması.

Grup 2: Retinoik asit (10 μ M) ve %1 FBS içeren DMEM:F12 kültür ortamının 5 gün boyunca uygulanması.

Grup 3: Retinoik asit (10 μ M) ve %1 FBS içeren DMEM:F12 kültür ortamının 10 gün boyunca uygulanması.

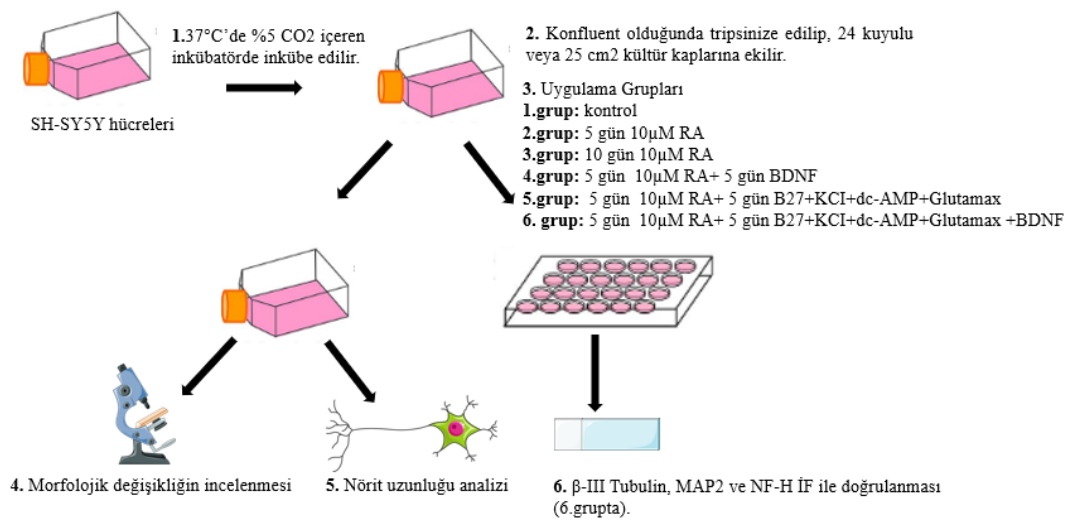
Grup 4: Retinoik asit (10 μ M) ve %1 FBS içeren DMEM:F12 kültür ortamının 5 gün uygulanmasının ardından 5 gün BDNF (50 ng/ml) içeren serumsuz DMEM:F12 ortamının uygulanması.

Grup 5: Retinoik asit (10 μ M) ve %1 FBS içeren DMEM:F12 ortamının 5 gün uygulanmasının ardından 5 gün KCI (20 mM), dc-AMP (2 mM), Glutamax (2 mM), B27 (1X), Neurobasal ortamından oluşan (mix medium) kültür ortamının uygulanması.

Grup 6: Retinoik asit (10 μ M) ve %1 FBS içeren DMEM:F12 kültür ortamının 5 gün uygulanmasının ardından 5 gün BDNF (50 ng/ml), KCI(20 mM), dc-AMP (2 mM), Glutamax (2 mM), B27 (1X), Neurobasal ortamından oluşan (mix medium) ortamının uygulanması.

3.6.2.3. Diferansiyasyonun Değerlendirilmesi

SH-SY5Y hücrelerinin diferansiyasyonun değerlendirilmesi için, morfolojik değişiklikleri, nörit uzunluğu ve nöron belirteçlerinin ekspresyonları incelendi (Şekil 14).



Şekil 14. Diferansiyasyon deney grupları ve diferansiyasyonun değerlendirilmesi.

3.6.2.3.1. Morfolojik Değişikliğin Işık Mikroskobu ile Değerlendirilmesi

Deney gruplarının inkübasyon süreleri sonunda ters-faz ışık mikroskobu ile morfolojik değişiklikleri incelendi (Olympus CKX40).

3.6.2.3.2. Nörit Uzunluğu Analizi

Her bir grubun uygulama sürelerinin sonunda ters-faz ışık mikroskobu ile altı farklı lokasyondan görüntüler alınarak, hücre başı (36 hücre) nörit uzunlukları ve sayıları Nöron J (Image J) bilgisayar programı ile hesaplandı ve gruplar arası farklıklar değerlendirildi [156].

3.6.2.3.3. İmmünofluoresan Analizi

Yöntem Prensibi: Fluoresan veren boyalı konjuge antikorlarla, spesifik antijenlerin (protein) birleşmesi ve fluoresan mikroskopta boyaya özgü renk aralığında oluşan fluoresan emisyonun şiddetine bağlı olarak incelenmesi esasına dayanmaktadır.

Uygulama: Diferansiyasyonun değerlendirilmesinde nöronal karakteri yansıtan ve diferansiyasyon ile artış gösteren belirteçler olan MAP2, β -III Tubulin ve NF-H proteinlerinin ekspresyonları immünofluoresan görüntüleme ile incelendi. 24 mm lameller 10 ug/ml Poli lizin D ile kaplandıktan sonra SH-SY5Y hücrelerinin ekimi yapılarak, 5 gün ve 10 gün boyunca farklı içerikleri olan ortam grupları ile diferansiyasyon gerçekleştirildi. Gerekli uygulama süreleri sonunda ortamlar uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkandı ve soğuk metanol ile oda sıcaklığında 30 dakika fikse edildi. Ardından hücreler PBS ile tekrar yıkandı ve PBS içinde hazırlanmış % 0,2 Triton-X-100 ile 5 dakika permeabilize olmaları sağlandı. %1 BSA ile 5 dakika bloklamanın ardından, 37 °C’de gece boyu MAP2 (abcam 1:5000), β -III Tubulin (santa cruz 1:50) ve NF-H abcam (1:500), primer antikor ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda dört kez PBS ile yıkamanın ardından, 20 dakika oda sıcaklığında sekonder antikorları ile inkübe edildi ve tekrar PBS ile yıkama yapıldı. Nükleus boyaması için % 50 gliserol, içeren PBS’de hazırlanmış Hoechst boyası ile hücreler 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Görüntüleme Leica DMIL fluoresans mikroskobunda gerçekleştirildi [157].

3.6.2.4. Diferansiye SH-SY5Y Hücrelerinin Stabilesinin Değerlendirilmesi

Diferansiye edilen SH-SY5Y hücrelerinin kaç gün nöron benzer özellik gösterdiğini belirlemek için morfolojik değişiklikleri ve nörit uzunlukları uygulama protokollerinin son günü 0. gün kabul edilerek 7., 10. ve 14. günlerde değerlendirildi.

3.6.2.5. $A\beta_{1-42}$ Plaklarının Hazırlanması

3.6.2.5.1. $A\beta_{1-42}$ Fibril ve Plakların Oluşturulması

$A\beta_{1-42}$ (Anaspec, Fremont, CA, USA) stok çözeltisi %1 amonyum hidroksit (NH_4OH) de çözündürülerek hazırlandı. 50 mM PBS (pH: 7,5) ile istenilen konsantrasyonlarda seyreltmeler gerçekleştirildi [158]. $A\beta_{1-42}$ 10 μM konsantrasyonunda etüv içinde, 37°C'de 0., 2., 4., 6., 24. ve 48., 72.h ve 96. saat inkübasyona bırakılarak en iyi fibril ve plak oluşumunu sağlayan süre belirlendi.

3.6.2.5.2. Tiyoflavin T Floresan Ölçümü

Yöntem Prensibi: Tiyoflavin T (ThT) $A\beta$ agregat/fibrillerin β -tabaka yapılarının hem *in vitro* hemde *in vivo* ortamda belirlenmesini sağlayan fluoeresan bir boyadır. ThT 'nin $A\beta$ 'nin β -tabakaları arasındaki tirozin ve fenilalanin amino asit kalıntıları ile etkileşime girerek etki ettiği düşünülmektedir [159] (Şekil 15). $A\beta_{1-42}$ 'nin β -tabaka agregasyon yapısı arttıkça ThT'nin fluoeresan emisyonunda artış görülmektedir.



Şekil 15. Tiyoflavin T (ThT) - $A\beta_{1-42}$ etki mekanizması.

Uygulama: Tiyoflavin T boyası distile su içinde çözündürülerek 10mM ana stok çözeltisi hazırlandı. $A\beta_{1-42}$ 'nin 0, 2, 4, 6, 24., 48., 72. ve 96. 37°C'de inkübasyon sonucunda, son reaksiyon ortamı 100 μl hacimde olacak şekilde 50 mM glisin-NAOH tamponu ve 50 μM ThT karışımı eklendi. ThT fluoeresans şiddeti 450 nm eksitasyon ve 482 nm emisyon dalga boylarında ölçüldü [160].

3.6.2.5.3. Alan Emisyon Taramalı Elektron Mikroskopi Görüntüleme (FESEM)

Yöntemin Prensibi: Alan emisyon taramalı elektron mikroskopisinde (FESEM), elektron kaynağından koparılan elektronlar vakum altında lensler aracılığıyla numune üzerine düşürülür. Ardından numune yüzeyinde bulunan atomlarla elektron demetinin etkileşmesi sonucunda ortaya çıkan farklı tipte elektronlar detektör tarafından detekte edilir ve numune yüzeyinin bir görüntüsü oluşturularak monitöre yansıtılır [161].

Uygulama: A β ₁₋₄₂'nin 37°C 'de 4., 24., 48., 72. ve 96. saat inkübasyon sonucunda A β ₁₋₄₂ fibril ve plak oluşum düzeyleri FESEM ile görüntülendi. A β ₁₋₄₂ konsantrasyonu (10 μ M) örnekten 2 μ l alınarak 100 mesh formvar karbon kaplı elektron mikroskopi grid üzerine damlatıldı. Bir dakika sonra örnek filtre kağıdı ile kurutuldu ve distile su ile yıkandı. % 2 uranil asetat içeren kontras boyadan 8 μ l grid üzerine eklendi, örneğin aşırı kısmı filtre kağıdı ile uzaklaştırıldı ve 20 dakika kurumaya bırakıldı. Ardından grid numune tutucuya yüklendi ve Zeiss Sigma 500 marka FESEM cihazıyla görüntülendi [78].

3.6.2.5.4. Agrege A β ELISA Testi

Yöntemin Prensibi: Enzim spesifik substrat ve enzim bağlı konjugat kullanılarak, antijen-antikor reaksiyonlarının renk değişimi elde edilmesi ve bunun kantitatif olarak gösterilmesine dayanmaktadır. Agrege A β kiti, katı fazlı sandviç ELISA prensibine dayanmaktadır. Mikroplak kuyuları insan A β 'nın N-terminaline spesifik bir monoklonal antikor ile kaplanmıştır [162].

Uygulama: Kit prosedürüne göre yapılan uygulama basamakları Şekil 16'da şematize edilmiştir. Çalışma için öncelikle standartlar hazırlandı. Liyofilize standart üzerine 1000 μ l standart dilüsyon tamponu ile çözülerek 5,7 ng/ml'lik stok solüsyon hazırlandı. Standartın iyice çözünmesi için 10 dakika beklendi. 250 μ L alınarak, daha önceden içerisine 250 μ L standart dilüsyon tamponu konmuş 6 eppendorf tüpte 1:2 seri dilüsyonlar yapıldı. Böylece 7 farklı konsantrasyonda standart oluşturuldu (2,9; 1,4; 0,7; 0,36; 0,18; 0,09; ng/mL). Örnekler PBS ile önce 1:500 oranında, ardından dilüsyon tamponu ile 1:2 oranında dilediği şekilde kullanıldı. Hazırlanan 7 farklı konsantrasyonda standart, blank (dilüsyon tamponu kullanıldı) ve dilüe edilmiş örneklerden 100'er μ L kuyucuklara kondu ve 2 saat boyunca oda ısısında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda plak 4 kez 350'er μ L yıkama tamponu ile yıkandı. Kuyulara 100 μ L agrege A β 'ya özgü biyotinlenmiş antikor eklendi ve 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe

edildi. İnkübasyon sonunda plak 4 kez 350'er µL yıkama tamponu ile yıkandı. Ardından kuyulara 100 µL Streptavidin-HRP konjugat eklendi ve 30 dakika boyunca oda ısısında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda plak 4 kez 350'er µL yıkama tamponu ile yıkandı. Kuyulara 100 µL kromogen eklenerek 30 dakika boyunca oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüm kuyulara 1000 µL sonlandırma solüsyonu eklenerek, 15 dakika içinde 450 nm ELISA plak okuyucuda absorbans ölçüldü

3.6.2.6. Diferansiye SH-SY5Y Hücrelerinde Aβ₁₋₄₂ Plaklarının Toksisitesinin Belirlenmesi

37°C'de 24 saat agreste edilen 10 µM ve 20 µM konsantrasyonundaki Aβ₁₋₄₂ plaklarının toksisitesi 24/ 48 /72 saatleri için WST-1 ve LDH analizleri ile değerlendirildi.

3.6.2.6.1. WST-1 Analizi

Yöntem Prensipleri: Hücresel enzimler tetrazolyum tuzlarını formazana dönüştürürler. WST-1 (4-(3-(4-iyodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolyum-1,3-benzen disülfonat), suda çözünür formazan boyalarını içermektedir. Oluşan formazanlar farklı absorpsiyon yapma yeteneğindedir. Canlı hücre sayısındaki artış, mitokondriyal dehidrogenazların aktivitesindeki artışıyla sonuçlanır ve böylelikle formazan oluşumu arttırmış olur (Şekil 16). Oluşan artış metabolik olarak aktif hücre sayısı ile doğru orantılıdır. Oluşan renkli çözelti spektrofotometrik olarak 450 nm – referans 630 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda ölçülür [163][164].



Şekil 16. WST-1 reaktifinin formazan yapısına dönüşümünün gösterimi [165].

Uygulama: Diferansiye edilmiş SH-SY5Y hücrelerinin üzerindeki eski ortam uzaklaştırılarak uygun besi ortamında hazırlanmış A β ₁₋₄₂ son hacim 100 μ L olacak şekilde 10 μ M ve 20 μ M konsantrasyonunda eklendi. Hücreler 24, 48 ve 72 saat 37°C'deki % 5 CO₂ bulunan inkübatörde inkübe edildi. WST-1 kitinin protokolüne göre reaktifinden her bir kuyucuğa 10 μ l eklendi. Hücreler 37°C'de 3 saat inkübasyona bırakıldı. Karıştırıcıda 1 dakika karıştırıldıktan sonra plak okuyucu ile 450 nm de (referans dalga boyu: 630 nm) ölçüm alındı. Elde edilen absorbans değerleri ile aşağıdaki formül kullanılarak hücrelerin canlılık yüzdeleri belirlendi.

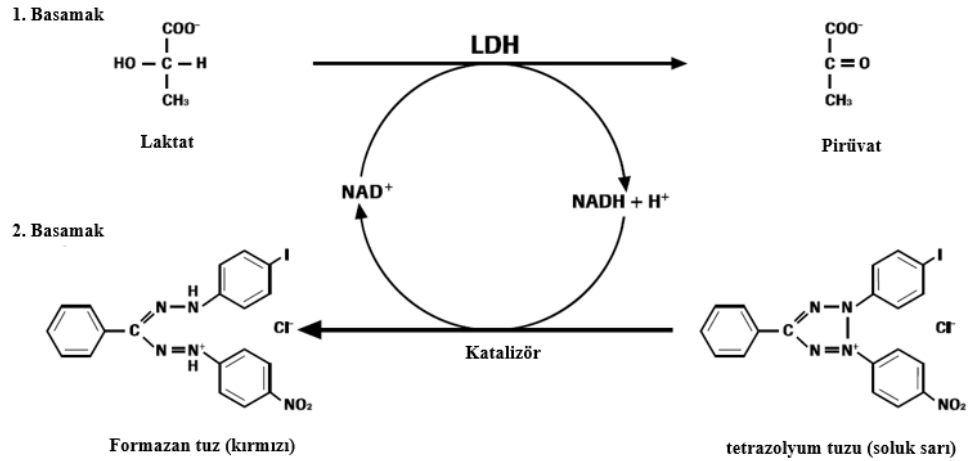
$$\% \text{ Canlılık} : (\text{Ort Örnek Abs}-\text{Kör Abs}/ (\text{Ort Kontrol Abs}- \text{Ort Kör Abs})) \times 100.$$

3.6.2.6.2. Laktat Dehidrojenaz Salınımının Belirlenmesi

Yöntem Prensibi: Hücre canlılığının değerlendirilmesi için diğer bir yöntem laktat dehidrojenaz (LDH) aktivitesinin belirlenmesidir. LDH sitoplazmik bir enzimdir ve hücreler toksik etkiye maruz kaldıklarında plazma membran bütünlüğünün bozulması ile ortama sızar. Ortamdaki enzim aktivitesinin ölçümü iki basamaklı bir reaksiyona dayanmaktadır. Birinci basamakta, Laktatın LDH enzimi ile piruvata dönüştürülmesi sırasında, NAD⁺/NADH/H⁺a indirgenmektedir. İkinci basamakda da indirgenmiş olan NADH/H⁺'ın bir katalizör (diaphorase) ile soluk sarı renkli tetrazolium tuzuna transfer edilmesi ve kırmızı renkli formazan ürünü oluşmasına dayanmaktadır (Şekil 17). Oluşan kırmızı renkli ürün kolorimetrik olarak 492 nm dalga boyunda ölçülmektedir.

Uygulama: Süpernatantın elde edilmesi için öncelikle 96 kuyulu plaklar 1250 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Örnekler 1:10 oranında seyreltilerek, toplam 100 μ L örneğin üzerine 100 μ L çalışma solüsyonu eklendi. Oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 30 dakika inkübe edildikten sonra 50 μ L 1 N HCl (sonlandırma solüsyonu) eklenerek reaksiyon sonlandırıldı. Örneklerin absorbansları 492 nm'de okutuldu. Aşağıdaki denklem kullanılarak % sitotoksosite değerleri hesaplandı [166]. Kontrol I grubu; herhangi bir işlem uygulanmamış diferansiye SH-SY5Y hücreleri, Kontrol II grubu; TritonX-100 uygulanmış diferansiye SH-SY5Y hücreleridir.

$$\% \text{ Sitotoksosite} : (\text{Ort Örnek Abs} - \text{Ort Kontrol I Abs})/ (\text{Ort Kontrol II Abs}- \text{Ort Kontrol I Abs})) \times 100.$$



Şekil 17. LDH yönteminin iki basamaklı enzimatik reaksiyonu [166].

3.6.2.7. Polifenollerin Diferansiye SH-SY5Y Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

3.6.2.7.1. Polifenollerin Hazırlanması

Literatür araştırmalarımız sonucunda elde edilen bilgiler doğrultusunda araştırmamız için seçilen polifenoller (EGCG, Punicalagin, Gastrodin ve Elagic asid) uygun ortam ve çözündürme protokollerine göre hazırlandı. Stabilite ve yarı ömür süresini arttırabilmek amacıyla EGCG 5 Ünite/ml süperoksit dismutaz (SOD) ile muamele edilerek stok çözeltiler hazırlandı [167]. Punicalagin ve Gastrodin polifenollerini üretici firmanın talimatları temel alınarak DMSO 'da Ellagic asid ise 1 N NaOH'da çözündürülerek stok çözeltileri hazırlandı ve kültür ortamı ile istenilen konsantrasyonlardaki seyreltmeleri gerçekleştirildi.

3.6.2.7.2. WST-1 Analizi

Her bir polifenolün diferansiye SH-SY5Y hücrelerinde toksik olmayan dozlarının belirlenmesi için WST-1 hücre canlılık analizleri 3.6.2.5.1 de belirtilen basamaklara uygun olarak gerçekleştirildi.

3.6.2.7.3. Laktat Dehidrojenaz Salınımının Belirlenmesi

WST-1 analizi sonucunda %80-90 oranında canlılık sağlayan polifenol dozlarının diferansiye SH-SY5Y hücrelerinde toksik etkileri LDH hücre canlılık analizleri ile değerlendirildi. Yöntem, 3.6.2.5.2 de belirtilen basamaklara uygun olarak gerçekleştirildi.

3.6.2.8. Polifenol ve $A\beta_{1-42}$ Birlikte Uygulamasının Diferansiye SH-SY5Y Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

Polifenollerin diferansiye SH-SY5Y hücrelerine uygulanması sonrası %80-90 canlılık sağlayan dozları 10 μ M $A\beta_{1-42}$ ile birlikte diferansiye SH-SY5Y hücrelerine uygulanarak 24, 36 ve 48 saat hücre canlılık analizleri 3.6.2.5.1 de belirtilen basamaklara uygun olarak gerçekleştirildi.

3.6.2.9. Polifenollerin $A\beta_{1-42}$ Plaklarını Çözündürme Etkinliklerinin İncelenmesi

Polifenollerin $A\beta_{1-42}$ plaklarını çözündürme etkinlikler Tiyoflavin T, FESEM görüntüleme ve ELISA testleri ile değerlendirildi.

3.6.2.9.1. Tiyoflavin T Floresan Ölçümü

Polifenollerin $A\beta_{1-42}$ plaklarını çözündürme etkinlikleri zamana bağlı olarak (12, 24, 36 ve 48 saat) ThT analizi ile 3.6.2.5.2' de belirtilen basamaklara uygun olarak gerçekleştirildi.

3.6.2.9.2. FESEM Görüntüleme

Polifenollerin ThT analizlerine göre $A\beta_{1-42}$ plaklarını çözündürme etkinliklerinin en yüksek olduğu zaman dilimlerinin FESEM görüntüleri 3.6.2.5.3'de belirtilen basamaklara uygun olarak gerçekleştirildi ve polifenollerin $A\beta_{1-42}$ plaklarını çözündürme etkinliği görsel olarak incelendi.

3.6.2.9.3. ELISA Testleri

ThT sonuçlarına göre $A\beta_{1-42}$ plaklarını çözündürme etkinliği olan zaman dilimlerinde, polifenollerin agrege $A\beta$ düzeylerini azaltma etkisi 3.6.2.5.4'de belirtilen basamaklara uygun olarak ELISA testi ile incelendi.

3.6.2.10. Polifenol Kombinasyonları ve $A\beta_{1-42}$ Birlikte Uygulamasının Diferansiye SH-SY5Y Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Uygulanan tüm polifenoller ile ikili kombinasyonlar oluşturularak, toplam altı kombinasyon oluşturuldu. Kombinasyonların ve $A\beta_{1-42}$ plaklarının birlikte diferansiye SH-SY5Y hücrelerine uygulanması ile hücre canlılığına etkisi 3.6.2.6.1'de belirtilen basamaklara uygun olarak WST-1 testi ile değerlendirildi.

3.6.2.11. Polifenol Kombinasyonlarının $A\beta_{1-42}$ Plaklarını Çözündürme Etkinliklerinin İncelenmesi

Polifenol kombinasyon ve $A\beta_{1-42}$ plaklarının diferansiye SH-SY5Y hücrelere uygulanmasının ardından %50 toksisite altına düşmeyen zaman dilimleri seçilerek, kombinasyonların $A\beta_{1-42}$ plak çözündürme etkinlikleri incelendi.

3.6.2.11.1. Tiyoflavin T Floresan Ölçümü

Polifenol kombinasyonlarının $A\beta_{1-42}$ plaklarını çözündürme etkinlikleri zamana bağlı olarak (12, 24 saat) ThT analizi ile 3.6.2.5.2’de belirtilen basamaklara uygun olarak değerlendirildi.

3.6.2.11.2. FESEM Görüntüleme

$A\beta_{1-42}$ plaklarını en iyi çözüdüren iki adet polifenol kombinasyonu ThT verilerine göre seçilerek, bundan sonraki iş paketleri için kullanılmasına karar verildi. Seçilen iki adet polifenol kombinasyonunun da FESEM görüntülemesi 3.6.2.5.3’de belirtilen basamaklara uygun olarak yapıldı.

3.6.2.11.3. Agreg $A\beta_{1-42}$ ELISA Testleri

Seçilen $A\beta_{1-42}$ plaklarını en iyi çözüdüren iki adet polifenol kombinasyonunun agreg $A\beta$ çözündürme etkinliği 3.6.2.5.4’de belirtilen basamaklara uygun olarak ELISA analizi ile doğrulandı.

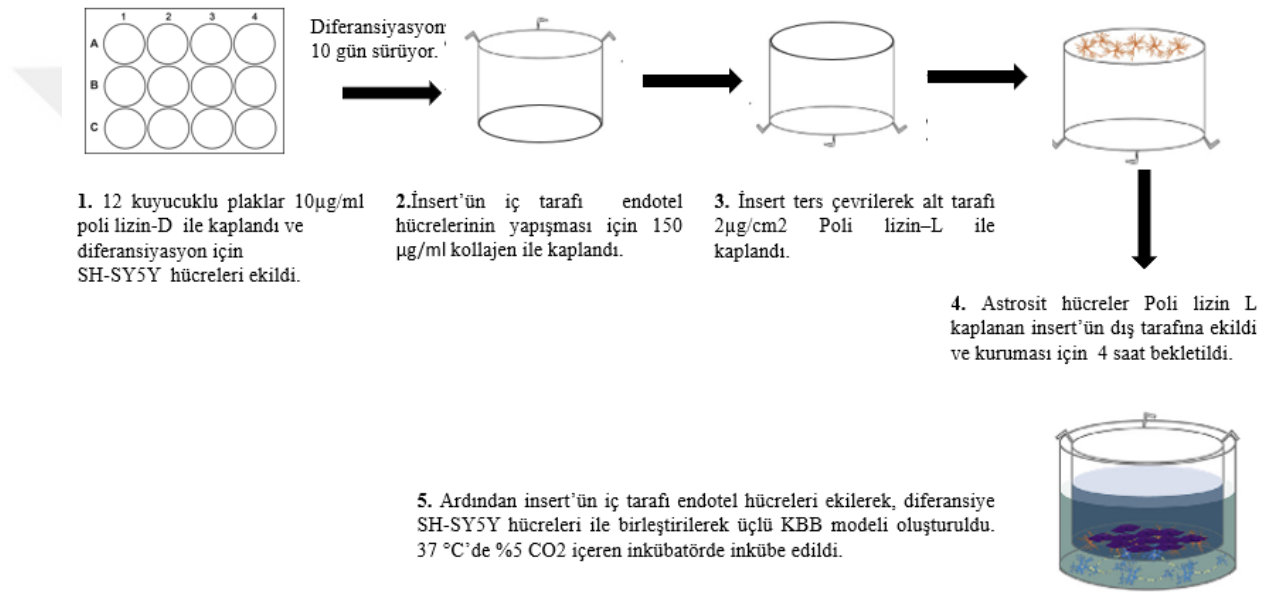
3.6.2.12. İn Vitro KBB Modelinin Oluşturulması

İkili ve üçlü kan beyin bariyer modellerinin oluşturulması için 12 kuyucuklu plaklar ve insertler (0,4 μ m) kullanıldı. Öncelikle hücreler 10 gün boyunca 3.6.2.2’de belirtilen basamaklara uygun olarak diferansiyon uygulamasına tabi tutuldu. Hücreler diferansiyasyonlarının ardından B27 (1X) ve glutamaxI (%1), P/S (%1) içeren DMEM:F12 ortamı içerisinde muhafaza edildi.

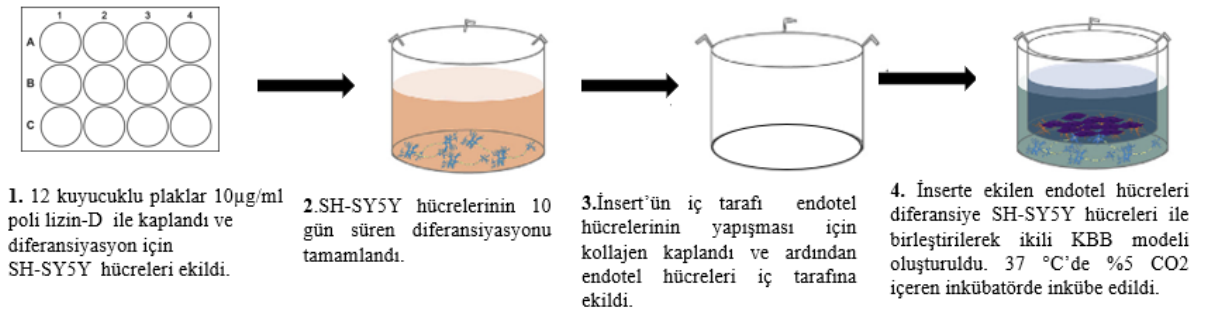
Üçlü KBB kültür modeli için, 0,4 μ M por çaplı insertlerin iç yüzeyi 150 μ g/ml kollajen ile kaplandı ve 3 saat kuruması beklendi. Kurumasının ardından ters çevrilerek dış yüzeyi polilizin L ile kaplandı. İç ve dış tarafı kaplı insert’ün dış kısmına 35,000 hücre insan astrosit hücreleri ekildi. Insertler hücrelerin yüzeye tutunması için 4 saat 37° C’de CO₂ inkübasyona bırakıldı. Ardından insert’ün iç kısmına 40,000 hCMEC/D3 insan beyin mikropiller endotel hücreleri ekilerek 37° C’de CO₂ inkübasyona bırakıldı (Şekil 18). Astrosit ve endotel hücreleri

ekilmiş olan insertler diferansiye SH-SY5Y hücrelerinin bulunduğu 12 kuyulu plaklara yerleştirilerek üçlü KBB modeli oluşturuldu.

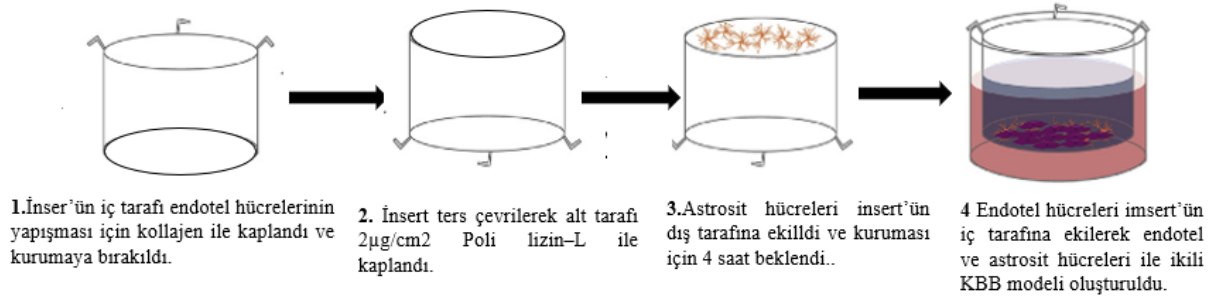
İkili kültür modeli için iki farklı hücre kombinasyonu denendi (endotel-diferansiye SH-SY5Y ve endotel-astrosit) (Şekil 19 ve Şekil 20). Endotel-diferansiye SH-SY5Y hücreleri modelinde insertlerin iç yüzeyi 150 µg/L kollajen ile 12 kuyucuklu plakların tabanı 10 µg/ml poli lizin D ile kaplandı. Diğer ikili kültür modelinde kullanılan endotel-astrosit hücreleri için insert'ün iç yüzeyi 150 µg/L kollajen kaplanır kurumaya bırakılır. Kuruyan insertler ters çevrilir ve insert'ün dış yüzeyi 2 µg/cm² poli lizin L ile kaplandı.



Şekil 18. Üçlü KBB modelinin oluşturulması ([168]'den modifiye edilmiştir).



Şekil 19. İkili KBB modelinin (Endotel ve Diferansiye SH-SY5Y) oluşturulması ([168]'den modifiye edilmiştir).



Şekil 20. İkili kan beyin bariyer modelinin (Endotel ve astrosit) oluşturulması ([168]'den modifiye edilmiştir).

3.6.2.12.1. *İn vitro* KBB Modelinin Doğrulanması

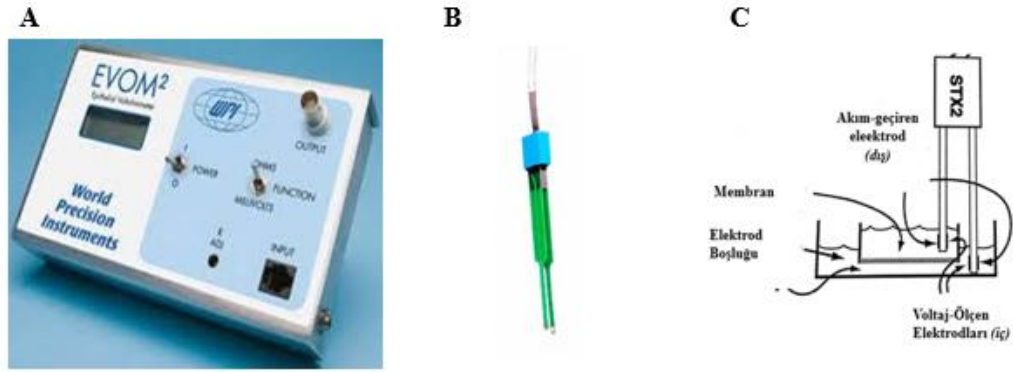
İn vitro KBB modelleri transepitelyal/transendotelyal elektrik direncinin, TEER'in ölçülmesi ile değerlendirildi. En yüksek TEER değerine sahip model seçilerek, bu modelin membran geçirgenlik analizleri yapıldı.

3.6.2.12.1.1. Transepitelyal/Transendotelyal Elektrik Direncinin (TEER) Ölçümü

Yöntemin prensibi: *İn vitro* KBB modellerinde insertlerin üst ve alt bölümleri arasındaki iyon akışının difüzyonuna bağlı olarak birim alandaki direncin Ohm cinsinden ($\Omega \cdot \text{cm}^2$) ölçülmesi prensibine dayanmaktadır [151].

Uygulama: TEER ölçümü EVOM 2 (World Precision Instrument, Sarasota, FL, USA) direnç ölçer ve STX2 elektrotlar (World Precision Instrument, Sarasota, FL, USA) kullanılarak yapıldı. Hücre ekilmemiş olan kollajen, poli lizin-L ve poli lizin-D kaplı insertler bazal değer veya kör olarak kullanıldı. Elde edilen değerler insert yüzey alanıyla ($1,13 \text{ cm}^2$) normalize edilerek aşağıdaki formül ile $\Omega \cdot \text{cm}^2$ olarak belirlendi. TEER ölçümleri model oluşturulduktan sonra 2., 4., 6. ve 8. günlerde alınarak değerlendirildi. Her TEER ölçümü sonrası ortamlar değiştirildi.

$$\text{TEER: [Toplam R } (\Omega) - \text{Kör R}(\Omega)] \times 1,13 \text{ cm}^2.$$



Şekil 21. A) EVOM2 direnç ölçer B) STX2 elektrodu C) insertte uygulama şeklinin gösterimi.

3.6.2.12.1.2. Transendotelyal Geçirgenlik Katsayısının Belirlenmesi

Yöntemin Prensibi: *In vitro* KBB modelinin doğrulanmasında ve/veya *in vivo* KBB benzerliğinde en önemli özellik bariyerin geçirgenliğinin sınırlı/düşük olmasıdır. Sodyum fluoresein (NA-F, MW:376 Da), transendotelyal geçirgenlik katsayısı (Pe) ve bariyer sıklığını değerlendirme için kullanılan bir kimyasallar belirteçtir [152]. Yöntemin prensibi, endotel hücrelerinin bulunduğu üst tarafa NaF çözeltisinin eklenmesi sonrası farklı zaman dilimlerinde hem üst hem alt bölmeden alınan örneklerdeki NaF'e bağlı fluoresan yoğunluğunun ölçülmesine dayanmaktadır.

Uygulama: Üçlü KBB modelinin oluşturulmasının ardından 4., 6., 8 ve 10.günlerde floresan yoğunluğunun ölçüldü. İlk olarak insert'ün içindeki ve kuyulardaki ortamlar uzaklaştırıldı. 12 kuyulu plak içine 37 °C'de ısıtılmış 1500 µl Ringer Hepes Tamponu (150 mM NaCl, 2,2 mM CaCl₂, 0,2 mM MgCl₂, 5,2 mM KCl, 2,8 mM glucose, 5 mM HEPES, 6 mM NaHCO₃ pH:7,4 hazırlanıp + 4°C'de muhafaza edildi) eklendi. 500 µl 10 µg/ml Na-F içeren Ringer-Hepes Tamponu insert içine eklendi ve her iki taraftan 0. dakika, 24., 48. ve 72. saatlerde örnekler alındı (Her bir zaman dilimi için ayrı insert ekimi yapıldı) [169]. Hücresiz olan kollajen, poli lizin-L ve poli lizin-D kaplı insertler kontrol grubu olarak kullanıldı. Sodyum fluoresein konsantrasyonu spektrofloreometrede (Eksitasyon: 485 nm ve Emisyon: 530 nm) değerlendirildi. Transendotelyal geçirgenlik katsayısı (Pe) hesaplaması yapıldı [169][170].

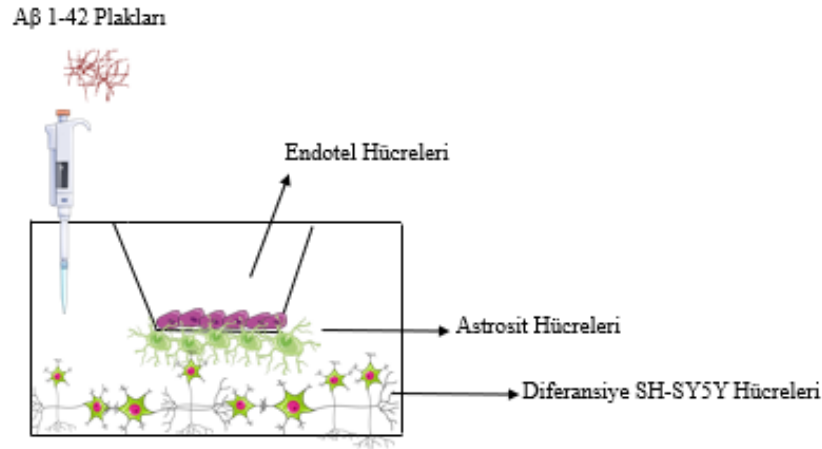
$$\text{Temizlenen Hacim } (\mu\text{l}) = \frac{(C_{\text{üst}} \times V_{\text{üst}})}{C_{\text{alt}}}$$

Deney boyunca temizlenen hacminin zamanla doğrusal olarak artmaktadır. Temizlenen hacme karşı zaman grafiği oluşturularak eğim bulundu. Temizlenen hacim grafiğinin eğimi, PS_{total} insertteki hücrelerin, PS_{insert} kollajen+ Poli lizin L+ Poli lizin D kaplı boş insert'ün eğim değerleri hesaplanarak bulundu. Psendotelyal yüzey alanına bölünerek, endotelial geçirgenlik katsayısı bulundu ($1,13 \text{ cm}^2$ for Transwell-12).

$$\frac{1}{PS_{endotelyal}} = \frac{1}{PS_{total}} - \frac{1}{PS_{insert}}$$

3.6.2.13. Üçlü Kültür Kan Beyin Bariyeri İle Alzheimer Modeli

3.6.2.12 'de açıklandığı şekilde üçlü kültür ile KBB modeli oluşturuldu. Öncelikle $10 \mu\text{M}$ $A\beta_{1-42}$, 24 saat 37°C 'de inkübe edilerek plak oluşumu sağlandı ve üçlü KBB modelinin 4. gününde diferansiye SH-SY5Y hücrelerinin üzerine uygulandı. Uygulama sonrası 48. saatte (KBB modelinin 6. günü) TEER ölçümü alındı (Şekil 22).



Şekil 22. Üçlü kültür kan beyin bariyerinde Alzheimer modeli.

3.6.2.14. Üçlü Kültür Kan Beyin Bariyerine Polifenollerin Uygulanması

3.6.2.14.1. Polifenol ve Polifenol Kombinasyonlarının Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

Üçlü kültür kullanılarak oluşturulan KBB modeline polifenol uygulamalarının yapılması için öncelikle bu polifenollerin endotel ve astrosit hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri değerlendirildi.

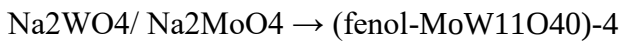
Uygulama: Endotel hücreleri 10,000 hücre/100 µL olacak şekilde önceden 150 µg/ml kollajen ile kaplanmış 96 kuyulu plaklara ekildi. Ertesi gün kuyuların üzerindeki ortam uzaklaştırılarak uygun kültür ortamlarında hazırlanmış polifenollerin düşük ve yüksek konsantrasyonları Vson: 100 µL olacak şekilde hücrelere uygulandı (EGCG 10 µM ve 25 µM, Punicalagin 15 µM ve 30 µM, Ellagic asid 20 µM ve 40 µM, Gastrodin 50 µM ve 100 µM, Kom 1: EGCG: 10 µM+ PU: 15 µM ve Kom 2: EGCG: 10 µM+EA: 20 µM). Hücreler 24 saat 37°C'deki % 5 CO₂ bulunan inkübatörde inkübasyona bırakıldıktan sonra WST-1 testi ile endotel hücrelerinin canlılık analizi yapıldı. Toksisite oluşturmayan % 80-90 oranında canlılık sağlayan polifenol dozları deneyler için seçildi. Ayrıca bu dozlardaki polfenollerin KBB'inden geçişi Folin Ciocalteu (FC) analizi ile değerlendirildi.

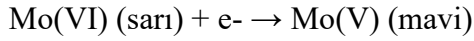
Uygulama: Astrosit hücreleri 7000 hücre/100 µL olacak şekilde önceden poli lizin L ile kaplanmış 96 kuyulu plaklara ekildi ve 24 saat sonra astrosit hücreleri diferansiye SH-SY5Y hücreleri için kullanılan ortamın içerisine alındı ve 24 saat inkübe edildi. Inkübasyon süresi sonunda polifenollerin düşük ve yüksek konsantrasyonları Vson: 100 µL olacak şekilde hücrelere uygulandı (EGCG 10 µM ve 25 µM, Punicalagin 15 µM ve 30 µM, Ellagic asid 20 µM ve 40 µM, Gastrodin 50 µM ve 100 µM, Kom 1: EGCG: 10 µM+ 15 µM ve Kom 2: EGCG: 10 µM+EA: 20 µM). Hücreler 24 saat 37°C'deki % 5 CO₂ bulunan inkübatörde inkübasyona bırakıldıktan sonra WST-1 testi ile endotel hücrelerinin canlılık analizi yapıldı. Toksisite oluşturmayan % 80-90 oranında canlılık sağlayan polifenol dozları deneyler için seçildi. Ayrıca bu dozlardaki polfenollerin KBB'inden geçişi FC analizi ile değerlendirildi.

3.6.2.15. Polifenollerin KBB Modelinden Geçişinin Değerlendirmesi

Polifenollerin KBB modelinden geçişini değerlendirmek için Folin Ciocalteu (FC) yöntemi kullanıldı.

Yöntemin Prensipleri: Alkali ortamda fenolik bileşiklerin FC reaktifini indirgeyerek, kendilerinin oksitlenmiş formuna dönüştüğü bir redoks reaksiyonuna dayanmaktadır. Bu yöntem fenol tayininde sıklıkla kullanılan Singleton ve Rossi (1965) tarafından önerilen FC yönteminden yararlanılarak yapılmıştır [171]. FC reaktifi fosfomolibdik ve fosfotungstik asitlerin bir karışım reaktifi olup, fenolik ve polifenolik antioksidanların kolorimetrik tayininde kullanılmaktadır. Aktif merkezi Mo(VI) dır.



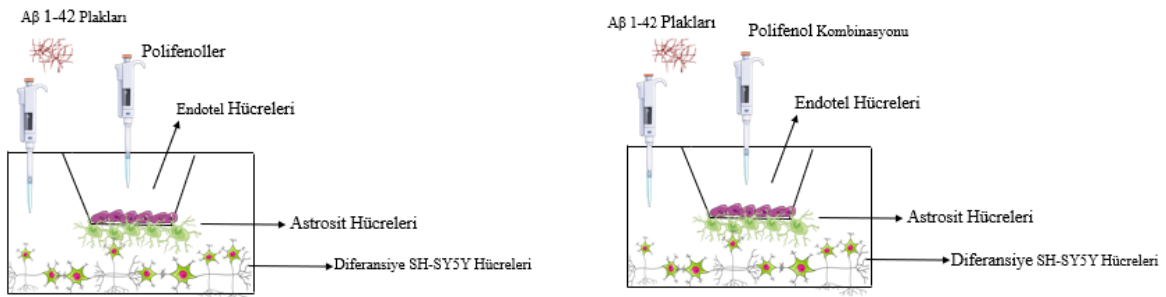


Bu metod basit ve tekrarlanabilir metod olduğundan fenolik antioksidan ve total fenolik bileşik çalışmalarında kullanılmaktadır [172].

Uygulama: Öncelikle fenolik bileşik değerinin belirlenmesinde bir fenolik yapı olan ve standart olarak kullanılan gallik asit'in 5-100 µg/ml arası değişen konsantrasyonda standartları hazırlandı. Folin-Ciocalteu yönteminde analiz için % 7,5 Sodyum karbonat (Na₂CO₃) çözeltisi hazırlandı ve 2 N Folin ciocalteu raktifi ile 1:10 oranında dilüe edildi. 96 kuyulu plaklara standartlar ve örnekler 20 µl olacak şekilde pipetlendi ve her bir kuyuya 100 µl FC reaktifi ile karıştırılarak plak oda sıcaklığında 5 dk. bekletildi. Süre sonunda, % 7,5 Na₂CO₃ reaktifinden her bir kuyuya 80 µl eklenerek, oda sıcaklığında karanlıkta 1 saat inkübasyona bırakıldı. Ardından mavi renk oluşumu plak okuyucuda kolorimetrik olarak ile 760 nm'de değerlendirildi. Elde edilen absorbans verilerine karşılık gelen gallik asit standart konsantrasyonları arasında bir standart grafiği çizildi. Örneklerin toplam fenolik bileşik içeriği gallik asit standart grafiğinden yararlanılarak gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak verildi.

3.6.2.16. Alzheimer KBB Modeline Polifenol/Polifenol Kombinasyonlarının Uygulanması

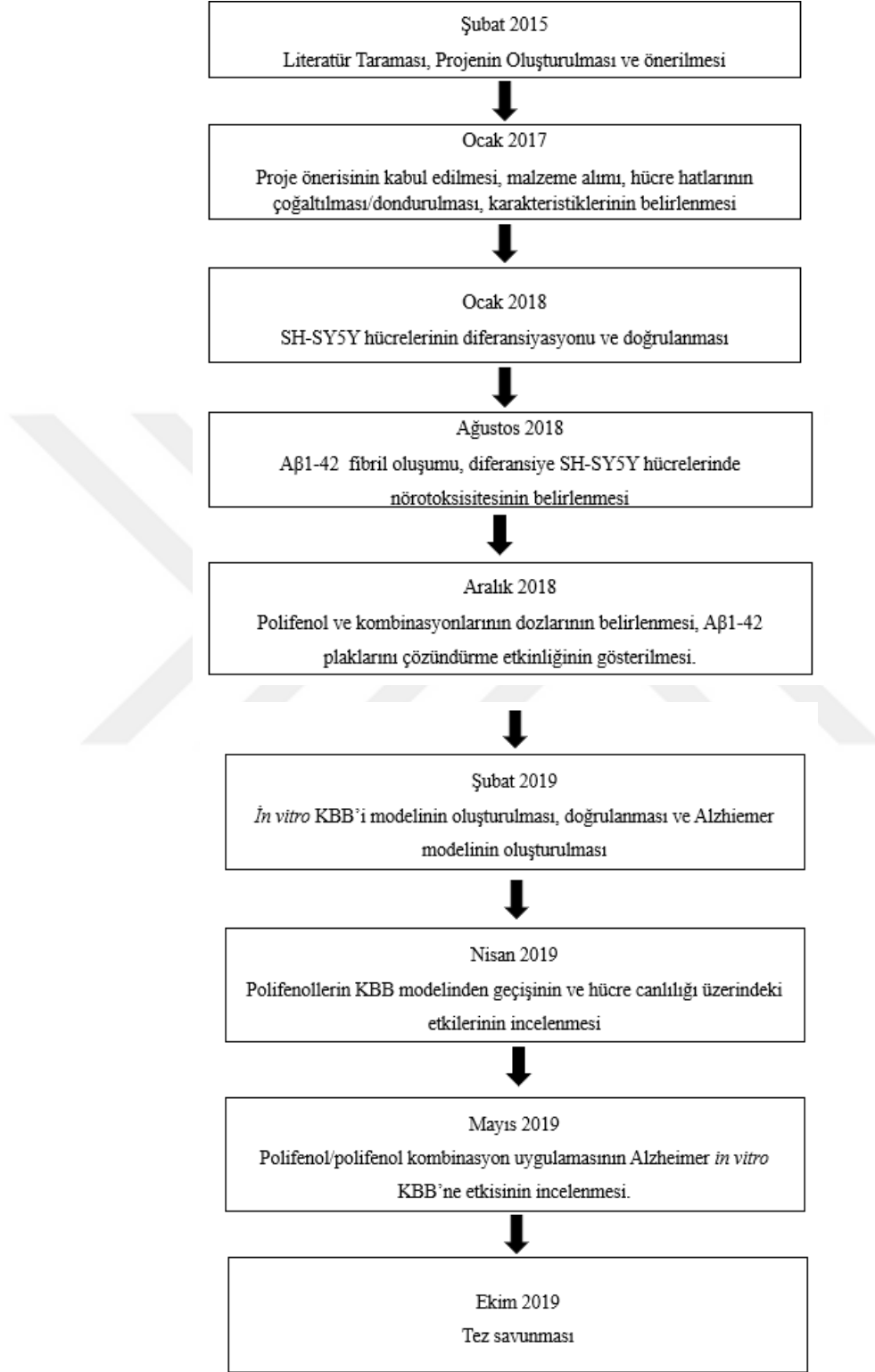
Üçlü kültür KBB modelinin 4. gününde Aβ₁₋₄₂ plakları, tekli olarak polifenoller veya polifenol kombinasyonları modele uygulanarak KBB'inin fonksiyonelliği TEER'inin ve çözünen agrege Aβ miktarının belirlenmesi ile değerlendirildi (Şekil 23).



Şekil 23. Alzheimer üçlü kan beyin bariyer modeline polifenol/polifenol kombinasyonlarının uygulanması.

3.7.Araştırma Planı ve Takvimi

Araştırmanın planı ve takvimine ait akış grafiği Şekil 24’de gösterilmiştir.



Şekil 24. Deney akış şeması.

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Elde edilen veriler, Graphad Prism 8.0 (San Diego, CA, ABD) programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. Tüm çalışmalar 3 kez en az 3'er kere tekrar edilerek çalışıldı. Gruplar arasındaki anlamlı farklılık studen t test ve one way ANOVA ile analiz edildi. Tüm testlerde anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak ifade edildi. Değerler ortalama $\pm$ hata olarak gösterilmiştir.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

1. Diferansiye SH-SY5Y hücrelerinin diferansiyasyon belirteçlerinin gen ekspresyon düzeyleri ile değerlendirilememesi.
2. Polifenol bileşiklerinin kan beyin bariyer modelinden geçişlerinin HPLC, LCMS gibi daha duyarlı yöntemler ile doğrulanamaması.
3. Çalışmanın *in vivo* çalışma ile desteklenememesi.

3.10. Etik Kurul Onayı

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik kurulu, 21.04.2016 tarih ve 2016/11-20 karar numarası ile 2652-GOA protokol numarası çalışmamızın etik açıdan sakıncalı olmadığına karar verilmiştir. Ardından 19.07.2018 tarihli ve 2018/10-33 karar numarası ile aynı protokol numaralı çalışmamızın proje adı değişikliği aynı etik kurul heyeti tarafından kabul edilmiştir (EK-1).

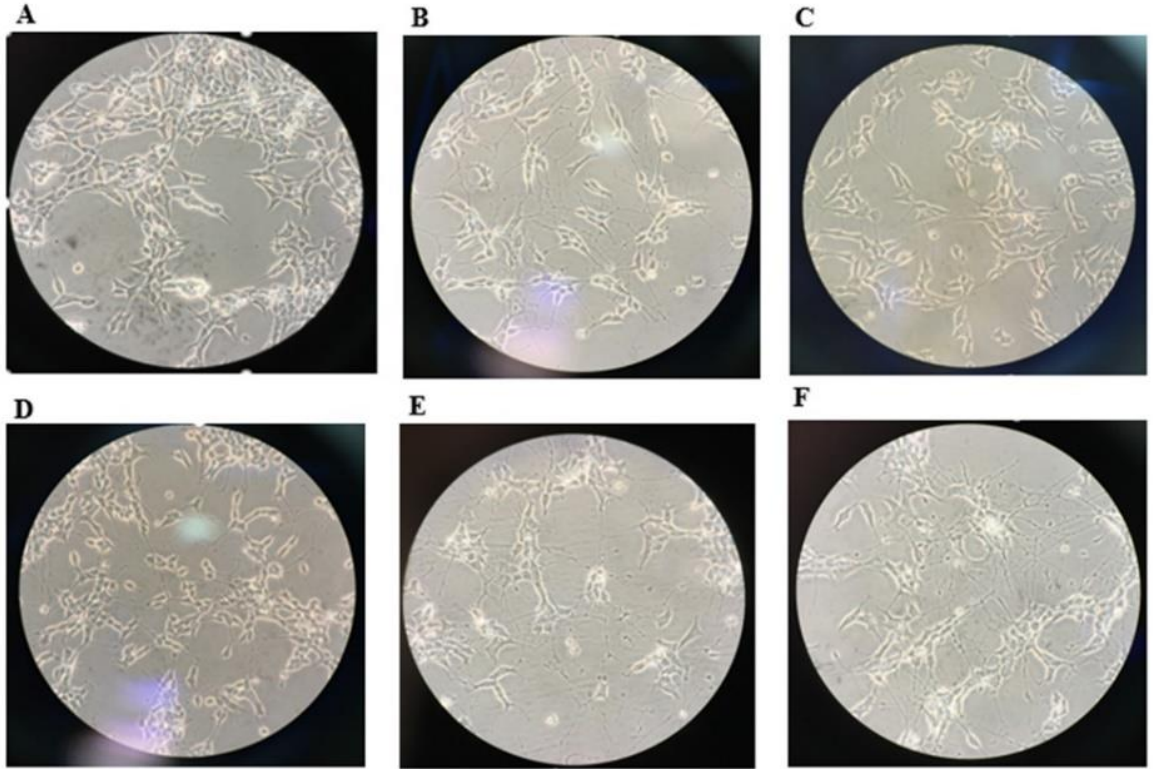
4. BULGULAR

4.1. Diferansiyasyonun Değerlendirilmesi

SH-SY5Y hücrelerinin diferansiyasyonu, morfolojik değişiklik, nörit uzunluğu ve nöronal belirteç proteinlerinin ekspresyonu ile değerlendirilmiştir.

4.1.1. Morfolojik Değişikliğin Değerlendirilmesi

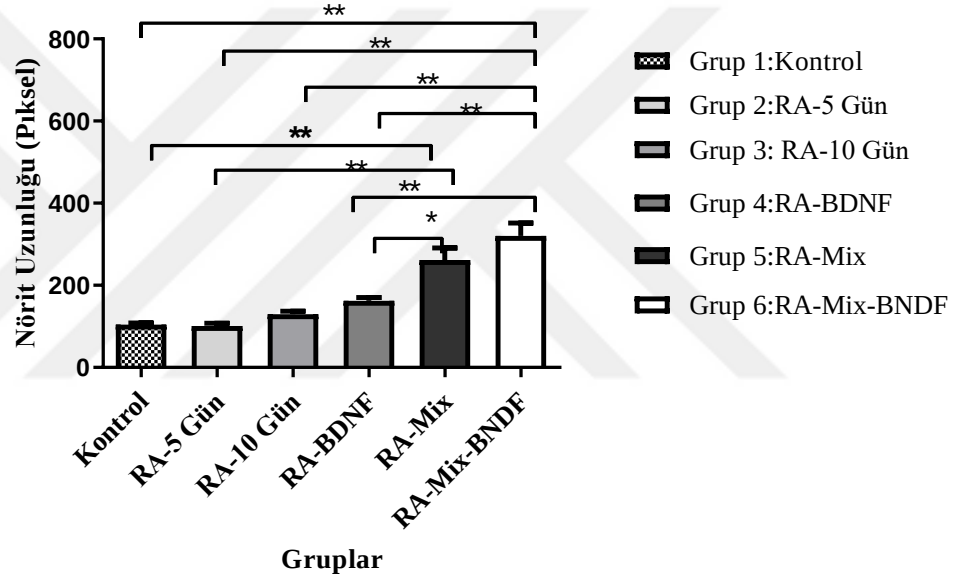
Morfolojik değişiklikler inkübasyon süreleri sonunda ters faz ışık mikroskobu ile değerlendirildi. Diferansiye edilmeyen normal SH-SY5Y hücreleri (kontrol) kümeleşme eğilimi göstermektedir (Şekil 25A). Bu grupta nörit oluşumu görülmemesine karşın, diğer gruplarda hücreler arası ağ ve nörit oluşumu gözlenmektedir (Şekil 25 B-F).



Şekil 25. Diferansiye ve diferansiye edilmemiş SH-SY5Y hücrelerinde görülen morfolojik değişiklikler. **A)** Kontrol SH-SY5Y **B)** 5 gün RA uygulanan grup, **C)** 10 gün RA uygulanan grup, **D)** 5 gün RA+5 gün BDNF uygulanan grup, **E)** 5 gün RA+ Mix Medium uygulanan grup, **F)** 5 gün RA+ Mix Medium+ BDNF uygulanan grup. Ters faz ışık mikroskobu görüntüleri (40 X büyütme).

4.1.2. Nörit Uzunluğunun Değerlendirilmesi

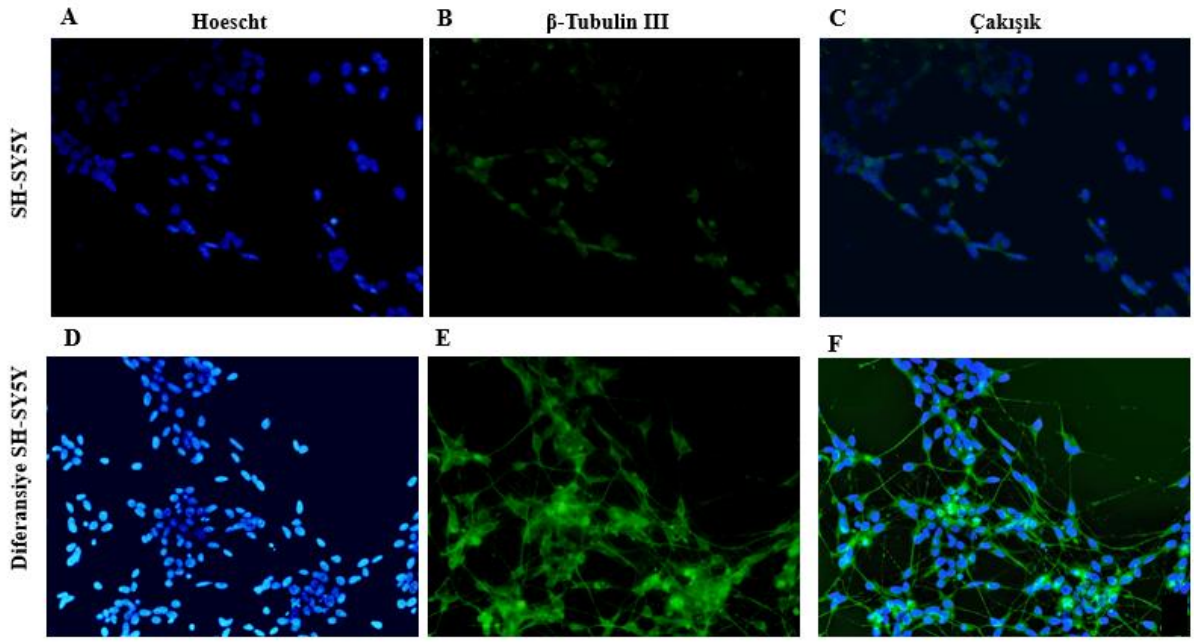
Nöron J programı ile gruplar arası nörit uzunluğu değerlendirildiğinde, nörit uzunluğunun en fazla olduğu ve diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturan grubun 6. grup (5 gün RA, 5 gün mix ortam+ BDNF) olduğu saptanmıştır ($p<0,001$). Diğer gruplar birbiri ile karşılaştırıldığında 5. grubun (5 gün RA, ardından 5 gün mix ortam) 6. grup dışındaki tüm gruplar ile arasında anlamlı fark olduğu belirlendi ($p<0,001$ veya $p<0,05$). Elde edilen veriler doğrultusunda diferansiyasyon ortamı olarak bundan sonraki deneylerde 6. gruba uygulanan RA+ mix medium + BDNF içeren ortamının kullanılmasına karar verildi (Şekil 26).



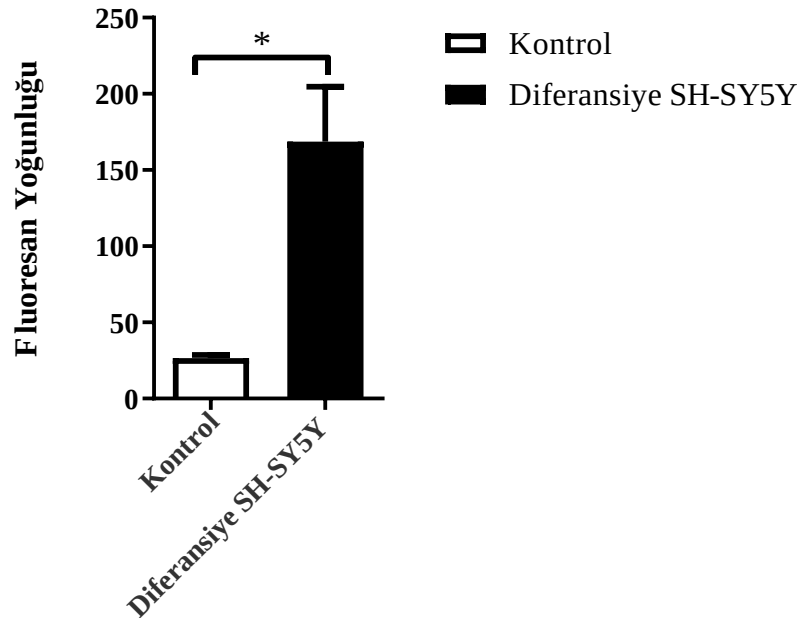
Şekil 26. Nöron J programı ile nörit uzunluğu analizi. İstatistiksel anlamlılık: ** $p<0,001$, * $p<0,05$ (Ortalama±Standart Hata, her koşul 9 kez tekrarlanmıştır).

4.1.3. Nöronal Belirteçlerin Analizi

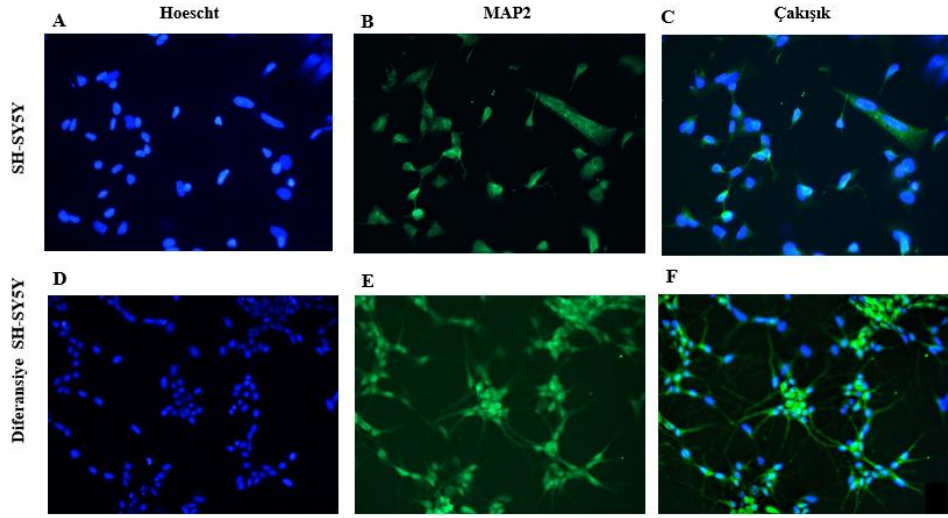
En fazla nörit uzunluğu elde edilen 6. grup ile diferansiye edilmemiş SH-SY5Y (kontrol) hücrelerinde β -III Tubulin, MAP2 ve NF-H proteinlerinin ekspresyonları immünofluoresan yöntemi ile değerlendirildi ve sinyal yoğunluğu Image J analiz programı ile hesaplandı. (Şekil 27, 28)'de görüldüğü gibi, 6. grupta β -III tubulin ekspresyon yoğunluğu kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış gösterdi ($p<0,05$). Benzer şekilde 6.grup ile kontrol grubu arasında MAP2 ve NF-H ekspresyon yoğunluğu açısından anlamlı bir fark elde edildi ($p<0,001$; $p<0,05$). (Şekil 29, 30 ve Şekil 31,32).



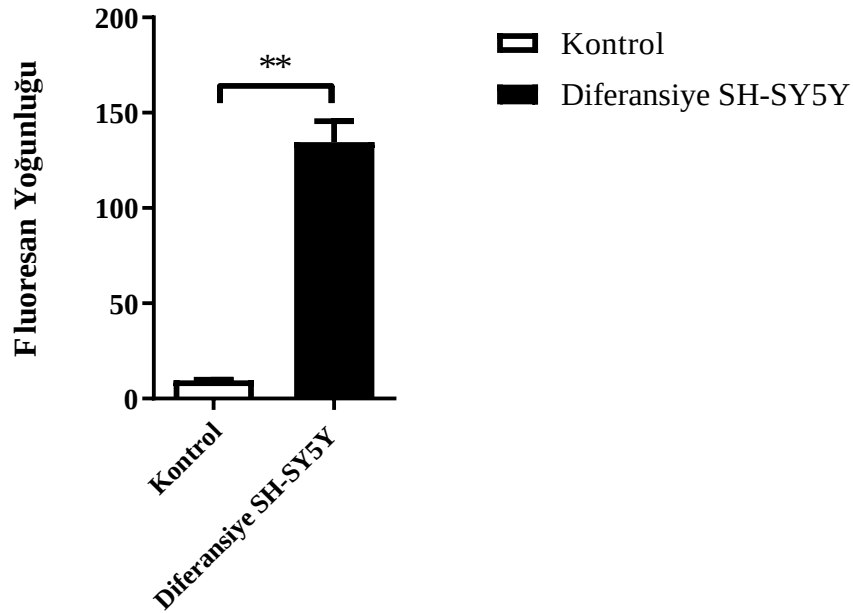
Şekil 27. β -Tubulin III immünofluoresan sonuçları. **A)** SH-SY5Y hoescht boyaması, **B)** SH-SY5Y β -III tubulin, **C)** SH-SY5Y β -III tubulin, **D)** Diferansiye-SH-SY5Y hoescht **E)** Diferansiye-SH-SY5Y β -III tubulin, **F)** Diferansiye-SH-SY5Y β -III tubulin. (Büyütme 40 X, ölçek büyüklüğü 150 μ m).



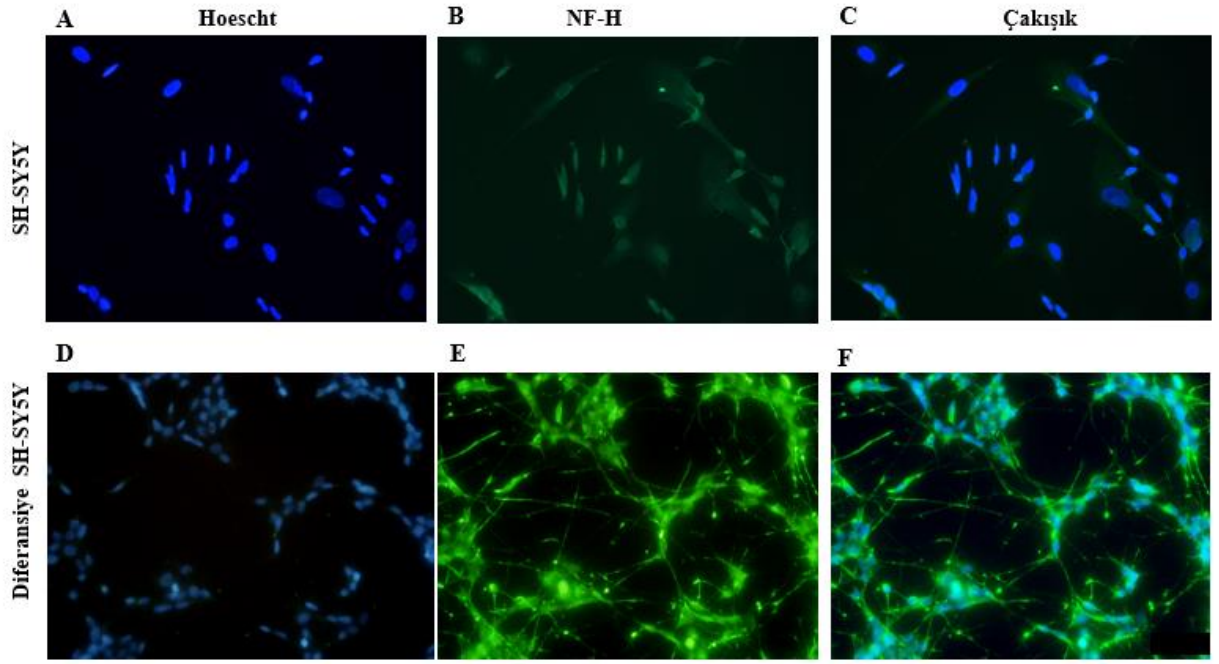
Şekil 28. β -III Tubulin sinyal yoğunluğu. İstatistiksel anlamlılık: ** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ (Ortalama $\pm$ Standart Hata, her koşul 9 kez tekrarlanmıştır).



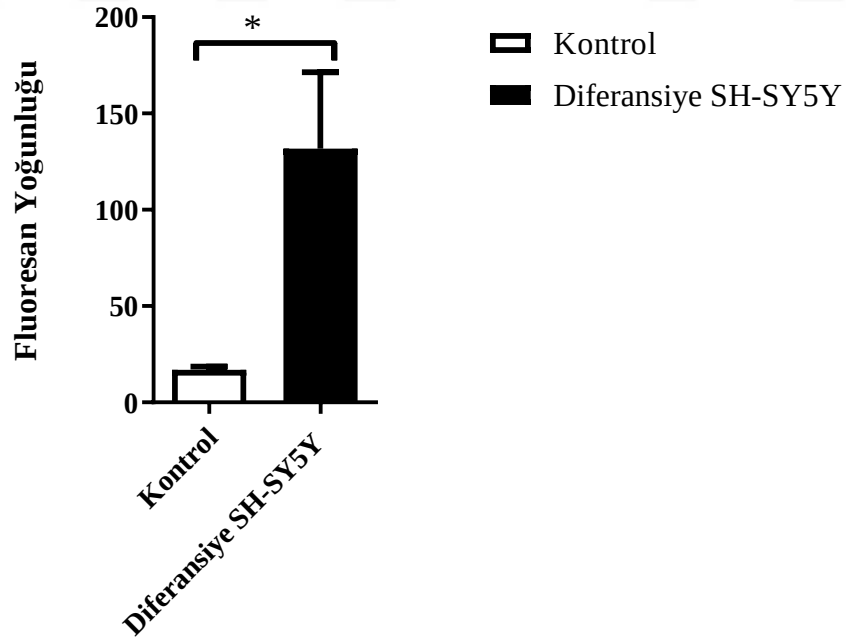
Şekil 29. MAP2 immüno Floresan sonuçları. **A)** SH-SY5Y hoescht, **B)** SH-SY5Y MAP2, **C)** SH-SY5Y çakışık, **D)** Diferansiye-SH-SY5Y hoescht **E)** Diferansiye-SH-SY5Y MAP2, **F)** Diferansiye-SH-SY5Y çakışık (Büyütme 40 X, ölçek büyüklüğü 150 μ m).



Şekil 30. MAP2 sinyal yoğunluğu. İstatistiksel anlamlılık: **p< 0,001, *p<0,05 (Ortalama±Standart Hata, her koşul 9 kez tekrarlanmıştır).



Şekil 31. NF-H immüno Floresan sonuçları. A) SH-SY5Y hoescht, B) SH-SY5Y NF-H, C) SH-SY5Y çakışık, D) Diferansiye-SH-SY5Y hoescht E) Diferansiye-SH-SY5Y NF-H, F) Diferansiye-SH-SY5Y çakışık (Büyütme 40 X, ölçek büyüklüğü 150 μ m).



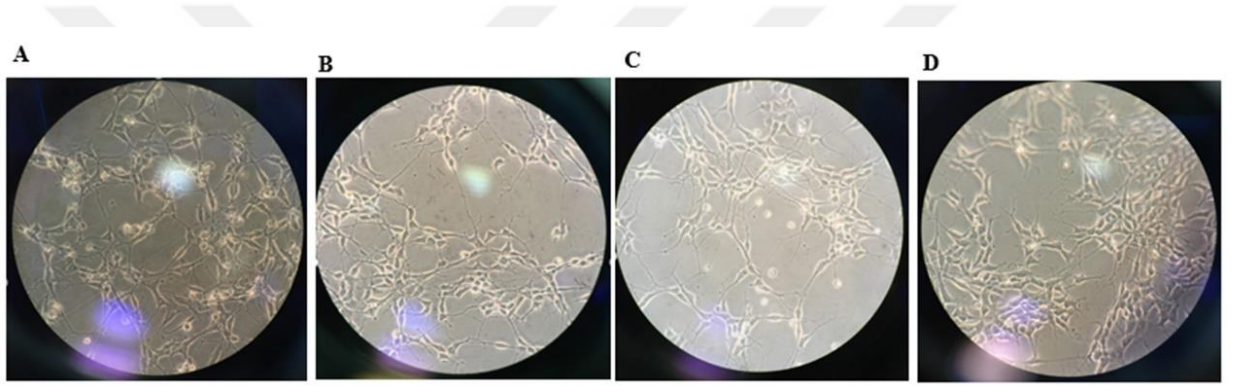
Şekil 32. NF-H sinyal yoğunluğu. İstatistiksel anlamlılık: **p< 0,001, *p<0,05 (Ortalama±Standart Hata, her koşul 9 kez tekrarlanmıştır).

4.2. Diferansiye Hücrelerinin Stabilizasyonun Değerlendirilmesi

Diferansiye edilen SH-SY5Y hücrelerinin diferansiyasyon sonrası kaç güne kadar nöron benzeri karakterini ve nörit uzunluğunu koruduğunun değerlendirilmesi, diferansiyasyon sonrası 14. güne kadar morfolojik değişiklik ve nörit uzunluklarının değerlendirilmesi ile izlendi.

4.2.1. Işık Mikroskopi Görüntüleri

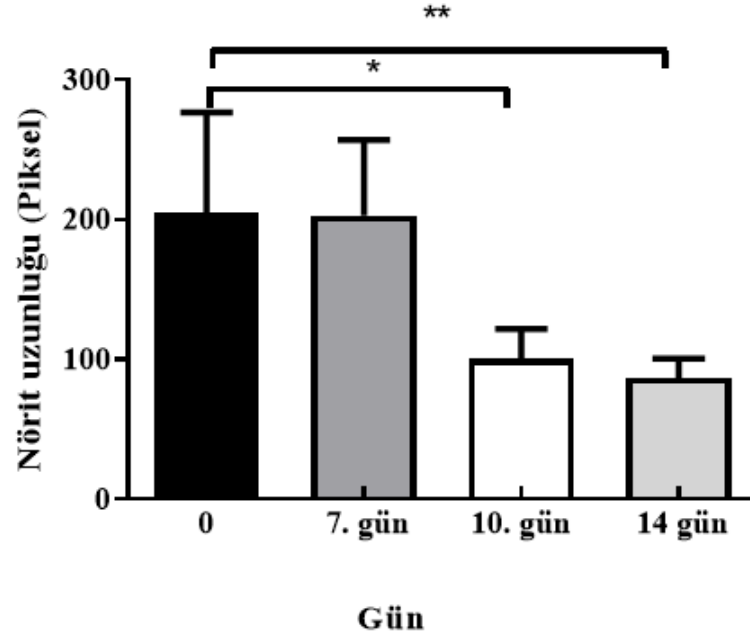
5 gün RA + 5 gün mix ortam ve BDNF'nin uygulanarak diferansiye edilen hücrelerin diferansiyasyon protokolünün son günü 0. gün olarak kabul edilerek 7.,10. ve 14. gün morfolojik değişiklikleri ters faz mikroskobu ile incelendi ve 14. güne kadar hücrelerin morfolojilerinde bir değişiklik gözlenmedi (Şekil 33).



Şekil 33. Ters faz mikroskop görüntüleri (40 X büyütme). **A)** Diferansiyasyon protokolün son günü 0. gün **B)** Diferansiyasyon sonrası 7. gün **C)** Diferansiyasyon sonrası 10.gün **D)** Diferansiyasyon sonrası 14. gün.

4.2.2. Nörit Uzunluğunun Değerlendirilmesi

Hücrelerin nörit uzunlukları karşılaştırıldığında diferansiyasyon sonrası 0. gün ile 7. gün arasında anlamlı bir fark bulunmadığı ($p>0,05$), ancak 0. gün ile 10. gün arasında ve 0.gün ile 14.gün arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu saptandı (sırasıyla $p<0,05$, $p<0,001$) (Şekil 34).



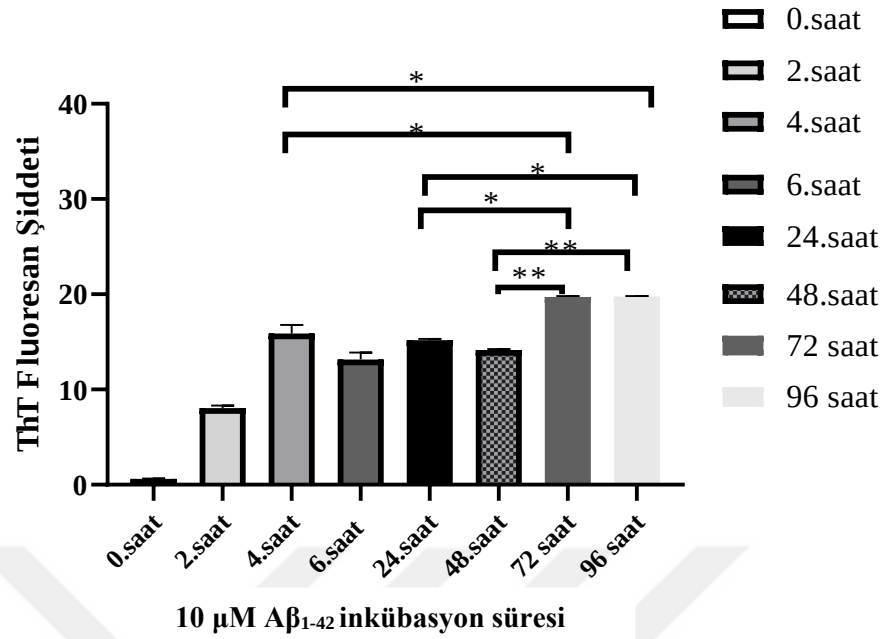
Şekil 34. Nörit uzunluğu analizi. İstatistiksel anlamlılık: **p< 0,001, *p<0,05 (Ortalama±Standart Hata, her koşul 9 kez tekrarlanmıştır).

4.3. A β 1-42 Fibril ve Plak Oluşumun Doğrulanması

A β ₁₋₄₂ fibril ve plak oluşumun doğrulanması için ThT, FESEM ve ELISA yöntemlerinden yararlanılarak veriler birlikte değerlendirildi. Elde edilen verilere göre, A β ₁₋₄₂ plak oluşumu için en uygun zaman seçimi yapıldı.

4.3.1. A β 1-42 Fibril ve Plakların Tiyoflavin T Analizi

A β ₁₋₄₂ fibril ve plak oluşumu (10 μ M) *in vitro* koşullarda bölüm 3.6.2.5.2’de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Fibril ve plakların *in vitro* koşullarda süreye bağlı değişimini ifade eden ThT analizi Şekil 35’de gösterilmiştir.

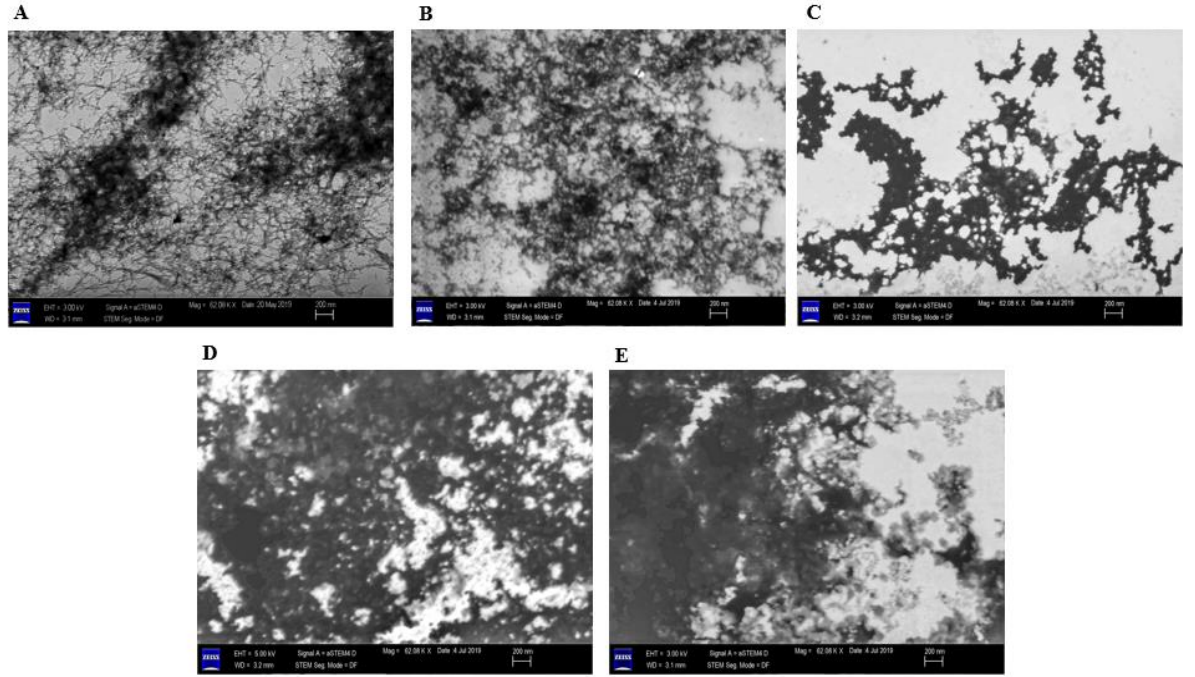


Şekil 35. 10 µM Aβ₁₋₄₂ örneklerinde ThT miktarının süreye bağlı değişimi. İstatistiksel anlamlılık: **p< 0,001, *p<0,05 (Ortalama±Standart Hata, her koşul 9 kez tekrarlanmıştır).

4. saat inkübe edilen Aβ₁₋₄₂ ile 72 saat ve 96 saat inkübe edilen Aβ₁₋₄₂ arasında anlamlı bir fark bulunmadı (p<0,05). Bunun yanı sıra, 24 saat inkübe edilen Aβ₁₋₄₂ ile 72 saat ve 96 saat inkübe edilen Aβ₁₋₄₂ arasında ve 48 saat inkübe edilen Aβ₁₋₄₂ ile 72 saat ve 96 saat inkübe edilen Aβ₁₋₄₂ arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (sırasıyla; p<0,05, p< 0,001).

4.3.2. Aβ₁₋₄₂ Fibril ve Plakların FESEM Görüntülemesi

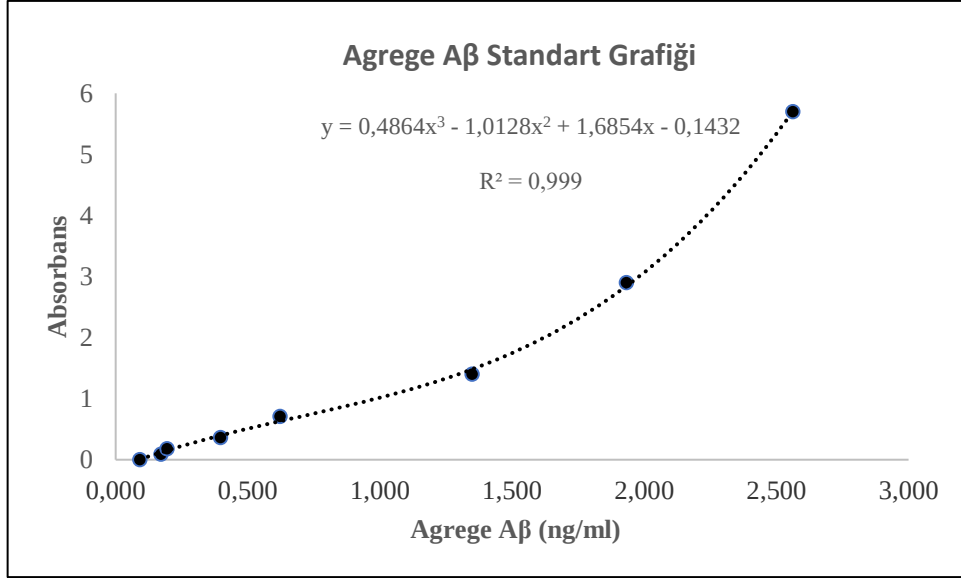
Aβ₁₋₄₂'nin ThT analizinde 4. saat 37°C 'de fibril oluşumu, 24., 48., 72. ve 96. saat inkübasyonlarına ilişkin plak oluşumunun FESEM görüntüleri Şekil 36'da gösterilmiştir. Aβ₁₋₄₂ 4.saat 37°C'de inkübasyonu sonucunda fibril oluşumunun ardından süre artışı ile plak oluşumunun arttığı görülmektedir.



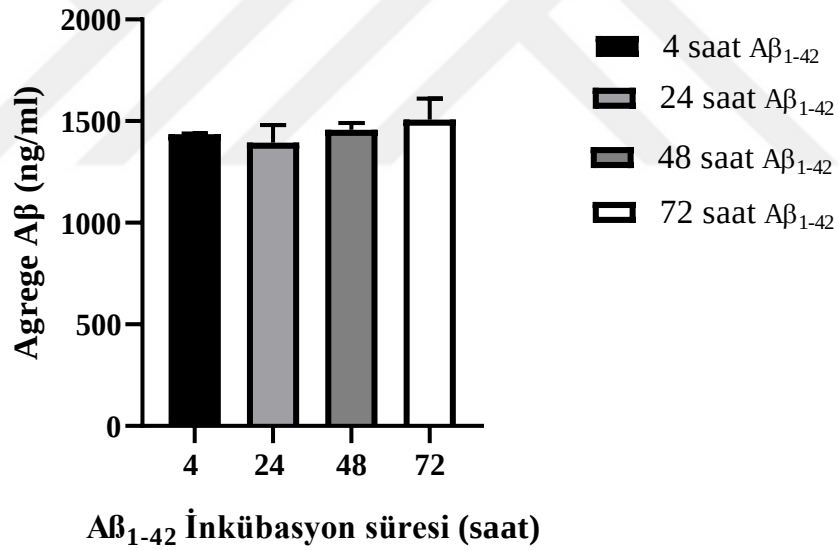
Şekil 36. Farklı zaman dilimlerinde A β ₁₋₄₂ fibril ve plaklarının FESEM görüntüleri. (200 nm, 300 kV). **A)** 4 saat A β ₁₋₄₂ fibril oluşumu, **B)** 24 saat A β ₁₋₄₂ plak oluşumu, **C)** 48 saat A β ₁₋₄₂ plak oluşumu, **D)** 72 saat A β ₁₋₄₂ plak oluşumu, **E)** 96 saat A β ₁₋₄₂ plak oluşumu.

4.3.3. A β ₁₋₄₂ Fibril ve Plakların Agrege A β Düzeyinin Belirlenmesi

Oluşan fibril ve plaklardaki A β agregasyon düzeyi agrege A β ELISA analizi ile değerlendirildi. ELISA kit protokolüne uygun olarak öncelikle 3.6.2.5.4’da belirtildiği şekilde standartlar hazırlanarak standart grafiği oluşturuldu (Şekil 37). Farklı zaman dilimlerinde inkübe edilen A β ₁₋₄₂ ‘ye ait ELISA sonuçları Şekil 38’de gösterilmiştir. Farklı sürelerde inkübasyona bırakılan A β ₁₋₄₂ ‘nin agrege A β ELISA sonuçları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p > 0,05$).



Şekil 37. Agregre Aβ standart grafiği.



Şekil 38. Farklı inkübasyon sürelerinde agregre Aβ düzeyleri. (Ortalama±Standart Hata, her koşul 9 kez tekrarlanmıştır).

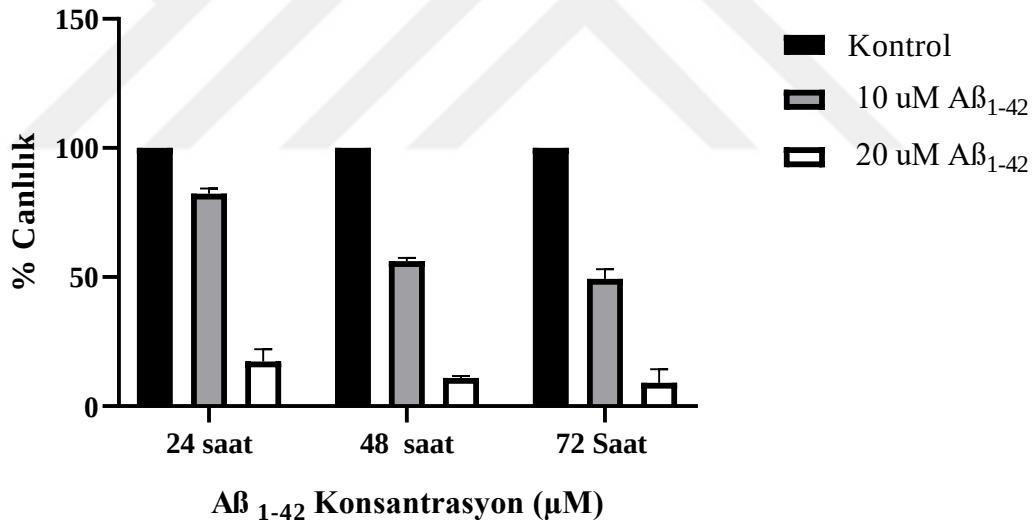
Elde edilen ThT, FESEM ve ELISA verileri birlikte değerlendirildiğinde; 72 saat ve 96 saatte çok yoğun plak oluşumlarının gerçekleştiği ve bunun hastalığın ilerleyen son evrelerini temsil edebileceği düşünülmüştür. Bu nedenle plak oluşumunun net olarak gözlemlendiği en erken süreç olan 24 saat Aβ₁₋₄₂ inkübasyon süresinin bundan sonraki deneylerde Aβ plağı olarak kullanılmasına karar verildi.

4.4. Oluşturulan A β ₁₋₄₂ Plaklarının Diferansiye Hücreler Üzerine Toksisitesinin Belirlenmesi

24 saat inkübasyon sonucunda oluşumu doğrulanan A β ₁₋₄₂ 'nin diferansiye SH-SY5Y hücreleri üzerinde yaklaşık %50-60 oranında toksisite oluşturacak A β ₁₋₄₂ doz ve uygulama süresinin belirlenmesi için WST-1 ve LDH analizleri gerçekleştirildi.

4.4.1. A β ₁₋₄₂ Plaklarının Hücre Canlılığına Etkisi

Diferansiye SH-SY5Y hücrelerinde 10 μ M ve 20 μ M A β ₁₋₄₂ 'nin 24., 48. ve 72. saat uygulanması ile canlılığa etkisi WST-1 analizi ile incelendi. Kontrol grubu olarak A β ₁₋₄₂ uygulaması yapılmayan diferansiye SH-SY5Y hücreleri kullanıldı (Şekil 39). 10 μ M A β ₁₋₄₂ uygulaması ile 24 saatte % 82, 48 saatte % 56 ve 72 saatte % 49 oranında hücre canlılığı gözlemlendi. 20 μ M A β ₁₋₄₂ 'nin uygulanması ile 24 saatte % 17, 48 saatte % 11 ve 72 saatte % 9 oranında hücre canlılığı tespit edildi. 20 μ M A β ₁₋₄₂ 'nin diferansiye SH-SY5Y hücreleri üzerinde çok belirgin bir toksisite yarattığı belirlendi.

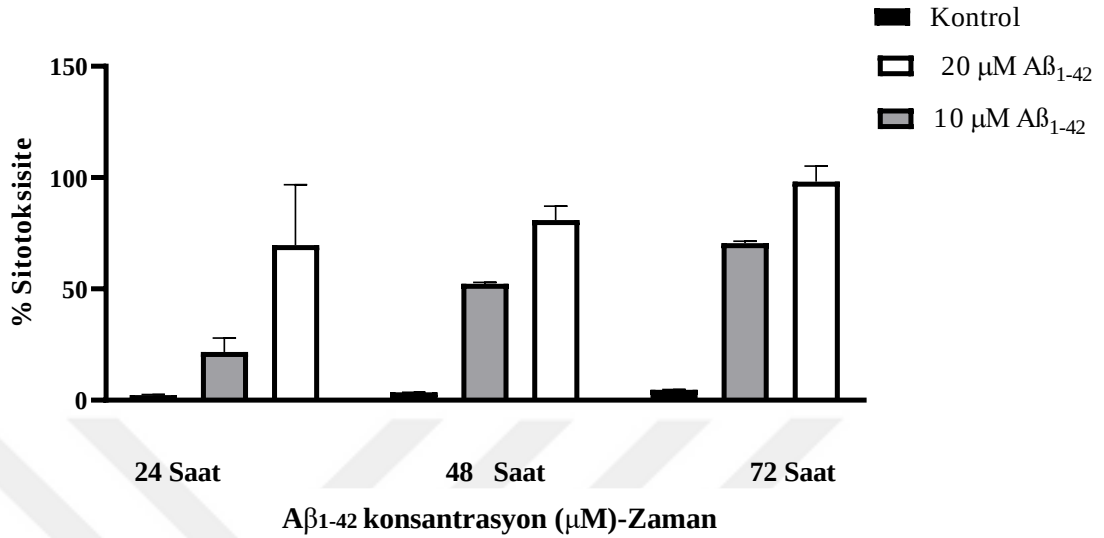


Şekil 39. Diferansiye SH-SY5Y hücre hattında 10 ve 20 μ M A β ₁₋₄₂ konsantrasyonlarının 24-72 saat inkübasyonu ile % canlılık değerlerinin değişimi. (Ortalama $\pm$ Standart Hata, her koşul 9 kez tekrarlanmıştır).

4.4.2. A β ₁₋₄₂ Plaklarının Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi

Diferansiye SH-SY5Y hücrelerine uygulanan 10 μ M ve 20 μ M A β ₁₋₄₂ 'nin 24., 48. ve 72. saatlerde LDH enzim salınımı ile sitotoksik etkisi Şekil 40'da gösterilmiştir. 10 μ M A β ₁₋₄₂ uygulaması ile 24 saatte % 22, 48 saatte % 52 ve 72 saatte % 70 oranında sitotoksisite

belirlenirken, 20 μM $\text{A}\beta_{1-42}$ 'nin uygulanması ile 24 saatte % 69, 48 saatte % 81 ve 72 saatte % 99 oranında sitotoksosite tespit edildi.



Şekil 40. Diferansiye SH-SY5Y hücrelerinde 10 ve 20 μM $\text{A}\beta_{1-42}$ konsantrasyonlarının 24-72 saat inkübasyonu ile % sitotoksosite değerlerinin değişimi (Ortalama $\pm$ Standart Hata, her koşul 9 kez tekrarlanmıştır).

Elde edilen WST-1 ve LDH verileri birlikte değerlendirildiğinde; diferansiye SH-SY5Y hücrelerinde yaklaşık %50-60 oranında sitotoksosite oluşturan uygulama süresinin ve $\text{A}\beta_{1-42}$ dozunun 48 saat ve 10 μM olduğu belirlendi.

4.5. Polifenollerin Diferansiye SH-SY5Y Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri

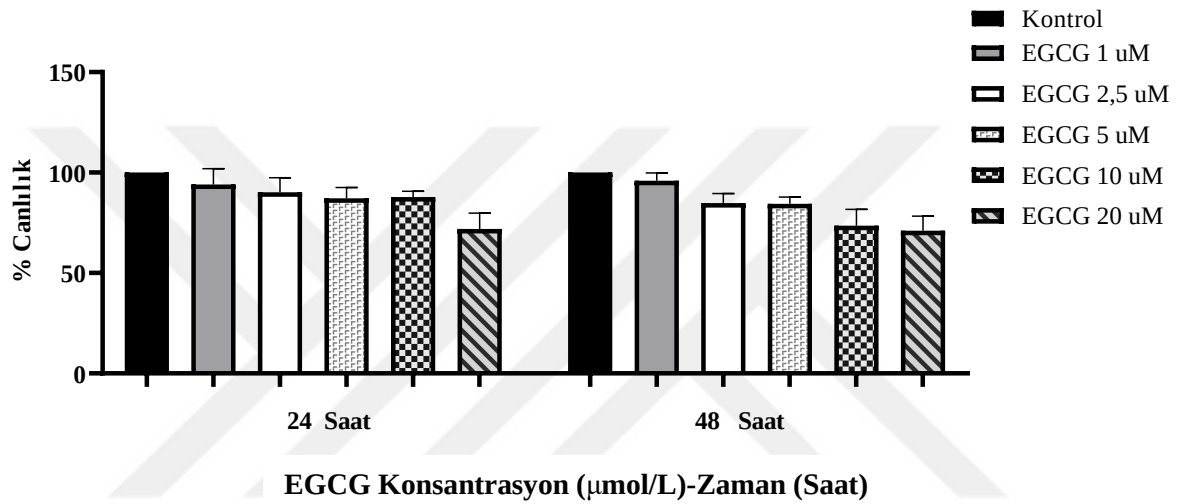
Polifenollerin diferansiye SH-SY5Y hücreler üzerinde toksisite oluşturmayan dozlarının 24. ve 48. saatlerde belirlenmesi için (yaklaşık %80-90 oranında canlılık) WST-1 ve LDH analizleri yapıldı.

4.5.1. Polifenollerin Hücre Canlılığına Etkisi

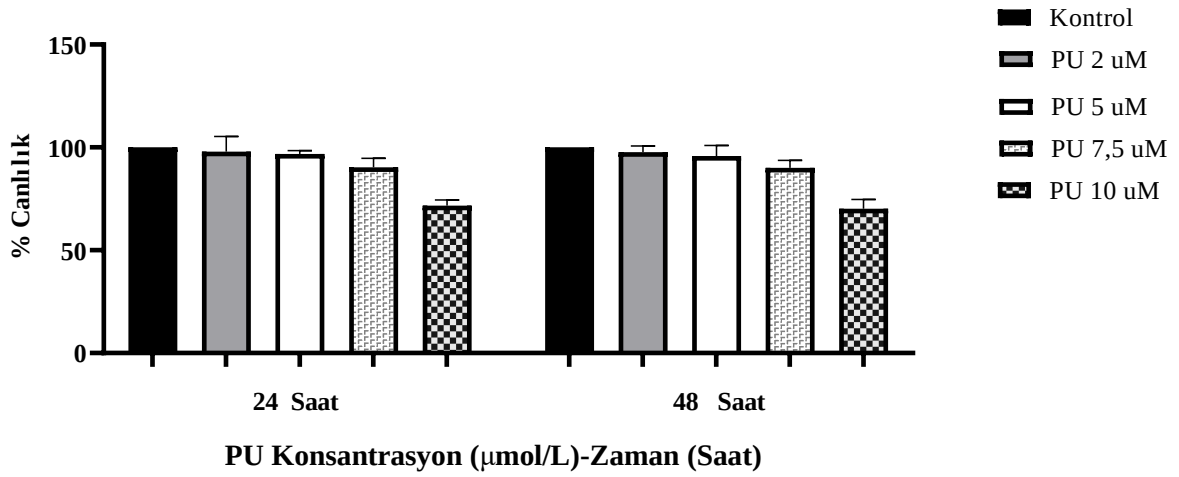
Polifenol uygulamaları ile diferansiye SH-SY5Y hücrelerinde canlılığın etkilenmediği (en az % 80-90 oranında canlılık) dozların seçimi için her bir polifenol için literatür bilgilerine dayanılarak belirlenen doz aralıklarında canlılık analizleri yapıldı. Kontrol grubu olarak polifenol uygulaması yapılmayan diferansiye SH-SY5Y hücreleri kullanıldı. Elde edilen verilere göre; EGCG'nin 1-20 μM doz aralığında 24 saatte % 90 canlılık gösterdiği dozun 2,5 μM , (Şekil 41) Punicalagin'in 2-10 μM doz aralığında 24 saatte % 91 canlılık gösterdiği dozun 7,5 μM (Şekil 42), Ellagic asid'in 10-100 μM doz aralığında 24 saatte % 97 canlılık gösterdiği

dozun 10 μM (Şekil 43) ve Gastrodin'in 10-100 μM doz aralığında 24 saatte % 99 canlılık gösterdiği dozun 25 μM olduğu saptandı (Şekil 44). Polifenollerin 48 saat uygulama sonrası canlılığa etkisi incelendiğinde; EGCG 2,5 μM dozda % 85, PU 7,5 μM dozda % 90, EA 10 μM dozda % 93, GA 25 μM dozda % 97 hücre canlılığı belirlendi.

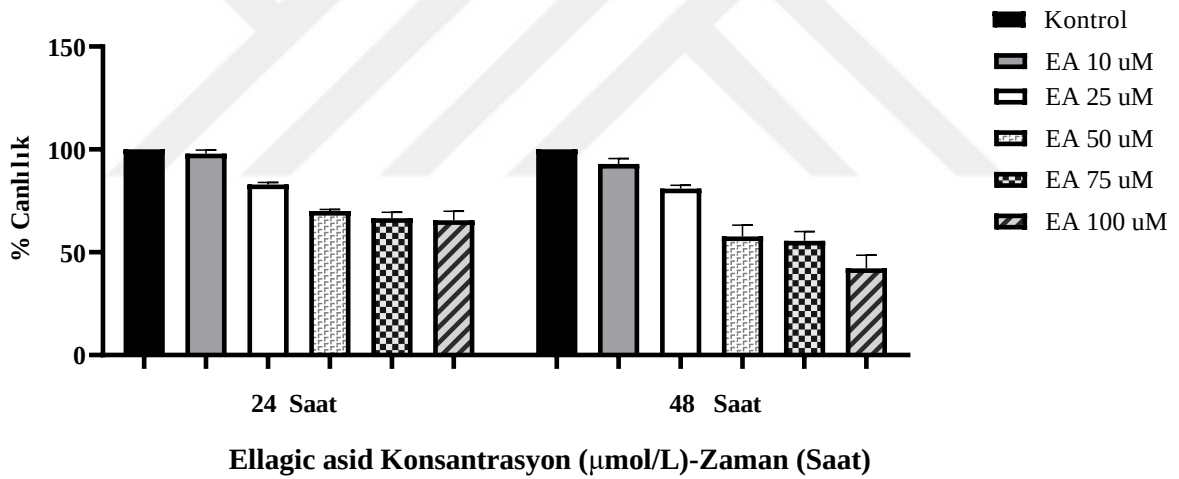
Elde edilen veriler değerlendirildiğinde polifenollerin hücrelerde yaklaşık %90 canlılığı sağladıkları 24 saat uygulamasının ve belirlenen polifenol dozlarının bundan sonraki deneyler için kullanılmasına karar verildi



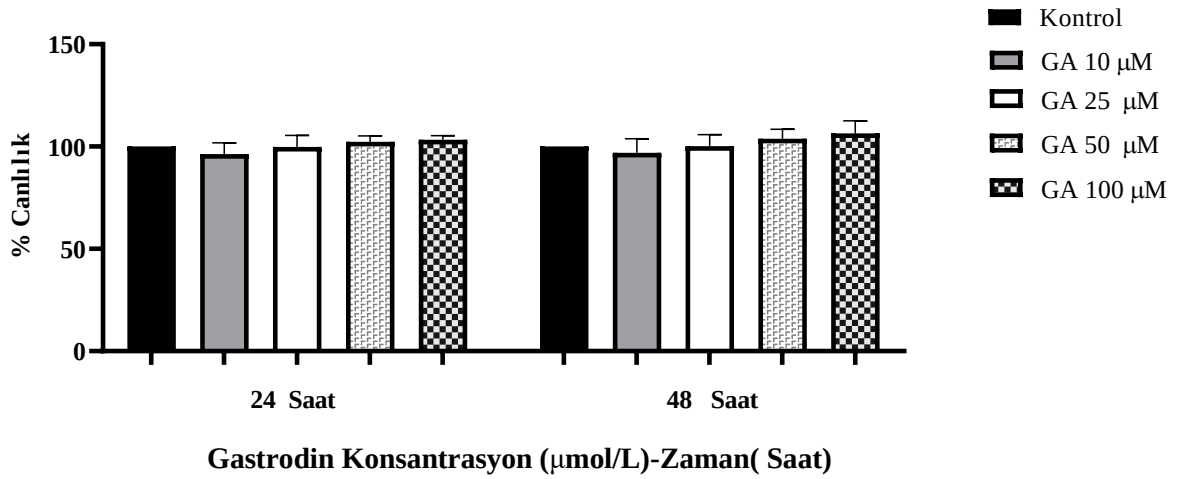
Şekil 41. Diferansiye SH-SY5Y hücrelerinde 0-20 μM EGCG konsantrasyonlarının 24-48 saat inkübasyonu ile % canlılık değerlerinin değişimi. (Ortalama $\pm$ Standart Hata, her koşul 9 kez tekrarlanmıştır).



Şekil 42. Diferansiye SH-SY5Y hücrelerinde 2-10 µM Punicalagin konsantrasyonlarının 24-48 saat inkübasyonu ile % canlılık değerlerinin değişimi. (Ortalama±Standart Hata, her koşul 12 kez tekrarlanmıştır).



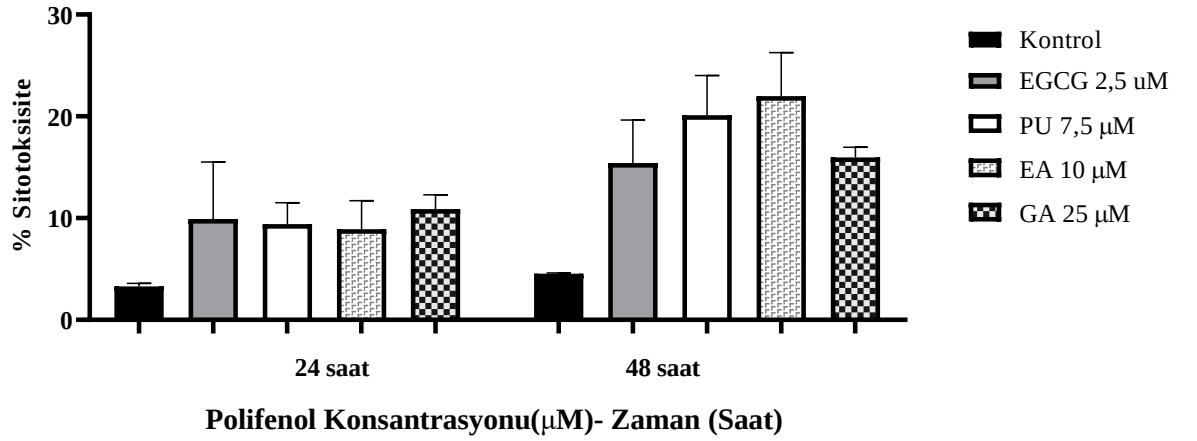
Şekil 43. Diferansiye SH-SY5Y hücrelerinde 10 -100 µM Ellagic asid konsantrasyonlarının 24-48 saat inkübasyonu ile % canlılık değerlerinin değişimi. (Ortalama±Standart Hata, her koşul 9 kez tekrarlanmıştır).



Şekil 44. Diferansiye SH-SY5Y hücrelerinde 10-100 µM Gastrodin konsantrasyonlarının 24-48 saat inkübasyonu ile % canlılık değerlerinin değişimi. (Ortalama±Standart Hata, her koşul 12 kez tekrarlanmıştır).

4.5.2. Polifenollerin Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi

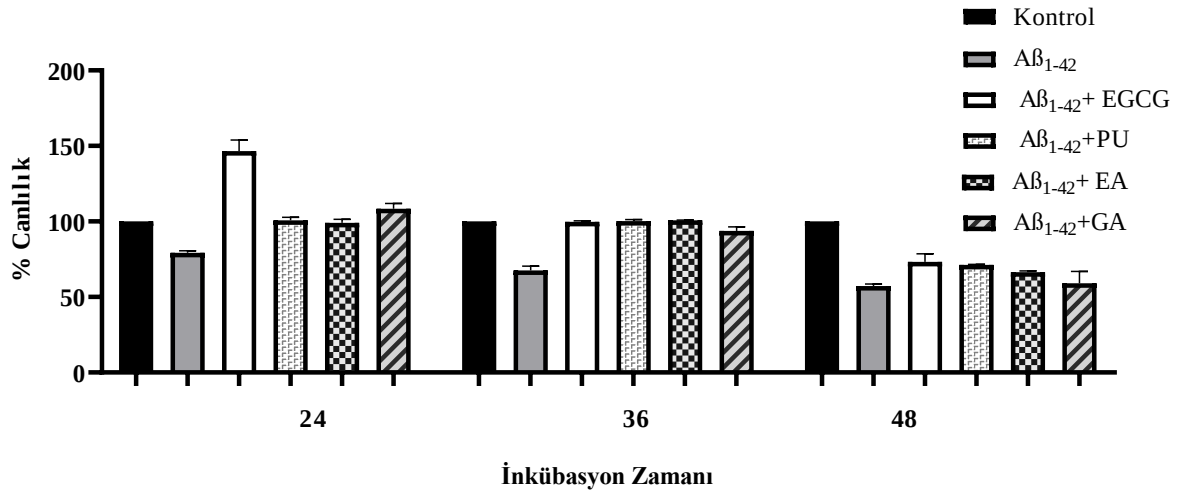
WST-1 sonuçlarına göre % 90 canlılık gösteren polifenol dozlarının diferansiye SH-SY5Y hücreleri üzerindeki etkisi LDH salınım analizi ile de doğrulandı (Şekil 45). 2,5 µM EGCG uygulaması 24 saatte % 10, 7,5 µM PU uygulaması 24 saatte % 12, 10 µM EA uygulaması 24 saatte % 9, 25 µM GA uygulaması 24 saatte % 11 oranında LDH salınımı olduğu saptandı. 2,5 µM EGCG uygulaması 48 saatte % 15, 7,5 µM PU uygulaması 48 saatte % 20, 10 µM EA uygulaması 48 saatte % 21, 25 µM GA uygulaması 48 saatte % 16 oranında LDH salınımı olduğu saptandı. LDH salınım sonuçları ile canlılık analiz sonuçlarında paralellik göstermesi nedeniyle polifenol uygulamaları için belirlenen dozların kullanılmasına karar verildi.



Şekil 45. Diferansiye SH-SY5Y hücrelerinde polifenollerin konsantrasyonlarının 24-48 saat inkübasyonu ile % LDH salınım değerleri. (Ortalama±Standart Hata, her koşul 9 kez tekrarlanmıştır).

4.6. Polifenol ve A β ₁₋₄₂ Birlikte Uygulamasının Diferansiye SH-SY5Y Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

Seçilen polifenol dozları ve A β ₁₋₄₂'nin birlikte diferansiye SH-SY5Y hücrelerine uygulanmasının hücre canlılığı üzerine etkisi WST-1 analizi ile tekrar değerlendirildi. Birlikte uygulama sonucunda canlılığı % 50'nin altına düşürmeyen saatler saptandı. Polifenollerin (EGCG (2,5 µM), PU (7,5 µM), EA (10 µM), GA (25 µM)) A β ₁₋₄₂ ile birlikte diferansiye SH-SY5Y hücrelerine uygulanmasından 24 saat sonra proliferasyon gözlenmiştir. Hücre canlılık değerleri 24 saat sonunda sırasıyla sırasıyla % 146 , % 100, % 101 ve % 108, 36 saat sonrasında hücre canlılık değerleri ise, % 99,5, % 98, % 99 ve % 93 olarak belirlendi. 48 saat sonra sırasıyla % 73, % 71, % 66 ve % 59 olarak belirlendi (Şekil 46). Elde edilen verilere göre polifenollerin ilk 24 saatte proliferasyon etkisi gösterdiği ancak 48. saat sonunda hiçbir polifenol uygulamasının canlılığı %50 oranının altına düşürmediği saptandı. Bu nedenle polifenollerin A β ₁₋₄₂ plak çözündürme etkinlikleri için 48. saate kadar inceleme yapılmasına karar verildi.

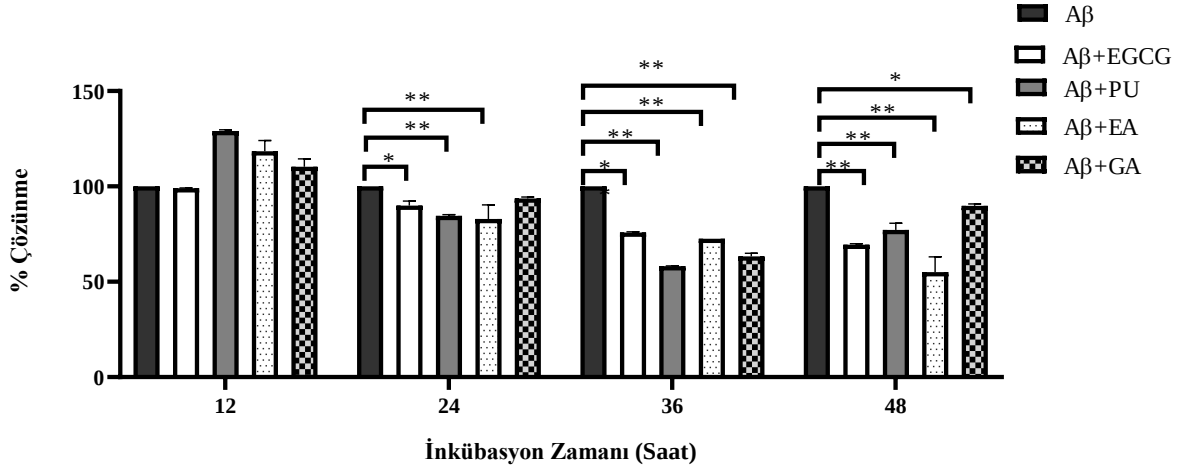


Şekil 46. Polifenol ve Aβ₁₋₄₂'nin diferansiye SH-SY5Y hücrelerinde 24, 36 ve 48 saat inkübasyonu ile % canlılık değerlerinin değişimi. (Ortalama±Standart Hata, her koşul 9 kez tekrarlanmıştır).

4.7. Polifenollerin Aβ₁₋₄₂ plaklarını çözündürme etkilerinin incelenmesi

4.7.1. Tiyo flavin T Analizi

Aβ₁₋₄₂ plakları ve polifenoller (%90 canlılık sağlayan) 37°C 'de 12, 24, 36 ve 48 saatlerde birlikte inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında Aβ₁₋₄₂ plaklarının çözünmesi ThT fluoresan ölçümü ile değerlendirildi. Polifenollerin plakları çözündürme etkinliği Şekil 47'de gösterilmiştir.

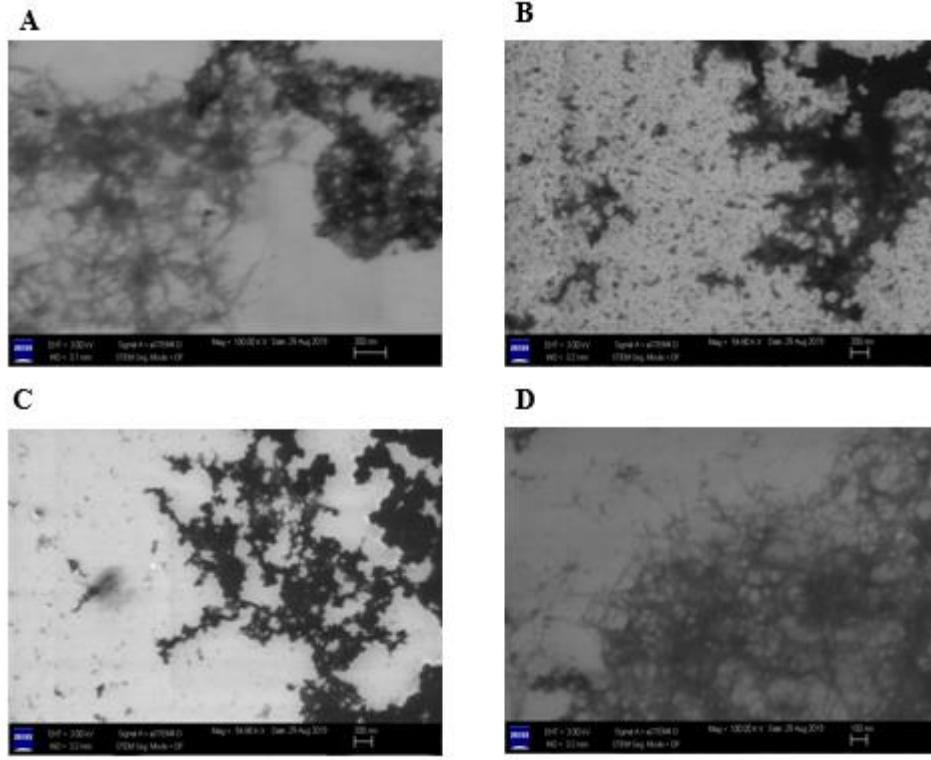


Şekil 47. Polifenollerin A β_{1-42} plaklarını çözünme etkinliği. İstatiksel anlamlılık: **p< 0,001, *p<0,05 (Ortalama±Standart Hata, her koşul 9 kez tekrarlanmıştır).

EGCG dışında, Punicalagin, Ellagic asid ve Gastrodin polifenollerinin 12. saatte herhangi bir çözündürme etkisi saptanmadı. EGCG'nin 12. saatte A β_{1-42} plaklarının % 0,91 oranında çözdüğü, 24. saatte % 10,14 oranında, 36. saatte % 24,14 oranında ve 48. saatte % 30,52 oranında çözdüğü belirlendi. Punicalagin A β_{1-42} plaklarını 24. saatte % 15,74, 36. saatte % 41,84 ve 48. saatte % 11,83 oranında çözdüğü saptandı. Ellagic asid ise 24. saatte % 12,7 oranında, 36. saatte % 27,43 oranında ve 48. saatte % 45,01 oranında çözdürdüğü ortaya kondu. Gastrodinin 24. saatte % 6,35 oranında, 36. saatte % 36,68, 48. saatte ise % 10,16 oranında A β_{1-42} plaklarını çözdürdüğü belirlendi.

4.7.2. FESEM

3.6.2.5.3 'de anlatıldığı şekilde polifenollerin tekli olarak A β_{1-42} plaklarını çözündürme etkinlikleri ThT değerlerinin en yüksek olduğu saatlerde FESEM görüntüleri alındı (EGCG ve EA 48 saat, PU ve Gastrodin 36 saat) (Şekil 48).

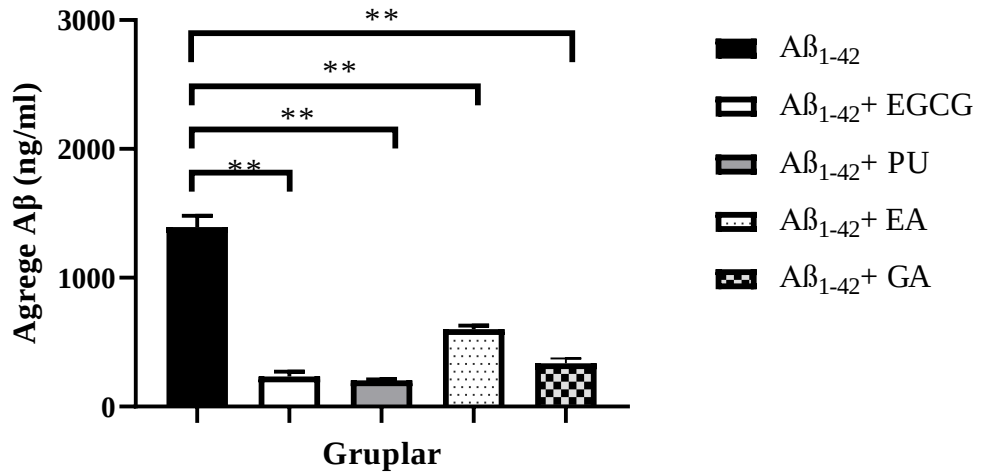


Şekil 48. Polifenollerin $A\beta_{1-42}$ plak çözündürme etkinliklerinin FESEM görüntüleri. A) EGCG (48s), B) PU (36s) C) EA (48s) D) GA (36s) (Görüntüler 300 kV 'da, 100.000 büyütmede 200 nm ölçeğe alınmıştır).

EGCG ve Gastrodin (Şekil 48 A ve D) $A\beta_{1-42}$ plaklarını, plak oluşumundan önceki forma fibril yapısına benzer bir yapıya dönüştürerek çözdüğü gözlemlendi. Bunun yanı sıra, punicalagin'in (Şekil 48 B) plak yapılarını parçalayarak, daha küçük fragmanlara ayırarak, amorf bir yapı oluşturarak; ellagic asidin (Şekil 48 C) ise $A\beta_{1-42}$ plaklarını yapıyı katmanlarına ayırarak, yapıda inceltici bir etki oluşturarak çözünme sağladığı görüldü.

4.7.3. Polifenollerin Çözündürme Etkisinin Agrege $A\beta_{1-42}$ ELISA Analizi ile İncelenmesi

24 saat 37°C 'de inkübe edilen $A\beta_{1-42}$ plaklara polifenol uygulamalarının ardından çözündürme etkinlikleri in vitro ortamda (tüp içinde) agrege $A\beta_{1-42}$ ELISA ile değerlendirildi (EGCG ve EA 48 saat, PU ve Gastrodin 36 saat). Polifenollerin plakları çözündürme etkinliğine ilişkin sonuçlar Şekil 49'da gösterilmiştir.

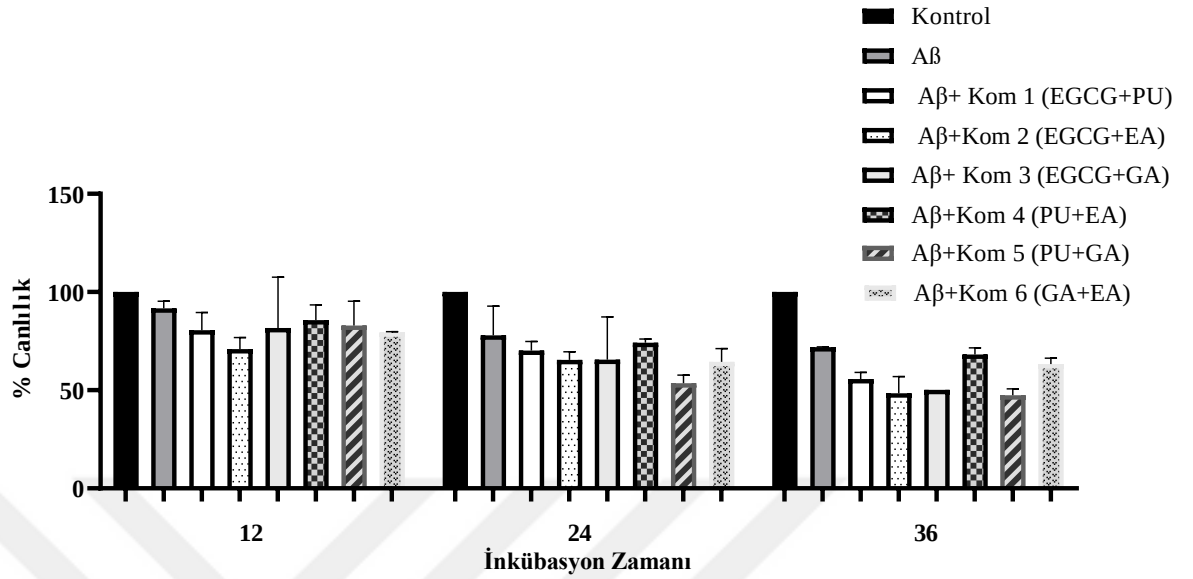


Şekil 49. Polifenollerin Aβ₁₋₄₂ plak çözündürme etkinliğine ait agregre Aβ ELISA sonuçları. İstatiksel anlamlılık: **p< 0,001, *p<0,05 (Ortalama±Standart Hata, her koşul 9 kez tekrarlanmıştır).

Polifenollerin amiloid beta çözündürme etkilerini ortaya koyan agregre Aβ ELISA analizi verilerine göre, her bir polifenolün Aβ₁₋₄₂ yapısını çözündürme etkinliği olduğu ve kontrol grubu ile diğer tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu saptandı (p<0,001). Kontrol grubunu oluşturan agregre Aβ miktarı 1395 ng/ml iken, bu miktar EGCG uygulaması ile 234 ng/ml, PU uygulaması ile 203 ng/ml, EA uygulaması ile 601 ng/ml, GA uygulaması ile 335 ng/ml 'ye düştüğü saptandı.

4.8. Polifenol Kombinasyonları ve Aβ₁₋₄₂ Birlikte Uygulamasının Diferansiye SH-SY5Y Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri

Tüm polifenollerin farklı zaman dilimlerinde tekli olarak Aβ₁₋₄₂'yi çözündürme etkinliğine sahip olması nedeniyle her bir polifenolün ikili kombinasyonu ile daha kısa sürede daha etkin çözündürme etkisinin belirlenmesi hedeflenerek toplam altı adet kombinasyon oluşturuldu. EGCG + PU (Kom 1), EGCG + EA (Kom 2), EGCG + GA (Kom 3), PU + EA (Kom 4), PU + GA (Kom 5), GA + EA (Kom 6) olarak tanımlandı. Polifenol ve Aβ₁₋₄₂ uygulaması yapılmayan diferansiye hücreler kontrol-1 grubu, diferansiye hücrelere sadece Aβ₁₋₄₂ uygulanan grup kontrol-2 olarak değerlendirildi. Bu kombinasyonların ve Aβ₁₋₄₂'nin birlikte diferansiye hücreler üzerindeki etkisi 12., 24. ve 36. saatlerde değerlendirildi. Her bir kombinasyon ve Aβ₁₋₄₂ uygulamasının hücre canlılık analiz sonuçları Şekil 50'de gösterilmiştir.



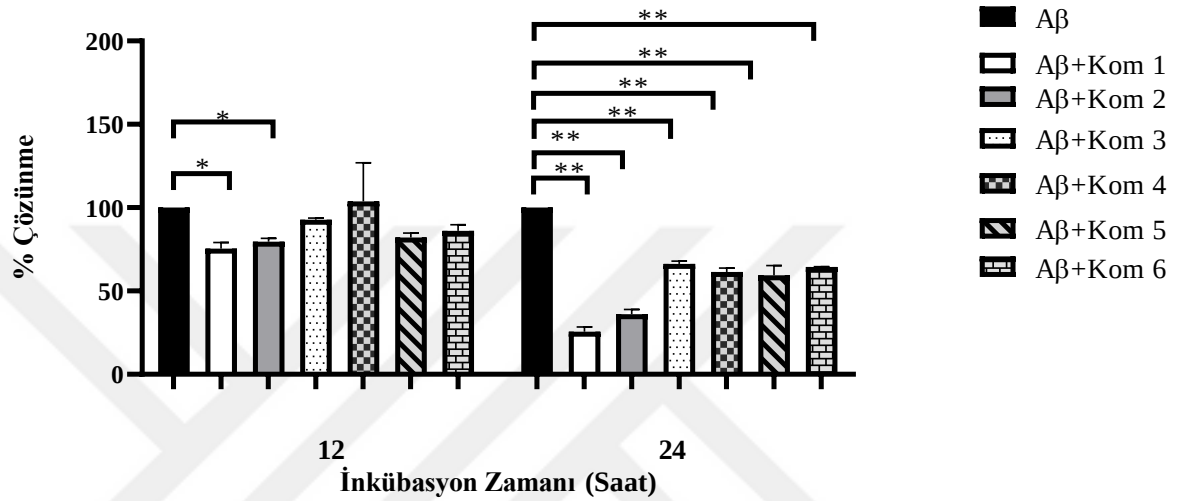
Şekil 50. Polifenol kombinasyonları ve A β_{1-42} 'nin diferansiye SH-SY5Y hücrelerinde 12, 24 ve 36 saat inkübasyonu ile % canlılık değerlerinin değişimi. (Ortalama $\pm$ Standart Hata, her koşul 9 kez tekrarlanmıştır).

Diferansiye SH-SY5Y hücrelerinin A β_{1-42} ve sırası ile Kom 1, Kom 2, Kom 3, Kom 4, Kom 5, Kom 6 ile 12 saat muamele edilmesi sonucunda hücre canlılıkları sırasıyla % 80,5, % 71, % 81,5, % 85,6, % 83 ve % 79 olarak belirlendi. 24 saat sonundaki canlılıklar ise sırasıyla; % 73, % 65,4, % 65,5, % 74,12, % 53,6 ve % 65 olarak saptandı. 36 saat sonunda ise sırasıyla % 71, % 56, % 49, % 68, % 48 ve % 63 olarak belirlendi. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde polifenollerin kombinasyon halinde uygulanmasının bireysel uygulamaya göre daha kısa sürede etkin çözündürme sağlayabileceği düşünülerek, çözündürme zaman dilimleri olarak 12. ve 24. saatler seçildi.

4.9. Polifenol Kombinasyonlarının A β ₁₋₄₂ plaklarını çözündürme etkilerinin incelenmesi

4.9.1. Tiyoflavin T Analizi

Altı adet kombinasyonun A β ₁₋₄₂ plaklarını çözünme etkinlikleri 12. ve 24. saatlerde incelendi (Şekil 51).

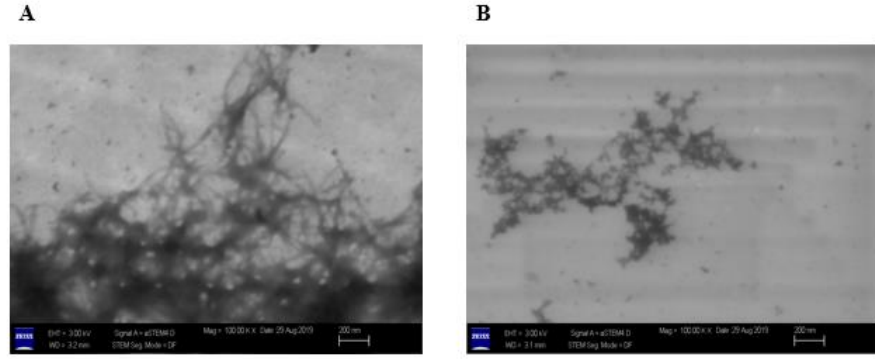


Şekil 51. Polifenol kombinasyonlarının 12 ve 24 saat inkübasyonunda agregre A β ₁₋₄₂ plaklarını çözündürme etkinliği. İstatiksel anlamlılık: **p<0,001, *p<0,05 (Ortalama±Standart Hata, her koşul 9 kez tekrarlanmıştır).

Kombinasyon uygulamasının A β ₁₋₄₂ plaklarını 12 saatte çözündürme % leri Kom 1, Kom 2, Kom 3, Kom 4, Kom 5, Kom 6 sırasıyla %24, %21, %7,5, % 12,5, % 18, %14 oranında çözündürürken, 24 saatte A β ₁₋₄₂ plaklarını çözündürme yüzdeleri ise, % 75, %64, %34, % 39, % 41, %36 oranında saptandı. 12 ve 24 saat ThT verileri değerlendirildiğinde en iyi A β ₁₋₄₂ plaklarını çözdüren iki kombinasyon olarak Kom 1 ve Kom 2 belirlendi. Bu nedenle diğer iş paketlerinde bu iki kombinasyon ile uygulamalara devam edildi.

4.9.2. FESEM

Seçilen Kom 1 ve Kom 2'nin en yüksek çözünürlük gösterdiği 24 saatte FESEM görüntüleri alındı (Şekil 52).

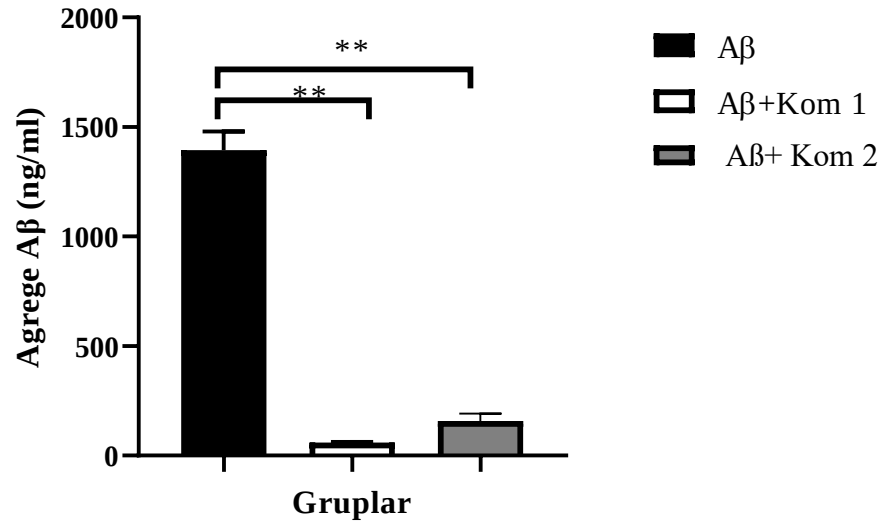


Şekil 52. Polifenol kombinasyonlarının $A\beta_{1-42}$ plak çözündürme etkinliklerinin FESEM görüntüleri A) Kom 1 (24s), B) Kom 2 (24s) (Görüntüler 300 kV ‘da, 100.000 büyütmede 200 nm ölçekte alınmıştır).

Kom 1’in (EGCG+PU) $A\beta_{1-42}$ plaklarını hem fibril haline dönüştürdüğü hem de ufak parçalara böldüğü gözlemlendi (Şekil 52.A). Kom 2’nin (EGCG+EA)(Şekil 52. B). kullanıldığı kombinasyonda ise fibril yapısı oluşmadan amiloid plakta delikler açarak, EA’nın tek başına sağladığı çözünürlük formuna benzer şekilde çözündürdüğü görüldü.

4.9.3. Polifenol Kombinasyonlarının Çözündürme Etkisinin Agrege $A\beta_{1-42}$ ELISA Analizi ile İncelenmesi

Seçilen Kom 1 ve Kom 2’nin en yüksek çözünürlük gösterdiği 24 saatte agrege $A\beta_{1-42}$ ELISA analizi yapıldı (Şekil 53). 24 saatte Kom 1 ve Kom 2’nin $A\beta_{1-42}$ plaklarını çözündürme etkinliklerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık gösterdiği saptandı ($p < 0,001$).



Şekil 53. Polifenol kombinasyonlarının A β_{1-42} plak çözündürme etkinliğine ait ELISA sonuçları. İstatiksel anlamlılık: **p< 0,001, *p<0,05 (Ortalama±Standart Hata, her koşul 9 kez tekrarlanmıştır).

Yapılan çözündürme değerlendirilmesi verilerine göre, A β_{1-42} 'nin her bir polifenol kombinasyonu ile anlamlı düzeyde çözündüğü istatistiksel olarak saptandı (p<0,001). Kombinasyon uygulamaları öncesi 1395 ng/ml olan A β_{1-42} 'nin Kom 1 uygulaması ile 59 ng/ml, Kom 2 uygulaması ile 157 ng/ml'ye düştüğü saptandı.

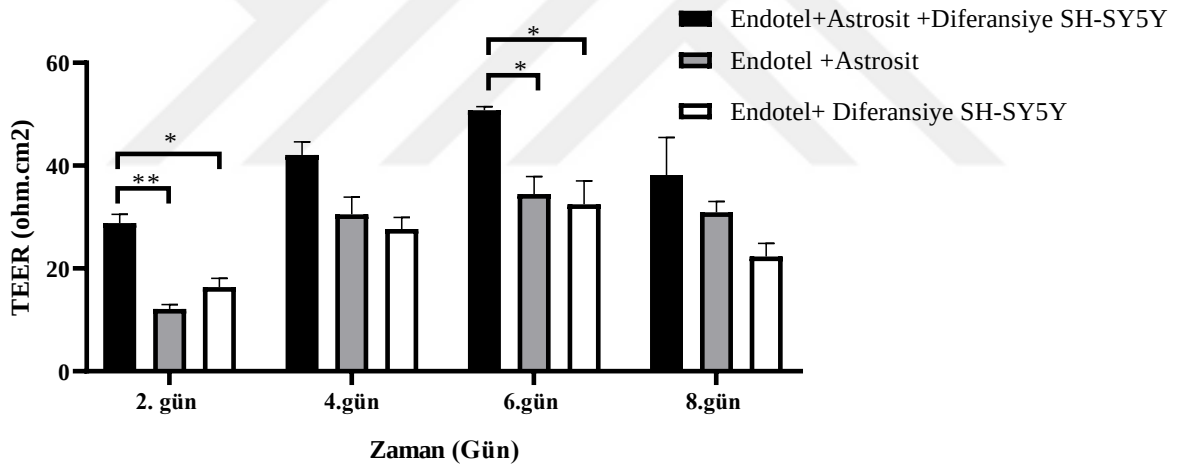
4.10. *In-vitro* KBB'i modelinin Doğrulanması

Bu noktaya kadar yapılan uygulamalar sonucunda A β_{1-42} plak oluşumu kalitatif ve kantitatif yöntemler kullanılarak doğrulanmış ve oluşan bu plakların polifenol kombinasyon uygulamaları ile büyük oranda çözündürüldüğü tüp içinde yapılan deneyler ile saptanmıştır. Elde edilen bu verilerin *in-vivo*'ya en yakın olan *in vitro* KBB modelinde de denenmesi için öncelikle ikili ve üçlü kültür modelleri ile KBB oluşturulması ve bütünlüğünün (TJ artışının) doğrulanması hedeflenmiştir.

4.10.1. TEER Ölçümü

Oluşturulan KBB'lerinin bütünlüğü, hücre-hücre bağlantılarının gelişmişliğini ifade eden TEER ölçümü alındı. İkili (endotel + astrosit ve endotel + diferansiye SH-SY5Y hücreleri) ve üçlü (endotel + astrosit + diferansiye SH-SY5Y hücreleri) modeller birbiri ile KBB modellerinin oluşturulmasından sonraki 2.,4.,6. ve 8. günlerde alınan TEER değerleri ile karşılaştırıldı. 2. günün TEER değerleri karşılaştırıldığında, ikili KBB modelleri olan endotel+

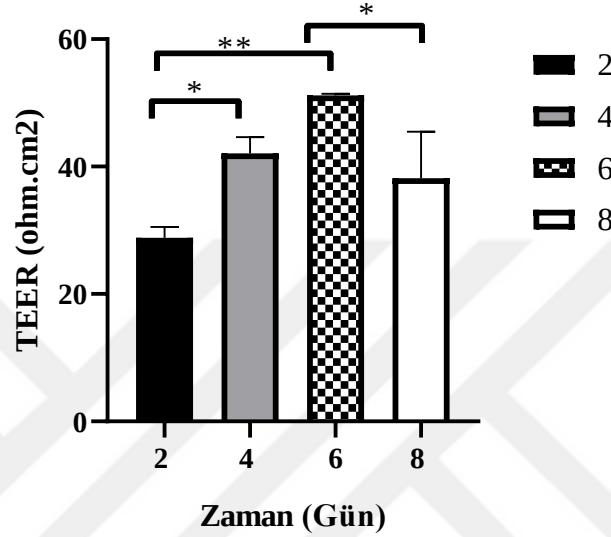
astrozit ($12,47 \pm 0,85 \Omega\text{cm}^2$) ve endotel+diferansiye SH-SY5Y hücreleri ($16,38 \pm 1,69 \Omega\text{cm}^2$) arasında anlamlı bir fark olmadığı saptandı ($p>0,05$) (Şekil 54). Üçlü KBB modelin 2. gün TEER değeri ile ($28,81 \pm 1,69 \Omega\text{cm}^2$) endotel +astrositten oluşan modelin TEER değeri karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulundu ($p< 0,001$). Aynı zamanda üçlü KBB model ile endotel+ diferansiye SH-SY5Y'den oluşan modeller arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı ($p<0,05$). 4. ve 8. günlerde tüm modeller arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$). 6. gün TEER ölçümleri değerlendirildiğinde üçlü model ($50,76 \pm 0,69 \Omega\text{cm}^2$) ile Endotel+astrozit'den oluşturulan ikili KBB modeller arasında ($34,48 \pm 3,38 \Omega\text{cm}^2$) anlamlı bir fark bulundu ($p<0,05$). Diğer ikili model olan Endotel+diferansiye SH-SY5Y ($32,48 \pm 4,55 \Omega\text{cm}^2$) ile üçlü KBB model karşılaştırıldığında, bu modeller arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı ($p<0,05$). 6. gün ikili modeller arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$). En yüksek TEER değerleri tüm modeller için 6. günde elde edildi.



Şekil 54. KBB modellerinde TEER ölçümü. İstatistiksel anlamlılık: ** $p< 0,001$, * $p<0,05$ (Ortalama±Standart Hata, her koşul 9 kez tekrarlanmıştır).

TEER değerinin KBB modelinin TJ bağlantılarının artışının göstergesi olması nedeniyle, en yüksek TEER değerine sahip 6. gün üçlü KBB modeli seçildi. Seçtiğimiz bu modelin günler arasında farklılık gösterip göstermediği istatistiksel olarak değerlendirildi. (Şekil 55). Üçlü KBB modeli için 2.gün ile 4.gün arasında, 6.gün ile 8. gün arasında, 2.gün ile 6.gün arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir. (sırasıyla, $p<0,05$, $p<0,05$, $p<0,01$). Bununla birlikte 4. ve 6. gün arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Bu

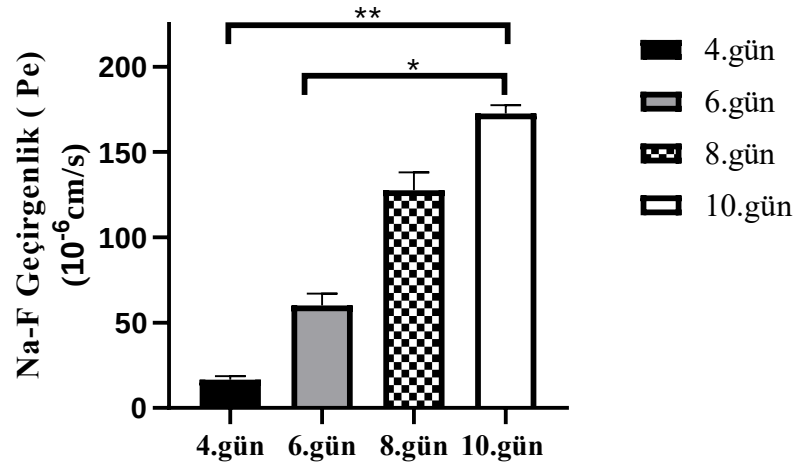
nedenle denemelerimizde kullanılacak olan KBB modelinin geçirgenlik değerlendirilmesinin 4.gün ile 10.gün arasında yapılmasının uygun olacağına karar verildi. TEER ölçümü açısından 4.gün ile 6. gün arasında anlamlı bir farkın görülmemesi nedeniyle diğer deneyler için uygulamalar 4. gün gerçekleştirildi.



Şekil 55. KBB üçlü modelinde günler arasındaki TEER ölçümünün değerlendirilmesi. İstatistiksel anlamlılık: ** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ (Ortalama±Standart Hata, her koşul 9 kez tekrarlanmıştır).

4.10.2. Transendotelyal Geçirgenlik Katsayısının Belirlenmesi

Üçlü kültür ile (endotel-astrosit-diferansiye SH-SY5Y) oluşturulan KBB'nin geçirgenlik düzeyi transendotelyal geçirgenlik katsayısının (Pe) belirlenmesi ile değerlendirildi. Geçirgenlik analizinde NAF kimyasalı kullanıldı. En yüksek TEER ölçümüne sahip, üçlü KBB model için 4. gün, 6.gün, 8.gün ve 10. günlerde Pe değerleri saptandı (Şekil 56).

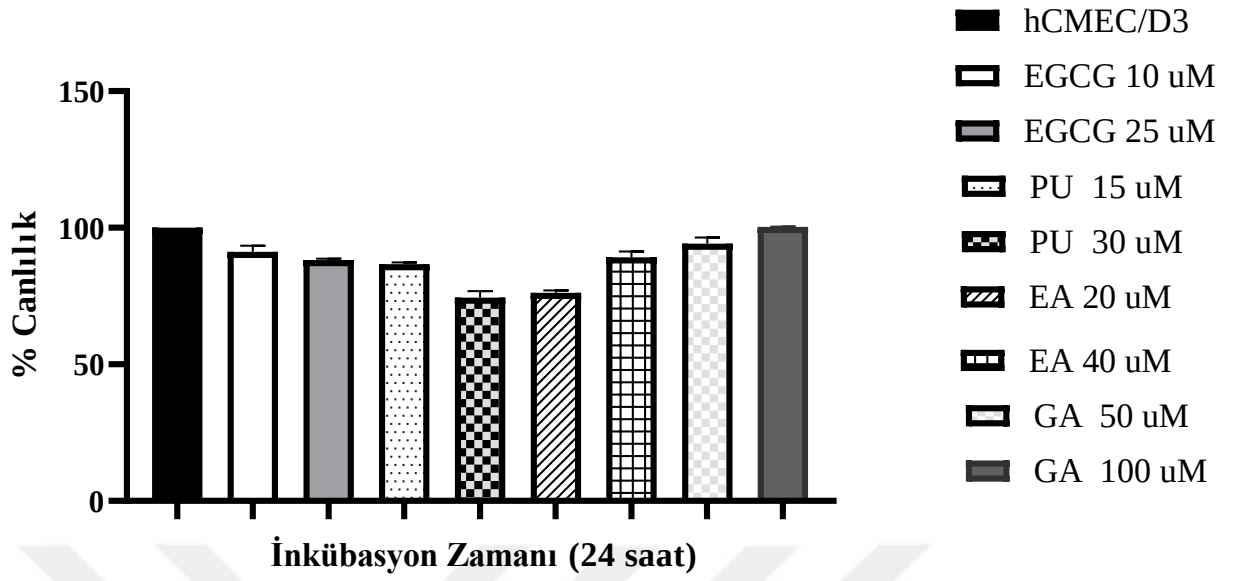


Şekil 56. Üçlü KBB modelinde geçirgenlik analizi. İstatiksel anlamlılık:** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ (Ortalama±Standart Hata, her koşul 9 kez tekrarlanmıştır).

4.gün ve 6. gün arasında anlamlı bir fark gözlenmedi ($p > 0,05$), ancak 4. gün ile 10.gün arasında ve 6. gün ile 10. gün arasında istatistiksel bir fark elde edildi (sırasıyla $p < 0,001$, $p < 0,05$). Elde edilen veriler ile KBB modelinin 10.güne kadar (6.ve 8. günler) geçirgenliğinde bir değişiklik olmadığı ve deney uygulamaları için uygun olduğu saptandı.

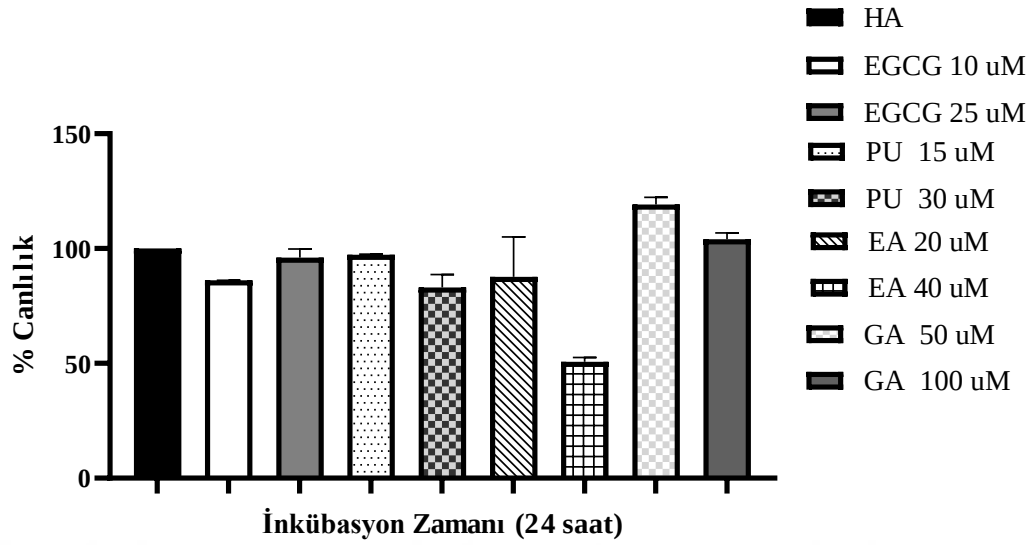
4.11. Endotel ve Astrosit Hücre Canlılıklarına Polifenol ve Polifenol Kombinasyonlarının Etisinin İncelenmesi

EGCG, Punicalagin, Ellagic asid ve Gastrodin polifenollerinin hCMEC/D3 endotel ve astrosit hücre canlılıkları üzerine etkisi incelendi (Şekil 57, Şekil 58). Her bir polifenol için 2 farklı doz denendi, polifenollerin 24 saatte yaklaşık %80 hücre canlılığı sağlayan dozları uygulamalarımız için seçildi. Polifenol dozları olarak EGCG 25 μM , Punicalagin 15 μM , Ellagic asid 20 μM ve Gastrodin 100 μM olarak belirlendi.



Şekil 57. hCMEC/d3 hücre hattında EGCG, PU, EA ve GA'nın 24 saat inkübasyonu ile % canlılık değerleri (Ortalama±Standart Hata, her koşul 9 kez tekrarlanmıştır).

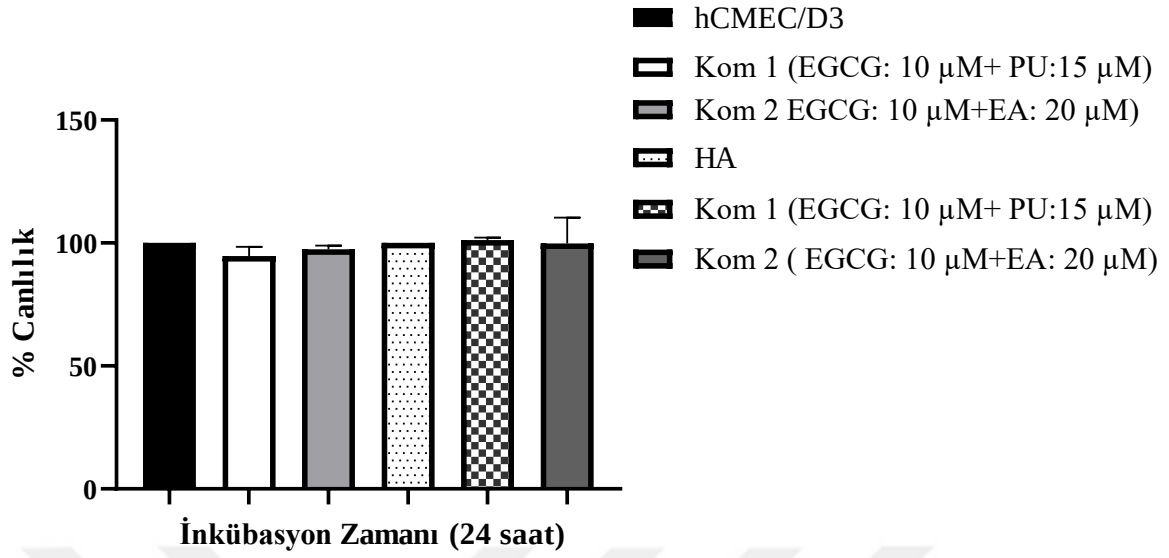
Polifenollerin hCMEC/d3 hücrelerine uygulandıktan 24 saat sonra hücre canlılık değerleri EGCG (10 μ M ve 25 μ M) için sırasıyla % 92, % 88,22 , PU (15 μ M ve 30 μ M) için %86,72, % 74, 4, EA (20 μ M ve 40 μ M) için % 77, %89,2, GA (50 μ M ve 100 μ M) için, %94,2, % 100,2 bulundu.



Şekil 58. Astrosit hücre hattında (HA) EGCG, PU, EA ve GA'nın 24 saat inkübasyonu ile % canlılık değerlerinin değişimi. (Ortalama±Standart Hata, her koşul 9 kez tekrarlanmıştır).

Polifenollerin HA hücreleri uygulandıktan 24 saat sonunda hücre canlılık oranları EGCG (10 μ M ve 25 μ M) için sırasıyla % 86, % 96,0, PU (15 μ M ve 30 μ M) için %97, % 83, EA (20 μ M ve 40 μ M) için % 100,5, % 51, GA (50 μ M ve 100 μ M) için, % 120, % 105 bulundu. hCMEC/D3 hücrelerine kombinasyon uygulanmasının 24 saat sonunda hücre canlılığı Kom 1(EGCG: 10 μ M+ PU:15 μ M) 'de %95, Kom 2 (EGCG: 10 μ M+EA: 20 μ M) ise, %98 oranında belirlendi. HA hücrelerine kombinasyon uygulanmasının 24 saat sonunda hücre canlılığı ise, Kom 1 (EGCG: 10 μ M+ PU:15 μ M) 'de % 101, Kom 2 (EGCG: 10 μ M+EA: 20 μ M) ise, %99,8 oranında belirlendi.

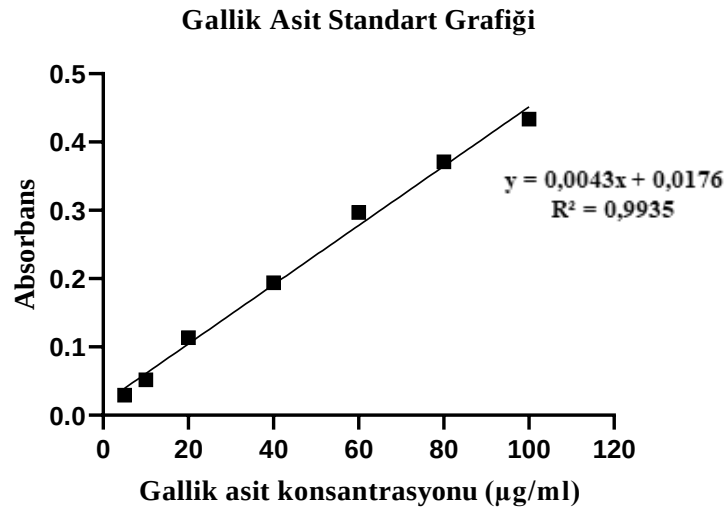
Seçilen kombinasyon dozlarının hem endotel hCMEC/D3, hemde astrosit HA hücreleri üzerinde herhangi bir toksik etki göstermediği saptandı (Şekil 59).



Şekil 59. hCMEC/D3 ve HA hücrelerinde polifenol kombinasyonunun 24 saat inkübasyonu ile % canlılık değerlerinin değişimi. (Ortalama±Standart Hata, her koşul 9 kez tekrarlanmıştır).

4.12. Polifenollerin üçlü KBB modelinden geçişinin değerlendirilmesi

Polifenollerin üçlü KBB modelinden geçişinin değerlendirilmesinde Folin Ciocalteu metodu kullanıldı. Polifenol standardı olarak Gallik asit kullanıldı (Şekil 60). Her bir polifenolün KBB'inden geçişi gallik asit eşdeğerinin ölçülmesi ile saptandı (Tablo 4).



Şekil 60. Gallik asit standart grafiği.

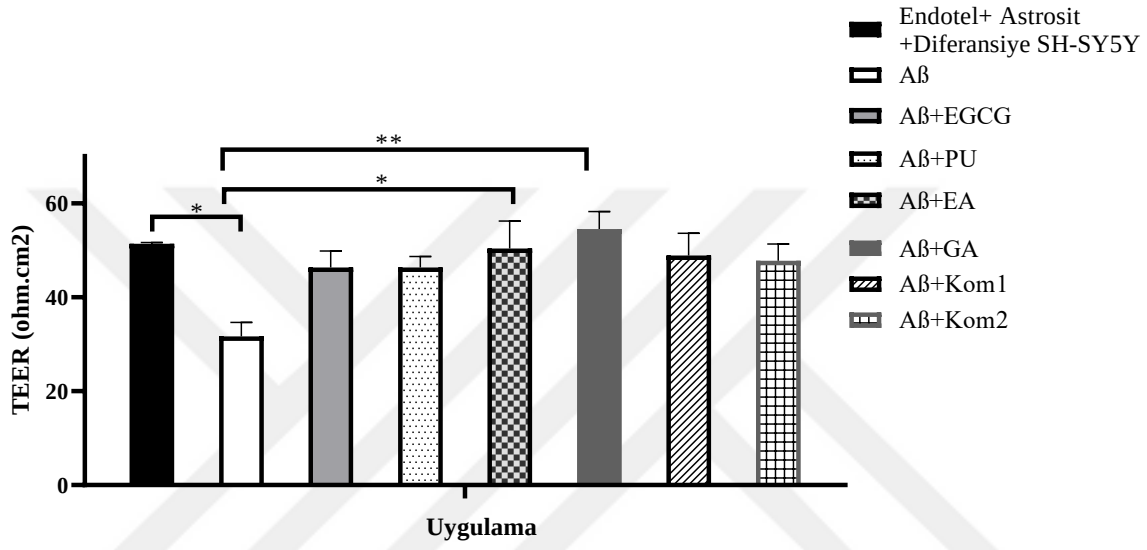
Tablo 4. Polifenollerin KBB modelinden geçişlerinin gallik asit eşdeğeri

Polifenol	Kan Beyin Bariyeri Geçiş Miktarı						
	0.saat Luminal ($\mu\text{g}/\text{Gallik asit}$ eşdeğeri)	6.saat Abluminal ($\mu\text{g}/\text{Gallik asit}$ eşdeğeri)	6. saate göre (%) geçiş	12. saat Abluminal ($\mu\text{g}/\text{Gallik asit}$ eşdeğeri)	12. saate göre (%) geçiş	24. saat Abluminal ($\mu\text{g}/\text{Gallik asit}$ eşdeğeri)	24. saate göre (%) geçiş
EGCG 25 μM = 85,777 μg gallik asit	85,777	75,331	87,22	57,065	65,016	40,537	47,258
Punicalagin 15 μM = 49,608 μg gallik asit	49,608	30,358	61,19	29,004	62,229	28,094	56,631
Ellagic acid 20 μM = 50,120 μg gallik asit	50,120	48,965	97,69	36,567	72,958	48,000	95,770
Gastrodin 100 μM = 31,625 μg gallik asit	31,625	22,194	70,18	13,104	41,435	15,261	48,256

Polifenollerin KBB’inde geçişlerinin/ geçiş miktarlarının gallik asit eşdeğeri cinsinden belirlenmesinden sonra her bir polifenol için A β çözünmesini sağlayan doza eşdeğer olacak bir faktör belirlendi. Belirlenen faktöre göre KBB’nin luminal tarafına uygulanacak polifenol dozları hesaplandı. Diferansiye SH-SY5Y hücreleri için seçilen EGCG dozu 2,5 μM idi. EGCG KBB geçişi %87,82 olduğundan KBB’nin luminal tarafına uygulanacak EGCG dozu 2,85 μM olarak hesaplandı. Diferansiye SH-SY5Y hücreleri için seçilen PU 7,5 μM idi ve KBB den geçişi % 61,19 olduğundan KBB’nin luminal tarafına uygulanacak doz 12,25 μM olarak hesaplandı. Diferansiye SH-SY5Y hücreleri için seçilen EA 10 μM seçilmişti. KBB geçişi % 97,69 olduğundan KBB’nin luminal tarafına uygulanacak doz 10,24 μM olarak hesaplandı. Diferansiye SH-SY5Y hücreleri için seçilen GA 25 μM olduğundan KBB geçişi % 70,18 olduğundan KBB’nin luminal tarafına uygulanacak doz 35,62 μM olarak hesaplandı.

4.13. Üçlü KBB modeline A β ve Polifenol/Polifenol Kombinasyonlarının Uygulanması

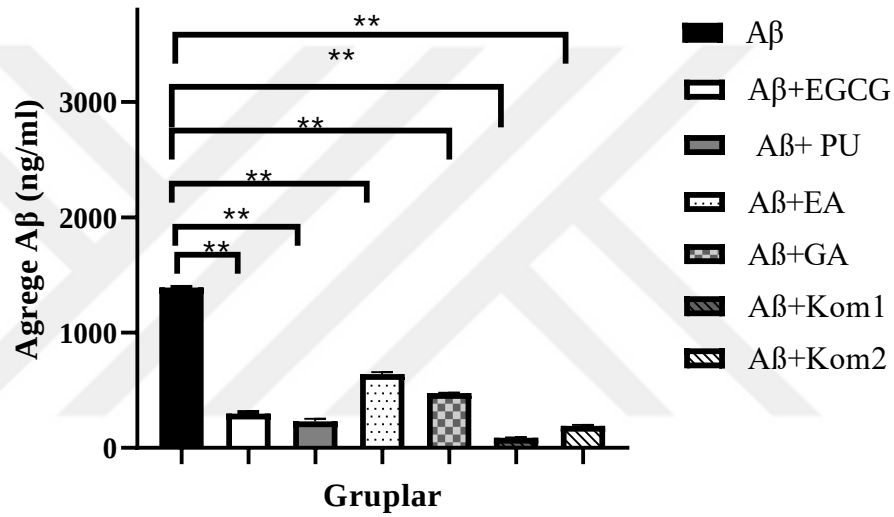
A β_{1-42} nin üçlü kültür KBB modelinde oluşturduğu toksisiteye bağlı olarak KBB'nin bütünlüğünün nasıl etkilendiği, hücre-hücre etkileşimlerinin nasıl değiştiği TEER değerlerinin incelenmesi ile saptandı (Şekil 61). Ayrıca A β_{1-42} ile birlikte polifenol/polifenol kombinasyon uygulamalarının TJ sıkı bağlantıları üzerindeki etkisi de alınan TEER değerleri yorumlandı.



Şekil 61. KBB modelline A β_{1-42} ve polifenol uygulamaları sonrası 6. günde TEER değerleri. İstatistiksel anlamlılık: **p< 0,001, *p<0,05 (Ortalama±Standart Hata, her koşul 9 kez tekrarlanmıştır).

KBB modelinde A β_{1-42} 'nin bulunması ve bulunmaması arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlendi (p<0,05). A β_{1-42} uygulanması ile düşen TEER değeri bariyer bütünlüğünün ve sıkı bağlantıların bozulduğunu göstermektedir. Bunun yanı sıra, polifenol ve polifenol kombinasyonlarının A β_{1-42} ile beraber KBB 'ye uygulanması sonucunda TEER değerlerinde yükselme olduğu saptandı. A β_{1-42} uygulanan grup ile A β_{1-42} +EA ve A β_{1-42} + GA uygulanan grup karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (sırasıyla p<0,05 ve p<0,001). Polifenol ve polifenol kombinasyonlarının uygulanması sonucu yükselen TEER değeri bütünlüğün iyileştirilmesi sıkı bağlantıların oluşumuna katkı sağlayabileceğini göstermektedir.

Uygulanan bu polifenol ve kombinasyonlarının $A\beta_{1-42}$ plak çözündürme etkinliği agrege $A\beta_{1-42}$ ELISA yöntemi ile KBB modelinden alınan örneklerde incelendi (Şekil 62). $A\beta_{1-42}$ ile polifenol/kombinasyon uygulanan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p<0,001$) ve en yüksek çözünürlük miktarının Kom 1 uygulanan grupta olduğu görüldü. Agrege $A\beta_{1-42}$ ölçüm değerleri $A\beta$ grubunda 1390 ng/ml iken, EGCG uygulaması ile 297 ng/ml, PU uygulaması ile 229 ng/ml, EA uygulaması ile 641 ng/ml, GA uygulaması ile 476 ng/ml, Kom 1 uygulaması ile 88 ng/ml, Kom 2 uygulaması ile 192 ng/ml olarak saptandı.



Şekil 62. KBB modeline uygulanan polifenol/kombinasyonlarının $A\beta_{1-42}$ plaklarını çözündürme etkinliği. İstatistiksel anlamlılık: ** $p<0,001$, * $p<0,05$ (Ortalama±Standart Hata, her koşul 9 kez tekrarlanmıştır).

5. TARTIŞMA

Alzheimer hastalığının primer nedeni olan A β peptidinin aşırı üretiminin ve birikiminin yarattığı toksik etkinin, hastalığı başlatıcı faktörlerden biri olduğu düşünülmektedir. A β peptidinin en yaygın formları A β_{40} ve A β_{42} 'dir ve bu formları arasında A β_{42} 'nin en toksik form olduğu düşünülmektedir [23]. Hastalık patogenezinin A β_{42} peptid birikiminin yanı sıra günümüzde kolinerjik, tau, eksitoksisite, oksidatif stres ve ApoE gibi faktörlerin de eşlik ettiği düşünülmektedir ve bu kompleks patogenezin kesin tedavisi henüz bulunmamaktadır [14] [23]. Günümüzde kullanılan tedaviler daha çok hastalığın belirtilerini ortadan kaldırmaya veya semptomları yavaşlatmaya yöneliktir. Bu amaçla, aşırı glutamatın salınımının önlenmesi ile hücre ölümünü azaltan NMDAR antagonistleri ve asetilkolin sinaptik konsantrasyonunu arttıran kolinesteraz inhibitörleri kullanılması ile beraber, günümüzde A β 'nın çözündürülmesi ya da azaltılmasına yönelik tedavi stratejileri üzerinde de yoğun araştırmalar sürmektedir. Sekretaz enzimlerinin düzenlenmesi (özellikle β - ve γ sekretaz inhibitörleri), amiloid plaklarının çözündürülmesi, amiloid agregasyonunun engellenmesi, amiloid temelli immünoterapi yaklaşımları başta olmak üzere, özellikle fibril agregasyonu oluşmadan önce A β α -heliks doğal yapısını stabilize etmek ya da var olan β -sheet yapısını destabilize eden bileşiklerin tanımlanması amiloidojenik patolojinin tedavisi için son yıllarda üzerinde araştırma yapılan terapötik bir yaklaşım haline gelmiştir [1][49]. AH'da etkili bir tedavinin geliştirilmesi için A β 'nin protein sekansı, yapısı, çözünürlüğü, proteinin agregasyonunun inhibisyonunu karakterize etmek için çeşitli ajanların geliştirilmesinin ve ilaç dağılım yollarının belirlenmesinin önemli noktalar olduğu düşünülmektedir [48] [173]. Bu yaklaşımla toksik olan oligomerlerin ya da çözünmez fibril/plak oluşumlarının engellenebileceği umut edilmektedir [47][174][175]. A β agregasyonunu engelleme/bozma stratejisi için A β plak oluşumundan sorumlu olan A β peptid sekansındaki anahtar bölgelerin aydınlatılmasının (N-terminal, hidrofobik çekirdek, dönüş bölgesi ve C-terminal) ve agregasyon inhibitörlerinin geliştirilmesinin önemli bir nokta olduğu düşünülmektedir [176]. Bu amaç doğrultusunda, yapılarında çoklu aromatik halka içermeleri, antioksidan, anti-inflamatuar ve nöroprotektif etkileri ile doğal polifenoller A β agregasyonunu engelleme/bozma stratejisinde öne çıkmaktadırlar. Polifenollerin A β agregasyonunu engelleme/bozma etkilerini, hidrofobik güçler, elektrostatik ve aromatik etkileşimler ile hidrojen bağ oluşumlarını bozarak ve/veya non-kovalent bağları inhibe ederek gerçekleştirdikleri belirtilmektedir [59][60][78].

2019 yılında yapılan bir araştırmada, stilben (80 μ M) ve flavanoid (80 μ M) ailesinden seçilen iki farklı polifenol grubunun 12 ve 24 saatteki 80 μ M A β ₁₋₄₂ agregasyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir [45]. Bu çalışmada, flavonoid ailesinden olan galloktekin gallat ve theaflavin'in A β ₁₋₄₂ agregasyonunu tamamen engelleyebildiği, ancak iki stilben grubu üyesi resveratrol ve bir glukozit türevinin A β ₁₋₄₂ agregasyonu çok daha az bir ölçüde baskılayabildiği belirtilmiştir. Araştırmacılar, Resveratrolün ilk 12 saatte A β ₁₋₄₂ agregasyon oluşumunu hızlandırdığını ancak 24. saatte agregasyonu azalttığını saptamışlardır. Atomik kuvvet mikroskobu ve elektrokimyasal analizlerden alınan verilere dayanarak, flavanoid grubunun stilben grubuna göre daha fazla aromatik halka ve hidroksil grubu içermesinin A β ₁₋₄₂'ile daha fazla etkileşime girme kapasitesi oluşturduğu düşünülmektedir. Ayrıca, iki flavanoid yapısal olarak farklılık göstermesine rağmen, A β ₁₋₄₂ agregasyonunu çözündürme özellikleri benzer bulunmuştur. Bu bilgiler polifenol yapısının A β ₁₋₄₂ agregasyonunu engelleyici/çözücü özelliği açısından önem taşıdığını vurgulamaktadır [45]. Çok sayıda çalışma anti-agregasyon bileşiklerinin etkilerini hidrojen bağı, kovalent ve non-kovalent bağ veya hedef proteinin yan zincir kalıntıları ile arasındaki yük etkileşimleri aracılığıyla olduğunu ortaya koymuştur [59][62] [78]. Yapılan çalışmalar polifenollerin aromatik halkalarının A β 'nın hidrofobik amino asit kalıntıları (Tyr, Phe) ile kovalent etkileşimler oluşturduklarını, polifenollerin hidroksil gruplarının ise A β 'nın hidrofilik amino asitleri ile (His6, Ser8, Tyr10, His14, Lys16) etkileşime girdiğini göstermektedir [62][177]. Bu amaçla, çalışmamızda farklı grupları temsil eden flavanoid (EGCG), tanenler (punicagalin), fenolik asit (Ellagic acid) ve fenolik glikozid (gastrodin) polifenollerini seçilmiştir. Bu polifenollerin farklı hidrofobik ve hidrofilik grupları içermelerine bağlı olarak A β yapısındaki hidrofobik ve hidrofilik amino asitlerle etkileşime girmelerinin mümkün olacağı ve daha etkili çözündürme sağlayabileceği düşünülmüştür.

Polifenollerin uygulamalarından önce, A β ₁₋₄₂ peptidinin plak oluşturulması ve doğrulanmasının gerekliliği pek çok araştırmada vurgulanmaktadır. A β ₁₋₄₂ peptidinin plak oluşumu için, hangi çözgenin kullanılacağı ve A β ₁₋₄₂'nin ne kadar süre 37 °C'de inkübe edileceğine ait veriler incelendiğinde; A β ₁₋₄₂ peptidinin plak oluşumu için farklı araştırmalarda farklı doz ve sürelerin kullanıldığı görülmektedir. Bunun yanı sıra, A β ₁₋₄₂'nin yapısal olarak kendiliğinden agregat olma eğiliminde olduğu bilinmektedir. Bu nedenle öncelikle A β ₁₋₄₂ yapısı monomerik forma dönüştürülmeli ardından istenilen oligomerik, fibril veya plak oluşumu sağlanması gerekmektedir. Monomerik yapıya dönüştürmede kullanılan en yaygın yöntem, florlanmış organik çözücü HFIP'in ardından (1,1,1,3,3,3-heksafloro-2-propanol) DMSO

çözgenini kullanmaktır ancak Timothy ve ark. bu yöntemin % 100 etkili olmadığını belirtmektedirler [178]. Araştırmacılar, NH_4OH gibi güçlü alkalilerle monomerik hale getirmenin diğer çözümlere göre daha üstün olduğu ortaya konmuştur. Çalışmamızda bu araştırmanın verileri baz alınarak NH_4OH çözgeni kullanılmış ve elde edilen FESEM , ThT ve agregre $\text{A}\beta$ sonuçları seçmiş olduğumuz plak oluşturma yönteminin verimliliği ortaya konulmuştur.

Yapısal farklılıklarına bağlı olarak polifenollerin A β ₁₋₄₂ plakları ile etkileşimlerinin zamana bağlı olarak farklılık göstermesi beklenen bir sonuçtur. Verilerimiz incelendiğinde; EGCG ve Ellagic asid'in 48. saatte, Punicalagin ve Gastrodin'in en iyi çözündürmeyi 36. saatte gerçekleştirdiği saptanmıştır. EGCG ile ilişkili araştırmalar ile verilerimiz değerlendirildiğinde; çalışmamıza paralel sonuçları olan Ehrnboefer ve arkadaşları [63], 75 μ M EGCG'nin 72 saat inkübasyon sonucunda, kararlı hidrojen bağları yaparak 15 μ M konsantrasyonundaki A β fibril/plak oluşumunu tamamen engellediği ortaya koymuşlardır. Yine aynı grubun yapmış olduğu diğer bir araştırmada da 50 μ M EGCG'nin 15 μ M A β fibrillerini/plaklarını küçük toksik olmayan amorf protein yapılarına dönüştürdüğü saptanmıştır [62]. Araştırmamızın FESEM, ThT ve agrege A β sonuçları 2.5 μ M EGCG'nin, 10 μ M A β 'yı etkin bir şekilde çözündürdüğünü ortaya koymuştur (p<0,001).

Seçtiğimiz diğer bir polifenol olan 10 μM Ellagic asid 10 μM A β 'yı 48. saatte çözündürmüştür ($p<0,001$). Feng ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, 100 μM EA'nın 2.,6.,12. ve 24. saat A β_{42} (10 μM) ile birlikte inkübasyona bırakılarak, TEM, Western Blot, dairesel dikroizm spektroskopisi ve ELISA yöntemleri ile agregasyon üzerine etkileri incelenmiştir. Araştırma verileri, EA'nın plak oluşumunu bozarak fibriller yapıyı desteklediğini göstermektedir. Bunun yanı sıra, 1 μM A β_{42} ve 2 μM , 5 μM ve 10 μM EA'nın birlikte SH-SY5Y hücrelerine uygulamasının A β toksisitesini azalttığı belirtilmektedir [73]. Ellagic asidin A β_{42} plaklarını çözündürme bulgularımız Feng ve arkadaşlarının bulguları ile uyushmasına karşın, Feng ve ark.'nın kullandığı EA dozu çalışmamızda kullanmış olduğumuz dozdan 10 kat fazladır. Çalışmamızın FESEM görüntülerimiz ile Feng ve ark.'nın TEM görüntüleri karşılaştırıldığında EA uygulmamızın A β_{1-42} plaklarını Feng ve ark.'daki gibi fibriler yapı oluşturarak değil katmanlarına ayırarak ve yapıyı incelterek çözündürdüğü gözlemlenmektedir. Bu etkinin kullanmış olduğumuz EA dozu ve/veya kullanılan A β_{1-42} markasına bağlı olabileceğini düşünmekteyiz.

Araştırmamızın 25 μ M Gastrodin'in 10 μ M A β plaklarını 36. saatte etkin bir şekilde çözüldüğünü FESEM, ThT ve agregate A β sonuçları ile ortaya konmuştur ($p < 0,001$). Gastrodinin pek çok *in vitro* ve *in vivo* çalışma da, AH tedavisi için terapötik etki potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir fakat literatür bilgilerimize göre, *in vitro* olarak Gastrodinin A β_{1-42} plaklarını çözündürme etkisini inceleyen bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle Gastrodinin A β_{1-42} plaklarını çözündürme etki potansiyelinin olduğunu gösteren bulgularımızın literatüre katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

7,5 μ M Punicalagin 10 μ M A β 'yı 36. saatte etkili bir şekilde çözündürmüştür ($p < 0,001$). Çalışmamızda kullanılan bir diğer polifenol olan punicalagini içeren çalışmada, *in silico* etkileşimli modelleme yapılarak PC12 hücrelerinde anti-agregasyon özelliği ve A β_{1-42} 'nin nöronal toksisitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Polifenolik molekülün başlıca stearik ve hidrojen bağ etkileşimleri aracılığıyla 10 μ M A β_{1-42} 'e bağlandığı ve 48. saatte 100 μ M punicalagin'in nörotoksositeyi önemli derecede inhibe ettiği gösterilmiştir. Punicalagin'in büyük molekül ağırlığı nedeniyle A β_{1-42} 'nin Leu17den Val39 kalıntılarından bağlandığı saptanmıştır [78]. Bulgularımız çözünürlüğü sağlanması yönü ile paralellik göstermesine karşın bizim kullanmış olduğumuz punicalagin dozu 13 kat düşüktür. Çalışma verilerimiz, seçtiğimiz polifenol dozlarının literatürde seçilen dozlara oranla oldukça düşük olmasına rağmen, A β_{1-42} plaklarını farklı şekillerde ve etkili bir şekilde çözdüğünü göstermiştir.

Son yıllarda yapılan araştırmalar, polifenolik bileşiklerin tek başına kullanılması yerine kombinasyonları ile sinerjik etki oluşturarak, A β üzerine daha etkili sonuçlar alınabileceği, AH tedavisi stratejilerine yeni bilgiler kazandırabileceği ve tedavi ajanı olarak kullanılabileceklerini vurgulamaktadır [50]. EGCG'nin balık yağı ile kombinasyonunun Tg 2576 transgenik fareler üzerindeki etkisini inceleyen çalışmada A β_{1-40} , A β_{1-42} düzeylerinde ve A β plak oluşumunda azalma olduğu belirtilmiştir [179]. Choi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, daidzein ve baicalein flavanodillerinin A β agregasyonu üzerindeki etkileri incelenmiş ve flavanoidlerin bireysel kullanımlarından ziyade kombinasyon olarak uygulamaların sinerjik etki yaratarak A β agregasyonu üzerinde daha etkili sonuçlara ulaşıldığı ortaya konulmuştur [180]. Benzer çalışmalar resveratrol ve EGCG'nin kombinasyonunda ayrıca EGCG ve ferulik asitin kombinasyonunda da tek tek kullanımlarına göre daha etkili protektif etki ve kognitif bozukluğu iyileştirici etkileri gözlenmiştir [7][8]. Çalışmamızdaki polifenollerin kombinasyon uygulaması ile bireysel olarak A β_{1-42} plaklarını çözündürme etkinliklerinin

değerlendirilmesinin ardından oluşturulan altı adet ikili kombinasyonun tümü çeşitli oranlarda A β ₁₋₄₂ plaklarını çözdüğü saptanmıştır. Kom 1 (EGCG: 2,5 μ M + PU: 7,5 μ) ve Kom 2 (EGCG: 2,5 μ M + EA: 10 μ M) ‘nin 10 μ M A β ₁₋₄₂ plaklarını istatiksel olarak anlamlı düzeyde çözdüğünü ortaya koymuştur (p<0,001). Verilerimiz, ilk kez polifenol kombinasyon uygulamasının A β ₁₋₄₂ plaklarını çözündürme etkinlikleri potansiyeline sahip olduğunu ve bir sinerjik etki oluşturarak daha kısa sürede, daha etkin A β ₁₋₄₂ plaklarını çözünürlüğü sağladığını ortaya koymuştur.

Literatürde yer alan bu polifenollerin çözündürme etkinlik dozları, çalışmamızda kullanılan dozlara göre oldukça yüksektir, ancak bu çalışmalarda doz belirleme çalışmaları PC12 ve SH-SY5Y gibi kanser kökenli daha dirençli hücre hatları üzerinde yapılmıştır. Yüksek dozların nedeninin diferansiye hücrelere göre daha dirençli olan hücre hatlarına bağlı olabileceğini düşünmekteyiz.

Son yıllardaki çalışmalar incelendiğinde yapılan *in vitro* çalışmalar ile *in vivo* ‘ya daha benzer sonuçlara ulaşmak için hücrelerin *in vivo* ortamındaki davranışına yakın yanıt veren hücrelerle çalışılmasının büyük önem arz ettiği vurgulanmaktadır. Özellikle Alzheimer ile ilgili çalışmalarda genellikle SH-SY5Y hücreleri kullanılmasına karşın, son zamanlarda bu hücrelerin diferansiye edilmeden çalışılmasının uygun olmadığı vurgulanmaktadır [9][10][136][181].

Diferansiye edilmiş ve edilmemiş SH-SY5Y hücreleri arasındaki en önemli fark; hücrelerin nöronal sinyalleri taşımasında önemli rol oynayan polarizasyonunun farklanmasıdır. Diferansiye edilen SH-SY5Y hücreleri diferansiye edilmemiş olanlara göre polarizasyon özelliği kazanmış olmakta ve çeşitli nörotransmitterlerin salınımının artması ile nöron benzeri karakter kazanmaktadırlar. Bunun yanı sıra, Medeiros ve ark. (136), Alzheimer hastalığının kolinerjik nöronların dejenerasyonu ile ilişkili olmasından dolayı araştırmalarda oluşturulan AH modelinin kolinerjik nöron özelliği olan hücreler ile yapılması gerekliliği vurgulanmaktadırlar. Araştırmacılar 2019’da yaptıkları bir mikroyarray çalışması ile, RA ve BDNF’nin kullanımının, kolinerjik enzim aktivitesini arttırdığını ve kolinerjik nöron oluşumunda tetikleyici olduğunu ve AH modelleri için uygun bir diferansiyasyon ajanı olduklarını ortaya koymuşlardır. BDNF’nin nörotrofinlere yanıt veren daha hassas ve daha iyi diferansiyasyon sağlayan bir ajan olduğu ve SH-SY5Y hücrelerine RA ve BDNF’nin ardışık olarak uygulanmasının nöritlerin büyümesini ve sinapsların gelişimini arttırdığı belirtilmektedir

[136]. Yapılan diğer araştırmalarda da RA ve BDNF uygulamasının kolinasetiltransferaz, veziküler asetilkolin taşıyıcı ekspresyonunu ve asetilkolinesteraz aktivitesi artırarak kolinerjik nöronal fenotipe doğru farklılaşmayı sağladığı ortaya konulmaktadır [182][183]. Bunun yanı sıra bazı araştırmalarda da, SH-SY5Y hücrelerine diferansiyasyon için dc-AMP uygulamasının nöron benzer fenotip morfolojik değişikliğe ve nörit uzamasına neden olduğu da belirtilmiştir dc-AMP'nin A β peptid prekürsörü olan APP'nin ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir [184][185]. Bu bilgiler göz önüne alınarak, çalışmamızda farklı ortam içeriklerinin diferansiyasyon üzerine etkileri hücrelerin nörit uzunluğu ve morfolojik değişimlerine göre karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda RA uygulamasının ardından mix medium içeriğindeki, dc-AMP ve BDNF kullanımının AH modeline uygun nöronlar elde edilmesi açısından anlamlı farklılık gösterdiği ($p < 0,001$) ve oldukça önemli olduğu görülmüştür.

Literatürde diferansiye etmek için genellikle RA kimyasalının kullanıldığı görülmüne karşın, RA'nın kısa süreli (5 güne kadar) uygulanmasının nöron-benzeri fenotip (N-tip) hücrelerinin proliferasyonunu indüklerken, uzun süreli (>10 gün) uygulamada endotel-benzeri fenotip (S-tip) hücrelerinin proliferasyonunu sağladığını belirtilmiştir [134]. Bu nedenle, diferansiyasyon protokolünün uygulama süresi hücrelerin farklılaşması üzerindeki etkilerini oldukça etkilediği düşünülmüştür. Ayrıca pek çok çalışma da farklı diferansiyasyon ortam içerikleri kullanılmış ve sonuçları kombinasyon uygulamasının SH-SY5Y hücrelerinin diferansiyasyonunda önemli bir rol oynadığını göstermiştir [134][10][142][183][186][187]. Örneğin, Teppola ve arkadaşları SH-SY5Y hücrelerine RA, kolesterol ve BDNF kombinasyonu uygulaması sonucunda nörit uzunluklarının, dallanmanın ve ağ oluşumunun hücrelerin sadece östradiol veya RA uygulamasından daha yüksek olduğunu göstermişlerdir [188]. Benzer bulgu, Agholme ve arkadaşlarının çalışmasıyla da desteklenmiştir ve RA + BDNF ve RA + BDNF + kolesterol uygulamasının, yalnızca RA uygulamasından daha uzun nörit uzunluğu sağladığı belirtilmiştir [142]. Shiley ve ark.'larının çalışmasında [9], farklı diferansiyasyon içerik kombinasyonunun SH-SY5Y hücrelerinin diferansiyasyonu üzerinde olumlu bir etkisi olduğunu gösterilmiştir. Çalışmalarında, hücrelere 10 gün boyunca RA uygulamasının ardından 8 gün boyunca farklı içeriklerden oluşan ortam: Neurobasal, B27 (1X), KCI (20mM), Glutamax I (2 mM), dc-AMP (2mM), BDNF (50 ng /mL) uygulamasını kullanmışlardır. Shiley ve arkadaşları farklı diferansiyasyon içerik ortamının kullanımı ile literatüre katkıda bulunmuş olmalarına rağmen, ortam içeriklerinin birbiriyle karşılaştırılması gerçekleştirilmemiştir. Bu nedenle ortam içeriklerinin birbiriyle karşılaştırıldığı çalışmamız literatüre katkı sağlamaktadır.

Çalışmamızda, öncelikle hangi ortam içeriğinin (RA, RA-BDNF, RA-Mix, RA-Mix-BDNF) ve zaman diliminin (5 ve 10 gün) daha iyi diferansiyasyon sağladığı MAP2, β -III tubulin, ve NF-H gibi bazı nöronal belirteç proteinlerin ekspresyonları, nörit uzunluğu ve morfolojik değişikliklerin incelenmesini ile değerlendirildi. Çalışmamızda 6. gruptaki hücrelerin β -III tubulin, MAP-2 ve NF-H ekspresyon yoğunluğu kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış göstermektedir (sırasıyla, $p<0,05$; $p<0,001$; $p<0,05$).

Çalışmamızın sonuçlarına paralel olarak, nöronal belirteçler ile yapılan benzer çalışmaları olan Lonnie ve arkadaşlarının araştırmasında SH-SY5Y hücrelerine 5 günlük RA uygulamasının MAP2 ekspresyonunda % 50 artışı oluşturduğu belirtilmiştir [189]. Bir başka çalışmada da, RA uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde nöronal spesifik belirteçler olan Tau, β -III Tubulin ve MAP2 ekspresyonunda artış olduğu ortaya konulmuştur [190]. Roberta ve ark. 7 gün boyunca RA ve starosporinin uygulamasının, SH-SY5Y ve BE (2)-M17 nöroblastom hücrelerinde, nörofilament ve β -III Tubulin ekspresyonunu arttırdığını belirtmiştir [191]. Çalışmamızda ortam içeriklerinin değerlendirilmesinin yanı sıra, diferansiye edilen SH-SY5Y hücrelerinin kaç gün boyunca nöron-benzeri fenotip gösterdiğini, kaç gün boyunca stabil olduğu da değerlendirilmiştir. Shipley ve ark. diferansiye SH-SY5Y hücrelerinin 14. güne kadar stabil olduğu belirtmiş, ancak hangi yöntem kullanılarak bu günün belirlendiği belirtilmemiştir [9]. Çalışmamızda diferansiyasyon süresi sonunda nörit uzunluğu ile diferansiye hücrelerin ne kadar stabil kaldıklarının belirlenmesinin literatüre önemli katkı sağlamaktadır. Çalışmamızın sonuçlarına göre, SH-SY5Y hücrelerinin diferansiyasyonun uygulama süresinin 10 gün, RA+BDNF+dc-AMP+KCI+B27'den oluşan ortam içeriğinin, *in vivo* sonuçlara daha yakın nöron benzeri özellik sağlama ve başta AH modeli için kullanılabilir olması nedeniyle sinir bilimleri ile ilgili çalışmalarda da kullanılabilirliğini önermekteyiz. Araştırmamızın bu kısmını içeren çalışma yayımlanmak üzere kabul edilmiş olup basıma hazırlanma sürecindedir.

Medeiros ve ark. (136)'nın görüşlerine paralel olarak Alzheimer modelinin oluşturulması sürecinde diferansiye hücre kullanılması ile *in vivo*'ya daha benzer sonuçların elde edilebileceğini düşünmekteyiz. Bu nedenle araştırmamızın A β toksisitesi ve agregasyonu ile ilgili iş paketlerinde diferansiye ettiğimiz hücreler kullanılmıştır. A β toksisitesi ile ilgili olarak, yapılan çalışmalar incelendiğinde çalışmalarda diferansiye olan ve olmayan hücreler kullanıldığı için sonuçlar arasında farklılıklar görülmektedir. Jekaterina ve arkadaşları A β_{1-42} ' toksisitesine diferansiye SH-SY5Y hücrelerinin daha hassas olduğunu ifade etmektedirler. Bunun nedeninin diferansiye hücrelerin uzun nöritlere sahip olması ve yüzey alanlarının daha

geniş olmasına bağılı olarak A β ₁₋₄₂ toksisitesinden daha fazla etkilendikleri savunulmaktadır [187]. 2019 yılında yapılmış başka bir araştırmada [181] ise, SH-SY5Y hücrelerini diferansiye etmek için kullanılan RA/BDNF, RA/ tetradekanoilphorbol asetat ve dc-AMP'den oluşan üç ayrı grupta A β ₁₋₄₂ toksisitesi incelenmiştir. RA/BDNF ve dc-AMP uygulanan gruptaki hücrelerin A β ₁₋₄₂ toksisitesine karşı RA/ tetradekanoilphorbol asetat uygulanan gruba oranla çok daha hassas olduğu ortaya konmuştur. Bunun nedeninin dc-AMP'nin APP'nin aşırı ekspresyonunu indüklemesi ile A β ₁₋₄₂ peptidinin toksisitesini arttırmasına bağılı olduğu düşünölmektedir.

Literatürdeki bu bilgiler ışığı altında, AH modeli çalışmalarında diferansiye SH-SY5Y hücrelerinin kullanımının AH modelini daha iyi yansıtması, *in vivo*'ya daha benzer sonuçlara ulaşılması bakımından oldukça önemli olduğu görölmektedir. Bunun yanı sıra, hücre költürü ile yapılan araştırmalarda diferansiye SH-SY5Y hücrelerinin kullanılması, amiloid beta proteininin çözöndürölmesinde polifenollerin kullanılması umut verici veriler sağılasa da, bu verilerin KBB uygun olup olmadığı tartışma konusudur [48][192]. Bu nedenle anti-agregasyon özelliğı gösteren polifenollerin KBB modellerinde çalışılması ve KBB'den geçmeleri büyük önem taşımaktadır [112]. Böylelikle *in vitro* sistemlerin *in vivo* sistemi yansıtırma düzeyinin artacağı ve *in vivo*'ya uyarlanması daha kolay olacağı vurgulanmaktadır. Bu amaçla, geliştirilen *in vitro* alışmalar sıklıkla primer hücreleri veya immortalize beyin endotel hücre hatlarına dayalı hücre költürü KBB modellerine dayanmaktadır. Tekli költür modellerinin kullanımı literatürde yer almasına karşın, bu költürlerdeki hücreler normal fizyolojik sistemdeki nörovasküler sistem ve hücreler arasındaki iletişimden yoksun oldukları bilinmekte ve birçok çalışma, hücreler arası temasın/etkileşimin hücre davranışında önemli olduğunu ortaya koymaktadır. *İn vitro* araştırmalarda kullanılan iki boyutlu hücre çalışmaları basit ve kontrol edilebilir olmalarına rağmen tüm hücresel etkileşimleri ve davranışları incelemede etkili yöntemler değillerdir. Bu nedenle KBB modellerinin özellikle ikili veya üçlü költür sistemlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Tekli endotel hücreleri ile astrosit, perisit, nöron veya glial hücreler ile ikili veya üçlü modellerin oluşturulmasında KBB'nin fonksiyonelliğı ve bütönlüğünde önemli olan TJ bağılantılarının oluşumunu destekleyebileceğı, daha yüksek TEER sonuçları elde edilebileceğı ve hücresel iletişimi daha iyi sağılayabileceğı vurgulanmaktadır [126][127]. KBB modelinin oluşturulmasındaki önemli bir husus da oluşturulan modelin doğırlanmasıdır. Literatürde en yaygın yöntem transendotel elektriksel direncin (TEER) değeriendirilmesinin yanı sıra çeşitli kimyasal ile geçirgenliğı ve TJ

oluşumunda etkili olan protein ekspresyonlarının incelenmesi de kullanılmaktadır. KBB'nin fonksiyonelliğinin ve bütünlüğünün değerlendirilmesinde kullanılan pek çok yöntem olmasına karşın, literatürde sabit bir TEER ve geçirgenlik değeri bulunmamaktadır. Örneğin literatür incelendiğinde tek tabakalı endotel KBB modeli için $2 \Omega\text{cm}^2$ - $1150 \Omega\text{cm}^2$ aralığında TEER değerleri görülmektedir [193]. Bunun yanı sıra, ikili veya üçlü KBB modellerinin nörovasküler üniteyi desteklemesi, TJ bağlantıların oluşumunu desteklemesi nedeniyle TEER değerlerinde tek tabakalı hCMEC/D3'e göre artış olabileceği çeşitli çalışmalarla desteklenmiştir ancak etkili olmadığını belirten çalışmalar da bulunmaktadır [94][131][169]. Örneğin, Daniella ve ark.'nın [169] çalışmasında 4 farklı insan endotel hücre hattı kullanılarak (hCMEC / D3, hBMEC, TY10 ve BB19) tekli ve astrosit (SVG-A hücre hattı) ve perisit hücreleri kullanılarak ikili KBB modellerinin TEER değerlerini karşılaştırmışlardır. Elde edilen verileri bu hücre hatları ile oluşturulan tekli ve ikili KBB modelleri arasında TEER değerleri açısından anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir ($p>0,05$).

Kathryn ve ark.'nın [131] yaptığı çalışmada ise, endotel hücresi olarak hCMEC/D3 seçilip, ikili model olarak iki farklı insan astrosit hücreleri CC-2565 ve SC-1810 ya da insan beyin vasküler perisit hücreleri (HBVP) kullanılıp çeşitli modeller oluşturulmuştur. Modeller, hCMEC/D3 hücreleri arasındaki sıkı bağlantı oluşumunu doğrulamak için 1. günden 10.güne kadar gün aşırı TEER sonuçları değerlendirilerek karşılaştırılmıştır. Tekli modele göre ayrı ayrı astrosit ve perisit hücreleri ile oluşturulan iki modelde TEER değeri anlamlı derece artış gözlenirken ($p<0,001$), iki astrosit hücresi arasında oluşturulan modelde anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0,05$). Endotel, astrosit ve perisit hücrelerinden oluşan üçlü modellerin TEER değerleri tekli modele göre anlamlı bir fark göstermesine rağmen ($p<0,001$), ikili modelden daha düşük TEER değerine sahip olduğu belirtilmiştir. Araştırma verileri, astrosit ve perisit hücrelerin hücresel iletişimi aracılığı ile hCMEC/D3 hücrelerinin bariyer fonksiyonunun uyarılmasında önemli bir rol oynadıklarını göstermektedir. Bu bulgulara dayanarak, araştırmacılar *transwell* sistemleri ile oluşturulan tekli, ikili ve üçlü modeller arasında TEER ölçümleri temel alınarak en başarılı modelin endotel ve astrositlerden oluşan model olduğunu savunmaktadırlar. Bu veriler astrositlerin perisitlerden daha sıkı bir bariyer oluşturduğunu ortaya koymuştur. Astrositlerin veya perisitlerin etkisinden yoksun olan hCMEC / D3 tekli kültür de en zayıf bariyer sıklığını göstermiştir, bu da hücresel iletişim yokluğunda KBB özelliklerinin kaybına işaret etmektedir [131]. Kan beyin bariyeri özelliklerinin sürdürülebilirliği; sıkı bağlantıların oluşumu, luminal ve abluminal endotelial membranlardaki

taşıyıcıların ekspresyonları ve astrosit hücreleri ile yakından ilişkidir [194] [90]. Zaynah ve ark.'nın [132] 2017'deki çalışmasında endotel (hCMEC/D3), sağlıklı serebral korteksden türevlendirilmiş astrosit (SC-1800) ve insan vasküler beyin perisit hücrelerinin (HBVP) bazal laminaya gömülerek tekli, ikili, üçlü etkileşimli ve etkileşimli olmayan *in vitro* üç boyutlu bir KBB modeli oluşturulmuşlardır. İkili modellerin TEER değerlerinin diğer modeller arasında en yüksek elektrik direncine sahip olduğu belirtilirken, üçlü modeldeki TEER sonucu, tekli modele göre yüksek bulunmuştur. Elde edilen veriler, astrositlerin hücresel iletişimi, bariyer fonksiyonunu indüklemeye ve bariyer bütünlüğünü korumada önemini doğrulamaktadır. Ayrıca perisitler hücreleri ile endotel hücrelerinden oluşan modelde, endotel hücrelerinin tekli modeline kıyasla, daha yüksek TEER değerlerinin elde edilmesinde perisitlerin de bariyer sıklığına katkıda bulunduğunu göstermektedir.

Literatürde yer alan, tekli, ikili ve üçlü KBB modellerinde farklı TEER değerlerinin olduğu görülmektedir. Her çalışmanın kendi içinde değerlendirilmesinin daha uygun olacağı kanısındayız. *In vitro* KBB modelinin oluşturulmasında sıklıkla endotel, astrosit ve perisit hücrelerinin kullanıldığı görülmektedir. Bunun yanı sıra, nöron hücrelerinin de KBB'nin fonksiyonu için önemli özellikleri düzenledikleri düşünülmektedir [107]. Bu amaçla nörovasküler sistem elemanlarından biri olan nöron hücrelerinin kullanımının KBB model oluşumunda etkili olacağını düşünmekteyiz. Literatürde üçlü KBB modeli olarak endotel, astrosit ve nörondan oluşan bir KBB modeli olmamasından dolayı oluşturduğumuz ikili ve üçlü modeller kendi içerisinde karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda, ikili (endotel+astrosit / endotel+diferansiye SH-SY5Y) ve üçlü (endotel+astrosit+diferansiye SH-SY5Y) modellerinde farklı günlerde alınan TEER ölçümleri sonucunda, üçlü KBB modelin en yüksek TEER değerine sahip olduğunu ortaya koymaktadır ($p<0,05$). İkili ve üçlü KBB modellerinin karşılaştırıldığı araştırmamızda astrosit ve nöron hücrelerinin KBB bütünlüğüne destek sağladığını TEER değerleri ortaya koymuş ve üçlü KBB modelinin nörovasküler üniteyi ikili modele göre daha iyi taklit ederek *in vivo*'ya daha benzer bir ortamın oluşturulmasını sağladığı ilk kez ortaya koymaktadır. Bunun yanı sıra, literatür incelendiğinde oluşturulan bu modellerin sadece TEER ölçümü ile değerlendirildiği, geçirgenlik deneylerinin pek çok çalışmada yer almadığı görülmektedir. Her iki parametrenin kullanılarak *in vitro* KBB modelinin doğrulanmasının daha uygun olacağını düşünmekteyiz. Bu amaçla, en yüksek TEER değeri elde edilen KBB modelimizin farklı günlerdeki geçirgenlik deneyleri de yapılarak, modelin kaç gün kullanılabilir olduğu bilgisi literatüre kazandırılmıştır.

Literatürdeki araştırmalar incelendiğinde, polifenollerin A β çözünürlükleri tüpte araştırıldığı görülmektedir ve bu sebeple de KBB bariyerinden geçişleri incelenememektedir. Polifenollerin KBB'den geçip geçmemeleri, etkinliklerini etkileyeceğinden bu konunun oldukça önemli olduğunu öngörmekteyiz. Bu nedenle araştırmamız, *in vivo*'ya benzer bir modelde polifenollerin geçişlerini değerlendirerek polifenollerin A β çözünürlükleri hem tüpte hemde *in vitro* KBB modeline uygulanarak değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla üçlü KBB modeline A β_{1-42} toksisitesi oluşturularak ilk kez üçlü AH modelinin değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir. Bunun yanı sıra oluşturduğumuz üçlü KBB modelinden, seçilen polifenollerin geçip geçmediği kantitatif olarak Folin ciocalteu yöntemi ile değerlendirilerek, polifenollerin geçiş miktarlarının belirlenmesinin ardından, polifenol ve/veya polifenol kombinasyonları ile A β_{1-42} uygulanarak KBB modeli üzerine etkileri incelenmiştir. Elde edilen verilerimiz, A β toksisitesi oluşturulan KBB modeline uygulanan polifenol/polifenol kombinasyonlarının TEER değerinde göre artışa neden olduğu ve bu artışın olasılıkla hasarlanmış olan TJ bağlantılarını desteklediğini göstermektedir. Üçlü *in vitro* KBB modelinde luminal yüzeyden (endotel hücre tarafı) eklenen polifenollerin A β_{1-42} plaklarını çözündürme etkinliklerinde biraz düşüş belirlenmiştir. Bu etkinin polifenollerin % 100 oranında KBB'den geçemediğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Araştırmamız polifenol kombinasyonlarının sinerjik etki oluşturarak, A β_{1-42} plaklarının yapısına çeşitli gruplar aracılığıyla bağlanıp yapıyı bireysel uygulanmalarındaki etkilerinden çok daha iyi çözdüğünü ortaya koymuştur. Bunun yanı sıra, üçlü KBB modeline A β toksisitesinin oluşturulması ile modelin bütünlüğünün değerlendirilmesi ilk kez çalışmamız da değerlendirilmiştir. KBB modeline polifenol ve A β uygulamasının, TJ bağlantılarının TEER değerlendirilmesi açısından literatüre önemli katkı sağlayacağını düşünmekteyiz. Polifenollerin KBB 'den geçişlerinin arttırabilmek için nanopartikül gibi yapılar ile kaplanması gerekliliğini ön görmekteyiz. Bu polifenol kombinasyonlarının Alzheimer tedavi stratejilerinde kullanıma potansiyellerinin olduğunu çeşitli *in vivo* çalışmalar ile desteklenerek kliniğe uygulanabilir hala getirilmesinin önemli olduğunu düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız diferansiye insan nöroblastoma (SH-SY5Y), insan beyin mikro kapiller endotel (hCMEC/D3) ve insan astrosit hücreleri (HA) kullanılarak ikili ve üçlü KBB modellerinin oluşturulduğu ve üçlü KBB bütünlüğünün incelendiği ilk çalışmadır. Diferansiye insan nöroblastoma (SH-SY5Y) hücreleri ile oluşturulan KBB modelinin, in vivo'yu daha çok yansıtacak AH çalışmalarına temel oluşturacağını ve literatüre katkı sağlayacağını düşünmekteyiz. Seçilen tüm polifenoller, oluşturulan Kom 1 ve Kom 2'nin A β ₁₋₄₂ plaklarının tüpte ve üçlü KBB modelinde çözündürme etkinlikleri olduğu ilk kez çalışmamız ile ortaya konmuştur. Kombinasyon uygulaması ile sinerjik etki oluşturularak plak çözündürme etkinlikleri daha kısa sürede daha etkin çözündürme ile sonuçlanmıştır. Bu polifenollerin ve kombinasyonlarının KBB'den geçişlerinin çeşitli yollarla arttırılmasının, AH tedavisi için yeni tedavi stratejilerinin denenmesine olanak sağlayabileceği düşünülmektedir. SH-SY5Y hücrelerinin diferansiyasyonun değerlendirilmesinde gen ekspresyon analizlerinin yapılamaması, oluşturulan KBB modelinden polifenol bileşiklerinin geçişinin daha duyarlı yöntemlerle spesifik olarak değerlendirilememesi araştırmamızın kısıtlıklarına neden olmaktadır ve gelecek çalışmalarımızın temelini oluşturmaktadır.

7. KAYNAKLAR

- [1] R. Anand, K. D. Gill, and A. A. Mahdi, "Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future," *Neuropharmacology*, vol. 76, no. PART A, pp. 27–50, 2014.
- [2] A. Demuro, E. Mina, R. Kayed, S. C. Milton, I. Parker, and C. G. Glabe, "Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 17, pp. 17294–17300, Apr. 2005.
- [3] A. Y. Abramov, L. Canevari, and M. R. Duchen, " β -Amyloid Peptides Induce Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Astrocytes and Death of Neurons through Activation of NADPH Oxidase," *J. Neurosci.*, vol. 24, no. 2, pp. 565–575, Jan. 2004.
- [4] H. Kokubo, R. Kayed, CG. Glabe, M. Staufenbiel, T.C. Saido, N. Iwata, H. Yamaguchi. "Amyloid Beta Annular Protofibrils in Cell Processes and Synapses Accumulate with Aging and Alzheimer-Associated Genetic Modification," *Int. J. Alzheimers. Dis.*, vol. 2009, pp. 1–7, 2009.
- [5] S. Bastianetto, S. Krantic, and R. Quirion, "Polyphenols as Potential Inhibitors of Amyloid Aggregation and Toxicity: Possible Significance to Alzheimers Disease," *Mini-Reviews Med. Chem.*, vol. 8, no. 5, pp. 429–435, Apr. 2008.
- [6] K. S. Bhullar and H. P. V. Rupasinghe, "Polyphenols: Multipotent therapeutic agents in neurodegenerative diseases," *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2013.
- [7] A. Conte, S. Pellegrini, and D. Tagliazucchi, "Synergistic protection of PC12 cells from beta-amyloid toxicity by resveratrol and catechin," *Brain Res. Bull.*, vol. 62, no. 1, pp. 29–38, Nov. 2003.
- [8] T. Mori, N. Koyama, J. Tan, T. Segawa, M. Maeda, and T. Town, "Combined treatment with the phenolics (-)-epigallocatechin-3-gallate and ferulic acid improves cognition and reduces Alzheimer-like pathology in mice," *J. Biol. Chem.*, vol. 294, no. 8, pp. 2714–2731, 2019.
- [9] M. M. Shipley, C. A. Mangold, and M. L. Szpara, "Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line," *J. Vis. Exp.*, no. 108, p. 53193, 2016.
- [10] J. Kovalevich and D. Langford, "Considerations for the Use of SH-SY5Y

Neuroblastoma Cells in Neurobiology.”

- [11] R. Constantinescu, A. T. Constantinescu, H. Reichmann, and B. Janetzky, “Neuronal differentiation and long-term culture of the human neuroblastoma line SH-SY5Y,” in *Neuropsychiatric Disorders An Integrative Approach*, Vienna: Springer Vienna, 2007, pp. 17–28.
- [12] R. A. Stelzmann, H. Norman Schnitzlein, and F. Reed Murtagh, “An english translation of alzheimer’s 1907 paper, ‘über eine eigenartige erkankung der hirnrinde,’” *Clin. Anat.*, vol. 8, no. 6, pp. 429–431, 1995.
- [13] “World Alzheimer Report 2018 | Alzheimer’s Disease International.” [Online]. Available: <https://www.alz.co.uk/research/world-report-2018>. [Accessed: 14-Sep-2019].
- [14] A. Sanabria-Castro, I. Alvarado-Echeverría, and C. Monge-Bonilla, “Molecular pathogenesis of alzheimer’s disease: An update,” *Annals of Neurosciences*, vol. 24, no. 1. S. Karger AG, pp. 46–54, 01-May-2017.
- [15] R. J. Guerreiro, D. R. Gustafson, and J. Hardy, “The genetic architecture of Alzheimer’s disease: beyond APP, PSENs and APOE.,” *Neurobiol. Aging*, vol. 33, no. 3, pp. 437–56, Mar. 2012.
- [16] D. M. Holtzman, J. C. Morris, and A. M. Goate, “Alzheimer’s disease: the challenge of the second century.,” *Sci. Transl. Med.*, vol. 3, no. 77, p. 77sr1, Apr. 2011.
- [17] M. V. F. Silva, C. de M. G. Loures, L. C. V. Alves, L. C. de Souza, K. B. G. Borges, and M. das G. Carvalho, “Alzheimer’s disease: risk factors and potentially protective measures.,” *J. Biomed. Sci.*, vol. 26, no. 1, p. 33, May 2019.
- [18] L. Calderón-Garcidueñas and S. M. de la Monte, “Apolipoprotein E4, Gender, Body Mass Index, Inflammation, Insulin Resistance, and Air Pollution Interactions: Recipe for Alzheimer’s Disease Development in Mexico City Young Females.,” *J. Alzheimers. Dis.*, vol. 58, no. 3, pp. 613–630, 2017.
- [19] N. S. Jones and G. W. Rebeck, “The Synergistic Effects of APOE Genotype and Obesity on Alzheimer’s Disease Risk.,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 1, Dec. 2018.

- [20] M. S. Uddin, M. T. Kabir, A. Al Mamun, M. M. Abdel-Daim, G. E. Barreto, and G. M. Ashraf, "APOE and Alzheimer's Disease: Evidence Mounts that Targeting APOE4 may Combat Alzheimer's Pathogenesis.," *Mol. Neurobiol.*, vol. 56, no. 4, pp. 2450–2465, Apr. 2019.
- [21] R. Deane, A. Sagare, K. Hamm, M. Parisi, S. Lane, M. B. Finn, D. M. Holtzman, B. V. Zlokovic, "apoE isoform-specific disruption of amyloid β peptide clearance from mouse brain," *J. Clin. Invest.*, vol. 118, no. 12, pp. 4002–4013, Dec. 2008.
- [22] L. Puglielli, R. E. Tanzi, and D. M. Kovacs, "Alzheimer's disease: the cholesterol connection.," *Nat. Neurosci.*, vol. 6, no. 4, pp. 345–51, Apr. 2003.
- [23] P. Sharma, P. Srivastava, A. Seth, P. N. Tripathi, A. G. Banerjee, and S. K. Shrivastava, "Comprehensive review of mechanisms of pathogenesis involved in Alzheimer's disease and potential therapeutic strategies.," *Prog. Neurobiol.*, vol. 174, pp. 53–89, Mar. 2019.
- [24] K. Parameshwaran, M. Dhanasekaran, and V. Suppiramaniam, "Amyloid beta peptides and glutamatergic synaptic dysregulation.," *Exp. Neurol.*, vol. 210, no. 1, pp. 7–13, Mar. 2008.
- [25] D. A. Butterfield, T. Reed, S. F. Newman, and R. Sultana, "Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment.," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 43, no. 5, pp. 658–77, Sep. 2007.
- [26] H. Lin, R. Bhatia, and R. Lal, "Amyloid beta protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology.," *FASEB J.*, vol. 15, no. 13, pp. 2433–44, Nov. 2001.
- [27] G. Thinakaran and E. H. Koo, "APP trafficking, processing and function," *J Biol Chem*, 2008.
- [28] Y. Ling, K. Morgan, and N. Kalsheker, "Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease.," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 35, no. 11, pp. 1505–35, Nov. 2003.
- [29] M. G. Iadanza, M. P. Jackson, E. W. Hewitt, N. A. Ranson, and S. E. Radford, "A new era for understanding amyloid structures and disease," *Nature Reviews Molecular Cell*

- Biology*, vol. 19, no. 12. Nature Publishing Group, pp. 755–773, 01-Dec-2018.
- [30] L. Gremer, D.Schölzel, C.Schenk, E.Reinartz, J.Labahn, R.B.G. Ravelli, M.Tusche, C. Lopez-Iglesias, W. Hoyer, H. Heise, D.Willbold, G.F.Schröder, “Fibril structure of amyloid- b (1 – 42) by cryo – electron microscopy,” *Science* (80-.), vol. 119, no. October, pp. 116–119, 2017.
 - [31] D. S. Eisenberg and M. R. Sawaya, “Implications for Alzheimer’s disease of an atomic resolution structure of amyloid- β (1-42) fibrils.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 113, no. 34, pp. 9398–400, 2016.
 - [32] P. H. Reddy and M. F. Beal, “Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer’s disease,” *Trends Mol. Med.*, vol. 14, no. 2, pp. 45–53, Feb. 2008.
 - [33] B. Su, X. Wang, A. Nunomura, P.Moreira, H.G. Lee, G. Perry, M.A. Smith, X. Zhu, “Oxidative stress signaling in Alzheimer’s disease.,” *Curr. Alzheimer Res.*, vol. 5, no. 6, pp. 525–32, Dec. 2008.
 - [34] M. Gold and J. El Khoury, “ β -amyloid, microglia, and the inflammasome in Alzheimer’s disease.,” *Semin. Immunopathol.*, vol. 37, no. 6, pp. 607–11, Nov. 2015.
 - [35] J. M. Rubio-Perez and J. M. Morillas-Ruiz, “A review: Inflammatory process in Alzheimer’s disease, role of cytokines,” *The Scientific World Journal*, vol. 2012. 2012.
 - [36] M. G. Spillantini and M. Goedert, “Tau pathology and neurodegeneration.,” *Lancet. Neurol.*, vol. 12, no. 6, pp. 609–22, Jun. 2013.
 - [37] E. K. Perry, P. H. Gibson, G. Blessed, R. H. Perry, and B. E. Tomlinson, “Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia. Choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in necropsy brain tissue.,” *J. Neurol. Sci.*, vol. 34, no. 2, pp. 247–65, Nov. 1977.
 - [38] E. K. Perry, R. H. Perry, G. Blessed, and B. E. Tomlinson, “Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type.,” *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, vol. 4, no. 4, pp. 273–7.
 - [39] A. V Terry and J. J. Buccafusco, “The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer’s

- disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development.,” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 306, no. 3, pp. 821–7, Sep. 2003.
- [40] M. Arundine and M. Tymianski, “Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity,” *Cell Calcium*, vol. 34, no. 4–5, pp. 325–37.
- [41] T. J. Revett, G. B. Baker, J. Jhamandas, and S. Kar, “Glutamate system, amyloid β peptides and tau protein: Functional interrelationships and relevance to Alzheimer disease pathology,” *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, vol. 38, no. 1. Canadian Medical Association, pp. 6–23, 2013.
- [42] S. Brahmachari, A. Paul, D. Segal, and E. Gazit, “Inhibition of amyloid oligomerization into different supramolecular architectures by small molecules: mechanistic insights and design rules,” *Future Med. Chem.*, vol. 9, no. 8, pp. 797–810, 2017.
- [43] A. Kumar, A. Singh, and Ekavali, “A review on Alzheimer’s disease pathophysiology and its management: An update,” *Pharmacological Reports*, vol. 67, no. 2. Elsevier, pp. 195–203, 2015.
- [44] D. Sivaraman, N. Anbu, N. Kabilan, M. Pitchiah Kumar, P. Shanmugapriya, and G. J. Christian, “Review On Current Treatment Strategy In Alzheimer’s Disease And Role Of Herbs In Treating Neurological Disorders.”
- [45] H. T. T. Phan, K. Samarat, Y. Takamura, A. F. Azo-Oussou, Y. Nakazono, and M. C. Vestergaard, “Polyphenols Modulate Alzheimer’s Amyloid Beta Aggregation in a Structure-Dependent Manner,” *Nutrients*, vol. 11, no. 4, Mar. 2019.
- [46] R.N. Martins, V. Villemagne, H.R. Sohrabi, P.Chatterjee, T.M. Shah, Alzheimer’s Disease: A Journey from Amyloid Peptides and Oxidative Stress, to Biomarker Technologies and Disease Prevention Strategies-Gains from AIBL and DIAN Cohort Studies,” *J. Alzheimers. Dis.*, vol. 62, no. 3, pp. 965–992, 2018.
- [47] P. T. Lansbury, “Inhibition of amyloid formation: a strategy to delay the onset of Alzheimer’s disease,” *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 1, no. 2, pp. 260–7, Aug. 1997.
- [48] P. Arosio, M. Vendruscolo, C. M. Dobson, and T. P. J. Knowles, “Chemical kinetics for drug discovery to combat protein aggregation diseases,” *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 35, no. 3, pp. 127–35, Mar. 2014.

- [49] G. B. Irvine, O. M. El-Agnaf, G. M. Shankar, and D. M. Walsh, "Protein aggregation in the brain: the molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's diseases.," *Mol. Med.*, vol. 14, no. 7–8, pp. 451–64.
- [50] Q. Zheng, M.T.Kebede, M.M. Kemeh, S. Islam, B. Lee, S.D. Bleck, L.A. Wurfl, N.D.Lazo, "Inhibition of the Self-Assembly of A β and of Tau by Polyphenols: Mechanistic Studies.," *Molecules*, vol. 24, no. 12, Jun. 2019.
- [51] A. Sgarbossa, "Natural biomolecules and protein aggregation: Emerging strategies against amyloidogenesis," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 13, no. 12. MDPI AG, pp. 17121–17137, 2012.
- [52] B. Cheng, H. Gong, H. Xiao, R. B. Petersen, L. Zheng, and K. Huang, "Inhibiting toxic aggregation of amyloidogenic proteins: a therapeutic strategy for protein misfolding diseases.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1830, no. 10, pp. 4860–71, Oct. 2013.
- [53] K. B. Pandey and S. I. Rizvi, "Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease.," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2, no. 5. pp. 270–278, Nov-2009.
- [54] F. Shahidi and P. Ambigaipalan, "Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review.," *Journal of Functional Foods*, vol. 18. Elsevier Ltd, pp. 820–897, 01-Oct-2015.
- [55] A. Ebrahimi and H. Schluesener, "Natural polyphenols against neurodegenerative disorders: potentials and pitfalls.," *Ageing Res. Rev.*, vol. 11, no. 2, pp. 329–45, Apr. 2012.
- [56] J. W. Lee, YK. Lee, JO.Ban, TY. Ha, YP. Yun, SB, Han, KW. Oh, JT. Hong. "Green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits beta-amyloid-induced cognitive dysfunction through modification of secretase activity via inhibition of ERK and NF-kappaB pathways in mice.," *J. Nutr.*, vol. 139, no. 10, pp. 1987–93, 2009.
- [57] J. Kim, H. J. Lee, and K. W. Lee, "Naturally occurring phytochemicals for the prevention of Alzheimer's disease.," *J. Neurochem.*, vol. 112, no. 6, pp. 1415–30, Mar. 2010.
- [58] H. Y. Zhang, "Can food-derived multipotent agents reduce the risk of Alzheimer's disease," *Trends in Food Science and Technology*, vol. 18, no. 9. Elsevier Ltd, pp. 492–

495, 2007.

- [59] Y. Porat, Y. Mazor, S. Efrat, and E. Gazit, "Inhibition of islet amyloid polypeptide fibril formation: a potential role for heteroaromatic interactions.," *Biochemistry*, vol. 43, no. 45, pp. 14454–62, Nov. 2004.
- [60] R. D. Hills and C. L. Brooks, "Hydrophobic Cooperativity as a Mechanism for Amyloid Nucleation," *J. Mol. Biol.*, vol. 368, no. 3, pp. 894–901, May 2007.
- [61] Y. Porat, A. Abramowitz, and E. Gazit, "Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism.," *Chem. Biol. Drug Des.*, vol. 67, no. 1, pp. 27–37, Jan. 2006.
- [62] J. Bieschke, J. Russ, R.P. Friedrich, D.E. Ehrnhoefer, H. Wobst, K. Neugebauer, E.E. Wanker. "EGCG remodels mature α -synuclein and amyloid- β fibrils and reduces cellular toxicity," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 17, pp. 7710–7715, Apr. 2010.
- [63] D.E. Ehrnhoefer, J. Bieschke, A. Boeddrich, M. Herbst, L.Masino, R. Lurz, S. Engemann, A.Pastore, E.E. Wanker, "EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers.," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 15, no. 6, pp. 558–66, Jun. 2008.
- [64] I. R. Chandrashekar, C. G. Adda, C. A. MacRaid, R. F. Anders, and R. S. Norton, "Inhibition by flavonoids of amyloid-like fibril formation by plasmodium falciparum merozoite surface protein 2," *Biochemistry*, vol. 49, no. 28, pp. 5899–5908, Jul. 2010.
- [65] J.M. Lopez del Amo, U. Fink, M. Dasari, G. Grelle, E.E.Wanker, J. Bieschke, B. Reif, "Structural properties of EGCG-induced, nontoxic Alzheimer's disease A β oligomers.," *J. Mol. Biol.*, vol. 421, no. 4–5, pp. 517–24, Aug. 2012.
- [66] F. Meng, A. Abedini, A. Plesner, C. B. Verchere, and D. P. Raleigh, "The flavanol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits amyloid formation by islet amyloid polypeptide, disaggregates amyloid fibrils, and protects cultured cells against IAPP-induced toxicity.," *Biochemistry*, vol. 49, no. 37, pp. 8127–33, Sep. 2010.
- [67] Y. Levites, T. Amit, S. Mandel, and M. B. H. Youdim, "Neuroprotection and neurorescue against Abeta toxicity and PKC-dependent release of nonamyloidogenic soluble precursor protein by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate.,"

FASEB J., vol. 17, no. 8, pp. 952–4, May 2003.

- [68] P. Langley, “Why a pomegranate?,” *BMJ*, vol. 321, no. 7269, pp. 1153–4, Nov. 2000.
- [69] K. L. Wolfe, X. Kang, X. He, M. Dong, Q. Zhang, and R. H. Liu, “Cellular antioxidant activity of common fruits,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, no. 18, pp. 8418–26, Sep. 2008.
- [70] M. I. Gil, F. A. Tomás-Barberán, B. Hess-Pierce, D. M. Holcroft, and A. A. Kader, “Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 48, no. 10, pp. 4581–9, Oct. 2000.
- [71] E. P. Lansky and R. A. Newman, “*Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 109, no. 2, pp. 177–206, Jan. 2007.
- [72] J. S. Jurenka, “Therapeutic applications of pomegranate,” *Altern. Med. Rev.*, vol. 13, no. 2, pp. 128–44, 2008.
- [73] Y. Feng, SG. Yang, XT. Du, X. Zhang, X.X. Sun, M. Zhao, GY. Sun, RT Liu. “Ellagic acid promotes A β 42 fibrillization and inhibits A β 42-induced neurotoxicity,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 390, no. 4, pp. 1250–1254, Dec. 2009.
- [74] RE. Hartman, A. Shah, AM. Fagan, KE. Schwetye, M. Parsadanian, RN. Schulman, MB.Finn, DM. Holtzman. “Pomegranate juice decreases amyloid load and improves behavior in a mouse model of Alzheimer’s disease,” *Neurobiol. Dis.*, vol. 24, no. 3, pp. 506–15, Dec. 2006.
- [75] L. Rojanathammanee, K. L. Puig, and C. K. Combs, “Pomegranate Polyphenols and Extract Inhibit Nuclear Factor of Activated T-Cell Activity and Microglial Activation In Vitro and in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer Disease,” *J. Nutr.*, vol. 143, no. 5, pp. 597–605, May 2013.
- [76] A. H. Ahmed, G. M. Subaiea, A. Eid, L. Li, N. P. Seeram, and N. H. Zawia, “Pomegranate extract modulates processing of amyloid- β precursor protein in an aged Alzheimer’s disease animal model,” *Curr. Alzheimer Res.*, vol. 11, no. 9, pp. 834–43, 2014.

- [77] L. Zhong, H. Liu, W. Zhang, X. Liu, B. Jiang, H. Fei, Z. Sun. "Ellagic acid ameliorates learning and memory impairment in APP/PS1 transgenic mice via inhibition of β -amyloid production and tau hyperphosphorylation.," *Exp. Ther. Med.*, vol. 16, no. 6, pp. 4951–4958, Dec. 2018.
- [78] S. Das, L. Stark, I. F. Musgrave, T. Pukala, and S. D. Smid, "Bioactive polyphenol interactions with β amyloid: A comparison of binding modelling, effects on fibril and aggregate formation and neuroprotective capacity," *Food Funct.*, vol. 7, no. 2, pp. 1138–1146, 2016.
- [79] Y. Liu, J. Gao, M. Peng, H. Meng, H. Ma, P. Cai, Y. Xu, Q. Zhao, G. Si, "A Review on Central Nervous System Effects of Gastrodin.," *Front. Pharmacol.*, vol. 9, p. 24, 2018.
- [80] Y. Dan, Z. Qian, P. Yong, "Revision and Improvement of Criterion on Traditional Chinese Medicines in Chinese Pharmacopoeia 2015," *Chinese Herb. Med.*, vol. 8, no. 3, pp. 196–208, Jul. 2016.
- [81] H.-J. Kim, K.-D. Moon, D.-S. Lee, and S.-H. Lee, "Ethyl ether fraction of *Gastrodia elata* Blume protects amyloid beta peptide-induced cell death.," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 84, no. 1, pp. 95–8, Jan. 2003.
- [82] X. Zeng, S. Zhang, L. Zhang, K. Zhang, and X. Zheng, "A study of the neuroprotective effect of the phenolic glucoside gastrodin during cerebral ischemia in vivo and in vitro.," *Planta Med.*, vol. 72, no. 15, pp. 1359–65, Dec. 2006.
- [83] X. Xu, Y. Lu, and X. Bie, "Protective effects of gastrodin on hypoxia-induced toxicity in primary cultures of rat cortical neurons.," *Planta Med.*, vol. 73, no. 7, pp. 650–4, Jun. 2007.
- [84] H. An, I. S. Kim, S. Koppula, B. W. Kim, P. J. Park, B. O. Lim, W. S. Choi, K. H. Lee, D. K. Choi, "Protective effects of *Gastrodia elata* Blume on MPP⁺-induced cytotoxicity in human dopaminergic SH-SY5Y cells.," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 130, no. 2, pp. 290–8, Jul. 2010.
- [85] G. Jiang, Y. Hu, L. Liu, J. Cai, C. Peng, and Q. Li, "Gastrodin protects against MPP⁽⁺⁾-induced oxidative stress by up regulates heme oxygenase-1 expression through p38 MAPK/Nrf2 pathway in human dopaminergic cells.," *Neurochem. Int.*, vol. 75, pp. 79–

88, Sep. 2014.

- [86] J.S. Zhang, S.F. Zhou, Q.Wang, J.N.Guo, H.M.Liang, J.B. Deng, W.Y.He, “Gastrodin suppresses BACE1 expression under oxidative stress condition via inhibition of the PKR/eIF2 α pathway in Alzheimer’s disease.,” *Neuroscience*, vol. 325, pp. 1–9, 2016.
- [87] X. Zhao, Y. Zou, H.Xu, L.Fan, H. Guo, X. Li, G. Li, X. Zhang, M.Dong, “Gastrodin protect primary cultured rat hippocampal neurons against amyloid-beta peptide-induced neurotoxicity via ERK1/2-Nrf2 pathway.,” *Brain Res.*, vol. 1482, pp. 13–21, Oct. 2012.
- [88] G.H.Lee,H.R. Kim, S.Y.Han, B.Bhandary, D.S.Kim, M.G.Kim, B.O. So, S.Y.Kim, K.S. Jo, B.H.Lee, H.N.Seo, S.W.Chae, H.J.Chae, “Gastrodia elata Blume and its pure compounds protect BV-2 microglial-derived cell lines against β -amyloid: the involvement of GRP78 and CHOP” *Biol. Res.*, vol. 45, no. 4, pp. 403–10, 2012.
- [89] Wilhelm I, Fazakas C, Krizbai IA. "In vitro models of the blood-brain barrier.,"*Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2011;71(1):113-28.
- [90] N. J. Abbott, L. Rönnebeck, and E. Hansson, “Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier.,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 7, no. 1, pp. 41–53, Jan. 2006.
- [91] S. Banerjee and M. A. Bhat, “Neuron-Glial Interactions in Blood-Brain Barrier Formation,” *Annu. Rev. Neurosci.*, vol. 30, no. 1, pp. 235–258, Jul. 2007.
- [92] B. T. Hawkins and T. P. Davis, “The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease.,” *Pharmacol. Rev.*, vol. 57, no. 2, pp. 173–85, Jun. 2005.
- [93] S. Nakagawa, M.A.Deli, S.Nakao, M.Honda, K.Hayashi, R. Nakaoke, Y. Kataoka,M. Niwa, “Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells,” *Cell. Mol. Neurobiol.*, vol. 27, no. 6, pp. 687–694, Sep. 2007.
- [94] S,Nakagawa, M.A. Deli, H.Kawaguchi, T.Shimizudani,T. Shimono, A.Kittel,K. Tanaka, M.S.Niwa, “A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes.,” *Neurochem. Int.*, vol. 54, no. 3–4, pp. 253–63.
- [95] T. Barichello, A. Collodel, R. Hasbun, and R. Morales, “An Overview of the Blood-Brain Barrier,” 2019, pp. 1–8.

- [96] H. Wolburg and A. Lippoldt, "Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation.," *Vascul. Pharmacol.*, vol. 38, no. 6, pp. 323–37, Jun. 2002.
- [97] N. J. Abbott, A. A. K. Patabendige, D. E. M. Dolman, S. R. Yusof, and D. J. Begley, "Structure and function of the blood-brain barrier.," *Neurobiol. Dis.*, vol. 37, no. 1, pp. 13–25, 2009.
- [98] Y. Chen and L. Liu, "Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier.," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, no. 7, pp. 640–65, May 2012.
- [99] A. Seelig, "The role of size and charge for blood-brain barrier permeation of drugs and fatty acids," *J. Mol. Neurosci.*, vol. 33, no. 1, pp. 32–41, Sep. 2007.
- [100] Z. Ni, Z. Bikadi, M. F. Rosenberg, and Q. Mao, "Structure and function of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2).," *Curr. Drug Metab.*, vol. 11, no. 7, pp. 603–17, Sep. 2010.
- [101] C. Hajal, M. Campisi, C. Mattu, V. Chiono, and R. D. Kamm, "In vitro models of molecular and nano-particle transport across the blood-brain barrier."
- [102] A. Armulik, A. Abramsson, and C. Betsholtz, "Endothelial/pericyte interactions.," *Circ. Res.*, vol. 97, no. 6, pp. 512–23, Sep. 2005.
- [103] R. Erzurumluoğlu, G. Şengül, E. Ulupınar. "Nöroanatomi.," 1. Baskı, Güneş Tıp Kitabevleri, 2018.
- [104] J.I. Alvarez, A. Dodelet-Devillers, H.Kebir, I.Ifergan, P.J.Fabre, S.Terouz, M.Sabbagh, K. Wosik, L.Bourbonnière, M.Bernard, "The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence.," *Science*, vol. 334, no. 6063, pp. 1727–31, Dec. 2011.
- [105] L. F. Yousif, J. Di Russo, and L. Sorokin, "Laminin isoforms in endothelial and perivascular basement membranes.," *Cell Adh. Migr.*, vol. 7, no. 1, pp. 101–10.
- [106] S. T. Brady, G. J. Siegel, R. W. (Robert W. Albers, and D. L. (Donald L. Price, *Basic neurochemistry : principles of molecular, cellular, and medical neurobiology.* .
- [107] U. Tontsch and H. C. Bauer, "Glial cells and neurons induce blood-brain barrier related enzymes in cultured cerebral endothelial cells.," *Brain Res.*, vol. 539, no. 2, pp. 247–53,

Jan. 1991.

- [108] F. Sohet and R. Daneman, “Genetic mouse models to study blood-brain barrier development and function,” *Fluids Barriers CNS*, vol. 10, no. 1, p. 3, Jan. 2013.
- [109] I. W. Mak, N. Evaniew, and M. Ghert, “Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment,” *Am. J. Transl. Res.*, vol. 6, no. 2, pp. 114–8, 2014.
- [110] M.-F. Chesselet, “Animal models of neurological disorders,” *NeuroRX*, vol. 2, no. 3, pp. 395–395, Jul. 2005.
- [111] P. Naik and L. Cucullo, “In vitro blood-brain barrier models: current and perspective technologies,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 101, no. 4, pp. 1337–54, Apr. 2012.
- [112] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, and P. J. Feeney, “Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development q settings,” 2001.
- [113] W.Kalt, J.B. Blumberg, J.E.McDonald, M.R.Vinqvist-Tymchuk, S.A.Fillmore, B.A.Graf, J.M.O'Leary, P.E. Milbury, “Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, no. 3, pp. 705–12, Feb. 2008.
- [114] L. Ziberna, S. Fornasaro, J. Čvorović, F. Tramer, and S. Passamonti, “Bioavailability of Flavonoids: The Role of Cell Membrane Transporters,” in *Polyphenols in Human Health and Disease*, 2013.
- [115] C. Rice-Evans, “Flavonoids and isoflavones: absorption, metabolism, and bioactivity,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 36, no. 7, pp. 827–8, Apr. 2004.
- [116] I. Figueira, R. Menezes, D. Macedo, I. Costa, and C. N. Dos Santos, “Polyphenols Beyond Barriers: A Glimpse into the Brain,” *Curr. Neuropharmacol.*, vol. 15, no. 4, pp. 562–594, 2017.
- [117] F. Joo, “The blood-brain barrier in vitro: Ten years of research on microvessels isolated from the brain,” *Neurochem. Int.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–25, 1985.
- [118] T. Ruck, S. Bittner, and S. G. Meuth, “Blood-brain barrier modeling: challenges and perspectives,” *Neural Regen. Res.*, vol. 10, no. 6, pp. 889–91, Jun. 2015.

- [119] T. T. Wager, J. L. Liras, S. Mente, and P. Trapa, “Strategies to minimize CNS toxicity: in vitro high-throughput assays and computational modeling,” *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, vol. 8, no. 5, pp. 531–42, May 2012.
- [120] E. Urich, C. Patsch, S. Aigner, M. Graf, R. Iacone, and P.-O. Freskgård, “Multicellular self-assembled spheroidal model of the blood brain barrier,” *Sci. Rep.*, vol. 3, p. 1500, 2013.
- [121] G. E. Davis, W. Koh, and A. N. Stratman, “Mechanisms controlling human endothelial lumen formation and tube assembly in three-dimensional extracellular matrices,” *Birth Defects Res. C. Embryo Today*, vol. 81, no. 4, pp. 270–85, Dec. 2007.
- [122] J. Banerjee, Y. Shi, and H. S. Azevedo, “In vitro blood-brain barrier models for drug research: state-of-the-art and new perspectives on reconstituting these models on artificial basement membrane platforms,” *Drug Discov. Today*, vol. 21, no. 9, pp. 1367–1386, 2016.
- [123] L. Titomanlio and B. Fleiss, “Brain Edema in Developing Brain Diseases,” 2017.
- [124] H.C.Helms, N.J. Abbott, M.Burek, R.Cecchelli, P.O.Couraud, M.A.Deli, C.Förster, H.J. Galla, I.A. Romero, E.V.Shusta, M.J.Stebbins, E.Vandenhoute, B.Weksler, B. Brodin, “In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use,” *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 36, no. 5. Nature Publishing Group, pp. 862–890, 2015.
- [125] B.B.Weksler, E.A.Subileau, N. Perrière, P. Charneau, K. Holloway, M.Leveque, H. Tricoire-Leignel, A. Nicotra, S. Bourdoulous, P. Turowski, “Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line,” *FASEB J.*, vol. 19, no. 13, pp. 1872–1874, Nov. 2005.
- [126] Y. He, Y. Yao, S. E. Tsirka, and Y. Cao, “Cell-Culture Models of the Blood–Brain Barrier,” *Stroke*, vol. 45, no. 8, pp. 2514–2526, Aug. 2014.
- [127] A. Armulik, G. Genové, M. Mäe, M.H. Nisancioglu, E.Wallgard, C. Niaudet C, “Pericytes regulate the blood-brain barrier,” *Nature*, vol. 468, no. 7323, pp. 557–561, Nov. 2010.
- [128] R. Daneman, L. Zhou, A. A. Kebede, and B. A. Barres, “Pericytes are required for blood-

- brain barrier integrity during embryogenesis.,” *Nature*, vol. 468, no. 7323, pp. 562–6, Nov. 2010.
- [129] R. C. Janzer and M. C. Raff, “Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells.,” *Nature*, vol. 325, no. 6101, pp. 253–7.
- [130] J. H. Tao-Cheng, Z. Nagy, and M. W. Brightman, “Tight junctions of brain endothelium in vitro are enhanced by astroglia.,” *J. Neurosci.*, vol. 7, no. 10, pp. 3293–9, Oct. 1987.
- [131] K. Hatherell, P.-O. Couraud, I. A. Romero, B. Weksler, and G. J. Pilkington, “Development of a three-dimensional, all-human in vitro model of the blood-brain barrier using mono-, co-, and tri-cultivation Transwell models.,” *J. Neurosci. Methods*, vol. 199, no. 2, pp. 223–9, Aug. 2011.
- [132] Z. Maherally, H.L. Fillmore, S.L. Tan, S.F. Tan, S.A. Jassam, F.I. Quack, K.E. Hatherell. “Real-time acquisition of transendothelial electrical resistance in an all-human, in vitro, 3-dimensional, blood-brain barrier model exemplifies tight-junction integrity.,” *FASEB J.*, vol. 32, no. 1, pp. 168–182, 2018.
- [133] J. L. Biedler, S. Roffler-Tarlov, M. Schachner, and L. S. Freedman, “Multiple Neurotransmitter Synthesis by Human Neuroblastoma Cell Lines and Clones,” *Cancer Res.*, vol. 38, no. 11 Part 1, 1978.
- [134] M. Encinas, M. Iglesias, Y. Liu, H. Wang, A. Muhaisen, V. Ceña, C. Gallego, J.X. Comella, “Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells.,” *J. Neurochem.*, vol. 75, no. 3, pp. 991–1003, Sep. 2000.
- [135] R. A. Ross, B. A. Spengler, and J. L. Biedler, “Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells.,” *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 71, no. 4, pp. 741–7, Oct. 1983.
- [136] L.M de Medeiros, M.A De Bastiani, EP.Rico, P. Schonhofen, B.Pfaffenseller, B.Wollenhaupt-Aguiar, L. Grun, F. Barbé-Tuana, E.R. Zimmer, M.A.A.Castro, R. B. Parsons, F. Klamt. “Cholinergic Differentiation of Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cell Line and Its Potential Use as an In vitro Model for Alzheimer’s Disease Studies.,” *Mol. Neurobiol.*, Apr. 2019.

- [137] T. Takano, Y. Funahashi, and K. Kaibuchi, “Neuronal polarity: Positive and negative feedback signals,” *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol. 7, no. APR. Frontiers Media S.A., 2019.
- [138] S. Tahirovic and F. Bradke, “Neuronal polarity.,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 1, no. 3, p. a001644, Sep. 2009.
- [139] H. Witte and F. Bradke, “The role of the cytoskeleton during neuronal polarization.,” *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 18, no. 5, pp. 479–87, Oct. 2008.
- [140] G. Banker, “The Development of Neuronal Polarity: A Retrospective View.,” *J. Neurosci.*, vol. 38, no. 8, pp. 1867–1873, 2018.
- [141] A. Jämsä, K. Hasslund, R. F. Cowburn, A. Bäckström, and M. Vasänge, “The retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor differentiated SH-SY5Y cell line as a model for Alzheimer’s disease-like tau phosphorylation.,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 319, no. 3, pp. 993–1000, Jul. 2004.
- [142] L. Agholme, T. Lindström, K. Kågedal, J. Marcusson, and M. Hallbeck, “An in vitro model for neuroscience: differentiation of SH-SY5Y cells into cells with morphological and biochemical characteristics of mature neurons.,” *J. Alzheimers. Dis.*, vol. 20, no. 4, pp. 1069–82, 2010.
- [143] J. Qiao, P. Paul, S. Lee, L. Qiao, E. Josifi, J. R. Tiao, D. H. Chung. “PI3K/AKT and ERK regulate retinoic acid-induced neuroblastoma cellular differentiation.,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 424, no. 3, pp. 421–6, Aug. 2012.
- [144] G. Melino, C. J. Thiele, R. A. Knight, and M. Piacentini, “Retinoids and the control of growth/death decisions in human neuroblastoma cell lines.,” *J. Neurooncol.*, vol. 31, no. 1–2, pp. 65–83, Jan. 1997.
- [145] Y.-T. Cheung, W. K. Lau, M. S. Yu, C. S. Lai, S. C. Yeung, K. F. So, R. C. Chang, “Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research.,” *Neurotoxicology*, vol. 30, no. 1, pp. 127–35, Jan. 2009.
- [146] L. I. Binder, A. Frankfurter, and L. I. Rebhun, “The distribution of tau in the mammalian central nervous system.,” *J. Cell Biol.*, vol. 101, no. 4, pp. 1371–8, Oct. 1985.

- [147] A. Laser-Azogui, M. Kornreich, E. Malka-Gibor, and R. Beck, “Neurofilament assembly and function during neuronal development,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 32, pp. 92–101, Feb. 2015.
- [148] A. Yuan, M. V Rao, Veeranna, and R. A. Nixon, “Neurofilaments and Neurofilament Proteins in Health and Disease,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 9, no. 4, Apr. 2017.
- [149] J. J. Hakkarainen, *In Vitro Cell Models in Predicting Blood-Brain Barrier Permeability of Drugs*. .
- [150] B. Srinivasan and A. R. Kolli, “Transepithelial/Transendothelial Electrical Resistance (TEER) to Measure the Integrity of Blood-Brain Barrier,” in *Neuromethods*, vol. 142, Humana Press Inc., 2019, pp. 99–114.
- [151] B. Srinivasan, A. R. Kolli, M. B. Esch, H. E. Abaci, M. L. Shuler, and J. J. Hickman, “TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems,” *J. Lab. Autom.*, vol. 20, no. 2, pp. 107–26, Apr. 2015.
- [152] M. Burek and C. Y. Förster, “Culturing of Rodent Brain Microvascular Endothelial Cells for In Vitro Modeling of the Blood-Brain Barrier,” in *Neuromethods*, vol. 142, Humana Press Inc., 2019, pp. 45–54.
- [153] B. Poller, H. Gutmann, S. Krähenbühl, B. Weksler, I. Romero, P. O. Couraud, G. Tuffin, J. Drewe, J. Huwyler, “The human brain endothelial cell line hCMEC/D3 as a human blood-brain barrier model for drug transport studies,” *J. Neurochem.*, vol. 107, no. 5, pp. 1358–1368, 2008.
- [154] L. J. W. Van Der Laan, C. J. A. De Groot, M. J. Elices, and C. D. Dijkstra, “Extracellular matrix proteins expressed by human adult astrocytes in vivo and in vitro: An astrocyte surface protein containing the CS1 domain contributes to binding of lymphoblasts,” *J. Neurosci. Res.*, vol. 50, no. 4, pp. 539–548, Nov. 1997.
- [155] P. Sheet, “Sh-SHSY (atcc ® crl- 2266 TM),” pp. 4–6.
- [156] Z. Fanti, F. F. De-Miguel, and M. E. Martinez-Perez, “A method for semiautomatic tracing and morphological measuring of neurite outgrowth from DIC sequences,” in *2008 30th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and*

Biology Society, 2008, pp. 1196–1199.

- [157] B. Erbaykent-Tepedelen, S. Karamil, C. Gonen-Korkmaz, K. S. Korkmaz, “DNA damage response (DDR) via NKX3.1 expression in prostate cells,” *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 141, pp. 26–36, May 2014.
- [158] S. A. Hudson, H. Ecroyd, T. W. Kee, and J. A. Carver, “The thioflavin T fluorescence assay for amyloid fibril detection can be biased by the presence of exogenous compounds,” *FEBS J.*, vol. 276, no. 20, pp. 5960–72, Oct. 2009.
- [159] M. Biancalana and S. Koide, “Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1804, no. 7, pp. 1405–12, Jul. 2010.
- [160] C. Xue, T. Y. Lin, D. Chang, and Z. Guo, “Thioflavin T as an amyloid dye: fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation,” *R. Soc. open Sci.*, vol. 4, no. 1, p. 160696, Jan. 2017.
- [161] A. Alyamani and O. M. Lemine, “FE-SEM Characterization of Some Nanomaterial.”
- [162] C. Number, “Human Aggregated Beta Amyloid ELISA Kit,” vol. 3491, no. 30, pp. 2–5.
- [163] M. V. Berridge, P. Herst M., and A. Tan S., “Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction,” *Biotechnol. Annu. Rev.*, vol. 11, no. 2, pp. 127–151, 2016.
- [164] J. A. Cook and J. B. Mitchell, “Viability measurements in mammalian cell systems,” *Anal. Biochem.*, vol. 179, no. 1, pp. 1–7, 1989.
- [165] “Cell Proliferation Reagent WST-1.”
- [166] “Cytotoxicity Detection Kit (LDH) y Version 11.”
- [167] Z Hou, S Sang, H You, MJ Lee, J Hong, KV Chin, CS Yang. “Mechanism of action of (-)-epigallocatechin-3-gallate:auto-oxidation-dependent inactivation of epidermal growth factor receptor and direct effects on growth inhibition in human esophageal cancer KYSE 150 cells,” *Cancer Res.*, vol. 65, no. 17, pp. 8049–56, 2005.
- [168] H. Zhao, P. Sun, T. Fan, X. Yang, T. Zheng, and C. Sun, “The effect of glutamate-induced excitotoxicity on DNA methylation in astrocytes in a new in vitro neuron-astrocyte-endothelium co-culture system,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 508,

no. 4, pp. 1209–1214, 2019.

- [169] D. E. Eigenmann, G. Xue, K. S. Kim, A. V. Moses, M. Hamburger, and M. Oufir, “Comparative study of four immortalized human brain capillary endothelial cell lines, hCMEC/D3, hBMEC, TY10, and BB19, and optimization of culture conditions, for an in vitro blood-brain barrier model for drug permeability studies.,” *Fluids Barriers CNS*, vol. 10, no. 1, p. 33, Nov. 2013.
- [170] M. A. Deli, C. S. Abrahám, Y. Kataoka, and M. Niwa, “Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology.,” *Cell. Mol. Neurobiol.*, vol. 25, no. 1, pp. 59–127, Feb. 2005.
- [171] V. L. Singleton and J. A. Rossi, “Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents,” *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 16, no. 3, 1965.
- [172] D. Huang, O. U. Boxin, and R. L. Prior, “The chemistry behind antioxidant capacity assays,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, no. 6. pp. 1841–1856, 23-Mar-2005.
- [173] K. Trainor, A. Broom, and E. M. Meiering, “Exploring the relationships between protein sequence, structure and solubility,” *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 42. Elsevier Ltd, pp. 136–146, 01-Feb-2017.
- [174] M. Citron, “Alzheimer’s disease: Strategies for disease modification,” *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 9, no. 5. pp. 387–398, May-2010.
- [175] C. Nerelius, A. Sandegren, H. Sargsyan, R. Raunak, H. Leijonmarck, U. Chatterjee, “ α -Helix targeting reduces amyloid- β peptide toxicity,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 23, pp. 9191–9196, Jun. 2009.
- [176] C. A. Söldner, H. Sticht, and A. H. C. Horn, “Role of the N-terminus for the stability of an amyloid- β fibril with three-fold symmetry.,” *PLoS One*, vol. 12, no. 10, p. e0186347, 2017.
- [177] P. Velander, L. Wu, F. Henderson, S. Zhang, D. R. Bevan, and B. Xu, “Natural product-based amyloid inhibitors.,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 139, pp. 40–55, 2017.
- [178] T. M. Ryan, J. Caine, H. D. Mertens, N. Kirby, J. Nigro, K. Breheny, L. J. Waddington,

- V.A. Streltsov, C.Curtain, C.L. Masters, B.R.Roberts. “Ammonium hydroxide treatment of A β produces an aggregate free solution suitable for biophysical and cell culture characterization.,” *PeerJ*, vol. 1, p. e73, 2013.
- [179] B. Giunta, H. Hou, Y. Zhu, J.Salemi, A.Ruscin, R.D.Shytle,J. Tan, “Fish oil enhances anti-amyloidogenic properties of green tea EGCG in Tg2576 mice.,” *Neurosci. Lett.*, vol. 471, no. 3, pp. 134–8, Mar. 2010.
- [180] RC.Choi, JT. Zhu, AW. Yung, PS. Lee, SL. Xu, AJ. Guo, KY. Zhu, TT. Dong, KW. sim. “Synergistic action of flavonoids, baicalein, and daidzein in estrogenic and neuroprotective effects: A development of potential health products and therapeutic drugs against alzheimer’s disease,” *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, vol. 2013.
- [181] J. Krishtal, K. Metsla, O. Bragina, V. Tõugu, and P. Palumaa, “Toxicity of Amyloid- β Peptides Varies Depending on Differentiation Route of SH-SY5Y Cells.,” *J. Alzheimers. Dis.*, Aug. 2019.
- [182] V. Chandrasekaran, Y. Zhai, M. Wagner, P. L. Kaplan, J. L. Napoli, and D. Higgins, “Retinoic acid regulates the morphological development of sympathetic neurons.,” *J. Neurobiol.*, vol. 42, no. 4, pp. 383–93, Mar. 2000.
- [183] B. J. Goldie, M. M. Barnett, and M. J. Cairns, “BDNF and the maturation of posttranscriptional regulatory networks in human SH-SY5Y neuroblast differentiation.,” *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 8, p. 325, 2014.
- [184] C. Sagy-Bross, K. Kasianov, Y. Solomonov, A.Braiman, A.Friedman, N. Hadad, R. Levy. “The role of cytosolic phospholipase A2 α in amyloid precursor protein induction by amyloid beta1-42 : implication for neurodegeneration.,” *J. Neurochem.*, vol. 132, no. 5, pp. 559–71, Mar. 2015.
- [185] M. Shekarabi, M. Bourbonnière, A. Dagenais, and J. Nalbantoglu, “Transcriptional regulation of amyloid precursor protein during dibutyryl cyclic AMP-induced differentiation of NG108-15 cells.,” *J. Neurochem.*, vol. 68, no. 3, pp. 970–8, Mar. 1997.
- [186] J. I. Forster, S.Köglberger, C.Trefois, O.Boyd, A.S.Baumuratov, L.Buck, R.Balling, P.M. Antony, “Characterization of Differentiated SH-SY5Y as Neuronal Screening

- Model Reveals Increased Oxidative Vulnerability,” *J. Biomol. Screen.*, vol. 21, no. 5, pp. 496–509, Jun. 2016.
- [187] J. Krishtal, O. Bragina, K. Metsla, P. Palumaa, and V. Tõugu, “In situ fibrillizing amyloid-beta 1-42 induces neurite degeneration and apoptosis of differentiated SH-SY5Y cells,” *PLoS One*, vol. 12, no. 10, p. e0186636, 2017.
- [188] H. Teppola, J.-R. Sarkanen, T. O. Jalonen, and M.-L. Linne, “Morphological Differentiation Towards Neuronal Phenotype of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells by Estradiol, Retinoic Acid and Cholesterol,” *Neurochem. Res.*, vol. 41, no. 4, pp. 731–47, 2016.
- [189] Schneider L, Giordano S, Zelickson BR, S Johnson M, A Benavides G, Ouyang X, Fineberg N, Darley-Usmar VM, Zhang J. “Differentiation of SH-SY5Y cells to a neuronal phenotype changes cellular bioenergetics and the response to oxidative stress”. *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 51, no. 11, pp. 2007–17, Dec. 2011.
- [190] S. Paik, R. K. Somvanshi, and U. Kumar, “Somatostatin-Mediated Changes in Microtubule-Associated Proteins and Retinoic Acid-Induced Neurite Outgrowth in SH-SY5Y Cells,” *J. Mol. Neurosci.*, vol. 68, no. 1, pp. 120–134, May 2019.
- [191] R Filograna, L Civiero, V Ferrari, G Codolo, E Greggio, L Bubacco, M Beltramini, Bisaglia M, “Analysis of the Catecholaminergic Phenotype in Human SH-SY5Y and BE(2)-M17 Neuroblastoma Cell Lines upon Differentiation,” *PLoS One*, vol. 10, no. 8, p. e0136769, 2015.
- [192] T. Härd and C. Lendel, “Inhibition of amyloid formation,” *J. Mol. Biol.*, vol. 421, no. 4–5, pp. 441–65, Aug. 2012.
- [193] N. A. Rahman, U, Meyding-Lamade, E. M. Craemer, S. Diah, A. A. Tuah, S. H. Muharram, “Immortalized endothelial cell lines for in vitro blood-brain barrier models: A systematic review,” *Brain Res.*, vol. 1642, pp. 532–545, 2016.
- [194] H. Wolburg, S. Noell, A. Mack, K. Wolburg-Buchholz, and P. Fallier-Becker, “Brain endothelial cells and the glio-vascular complex,” *Cell Tissue Res.*, vol. 335, no. 1, pp. 75–96, Jan. 2009.

8. EKLER

EK-1 ETİK KURUL ONAYI

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

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

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	2652-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Gastrodia Elata, Punicalagin, Ellagic Asid, EGCG Polifenolik Bileşikleri ve Kombinasyonlarının Amiloid Beta Plaklarını Çözündürme Etkinliğinin Differansiye-SH-SY5Y Hücrelerinde İncelenmesi ve Differansiye-SH-SY5Y Hücrelerinin İn-Vitro Kan Beyin Bariyer Bütünlüğündeki Rolü
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr.A.Semra KOÇTÜRK Tıbbi Biyokimya A.D.
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

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

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2016/11-20	Tarih:21.04.2016
	Prof.Dr.A.Semra KOÇTÜRK'ün sorumlusu olduğu "Gastrodia Elata, Punicalagin, Ellagic Asid, EGCG Polifenolik Bileşikleri ve Kombinasyonlarının Amiloid Beta Plaklarını Çözündürme Etkinliğinin Differansiye-SH-SY5Y Hücrelerinde İncelenmesi ve Differansiye-SH-SY5Y Hücrelerinin İn-Vitro Kan Beyin Bariyer Bütünlüğündeki Rolü" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?	İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	Katılımcı
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	İmza
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	Katılımcı
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	İmza
Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	İmza
Prof.Dr.Sevinç ERASLAN	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	İmza
Prof.Dr.Mukaddes GÜMÜŞTEKİN	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	Katılımcı
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	İmza
Prof.Dr.Nihal GELECEK	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐ H ☒	Katılımcı
Prof.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	İmza
Doç.Dr.Şeyda SEREN İNTEPELER	Hemşirelik Yönetimi	DEU Hemşirelik Fakültesi Hemşirelik Yönetimi A.D	Kadın	E ☐ H ☒	İmza
Doç.Dr.Sefa KIZILDAĞ	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D	Erkek	E ☐ H ☒	İmza
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEU Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	İmza
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐ H ☒	Katılımcı
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐ H ☒	İmza

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

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

BASVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	2652-GOA	
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ MÜNFERİT ARAŞTIRMA ☐ ÖÇM ☐ YÜKSEKLİSANS ☒ DOKTORA ☐	
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Gastrodia Elata, Punicaglin, Ellagic Acid, EGCG Polifenolik Bileşikleri ve Kombinasyonlarının Amiloid Beta Plaklarını Çözündürme Etkinliğinin Differansiye-SH-SY5Y Hücrelerinde İncelenmesi ve Differansiye-SH-SY5Y Hücrelerinin İn-Vitro Kan Beyin Bariyer Bütünlüğündeki Rolü	
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr.A.Semra KOÇTÜRK Tıbbi Biyokimya A.D.	
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-	
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-	
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
				Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	Araştırma dilekçesi	11.07.2018				

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2018/18-33	Tarih:19.07.2018
	Prof.Dr.A.Semra KOÇTÜRK'un sorumlusu olduğu "Gastrodia Elata, Ponicalagin, Ellagic Asid, EGCG Polifenolik Bileşikleri ve Kombinasyonlarının Amiloid Beta Plaklarını Çözündürme Etkinliğinin Differansiye-SH-SY5Y Hücrelerinde İncelenmesi ve Differansiye-SH-SY5Y Hücrelerinin İn-Vitro Kan Beyin Bariyer Bütünlüğündeki Rolü" isimli klinik araştırmaya ait 17.07.2018 tarihli araştırıcı dilekçesine ilişkin olarak; -Çalışma adının "Polifenolik Bileşiklerin Amiloid Beta Plak Çözündürme Etkinliklerinin Differansiye-SH-SY5Y Hücrelerinin Araştırılması ve Differansiye Hücrelerin Kan-Beyin Bariyer Bütünlüğüne Etkisinin İn Vitro Olarak İncelenmesi" olarak değiştirilmesi, ile ilgili belge incelenerek bilgi edinilmiş ve uygun bulunmuştur.	
	ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkili mi?	İmza
Prof.Dr.Ali Rıza ŞİŞMAN (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	<i>A.Şişman</i>
Prof.Dr.Gül ERGÖR (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEÜ Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Katılamadı</i>
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEÜ Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	<i>Katılamadı</i>
Prof.Dr. Mehmet Refik MAS	Geriatri	DEÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	<i>Katılamadı</i>
Prof.Dr.Ayşe Aydın ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Öz.</i>
Prof.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Katılamadı</i>
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Katılamadı</i>
Prof.Dr.Süleyman SARIOĞLU	Patoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	<i>S.Ö.</i>
Prof.Dr.Bülge KARA	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEÜ Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐ H ☒	<i>B.K.</i>
Prof.Dr.Ayhan ABACI	Pediyatrik Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları	DEÜ Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	<i>A.A.</i>
Doç.Dr.M.Aylin ARICI	Tıbbi Farmakoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>A.A.</i>
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEÜ Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E ☐ H ☒	<i>M.B.</i>
Doç.Dr.Yasemin SOYSAL	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Y.S.</i>
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEÜ Tıp Tarihi ve Etik A.D.	Erkek	E ☐ H ☒	<i>A.C.B.</i>
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐ H ☒	<i>M.E.Ö.</i>

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

EK-2 ÖZGEÇMİŞ



BELGİN SERT SERDAR

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

Kimlik Numarası	16735777902
Doğum Tarihi	08/06/1988
İletişim Adresi	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası Biyokimya ABD
Telefon	(554) 609 4978
E-posta	belginsrt@gmail.com
Web Adresi	

Yabancı Dil Bilgileri

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

Ar-Ge Yetkinlik

Makaleler

B. SERT SERDAR, CA125, YKL-40, HE-4 and Mesothelin: a new serum biomarker combination in discrimination of benign and malignant epithelial ovarian tumor, Turkish Journal of Biochemistry, 2019, 1303-829X, volume 44, 4, 438-451.

B. SERT SERDAR, Melatonin attenuates the detrimental effects of UVA irradiation in human dermal fibroblasts by suppressing oxidative damage and MAPK/AP-1 signal pathway in vitro, Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine Journal, 2019, 1600-0781, volume 35, 4, 221-231.

Bildiriler

B. SERT SERDAR, Evaluation of Neuronal SH-SY5Y Cell Differentiation Process with Neuronal Markers and Catecholamine Levels, Poster Sunumu, Cell Death: Degeneration and Regeneration Symposium, 03 Ekim 2019, 05 Ekim 2019.

B. SERT SERDAR, Apoptotic Effect of Boron Derivatives on HL-60 Acute Promyelocytic Leukemia Cell Line, Sözlü Sunum, 2nd International Cell Death Research Congress (3rd Congress of Cell Death Research Society-Turkey), 01 Kasım 2018, 04 Kasım 2018, 2504-3900,

B. SERT SERDAR, Effects of Quercetin and Curcumin Combination on Signal Transduction Pathways in Chronic Myeloid Leukemia Cells., Sözlü Sunum, 2nd International Cell Death Research Congress (3rd Congress of Cell Death Research Society-Turkey), 01 Kasım 2018, 04 Kasım 2018.

B. SERT SERDAR, which medium and ingredients provide better morphological differentiation of SH-SY5Y cells, Poster Sunumu, 2nd International Cell Death Research Congress, 01 Kasım 2018, 04 Kasım 2018.

B. SERT SERDAR, Nöroblastoma Hücre Diferansiyasyonun Mikrotübül İlişkili Protein-2, Nörofilament Ağırlık Zincir Proteinleri ile Değerlendirilmesi, Poster Sunumu, Uluslararası Katılımlı, Nörodejenerasyon/Nörorejenerasyon Çalıştay, 04 Mayıs 2018, 05 Mayıs 2018.

B. SERT SERDAR, The Effects of Resveratrol Gain Importance According to P53 Mutation in Hct116 Colon Cancer Cell lines, Poster Sunumu, Spetses Summer School an EACR-FEBS advanced lecture course, 16 Ağustos 2017, 24 Ağustos 2017.

B. SERT SERDAR, Evaluation of Diagnostic Performance of YKL-40, HE-4, LYGD1 and Mesothelin Biomarkers as a Panel in Differentiation of Epithelial Ovarian Cancers and Benign Ovarian Disease, Sözlü Sunum, In vitro Diagnostic Biomarkers Symposium, 10 Mayıs 2017, 12 Mayıs 2017, 1303-829X.

B. SERT SERDAR, The Importance of Resveratrol in Point of P53 Mutation and SIRT1 Activity of Colorectal Cancer Cells, Poster Sunumu, 1st International Cell Death Research Congress (3rd Congress of Cell Death Research Society-Turkey), 04 Mayıs 2017, 07 Mayıs 2017.

B. SERT SERDAR, Cytotoxic Effects of Boron Compounds in P53 (+/+) And P53 (-/-) HCT-116 Colon Carcinoma Cells Lines., Poster Sunumu, 41st FEBS Congress, 03 Eylül 2016, 08 Eylül 2016.

Ödüller

Diğer, Ulusal, Poster Sunum İkincilik Ödülü, Poster Ödül Alınan Kurumi HÖAD (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş), TÜRK YE, 03-06 Ekim 2019.

Diğer, Ulusal, Sözlü Sunum Üçüncülük Ödülü, Sözlü sunum, Ödül Alınan Kurumi HÖAD (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş), TÜRK YE, 04 Kasım 2018.

Diğer, Ulusal, Poster Sunumu Üçüncülük Ödülü, Poster Ödülü, Ödül Alınan Kurumi HÖAD (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş), TÜRK YE, 06 Mayıs 2018.

Diğer, Uluslararası, FEBS Youth Fund Advanced Course Grant, 2. FEBS Youth Fund Advanced Course Grant, Ödül Alınan Kurumi FEBS (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş), YUNAN STAN, 16 Ağustos 2017.

Diğer, Ulusal, 2228-B Yüksek Lisans Öğrencileri için Doktora Burs Programı, Doktora Burs, Ödül Alınan Kurumi TÜBİTAK BİLİM KURULU, TÜRK YE, 01 Aralık 2014.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

B DEB Destekleri

BELGİN SERT SERDAR, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Burslar Müdürlüğü, 2228-B Yüksek Lisans Öğrencileri için Doktora Burs Program , Bursu Kesildi, 2014-2, 01.03.2015 -28.02.2019.

Panelistlik/ Zileviciilik/Raportörlük Sayı s

Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı

ARDEB/B DEB 0

TEYDEB 0

Toplam 0

Uzleviceilik/Danışmanlık Sayısı

ARDEB/B DEB 0

TEYDEB 0

Toplam 0

Raportörlük Sayısı

ARDEB/B DEB 0

TEYDEB 0

Toplam 0



EK-3 MAKALE



Editor-in-Chief

Glden Akdal
Department of Neurology,
Dokuz Eylül School of Medicine,
Izmir, Turkey

Associate Editors

Betül Baykan
Department of Neurology,
Istanbul University Istanbul School
of Medicine, Istanbul, Turkey

Hilmi Uysal
Department of Neurology,
Akdeniz University School of
Medicine, Istanbul, Turkey

Erkin zgiray
Department of Neurosurgery,
Ege University School of Medicine,
Izmir, Turkey

Neurological Sciences and
Neurophysiology is the single-
blind peer-reviewed, open
access, international publication
organ of Turkish Society of
Clinical Neurophysiology EEG-
EMG. The journal is a quarterly
publication, published in March,
June, September and December
and the publication language of
the journal is English.

Contact

Adress: Department of Neurology,
Dokuz Eylül University School of
Medicine, 35100, Izmir, Turkey
Phone: +90 232 412 40 50
Fax: +90 232 277 77 21
E-mail: info@nsnjournal.org

Neurological Sciences and Neurophysiology

13.09.2019

Dear Semra Koçtürk,

I am pleased to inform you that your manuscript entitled as "Comparison of Medium Supplements in Terms of The Effects on The Differentiation of SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line" has been accepted for publication in the Neurological Sciences and Neurophysiology.

We are looking forward to publishing your other studies.

Sincerely,

Glden AKDAL
Editor in Chief

Manuscript no: JNS-12463.REV-1

Title: Comparison of Medium Supplements in Terms of The Effects on The Differentiation of SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line

Authors: Belgin Sert Serdar, Tuğba Erkmen, Bekir Uğur Ergr, Pınar Akan, Semra Koçtürk

Comparison of Medium Supplements in Terms of the Effects on the Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line

Belgin Sert Serdar¹, Tuğba Erkmen¹, Bekir Uğur Ergür², Pınar Akan¹, Semra Koçtürk¹

¹ *Dokuz Eylül University Faculty of Medicine, Department of Biochemistry, Health Sciences Institute, İzmir, Turkey*

² *Dokuz Eylül University Faculty of Medicine, Graduate School of Health Sciences, Department of Histology and Embryology, İzmir, Turkey.*

Corresponding author: Prof. Dr. Semra KOÇTÜRK

Address: Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Department of Biochemistry, 35340 Balçova, IZMİR/ TURKEY

Abstract

Objective: The human SH-SY5Y cell line, has been frequently used for *in-vitro* experiments in neuroscience-related research. However, the cell line needs to differentiate to reflect a better neuronal characteristic. The similarity of the phenotype and characteristic of the cells have great importance when comparing results obtained from *in-vitro* models. However, many studies have been performed using different medium ingredients, which affects the differentiation progress of the cells. Therefore, we aimed to compare generally used differentiation mediums, containing only retinoic acid and supplemented with different ingredients, in terms of neuron-like phenotype characteristics and stability.

Methods: The effects of medium ingredients on differentiation levels were evaluated using morphologic change, neurite length and immunofluorescence detection of neuronal markers such as NF-H, β -III tubulin, MAP2. The stability of differentiated cells was followed microscopically at day 7, 10 and 14 using morphologic change and neurite length with the Neuron J software.

Results: The results revealed that the cells pre-treated with retinoic acid for 5-days followed by 5-days treatment with mix medium and BDNF, provided significantly longer neurite length than the other groups ($p < 0.001$). In this group, the expressions of β -III tubulin, MAP2, and NF-H were also significantly higher than the control group ($p < 0.05$, $p < 0.001$, $p < 0.05$ respectively) and differentiated cells were stable until the 7th day.

Conclusion: Our results demonstrated that enriched mediums were necessary for better differentiation of SH-SY5Y cells. We recommend a 10-day treatment period and use of RA, BDNF, dc-AMP, and KCI together in SH-SY5Y cell differentiation.

Keywords: SH-SY5Y cells; differentiation; MAP2; β -III tubulin; NF-H.

INTRODUCTION

The neuroblastoma (SH-SY5Y) cell line has frequently been used for *in-vitro* experiments but it lacks some of the features of functionally mature neurons (1, 2). Many studies have demonstrated that differentiated and undifferentiated SH-SY5Y cells have important differences that affect morphology, polarization, neurites length and proliferation rates of the cells (2,3). For instance, undifferentiated SH-SY5Y cells consist of neuroblast-like cells (N-type), epithelial-like cells (S-type) and lack of many of features that define neurons such as expression of neuron-specific markers (2,4). Therefore, the differentiation of the SH-SY5Y cell line has great importance for research in neuroscience. Studies revealed that SH-SY5Y cells were differentiated by a treatment with a differentiation medium, with the cells gained some biochemical characteristics and expression of neuronal markers such as β -III tubulin, microtubule-associated protein 2 (MAP2), neurofilament heavy/light polypeptides (NF-H, NF-L), growth-associated protein-43 (GAP-43) and neuronal nuclei (NeuN) (2,4,5). Evidence of differentiation is accepted with the determination of three or four of the neuronal

markers in differentiated cells. For instance, β -III tubulin is a microtubule element found in mature neurons and involved in axon maintenance (6). The other marker, MAP2, is a major component of microtubules in dendrites and has a role in determining and stabilizing dendritic shape during neuron development (7). Neurofilament heavy polypeptide is a type of intermediate filament existing in axons and its expression allows the cytoskeleton network that provides a gradient between the distal and proximal side of the cells (8,9). Growth-associated protein-43 (GAP-43) is another nervous tissue-specific cytoplasmic protein, and its expression is increased during neuronal growth, development and axonal regeneration (10). Neuronal nuclei (NeuN) is accepted as a neuron-specific marker in the literature but its function is unknown (11).

Currently, various reagents have been used in the differentiation process but which medium provides better differentiation for the neuron-like phenotype has not yet been clearly elucidated. Retinoic acid (RA) is a commonly used reagent in differentiation and many studies have shown that RA and the addition of vitamin D3, phorbol esters, dibutyryl-cyclic AMP (db-cAMP), cholesterol, estradiol, 12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), nerve growth factor (NGF) to the medium provides better differentiation of SH-SY5Y cells, reflecting as neuron-like phenotype (5,12,13). In addition, the treatment period of the cells is another important factor in differentiation. In the literature, RA treatment periods show variability between 3–5 days and >10 days (4,5). Encinas et al. emphasized the importance of the RA treatment period on differentiation. They argued that short-term treatment (up to 5 days) had a capacity to induce the proliferation of neuroblast-like N-type cells, but a longer period, (>10 days), lead to promoting the proliferation of epithelial-like S-type cells (4). Some researchers also emphasized that the combination of RA with other agents such as BDNF, cholesterol, estradiol, dc-AMP had a beneficial effect on the expression

of neuronal markers (1,14-16). That there are different recommendations in the literature about the ingredients of differentiation media creates a need for investigation to, determine the best differentiation medium ingredients for differentiation of SH-SY5Y cells.

In the present study, our aim was to examine the effects of medium ingredients and the treatment periods on the differentiation of SH-SY5Y cells. We compared generally used differentiation mediums containing RA only, BDNF, and a mixed medium composed of different ingredients such as dc-AMP, Glutamax I, potassium chloride (KCI). Differentiation was evaluated using morphologic changes, neurite length, expression of β -III Tubulin, MAP2, and NF-H, and neurite length stability. Our results showed that RA-Mix-BDNF medium had the best differentiation capacity for SH-SY5Y cells, and we suggest that it should be used for neuroscience studies.

MATERIALS AND METHODS

The study was approved by the XXXXX University Noninvasive Research Ethics Board (Acceptance code:2016/11-20).

Cell Culture and Differentiation Mediums: The human neuroblastoma cell line SH-SY5Y (ATCC–2266) was purchased from American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, USA). Cells were cultured in DMEM: F12 (Biochrom; Berlin, Germany) supplemented with fetal bovine serum, penicillin, streptomycin in a humidified 5% CO₂ incubator at 37°C. Six groups were formed; group 1: (control), undifferentiated SH-SY5Y cells, group 2: cells treated with RA (10 μ M) for 5-days, group 3: cells treated with 10 μ M RA (Sigma; St Louis, USA) for 10-days, group 4: cells pre-treated with RA for 5-day followed by 50 ng/mL BDNF (Sigma; St Louis, USA) for 5-days, group 5: cells pre-treated with RA for 5-days followed with mix medium (Neurobasal (Thermo Fisher Scientific; Massachusetts, USA),

B27 (1X) (Thermo Fisher Scientific; Massachusetts, USA), 2mM dc-AMP (Sigma; St Louis, USA), 20 mM KCl (Fisher; Michigan, USA), 2mM Glutamax I (Thermo Fisher Scientific; Massachusetts, USA) for 5-days, group 6: cells pre-treated with RA for 5-day followed by a mixed medium (Neurobasal, B27 (1X), db-cAMP(2 mM), KCl (20 mM), Glutamax I (2 mM) and BDNF (50 ng/mL) for 5-days. The differentiation period was 10 days for all groups except for group 2, which was 5 days. The culture medium was changed every 3-4 days and supplemented with fresh medium. The cellular morphology of the groups was examined using an Olympus CKX40 digital camera at 40X magnification. Early passages (1-10) of the cells were used in all experiments.

Measurement of Neurite length:

Neurite length was measured using the Neuron J analysis software (ImageJ software, NIH) which provides for neurite. The cultured cells were observed using a phase-contrast microscope on the 10th day and 5th day. Six different locations were counted for each well and mean values were evaluated using the software.

Immunofluorescence Assay:

An immunofluorescence assay was performed to investigate the expression of MAP2, NF-H and β -III tubulin neuronal-specific markers. The immunofluorescence protocol was modified from the method described previously (17). The undifferentiated and differentiated SH-SY5Y cells were plated at a density of 3×10^4 cells/coverslip on 12-mm glass coverslips precoated with poly-D-lysine (PDL) (Sigma; St Louis, USA). At the 10th day of the differentiation, the cells were fixed with cold methanol for 30 min at room temperature and rinsed three times with phosphate-buffered saline (PBS Biochrom; Berlin, Germany). After washing, cells were permeabilized with 0.2% Triton X-100 (Sigma; St Louis, USA) in PBS for

5 minutes and then incubated in blocking solution (1% BSA in PBS) at room temperature. Then, the cells were incubated for overnight at 4 °C with primary antibodies, separately (MAP2 (Abcam; Cambridge, UK), β -III tubulin (Santa Cruz; Texas, USA), and NF-H (Abcam; Cambridge, UK). At the end of the incubation period, all samples were washed with PBS and incubated with secondary antibody at room temperature for 1 hour. After nuclei were stained using 33342 Hoechst (Sigma; St Louis, USA), the samples were immediately analysed with a Leica DMIL fluorescence microscope.

Assessment of Stabilisation Period of the Differentiation

We also examined the stability period of the differentiated cells through morphologic and neurite length parameters, which provided information about how many days the cells carried neuronal characteristics. Cellular morphology and neurite length measurements were performed as described previously on the last day of the differentiation period and accepted as the day 0 of the stabilisation period, thereafter it was monitored on the 7th, 10th and 14th-days.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism Software, Inc., version 8.00, software. (La Jolla, CA, USA). Multiple groups were compared using one-way analysis of variance (ANOVA), Tukey's multiple comparison test and p-values < 0.05 were considered significant. All experiments were performed at least in triplicate.

RESULTS

Morphologic Assessment of the Groups

Our morphologic assessment results showed that the control cells (group 1) tended to grow in clusters and had no neurites but in the other groups (groups 2-6), the neurites tended to

extend (Figure 1). In groups 2 and 3, cells were treated with RA for 5 and 10 days respectively, and they displayed more neurites with branched morphology compared with the control group, which had branching but at a minimum level. Furthermore, group 6, in which cells were pre-treated with RA for 5 days, and followed by a BDNF included-mixed medium (Glutamax I, Neurobasal, KCI, dc-AMP) for 5 days, the branching rate and connections of neurites were higher than in the other groups (Figure 1f). Our morphologic assessment clearly revealed that the mediums used, their ingredients and treatment periods had an important effect on the differentiation level of SH-SY5Y cells.

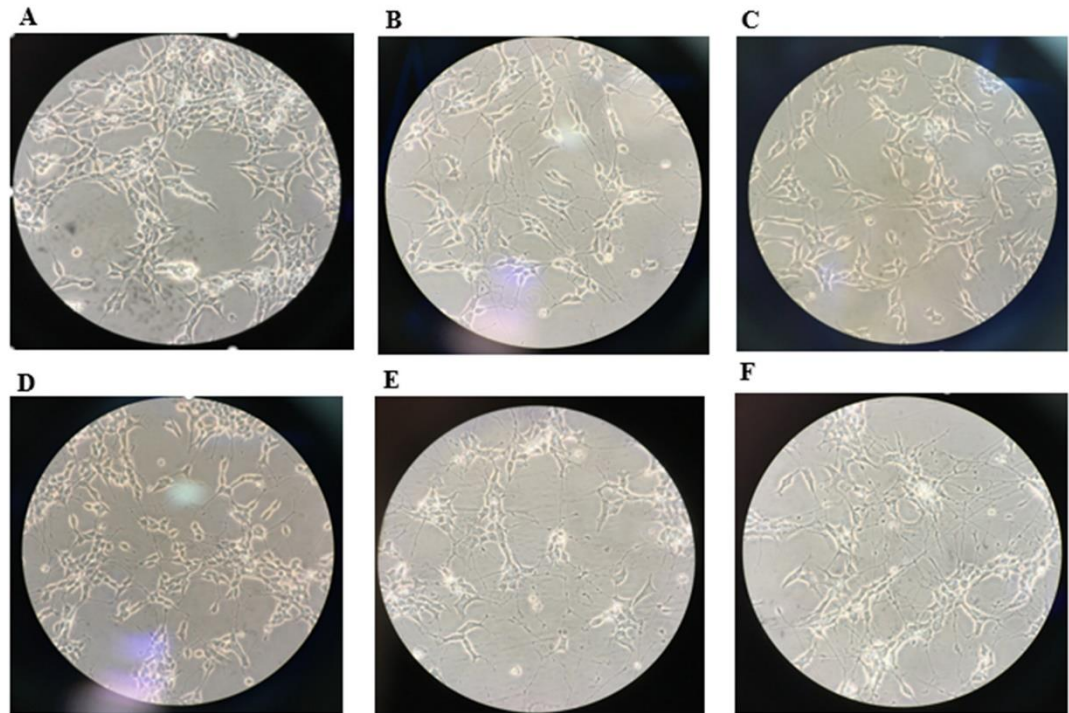


Figure 1. Cellular morphology and network of undifferentiated and differentiated SH-SY5Y cells with different treatment periods. **a)** undifferentiated **b)** treated with RA for 5 days **c)** treated with RA for 10 days **d)** pre-treated RA for 5 days then treated with BDNF for 5 days **e)** pre-treated with RA for 5 days then treated with mix medium for 5 days **f)** pre-treated with RA for 5 days then treated with mix medium and BDNF for 5 days. Images were obtained at 40X magnification using by phase contrast microscopy.

Determination of Neurite Length

The neurites lengths of the groups were calculated on the 10th and 5th day. As shown in Figure 2 differentiated cells treated with the mixed medium+ BDNF displayed significantly longer neurite extensions than the other groups ($p < 0.001$), except for the RA +Mix group ($p > 0.05$). When we compared the groups with each other, significant differences were found between the groups ($p < 0.001$, $p < 0.05$) (Figure 2). However, the medium with ingredients of Neurobasal, B27, KCI, Glutamax I, dc-AMP and BDNF with differentiated cells obtained the longest neurites among the six groups. These data show that BDNF has a promoting effect on neurite length compared with RA-Mix medium.

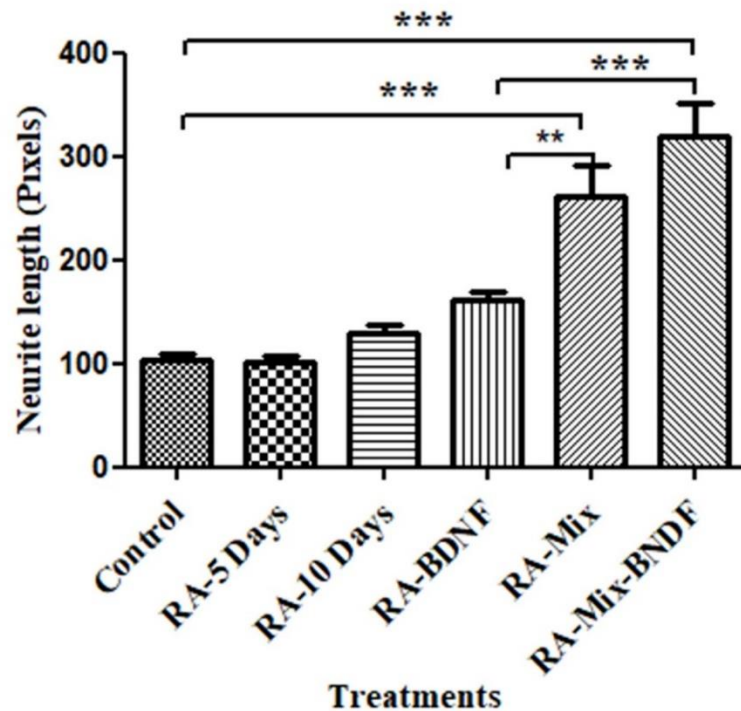


Figure 2. Effects of different treatments on neurite lengths of SH-SY5Y cells. Data showed mean $\pm$ S.D. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

Immunofluorescence Analysis of Neuronal Specific Markers

Immunofluorescence assays showed that β -III tubulin was found in low amounts in undifferentiated cells, but in group 6, its expression tended to increase with neuronal morphology ($p < 0.05$, Figure 3,4). The intensity of MAP2 expression was significantly stronger in group 6 than in the undifferentiated group ($p < 0.001$, Figure 5,6). NF-H expression was significantly higher in group 6 than in the undifferentiated group ($p < 0.05$, Figure 7,8).

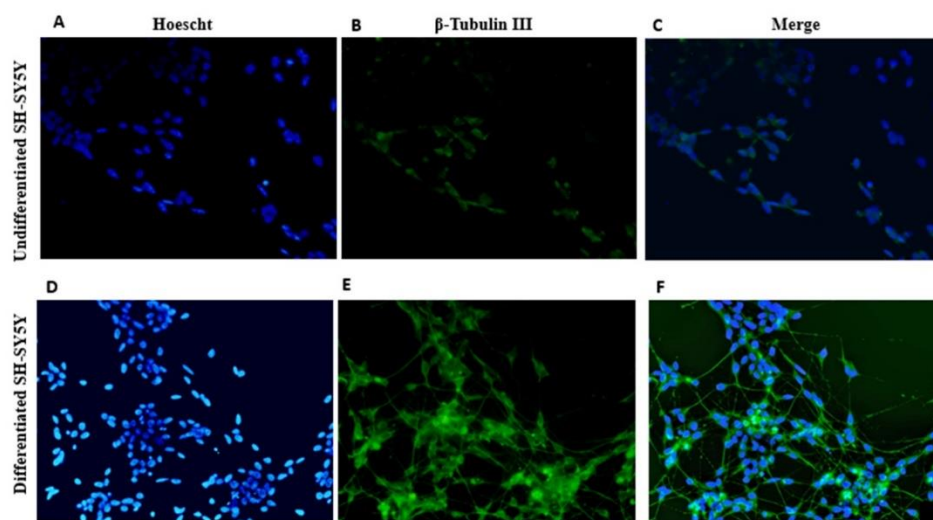


Figure 3. Immunofluorescence staining for the neuronal markers β -III tubulin. a. Nuclei stained with Hoechst in undifferentiated SH-SY5Y group b. β -Tubulin III in undifferentiated cells c. Merged image d. Nuclei stained with Hoechst in differentiated SH SY5Y cells in group 6 e. β -Tubulin III in differentiated SH SY5Y cells in group 6. f. Merged image group six. Images were obtained at 40X magnification using an immunofluorescence microscope. Scale bar: 150 μ m. Blue: Hoechst; Green: β -Tubulin III.

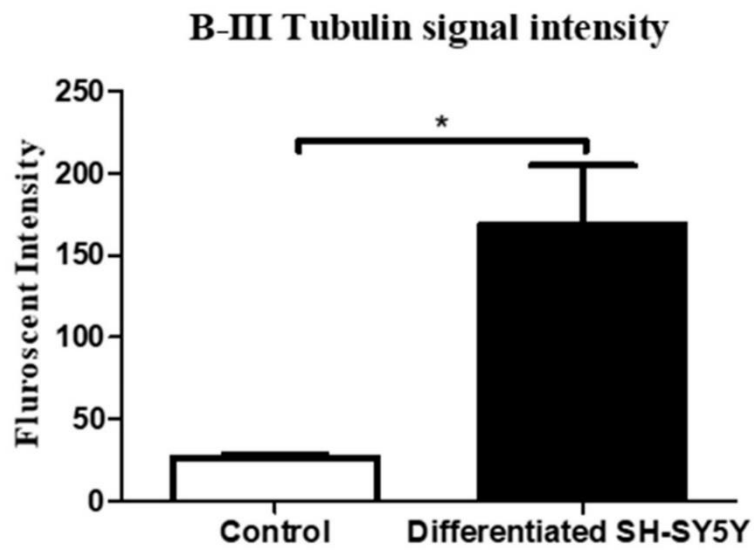


Figure 4. β -III tubulin signal intensity calculated by using Image-J software. Data showed mean $\pm$ S.D. * $p < 0.05$ vs. Control group (n = 9).

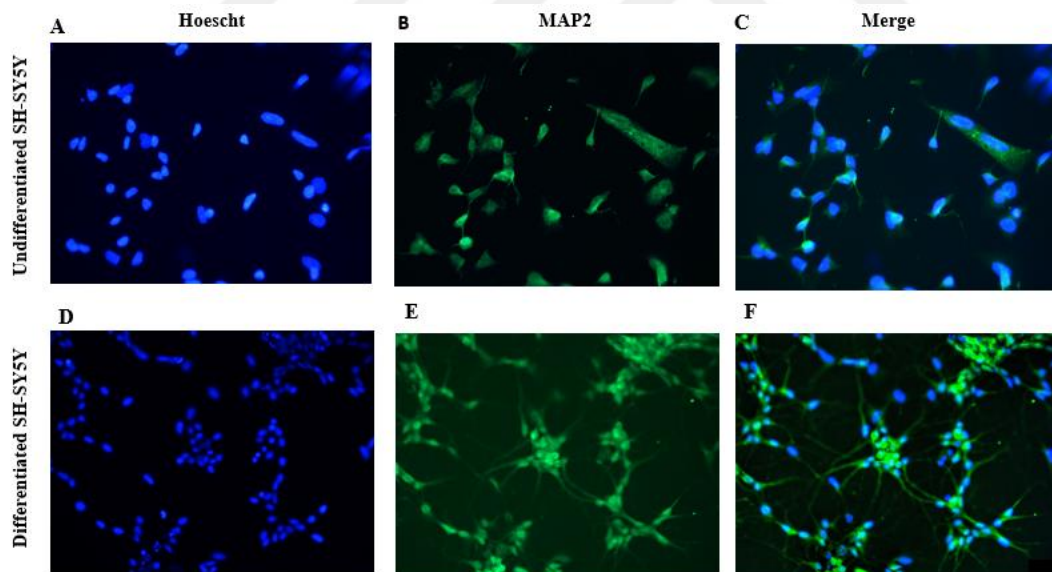


Figure 5. Immunofluorescence staining for the neuronal markers MAP2. a. Nuclei stained with Hoescht in undifferentiated group b. MAP2 in undifferentiated cells. c. Merged image d. Nuclei stained with Hoescht in differentiated SH-SY5Y in group 6. e. MAP2 in differentiated SH SY5Y cells in group 6. f. Merged image in group 6. Images were obtained at 40X magnification using an immunofluorescence microscope. Scale bar: 150 μ m. Blue: Hoescht; Green: MAP2.

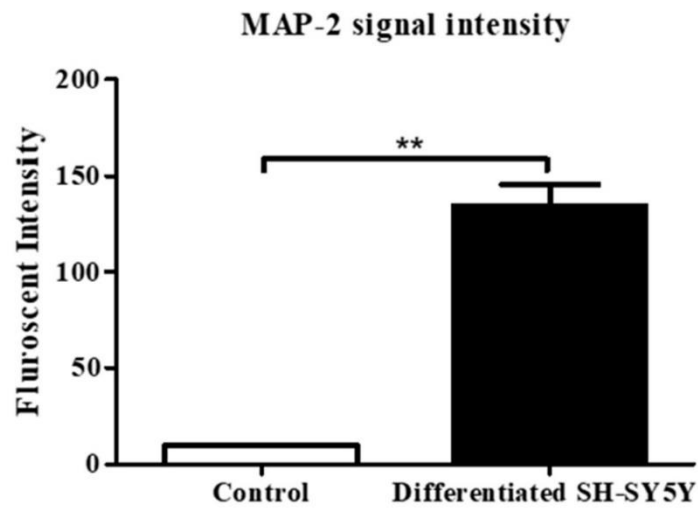


Figure 6. MAP-2 signal intensity calculated by using Image-J software. Data showed mean $\pm$ S.D. $**p < 0.001$ vs. Control group (n = 9).

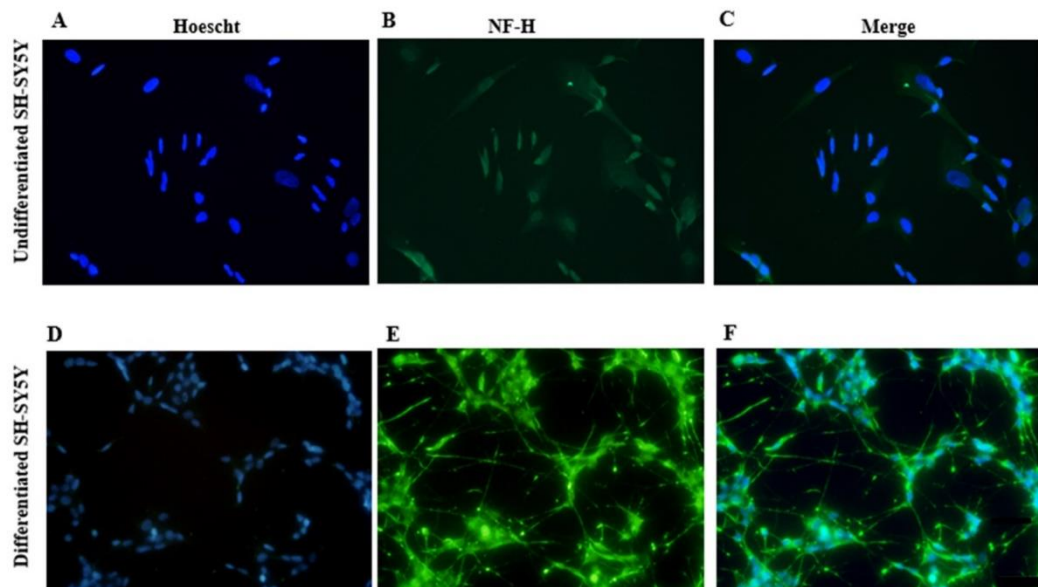


Figure 7. Immunofluorescence staining for the neuronal markers neurofilament heavy polypeptide. a. Nuclei stained with Hoechst in undifferentiated group b. NF-H in undifferentiated cells. c. Merged image. d. Nuclei stained with Hoechst in differentiated SH-SY5Y in group 6. e. NF-H in differentiated SH-SY5Y in group 6. f. Merged image in group 6. Images were obtained at 40X magnification using an immunofluorescence microscope. Scale bar: 150 μ m. Blue: Hoechst; Green: NF-H.

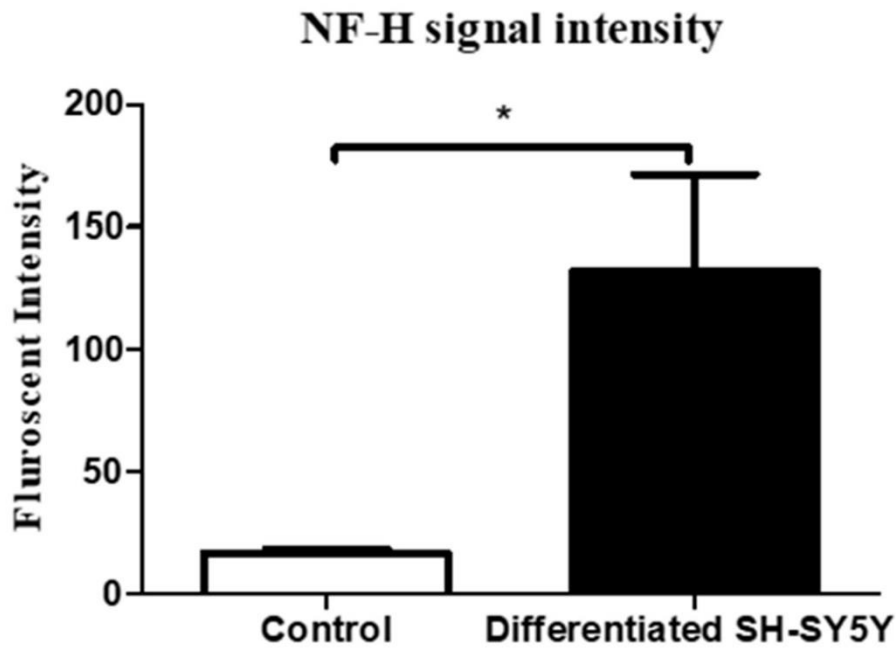


Figure 8. NF-H signal intensity calculated by using Image-J software. Data showed mean $\pm$ S.D. * $p < 0.05$ vs. Control group (n = 9).

Stability

We also investigated the stability period of neuronal morphology and neurite length in differentiated cells (Figure 9, 10). Our results demonstrated that there was no significant difference between day 0 and the 7th day results in terms of neurite length (Figure 10). However, the neurite lengths of the 10th and 14th -days were significantly shorter than on day 0 ($p < 0.05$, $p < 0.001$ respectively). The obtained data clearly revealed that differentiated cells were stable up to the 7th day.

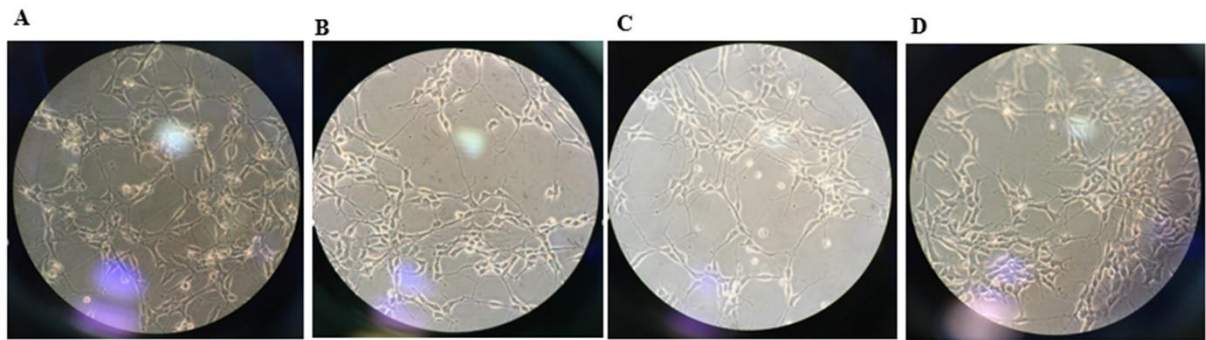


Figure 9. Morphological changings after differentiation periods. a. 0th day, after differentiation protocols b. 7th day, after differentiation protocols c. 10th day, after differentiation protocols d. 14th day, after differentiation protocols. Images were obtained at 40X magnification using by phase contrast microscopy.

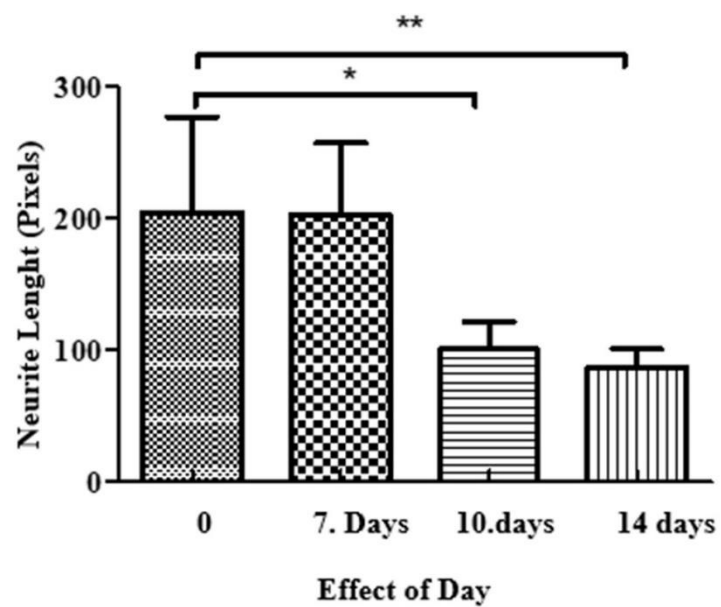


Figure 10. Neurite length changings at 0th, 7th, 10th and 14th days after differentiation periods. Images were obtained at 40X magnification using by phase contrast microscopy and Neuron J software. Data showed mean $\pm$ S.D. ** $p < 0.001$, * $p < 0.05$.

DISCUSSION

To reach accurate results, cells reflecting a mature neuron-like phenotype or behaviour have great importance in nervous system-related studies. With this awareness, we aimed to compare the generally used differentiation mediums with their differentiation performance for SH-SY5Y cells. Several attempts have been made to differentiate SH-SY5Y cells (1-5,11,13-16). Although RA-induced differentiation of SH-SY5Y cells has been the accepted and generally used protocol, the ingredients of mediums and the treatment period in differentiation remain controversial (4,5,14,16, 18-21). Combinational uses of BDNF and RA have been suggested by many studies for differentiation (1, 2, 4, 22-26), in only one study did the researchers claimed that there was no enhancing effect of combinational uses of RA and BDNF on differentiation (15). Shiley et al advocated that pre-treatment of the cells and combinational uses of some mediums had a beneficial effect on differentiation. In their study, they had pre-treated the cells with RA for 10-days, followed by differentiation media for 8-days, which consisted of Neurobasal, B27 (1X), KCI (20mM), Glutamax I (2 mM), dc-AMP (2mM), BDNF (50 ng/ml) (3). They suggested the protocol to generate neuronal cultures proven by the high expression levels of NF-H and MAP2 in the cells. Shiley et. al contributed to the literature about the ingredients of differentiation media but their results lacked comparison of the medium ingredients with each other.

The treatment period is another important factor in differentiation. The present study has shown that a neuron-like type phenotype (N-type) is needed to ensure a better differentiation of SH-SY5Y cells and treatment of RA over a longer period (>10 days) leads to promoting the proliferation of epithelial-like S-type cells (4). Therefore, there is a need to examine the effects of the ingredients of media and the RA treatment period together on the differentiation of the cells. We think that our study contributes to the literature by comparing medium ingredients

(RA, RA-BDNF, RA-Mix, RA-Mix-BDNF) and in terms of the time period (5 and 10 days). Our results are in contrast to many studies suggesting RA treatment only. For instance, we found a significant difference in neurite extensions between only RA treated, mixed and mixed-BDNF treated groups. Different ingredients of the differentiation mediums have been examined in studies and their results indicated that combinational treatment plays an important role in the differentiation of SH-SY5Y cells. For instance, Teppola et al. showed that when SH-SY5Y cells were treated with a combination of RA, cholesterol, and BDNF, neurites were longer, and there were more branching and network formations of the cells than with estradiol or RA treatment alone (15). This finding was also supported by the study of Agholme et al who suggested that RA+BDNF and RA+BDNF+cholesterol treatments provided longer neurites than treatment with RA alone (1). Recently, Paik et al. also demonstrated that combinational use of RA and somatostatin had an enhancing effect on neurite outgrowth (16).

The increased expression of some proteins, such as MAP2, β -III tubulin, GAP-43, and NF-H are also characteristic of differentiated cells but variation in protein markers can be seen related to *in-vitro* disease model. For instance, different markers can be chosen to prove the *in-vitro* disease models such as Parkinson's or Alzheimer's. Avola et al. confirmed SH-SY5Y cell differentiation by increased expression of MAP2, β -III tubulin and tyrosine hydroxylase for an *in-vitro* Parkinson's disease model (27). However, Jämsä et al. analysed the cell differentiation through the increased level of total glycogen synthase kinase 3 beta as well as the expression of the phosphorylation state of tau in an Alzheimer's disease model (14). Some researchers also emphasized the importance of the treatment period in differentiation. Lonnie et al. showed that the expression of MAP2 was increased by 50% after 5 days of treatment with RA (27). Another study demonstrated that RA-induced differentiated SH-SY5Y cells clearly exhibited neuronal specific markers Tau, β -III tubulin, and MAP2 on the 3rd and 7th days of treatment (16). Encinas

et al. also reported greater expression of NF-H and MAP2 in differentiated cells, treated with RA for 5 days and subsequently treated by BDNF for 5 days (4). Constantinescu et al. found greater expression of MAP2 and β -III tubulin in differentiated cells treated with 10 μ M RA for 14 days (11). Roberta et al. also demonstrated that 7 days treatment of RA and staurosporine led to an increase in the expression of neurofilament and β -III Tubulin in SH-SY5Y and BE (2)-M17 neuroblastoma cells (29). When all of the literature is evaluated together, a variation on the suggested treatment periods and the confirmation methods can clearly be seen. Therefore, we decide to compare the media by assessing their effects on morphology and neurite length. The differentiation marker assessment was performed in the group that had the longest neurite length which implies the best morphologic differentiation. In this group, the marker expressions (β -III tubulin, MAP2, and NF-H) were found significantly greater compared with the control groups ($p < 0.05$, $p < 0.001$, $p < 0.05$ respectively) similar to Shipley et. al's study (3).

The stability period of differentiation characteristics needs to be taken into consideration in studies. Shipley et al. exhibited that differentiated SH-SY5Y cells showed stability until the 14th day (3). Therefore, we examined whether the differentiated cells maintained their characteristics for up to 14 days. We clearly showed that neurite length was stable until the 7th day after differentiation, but the stability of the differentiation could be examined by different markers and methods.

In conclusion, to obtain more accurate and as-close to *in vivo* results, we suggest using a differentiation method that provides differentiation of a neuron-like phenotype. According to our results, we recommend our treatment period (10 days) and ingredients (RA, BDNF, dc-AMP, KCl, B27) to researchers for SH-SY5Y cell differentiation.

REFERENCES

1. Agholme L, Lindström T, Kågedal K, Marcusson J, Hallbeck M. An in vitro model for neuroscience: Differentiation of SH-SY5Y cells into cells with morphological and biochemical characteristics of mature neurons. *J Alzheimers Dis* 2010; 20:1069–1082.
2. Kovalevich J, Langford D. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods Mol. Biol* 2013; 1078:9–21.
3. Shipley MM, Mangold, CA, Szpara ML. Differentiation of the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *J Vis Exp* 2016; 17: 53193.
4. Encinas M, Iglesias M, Liu Y et al. Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem* 2000; 75:991–1003.
5. Cheung, YT, Lau, WK, Yu MS et al. Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *Neurotoxicology*. 2009; 30:127-35.
6. Avwenagha O, Campbell G, Bird MM. Distribution of GAP-43, beta-III tubulin and F-actin in developing and regenerating axons and their growth cones in vitro, following neurotrophin treatment. *J Neurocytol* 2003; 32:1077-89.
7. Harada A, Teng J, Takei Y, Oguchi K, Hirokawa N. MAP2 is required for dendrite elongation, PKA anchoring in dendrites, and proper PKA signal transduction. *J Cell Biol*. 2002; 5; 158:541-9.
8. Laser Azogui A, Kornreich M, Malka-Gibor E, Beck R. Neurofilament assembly and function during neuronal development. *Curr Opin Cell Biol* 2015; 32:92-101.
9. Yuan A, Rao MV, Veeranna, Nixon RA. Neurofilaments and Neurofilament Proteins in Health and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2017;3;9.
10. Pak EJ, Son GD, Yoo BS. Cadmium inhibits neurite outgrowth in differentiating human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Int J Toxicol*. 2014; 33:412-8.
11. Constantinescu R, Constantinescu AT, Reichmann H, Janetzky B. Neuronal differentiation and long-term culture of the human neuroblastoma line SH-SY5Y. *J Neural Transm Suppl* 2007;72:17-28.

12. Gimenez Cassina, A, Lim F, Diaz-Nido J. Differentiation of a human neuroblastoma into neuron-like cells increases their susceptibility to transduction by herpesviral vectors. *J Neurosci Res*. 2006; 84(4):755-67.
13. Murillo JR, Goto-Silva L, Sánchez A, Nogueira FCS, Domont GB, Junqueira, M. Quantitative proteomic analysis identifies proteins and pathways related to neuronal development in differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cells. *EuPA Open Proteom*. 2017; 23:16: 1-11.
14. Jämsä A, Hasslund K, Cowburn RF, Bäckström A, Vasänge M. The retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor differentiated SH-SY5Y cell line as a model for Alzheimer's disease-like tau phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 2;319(3):993-1000.
15. Teppola H, Sarkanen JR, Jalonon TO, Linne ML. Morphological differentiation towards neuronal phenotype of sh-sy5y neuroblastoma cells by estradiol, retinoic acid and cholesterol. *Neurochem Res* 2016;41(4):731-47.
16. Paik S, Somvanshi RK, Kumar U. Somatostatin-Mediated Changes in Microtubule-Associated Proteins and Retinoic Acid-Induced Neurite Outgrowth in SH-SY5Y Cells. *J Mol Neurosci* 2019; 68(1):120-134.
17. Erbaykent-Tepedelen B, Karamil S, Gonen-Korkmaz C, Korkmaz KS. DNA damage response (DDR) via NKX3.1 expression in prostate cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014; 141:26-36.
18. Gill I, Kaur S, Kaur N, Dhiman M, Mantha AK. Phytochemical Ginkgolide B Attenuates Amyloid- β 1-42 Induced Oxidative Damage and Altered Cellular Responses in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *J Alzheimers Dis* 2017;60(s1): S25-S40.
19. Da Rocha JF, da Cruz e Silva OA, Vieira SI. Analysis of the amyloid precursor protein role in neuritogenesis reveals a biphasic SH-SY5Y neuronal cell differentiation model. *J Neurochem* 2015;134(2):288-301.
20. Majd S, Majd Z, Koblar S, Power J. Beta estradiol and norepinephrine treatment of differentiated SH-SY5Y cells enhances tau phosphorylation at (Ser396) and (Ser262) via AMPK but not mTOR signaling pathway. *Mol Cell Neurosci* 2018; 88:201-211.
21. Majd S, Koblar S, Power J. Compound C enhances tau phosphorylation at Serine396 via PI3K activation in an AMPK and rapamycin independent way in differentiated SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett* 2018; 23; 670:53-61.

22. Forster JI, Köglberger S, Trefois C, Boyd O, Baumuratov AS, Buck L, Balling R, Antony PM. Characterization of Differentiated SH-SY5Y as Neuronal Screening Model Reveals Increased Oxidative Vulnerability. *J Biomol Screen* 2016;21(5):496-509.
23. Goldie BJ, Barnett MM, Cairns MJ. BDNF and the maturation of posttranscriptional regulatory networks in human SH-SY5Y neuroblast differentiation. *Front Cell Neurosci* 2014;15; 8:325.
24. Krishtal J, Bragina O, Metsla K, Palumaa P, Tõugu V. In situ fibrillizing amyloid-beta 1-42 induces neurite degeneration and apoptosis of differentiated SH-SY5Y cells. *PLoS One*. 2017 ; 24: 12(10):e0186636.
25. Pascual-Caro C, Berrocal M, Lopez-Guerrero AM et al. STIM1 deficiency is linked to Alzheimer's disease and triggers cell death in SH-SY5Y cells by upregulation of L-type voltage-operated Ca²⁺ entry. *J Mol Med (Berl)*. 2018;96(10):1061-1079.
26. Murillo JR, Goto-Silva L, Sánchez A, Nogueira FCS, Domont GB, Junqueira M. Quantitative proteomic analysis identifies proteins and pathways related to neuronal development in differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cells. *EuPA Open Proteom* 2017; 23; 16:1-11.
27. Avola R, Graziano ACE, Pannuzzo G, Albouchi F, Cardile V. New insights on Parkinson's disease from differentiation of SH-SY5Y into dopaminergic neurons: An involvement of aquaporin4 and 9. *Mol Cell Neurosci*. 2018; 88:212-221.
28. Schneider L, Giordano S, Zelickson BR et al. Differentiation of SH-SY5Y cells to a neuronal phenotype changes cellular bioenergetics and the response to oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2011; 1;51(11):2007-17.
29. Filograna R, Civiero L, Ferrari V et al. Analysis of the Catecholaminergic Phenotype in Human SH-SY5Y and BE (2)-M17 Neuroblastoma Cell Lines upon Differentiation. *PLoS One* 2015; 28:10(8): e0136769.