

**E VİTAMİNİNİN A-TOKOFEROL VE A-TOKOTRIENOL  
FORMLARININ BEYİNDE OLUŞAN BETA AMİLOID  
PLAK BİRİKİMİNE KARŞI KORUYUCU ETKİLERİNİN  
KARŞILAŞTIRILMASI**

**COMPARISON OF PROTECTIVE EFFECTS OF A-  
TOCOPHEROL AND A-TOCOTRIENOL FORMS OF  
VITAMIN E AGAINST BETA AMYLOID PLAQUE  
ACCUMULATION IN THE BRAIN**

**ALP YİĞİT ÖZDEMİR**

**PROF. DR. MEHMET ALİ ONUR**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

olarak hazırlanmıştır.

2021

i

Ilgın'a

## ÖZET

### **E VİTAMİNİNİN A-TOKOFEROL VE A-TOKOTRIENOL FORMLARININ BEYİNDE OLUŞAN BETA AMILOID PLAK BİRİKİMİNE KARŞI KORUYUCU ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

**ALP YİĞİT ÖZDEMİR**

**Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü**

**Tez Danışmanı: PROF DR. MEHMET ALİ ONUR**

**Mayıs 2021, 55 sayfa**

Bu tez çalışmasında, güçlü bir antioksidan olan E vitamininin  $\alpha$ - tokoferol ve  $\alpha$ -tokotrienol formlarının beta amiloid kaynaklı nörodejenerasyona karşı koruyucu etkileri hücre kültürü yöntemleri kullanılarak iki boyutlu *in vitro* nörodejenerasyon modeli üzerinde deneysel olarak incelenmiş ve karşılaştırılmıştır. Çalışmada E vitamininin  $\alpha$ - tokoferol ve  $\alpha$ -tokotrienol türevlerinin beta amiloid birikimi sonucu oluşan hücre ölümüne karşı koruyucu etkisinin incelenmesine ve bu iki E vitamini türevinin ortaya çıkardığı koruyucu etkilerin birbirleri ile karşılaştırılmasına odaklanılmıştır. Bu kapsamda iki boyutlu bir nörodejenerasyon modeli kurulabilmesi için primer nöron izolasyonu yapılmış ve elde edilen primer nöronlar üzerine beta amiloid uygulanmıştır. Ardından 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide analizi ile hücre canlılığı, nötral kırmızısı analizi ile sitotoksisite, Kongo Kırmızısı analizi ile beta amiloid birikim miktarı ve Akridin Orange / Propidium Iodide analizi ile yüzde apoptoz ve yüzde nekroz tespit edilmiştir. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile beta amiloid kaynaklı nörodejenerasyon mekanizmasında ifadesi artış gösteren Voltaj kapılı L-tip kalsiyum kanalı ve Beta sekretaz 1 genlerinin ifade edilme miktarları ölçülmüştür. Deneysel

çalışmalar altı adet dişi ve bir adet erkek sıçanın çiftleştirilmesi sonucu elde edilen 17-18 günlük sıçan yavruları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgulara göre E vitamininin  $\alpha$ - tokoferol ve  $\alpha$ - tokotrienol türevleri 48 ve 72 saatlik uygulamalarda beta amiloid kaynaklı nörodejenerasyona karşı koruyucu etki göstermiştir. Yapılan Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu analizi sonucu  $\alpha$ - tokoferol ve  $\alpha$ - tokotrienolün Voltaj kapılı L-tip kalsiyum kanalı ve Beta sekretaz 1 mekanizması üzerinde etkili olduğu ortaya çıkmıştır. E vitaminin bu iki türevinin Voltaj kapılı L-tip kalsiyum kanalı geninin ifadesini anlamlı bir şekilde azalttığı gözlemlenmiştir. Buna karşın Beta sekretaz 1 ifadesi üzerinde gözlemlenen düşüş istatistiksel olarak anlamlı değildir.  $\alpha$ - tokoferol ve  $\alpha$ - tokotrienolün beta amiloid kaynaklı nörodejenerasyona karşı gösterdiği koruyucu etki, hücre canlılığı ve sitotoksosite bakımından 48 ve 72 saatlik uygulamalarda farklı seviyelerde gözlemlenmiştir. Bu kapsamda  $\alpha$ - tokoferol ile  $\alpha$ - tokotrienolün beta amiloid kaynaklı nörodejenerasyona karşı gösterdiği koruyucu etkiler arasındaki fark ve E vitamininin Beta sekretaz 1 geni ifadesi üzerindeki etkisinin daha iyi anlaşılabilmesi için gelecekte daha detaylı çalışmalar yapılması gerekmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Nörodejenerasyon,  $\alpha$ - tokoferol,  $\alpha$ - tokotrienol, E Vitamini, Beta Amiloid Plak, Primer Nöron Kültürü

## **ABSTRACT**

### **COMPARISON OF PROTECTIVE EFFECTS OF A-TOCOPHEROL AND A- TOCOTRIENOL FORMS OF VITAMIN E AGAINST BETA AMYLOID PLAQUE ACCUMULATION IN THE BRAIN**

**ALP YİĞİT ÖZDEMİR**

**Master of Science, Department of Biology**

**Supervisor: PROF DR. MEHMET ALİ ONUR**

**May 2021, 55 pages**

In this thesis study, the protective effects of  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocotrienol forms of vitamin E, a powerful antioxidant, against beta amyloid-induced neurodegeneration were experimentally investigated and compared on a two-dimensional *in vitro* neurodegeneration model using cell culture methods. The focus of the study was to examine the protective effect of  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocotrienol derivatives of vitamin E against cell death caused by beta amyloid accumulation and to compare the protective effects of these two vitamin E derivatives with each other. In this context, primary neuron isolation was performed and beta amyloid was applied on the obtained primary neurons in order to establish a two-dimensional neurodegeneration model. Afterwards, cell viability was determined by analysis of 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide, cytotoxicity was determined by neutral red analysis, beta amyloid accumulation amount was determined by Congo Red analysis and percent apoptosis, and

necrosis were determined by Acridine Orange / Propidium Iodide analysis. In addition, the expression amounts of voltage-dependent L-type calcium channel and Beta-Secretase 1 genes whose expression increased in beta amyloid-induced neurodegeneration mechanism were measured by Real Time Polymerase Chain Reaction. Experimental studies were carried out using 17-18 day old rat pups obtained from mating six female and one male rats. According to the findings,  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocotrienol derivatives of vitamin E showed a protective effect against beta amyloid-induced neurodegeneration at 48 and 72 hours of application. As a result of the Real Time Polymerase Chain Reaction analysis, it was revealed that  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocotrienol were effective on Voltage-gated L-type calcium channel and Beta secretase 1 mechanism. These two components of vitamin E have been observed to significantly reduce the expression of the Voltage-gated L-type calcium channel gene. On the other hand, the decrease observed on Beta secretase 1 expression was not statistically significant. The protective effect of  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocotrienol against beta amyloid-induced neurodegeneration was observed at different levels in terms of cell viability and cytotoxicity in 48 and 72 hours applications. In this context, more detailed studies are required in the future in order to better understand the difference between the protective effects of  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocotrienol against beta amyloid-induced neurodegeneration and the effect of vitamin E on beta secretase 1 gene expression.

**Keywords:** Neurodegeneration,  $\alpha$ -tocopherol,  $\alpha$ -tocotrienol, Vitamin E, Beta Amyloid Plaque, Primary Neuron Culture

## TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, FYL-2019-18273 proje numarası ile Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir. Çalışmaya olan desteklerinden dolayı Bilimsel Araştırmalar Birimi'ne teşekkür ederim.

Lisans ve Yüksek Lisans Eğitimim boyunca kendisinden çok şey öğrendiğim, tecrübesi ve bilgisi ile bana akıl hocalığı yapan, kendisine getirdiğim her fikri yadırgamadan inceleyip beni en doğru şekilde yönlendiren ve başarılı bir bilim insanı olma yolunda ilk adımlarımı atmama önyak olan değerli danışman hocam **Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR**'a;

Tez çalışmamın yanı sıra her türlü problemimde yardımını esirgemeyen, her zaman yanımda olduğunu bildiğim sevgili hocam **Dr. Öğr. Üyesi Esin ÇETİN**'e;

Bilgileri ile beni aydınlatan ve her zaman cevap alabileceğimi bildiğim değerli hocalarım **Doç. Dr. Aylin GÜRPINAR, Dr. Öğr. Üyesi Handan SEVİM, Arş. Gör. Dr. Güler Hanife TANIR DÖNMEZ** ve **Uzm. Remma Pamir GÜLSOY**'a;

Laboratuvarlarını kullanmama izin verdikleri ve RNA izolasyonu sırasında bana yardımcı oldukları için **Doç. Dr. İbrahim Çağatay KARAASLAN** ve **Arş. Gör. Dilara KARAGÜZEL**'e

Her türlü yardımı ile iş yükümü olabildiğince azaltan arkadaşım **Şebnem ERFEN**'e

Neşeleri ile günlerime neşe katan, her zaman güvenebileceğim yakın dostlarım ve müzik grubumun yegâne gitaristleri **Hasan TOSKAR** ve **Murat ÜNAL**'a

Beni büyüten ve bu günlere getiren, her daim arkamda durup her konuda bana destek olan, koşulsuz bir şekilde beni seven annem **Hülya Funda ÖZDEMİR**, babam **Yakup ÖZDEMİR** ve anneannem **Türkan KIŞLAK**'a

Ve son olarak, hem mutlu hem de zor günlerimde her zaman yanımda olan, en küçük bir sorunumda bile sırtımı yaslayabileceğim, tez çalışmam dâhil olmak üzere bu güne kadar yaptığım her işte varlığı ile arkamda duran, gerektiğinde maddi gerektiğinde manevi desteğini asla esirgemeyen, dostum, en yakın arkadaşım **İlgin**'a;

saygı sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	iii
ABSTRACT .....	v
TEŞEKKÜR .....	vii
İÇİNDEKİLER .....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xv
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Sinir Sistemi .....	3
2.1.1. Nöronların Yapısı ve Özellikleri .....	3
2.2. Nörodejenerasyon .....	5
2.2.1. Yanlış Katlanmış Proteinlerin Agregat Oluşturması ve Beyinde Beta Amiloid Plaklarının Oluşumu .....	5
2.2.2. Beta Amiloid .....	7
2.2.3. Oksidatif Stres .....	10
2.2.4. Beta Amiloid Agregatlardan Kaynaklı Nörodejenerasyonun Önemi. ....	10
2.3. E Vitamini .....	11
2.3.1. Tokoferoller ve Tokotrienoller .....	12
2.3.2. E Vitamininin Nörodejenerasyona ve Oksidatif Strese Karşı Etkileri ....	13
2.4. Primer Nöron Kültürü ve Kullanım Alanları .....	15
2.5. Tez Çalışmasının Amacı .....	16
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR .....	17
3.1. Primer Nöron Kültürünün Oluşturulması .....	17
3.1.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması ve Cerrahi Yöntem ile Embriyoların Elde Edilmesi .....	17
3.1.2. Petrilerin Poly-D-Lizin ile Kaplanması .....	19



3.1.3. Primer Nöron Kültürü Sırasında Gerekli Solüsyonların Hazırlanması .....	20
3.1.4. Primer Kortikal Nöron İzolasyonu ve Kültürü.....	21
3.2. Elde Edilen Primer Nöronların Karakterizasyonunun Yapılması .....	22
3.3. Beta Amiloid Kaynaklı Nörodejenerasyon Modeli ve Deney Gruplarının Oluşturulması .....	22
3.4. Deney Grupları Üzerinde Yapılan Analizler .....	24
3.4.1. Hücre Canlılığının 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide ve Nötral Kırmızı Analizleri ile Ölçülmesi .....	24
3.4.2. Beta Amiloid Birikiminin Kongo Kırmızısı Boyaması ile Gösterilmesi .....	25
3.4.3. Nekroz ve Apoptoz'un Akridin Orange / Propidium Iodide Boyaması ile İncelenmesi .....	25
3.4.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizi .....	26
3.5. Stok Solüsyonların Hazırlanması.....	29
3.5.1. Kongo Kırmızısının Hazırlanması.....	29
3.5.2. Alpha-tokoferolün Stok ve Uygulama Solüsyonlarının Hazırlanması .....	29
3.5.3. Alpha-tokotrienolün Stok ve Uygulama Solüsyonlarının Hazırlanması .....	29
3.5.3. Beta Amiloid Stok ve Uygulama Solüsyonunun Hazırlanması .....	30
3.6. İstatistiksel Analiz.....	30
4. SONUÇLAR .....	31
4.1. Primer Nöron İzolasyonu ve Kültürü .....	31
4.2. Nöronların Karakterizasyonu .....	31
4.3. Sitotoksisite ve Canlılık Sonuçlarının Değerlendirilmesi .....	35
4.3.1. 24 Saat Uygulamalarının Hücre Canlılığı Bakımından Karşılaştırılması .....	36
4.3.2. 48 Saat Uygulamalarının Hücre Canlılığı ve Sitotoksisite Bakımından Karşılaştırılması .....	37
4.3.3. 72 Saat Uygulamalarının Hücre Canlılığı ve Sitotoksisite Bakımından Karşılaştırılması .....	38

4.4. Beta Amiloid Birikim Miktarlarının Karşılaştırılması .....	39
4.5. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizi ile Voltaj Kapılı L-tip Kalsiyum Kanalı ve Beta sekretaz 1 İfadelerinin Karşılaştırılması.....	41
4.6. Apoptoz ve Nekroz Yüzdelerinin İncelenmesi .....	42
5. TARTIŞMA .....	44
6. KAYNAKLAR .....	48

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Nöronun morfolojik bölgeleri [20] .....	4
Şekil 2.2.	APP'nin amiloidojenik olan ve amiloidojenik olmayan metabolik yolları [26] .....	7
Şekil 2.3.	APP'nin işlenmesinden sonra ortaya çıkan Amiloidlerin, Aβ'ya oligamerizasyonu [10] .....	9
Şekil 2.4.	E vitamininin yapısal özellikleri [48].....	11
Şekil 3.1.	Gebeliğinin 0. gününde vajinal plak oluşumunun gözlemlenmesi. Vajinal plak daire (○) içerisinde gösterilmiştir.....	18
Şekil 3.2.	Metil Mavisi ile vajinada sperm tespiti. Vajinada gözlemlenen spermelerin kamçıları ok (↑) işareti ile işaretlenmiştir. (Büyütme: 20X).....	18
Şekil 3.3.	Cerrahi yöntem aşamaları. 1: Sakrifikasyon, 2,3: Cerrahi müdahale ile embriyoların alınması, 4: Embriyoların transfer solüsyonu ile yıkanması, 5,6,7: Embriyoların, embriyonik keseden ayrılması ve transfer solüsyonu ile yıkanması, 8: Embriyolardan beynin korteks bölgesinin izolasyonu, 9: İzole edilmiş korteksler .....	19
Şekil 3.4.	48 ve 72 saat gruplarının A-T, A-T3 ve Aβ uygulamalarının yapılma sırası .....	23
Şekil 3.4.	RNA izolasyonu yapıldıktan sonra 7 gruptan elde edilen RNA'ların agaroz jelde yürütülerek RNA kırığı olup olmadığının kontrol edilmesi. Kb: Kilobaz, 1: Kontrol grubu, 2: Aβ grubu, 3: 48 Saat A-T + 24 saat Aβ uygulaması grubu, 4: 48 Saat A-T3 + 24 saat Aβ uygulaması grubu, 5: 72 Saat A-T + 24 saat Aβ uygulaması grubu, 6: 72 Saat A-T3 + 24 saat Aβ uygulaması grubu, 7: 48 Saat A-T3 uygulaması grubu, RNA Örneği: Diğer gruplar ile karşılaştırmak için kullanılan RNA, Marker: RNA kırıklarını kontrol etmek için kullanılan işaretleyicileri içeren grup .....	28
Şekil 4.1.	Olgunlaşmış nöron görüntüsü. Olgunlaşmış olan nöronlarda nörit oluşumu gözlemlenmiştir. Ok (↑) işareti ile nöronlar arasındaki nörit adını alan bağlantılar gösterilmiştir. Büyütme: X20 .....	32
Şekil 4.2.	Primer kültür yöntemi ile elde edilen nöronların Anti-MAP2 antikoru ile işaretlenerek immünohistokimyasal olarak boyama görüntüsü. Kırmızı: 1:200 Anti-MAP2, 1:100 TR (545-580 nm) Mavi: DAPI Büyütme: X20 .....	33
Şekil 4.3.	Primer kültür yöntemi ile elde edilen nöronların Anti-MAP2 antikoru ile işaretlenerek immünohistokimyasal olarak boyama görüntüsü. Kırmızı: 1:500 Anti-MAP2, 1:100 TR (545-580 nm) Mavi: DAPI Büyütme: X20 .....	33
Şekil 4.4.	Primer kültür yöntemi ile elde edilen nöronların Anti-MAP2 antikoru ile işaretlenerek immünohistokimyasal olarak boyama görüntüsü. Yeşil: 1:500 Anti-MAP2, 1:100 FITC (460-490) Mavi: DAPI Büyütme: X20 .....	34
Şekil 4.5.	Primer kültür yöntemi ile elde edilen nöronların Anti-MAP2 antikoru ile işaretlenerek immünohistokimyasal olarak boyama görüntüsü. Kırmızı: 1:1000 Anti-MAP2, 1:100 TR (545-580 nm) Mavi: DAPI Büyütme:X20 .....	34

- Şekil 4.6. Primer kültür yöntemi ile elde edilen nöronların Anti-MAP2 antikoru ile işaretlenerek immünohistokimyasal olarak boyama görüntüsü. 1:2000 Anti-MAP2, 1:100 TR (545-580 nm) çekirdek boyaması: DAPI X20 ..... 35
- Şekil 4.7. 24 saat boyunca uygulanan; A-T ve A-T3'ün üç farklı dozunun, A $\beta$ 'nin ve çözücü olarak görev yapan DMSO'nun % hücre canlılığı üzerine etkilerinin incelenmesi. E vitamini türevleri ve DMSO hücre canlılığı üzerinde herhangi bir olumsuz etji yaratmamıştır. A $\beta$  uygulaması ile hücre canlılığı istatistiksel olarak anlamlı olarak azalmıştır. (\*\*\*:P  $\leq$  0.001) ..... 36
- Şekil 4.8. 48 saat uygulamalarının % hücre canlılığı ve % sitotoksosite grafikleri. A $\beta$  uygulaması ile hücre canlılığı anlamlı olarak azalmış sitotoksosite ise anlamlı olarak artmıştır. E vitamini türevleri ve A $\beta$ 'nin beraber uygulandığı gruplarda hücre canlılığı A $\beta$ 'nin yalnız başına uygulandığı gruba göre anlamlı olarak daha yüksektir. 48 saatlik uygulamada A-T+A $\beta$  grubunda gözlemlenen hücre canlılığı A-T3+A $\beta$  grubundan daha fazla, sitotoksosite ise daha düşüktür. A) % hücre canlılığı grafiği, B) % sitotoksosite grafiği (istatistiksel olarak anlamlı farklılık, \*:P  $\leq$  0.05, \*\*:P  $\leq$  0.01 \*\*\*:P  $\leq$  0.001) ..... 38
- Şekil 4.9. 72 saat uygulamalarının % hücre canlılığı ve % sitotoksosite grafikleri. A $\beta$  uygulaması ile hücre canlılığı anlamlı olarak azalmış sitotoksosite ise anlamlı olarak artmıştır. E vitamini türevleri ve A $\beta$ 'nin beraber uygulandığı gruplarda hücre canlılığı A $\beta$ 'nin yalnız başına uygulandığı gruba göre anlamlı olarak daha yüksektir. 48 saatlik uygulamada A-T3+A $\beta$  grubunda gözlemlenen hücre canlılığı A-T+A $\beta$  grubundan daha fazla, sitotoksosite ise daha düşüktür. A) % hücre canlılığı grafiği, B) % sitotoksosite grafiği (istatistiksel olarak anlamlı farklılık, \*\*\*:P  $\leq$  0.001)..... 39
- Şekil 4.10. Kongo Kırmızısı boyaması ile A $\beta$  birikiminin gösterilmesi. Kontrol grubunda Kongo Kırmızısı boyaması ile işaretlenen herhangi bir agregata rastlanmamıştır. A $\beta$  grubunda ise hücreler arası bölgede birikim gösteren A $\beta$  işaretlenmiştir. A) Kontrol grubu, B) A $\beta$  grubu, Ok (†) işareti ile A $\beta$  birikimi gösterilmiştir. Çekirdek Boyaması: Hematoksin, Büyütme: X10... 40
- Şekil 4.11. Kongo Kırmızısı boyaması ile A $\beta$ , A-T + A $\beta$  ve A-T3 + A $\beta$  gruplarında A $\beta$  birikim miktarlarının karşılaştırılması. A $\beta$  grubunda çekilen fotoğraflarda toplam alanın %25'ten fazlası Kongo Kırmızısı ile işaretlenmiştir. A-T+A $\beta$  ve A-T3+A $\beta$  gruplarında ise % boyanan alan %15'in altındadır. A) 48 saat gruplarında A $\beta$  birikim miktarlarının karşılaştırılması, B) 72 saat gruplarında A $\beta$  birikim miktarlarının karşılaştırılması (istatistiksel olarak anlamlı farklılık, \*:P  $\leq$  0.05, \*\*:P  $\leq$  0.01) ..... 40
- Şekil 4.12. Kontrol, A $\beta$ , 48-72 saat A $\beta$  + A-T, 48-72 saat A $\beta$  + A-T3 gruplarında GAPDH'a göre relatif CACNA1C ve BACE1 ifadeleri. A $\beta$  uygulaması ile CACNA1C ifadesi ve BACE1 ifadesi artmıştır. E vitamini türevleri ve A $\beta$ 'nin birlikte uygulandığı gruplarda ise CACNA1C ve BACE1 genlerinin ifade miktarı yalnızca A $\beta$  uygulanan gruba göre daha düşüktür. A) Gruplara göre CACNA1C'nin relatif ifadesi B) Gruplara göre BACE1'in relatif ifadesi (istatistiksel olarak anlamlı farklılık, \*:P  $\leq$  0.05)..... 42
- Şekil 4.13. AO/PI boyaması ile Kontrol ve A $\beta$  gruplarında apoptoz ve nekrozun incelenmesi. Tamamı yeşil olarak boyanmış hücreler canlı hücre (a çemberi), hücre çekirdeği ve

sitoplazması turuncu olarak boyanmış hücreler nekrotik hücre (b çemberi), çekirdeği yeşil boyanmış ve sitoplazmasında turuncu işaretler bulunan hücreler ise apoptotik hücre (c ve d çemberleri) olarak kabul edilmiştir. Apoptotik hücrelerin sitoplazmasındaki tucunu miktarına göre bu hücrelerin erken veya geç apoptozda olduğu belirlenmiştir. A: Kontrol grubu, B: A $\beta$  uygulaması grubu, Büyütme: X20 ..... 43

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.	Deney gruplarının özetlenmesi.....	23
Çizelge 3.2.	AO/PI boyaması sonucu %apoptoz ve %nekroz değerlerinin hesaplanabilmesi için kullanılan formüller .....	26
Çizelge 3.3.	Hedef genler ve hedef genlerin primer dizileri .....	29
Çizelge 4.1.	Kontrol hücrelerinin, A $\beta$ uygulaması yapılan hücrelerin ve 48 ve 72 saat boyunca A-T + A $\beta$ veya A-T3 + A $\beta$ uygulaması yapılan hücrelerin RNA miktarlarının Nanodrop ölçüm sonuçları .....	41
Çizelge 4.2.	48 ve 72. saat uygulamalarında AO/PI boyaması ile hesaplanan % apoptoz ve % nekroz oranları .....	43

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gama
$\delta$	Sigma
g	Gram
ml	Mililitre
nm	Nanometre
rcf	Göreceli Santrifüj Kuvveti
rpm	Dakikadaki Dönme Sayısı
$\mu$ l	Mikrolitre
$\mu$ m	Mikrometre

### Kısaltmalar

A $\beta$	Beta Amiloid
ADAM17	ADAM metallopeptidase domain 17
ANOVA	Tek Yönlü Varyans Analizi
AO/PI	Akridin Orange / Propidium Iodide
APP	Amiloid Prekürsör Proteini
AraC	Cytosine $\beta$ -D-arabinofuranoside
A-T	A-Tokoferol
A-T3	A-Tokotrienol
BACE1	Beta sekretaz 1
CACNA1C	Voltaj kapılı L-tip kalsiyum kanalı

cDNA	Komplementer DNA
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
E-NBM	Ekim Nörobazal Besiyeri
FITC	Floresan İzotiyosiyanat
GAPDH	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
NBM	Nörobazal Besiyeri
MAP2	Mikrotübül İlişkili Protein-2
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
PBS	Phosphate buffered saline
PDL	Poly-D-Lizin
ROS	Reaktif Oksijen Türevi
RT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizi
sAPP $\alpha$	Çözünebilir Amiloid Perkürsör Protein
TR	Teksas Red



# 1. GİRİŞ

Beyin, sinir sisteminin merkezi organıdır. Nöronlardan ve destekleyici glial hücrelerden oluşmaktadır. Hafıza, bilgi işleme, gerekçe gibi bilişsel işlevler, motor işlevler ve hemostazın sağlanması gibi özellikler beyin aracılığıyla kontrol edilmektedir. Beynin oluşturduğu merkezi kontrol sayesinde oluşan en ufak çevresel değişime bile hızlı ve koordine bir şekilde yanıt verilebilmektedir. Bu koordine cevapların oluşturulabilmesi için beyin daima diğer organlar ile iletişim halinde olması gerekmektedir. Bu iletişim, nöronların diğer hücrelere elektrokimyasal maddeler iletilmesi ve diğer hücrelerden elektrokimyasal maddeler alması ile sağlanmaktadır. Nöronlar bu elektrokimyasal madde alış-verişini, sinaps adını alan bölgeler aracılığıyla sağlamaktadır. Bu sinaps bölgelerinde veya doğrudan nöronlarda oluşan çeşitli hasarlar beyin diğer organlar ile iletişiminin kesilmesine veya beyin tam işlev gösterememesine sebep olabilmektedir [1, 2].

Nöronlar; elektriksel olarak uyarılabilen, vücut ve merkezi sinir sistemi arasında uyarı-cevap iletimini sağlayan sinir hücreleridir. Sağlıklı bir nöron; bir gövde, bir akson ve dendritlerden oluşmaktadır. Dendritler nöronun uyarı almasını sağlarken akson nöronun aldığı veya ürettiği uyarıyı bir başka nörona veya hücreye aktarmaktan sorumludur. Nöronlar fonksiyonlarına göre; sensör nöronlar, motor nöronlar veya internöronlar olarak gruplandırılabilir. Vücut içerisinde tüm organların koordine bir şekilde çalışabilmesi için nöronların düzgün işlev göstermesi oldukça önemlidir. Nöronlar akson dejenerasyonu veya demiyelinizasyon gibi sebeplerden dolayı işlevlerini kaybedebilmektedir [3-5].

Nöronların çeşitli sebeplerden dolayı bozulması ve işlevini kaybederek ölmesi durumuna nörodejenerasyon denilmektedir. Genetik mutasyonlar, yanlış katlanan proteinler, oksidatif stres, apoptoz ve benzeri birçok durum nörodejenerasyona sebep olabilmektedir. Alzheimer Hastalığı, Parkinson Hastalığı ve Huntington Hastalığı gibi nörodejenerasyon sonucu ortaya çıkan hastalıklar mekanizma olarak birbirine benzemektedir. Bu hastalıkların tanımlanmasındaki en önemli faktör nörodejenerasyon sonucu nöron ölümünün gerçekleştiği beyin bölgesinin farklı olmasıdır. Hastalığın olduğu beyin bölgesine göre hastalık sonucu ortaya çıkan semptomlarda farklılıklar gözlemlenmektedir [6-8].

Beta amiloid ( $A\beta$ ), öncül proteini olan Amiloid Prekürsör Proteinin (APP) yanlış bir şekilde parçalanması sonucu ortaya çıkan bir protein parçasıdır.  $A\beta$  fragmanları bir araya gelerek  $A\beta$  agregatlarını oluşturmaktadır.  $A\beta$  agregatları nöronlar arası ekstraselüler matrikste birikirse nöronların aksonları üzerinde bozulmalara ve nörodejenerasyona sebep olabilir.  $A\beta$  kaynaklı nörodejenerasyon sonucu oluşan hastalıklardan birisi de Alzheimer hastalığıdır [6, 9]. Yapılan çalışmalar  $A\beta$  birikiminin nöronlar üzerinde toksik bir etki oluşturabileceğini ve hücreler üzerinde apoptoza veya nekroza neden olabileceğini ortaya koymaktadır [10-12].

E vitamini dört tokoferol ve dört tokotrienol çeşidi olmak üzere sekiz adet yağda çözünen bileşenden oluşan bir vitamin grubudur. İlk defa 1922 yılında keşfedilen bu vitamin grubu başlıca bitkisel yağlarda olmak üzere birçok besin maddesinde doğal olarak bulunmaktadır. E vitamini türevleri antioksidan özellikler göstermektedir ve canlı vücudunda reaktif oksijen türevlerinin (ROS) birikimi sonucu oluşan hücre hasarına karşı koruyucu ve tedavi edici olarak görev yapmaktadır [13-15]. Yapılan çalışmalar tokoferol ve tokotrienollerin vücutta antioksidan olarak görev yaptığını ortaya koymaktadır. Ayrıca E vitamininin bu antioksidan özellikleri  $A\beta$  kaynaklı nörodejenerasyona karşı nöronlar üzerindeki oksidatif stresi azaltılmasında da etkilidir. Ayrıca, E vitamininin  $A\beta$  kaynaklı nörodejenerasyona karşı tedavi edici etkisinin de olabileceği ortaya konulmuştur [16, 17]. E vitamininin  $A\beta$  kaynaklı nörodejenerasyona karşı gösterdiği bu etkilerin mekanizması günümüzde araştırılmaya devam etmektedir.

Sunulan bu tez çalışması kapsamında E vitamininin başlıca iki türevi olan  $\alpha$ -tokoferol (A-T) ve  $\alpha$ -tokotrienolün (A-T3)  $A\beta$  kaynaklı nörodejenerasyona karşı gösterdikleri koruyucu etkileri araştırılmıştır. Bu doğrultuda 17-18 günlük sıçan embriyoları kullanılarak primer hücre kültürü yöntemleri ile nöron izolasyonu yapılmış ve izole edilen nöronlar üzerinde  $A\beta$  kaynaklı nörodejenerasyon modeli kurulmuştur. Kurulan bu model üzerinde A-T ve A-T3'ün belirlenen dozda uygulaması yapılmış ve E vitamininin bu türevlerinin  $A\beta$  kaynaklı nörodejenerasyona karşı koruyucu etkileri incelenmiştir. Bu kapsamda hücre canlılığı, sitotoksikite, apoptoz veya nekroz gösteren hücre sayısı,  $A\beta$  birikimi ve Beta sekretaz 1 (BACE1) ve Voltaj kapılı L-tip kalsiyum kanalı (CACNA1C) genlerinin ifade miktarları ölçülmüştür. Sonuç olarak E vitamininin A-T ve A-T3 türevlerinin  $A\beta$  kaynaklı nörodejenerasyona karşı koruyucu etkisi incelenmiş ve karşılaştırılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Sinir Sistemi

Sinir sistemi; nöronlardan ve nöroglia hücrelerinden oluşan, ektoderm kökenli vücudun en karmaşık sistemidir. Sistem sürekli olarak beyinden çeşitli organlara ve bu organlardan beyine sinyal ileterek vücudun aktivasyonunu düzenlemektedir. Sinir sistemi ayrıca; davranışlardan, hafıza, işlem yapma gibi bilişsel fonksiyonlardan ve istemli bedensel hareketlerin tümünden sorumludur. Sinir sistemi; endokrin sistem ile birlikte çalışarak vücutta çevreden gelen uyarılara cevap verilmesini sağlamaktadır [5].

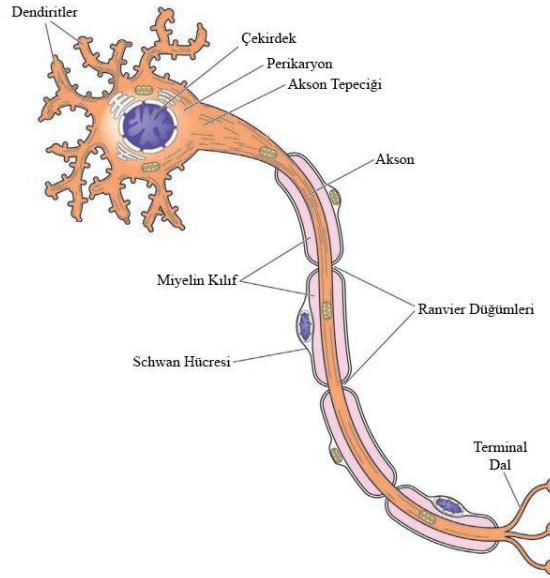
Sinir sistemi, hayvanların yaşama şekline göre organize olmaktadır. Örneğin; az hareket eden omurgasızlar genellikle basit düzeydeki duyu organlarına sahipken daha karmaşık davranışlar sergileyen ve daha aktif olan ahtapot gibi omurgasızlar gelişmiş bir sinir sistemine sahiptir [18].

Omurgalılarda sinir sistemi çevresel sinir sistemi ve merkezi sinir sistemi olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Merkezi sinir sistemi beyin ve omuriliği içermektedir. Sinir sisteminin çoğu hücresi burada bulunmakta ve vücuttaki çoğu bilgiyi işlemektedir. Çevresel sinir sistemi ise akson demetleri ve uzun lifler içerisinde bulunan sinirlerden oluşmaktadır. Böylece çevresel sinir sistemi, merkezi sinir sistemini vücuttaki diğer organlara bağlamaktadır. Sonuç olarak; duyu organları, merkezi sinir sistemi ve efektör organlar arasında bir bilgi akışı sağlanmaktadır. Sinir sisteminin bu şekilde organize olmasında sinir sistemi hücreleri olan nöronlar görev almaktadır [3].

#### 2.1.1. Nöronların Yapısı ve Özellikleri

Yirminci yüzyılda bilim insanları, sinir dokusunun da tüm diğer organlar gibi hücre adı verilen birimlerden oluştuğu konusunda ortak karara varmıştır. Nöronlar ve glia hücreleri; endoplazmik retikulum, golgi cisimciği, mitokondri ve çeşitli veziküler yapılar başta olmak üzere önemli organelleri içermektedir. Diğer hücrelerden farklı olarak, nöronlarda ve glia hücrelerinde bu organeller ve subsellüler yapılar hücrenin belli bir bölgesinde yoğunluk göstermektedir. Bunun dışında nöronlar ve glia hücreleri, hücre iskeletini oluşturan fibriler veya tübüler proteinlerin organizasyonu açısından diğer hücrelerden farklıdır. Bu proteinlerin nöronlardaki kendilerine özgü organizasyon şekilleri, nöronun kararlılığı ve fonksiyonu açısından önemli bir faktördür [2].

Tipik bir nöron hücresi; Şekil 2.1.'de gözüktüğü gibi hücre gövdesi, akson, dendritler ve perisinaptik terminaller olmak üzere dört morfolojik bölgeden oluşmaktadır. Hücre gövdesi hücrenin metabolik merkezidir ve genleri içeren çekirdek bölgesini bulundurmaktadır. Ayrıca endoplazmik retikulum ve çeşitli proteinlerin sentezlendiği çekirdek çıkıntıları da bu bölgede bulunmaktadır. İçi sitoplazma ile dolu olan bölge perikaryon adını almaktadır. Hücre gövdesinden uzanan iki önemli yapı vardır. Bunlar akson ve dendritler olarak isimlendirilmektedir. Aksonlar hücre gövdesinden uzanan, uzun, tübüler tek bir yapıdır ve nöron tarafından oluşturulan sinyallerin diğer nöronlara taşınması için kullanılan temel birimdir. Bir akson, elektrik sinyallerini 0,1 mm'den 3 m mesafeye kadar taşıyabilmektedir. Dendritler ise perikaryondan uzayan ve dallanma gösteren kısa uzantılardır. Dendritler, temel olarak diğer nöronlardan gelen sinyalleri toplamakta ve nöronlar arasındaki haberleşmeyi sağlamaktadır [4, 19].



Şekil 2.1. Nöronun morfolojik bölgeleri [20]

Nöronların hücre iskeleti, temel olarak arafilamentler ve mikrotübüllerden oluşmaktadır. Nöronlarda bulunan arafilamentler, nörofilament; mikrotübüller ise nörotübül adını almaktadır. Nörofilamentler diğer sitoplazmik filamentlerden yapısal olarak farklılıklar gösterirken, nörotübüller diğer hücrelerdeki mikrotübüllerden protein düzenlenişi açısından farklılık göstermemektedir. Nörofilamentler perikaryondan çıkarak akson ve dendritlere kadar uzanmakta ve nörona yapısal destek sağlamaktadır. Nörotübüller ise

golgi kompleksi ve Nissl cisimcikleri arasındaki bölgede bulunarak hücreye destek sağlamaktadır [4, 20].

## **2.2. Nörodejenerasyon**

Nörodejenerasyon kelimesi; sinir hücreleri olan nöronları temsil eden “nöro” ve çeşitli dokular ile organların yapı veya fonksiyonlarını kaybetmesi durumunu açıklayan “dejenerasyon” kelimelerinin bir araya gelmesi ile oluşmuştur. Nörodejenerasyon, nöronların birtakım sebeplerden ötürü bozulması anlamına gelmektedir. Nöronları doğrudan etkileyen herhangi bir patolojik durum nörodejenerasyon olarak ele alınabilmektedir [9]. Nörodejenerasyon; oksidatif stres, A $\beta$  veya tau gibi proteinlerin birikerek agregat oluşturması veya çeşitli genetik mutasyonlar sonucu ortaya çıkabilmektedir [6, 15]. Nörodejenerasyona sebep olan diğer bir durum ise, doğal bir süreç olan yaşlanma sürecidir [21].

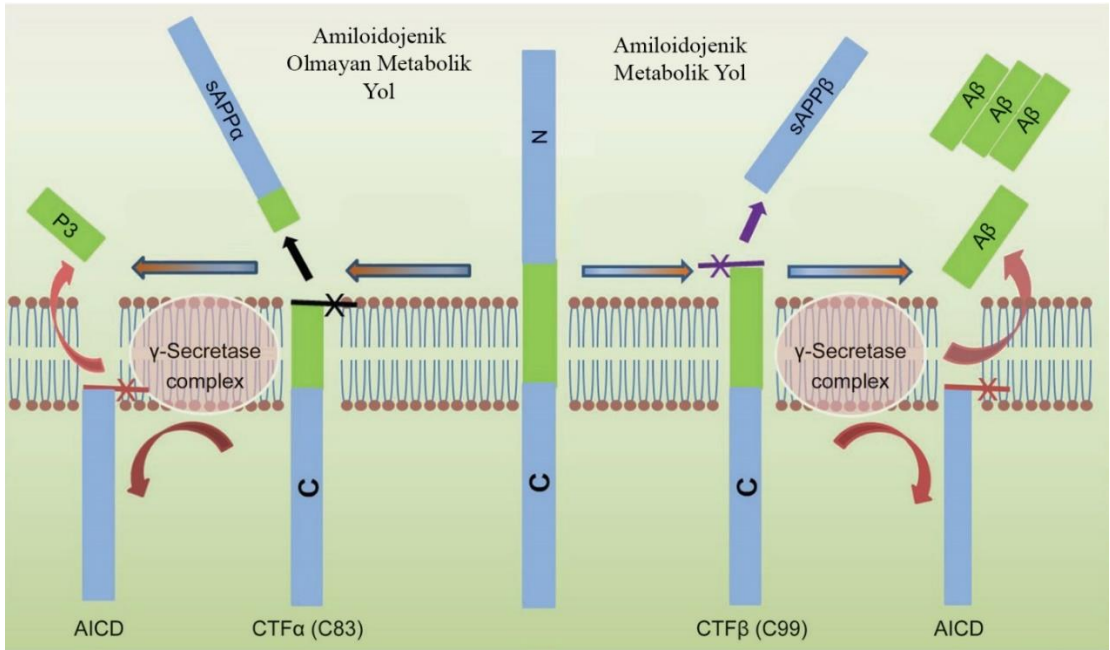
### **2.2.1. Yanlış Katlanmış Proteinlerin Agregat Oluşturması ve Beyinde Beta Amiloid Plaklarının Oluşumu**

Alzheimer hastalığı, Huntington hastalığı ve Parkinson Hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların patolojileri genellikle spesifik çözümlenir proteinlerin yanlış katlanmaları sonucu beyin belirlili bölgelerinde çözümlenmeyen ekstrasellüler agregatlar oluşturarak buradaki nöronların ölümüne yol açması ile karakterize edilmektedir. Bu protein agregatlarının birikerek hasar oluşturduğu bölgeler, sebep oldukları hastalıkların klinik özelliklerini de etkilemektedir. Bu durum Alzheimer hastalığının bilişsel bozukluklar oluştururken, Parkinson hastalığının hareket bozuklukları oluşturduğunu açıklamaktadır. Çözümlenmeyen ekstrasellüler agregatlara, amiloid lif adı verilmektedir. Amiloid lif yapısının gözlemlendiği bu hastalıklara ise amiloidozlar denilmektedir [8, 22]. Amiloid lifler;  $\beta$ -tabaka yapısını yüksek miktarda içeren, dallanmış ve oldukça iyi bir şekilde düzenlenmiş yapılardır. Genellikle 7 ila 10 nm arasında değişen bir çapa sahip olan bu yapı birçok protein için alternatif bir katlanma konformasyonu oluşturmaktadır. Bu yapıyı oluşturacak olan proteinler tam katlanmamış olarak salgılanmakta ve bir tane  $\beta$  tabaka yapısında çekirdek içermektedir. Bu proteinlerin  $\beta$  tabakaları ekstrasellüler bölgede bir araya gelerek amiloid lif oluşumunu tamamlamaktadır. Aromatik kalıntıların bulunduğu bu bölgelerde ise yapı kararlı olarak tanımlanmaktadır [22]. Yanlış katlanma sonucu

ortaya çıkan bir duruma örnek olarak Alzheimer hastalığı verilebilmektedir. Alzheimer hastalığı, senil plakları ve nörofibril yumaklarının beyinde intrasellüler ve ekstrasellüler bölgelerde birikerek nörodejenerasyon oluşturması sonucu ortaya çıkan bir nörodejeneratif hastalıktır [23]. Senil plakları; bir transmembran protein olan APP fragmentlerinin bir araya gelerek birikmesi ile oluşmaktadır. APP; nöronların büyümesi, hayatta kalması ve tamir edilebilmesi için oldukça önemli bir proteindir ve kaynak açısından oldukça zengindir. Ayrıca APP; hücre adezyonu, intrasellüler haberleşme, hücre zarı ile çekirdek arasındaki sinyallerin düzenlenmesi, nörotrofik aktivite ve nöroproliferatif aktivite üzerinde önemli roller üstlenmektedir. APP; büyük bir ekstrasellüler amino-terminal alan ve küçük bir intrasellüler sitoplazmik alan içeren transmembran bir proteindir. APP'nin ekstrasellüler bölgede bulunan kısmı N-terminal bölgesi adını alırken daha kısa olan ve sitoplazmik bölgede buluna kısmı C-terminal bölgesi adını almaktadır. Proteinin ekstrasellüler bölgesinde amino-terminal alana yakın sistince zengin bir alt-alan, bunun hemen arkasında da bir tanesi asidik olan iki tane daha alt-alan bulunmaktadır. Bütün bunların dışında proteinin ekstrasellüler bölgesinde çeşitli fonksiyonlara sahip birçok alt-alan tanımlanmıştır. APP'nin nöronlara özgü bir isoformu hücre zarında bulunmaktadır ve burada bir reseptör gibi çalışmaktadır. Hücre zarındaki APP diğer reseptörlerden farklı olarak proteolitik parçalanmaya karşı duyarlıdır. APP'nin ekstrasellüler amino-terminal alanından yaklaşık 600 amino asitlik, görece büyük protein fragmentleri salgılanmaktadır. Parçalanmanın şekline bağlı olarak A $\beta$  gibi daha küçük protein fragmentleri de ortaya çıkabilmektedir [24, 25].

APP'nin; amiloidojenik yol ve amiloidojenik olmayan yol olmak üzere iki tane metabolizma yolu bulunmaktadır (Şekil 2.2). Amiloidojenik olmayan yolda APP,  $\alpha$ -sekretaz tarafından metabolize edilerek zara bağlı  $\alpha$ -C terminal APP parçaları ortaya çıkarmaktadır. Böylece çözünebilir amiloid perkürsör protein (sAPP $\alpha$ ) adını alan bir form salınarak hücre zarını terk etmekte ve ardında zar üzerinde 83 amino asitlik bir C-terminal APP parçası bırakmaktadır. sAPP $\alpha$ 'nın üretimi hücrenin elektriksel aktiviteye cevabını ve asetilkolin reseptörlerinin aktivasyonunu arttırmaktadır. APP'nin amiloidojenik metabolizma yolu amiloidojenik olmayan metabolizma yolu ile benzerlik göstermektedir. Amiloidojenik yolda  $\alpha$ -sekretaz yerine  $\beta$ - ve  $\gamma$ -sekretazlar görev almaktadır.  $\beta$ -sekretaz, APP'yi N- ve C-terminal bölgelerinden bölerek 99 aminoasitlik bir C-terminal APP parçası ortaya çıkartmaktadır. Daha sonra bu parça  $\gamma$ -sekretaz tarafından ileri işlemlerden geçirilerek farklı sayılarda amino asit içeren A $\beta$  formlarını oluşturmaktadır. A $\beta$  formları

içerdiği amino asit sayısına göre A $\beta$ 40 veya A $\beta$ 42 gibi isimler almaktadırlar. Sonuç olarak oluşan bu A $\beta$  parçaları beyinde birikim göstererek nörotoksik etki yaratan A $\beta$  agregatlarını ortaya çıkartmaktadır [26]. Knowles ve ark. [27], amiloid lif oluşumu; içerisinde aynı anda birden çok mikroskobik olay gerçekleşen karmaşık bir agregasyon işlemi olduğunu göstermiştir. İlk olarak küçük çözünebilir agregatlar bir araya gelerek çekirdek oluşturmaktadır. Ardından, monomer eklenmesi ile amiloid lif uzamakta ve yeni çözünebilir agregatlar daha önce oluşmuş olan agregat yüzeyinin üstüne birikerek ikinci bir çekirdek oluşumu gerçekleştirmektedir. Son olarak ortamda bulunan lifler birbirinden ayrılarak toplam lif sayısı artmaktadır. Bu işlem sonucunda, işlemin gerçekleştiği bölgeye spesifik olan amiloidoz hastalığı ortaya çıkmaktadır [28].



Şekil 2.2. APP'nin amiloidojenik olan ve amiloidojenik olmayan metabolik yolları [26]

### 2.2.2. Beta Amiloid

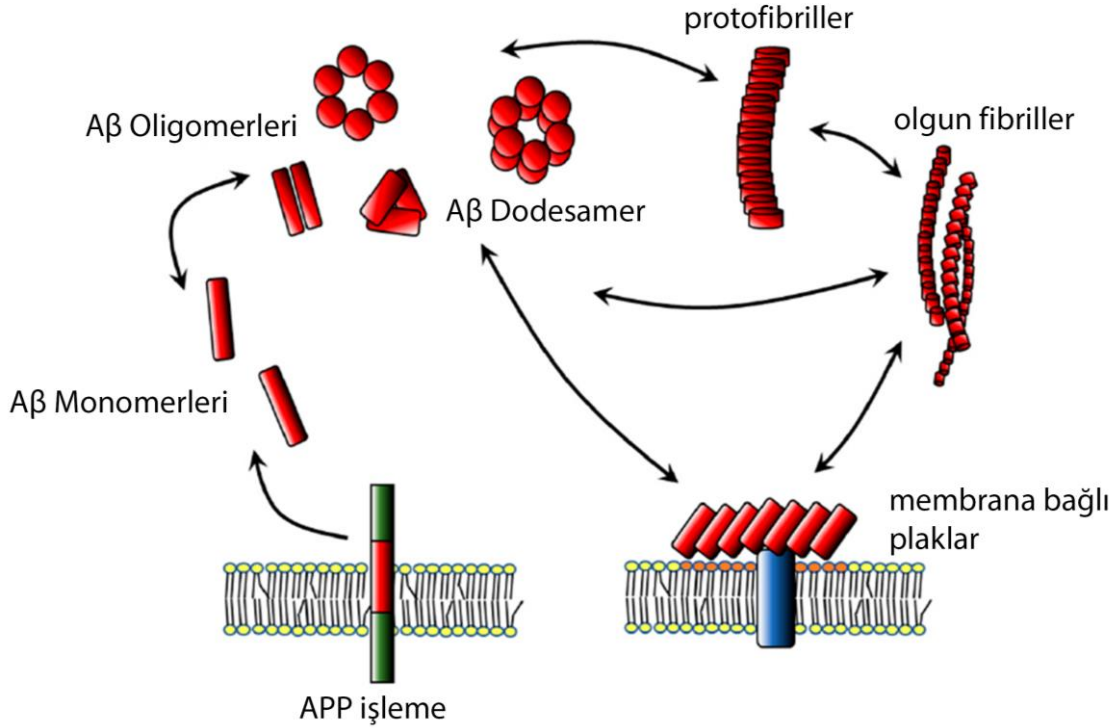
A $\beta$  monomerleri bir araya toplanarak farklı özelliklere sahip oligomerler ve amiloid fibriller gibi farklı formlar oluşturabilmektedir (Şekil2.3.). Bu formlar arasında amiloid fibriller; daha büyük olması, çözünemez özellikte olması ve amiloid plak oluşturabilecek olması ile oligomerlerden ayrılmaktadır [26].

A $\beta$ 'nın beyinde ağırlıklı olarak gözlenen formları 40 veya 42 amino asit içeren A $\beta$ 40 ve A $\beta$ 42 formlarıdır. Bu formlar arasında A $\beta$ 42 formu A $\beta$ 40 formuna göre daha toksik ve

fibril oluşturmaya yatkın olan formdur. Sağlıklı bir beyinde A $\beta$ 40:A $\beta$ 42 oranı 1:10'dur. Alzheimer hastalığı gibi hastalıklarda ise bu oranın beyinde bozulduğu gözlemlenmektedir. A $\beta$  monomerleri APP metabolizması sonucu oluştuktan sonra hücrelerden, hücreler arası boşluğa salgılanır. Daha sonra A $\beta$ 42 konsantrasyonuna ve ortamdaki çevresel koşullara bağlı olarak farklı nörotoksisiteye sahip oligomerler oluşturacak şekilde bir araya gelmeye başlamaktadır. Oluşan agregatlar arasında protofibriller olarak isimlendirilen formlar çözünebilir özelliktedir. Buna karşın 56 kDa moleküler ağırlığa sahip A $\beta$  dodecamer adını alan globüler yapıdaki form, nöronların zar bütünlüğünü bozarak nörotoksik etki göstermektedir. Her A $\beta$  türü nöronlar üzerinde farklı bir etki göstermektedir. A $\beta$  formları arasında moleküler ağırlık azaldıkça nöronlar üzerindeki toksik etki de azalmaktadır [10].

A $\beta$ 'nin nöronlar üzerinde gösterdiği nörodejenerasyon A $\beta$  ve lipit zar arasındaki doğrudan ilişkiye bağlı olabilmektedir. Amiloid peptitleri özellikle kolesterolce ve sfingomiyelince zengin hücre zarları ile bağlantı kurmaktadır. Yapılan çalışmalar zardaki kolesterol miktarının amiloid peptit birikimine ve morfolojisine etki edebileceğini göstermiştir. Temel olarak A $\beta$  zar yüzeyinde  $\beta$ -yaprak yapısında bulunmaktadır. Buna karşın zardaki kolesterol artışı A $\beta$ 'nin zar yüzeyinde  $\alpha$ -sarmal yapısına katılmasına sebep olmaktadır. Bu durum A $\beta$  agregatı oluşturmaya iten bir konformasyon değişikliği ortaya çıkartmaktadır. Yapılan çalışmalar; kolesterolün amiloid peptit oligomerlerde ortamda daha hızlı fibril oluşumuna sebep olan  $\beta$ -yaprak yapısını indüklediğini göstermiştir [10]. Wong ve ark. [29] yaptıkları çalışmada lipit zar yüzeyinin negatif yüklenmesinin A $\beta$  oligomerizasyonunu indüklediğini ortaya koymuştur. Zar akışkanlığı ve çift tabaka yapısı A $\beta$  peptitin zara bağlanmasını etkilemese bile kolesterol peptitin geçirgenlik aktivitesi açısından oldukça önemlidir. Bu durum A $\beta$  oligomerlerin morfolojisini ve yapısını etkilemektedir [29].





Şekil 2.3. APP'nin işlenmesinden sonra ortaya çıkan Amiloidlerin, Aβ'ya oligamerizasyonu [10]

Pike ve ark. [11] 1993 yılında yaptıkları çalışmada Aβ'nin agregat oluşturmasının gösterdiği toksik etkiler ile bir ilişkisi olabileceğini ortaya koymuştur. Aβ'de gözlemlenen konformasyonel değişiklikler Aβ'nin çözünmeyen agregatlar oluşturmasına ve biyolojik aktivitesinin değişmesine sebep olmaktadır. Sonuç olarak Aβ birikiminin gözlemlendiği bölgedeki nöronlarda dejenerasyon ortaya çıkmaktadır [11]. Daha sonra yapılan çalışmalar ile Aβ kaynaklı nörodejenerasyonun arkasında yatan mekanizma ortaya koyulmaya çalışılmıştır. Bu kapsamda Demuro ve ark. [30] 2005 yılında Aβ oligomerlerinin plazma ve intraselüler membranlardaki kalsiyum bağımlı kanalların bozulmasına yol açarak membran bütünlüğünü bozabileceğini ortaya koymuştur. Daha sonra De Felice ve ark. ve Deshpande ve ark. [31, 32] tarafından 2007 ve 2009 yılında yapılan çalışmalar Aβ oligomerlerinin N-metil-D-aspartat reseptörlerine bağlanarak aktivite oluşturuyor olabileceğini göstermiştir. Buna karşın Li ve ark. [33] 2009 yılında Aβ kaynaklı nörodejenerasyon mekanizmasının glutamaterjik terminallerin uyarılarak glutamat sentezinin artması ile ilgili olabileceğine dair bir çalışma yapmıştır. Ayrıca Arispe ve ark. [34] 2007 yılında Aβ birikimi sonucu nöron mitokondrisinin hasar

alabileceğini ve kaspaz bağımlı ve bağımsız hücre ölüm yollarının aktive olabileceğini ve sonuç olarak nörodejenerasyon ortaya çıkabileceğini göstermiştir [12].

### **2.2.3. Oksidatif Stres**

Oksidatif stres; sağlıklı bir dokudaki oksidan-antioksidan oranının bozulması ile dokuda hasar oluşması durumudur. Bu denge birçok sebepten ötürü bozulabilmektedir [35]. Oksidatif stres, serbest radikallerin sinir hücrelerine saldırmasına ve buna bağlı olarak da nörodejenerasyona sebep olabilmektedir. ROS olarak isimlendirilen oksijen radikalleri, beyine özgü bir takım metabolik olaylar sonucu ortaya çıkmaktadır ve beyinde oldukça aktiftir. ROS özellikle serbest radikallere hassas olan nöronlara ve glial hücrelere saldırarak oksidatif strese sebep olmaktadır [36].

Yaşlanmanın önemli etkilerinden biri de metal metabolizmasının bozulması sonucu ortaya çıkan nörodejenerasyondur. Alzheimer hastalığı bu durumun önemli örneklerinden biridir. Yaş ilerledikçe; bakır, çinko ve demir gibi redoks metallerinin birikimi kan beyin bariyerindeki konsantrasyonlarından dolayı artış göstermektedir. Opazo ve ark. [37], Alzheimer hastalığı sırasında oluşan A $\beta$  agregatlarının bakır, çinko ve demir gibi metal iyonlarından kaynaklandığı öne sürmektedir [38].

### **2.2.4. Beta Amiloid Agregatlardan Kaynaklı Nörodejenerasyonun Önemi**

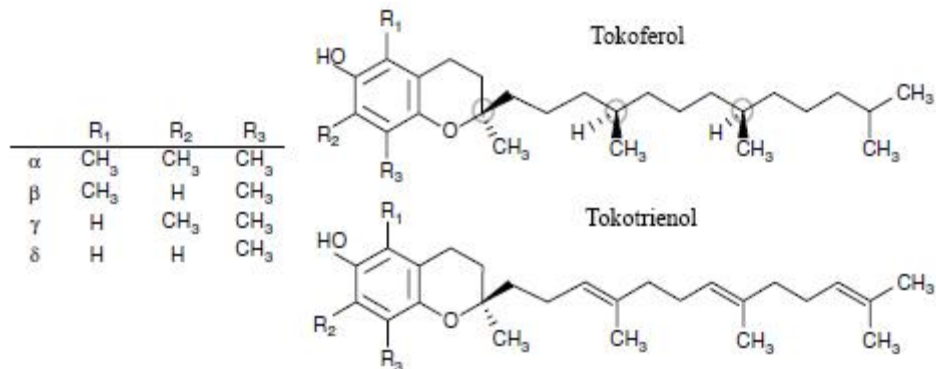
Moreno ve Romero'nun 2002 yılında yaptığı çalışmaya göre [39], nörodejeneratif bozuklukların artışı insan ömrünün uzamasına bağlanabilmektedir. Özellikle 55-75 yaş aralığı grupta, nörodejeneratif bozuklukların görülme olasılığı artmaktadır [40]. A $\beta$  gibi anormal protein depolanmaları, içinde Alzheimer hastalığının da bulunduğu yirmi beşten fazla nörodejeneratif bozukluk sırasında ortaya çıkabilmektedir [39, 41]. Amiloidoza sebep olabilecek yirmi sekizden fazla amiloid çeşidi tanımlanmaktadır. Bu amiloid çeşitlerinin birçoğu için tipe özgü tedavi çeşitleri üretilmiştir. Buna bağlı olarak amiloid tipini belirlemek oldukça önemlidir. Amiloid varlığını tespit etmek için Kongo Kırmızısı ile boyama yöntemi veya elektron mikroskopisi kullanılabilir [42].

A $\beta$  bağımlı nörodejenerasyonun anlaşılabilmesi için hayvan modelleri, *in vitro* modeller ve klinik vakalar üzerinde birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan bir çalışmadaki bulgular, amiloid fibril oluşumu sonucu ortaya çıkan amiloidozda makrofajların oldukça etkili olduğunu göstermektedir. Pepsitatin ile muamele edildiği zaman makrofaj kültürlerinde amiloid birikimi artmaktadır. Böylece amiloid agregatı birikimi sonucu oluşan hasarı

göstermek adına başarılı bir model kurulmuştur [43]. Bunun dışında, doğrudan Alzheimer hastalığının patolojisinin çalışılabilmesi adına da modeller oluşturulmuştur. Yapılan çalışmalara göre, nöronlar; fare, sıçan veya insan gibi farklı canlılardan belirli koşullar altında izole edilebilmekte ve izole edilen bu hücreler üzerinde boyamalar ve işaretlemeler ile yapılan analizlerden madde denemelerine kadar birçok işlem gerçekleştirilebilmektedir [44, 45]. Ayrıca, klinik çalışmalardan önceki aşamaları tamamlayabilmek ve gelecekte ilaç olarak kullanılabilir maddelerin ön taramalarını yapabilmek adına SH-SY5Y hücre hattı veya primer nöron kültürü ile oluşturulan A $\beta$  kaynaklı nörodejenerasyon modelleri de kullanılmaktadır [46].

### 2.3. E Vitamini

Yirminci yüzyılın ilk yarısında yaptıkları çalışmalar ile Evans ve ark. [13, 14], E vitaminini keşfetmiş, izole etmiş ve bu maddenin vücut için esansiyel bir mikronütrient olduğunu göstermiştir. Daha sonra bu vitaminin insan vücudunda önemli bir antioksidan olduğu fark edilmiş ve konuyla ilgili birçok çalışma ortaya konulmuştur. E vitamininin, yaşlanmaya bağlı ve yaygın kronik hastalıklar sonucu oluşan oksidatif stres üzerinde koruyucu ve iyileştirici bir etkisi bulunmaktadır. Aynı zamanda E vitamini, antioksidan özelliğinin dışında; gen ifadesi, belirli sinyal yolları ve hücre çoğalması gibi birçok spesifik biyolojik fonksiyonun işleyişi üzerinde de etkilidir. Bütün bunlara rağmen günümüzde hala E vitamininin fizyolojik rolü tam olarak anlaşılammıştır ve insan sağlığı üzerindeki etkilerinin tam olarak belirlenebilmesi için çalışmalar devam etmektedir [47].



Şekil 2.4. E vitamininin yapısal özellikleri [48]

E vitamini ismi, bitkiler tarafından üretilen, yağda çözünebilir ve antioksidan etki gösteren sekiz farklı maddeye verilen genel bir isimdir. Bu maddeler tokol adını

almaktadır. E vitaminleri moleküler olarak; metil grupları bulunduran bir tane kromanol halka üzerinde, C2 pozisyonundan çıkan bir yan karbon zinciri içeren bir yapı göstermektedir. Şekil 2.4'te de gösterildiği gibi tokoller doğada, tokoferol ve tokotrienol olmak üzere iki farklı çeşitte bulunmakta ve Trimetil ( $\alpha$ -), dimetil ( $\beta$ - veya  $\gamma$ -), monometil ( $\delta$ -) olmak üzere dörderli gruplar içerisinde incelenmektedir. Kromanol halkadaki metil grubunun sayısı gruplar arasında fark göstermektedir. " $\alpha$ " grubu tokoller üç tane metil grubu " $\beta$  ve  $\gamma$ " grubu tokoller iki tane metil grubu ve " $\delta$ " grubu tokoller bir tane metil grubu içermektedirler. Tokoferoller ve tokotrienoller yapısal açıdan birbirleri arasında farklılık göstermektedirler. Hem tokoferoller hem de tokotrienoller aynı yapıda bir kroman halkaya sahip olmasına karşın kroman halkadan çıkan yan zincir açısından fark göstermektedir. Kroman halka tokolün  $\alpha$ - ,  $\beta$ - ,  $\gamma$ , veya  $\delta$ - grubunu belirlerken kroman halkadan çıkan karbon zinciri tokolün tokoferol mü yoksa tokotrienol mü olduğunu belirlemektedir. Tokoferollerde fitil zinciri adı verilen hiç çift bağ içermeyen doymamış bir yan zincire sahipken tokotrienollerin bu yan zinciri üç tane çift bağ içeren doymuş bir zincirdir ve isoprenoid zincir olarak isimlendirilmektedir [47, 48].

E vitamininin insan vücudu üzerindeki temel rolü hala keşfedilme aşamasındadır. Buna rağmen E vitaminin yağda çözünebilen bir antioksidan olması ve insan üzerindeki rolünün de bu özelliği ile bağlantılı olması durumunu Buetnerr [49] *in vitro* ortamda yaptığı çalışma ile göstermiştir [50]. E vitamini, sistin yokluğundan veya glutamattan kaynaklanan hücre ölümleri gibi birçok tip hücre ölümüne engel olan bir antioksidan ve serbest radikal toplayıcısıdır [51, 52]. E vitaminin bu fonksiyonları onu hücre zarında bulunan ve sinyal molekülü olarak görev yapan doymamış yağ asitlerinin zardaki bütünlüğünü korumak ve onların biyolojik aktivitesini korumak açısından önemli kılmaktadır [50].

### **2.3.1 Tokoferoller ve Tokotrienoller**

Beslenme için esansiyel bir eleman olan E vitamini yalnızca fotosentetik organizmalar tarafından üretilmektedir. Tokoferoller, bir kromonal halka ve 15 karbonluk bir kuyruk bölümü içeren E vitamini formudur. Tokotrienoller ise hidrokarbon zincirlerinde 3 tane trans-çift bağ bulundurması ile tokoferollerden yapısal olarak ayrılmaktadır. Tokotrienol formu E vitaminin primer formudur ve temel olarak tarımsal açıdan önemli olan pirinç, buğday ve arpa gibi çoğu tek çenekli bitkinin tohum endosperminde bulunmaktadır. Bu form ayrıca tütün bitkisi gibi belli başlı tek çenekli bitkilerde de gözlenebilmektedir. Bu

moleküller bitkinin vejetatif dokusunda ise nadir olarak bulunmaktadır. Palmiye meyvesinden elde edilmiş ham palm yağında başta A-T3 ve  $\gamma$ -tokotrienol olmak üzere önemli miktarda tokotrienol bulunmaktadır. Buna karşılık, tokoferol ise E vitamininin bitkilerin hemen hemen her dokusunda bulunabilen özel bir formudur [53].

Tüm tokoferol ve tokotrienol formları ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, ve  $\delta$ -) besinlerde bulunmaktadır buna karşın insandaki E vitamini ihtiyacını karşılamakta olan asıl form A-T'dir. Ayrıca A-T insan vücudundaki E vitamininin de ana formudur. Bütün bu sebeplerden dolayı en çok çalışılan E vitamini çeşidi de A-T'dir. Bu form lipoproteinlerde ve hücre zarında lipid peroksidasyonunu sınırlayan ve zar bütünlüğünü koruyan bir antioksidan olarak görev yapmaktadır [54]. A-T'nin lipid peroksidasyonunu ve dolayısıyla arteriyel hasarı önlemedeki başarısı sayesinde ateroskleroza da azaltabilmektedir [55]. Buna karşın yapılan çalışmalar tokotrieneollerin insan vücudunda tokoferollerden farklı sağlık etkilerinin olduğunu ve tokoferollerden daha iyi bir antioksidan olabilecekleri göstermiştir [56, 57]. Tokotrienoller, hücre zarındaki yüksek antioksidan özelliklerinin yanı sıra tokoferollerde bulunmayan kanser önleyici, sinir koruyucu ve kolesterol düşürücü özelliklere de sahiptir [58]. Tokotrienollerin memeli hücrelerinde gözlenen bu antioksidan özellik dışındaki özellikleri; mevalonat-kolesterol biyosentezi yolağını etkilemesi ile açıklanabildiği gibi gen ifadesi ve sinyal iletimi üzerindeki etkileri ile de açıklanabilmektedir [53].

### **2.3.2. E Vitamininin Nörodejenerasyona ve Oksidatif Strese Karşı Etkileri**

Literatürde, E vitamininin oksidatif strese karşı gösterdiği iyileştirici ve koruyucu etkilerini araştıran çalışmaların yanı sıra bu vitaminin nörodejenerasyon ve kanser gibi durumlara karşı da etkilerini inceleyen çalışmalara rastlanmaktadır. Ayrıca E vitamininin; sinir sistemi, dolaşım sistemi ve immün sistem gibi fizyolojik sistemler üzerindeki etkileri birçok çalışmada araştırılmıştır.

Yağda çözünen bir vitamin olan E vitamini vücutta en önemli zincir kırıcı antioksidanlardan birisidir ve hücre zarını radikal elementlerin saldırıları sonucu oluşacak olan lipid peroksidasyonuna karşı korumaktadır [59]. Domuzdan elde edilmiş olan adipoz kökenli kök hücreler ile yapılan bir çalışmada H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kaynaklı oksidatif stres üzerinde E vitamini tedavisinin etkileri incelenmiştir. Çalışmada 3-4 aylık sağlıklı domuzlardan izole edilen adipoz kökenli kök hücreler üzerine E vitamini uygulanmış ve hücreler H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile

muamele edilerek oksidatif strese sokulmuştur. E vitamini ile muamele edilen grupların hücre canlılığı Trypan Blue boyamasıyla, sitotoksitesi ise lakat dehidrogenaz salınımının ölçülmesi aracılığıyla E vitamini uygulaması yapılmayan grup ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak E vitamininin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kaynaklı oksidatif strese karşı adipoz kökenli yağ hücrelerini *in vitro* ortamda koruduğu gösterilmiştir [60].

Lipid peroksidasyonuna karşı hücreleri koruma görevinin dışında E vitamini nörolojik sağlığın korunabilmesi açısından kritik bir rol oynamaktadır. E vitaminin beyindeki biyolojik yarı ömrü uzundur ve beynin farklı bölgelerinde E vitamini konsantrasyonları oldukça değişkendir. E vitamini tüm diğer sistemleri koruduğu gibi merkezi sinir sistemini de oksidatif strese ve dolayısıyla nörodejenerasyona karşı korumaktadır [16]. Yapılan bir çalışmada; A $\beta$ (1-42) kaynaklı nörodejenerasyon, protein oksidasyonu ve ROS oluşumuna karşı E vitamininin *in vitro* ortamda koruyucu etkileri araştırılmıştır. Bu doğrultuda primer hipokampal sıçan kültürü ile bir model oluşturulmuş ve amiloid fibril formasyonunu incelemek adına elektron mikroskopisi kullanılmıştır. Sonuç olarak E vitamininin A $\beta$ (1-42) kaynaklı nörodejenerasyonu engellediği gözlemlenmiştir. E vitamini, A $\beta$ (1-42) kaynaklı protein oksidasyonuna ve ROS birikimini önleyerek hücre ölümünü engellemektedir [61]. SH-SY5Y hücre hattı ile kültür ortamında yapılan bir başka çalışmada ise, yapılan ölçümler E vitamininin tüm tokoferol formlarının  $\beta$ - ve  $\gamma$ -sekretaz proteinlerinin ifadesini arttırarak A $\beta$  oluşumu arttırdığını ve A $\beta$  yıkımını azalttığını göstermiştir. Bu çalışmada SH-SY5Y hücre hattı ile bir A $\beta$  birikimi modeli kurulmuştur. Ardından hücreler tokoferoller ile muamele edilmiştir. Kurulan deney düzeneğinden toplam protein miktarı  $\beta$ - ve  $\gamma$ -sekretaz enzimlerinin aktivasyon miktarı ve hücre canlılığı verileri çeşitli yöntemler ile toplanmıştır. Sonuç olarak E vitamininin yararlı özelliklerinin dışında beyindeki A $\beta$  miktarını yükseltebilecek potansiyeli de olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca farklı tokoferol formlarının A $\beta$  oluşum seviyelerini farklı etkilediği incelenmiş bu formların arasında  $\alpha$ -tokoferolün en az amiloidojenik etkiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır [62]. Buna karşın bir diğer çalışmada ise SH-SY5Y hücre hattı ile kurulan bir modelde A-T'nin A $\beta$  toksisitesi üzerindeki koruyucu etkileri ortaya konulmuştur. Bu çalışmada SH-SY5Y nöroblastom hücreleri A $\beta$ (1-42) ile muamele edilerek oluşturulan hasara karşı A-T'nin koruyucu etkisi incelenmiştir. Daha önceden A-T ile muamele edilen gruplarda 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) analizi sonucu daha düşük sitotoksiteye rastlanmıştır. Ayrıca bu çalışma ile A-T'nin oksidatif stresi ve nitrik oksit seviyelerini azalttığı

immüno kimyasal yöntemler ile ortaya konulmuştur. E vitamininin insan vücudunda gözlenen en yaygın formu olan A-T, APP'nin amiloidojenik olmayan yolağında etkili olan; APP ve ADAM metallopeptidase domain 17 (ADAM17) genlerinin ifadesini arttırmaktadır. ADAM17 geni APP'nin çözünebilir bir peptit olan sAPP $\alpha$ 'ya parçalanmasını sağlayan  $\alpha$ -sekretazı kodlamaktadır. Böylece A-T, A $\beta$  toksisitesini engellemekte ve APP'nin zararsız bir şekilde metabolize olabildiğini sağlamaktadır [63]. E vitamininin Alzheimer hastalığına karşı etkilerini test eden bir klinik çalışma ise E vitaminini memantin isimli bir demans ilacı ile karşılaştırmıştır. Bu çalışmada 613 hasta içeren, randomize edilmiş ve plasebo kontrol grubu içeren bir klinik metod kullanılmıştır. Çalışmada, oluşturulan gruplara belirlenen miktarlarda A-T, memantin, memantin ile A-T kombinasyonu ve plasebo uygulaması yapılmıştır. Daha sonra bilişsel, nöropsikiyatrik ve bakım miktarı ölçümleri ile elde edilen sonuçlar analiz edilerek yorumlanmıştır. Sonuç olarak A-T ile tedavi gören grupların Alzheimer hastalığının yavaşlamasını ve hasta kişilerin bakım ihtiyaçlarının azalmasını sağlamıştır. Ayrıca A-T'nin belirlenen miktarda tek başına kullanımı, hem memantin tek başına kullanımından hem de A-T ile memantin bir arada kullanımından daha etkili olmuştur [17]. Sonuç olarak E vitamininin formlarının Alzheimer hastalığı gibi A $\beta$  kaynaklı nörodejeneratif hastalıkların hem tedavisine yardımcı olan hem de bu hastalıklardan vücudun korunmasını sağlayan bir ajan olarak kullanılabilmesi birçok çalışma ile ortaya konulmaktadır.

#### **2.4. Primer Nöron Kültürü ve Kullanım Alanları**

Geçtiğimiz yüzyıl boyunca nörobilimciler ve biyologlar sinir sistemini daha iyi anlayabilmek adına sinir hücreleri için *in vitro* kültür modelleri geliştirmişlerdir. Bu modellerden birisi de primer nöron kültürü modelidir. Deney hayvanlarından doğrudan alınan hücrelerden elde edilen kültürler "primer kültür" adını almaktadır. Deney hayvanlarından elde edilen nöronlar ile oluşturulan kültüre ise "primer nöron kültürü" denmektedir. Primer nöron kültürü tümör hücrelerinden elde edilmemesinden ve *in vivo* ortamdaki nöron hücrelerinin özelliklerini daha iyi yansıtmışından dolayı sekonder hücre hatlarına oranla daha çok tercih edilebilir bir model oluşturmaktadır. Özellikle primer nöron kültürlerinde hücrelerin ömrü sınırlıdır ve deney için kullanılacak hücre sayısı hücre hatlarına göre daha azdır. Sonuç olarak primer nöron kültürü yapılacak zaman; kültürü yapılacak olan hücre tipini içeren doku kaynağı elde edilmeli, homojen bir hale

getirilecek olan hücrelere uygun besi yeri seçilmeli, steril koşullar sağlanmalı ve nöronlar astrositler ile oligodendrositlerden ayrılarak karakterize edilmelidir [64, 65].

## 2.5. Tez Çalışmasının Amacı

Nöronlarda APP'nin rutin metabolizmasının bozulması ile A $\beta$  plakları adı verilen parçacıklar ortaya çıkmaktadır. Beyinde  $\beta$ -sekretaz enziminin aktivitesi sonucu APP metabolizması sekteye uğramaktadır ve A $\beta$  parçacıkları birikerek A $\beta$  plakları oluşmaktadır. Birikimin gözlemlendiği bölgede oksidatif stres oluşmaktadır. Bütün bunlar nöronların; hücre zarlarında parçalanmalara, mitokondri metabolizmalarında bozulmalara, genetik materyallerinde bir takım hasarlara ve hücre döngüsü ile protein formasyonlarında kötü yönde değişimlere sebep olarak nöronlarda hücre hasarı oluşturmaktadır. Sonuç olarak beyinde nörodejenerasyon ortaya çıkmaktadır. Bu durum beyin motor ve bilişsel fonksiyonlarında gerileme gözlenmesine sebep olmaktadır [66, 67].

Yapılan birçok çalışma E vitamini gibi antioksidan etki gösteren vitaminlerin beyindeki A $\beta$  plak oluşumu riskini azaltıyor olabileceğini göstermiştir. E vitamininin A-T formu insan vücudundaki temel E vitamini formudur [54]. Yapılan başka bir çalışmada ise tokotirenollerin antioksidan aktivitesinin tokoferollere oranla daha fazla olduğunu belirtmektedir [53]. Ayrıca yapılan çalışmalar E vitamininin farklı formlarının nörodejeneratif hastalıklar üzerindeki etkili olabileceğini ortaya koymaktadır [51].

E vitamininin en aktif formu olan A-T ve bir diğer önemli E vitamini formu olan A-T3'ün beyinde gerçekleşen A $\beta$  birikimi üzerindeki etkileri literatürde karşılaştırılmamıştır. Bu çalışma kapsamında iki boyutlu *in vitro* A $\beta$  birikimi kaynaklı nörodejenerasyon modeli üzerinde E vitamininin A-T ve A-T3 formlarının koruyucu etkisi incelenmiştir.



### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

#### 3.1. Primer Nöron Kültürünün Oluşturulması

##### 3.1.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması ve Cerrahi Yöntem ile Embriyoların Elde Edilmesi

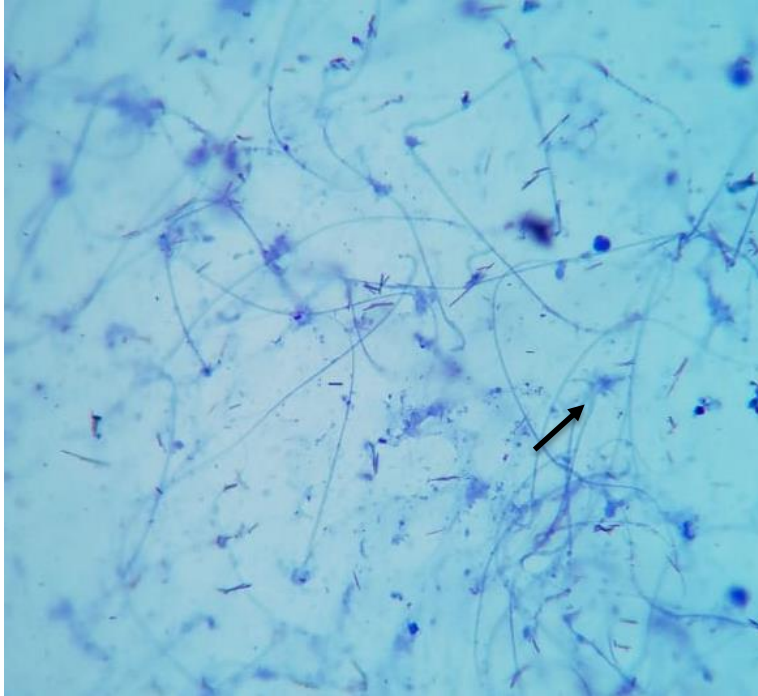
Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu'nun aldığı 52338575-68 sayılı etik kurul kararını takiben yedi adet (altı adet dişi, bir adet erkek) *Rattus norvegicus* türü Wistar Albino ırkı sıçanların 17-18 günlük embriyoları çalışma için kullanılmıştır.

Primer nöron kültüründe kullanmak üzere embriyolar altı dişi sıçanın bir erkek sıçan ile çiftleştirilmesi ile elde edilmiştir. Dişi sıçanlar çiftleşmek üzere erkek sıçanlar ile en fazla bir hafta bir arada bırakılmıştır. Gebelik zamanının tam tayini için vajinal plak gözlemi ve vajinal yayma preparatı ile sperm gözlemi yapılmıştır (Şekil 3.1). Vajinal yayma preparatı, salin solüsyonu ile ıslatılmış pamuklu çubuk yardımı ile alınan örneklerin lam üzerinde metilen mavisi (CAS Number: 28983-56-4, SigmaAldrich, Almanya) ile boyanmasıyla hazırlanmıştır. Vajinal plak oluşumu veya vajinada sperm gözlenen sıçanların gebeliğin sıfırıncı gününde olduğu kabul edilmiştir (Şekil 3.2.). Sıçanlara gebe oldukları süre boyunca günlük bakım ve kontroller uygulanmıştır. 17. ve 18. günlerde gebe sıçanlar alınan etik kurul iznine uygun olarak servikal dislokasyon ile ötenazi uygulanmıştır. Ardından sterilizasyonun sağlanması için sakrifiye edilen sıçanlara %70'lik alkol solüsyonu ile muamele edilmiştir.

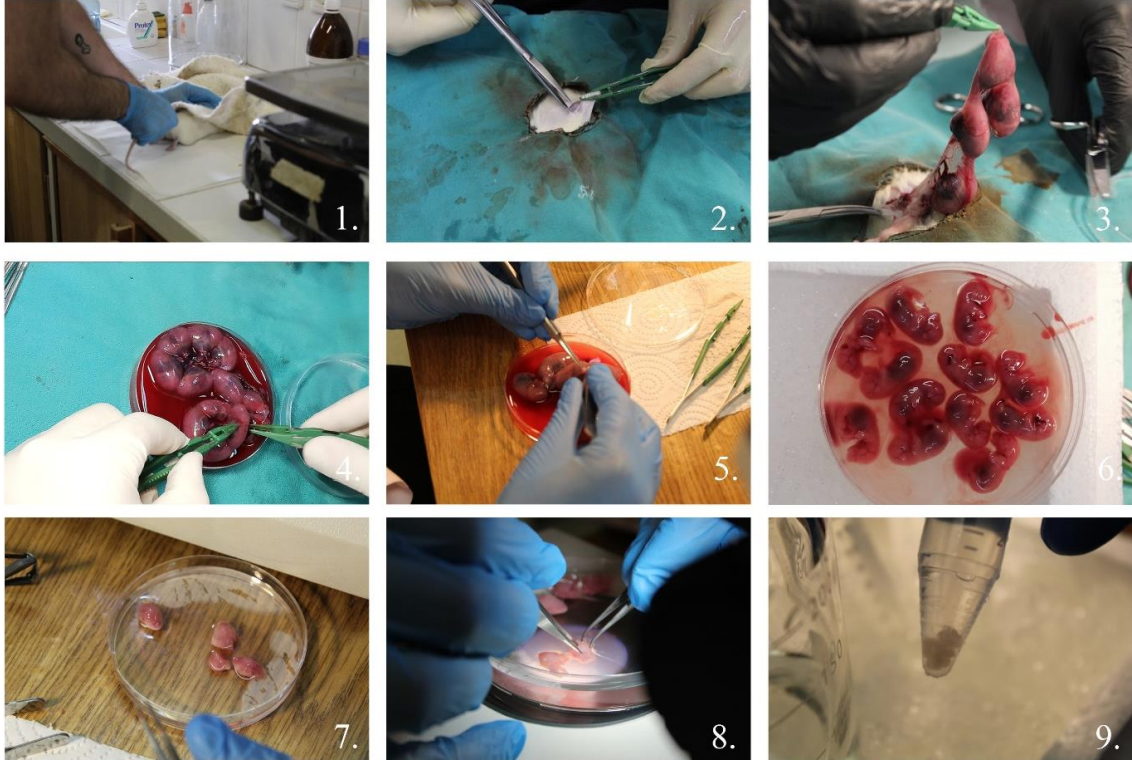
Cerrahi yöntem ile gebe sıçanlardan izole edilen embriyolar buzda bekletilmiş transfer solüsyonu içeren 100 mm çapındaki cam petrilere aktarılmıştır. Metabolizmalarını yavaşlatarak hücreleri canlı tutabilmek adına embriyolar üzerindeki tüm cerrahi yöntemler buz soğukluğundaki (0°C) transfer solüsyonu içerisinde gerçekleştirilmiştir. Embriyoların beyinleri diseksiyon mikroskobu altında izole edilmiştir ve izole edilen beyinlerin korteks bölgeleri ayrılmıştır. Beyin korteksleri beyin zarlarından ayrılarak buz soğukluğunda transfer solüsyonu içeren bir başka petri kabına aktarılmıştır. Aktarılan petride steril bistüri yardımı ile kortekslerin mekanik parçalanması gerçekleştirilmiştir. Daha sonra korteks parçaları içerisinde 10 ml transfer solüsyonu bulunan 15 ml'lik tüplere aktarılmıştır.



Şekil 3.1. Gebeliğinin 0. gününde vajinal plak oluşumunun gözlemlenmesi. Vajinal plak daire (○) içerisinde gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Metil Mavisi ile vajinada sperm tespiti. Vajinada gözlemlenen spermilerin kamçıları ok (↑) işareti ile işaretlenmiştir. (Büyütme: 20X)



Şekil 3.3. Cerrahi yöntem aşamaları. 1: Sakrifikasyon, 2,3: Cerrahi müdahale ile embriyoların alınması, 4: Embriyoların transfer solüsyonu ile yıkanması, 5,6,7: Embriyoların, embriyonik keseden ayrılması ve transfer solüsyonu ile yıkanması, 8: Embriyolardan beynin korteks bölgesinin izolasyonu, 9: İzole edilmiş korteksler

### 3.1.2. Petrilerin Poly-D-Lizin ile Kaplanması

96 kuyulu plastik kültür kapları; izole edilmiş hücrelerin tutunmasına, büyümesine ve morfolojik olarak uygun hale gelmesine yardımcı olması için Poly-D-Lizin (PDL) (Cat Number: A3890401, Thermo Fisher Scientific, ABD) solüsyonu ile kaplanmıştır. PDL stok solüsyonu 1 ml steril distile suda 50 µg PDL olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan stok solüsyon kullanılacağı zamana kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir. Kültür kabının kullanılacak olan her gözüne 50 µl koyulmuş ve kültür kapları bir saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından PDL solüsyonu pipet yardımı ile gözlerden uzaklaştırılarak solüsyonun hücrelere toksik etki göstermemesi için gözler üçer kere 100 µl steril distile su ile yıkanmıştır. İki saat boyunca kültür kapları ağzı açık şekilde kurutulduktan sonra kaplar hücre ekimi için hazır hale getirilmiştir.

### **3.1.3. Primer Nöron Kültürü Sırasında Gerekli Solüsyonların Hazırlanması**

#### **3.1.3.1 Transfer Solüsyonunun Hazırlanması**

Cerrahi yöntem ile elde edilen embriyoların, korteks izolasyonu işlemlerinin sonuna kadar muhafaza edilebilmesi için işlemlere başlamadan önce transfer solüsyonu aşağıdaki protokole göre hazırlanmıştır.

1- 100 ml Phosphate buffered saline (PBS) (P4417-50TAB, SigmaAldrich, Almanya), 1,5 g sükröz ve 0,6 g D-glikoz ile karıştırmıştır. Sükrozun solüsyondaki son konsantrasyonu 43.8 mM, D-glikozun solüsyondaki son konsantrasyonu ise 33,3 mM olarak hesaplanmıştır.

2- Oluşan karışım 0,22 µm filtreden geçirilmiştir.

3-Oluşan solüsyon çalışma anına kadar 2-8°C'de muhafaza edilmiştir.

#### **3.1.3.2. Stok Nörobazal Besiyeri ve Ekim Nörobazal Besiyerinin Hazırlanması**

%2 B-27™ Supplement (50X) (Cat Number: A3582801, Thermo Fisher Scientific, ABD), %1 200 mM'lık L-glutamin (CAS Number: 56-85-9, SigmaAldrich, Almanya), %0,02 Amphotericin B (CAS Number: 1397-89-3, SigmaAldrich, Almanya) ve %1 100x Penisilin / Streptomisin (CAS Number: 3810-74-0 SigmaAldrich, Almanya) içeren Nörobazal Besiyeri (NBM) (Cat Number: 21103049, Thermo Fisher Scientific, ABD) hazırlanmıştır.

Hazırlanan NBM kullanılarak %0,07 10 mM'lık β-merkaptöetanol (Cat Number: 31350010, Thermo Fisher Scientific, ABD) stok solüsyonu, % 0,1 25 mM'lık glutamat (CAS: Number: 56-86-0) stok solüsyonu içeren Ekim Nörobazal Besiyeri (E-NBM) hazırlanmıştır.

#### **3.1.3.3. Sitozin β-D-arabinofuranosit Besiyerinin Hazırlanması**

NBM kullanılarak, 25 µM 10 mM'lık Sitozin β-D-arabinofuranosit (AraC) (CAS Number: 147-94-4, SigmaAldrich, Almanya) stok solüsyonu içeren AraC besiyeri nöron hücrelerinin saf bir şekilde izole edilebilmesi amacıyla hazırlanmıştır.

### **3.1.3.4. Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 Besiyerinin Hazırlanması**

%10 Fetal Bovine Serumu (Cat Number S1810-500, Biowest, ABD) ve %1 100x Penisilin / Streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12) (Cat Number: L0092-500, Biowest, ABD) besiyeri Tripsin (CAS Number: 9002-07-7, SigmaAldrich, Almanya) inaktivasyonu amacıyla kullanılmak üzere hazırlanmıştır.

### **3.1.4. Primer Kortikal Nöron İzolasyonu ve Kültürü**

Bu aşamada tüm işlemler biyolojik güvenlik seviyesi iki olan steril bir laboratuvarında, çalışma kabini içerisinde gerçekleştirilmiştir.

İçerisinde korteks parçaları bulunan 15 ml'lik tüpler 1000 rpm'de bir dakika santrifüj edilerek yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Yıkama işleminden sonra süpernatant ayrılmış ve dipte kalan kısım 15 ml transfer solüsyonu ile ikişer kere yıkanmıştır. Daha sonra peletin üstünde kalan kısım ayrılarak tüplere 0,5'er ml önceden 37°C'ye ısıtılmış 1X Tripsin koyulmuştur. Tripsin'in üstü transfer solüsyonu ile 5 ml'ye tamamlanmıştır. Tüplerin ağızları parafilm ile kaplanarak 37°C'lik sıcak su banyosunda 15 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Böylece dokudaki protein bağlarının parçalanması sağlanmıştır. İnkübasyonun sonunda tüpler %70 etanol ile dezenfekte edilmiştir. Tüpler içerilerindeki Tripsin'in inhibe edilmesi için 10'ar ml DMEM-F12 besiyeri ile ikişer kere yıkanmıştır. Ardından elde edilen süpernatant ayrılmış ve kalan peletlerin üstüne 5'er ml E-NBM koyulmuştur. Korteks parçalarının, 10ml'lik pipet yardımı ile 3-5 defa pipetaj yapılarak besi yeri içerisinde mekanik olarak parçalanması sağlanmıştır. Ardından cam pastör pipeti yardımı ile 3-5 defa pipetaj yapılarak tüm dokuların parçalanması ve hücrelerin besiyeri içerisinde homojen olarak dağılması sağlanmıştır. Ölü hücrelerin ve doku parçalarının 15 ml'lik tüp içerisinde çökmesi beklenmiştir. Çökme işlemi gerçekleştirildikten sonra süpernatant ayrılmıştır. Ayrılan süpernatantın üstüne 10-12 ml E-NBM eklenmiş ve hücre sayımı işlemine geçilmiştir. Hücre sayımı Tripan mavisi boyaması ile hemositometre tipi lamel kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Önceden PDL ile kaplanmış olan 96 kuyulu kültür kapların PDL kaplı olan gözlerine 10<sup>4</sup> hücre/kuyucuk olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır. 3 gün boyunca hücreler 37°C, %5 CO<sub>2</sub> koşullarını sağlayan etüv içerisinde inkübe edilmiştir. 3. günde her göz AraC besiyeri ile yarı yarıya

besiyeri değişikliğine tabi tutulmuştur. 4. günde her gözde besi yerleri %90 oranla NBM ile değiştirilmiştir. Daha sonra her 3-4 günde bir NBM ile besi yeri değişimi yapılmıştır. Nöronların olgun hale gelebilmesi için düzenli besi yeri değişimleri ile nöronlar 10-11. güne kadar inkübe edilmiştir.

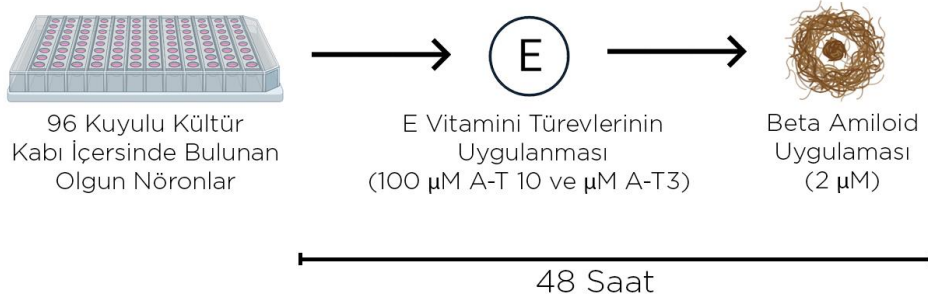
### **3.2. Elde Edilen Primer Nöronların Karakterizasyonunun Yapılması**

Primer kültür ile elde edilmiş nöronların karakterizasyonunu sağlayabilmek için nöronların hücre iskeletinde bulunan Mikrotübül İlişkili Protein-2'yi (MAP2) hedefleyen Anti-MAP2 antikoru (ab11268, Abcam, Birleşik Krallık) kullanılarak immünohistokimyasal boyama gerçekleştirilmiştir. Nöronlar olgun hale geldikten sonra besiyeri ortamdan uzaklaştırılmıştır. PBS ile yıkama yapıldıktan sonra hücreler; -20°C sıcaklıktaki metanol ile oda sıcaklığında 5 dakika boyunca fikse edilmiştir. Ardından %0,1 Triton X-100 (CAS Number: 9002-93-1, SigmaAldrich Almanya) ile 3 dakika boyunca oda sıcaklığında hücrelerin geçirgenliği sağlanmıştır. Sekonder antikorun serumunu içeren solüsyon ile bloklama sağlandıktan sonra hücreler, primer antikorun hedefe bağlanabileceği en düşük konsantrasyonun belirlenebilmesi için primer antikorun 1:2000 dilüsyonu ile gece boyunca 4°C'de inkübe edilmiştir. Primer antikor ile inkübasyondan sonra "Goat Anti-Mouse IgG Texas Red (TR, sc-2781, Santa Cruz, ABD)" ve "goat anti-mouse IgG - Floresan İzotiyosiyanat (FITC, sc-2010 Santa Cruz, ABD)" sekonder antikorları ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübasyon yapılmıştır. Çekirdek boyaması ise 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) kullanılarak yapılmıştır.

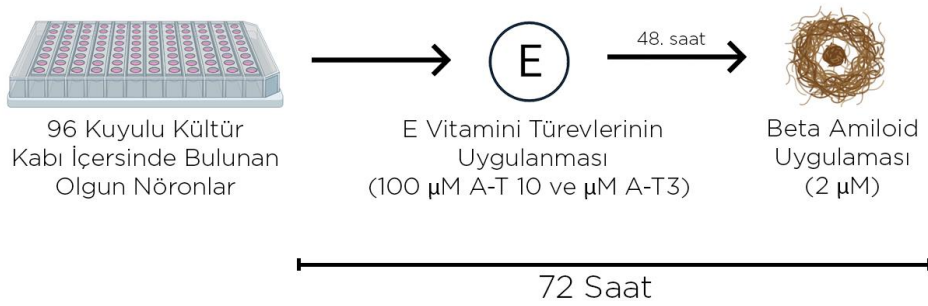
### **3.3. Beta Amiloid Kaynaklı Nörodejenerasyon Modeli ve Deney Gruplarının Oluşturulması**

Primer kültür ile elde edilmiş nöronlar olgun hale geldikten sonra A $\beta$  kaynaklı nörodejenerasyon modeli oluşturabilmek adına hücrelere her gözde 2  $\mu$ M konsantrasyonda olacak şekilde 24 saat boyunca A $\beta$  uygulaması yapılmıştır. E vitamininin farklı formlarının koruyucu etkilerinin araştırılması için ise A $\beta$  uygulaması yapılmadan önce 48 ve 72 saatlik süreler boyunca nöronlar 100  $\mu$ M A-T ve ile muamele edilmiş, A $\beta$  uygulaması E vitamini türevlerinin uygulamasının son 24 saatlik periyodunda gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.4.). Ayrıca A-T ve A-T3'ün farklı konsantrasyonlarının ve çözücü olarak kullanılan dimetil sülfoksitin (DMSO) nöronlar üzerinde toksik bir etki yaratıp yaratmadığını gözlemlemek için 24 saat boyunca 50  $\mu$ M 100  $\mu$ M ve 200  $\mu$ M A-T ve 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M ve 20 $\mu$ M A-T3 ile muamele edilmiştir (Çizelge 3.1.).

## 48 Saat Uygulaması



## 72 Saat Uygulaması



Şekil 3.4. 48 ve 72 saat gruplarının A-T, A-T3 ve A $\beta$  uygulamalarının yapılma sırası

Çizelge 3.1. Deney gruplarının özetlenmesi

Grup Adı	Grup İçeriği	Grup Uygulama Süresi		
Grup I	Kontrol	24 saat boyunca normal besi yeri uygulaması	48 saat boyunca normal besi yeri uygulaması	72 saat boyunca normal besi yeri uygulaması
Grup II	Sadece A $\beta$ içeren besi yeri	24 saat boyunca A $\beta$ içeren besi yeri uygulaması	48 saat boyunca A $\beta$ içeren besi yeri uygulaması	72 saat boyunca A $\beta$ içeren besi yeri uygulaması
Grup III	Sadece A-T içeren besi yeri	24 saat boyunca A-T içeren besi yeri uygulaması	48 saat boyunca A-T içeren besi yeri uygulaması	72 saat boyunca A-T içeren besi yeri uygulaması
Grup IV	Sadece A-T3 içeren besi yeri	24 saat boyunca A-T3 içeren besi yeri uygulaması	48 saat boyunca A-T3 içeren besi yeri uygulaması	72 saat boyunca A-T3 içeren besi yeri uygulaması
Grup V	A $\beta$ ve A-T içeren besi yeri	-	A-T uygulamasının 24. saatinde A $\beta$ uygulaması	A-T uygulamasının 48. saatinde A $\beta$ uygulaması
Grup VI	A $\beta$ ve A-T3 içeren besi yeri	-	A-T3 uygulamasının 24. saatinde A $\beta$ uygulaması	A-T3 uygulamasının 48. saatinde A $\beta$ uygulaması
Grup VIII	DMSO içeren besi yeri	24 saat boyunca DMSO içeren besi yeri uygulaması	-	-

### 3.4. Deney Grupları Üzerinde Yapılan Analizler

#### 3.4.1. Hücre Canlılığının 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide ve Nötral Kırmızı Analizleri ile Ölçülmesi

MTT testi, standartlaştırılmış bir kalorimetrik hücre canlılığı testidir. Canlı hücrelerin süksinat dehidrojenaz enzimi aktivitesi ile MTT formazan kristallerini oluşturma kabiliyetini belirleyerek canlı hücre sayısını yansıtmaktadır [68].

MTT analizinin uygulanabilmesi için 96 kuyulu kültür kabı içerisindeki hücrelerin üstüne %10 MTT solüsyonu (CAS Number: 298-93-1, SigmaAldrich, Almanya) içeren serumsuz besiyeri eklenerek hücreler 4 saat boyunca 37°C, %5 CO<sub>2</sub> inkübe edilmiştir. Daha sonra MTT solüsyonu uzaklaştırılarak isopropanol eklenmiş ve örneklerin 570 nm'de ELİSA okuyucu ( $\mu$ QuantTM, BiotekW Instruments Inc, ABD) cihazında absorbans değerleri okunmuştur. Hücre canlılıklarının oranı deney gruplarının pozitif kontrole göre yüzdeleri hesaplanarak elde edilmiştir.

Nötral Kırmızı analizi canlı hücrelerin lizozomlarına supravital bir madde olan Nötral Kırmızı boyasını dahil etme ve bağlama yeteneğini ölçen bir analizdir. Birçok biyomedikal uygulama alanında kullanılan bu sitotoksosite testi hücre kültüründeki canlı hücre sayısını ve sitotoksosite miktarını kantatif olarak analiz edebilmeyi sağlamaktadır [69].

Nötral Kırmızı analizi için ise hücreler üzerinde bulunan NBM besiyerleri uzaklaştırılmış ve hücreler PBS ile yıkanmıştır. Hücrelerin üstüne %10 Nötral Kırmızı (CAS Number: 553-24-2, SigmaAldrich, Almanya) içeren serumsuz besi yeri, 37°C sıcaklıkta 3 saat boyunca uygulanmıştır. İnkübasyondan sonra Nötral Kırmızı besiyeri uzaklaştırılmış ve hücreler PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra %0,1 CaCl<sub>2</sub> ve %0,5 formaldehit içeren solüsyon ile fiksasyon yapılmıştır. Fiksasyondan sonra %1 asetik asit ve %50 etanol içeren solüsyon eklenerek hücreler 10 dk boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra örneklerin 490 nm'de ELİSA okuyucu ( $\mu$ QuantTM, BiotekW Instruments Inc, ABD) cihazında absorbans değerleri okunmuştur.



### **3.4.2. Beta Amiloid Birikiminin Kongo Kırmızısı Boyaması ile Gösterilmesi**

Kongo Kırmızısı, geniş beta yaprak yapıları nedeniyle birçok amiloid proteinine bağlanan histolojik bir boyadır. Boyanın absorban spektrumu, amiloid bağlanma şekline göre değişmektedir [70].

2 µM Aβ uygulanan gruplardaki Aβ birikiminin gösterilebilmesi için Kongo Kırmızısı Boyası kullanılmıştır. 24 saat boyunca Aβ ile muamele edilen hücrelerin besiyerleri uzaklaştırılmıştır. PBS ile yıkama yapıldıktan sonra hücreler soğuk %100 metanol ile 5 dakika boyunca oda sıcaklığında fikse edilmiştir. Fiksasyondan sonra Hematoksilin ile çekirdek boyaması yapılmıştır. Ardından %0,1 oranında distile su ile seyreltilerek hazırlanan Kongo Kırmızısı solüsyonu hücreler üzerine uygulanmıştır. Boyama bittikten sonra boya kalıntıları PBS ile yıkama yapılarak uzaklaştırılmıştır ve boyanmış olan Aβ fragmentleri Inverted Mikroskop (Olympus IX70 Inverted Mikroskop, Japan) ile gözlemlenmiş ve Aβ birikimi olan bölgelerin fotoğrafları çekilmiştir. Çekilen fotoğraflardaki Aβ birikimi Fiji-ImageJ (NIH, ABD) programı aracılığıyla, Kongo Kırmızısı ile boyanan bölgelerin yüzdeleri hesaplanarak analiz edilmiştir.

### **3.4.3. Nekroz ve Apoptoz'un Akridin Orange / Propidium Iodide Boyaması ile İncelenmesi**

AO ve PI, nükleik aside özgü flokromlardır ve DNA'ya bağlandıklarında, sırasıyla yeşil ve turuncu floresan yaymaktadır. Akridin Orange (AO) (CAS Number: 65-61-2, SigmaAldrich, Almanya) canlı ve erken apoptotik hücrelerin zarını geçebilmekte, Propidium Iodide (PI) (CAS Number: 25535-16-4, SigmaAldrich, Almanya) ise canlı hücrelerin zarından geçememektedir. Geç apoptotik ve nekrotik hücreler AO ve PI ile birlikte boyanmaktadır [71].

Tez çalışması kapsamında 96 kuyulu kültür kabı içerisindeki nöronlara Aβ kaynaklı nörodejenerasyon modeli ve E vitamininin A-T ve A-T3 uygulandıktan sonra apoptozun incelenmesi için AO/PI boyaması yapılmıştır. Nöronların üzerindeki NBM besiyerleri uzaklaştırıldıktan sonra nöronlar PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra bir dakika boyunca 1:1 hazırlanmış AO:PI boyası ile boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Boya kaldırıldıktan sonra nöronlar boya kalıntılarını uzaklaştırabilmek için PBS ile ikişer kere yıkanmıştır. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra 460-490 nm dalga boyundaki ışık altında Inverted Mikroskop (Olympus IX70 Inverted Mikroskop, Japonya) ile inceleme yapılmıştır.

Boyama yapıldıktan sonra Fiji-ImageJ programı kullanılarak apoptotik ve nekrotik hücreler sayılmıştır. Organize yapıya, sağlam plazma membranına ve turuncu veya yeşil sitoplazmaya sahip tek tip yeşil çekirdekli hücreler, canlı hücre; çekirdekte parlak yeşil kromatin yoğunlaşması alanları olan hücreler, erken apoptotik hücre; yoğun turuncu kromatin yoğunlaşması alanlarına sahip hücreler, geç apoptotik hücre ve turuncu sağlam çekirdekli hücreler nekrotik hücreler olarak kabul edilmiştir. Çizelge 3.2.'de belirtilen formüller kullanılarak %apoptoz ve %nekroz oranları hesaplanmıştır [72].

Çizelge 3.2. AO/PI boyaması sonucu %apoptoz ve %nekroz değerlerinin hesaplanabilmesi için kullanılan formüller

---

#### Formül

---

$$\text{Apoptotik Hücreler (\%)} = \frac{\text{Toplam Apoptotik Hücre Sayısı (Erken + Geç)}}{\text{Topalm Hücre Sayısı}} \times 100$$

---

$$\text{Nekrotik Hücreler (\%)} = \frac{\text{Toplam Nekrotik Hücre Sayısı}}{\text{Topalm Hücre Sayısı}} \times 100$$

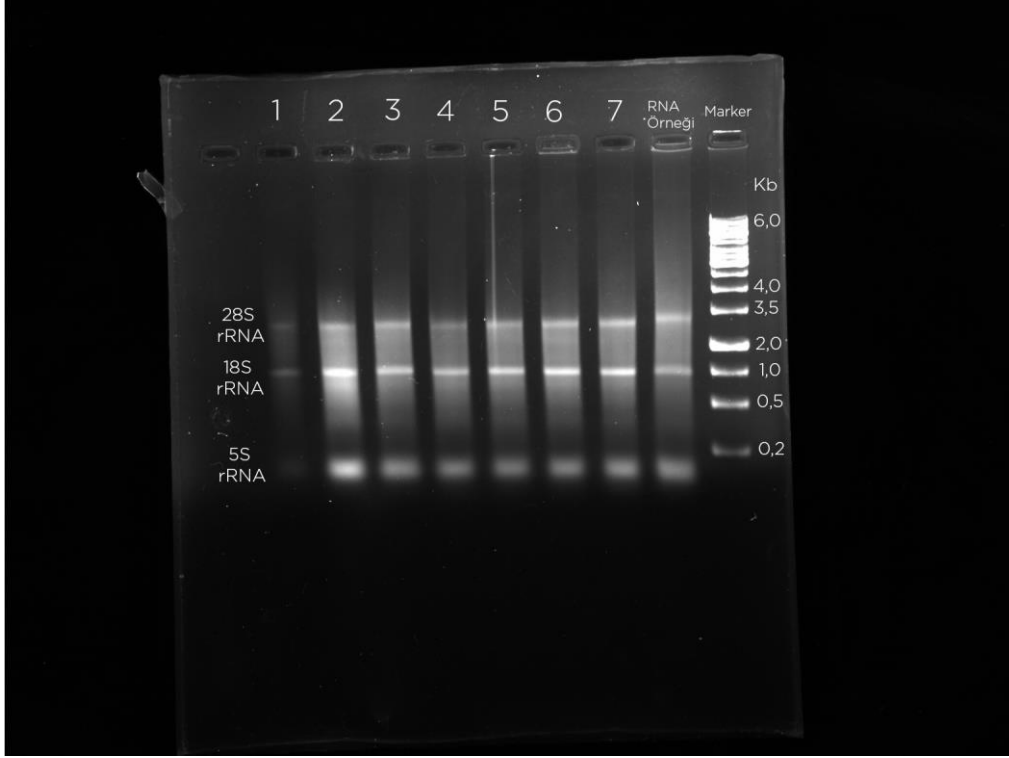
---

#### 3.4.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizi

A-T ve A-T3'ün A $\beta$  kaynaklı nörodejenerasyona karşı gösterdiği koruyucu etkilerin moleküler düzeyde incelenebilmesi için kalsiyum kanallarını kontrol eden CACNA1C ve APP proteinin parçalanması ile ilgili olan BACE1 genleri seçilerek bu genlere özel yaklaşık 20 bazlık primer tasarımı yapılmıştır [73, 74]. Daha sonra tasarlanan primerler kullanılarak hücreler CACNA1C ve BACE1 genleri için analiz edilmiştir. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizi (RT-PCR) işleminin yapılabilmesi için hücrelerden RNA izole edildi ve izole edilen RNA'lar komplementer DNA'ya (cDNA) çevrilerek ilgili gen bölgelerinin ifade düzeyleri RT-PCR analizi ile incelenmiştir.

Yeterli miktarda RNA izole edilebilmesi için deney düzeneği 24 kuyulu kültür kabı içerisinde tekrar edilmiştir. Belirlenen sürelerde A $\beta$ , A-T ve A-T3 uygulamasından sonra her kuyucuk PBS ile yıkanmış ve 300  $\mu$ l Trizol (MDL number: MFCD00213058, SigmaAldrich, Almanya) uygulaması yapılmıştır. Mekanik uygulama ile hücreler yüzeyden kaldırılmıştır. Pipetaj ile homojenizasyon sağlandıktan sonra her dört kuyucuk

bir eppendorfta olacak şekilde hücreler toplanmıştır. Nükleoprotein komplekslerinin tam ayrışmasını sağlamak için, numuneler oda sıcaklığında beş dakika boyunca beklemiştir. Daha sonra kullanılmış olan her 1 ml trizol için 0,2 ml kloroform eklenmiştir. On beş saniye boyunca örnekler kloroform ile karıştırıldıktan sonra on dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyondan sonra örnekler 12000 rcf'de on beş dakika boyunca 2-8°C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında üç adet faz oluşumu gözlemlenmiştir. RNA içeriği en üstte bulunan renksiz sulu fazda bulunduğundan dolayı bu faz yeni bir eppendorfa ayrılmıştır. Daha sonra RNA'ların saf bir şekilde izole edilebilmesi için kullanılmış olan her 1 ml trizole karşılık 0,5 ml isopropanol eklenmiştir. Oda sıcaklığında on dakika inkübasyondan sonra örnekler 12000 rcf'de on dakika boyunca 2-8°C'de santrifüj edilmiştir. Supernatan uzaklaştırıldıktan sonra örneklerin üstüne kullanılmış olan her 1 ml trizole karşılık 1 ml %75 etanol eklendi ve örnekler 12000 rcf'de on beş dakika boyunca 2-8°C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra dibeye çökmüş olan RNA'ların üstündeki alkol uzaklaştırılmış ve RNA'lar kurutulmuştur. Kurutma işlemi tamamlandıktan sonra 250 µl nükleaz içermeyen su ile örnekler sulandırılmıştır. Pipetaj işlemi ile on beş dakika boyunca 55°C sıcaklıktaki ısıtıcı üstünde RNA'nın çözünmesi sağlanmıştır. RNA'lar tamamen çözüldükten sonra izole edilen RNA'larda kırık olup olmadığının kontrolü için agaroz jelde yürütme işlemi yapılmıştır (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. RNA izolasyonu yapıldıktan sonra 7 gruptan elde edilen RNA'ların agaroz jelde yürütülerek RNA kırığı olup olmadığının kontrol edilmesi. Kb: Kilobaz, 1: Kontrol grubu, 2: A $\beta$  grubu, 3: 48 Saat A-T + 24 saat A $\beta$  uygulaması grubu, 4: 48 Saat A-T3 + 24 saat A $\beta$  uygulaması grubu, 5: 72 Saat A-T + 24 saat A $\beta$  uygulaması grubu, 6: 72 Saat A-T3 + 24 saat A $\beta$  uygulaması grubu, 7: 48 Saat A-T3 uygulaması grubu, RNA Örneği: Diğer gruplar ile karşılaştırmak için kullanılan RNA, Marker: RNA kırıklarını kontrol etmek için kullanılan işaretleyicileri içeren grup

İzole edilen toplam RNA miktarları ise Nanodrop cihazı (NanoDrop Q 5000 UV-Vis Spectrophotometer, Quawell Technologies Inc, China) ile hesaplanmıştır. Yeterli miktarda RNA kullanılarak Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche Molecular Systems, Inc, ABD) ile üretici protokolüne uygun bir şekilde cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA'larda incelenecek olan primerler CACNA1C ve BACE1 genlerine özgü bir şekilde tasarlanmıştır. Primer tasarımı sırasında DNA kontaminasyonunu önlemek ve intron sekanslarını dahil etmek için birbirinden farklı ekzonlardan yola çıkılmıştır. LightCycler® 480 SYBR® Green I Master (Roche Molecular Systems, Inc, ABD) ile üretici protokolüne uygun bir şekilde RT-qPCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) geni rölatif ekspresyon analizi için internal kontrol olarak kullanılmıştır.

Primerler, Primer3 Versiyon V4.0 programı kullanılarak tasarlandı ve Desalting metodu ile saflaştırılmıştır. Çizelge 3.3.'de CACNA1C, BACE1 ve GAPDH genlerine ait primer dizileri verilmiştir. Tüm primerler, erime erime eğrişi üzerinde bir tane amplifikasyon ürünü oluşturması ile spesifiklik durumu açısından kontrol edilmiştir.

Çizelge 3.3. Hedef genler ve hedef genlerin primer dizileri

Hedef Gen	Gen İsmi	Primer Çeşidi	Primer Dizisi
CACNA1C	Voltaj kapılı L-tip kalsiyum kanalı	Forward	CTCCAGTTGCCTGTCTGAGG
		Reverse	GCTCCCATAGTTGGAACCTCC
BACE1	Beta sekretaz 1	Forward	ATGGCTTTTGGCTAGGGGAG
		Reverse	TGGCCGTAGGTATTGCTGAG
GAPDH	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz	Forward	TTGTGCAGTGCCAGCCTC
		Reverse	ATGAAGGGGTCGTTGATGGC

### 3.5. Stok Solüsyonların Hazırlanması

#### 3.5.1. Kongo Kırmızısının Hazırlanması

0,1 g Kongo Kırmızısı (CAS Number: 573-58-0, SigmaAldrich, Almanya) tartılarak 100 ml distile su içerisinde çözdürülmüştür. Kalıntıların uzaklaştırılabilmesi için hazırlanan solüsyon kurutma kağıdı yardımı ile süzölmüştür.

#### 3.5.2. Alpha-tokoferolün Stok ve Uygulama Solüsyonlarının Hazırlanması

0,95 g %95 saflıktaki A-T (CAS Number: 10191-41-0, SigmaAldrich, Almanya) 1 ml DMSO içerisinde çözdürülerek 1,47 M konsantrasyondaki stok solüsyon hazırlanmıştır. 50 µM, 100 µM ve 200 µM olan uygulama konsantrasyonları ise stok solüsyonun NBM besiyeri ile sulandırılması hazırlanmıştır.

#### 3.5.3. Alpha-tokotrienolün Stok ve Uygulama Solüsyonlarının Hazırlanması

10 mg A-T3 (CAS Number: 1721-51-3, SigmaAldrich, Almanya) 1 ml DMSO içerisinde çözdürülerek 0,024 M konsantrasyondaki stok solüsyon hazırlanmıştır. 5 µM, 10 µM ve 20 µM olan uygulama konsantrasyonları stok solüsyonun NBM besiyeri ile sulandırılması aracılığıyla hazırlanmıştır.

### **3.5.3. Beta Amiloid Stok ve Uygulama Solüsyonunun Hazırlanması**

1 mg A $\beta$  (CAS Number: 107761-42-2, SigmaAldrich, Almanya) 1 ml DMSO içerisinde çözdürülerek 10  $\mu$ M'lık stok solüsyon hazırlanmıştır. Sulandırılma işleminden önce A $\beta$  stok çözeltisi 24 saat boyunca 37°C'de inkübe edilerek A $\beta$  fibrillerinin oluşumu sağlanmıştır. Daha sonra 2  $\mu$ M konsantrasyondaki uygulama solüsyonunu hazırlamak için hazırlanan stok solüsyon NBM besiyeri ile sulandırılmıştır.

### **3.6. İstatistiksel Analiz**

Tüm analiz sonuçları GraphPad Prism Software (GraphPad Software Inc., ABD) programı aracılığıyla istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Analiz sırasında hesaplanan ortalama değerleri ve  $\pm$  standart sapma değerleri bir arada verilmiştir. Farklı gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık düzeyleri ise Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) aracılığıyla ölçülerek p-değerleri 0,05'den daha az olan durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## 4. SONUÇLAR

Çalışmada, üzerlerinde A $\beta$  kaynaklı nörodejenerasyon oluşturulan nöronlar 17-18 günlük sıçan embriyolarından izole edilmiştir. Primer kültür yöntemi ile kültüre edilen nöronlar ile çalışılmaya başlanmadan önce nöronların olgun hale gelmesi beklenmiş ve karakterizasyon yapılmıştır.

A $\beta$ , A-T ve A-T3 uygulamaları yapıldıktan sonra E vitamini türevlerinin koruyucu etkilerini inceleyebilmek için nöronlardaki hücre canlılığı yüzdelерinin değişimleri, CACNA1C ve BACE1 genlerinin ifadesi ve A $\beta$  birikim miktarları incelenmiştir. Daha sonra elde edilen sonuçlar ANOVA kullanılarak istatistiksel açıdan karşılaştırılmıştır.

### 4.1. Primer Nöron İzolasyonu ve Kültürü

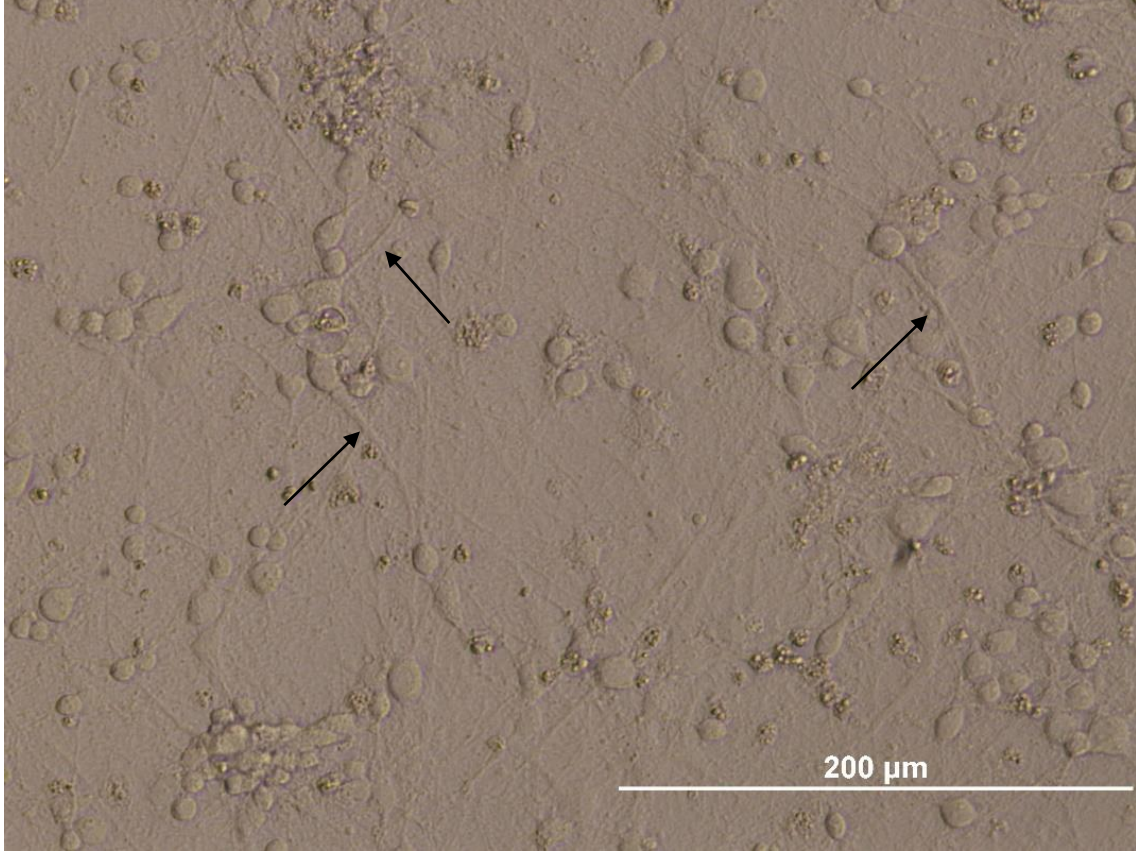
17-18 günlük sıçan embriyolarından steril koşullarda izole edilen nöronlar uygun besiyeri ortamında kültüre edildikten sonra inkübe edilmiştir. Nöronlar doğru morfolojik şekli alıp kültür ortamında bağlantılar kurduktan sonra olgunlaşmış olarak kabul edilmiştir (Şekil 4.1.). Kültür işleminden sonra nöronların olgunlaşmaları yaklaşık 8-10 gün sürmüştür. Nöronlar üzerinde herhangi bir pasajlama işlemi gerçekleştirilmemiştir.

### 4.2. Nöronların Karakterizasyonu

Primer kültür yöntemi ile elde edilen nöronlar olgunlaştıktan sonra deney aşamasına geçmeden önce nöronlara özgü olan MAP2 molekülü için floresan boyama yapılmıştır. MAP2 molekülü için primer antikor olarak mouse monoclonal anti-MAP2 sekonder olarak ise goat anti-mouse IgG-TR ve goat anti-mouse IgG-FITC antikorları kullanılmıştır. Hücreler boyandıktan sonra TR antikoruna 545-580 nm, FITC antikoruna ise 460-490 nm dalga boyunda Inverted Mikroskop (Olympus IX70 Inverted Mikroskop, Japan) ile görüntülenmiştir. MAP2 molekülünü işaretlemek için en uygun en düşük konsantrasyonu belirlemek için primer antikor farklı miktarlarda seyreltilmiştir (1:200, 1:500, 1:1000, 1:2000).

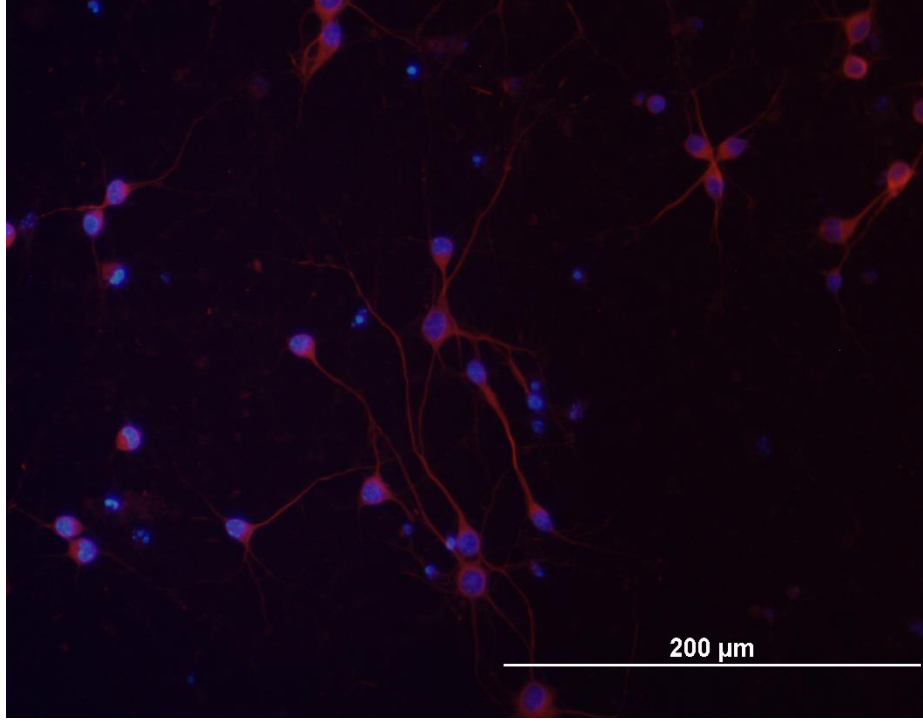
Yapılan immünohistokimyasal boyama ile primer kültür yöntemi ile elde edilen kültürün saf bir şekilde nöron hücrelerinden oluştuğu gösterilmiştir. Ayrıca farklı konsantrasyonlarda primer antikolar ile işaretlemeler sonucu elde edilen görüntüler, primer kültür yöntemi ile oluşturulmuş olan nöronların en düşük konsantrasyonda bile (1:2000) Anti-Map2 tarafından işaretlenebildiğini göstermiştir. Bunun yanı sıra hem

FITC hem de TR boya ları nöron hücrelerini başarılı bir şekilde boyanmıştır (Şekil 4.2.-4.7.).

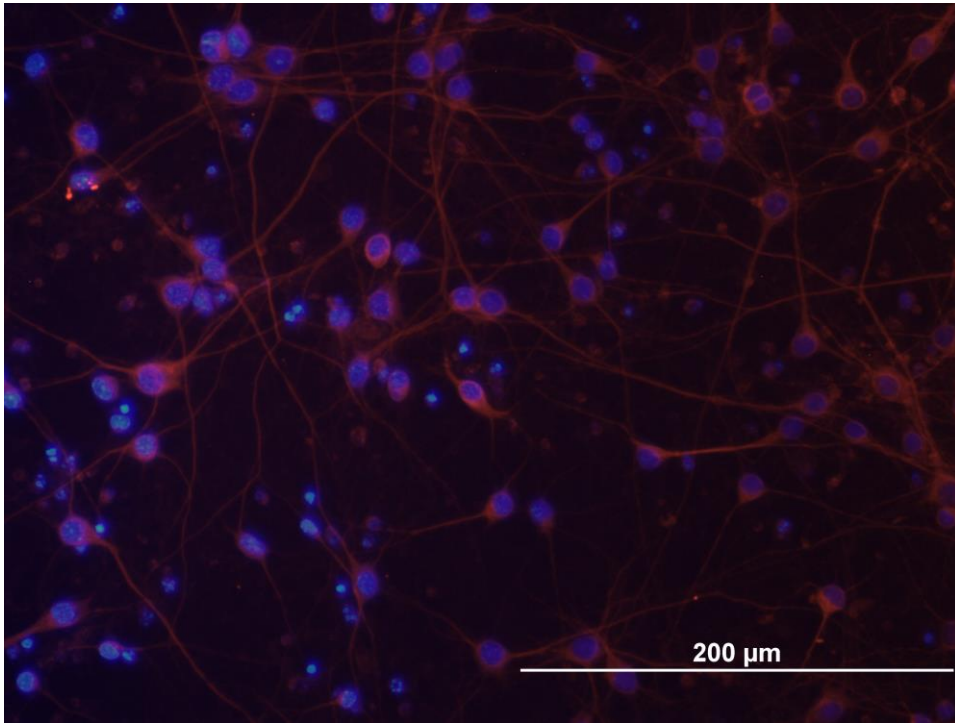


Şekil 4.1. Olgunlaşmış nöron görüntüsü. Olgunlaşmış olan nöronlarda nörit oluşumu gözlemlenmiştir. Ok (↑) işareti ile nöronlar arasındaki nörit adımı alan bağlantılar gösterilmiştir. Büyütme: X20

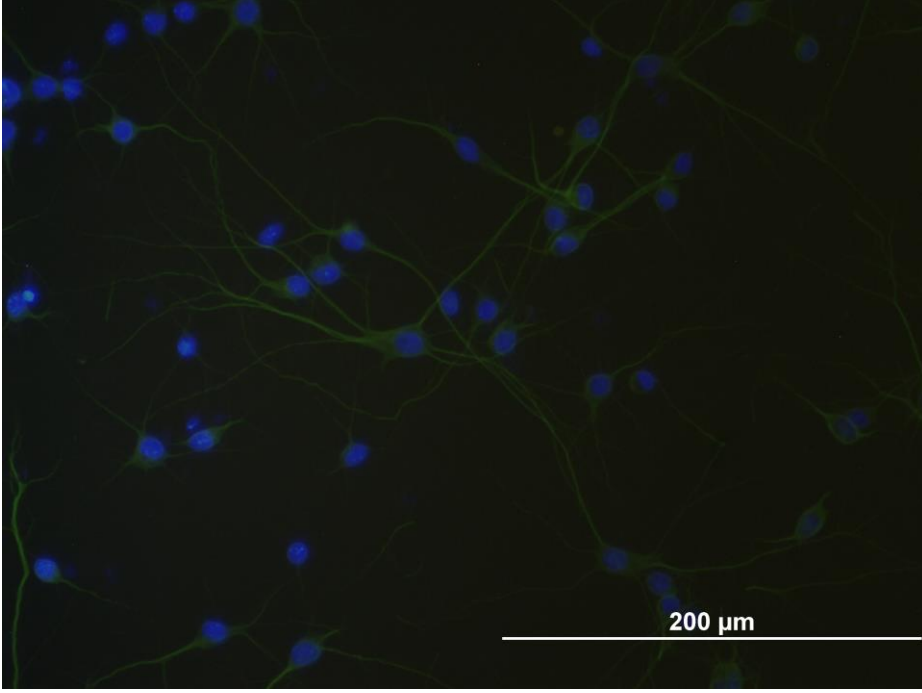




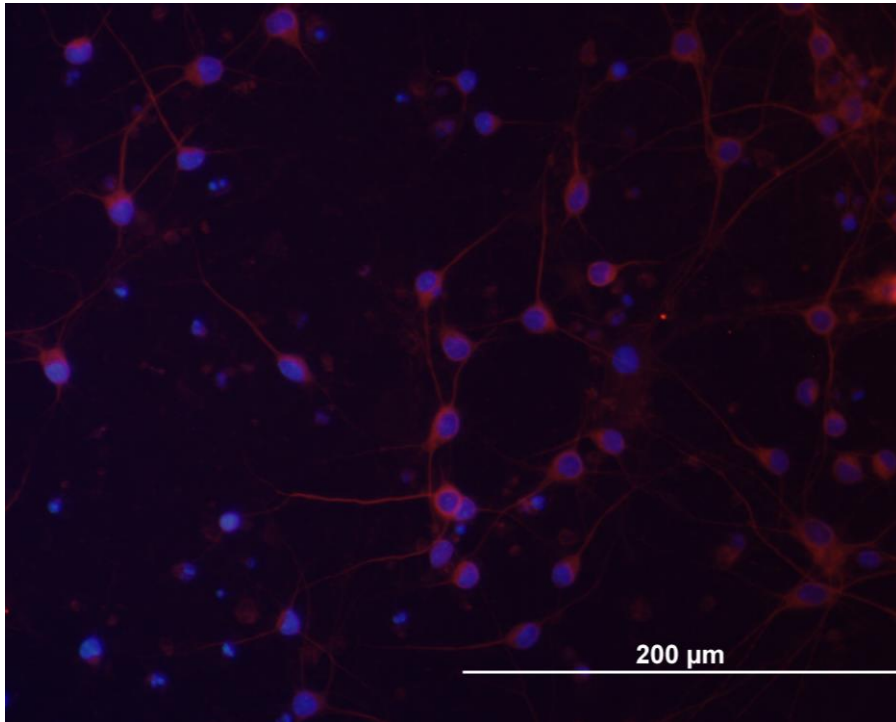
Şekil 4.2. Primer kültür yöntemi ile elde edilen nöronların Anti-MAP2 antikoru ile işaretlenerek immünohistokimyasal olarak boyama görüntüsü. Kırmızı: 1:200 Anti-MAP2, 1:100 TR (545-580 nm) Mavi: DAPI Büyütme: X20



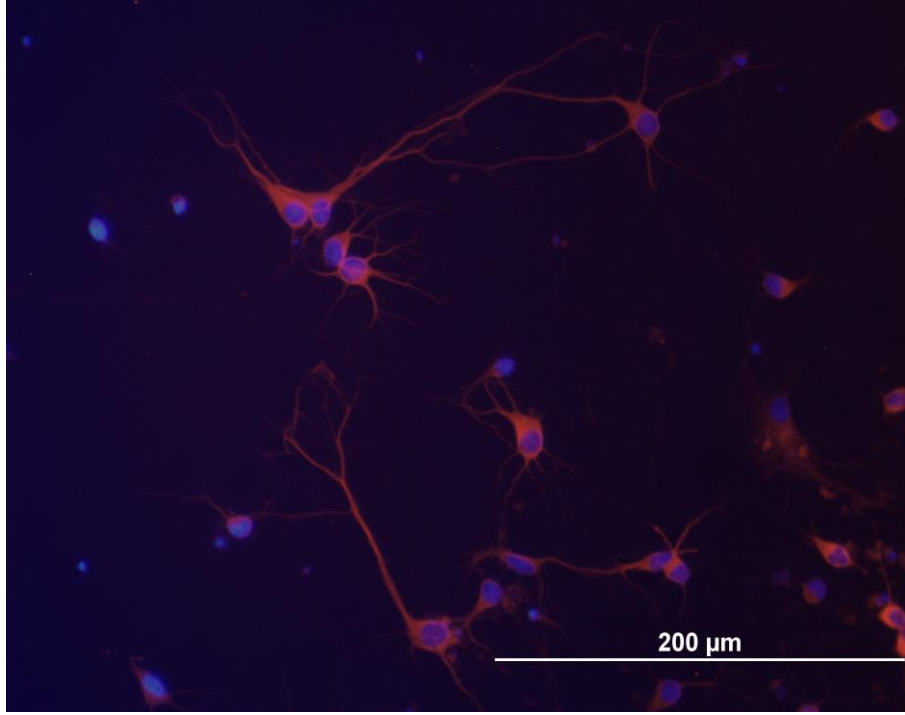
Şekil 4.3. Primer kültür yöntemi ile elde edilen nöronların Anti-MAP2 antikoru ile işaretlenerek immünohistokimyasal olarak boyama görüntüsü. Kırmızı: 1:500 Anti-MAP2, 1:100 TR (545-580 nm) Mavi: DAPI Büyütme: X20



Şekil 4.4. Primer kültür yöntemi ile elde edilen nöronların Anti-MAP2 antikoru ile işaretlenerek immünohistokimyasal olarak boyama görüntüsü. Yeşil: 1:500 Anti-MAP2, 1:100 FITC (460-490) Mavi: DAPI Büyütme: X20



Şekil 4.5. Primer kültür yöntemi ile elde edilen nöronların Anti-MAP2 antikoru ile işaretlenerek immünohistokimyasal olarak boyama görüntüsü. Kırmızı: 1:1000 Anti-MAP2, 1:100 TR (545-580 nm) Mavi: DAPI Büyütme: X20



Şekil 4.6. Primer kültür yöntemi ile elde edilen nöronların Anti-MAP2 antikoru ile işaretlenerek immünohistokimyasal olarak boyama görüntüsü. 1:2000 Anti-MAP2, 1:100 TR (545-580 nm) çekirdek boyaması: DAPI X20

### 4.3. Sitotoksikite ve Canlılık Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Primer kültür ile elde edilmiş nöronlar sekizinci gününde olgunlaştıktan sonra deney aşamalarının gerçekleştirilebilmesi için gruplandırılmıştır. Gruplar şu şekilde kurulmuştur:

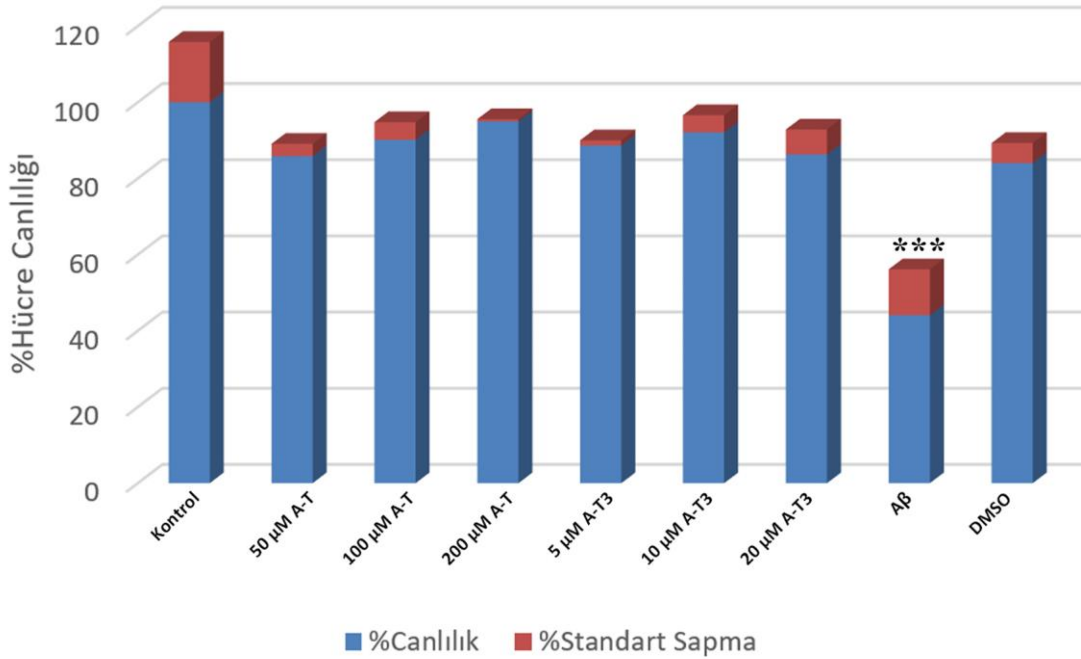
1. 24 saat süresince; A-T'ün üç farklı dozu (50, 100 ve 200  $\mu\text{g/ml}$ ), A-T3'ün üç farklı dozu (5, 10 ve 20  $\mu\text{g/ml}$ ), 2  $\mu\text{M}$ 'lık A $\beta$  ve çözücü olarak kullanılan DMSO (1  $\mu\text{l/ml}$ ) hücreler üzerine uygulanmıştır. Uygulamadan sonra hücreler MTT analizi ile canlılık bakımından incelenmiştir.
2. 48 saat süresince; 100  $\mu\text{g/ml}$  A-T ve 10  $\mu\text{g/ml}$  A-T3 hücreler üzerine uygulanmıştır. Uygulamanın 24. saatinde 2  $\mu\text{M}$ 'lık A $\beta$  uygulaması yapılmıştır. Uygulamalardan sonra hücreler; MTT analizi ile canlılık bakımından, Nötral Kırmızı analizi ile sitotoksikite bakımından incelenmiştir.
3. 72 saat süresince; 100  $\mu\text{g/ml}$  A-T ve 10  $\mu\text{g/ml}$  A-T3 hücreler üzerine uygulanmıştır. Uygulamanın 48. saatinde 2  $\mu\text{M}$ 'lık A $\beta$  uygulaması yapılmıştır.

Uygulamalardan sonra hücreler; MTT analizi ile canlılık bakımından, Nötral Kırmızısı analizi ile sitotoksisite bakımından incelenmiştir.

#### 4.3.1. 24 Saat Uygulamalarının Hücre Canlılığı Bakımından Karşılaştırılması

Bu aşamada A-T'nin, A-T3'ün, A $\beta$ 'nin ve çözücü olarak görev yapan DMSO'nun belirlenen dozlarının nöronlar üzerinde hücre canlılığı açısından bir fark oluşturup oluşturmadığı gözlemlenmiştir.

A-T ve A-T3'ün denemesi yapılan dozlarının hücreler üzerinde toksik bir etki bırakmadığı ve bu gruplarda hücre canlılığı %85'in altına düşmediği ortaya çıkmıştır. Buna karşı A $\beta$  uygulaması yapılan gruplar ile kontrol grubu arasında hücre canlılığı bakımından istatistiksel olarak güven aralığında anlamlı bir fark oluşmuştur ve hücre canlılığında %44'e kadar bir düşüş gözlemlenmiştir. Çözücü olarak görev yapan DMSO ise %0,1 konsantrasyonda kullanılmış ve hücreler üzerinde öldürücü bir etki bırakmamıştır (Şekil 4.7.).

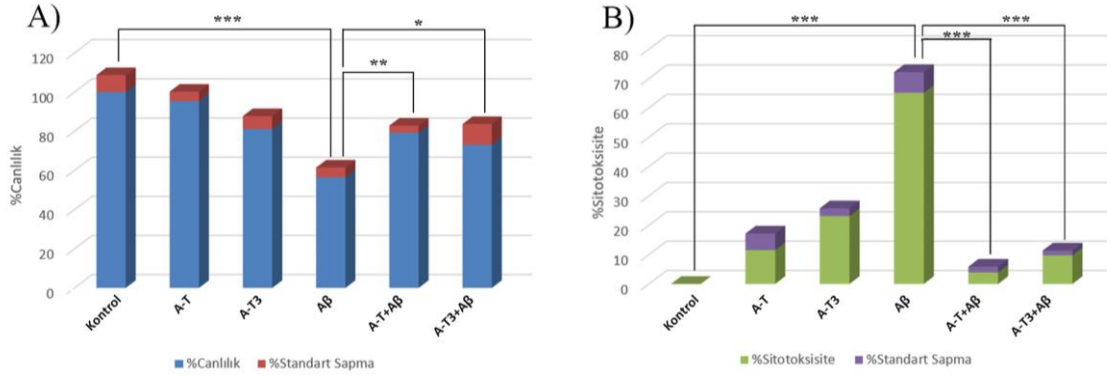


Şekil 4.7. 24 saat boyunca uygulanan; A-T ve A-T3'ün üç farklı dozunun, A $\beta$ 'nin ve çözücü olarak görev yapan DMSO'nun % hücre canlılığı üzerine etkilerinin incelenmesi. E vitamini türevleri ve DMSO hücre canlılığı üzerinde herhangi bir olumsuz etki yaratmamıştır. A $\beta$  uygulaması ile hücre canlılığı istatistiksel olarak anlamlı olarak azalmıştır. (\*\*\*: $P \leq 0.001$ )

#### **4.3.2. 48 Saat Uygulamalarının Hücre Canlılığı ve Sitotoksosite Bakımından Karşılaştırılması**

Bu aşamada A-T ve A-T3'ün 48 saat boyunca yapılan uygulamalarının A $\beta$  kaynaklı nörodejenerasyona karşı oluşturdukları koruyucu etkiler hücre canlılığı ve sitotoksosite bakımından karşılaştırılmıştır.

A $\beta$  uygulamasından sonra hücre canlılığı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşüş göstermiştir. A $\beta$  nöronlar üzerinde sitotoksik etki göstermiş ve sitotoksosite oranı A $\beta$  uygulaması ile %65 olarak gözlemlenmiştir. Bu uygulamada hücre canlılığı ise %56 olarak analiz edilmiştir. 48 saat boyunca A-T ve A-T3 ile muamele edilmiş gruplarda ise istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlemlenmemiştir. A-T uygulanan grupta hücre canlılığı 48 saatin sonunda %95 iken, A-T3 uygulanan grupta ise hücre canlılığı %81'dir. Hem A $\beta$  hem de E vitamini türevi ile muamele edilmiş gruplarda ise hücre canlılığı yalnızca A $\beta$  uygulanan gruba oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış ve %70'in üstüne çıkmıştır. Sitotoksosite oranı ise yalnızca A $\beta$  uygulanan gruba oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış ve %10'un altında gözlemlenmiştir. Hücre canlılığı A-T + A $\beta$  grubunda %79 olarak görülürken, A-T3 + A $\beta$  grubunda %73 olarak görülmüştür. Sitotoksiste ise A-T + A $\beta$  grubunda %4, A-T3 + A $\beta$  grubunda %10'dur. Bu iki grup arasında yüzde hücre canlılığı ve yüzde sitotoksosite değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir (Şekil 4.8.).



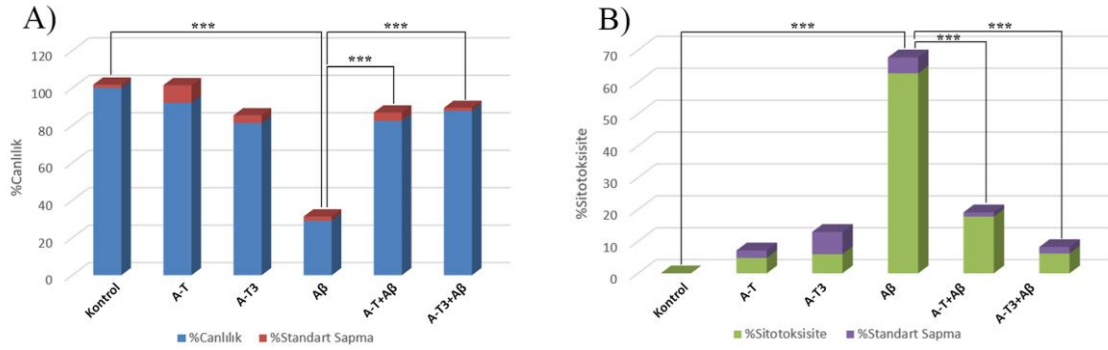
Şekil 4.8. 48 saat uygulamalarının % hücre canlılığı ve % sitotoksosite grafikleri. Aβ uygulaması ile hücre canlılığı anlamlı olarak azalmış sitotoksosite ise anlamlı olarak artmıştır. E vitamini türevleri ve Aβ'nin beraber uygulandığı gruplarda hücre canlılığı Aβ'nin yalnız başına uygulandığı gruba göre anlamlı olarak daha yüksektir. 48 saatlik uygulamada A-T+Aβ grubunda gözlemlenen hücre canlılığı A-T3+Aβ grubundan daha fazla, sitotoksosite ise daha düşüktür. A) % hücre canlılığı grafiği, B) % sitotoksosite grafiği (istatistiksel olarak anlamlı farklılık, \*:P ≤ 0.05, \*\*:P ≤ 0.01 \*\*\*:P ≤ 0.001)

#### 4.3.3. 72 Saat Uygulamalarının Hücre Canlılığı ve Sitotoksosite Bakımından Karşılaştırılması

Bu aşamada A-T ve A-T3'ün 72 saat boyunca yapılan uygulamalarının Aβ kaynaklı nörodejenerasyona karşı oluşturdukları koruyucu etkiler hücre canlılığı ve sitotoksosite bakımından karşılaştırılmıştır.

Yalnızca Aβ uygulaması yapılan grupta sonra hücre canlılığı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşmüş yüzde sitotoksosite değeri ise anlamlı bir şekilde yükselmiştir. Bu grupta hücre canlılığı %29 sitotoksosite değeri ise %62 olarak hesaplanmıştır. 72 saat boyunca A-T ve A-T3 ile muamele edilmiş gruplarda ise hücre canlılığı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlemlenmemiştir. A-T uygulanan grupta hücre canlılığı 72 saatin sonunda %92 iken, A-T3 uygulanan grupta ise hücre canlılığı %81'dir. Hem Aβ hem de E vitamini türevi ile muamele edilmiş gruplarda ise hücre canlılığı yalnızca Aβ uygulanan gruba oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış ve %80'in üstüne çıkmıştır. Sitotoksosite oranı ise yalnızca Aβ uygulanan gruba oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış ve %20'nin altında gözlemlenmiştir. Hücre canlılığı A-T + Aβ grubunda %82 olarak görülürken, A-T3 + Aβ grubunda %88 olarak görülmüştür. Sitotoksiste ise A-T + Aβ grubunda %17, A-T3 + Aβ grubunda %6'dır. Bu

iki grup arasında yüzde hücre canlılığı ve yüzde sitotoksosite değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir (Şekil 4.9.).

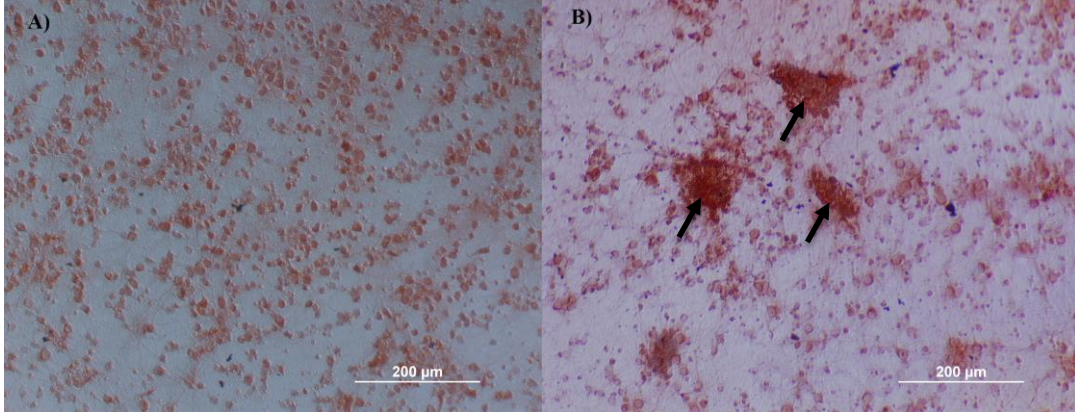


Şekil 4.9. 72 saat uygulamalarının % hücre canlılığı ve % sitotoksosite grafikleri. Aβ uygulaması ile hücre canlılığı anlamlı olarak azalmış sitotoksosite ise anlamlı olarak artmıştır. E vitamini türevleri ve Aβ'nin beraber uygulandığı gruplarda hücre canlılığı Aβ'nin yalnız başına uygulandığı gruba göre anlamlı olarak daha yüksektir. 48 saatlik uygulamada A-T3+Aβ grubunda gözlemlenen hücre canlılığı A-T+Aβ grubundan daha fazla, sitotoksosite ise daha düşüktür. A) % hücre canlılığı grafiği, B) % sitotoksosite grafiği (istatistiksel olarak anlamlı farklılık, \*\*\*:P ≤ 0.001)

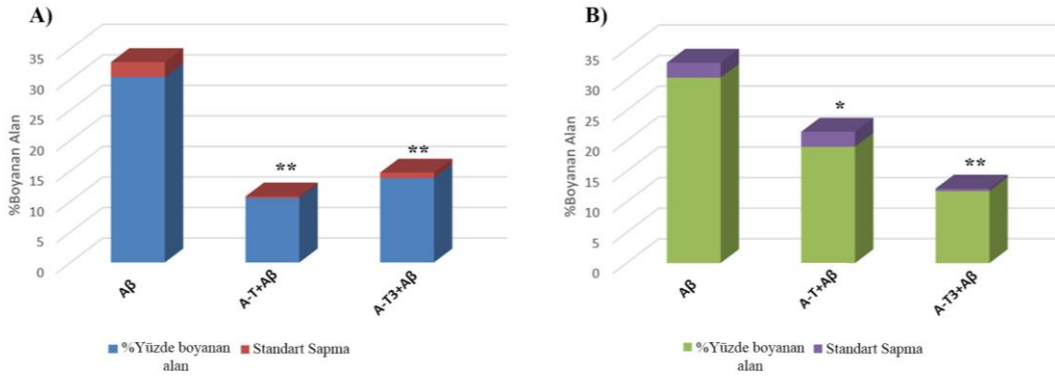
#### 4.4. Beta Amiloid Birikim Miktarlarının Karşılaştırılması

Bu aşamada kontrol, Aβ, 48-72 saat A-T + Aβ ve 48-72 saat A-T3 + Aβ gruplarında Aβ birikiminin gösterilebilmesi için Kongo Kırmızısı boyaması yapılmıştır. Kongo Kırmızısı ile % kırmızı boyanan alan Fiji-ImageJ programı kullanılarak analiz edilmiştir.

2 µm Aβ uygulaması yapıldığı zaman hücreler arası bölgede Aβ plakları birikimi gözlemlenmiştir. Bu birikim Kongo Kırmızısı boyaması ile işaretlenmiştir (Şekil 4.10.). Yalnızca 2 µM Aβ uygulaması yapılan grupta Kongo Kırmızısı ile işaretlenen bölgenin %30'unda Aβ birikimi gözlemlenirken bu birikim A-T ve A-T3'ün 48 ve 72 saatlik uygulamaları ile istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş göstermiştir. Aβ birikim miktarı A-T'ün 48 saatlik uygulamasında %10, A-T3 uygulamasında ise %14 olarak analiz edilmiştir. 72 saat uygulamasında ise Aβ birikim miktarı A-T grubunda %19, A-T3 grubunda ise %12 olarak gözlemlenmiştir. Hem 48 hem de 72 saatlik uygulamalarda A-T ve A-T3 grupları arasında yüzde Aβ miktarı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. (Şekil 4.11.).



Şekil 4.10. Kongo Kırmızısı boyaması ile A $\beta$  birikiminin gösterilmesi. Kontrol grubunda Kongo Kırmızısı boyaması ile işaretlenen herhangi bir agregata rastlanmamıştır. A $\beta$  grubunda ise hücreler arası bölgede birikim gösteren A $\beta$  işaretlenmiştir. A) Kontrol grubu, B) A $\beta$  grubu, Ok (↑) işareti ile A $\beta$  birikimi gösterilmiştir. Çekirdek Boyaması: Hematoksilen, Büyütme: X10



Şekil 4.11. Kongo Kırmızısı boyaması ile A $\beta$ , A-T + A $\beta$  ve A-T3 + A $\beta$  gruplarında A $\beta$  birikim miktarlarının karşılaştırılması. A $\beta$  grubunda çekilen fotoğraflarda toplam alanın %25'ten fazlası Kongo Kırmızısı ile işaretlenmiştir. A-T+A $\beta$  ve A-T3+A $\beta$  gruplarında ise % boyanan alan %15'in altındadır. A) 48 saat gruplarında A $\beta$  birikim miktarlarının karşılaştırılması, B) 72 saat gruplarında A $\beta$  birikim miktarlarının karşılaştırılması (istatistiksel olarak anlamlı farklılık, \*:P  $\leq$  0.05, \*\*:P  $\leq$  0.01)



#### 4.5. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizi ile Voltaj Kapılı L-tip Kalsiyum Kanalı ve Beta sekretaz 1 İfadelerinin Karşılaştırılması

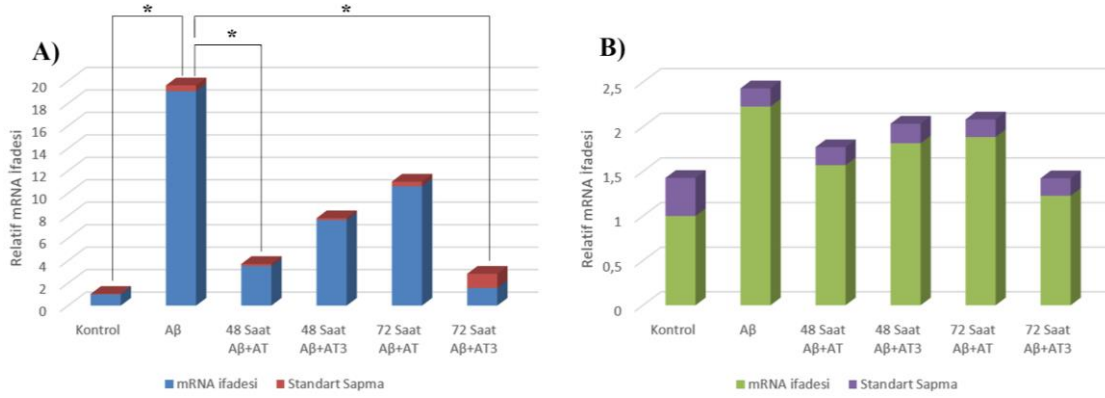
Kültür kaplarından kurulan gruplardan elde edilen toplam RNA miktarlarının Nanodrop ölçümü ile elde edilen konsantrasyonları Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Kontrol hücrelerinin, A $\beta$  uygulaması yapılan hücrelerin ve 48 ve 72 saat boyunca A-T + A $\beta$  veya A-T3 + A $\beta$  uygulaması yapılan hücrelerin RNA miktarlarının Nanodrop ölçüm sonuçları

Örnek	Toplam RNA miktarı (ng/ $\mu$ l)
Kontrol	211.83
A $\beta$	549.04
48 saat A-T + A $\beta$	178.65
48 saat A-T3 + A $\beta$	264.94
72 saat A-T + A $\beta$	259.59
72 saat A-T3 + A $\beta$	232.31

RT-PCR sonuçları delta delta Ct methodu ile analiz edilmiş olup GAPDH iç-düzen geni ile normalize edilmiştir. Normalizasyon işleminden sonra CACNA1C ve BACE1 genlerinin ifade miktarları hesaplanmıştır. Gen ifadeleri miktarları incelendiğinde A $\beta$  ile 24 saat boyunca muamele edildiği zaman nöronlarda CACNA1C ifadesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir. 48 ve 72 saat boyunca A-T veya A-T3 uygulamasından sonra 24 saat boyunca A $\beta$  uygulaması yapılan gruplar ile yalnızca A $\beta$  uygulaması yapılan grup arasında CACNA1C genin ifade düzeyi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşmuştur. Buna karşın A-T + A $\beta$  ve A-T3 + A $\beta$  grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ortaya çıkmamıştır. 48 saat uygulamasında A $\beta$  ve AT + A $\beta$  grupları arasında CACNA1C ifadesi bakımından anlamlı bir fark vardır. 72 saat uygulamasında ise anlamlı fark A $\beta$  ve AT3 + A $\beta$  grupları arasında gözlemlenmiştir. A $\beta$  uygulamasından sonra BACE1 miktarında artış gözlemlense bile bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu artış A $\beta$  uygulaması öncesinde A-T veya A-T3 uygulaması

yapılan gruplarda yalnızca A $\beta$  uygulaması yapılan gruba oranla düşüş göstermiştir (Şekil 4.12.).



Şekil 4.12. Kontrol, A $\beta$ , 48-72 saat A $\beta$  + A-T, 48-72 saat A $\beta$  + A-T3 gruplarında GAPDH'a göre relatif CACNA1C ve BACE1 ifadeleri. A $\beta$  uygulaması ile CACNA1C ifadesi ve BACE1 ifadesi artmıştır. E vitamini türevleri ve A $\beta$ 'nin birlikte uygulandığı gruplarda ise CACNA1C ve BACE1 genlerinin ifade miktarı yalnızca A $\beta$  uygulanan gruba göre daha düşüktür. A) Gruplara göre CACNA1C'nin relatif ifadesi B) Gruplara göre BACE1'in relatif ifadesi (istatistiksel olarak anlamlı farklılık, \*:P  $\leq$  0.05)

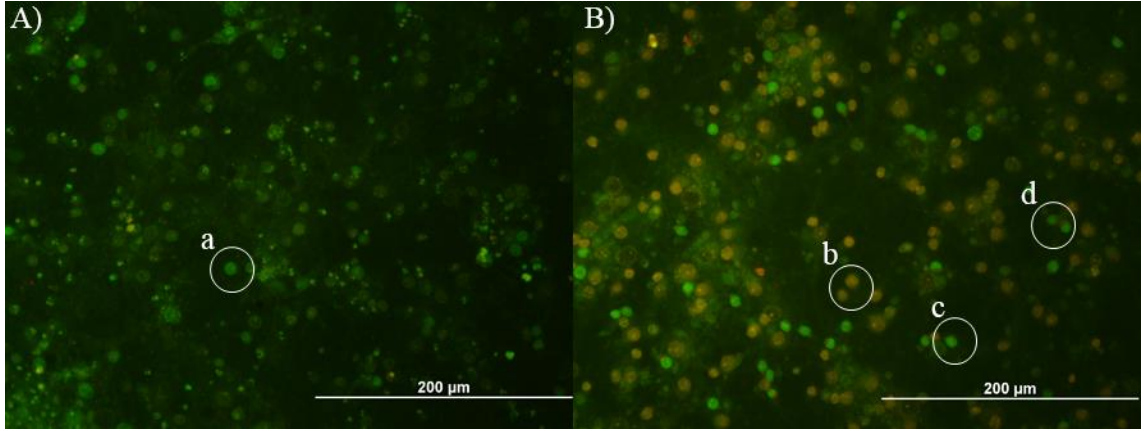
#### 4.6. Apoptoz ve Nekroz Yüzdelerinin İncelenmesi

Bu aşamada nöronlar üzerinde uygulama yapıldıktan sonra nöronlar AO/PI ile boyanmış ve Fiji-ImageJ programı kullanılarak % apoptoz ve % nekroz miktarları hesaplanmıştır. Apoptoz ve nekroz miktarı hücrelerin turuncu ve yeşil renge boyanma miktarları göz önünde bulundurularak hesaplanmıştır (Şekil 4.13.).

Apoptoz ve nekroz yüzdeleri incelendiğinde kontrol grubunda nöronlarda geç apoptoz ve nekroz gözlenmediği yalnızca çok düşük bir yüzdede erken apoptoz gözlendiği veya hiç apoptoz gözlemlenmediği ortaya çıkmıştır. A $\beta$  uygulaması yapılan grupta ise bu yüzdelerde bir artış ortaya çıkmıştır. Yapılan analiz sonucu A $\beta$  uygulamasından sonra toplam hücre sayısının %63'ü nekrotik hücre, %31'i ise apoptotik hücre olarak gözlemlenmiştir (Çizelge 4.2.).

48 saat boyunca uygulama yapılan gruplar için A-T ve A $\beta$ 'nin birlikte uygulandığı zaman apoptoz ve nekroz gösteren hücre sayısı %29 ve %4 olarak hesaplanmıştır. A-T + A $\beta$  grubunda apoptoz miktarı %17 iken nekroz miktarı %23'tür. 72 saat boyunca uygulama

yapılan gruplarda ise A-T + A $\beta$  grubunda %17 apoptotik hücre ve %19 nekrotik hücre gözlemlenirken, A-T3 + A $\beta$  grubunda ise apoptotik hücre yüzdesi değişmemiş ve nekrotik hücre yüzdesi ise %10 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.2.).



Şekil 4.13. AO/PI boyaması ile Kontrol ve A $\beta$  gruplarında apoptoz ve nekrozun incelenmesi. Tamamı yeşil olarak boyanmış hücreler canlı hücre (a çemberi), hücre çekirdeği ve sitoplazması turuncu olarak boyanmış hücreler nekrotik hücre (b çemberi), çekirdeği yeşil boyanmış ve sitoplazmasında turuncu işaretler bulunan hücreler ise apoptotik hücre (c ve d çemberleri) olarak kabul edilmiştir. Apoptotik hücrelerin sitoplazmasındaki tucunu miktarına göre bu hücrelerin erken veya geç apoptozda olduğu belirlenmiştir. A: Kontrol grubu, B: A $\beta$  uygulaması grubu, Büyütme: X20

Çizelge 4.2. 48 ve 72. saat uygulamalarında AO/PI boyaması ile hesaplanan % apoptoz ve % nekroz oranları

Grup		48 saat	72 saat
Kontrol	%apoptoz	14.15	14.15
	%nekroz	0	0
A $\beta$	%apoptoz	30.77	30.77
	%nekroz	63.46	63.46
A-T + A $\beta$	%apoptoz	28.70	17.43
	%nekroz	3.70	19.27
A-T3 + A $\beta$	%apoptoz	16.43	17.50
	%nekroz	22.86	10.83

## 5. TARTIŞMA

E vitamininin temel rolü antioksidan etkisidir. E vitamini bu özelliğini hidrojen atomunun transferi yoluyla serbest radikalleri temizleyerek sağlamaktadır. Antioksidan özelliğinin yanı sıra E vitamini beyin için de esansiyel olma özelliği taşımaktadır. Yapılan çalışmalarda E vitamini eksikliği sonucu beyinde antioksidan korumasının kaybedildiği, nöronlarda dejenerasyon gözlemlendiği ve merkezi sinir sistemi regülasyonunu sağlayan mekanizmalarda aksaklıkların ortaya çıktığı gözlemlenmiştir [16, 54]. E vitamini, A $\beta$  kaynaklı nörodejenerasyona karşı tedavi edici veya koruyucu etkiler ortaya koymaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalar E vitamininin nöronlar üzerindeki oksidatif stresi azalttığını göstermiştir [75]. Buna karşılık, literatürde E vitaminin A-T ve A-T3 formlarının nörodejenerasyona karşı koruyucu özelliklerinin *in vitro* olarak karşılaştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu kapsamda tez çalışmasında E vitamininin A-T ve A-T3 formlarının A $\beta$  kaynaklı nörodejenerasyona karşı gösterdiği koruyucu etkiler incelenmiş ve karşılaştırılmıştır. Çalışma doğrultusunda 17-18 günlük sıçan yavrularından primer nöron izolasyonu yapılmış ve oluşturulan primer nöron kültürleri üzerinde A $\beta$  uygulaması aracılığıyla nörodejenerasyon modeli kurulmuştur. Daha sonra kurulan bu model üzerinde A-T ve A-T3 denenerek bu maddelerin koruyucu özellikleri; hücre canlılığı, sitotoksosite, A $\beta$  birikim miktarı, BACE1 ile CACNA1C genlerinin ifadesi ve apoptoz-nekroz gösteren hücre miktarı bakımından incelenmiştir.

Yatin ve ark. [61] yaptıkları çalışmada E vitamininin nöronları A $\beta$  kaynaklı oksidatif strese karşı koruduğunu göstermiştir. A $\beta$  birikimine bağlı ortaya çıkan serbest radikaller nöronal ROS'u arttırmaktadır. E vitamini radikal toplayıcı görevi görerek ROS formasyonunu engellemekte ve A $\beta$  plaklarının oluşumunu önlemektedir. Sonuç olarak A $\beta$  kaynaklı nörotoksositeye engel olmaktadır [61]. Yapılan bir başka çalışmada ise E vitamininin A $\beta$ 'nin hücreler arası bölgede birikerek plak oluşturmasını ve A $\beta$  kaynaklı anormalliklerin ortaya çıkmasını önlediğini ortaya koymaktadır [76]. E vitamininin nöronlara karşı gösterdiği koruyucu etkilerin yanı sıra fazla konsantrasyonlarda kullanımının ise hücre canlılığında azalmaya ve sitotoksosite artışına neden olabileceği ortaya koyulmuştur. 200  $\mu$ M ve üstü miktarda E vitamini uygulaması yapıldığı zaman nöronlarda hücre canlılığı %40'a düşmüş sitotoksosite ise %20'nin üstüne çıkmıştır [77]. Tez çalışmasında ise A-T ve A-T3'ün denenen hiçbir konsantrasyonun hücre canlılığını düşürmediği ortaya konulmuştur. Ayrıca yapılan önceki çalışmalara paralel olarak, E vitaminin A-T ve A-T3 türevlerinin uygulanması nöronlar üzerinde oluşan A $\beta$  kaynaklı

sitotoksisteyi, nöronlarda gözlemlenen %nekroz miktarını ve hücreler arası bölgede biriken A $\beta$  miktarını azaltmıştır. Çalışma kapsamında A-T ve A-T3 nöronlar üzerindeki koruyucu etkisini oksidatif stresi azaltarak gösteriyor olabileceği gibi A $\beta$  birikim miktarını da azaltarak ve A $\beta$  kaynaklı nekroz ile geç apoptozu engelleyerek de gösterebileceği gözlemlenmiştir.

Nördejenerasyonun Kalsiyum Hipotezi'ne göre normal olarak nöron işleyişini düzenleyen hücre içi kalsiyum mekanizmasında oluşan bozukluklar nöronlarda bozulmaların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Bu durum nörodejenerasyonun ortaya çıkışında etkili bir yolaktır. Yapılan çalışmalar A $\beta$  birikiminin kalsiyum sinyal yolağını bozabileceğini ve hücre içerisindeki kalsiyum dengesini etkileyebileceğini ortaya koymaktadır [78]. Çalışma kapsamında yapılan RT-PCR analizi ile 24 saat boyunca A $\beta$  ile muamele edilen nöronlarda CACNA1C ifadesinde yüksek bir artış gözlemlenmiştir. Önceki çalışmalar kalsiyum kanallarının *in vitro* olarak APP ile etkileşime girdiğini göstermiştir. Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, APP'nin ortadan kaldırılması kalsiyum kanallarının artmasını ve hipokampus üzerinde yoğun bir kalsiyum akışının ortaya çıkmasına sebep olmuştur [74]. Bizim çalışmamızda ise A $\beta$  uygulaması ile CACNA1C ifadesinde gözlemlenen artış A-T ve A-T3 uygulaması ile düşmüştür. Bu durum E vitamininin antioksidan etkilerinin dışında nöronların kalsiyum mekanizması üzerinde de etkili olabileceğini ortaya koymuştur.

BACE1, APP metabolizması üzerinde etkili olan bir genidir. Bu genin ifadesinin artması ile APP bölünmesi ile ortaya çıkan fragman miktarı artar ve A $\beta$  plaklarının oluşumu gözlemlenir [73]. Yapılan çalışmalar E vitamininin kolesterol miktarını azalttığını göstermiştir. Kolesterol miktarının azalması ile BACE1 ifadesinde düşüş gözlemlenmiştir [79]. Buna karşın yapılan RT-PCR analizi de A $\beta$  uygulaması ile BACE1 ifadesinde gözlemlenen artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. BACE1 ifadesinin artışı A $\beta$  plaklarının miktarının artmasına sebep olmaktadır. Yapılan çalışma kapsamında oluşturulan primer nöron kültürüne sonradan eklenen A $\beta$ , BACE1 ifadesinde bir artışa neden olmuştur. Bu artış ise A-T ve A-T3 uygulamaları ile bir düşüş göstermiştir. Buna karşın E vitamininin ve türevlerinin BACE1 mekanizması üzerindeki etkisinin daha iyi anlaşılabilmesi için daha fazla çalışma gerekmektedir.

E vitamini dört tokoferol ve dört tokotrienol olmak üzere sekiz farklı analogtan oluşmaktadır. Tokoferoller, genellikle dikotil bitkilerin yapraklarında ve tohumlarında bol miktarda bulunurken, tokotrienoller, monokotillerin tohumlarında zengindir bir şekilde gözlemlenmektedir [48]. Yapılan çalışmalar A-T uygulamasının A $\beta$  birikim miktarını azaltabileceğini göstermiştir. E vitaminin temel formu olan A-T artan oksidatif strese karşı etki göstererek ve ROS miktarını azaltarak A $\beta$  kaynaklı nörodejenerasyona karşı nöronları korumaktadır [61, 80]. Bunun dışında yapılan başka çalışmalar ise A-T3'ün A-T'ye oranla nörodejenerasyona karşı daha etkili olabileceğini ortaya koymaktadır [53]. Khanna ve ark. [81] yaptıkları çalışmada A-T3'ün nanomolar konsantrasyonlarında A-T'ye göre daha çok nöro-koruyucu etki ortaya koyduğunu belirtmiştir. Ayrıca yapılan bir başka çalışmada palm yağından izole edilen tokotrienol açısından zengin fraksiyonun A $\beta$  oligomerizasyonunu azalttığını ve A $\beta$  kaynaklı nörodejenerasyona karşı alternatif bir tedavi yöntemi olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur [82]. Yaptığımız bu çalışmada ise A-T ve A-T3 ile muamele edilmiş nöronlarda farklı zaman periyotlarında farklı miktarlarda koruyucu etkiye rastlanmıştır. 48 saat uygulamasında A-T nöronlar üzerinde A-T3'ten daha fazla koruyucu etki koymaktadır. Bu zaman periyodunda 24 saatlik A $\beta$  uygulamasından önce A-T ile muamele edilen nöronlar, A-T3 ile muamele edilen nöronlara oranla daha yüksek hücre canlılığı ve daha düşük sitotoksisite göstermiştir. Ayrıca A-T grubunda gözlemlenen A $\beta$  birikim miktarı A-T3 grubundakinden daha düşüktür. Bu sonuçlar ile paralel bir şekilde CACNA1C ve BACE1 genlerinin ifadesi de A-T3'e oranla A-T grubunda daha fazla azaldığı gözlemlenmiştir. 72 saat uygulamasında ise A-T3; A $\beta$  kaynaklı nörodejenerasyona karşı koruyucu etki bakımında 48 saat uygulamasına göre artış göstermiştir. Buna karşın A-T'nin koruyucu özelliğinde hücre canlılığı ve sitotoksisite bakımından herhangi bir artış gözlemlenmemiştir. Bu zaman periyodunda 24 saatlik A $\beta$  uygulamasından A-T3 ile muamele edilen nöronların sitotoksiste ve hücreler arası bölgesinde biriken A $\beta$  miktarı A-T grubuna oranla daha düşüktür. Ayrıca CACANA1C ve BACE1 ifadesinin miktarları da A-T grubunun 72 saat uygulamasından daha düşük olarak gözlemlenmiştir. Buna karşın A-T ve A-T3'ün koruyuculukları arasındaki ortaya çıkan farklar istatistiksel olarak anlamlı değildir ve iki formun arasındaki farkların daha iyi anlaşılabilmesi için gelecekte daha detaylı çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Sonuç olarak E vitaminin A-T ve A-T3 formları uygulandıkları dozda, A $\beta$  kaynaklı nörodejenerasyona karşı koruyucu etki göstermektedir. Yaptığımız çalışma, bu iki

formun A $\beta$  uygulaması sonucu ortaya çıkan nekroz, geç apoptoz, sitotoksisite miktarlarını düşürerek ve A $\beta$  plak oluşumunu engelleyerek nöronlar üzerinde koruyucu etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bunun yanı sıra A-T ve A-T3, A $\beta$  kaynaklı CACNA1C geni ifadesindeki artışı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltarak nöronlardaki kalsiyum mekanizması üzerinde etkili olmaktadır. A $\beta$  kaynaklı BACE1 geni ifadesinde bir artış gözlemlenmektedir. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. Buna karşın, A-T ve A-T3 uygulamalarından sonra BACE1 geni ifadesi A $\beta$  grubuna göre azalma göstermektedir. Ayrıca, 72 saat uygulamasında A-T'nin gösterdiği koruyucu etki sabit kalırken A-T3'ün gösterdiği koruyucu etki artış göstermektedir. İki formun ortaya koyduğu nöro-koruyucu etki arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanmamaktadır. Daha uzun periyotlardaki uygulamalarda A-T3, A-T'ye göre daha fazla koruyucu etki gösterebilir ve A $\beta$  kaynaklı nörodejenerasyona karşı alternatif bir koruyucu ajan olarak kullanılabilir. Ayrıca yapılmış olan çalışma kapsamında A-T ve A-T3'ün belirlenen dozları dışındaki konsantrasyonları denenmemiştir. Farklı konsantrasyonlarda A-T ve A-T3'ün A $\beta$  kaynaklı nörodejenerasyona karşı koruyucu etkinlikleri değişiklik gösterebilir. A-T ve A-T3'ün farklı dozlarının ve daha uzun zaman periyotlarındaki uygulamalarının nörodejenerasyona karşı gösterdiği etki ile E vitamininin BACE1 mekanizması üzerindeki etkisinin daha detaylı araştırılabilmesi için gelecekte yeni çalışmaların ortaya konulması gerekmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] G.H. Parker, *The Elementary Nervous System*, J. B. Lippincott Company, London, 1919.
- [2] D. Purves, G.J. Augustine, D. Fitzpatrick, W.C. Hall, A.-S. Lamantia, J.O. Mcnamara, S.M. Williams, *Neuroscience*, 3 ed., Sinauer Associates, Massachusetts, 2004.
- [3] D. Sadava, D.M. Hillis, H.C. Heller, M.R. Berenbaum, *Yaşam Biyoloji Bilimi*, 9 ed., Palme Yayıncılık, Ankara, 2014.
- [4] M.T. Akay, *Genel Histoloji*, 9 ed., Palme Yayıncılık, Ankara, 2014.
- [5] G.J. Tortora, B. Derrickson, *Principles of Anatomy & Physiology*, 15 ed., John Wiley & Sons, Inc., United States of America, 2017.
- [6] C. Haass, D.J. Selkoe, Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8 (2007) 101-112.
- [7] A. Katsnelson, B. De Strooper, H.Y. Zoghbi, Neurodegeneration: From cellular concepts to clinical applications, *Sci Transl Med*, 8 (2016) 364ps318.
- [8] A. Schapira, Z. Wszolek, T.M. Dawson, N. Wood, *Neurodegeneration*, 1 ed., John Wiley & Sons Ltd 2017.
- [9] S. Przedborski, M. Vila, V. Jackson-Lewis, Neurodegeneration: what is it and where are we?, *J Clin Invest*, 111 (2003) 3-10.
- [10] V. Rudajev, J. Novotny, The Role of Lipid Environment in Ganglioside GM1-Induced Amyloid  $\beta$  Aggregation, *Membranes (Basel)*, 10 (2020).
- [11] C.J. Pike, D. Burdick, A.J. Walencewicz, C.G. Glabe, C.W. Cotman, Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state, *J Neurosci*, 13 (1993) 1676-1687.
- [12] A. Gupta, R. Goyal, Amyloid beta plaque: a culprit for neurodegeneration, *Acta Neurol Belg*, 116 (2016) 445-450.
- [13] H.M. Evans, K.S. Bishop, On The Existence Of A Hitherto Unrecognized Dietary Factor Essential For Reproduction, *Science*, 56 (1922) 650-651.
- [14] H.M. Evans, O.H. Emerson, G.A. Emerson, The Isolation From Wheat Germ Oil Of An Alcohol, A-Tocopherol, Having The Properties Of Vitamin E, *The Journal of Biological Chemistry*, 113 (1936) 319-332.
- [15] K.H. Chang, M.L. Cheng, M.C. Chiang, C.M. Chen, Lipophilic antioxidants in neurodegenerative diseases, *Clin Chim Acta*, 485 (2018) 79-87.
- [16] L.M. Ulatowski, D. Manor, Vitamin E and neurodegeneration, *Neurobiol Dis*, 84 (2015) 78-83.
- [17] M.W. Dysken, M. Sano, S. Asthana, J.E. Vertrees, M. Pallaki, M. Llorente, S. Love, G.D. Schellenberg, J.R. McCarten, J. Malphurs, S. Prieto, P. Chen, D.J. Loreck, G. Trapp, R.S. Bakshi, J.E. Mintzer, J.L. Heidebrink, A. Vidal-Cardona, L.M. Arroyo, A.R. Cruz, S. Zachariah, N.W. Kowall, M.P. Chopra, S. Craft, S. Thielke, C.L. Turvey, C. Woodman, K.A. Monnell, K. Gordon, J. Tomaska, Y. Segal, P.N. Peduzzi, P.D. Guarino, Effect of vitamin E and memantine on functional decline in Alzheimer disease: the TEAM-AD VA cooperative randomized trial, *Jama*, 311 (2014) 33-44.
- [18] J.B. Reece, L.A. Urry, M.L. Cain, S.A. Wasserman, P.V. Minorsky, R.B. Jackson, *Campbell Biyoloji*, 9 ed., Palme Yayıncılık, Ankara, 2013.
- [19] E.R. Kandel, J.H. Schwartz, T.M. Jessell, *Principles of Neural Science*, 4 ed., McGraw-Hill Medical, New York, 2000.



- [20] F.F. Evans-Martin, *The Nervous System*, 1 ed., Infobase Publishing, New York, 2005.
- [21] J.H. Hoeijmakers, DNA damage, aging, and cancer, *N Engl J Med*, 361 (2009) 1475-1485.
- [22] D.L. Nelson, M.M. Cox, *Lehninger Biyokimyanin İlkeleri*, 5 ed., Palme Yayıncılık, Ankara, 2013.
- [23] H.W. Querfurth, F.M. LaFerla, Alzheimer's disease, *N Engl J Med*, 362 (2010) 329-344.
- [24] P.R. Turner, K. O'Connor, W.P. Tate, W.C. Abraham, Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory, *Prog Neurobiol*, 70 (2003) 1-32.
- [25] N.M. Hooper, Roles of proteolysis and lipid rafts in the processing of the amyloid precursor protein and prion protein, *Biochem Soc Trans*, 33 (2005) 335-338.
- [26] G.F. Chen, T.H. Xu, Y. Yan, Y.R. Zhou, Y. Jiang, K. Melcher, H.E. Xu, Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development, *Acta Pharmacol Sin*, 38 (2017) 1205-1235.
- [27] T.P. Knowles, C.A. Waudby, G.L. Devlin, S.I. Cohen, A. Aguzzi, M. Vendruscolo, E.M. Terentjev, M.E. Welland, C.M. Dobson, An analytical solution to the kinetics of breakable filament assembly, *Science*, 326 (2009) 1533-1537.
- [28] S. Giorgetti, C. Greco, P. Tortora, F.A. Aprile, Targeting Amyloid Aggregation: An Overview of Strategies and Mechanisms, *Int J Mol Sci*, 19 (2018).
- [29] P.T. Wong, J.A. Schauerte, K.C. Wisser, H. Ding, E.L. Lee, D.G. Steel, A. Gafni, Amyloid-beta membrane binding and permeabilization are distinct processes influenced separately by membrane charge and fluidity, *J Mol Biol*, 386 (2009) 81-96.
- [30] A. Demuro, E. Mina, R. Kaye, S.C. Milton, I. Parker, C.G. Glabe, Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers, *J Biol Chem*, 280 (2005) 17294-17300.
- [31] F.G. De Felice, P.T. Velasco, M.P. Lambert, K. Viola, S.J. Fernandez, S.T. Ferreira, W.L. Klein, Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine, *J Biol Chem*, 282 (2007) 11590-11601.
- [32] A. Deshpande, H. Kawai, R. Metherate, C.G. Glabe, J. Busciglio, A role for synaptic zinc in activity-dependent Abeta oligomer formation and accumulation at excitatory synapses, *J Neurosci*, 29 (2009) 4004-4015.
- [33] S. Li, S. Hong, N.E. Shepardson, D.M. Walsh, G.M. Shankar, D. Selkoe, Soluble oligomers of amyloid Beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake, *Neuron*, 62 (2009) 788-801.
- [34] N. Arispe, J.C. Diaz, O. Simakova, Abeta ion channels. Prospects for treating Alzheimer's disease with Abeta channel blockers, *Biochim Biophys Acta*, 1768 (2007) 1952-1965.
- [35] A. Kisaoglu, B. Borekci, O.E. Yapca, H. Bilen, H. Suleyman, Tissue damage and oxidant/antioxidant balance, *Eurasian J Med*, 45 (2013) 47-49.
- [36] Y. Gilgun-Sherki, E. Melamed, D. Offen, Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier, *Neuropharmacology*, 40 (2001) 959-975.
- [37] C. Opazo, X. Huang, R.A. Cherny, R.D. Moir, A.E. Roher, A.R. White, R. Cappai, C.L. Masters, R.E. Tanzi, N.C. Inestrosa, A.I. Bush, Metalloenzyme-like activity of Alzheimer's disease beta-amyloid. Cu-dependent catalytic conversion

- of dopamine, cholesterol, and biological reducing agents to neurotoxic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *J Biol Chem*, 277 (2002) 40302-40308.
- [38] B. Uttara, A.V. Singh, P. Zamboni, R.T. Mahajan, Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options, *Curr Neuropharmacol*, 7 (2009) 65-74.
- [39] M.J. Moreno, J. Romero, Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: phenotypic variability, *Neurologia*, 17 (2002) 366-377.
- [40] A.V. Maltsev, S. Bystryak, O.V. Galzitskaya, The role of beta-amyloid peptide in neurodegenerative diseases, *Ageing Res Rev*, 10 (2011) 440-452.
- [41] D.H. Smith, X.H. Chen, A. Iwata, D.I. Graham, Amyloid beta accumulation in axons after traumatic brain injury in humans, *J Neurosurg*, 98 (2003) 1072-1077.
- [42] N. Leung, S.H. Nasr, S. Sethi, How I treat amyloidosis: the importance of accurate diagnosis and amyloid typing, *Blood*, 120 (2012) 3206-3213.
- [43] B. Kluge-Beckerman, J.J. Liepnieks, L. Wang, M.D. Benson, A cell culture system for the study of amyloid pathogenesis. Amyloid formation by peritoneal macrophages cultured with recombinant serum amyloid A, *Am J Pathol*, 155 (1999) 123-133.
- [44] M. Pacifici, F. Peruzzi, Isolation and culture of rat embryonic neural cells: a quick protocol, *J Vis Exp*, (2012) e3965.
- [45] E. Dursun, D. Gezen-Ak, S. Yilmazer, A novel perspective for Alzheimer's disease: vitamin D receptor suppression by amyloid-beta and preventing the amyloid-beta induced alterations by vitamin D in cortical neurons, *J Alzheimers Dis*, 23 (2011) 207-219.
- [46] T. Loffler, S. Flunkert, N. Taub, E.L. Schofield, M.A. Ward, M. Windisch, B. Hutter-Paier, Stable mutated tau441 transfected SH-SY5Y cells as screening tool for Alzheimer's disease drug candidates, *J Mol Neurosci*, 47 (2012) 192-203.
- [47] L. Packer, M.G. Traber, K. Kraemer, B. Frei, *Antioxidant Vitamins C and E*, AOCs Press, Illinois, 2002.
- [48] M.G. Traber, *Handbook of Vitamins*. Chapter 4: Vitamin E, 4 ed., CRC Press, Florida, 2007.
- [49] G.R. Buettner, The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate, *Arch Biochem Biophys*, 300 (1993) 535-543.
- [50] M.G. Traber, J. Atkinson, Vitamin E, antioxidant and nothing more, *Free Radic Biol Med*, 43 (2007) 4-15.
- [51] C. Behl, J. Davis, G.M. Cole, D. Schubert, Vitamin E protects nerve cells from amyloid beta protein toxicity, *Biochem Biophys Res Commun*, 186 (1992) 944-950.
- [52] A. Altiner, H. Atalay, T. Bilal, Bir antioksidan olarak E vitamini, *BSBD*, 6 (2017) 149-157.
- [53] C.K. Sen, S. Khanna, S. Roy, Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols, *Life Sci*, 78 (2006) 2088-2098.
- [54] F. Galli, A. Azzi, M. Birringer, J.M. Cook-Mills, M. Eggersdorfer, J. Frank, G. Cruciani, S. Lorkowski, N.K. Ozer, Vitamin E: Emerging aspects and new directions, *Free Radic Biol Med*, 102 (2017) 16-36.
- [55] L.R. McDowell, S.N. Williams, N. Hidiroglou, C.A. Njeru, G.M. Hill, L. Ochoa, N.S. Wilkinson, Vitamin E supplementation for the ruminant, *Animal Feed Science and Technology*, 60 (1996) 273-296.
- [56] R.S. Wong, A.K. Radhakrishnan, Tocotrienol research: past into present, *Nutr Rev*, 70 (2012) 483-490.

- [57] P. Meganathan, J.Y. Fu, Biological Properties of Tocotrienols: Evidence in Human Studies, *Int J Mol Sci*, 17 (2016).
- [58] J.M. Zingg, Vitamin E: an overview of major research directions, *Mol Aspects Med*, 28 (2007) 400-422.
- [59] A. Kamal-Eldin, L.A. Appelqvist, The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols, *Lipids*, 31 (1996) 671-701.
- [60] F.U.R. Bhatti, S.J. Kim, A.K. Yi, K.A. Hasty, H. Cho, Cytoprotective role of vitamin E in porcine adipose-tissue-derived mesenchymal stem cells against hydrogen-peroxide-induced oxidative stress, *Cell Tissue Res*, 374 (2018) 111-120.
- [61] S.M. Yatin, S. Varadarajan, D.A. Butterfield, Vitamin E Prevents Alzheimer's Amyloid beta-Peptide (1-42)-Induced Neuronal Protein Oxidation and Reactive Oxygen Species Production, *J Alzheimers Dis*, 2 (2000) 123-131.
- [62] M.O. Grimm, C.P. Stahlmann, J. Mett, V.J. Hauptenthal, V.C. Zimmer, J. Lehmann, B. Hundsdorfer, K. Endres, H.S. Grimm, T. Hartmann, Vitamin E: Curse or Benefit in Alzheimer's Disease? A Systematic Investigation of the Impact of alpha-, gamma- and delta-Tocopherol on Ass Generation and Degradation in Neuroblastoma Cells, *J Nutr Health Aging*, 19 (2015) 646-656.
- [63] A. Gugliandolo, L. Chiricosta, S. Silvestro, P. Bramanti, E. Mazzone, alpha-Tocopherol Modulates Non-Amyloidogenic Pathway and Autophagy in an In Vitro Model of Alzheimer's Disease: A Transcriptional Study, *Brain Sci*, 9 (2019).
- [64] J. Gordon, S. Amini, M.K. White, General overview of neuronal cell culture, *Methods Mol Biol*, 1078 (2013) 1-8.
- [65] G. Giordano, L.G. Costa, Primary neurons in culture and neuronal cell lines for in vitro neurotoxicological studies, *Methods Mol Biol*, 758 (2011) 13-27.
- [66] M. Stefani, Chapter 7: The Oligomer Species: Mechanistics and Biochemistry, in: D.E. Otzen (Ed.) *Amyloid Fibrils and Prefibrillar Aggregates*, Wiley-VCH, Weinheim, 2013.
- [67] R. Mayeux, Y. Stern, Epidemiology of Alzheimer disease, *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2 (2012).
- [68] A.B. Durukan, E. Akbay, A. Ünlü, A. Özdemir, M.A.O. Onur, The cytotoxic properties and apoptotic potential of N-butyl and 2-octyl cyanoacrylates used in surgical treatment of chronic venous insufficiency, *Turk Gogus Kalp Damar Cerrahisi Derg*, 27 (2019) 185-191.
- [69] G. Repetto, A. del Peso, J.L. Zurita, Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity, *Nat Protoc*, 3 (2008) 1125-1131.
- [70] W.E. Klunk, R.F. Jacob, R.P. Mason, Quantifying amyloid beta-peptide (A $\beta$ ) aggregation using the Congo red-A $\beta$  (CR-A $\beta$ ) spectrophotometric assay, *Anal Biochem*, 266 (1999) 66-76.
- [71] S.I. Abdel Wahab, A.B. Abdul, A.S. Alzubairi, M. Mohamed Elhassan, S. Mohan, In vitro ultramorphological assessment of apoptosis induced by zerumbone on (HeLa), *J Biomed Biotechnol*, 2009 (2009) 769568.
- [72] G. Ciapetti, D. Granchi, L. Savarino, E. Cenni, E. Magrini, N. Baldini, A. Giunti, In vitro testing of the potential for orthopedic bone cements to cause apoptosis of osteoblast-like cells, *Biomaterials*, 23 (2002) 617-627.
- [73] B. Das, R. Yan, Role of BACE1 in Alzheimer's synaptic function, *Transl Neurodegener*, 6 (2017) 23.
- [74] S. Bhat, D.T. Dao, C.E. Terrillion, M. Arad, R.J. Smith, N.M. Soldatov, T.D. Gould, CACNA1C (Cav1.2) in the pathophysiology of psychiatric disease, *Prog Neurobiol*, 99 (2012) 1-14.

- [75] A. Gugliandolo, P. Bramanti, E. Mazzon, Role of Vitamin E in the Treatment of Alzheimer's Disease: Evidence from Animal Models, *Int J Mol Sci*, 18 (2017).
- [76] B. Mazur-Kolecka, A. Golabek, K. Nowicki, M. Flory, J. Frackowiak, Amyloid-beta impairs development of neuronal progenitor cells by oxidative mechanisms, *Neurobiol Aging*, 27 (2006) 1181-1192.
- [77] S.M. Then, M. Mazlan, G. Mat Top, W.Z. Wan Ngah, Is vitamin E toxic to neuron cells?, *Cell Mol Neurobiol*, 29 (2009) 485-496.
- [78] M.J. Berridge, Calcium hypothesis of Alzheimer's disease, *Pflugers Arch*, 459 (2010) 441-449.
- [79] M.O. Grimm, J. Mett, T. Hartmann, The Impact of Vitamin E and Other Fat-Soluble Vitamins on Alzheimer's Disease, *Int J Mol Sci*, 17 (2016).
- [80] S. Sung, Y. Yao, K. Uryu, H. Yang, V.M. Lee, J.Q. Trojanowski, D. Praticò, Early vitamin E supplementation in young but not aged mice reduces A $\beta$  levels and amyloid deposition in a transgenic model of Alzheimer's disease, *Faseb j*, 18 (2004) 323-325.
- [81] S. Khanna, S. Roy, N.L. Parinandi, M. Maurer, C.K. Sen, Characterization of the potent neuroprotective properties of the natural vitamin E alpha-tocotrienol, *J Neurochem*, 98 (2006) 1474-1486.
- [82] N.F. Ibrahim, D. Yanagisawa, L.W. Durani, H.S. Hamezah, H.A. Damanhuri, W.Z. Wan Ngah, M. Tsuji, Y. Kiuchi, K. Ono, I. Tooyama, Tocotrienol-Rich Fraction Modulates Amyloid Pathology and Improves Cognitive Function in A $\beta$ PP/PS1 Mice, *J Alzheimers Dis*, 55 (2017) 597-612.