

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DENEYSEL DİYABET MODELİNDE HİPERGLİSEMİNİN ALZHEİMER
HASTALIĞI İLE İLİŞKİLİ PROTEİNLER ÜZERİNE ETKİSİ**

Uzm. Ecz. İnci KAZKAYASI

**Farmakoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2016**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DENEYSEL DİYABET MODELİNDE HİPERGLİSEMİNİN ALZHEİMER
HASTALIĞI İLE İLİŞKİLİ PROTEİNLER ÜZERİNE ETKİSİ**

Uzm. Ecz. İnci KAZKAYASI

**Farmakoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. M. Serdar UMA**


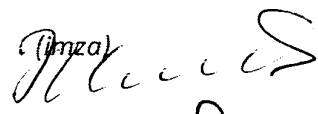

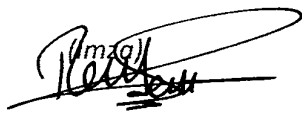
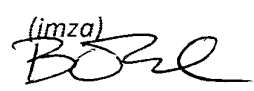
**İKİNCİ DANIŞMAN
Doç. Dr. Angel CEDAZO-MINGUEZ**

**ANKARA
2016**

ONAY SAYFASI

**Deneysel Diyabet Modelinde Hipergliseminin Alzheimer Hastalığı ile İlişkili
Proteinler Üzerine Etkisi
Uzm. Ecz. İnci KAZKAYASI**

Bu çalışma 19 Aralık 2016 tarihinde jürimiz tarafından "Farmakoloji Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	<i>Prof. Dr. İnci Erdemli</i> (Hacettepe Üniversitesi)	<i>(imza)</i> 
Tez Danışmanı:	<i>Prof. Dr. M. Serdar Uma</i> (Hacettepe Üniversitesi)	<i>(imza)</i> 
Üye:	<i>Prof. Dr. Nuray Arı</i> (Ankara Üniversitesi)	<i>(imza)</i> 
Üye:	<i>Prof. Dr. Şaban Remzi Erdem</i> (Başkent Üniversitesi)	<i>(imza)</i> 
Üye:	<i>Yrd. Doç. Dr. Banu Cahide Tel</i> (Hacettepe Üniversitesi)	<i>(imza)</i> 

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla onaylanmıştır.

Diclehan
(imza)

Prof. Dr. Diclehan Orhan
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

o Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.


(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir)

● Tezimin/Raporumun 30/06/2017 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)

o Tezimin/Raporumun.....tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

o Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

05/12/2016

Uzm. Ecz. İnci KAZKAYASI

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Serdar UMA danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.



Uzm. Ecz. İnci KAZKAYASI

TEŞEKKÜR

“Ben manevî miras olarak hiç bir ayet, hiç bir dogma, hiç bir donmuş ve kalıplaşmış kural bırakmıyorum. Benim manevî mirasım ilim ve akıldır.” M. KEMAL ATATÜRK

Önümüzde açtıkları aydınlık yolla hayata ve bilime bakışımı değiştiren içten teşekkürlerimi iletmek istediğim birçok kişi var. İlk olarak tüm zorluklara rağmen yolun yarısında elimden tutan tez danışmanım Prof. Dr. M. Serdar Uma’ya tecrübesi, titiz ve akılcı yaklaşımıyla tezime ve bana kattıkları için çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans tezimden beri bana yol gösteren Prof. Dr. Can Pekiner’e ve desteğini esirgemeyen Eczacılık ve Tıp Farmakoloji Anabilim dalındaki hocalarıma teşekkür ederim. Tezimin temellerini atan, onu şekillendiren, yalnızca tezimde değil ne zaman ihtiyacım olsa yanımda olan, bana her türlü zorlukla savaşmayı öğreten sevgili Dr. Ecz. Nihan Burul-Bozkurt’a çok teşekkür ederim. Bölümdeki ilk yıllarımdan itibaren birlikte çalıştığım Yrd. Doç. Dr. Banu Cahide Tel ve sık sık akıl danıştığım Doç. Dr. Emrah Bozkurt’a da teşekkürlerimi iletmek isterim.

Her tür zor koşula rağmen bölümümüzde sıcak ve eğlenceli bir çalışma ortamı yaratan sevgili çalışma arkadaşlarım Elif Çınar, Elif Nalbant, Erdoğan Aksay, Hande Çelik, Hande Karahan, İrfan Anjum, Melike Özkan, Necati Şengönül, Özge Erdoğan, Reshed Abohalaka, Sevgi Mutluay, Taşkın Taş, Yeşim Kaya, Yasemin Karaman’a ve bana sabırla ilham veren Merve Denizaltı’na, birlikte ülke ülke gezip güzel anılar biriktirdiğim E.İnci Somuncuoğlu’na, tatlı atışmalarımızın başkahramanı güzel insan Gökçen Telli’ye ayrıca teşekkür ederim.

Son olarak yalnız eğitim hayatım değil bütün hayatım boyunca yanımda olan çok sevgili anneme, babama, kardeşlerim ve kıymetli geniş aileme çok teşekkür ederim. Sizin emekleriniz ve sevginiz olmasaydı bugüne gelemeyeceğimi biliyorum.

Bu tez çalışması Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK), H.Ü. Bilimsel Araştırmalar Birimi (013D07301002-347 ve TBI-2015-6639) ve Karolinska Enstitüsü tarafından desteklenmiştir.

I would like to thank to my co-supervisor Angel Cedazo-Minguez for his generous support. I really want to thank to Antonio, Bernadette, Carlos, Catarina, Cristina, Daniel, Elena, Francesca, Gorka, Ingemar, Javier, Joana, Laetitia, Laura, Lorena, Maria, Mustafa, Nuno, Patricia, Paula, Raul, Silvia and Torbjörn for making Stockholm my second home.

ÖZET

Kazkayası, İ., Deneysel Diyabet Modelinde Hipergliseminin Alzheimer Hastalığı ile İlişkili Proteinler Üzerine Etkisi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2016. En önde gelen sağlık sorunlarından biri olan diyabet Alzheimer hastalığı (AH) riskini artırır ancak bu ilişkideki moleküler mekanizmalar henüz aydınlatılamamıştır. Bu tez kapsamında diyabetik koşullar altındaki primer nöronal hücre kültüründe ve streptozotosin (STZ) ile oluşturulan diyabetik sıçan beyinlerinde *selective Alzheimer's disease indicator-1* (seladin-1) ve insülin degrade edici enzim (İDE) düzeyleri araştırıldı. Primer nöronal hücre kültüründe glukozun yüksek olmasından ziyade insülin eksikliğinin seladin-1 ve İDE protein ve mRNA düzeylerini azalttığı gösterildi. Diyabetik koşullar aralıklı uygulandığında seladin-1 düzeyi etkilenmezken İDE düzeyi azaldı. Beş gün insülinizinkübasyondan sonra azalan seladin-1 düzeylerine artmış BACE1 düzeyleri eşlik etti. İnsülin varlığında metformin ile inkübasyon seladin-1 protein ve mRNA düzeylerini artırdı. Aralıklı glukoz ile eşzamanlı yapılan metformin ve estradiol inkübasyonu İDE'nin düzeyinin kontrol grubu ile aynı kalmasını sağladı. STZ ile oluşturulan diyabet sıçanların beyinlerindeki seladin-1 ve İDE düzeylerini azaltırken BACE1 düzeyini değiştirmede. Yalnızca overektomi yapılan sıçanların beyinlerinde seladin-1 ve İDE düzeyleri değişmezken overektomi ve diyabet yapılan grupta azaldı. Tüm bu bulgular seladin-1 ve İDE'nin diyabetli kişilerde AH gelişmesini önlemek için yeni tedavi hedefleri olabileceğini düşündürmüştür.

Anahtar kelimeler: Diyabet, Alzheimer hastalığı, Seladin-1, İnsülin degrade edici enzim

Bu tez çalışması TÜBİTAK (Program 2214-A), Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi (BAB, Proje numaraları: 013D07301002-347 ve TBI-2015-6639) ve çeşitli İsvaç kurumları tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Kazkayasi, I., Effect of Hyperglycemia on Proteins Associated with Alzheimer's Disease in Experimental Diabetes, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Doctor of Philosophy in Pharmacology, Ankara, 2016. Diabetes mellitus (DM) which is one of the foremost health problems enhances the risk of Alzheimer's disease (AD) although the molecular mechanisms behind this association remain unclear. In the present study, selective Alzheimer's disease indicator-1 (seladin-1) and insulin degrading enzyme (IDE) expressions were investigated in rat primary cultured neurons under diabetic conditions and in the brains of streptozotocine (STZ)-induced diabetic rats. We found that lack of insulin rather than high glucose levels decreased seladin-1 and IDE protein and mRNA levels in cultured rat primary neurons after 5 days incubation. If the diabetic conditions were intermittent, neuronal seladin-1 levels were unaffected whereas IDE levels were reduced. Increased BACE1 levels accompanied to decreased seladin-1 levels after 5 days of insulin deprivation. Metformin incubation in the presence of insulin increased seladin-1 protein and mRNA levels. Metformin and estradiol incubation with intermittent glucose treatment caused IDE to remain at control levels. STZ-induced diabetes reduced seladin-1 and IDE but did not change BACE1 levels in the brains of rats. Seladin-1 and IDE levels which were unchanged in the brains of ovariectomized rats decreased in STZ-induced diabetic and ovariectomized rats. Taken together we suggest that seladin-1 and IDE may represent new treatment targets for DM patients to prevent AD onset.

Key words: Diabetes mellitus, Alzheimer's Disease, Seladin-1, Insulin degrading enzyme

This study was supported by TUBITAK (Programme: 2214-A), Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project numbers: 013D07301002-347 and TBI-2015-6639) and by various Swedish foundations.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Diabetes Mellitus	2
2.2. Alzheimer Hastalığı	2
2.2.1. Alzheimer Hastalığı Patolojisinde Amiloid β Hipotezi	3
2.2.2. Alzheimer Hastalığı Patolojisinde Tau Hipotezi	3
2.3. Diabetes Mellitus ve Alzheimer Hastalığı İlişkisi	4
2.4. Alzheimer Hastalığı Tip 3 Diyabet midir?	5
2.5. Seladin-1	10
2.6. İnsülin Degrade Edici Enzim	13
3. GEREÇ ve YÖNTEM	19
3.1. Hücre Kültürü İnkübasyon Grupları	19
3.2. Sıçan Primer Hücre Kültürü	22
3.3. Deneysel Diyabetin Oluşturulması	23
3.4. <i>Western Blot</i> Analizleri	24
3.5. Gerçek Zamanlı Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizleri	25
3.6. Kolesterol ve Desmosterol Ölçümleri	26
3.7. İmmünoSitokimya Analizleri	26

3.8. Hücre Canlılığı	26
3.9. İstatistiksel Analiz	27
3.10. DeneYlerde Kullanılan Çözelti, İlaç ve Reaktifler	27
4. BULGULAR	29
4.1. Hücre Kültüründe Uygulanan İşlemlerin Hücre Canlılığına Etkisi	29
4.2. Hücre Kültüründe 48 saat Devamlı İnkübasyonun Seladin-1 Protein ve mRNA Düzeyine Etkisi	30
4.3. Hücre Kültüründe 5 gün Devamlı İnkübasyonun Seladin-1 Protein ve mRNA Düzeyine Etkisi	31
4.4. Hücre Kültüründe 5 gün Devamlı İnkübasyonun Seladin-1 Proteinini Üzerine Etkisinin Konfokal Mikroskopu ile Gösterilmesi	32
4.5. Hücre Kültüründe 48 saat Aralıklı İnkübasyonun Seladin-1 Protein ve mRNA Düzeyine Etkisi	33
4.6. Hücre Kültüründe 5 gün Aralıklı İnkübasyonun Seladin-1 Protein ve mRNA Düzeyine Etkisi	34
4.7. Hücre Kültüründe 5 gün Aralıklı İnkübasyonun Seladin-1 Proteinini Üzerine Etkisinin Konfokal Mikroskopu ile Gösterilmesi	35
4.8. Hücre Kültüründe 5 gün Devamlı İnkübasyonun BACE1 Protein ve mRNA Düzeyine Etkisi	36
4.9. Hücre Kültüründe 5 gün Devamlı İnkübasyonun Desmosterol/Kolesterol Oranına Etkisi	37
4.10. Hücre Kültüründe 48 saat Devamlı İnkübasyonun İDE Protein ve mRNA Düzeyine Etkisi	38
4.11. Hücre Kültüründe 5 gün Devamlı İnkübasyonun İDE Protein ve mRNA Düzeyine Etkisi	39
4.12. Hücre Kültüründe 5 gün Devamlı İnkübasyonun İDE Proteinini Üzerine Etkisinin Konfokal Mikroskopu ile Gösterilmesi	40

4.13. Hücre Kültüründe 48 saat Aralıklı İnkübasyonun İDE Protein ve mRNA Düzeyine Etkisi	41
4.14. Hücre Kültüründe 5 gün Aralıklı İnkübasyonun İDE Protein ve mRNA Düzeyine Etkisi	42
4.15. Hücre Kültüründe 5 gün Aralıklı İnkübasyonun İDE Proteinine Üzerine Etkisinin Konfokal Mikroskopi ile Gösterilmesi	43
4.16. Deneysel Diyabetin Kan Glukoz Düzeyi ve Vücut Ağırlığına Etkisi	44
4.17. Deneysel Diyabetin Seladin-1 Protein ve mRNA Düzeyine Etkisi	45
4.18. Deneysel Diyabetin BACE1 Protein Düzeyine Etkisi	46
4.19. Deneysel Diyabetin İDE Protein ve mRNA Düzeyine Etkisi	47
5. TARTIŞMA	48
5.1. Diyabetin Seladin-1 Üzerine Etkisi	48
5.2. Diyabetin İDE Üzerine Etkisi	54
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	58
7. KAYNAKLAR	59
8. EKLER	69
EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri	
EK-2: Tez Çalışması ile İlgili Bildiriler ve Yayınlar	
EK-3: Tez Çalışması ile İlgili Yayının Tam Metni	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

Aβ	Amiloid β
AH	Alzheimer Hastalığı
AKT	Protein Kinaz B
APP	Amiloid Prekürsör Protein
BACE1	β Sekretaz 1 (<i>β side APP cleaving enzyme 1</i>)
cDNA	Komplementar deoksiribonükleik asit
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
DHCR24	3-beta-hidroksisterol-delta-24-redüktaz
DM	Diabetes Mellitus
DNA	Deoksiribonükleik asit
ECL	Güçlendirilmiş ışımaya reaktifleri
GGA3	<i>Golgi-localized γ-ear-containing adenosine diphosphate-ribosylation factor-binding protein</i>
GK	Goto-Katizaki
GLUT	Glukoz taşıyıcı
GSK3β	Glikojen sentaz kinaz 3 β
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IRS	İnsülin cevap elemanı
İDE	İnsülin degrade edici enzim
İ.s.v	İntraserebroventriküler
kDa	Kilodalton
LXR	<i>Liver X receptor</i>
MAPK	Mitojenle aktive olan protein kinaz
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
MTT	4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolyum bromür
PI3K	Fosfotidil inozitol-3-kinaz
PPAR-γ	Peroksizom proliferatör ile aktifleşen reseptör γ
RNA	Ribonükleik asit

RT-PCR	Ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu
SDS	Sodyum dodesil sülfat
Seladin-1	<i>Selective Alzheimer's Disease Indicator-1</i>
STZ	Streptozotosin
T1DM	Tip I Diabetes Mellitus
T2DM	Tip II Diabetes Mellitus
17β-E2	17 β -Estradiol

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
3.1. 48 saat ve 5 gün devamlı inkübasyon grupları.	20
3.2. 48 saat ve 5 gün aralıklı inkübasyon grupları.	21
4.1. Sıçan korteks nöronlarından elde edilen primer hücre kültüründe 5 gün devamlı ve aralıklı yüksek glukoz inkübasyonunun hücre canlılığına etkisinin MTT testi ile gösterilmesi.	29
4.2. Sıçan korteks nöronlarından elde edilen primer hücre kültüründe 48 saat devamlı inkübasyonun seladin-1 protein ve mRNA düzeyine etkisi.	30
4.3. Sıçan korteks nöronlarından elde edilen primer hücre kültüründe 5 gün devamlı inkübasyonun seladin-1 protein ve mRNA düzeyine etkisi.	31
4.4. Primer hipokampal nöronlarda 5 gün devamlı inkübasyondan sonra yapılan seladin-1 boyamasının temsili fotoğrafları.	32
4.5. Sıçan korteks nöronlarından elde edilen primer hücre kültüründe 48 saat aralıklı inkübasyonun seladin-1 protein ve mRNA düzeyine etkisi.	33
4.6. Sıçan korteks nöronlarından elde edilen primer hücre kültüründe 5 gün aralıklı inkübasyonun seladin-1 protein ve mRNA düzeyine etkisi.	34
4.7. Primer hipokampal nöronlarda 5 gün aralıklı inkübasyondan sonra yapılan seladin-1 boyamasının temsili fotoğrafları.	35
4.8. Sıçan korteks nöronlarından elde edilen primer hücre kültüründe 5 gün devamlı inkübasyonun BACE1 protein ve mRNA düzeyine etkisi.	36
4.9. Sıçan korteks nöronlarından elde edilen primer hücre kültüründe 5 gün devamlı inkübasyonun desmosterolden kolesterol oluşmasına etkisi.	37

- 4.10.** Sıçan korteks nöronlarından elde edilen primer hücre kültüründe 48 saat devamlı inkübasyonun İDE protein ve mRNA düzeyine etkisi. 38
- 4.11.** Sıçan korteks nöronlarından elde edilen primer hücre kültüründe 5 gün devamlı inkübasyonun İDE protein ve mRNA düzeyine etkisi. 39
- 4.12.** Primer hipokampal nöronlarda 5 gün devamlı inkübasyondan sonra yapılan İDE boyamasının temsili fotoğrafları. 40
- 4.13.** Sıçan korteks nöronlarından elde edilen primer hücre kültüründe 48 saat aralıklı inkübasyonun İDE protein ve mRNA düzeyine etkisi. 41
- 4.14.** Sıçan korteks nöronlarından elde edilen primer hücre kültüründe 5 gün aralıklı inkübasyonun İDE protein ve mRNA düzeyine etkisi. 42
- 4.15.** Primer hipokampal nöronlarda 5 gün aralıklı inkübasyondan sonra yapılan İDE boyamasının temsili fotoğrafları. 43
- 4.16.** Diyabetin sıçan serebral korteksinde, hipokampusunda seladin-1 protein ve hipokampusunda seladin-1 mRNA düzeylerine etkisi. 45
- 4.17.** Diyabetin sıçan serebral korteksinde ve hipokampusunda BACE1 protein düzeyine etkisi. 46
- 4.18.** Diyabetin sıçan serebral korteksinde, hipokampusunda İDE protein ve hipokampusunda mRNA düzeyine etkisi. 47

TABLolar

Tablo	Sayfa
3.1. Deneylerde kullanılan çözeltiler.	27
3.2. Deneylerde kullanılan antikolar.	28
4.1. Diyabet ve/veya overektominin kan glukoz düzeyine ve vücut ağırlığına etkisi.	44

1. GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü'nün yayınladığı rapora göre 2016 yılı itibariyle dünyada 422 milyon diyabet hastası vardır (1) ve diyabet günümüzde en başta gelen sağlık sorunlarından biridir. Dünya çapında ciddi sağlık problemi haline gelen bir diğer hastalık ise Alzheimer hastalığıdır. Uluslararası Alzheimer derneklerinin ortak yayınladığı rapora göre bugün dünyada 46,8 milyon kişinin demans ile yaşadığı bilinmekte ve bu sayının her 20 yılda bir iki katına çıkması beklenmektedir (2).

Diyabet hastalarının AH geliştirme ihtimali sağlıklı kişilere göre 1,5-2 kat daha fazladır (3-7). Diyabetin AH riskini artırdığı birçok klinik ya da epidemiyolojik çalışma ile gösterilmiş ancak altında yatan moleküler mekanizmalar henüz aydınlatılamamıştır. Son zamanlarda AH literatürde "Tip 3 Diyabet" olarak adlandırılmaktadır. Diyabet ve AH arasındaki ilişkinin varlığının gösterilmesinin ardından bu ilişkide rolü olan mekanizmaların aydınlatılması önem kazanmıştır.

Bu tez kapsamında diyabet ve AH arasındaki moleküler mekanizmaların araştırılması amacıyla hücre kültüründe oluşturulmuş diyabetik koşulların ve sıçanlarda STZ ile oluşturulan diyabetin AH ile ilişkili iki protein olan seladin-1 ve İDE düzeylerine etkisi incelenmiştir. Ayrıca bu proteinleri nöroprotektif 17 β -estradiolün ve antidiyabetik ilaç metforminin ne yönde etkilediği de araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus (DM) karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasındaki bozuklukları içeren bir endokrin hastalıktır. İnsülin salgılanmasında, hedef hücrelerdeki aktivitesinde ya da her ikisinde birden bozulma sonucu gelişen hiperglisemi ile karakterizedir. DM'nin insüline bağımlı olan tip I DM (T1DM) ve insüline bağımlı olmayan tip II DM (T2DM) olmak üzere iki çeşiti vardır. Pankreastaki β hücrelerinin otoimmün mekanizmalarla hasar görmesi T1DM'ye, bozulmuş insülin salgılanması ya da periferik organlarda insülin aktivitesine direnç gelişmesi ise T2DM'ye neden olmaktadır (8). İnsülin direncinin neden geliştiği tam olarak bilinmese de kaslarda ve yağ dokusundaki insülin reseptör ekspresyonunun, insülin reseptör tirozin kinaz aktivitesinin, insülin cevap elemanı (IRS-I) ve fosfatidilinozitol-3-kinaz (PI3K) aktivitesinin azalmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir (9). Son yıllarda diyabetin beyne etkisi ile bilişsel fonksiyon bozukluğuna ve demansa zemin hazırlaması birçok araştırmancının konusu olmuştur (10).

2.2. Alzheimer Hastalığı

AH temel patolojik bileşenler olarak beyinde hücre dışında amiloid/senil plakların, hücre içinde ise nörofibriler yumakların birikmesi ile karakterize nörodejeneratif bir hastalıktır (11). Bu bileşenlere sekonder olarak oksidatif stres, lipid peroksidasyonu, beyinde inflamasyon, glutaminerjik nöronların eksitotoksitesisi, vasküler toksisite, glial hücreler tarafından proinflamatuvar sitokinlerin üretimi, bozulmuş hücresel enerji metabolizması ve apoptotik kaskatın başlaması eşlik eder (12, 13). Tüm bu değişiklikler ile sinaptik bozukluklar, kolinerjik hasar, mitokondriyal fonksiyon bozuklukları ve nöronal ölümler arasında korelasyon vardır. Beyinde biriken plaklar ve yumaklar nöronların küçülmesine, nöronal kayıplara ve nihayetinde serebral atrofiye neden olur (12, 13). Dünyada yaklaşık 47 milyon Alzheimer hastası vardır (2). Görülme sıklığının gittikçe artması ve tedavisinin henüz olmaması nedeniyle AH başta gelen sağlık problemlerindendir.

AH 60 yaşından sonra hemen her yaş diliminde kadınlarda erkeklerden daha fazla görülmektedir (14, 15). Kadınlarda menapozdan sonra estrogenin koruyucu etkisinin ortadan kalkması bu farkın sebebi olarak düşünülmektedir (15). AH araştırmalarında estrogenin nöroprotektif etkileri sıkça araştırılan konulardandır.

Yaşam süresi uzadıkça hem DM'nin hem de AH'nin görülme sıklığı artar. Her iki hastalık da kronik ve karmaşık yapıda olduğundan yaşlı popülasyonda en başta gelen morbidite ve mortalite nedenlerindedir (16).

2.2.1. Alzheimer Hastalığı Patolojisinde Amiloid β Hipotezi

Amiloid β ($A\beta$) plakları, amiloid prekürsör protein (APP)'nin proteolitik olarak kesilmesi sonucu meydana gelen $A\beta$ peptitlerinin birikmesi ile oluşur. APP aksonal veziküler trafikten, sinaps oluşumundan ve nöronal plastisiteden sorumlu olduğu düşünölen bir membran proteindir. APP, üç farklı sekretaz tarafından (α , β ve γ) proteolitik olarak kesilir ki hangisi tarafından kesildiği AH gelişmesi açısından önemlidir. APP'nin α ve γ sekretazlar ile kesilmesi amiloidojenik olmayan yolağı takip ederken, β ve γ sekretazlarla kesilmesi amiloidojenik yolağa girmesi ve $A\beta$ birikmesi ile son bulur. Amiloidojenik yolakta β sekretaz 1 (BACE1-*Beta site APP cleaving enzyme 1*), APP'yi C terminalinden keser, bunu takiben γ sekretaz ise membrana bağlı kalan C terminal fragmanını çeşitli yerlerden kopararak farklı boyutlarda $A\beta$ peptitleri oluşturur. En çok oluşunlar sırasıyla 40 ve 42 aminoasitli $A\beta_{40}$ ve $A\beta_{42}$ peptitleridir ve bunlar oksidatif stres gibi durumlarda birikmeye meyillidirler. Hücre dışında biriken $A\beta$ plakları, membran lipidlerinin peroksidasyonuna ve hücre içine glukoz alımının bozulmasına neden olarak hücreyi apoptozise götürürler (12).

2.2.2. Alzheimer Hastalığı Patolojisinde Tau Hipotezi

Tau proteini hücre iskeletini oluşturan yapılardan olan mikrotüböller ile ilişkili protein ailesindedir. Tau proteinlerinin mikrotüböllerin dinamiklerinin düzenlenmesinde, aksonal transportta ve nöritlerin uzamasında rolleri vardır. Bu fonksiyonel rolleri proteinin bölgelerine özgül olarak ve uygun şekilde fosforile

edilmesi ile düzenlenir. AH'de uygun olmayan şekilde fosforile edilen tau proteinleri hücre içinde birikerek çözünmez nörofibriler yumaklar oluşturur ve böylece mikrotübüllerin fonksiyon kaybına, aksonal kayba ve neticede nöronal ölüme neden olur (12).

2.3. Diabetes Mellitus ve Alzheimer Hastalığı İlişkisi

Yaşlanma, AH için temel risk faktörüdür (17, 18). Diğer risk faktörleri arasında DM, metabolik sendrom, periferik insülin direnci (19, 20), obezite ve yüksek kolesterol (21) sayılabilir. AH gelişmesinde rolü olduğu düşünülen şüpheli genler de vardır ve bunlardan en bilineni 19. kromozomdaki ApoE geninin allellerindeki anormalliktir (17). Bir diğeri ise 10. kromozomda IDE geninin yakınında yer alan lokustur (17, 22-24).

Geniş popülasyonlarda yapılan bir çok çalışma göstermiştir ki diyabetli hastaların AH olma ihtimali aynı yaştaki sağlıklı kişilerden 1,5 ile 2 kat daha fazladır (3-7, 25-34). İnsülin direnci ve/veya insülin üretimi azalmış olan hastalarda AH görülme riskini artmış bulan çalışmalar da mevcuttur (7, 30, 35). Öte yandan, Alzheimer hastalarının %80'inde de T2DM ya da bozulmuş açlık kan şekeri olduğu bildirilmiştir (36).

Bellek ve davranış gibi fonksiyonlarda rol alan hipokampus ve amigdala gibi beyin bölgelerinin DM'li hastalarda atrofiye uğradığı ve bu bölgelerin AH'li kişilerde de atrofik olduğu bilinmektedir (10). DM ve AH'nin her iki hastalıkta da görülen nörodejenerasyonu şiddetlendirecek ortak patolojik mekanizmalara sahip olduğu ileri sürülmüştür (37).

DM ve AH arasındaki ilişkiyi işaret eden klinik ve epidemiyolojik çalışmaların yanı sıra, olası hastalık mekanizmalarını araştıran deneysel çalışmalar da vardır. DM'nin bilişsel fonksiyon bozukluğuna ve serebral hasara nasıl neden olduğu, AH ile ilişkili patolojileri nasıl başlattığı ve ilerlettiği ayrıntılı olarak incelenmiştir (10, 38). Hiperglisemi, vasküler hasar, hipoglisemi ve insülin direnci en olası patofizyolojik sebepler arasındadır (10, 39). Teşhis konulmamış DM'li ya da DM teşhis sınırındaki kişilerde diyabetin neden olabileceği vasküler hasardan bağımsız AH'nin ortaya

çıkması, hiperglisemi ve nörodejenerasyon arasında direkt bir bağlantı olduğunu düşündürmüştür (29). Ayrıca her iki hastalıkta da oksidatif stres, vasküler disfonksiyonlar, amiloidogenezis, glukoz ve yağ asiti metabolizmasında bozukluklar vardır ve glikasyona ya da oksidatif modifikasyona uğramış proteinler birikmektedir (11, 40).

DM'de AH'ye özgü nöropatolojik belirteçler de görülmektedir (35). T1DM modeli olarak BB/Wor, T2DM modeli olarak da BBZDR/Wor transgenik sıçanların kullanıldığı bir çalışmada her iki grupta da APP, BACE1, A β , fosfo tau gibi AH belirteçlerinin arttığı, buna karşın fosfo AKT (protein kinaz B), fosfo glikojen sentaz kinaz-3 β (GSK3 β) gibi insülin reseptör yolağında yer alan hücre içi bileşenlerin ise azaldığı gösterilmiştir (39). Aynı çalışmada hiperglisemi seviyeleri benzer olan her iki modelde de sıçanların frontal korteksinde ciddi miktarda astrogliozis, nörit dejenerasyonu ve nöron ölümü tespit edilmiştir (39). STZ ile oluşturulmuş diyabetik sıçan modelinde yapılan bir diğer çalışmada temporal korteks ve hipokampusta A β 40 seviyesinin arttığı ve insülin tedavisiyle kontrol seviyesine geri döndüğü gösterilmiştir (41). T1DM modeli olarak STZ enjeksiyonu yapılmış farelerin, T2DM modeli olarak da db/db transgenik farelerin kullanıldığı bir başka çalışmada tüm hayvanların korteks ve hipokampusunda, T2DM modelinde daha fazla olmak üzere, tau fosforilasyonu artışı gösterilmiştir (42). APP aşırı ekspresyonu yapan transgenik farelerde STZ ile oluşturulmuş diyabetin bilişsel performansı bozduğu, insülin reseptör fosforilasyonunu azalttığı ve GSK3 β aktivitesini artırdığı gösterilmiştir (37). Bu farelerin beyinlerinde AH'nin iki patolojik belirteci olan tau fosforilasyonu ile A β plakları A β 40 ve A β 42 artmıştır (37). Öte yandan 5XFAD transgenik fare modelinde STZ ile oluşturulan diyabetin, henüz patoloji gelişmesi için erken olan bir dönemde (1,5 aylık farede) beyindeki A β birikmesini hızlandırdığı da bildirilmiştir (43).

2.4. Alzheimer Hastalığı Tip 3 Diyabet midir?

AH vakalarının %5-10'u otozomal dominant olarak aktarılan genetik anormalliklerin neden olduğu ve erken yaşta gelişen türdendir (17). Ailesel AH için APP, presenilin-1 ve presenilin-2 genlerindeki mutasyonlar sorumlu tutulmaktadır

(44). Vakaların %90-95 gibi büyük bir çoğunluğu ise geç yaşta gelişen ve nedeni bilinmeyen türdeki sporadik AH türündendir. AH'nin neden geliştiğine dair bugüne dek önerilen en kabul edilir görüş, genetik yatkınlıkların üzerine yetişkin yaşam tarzının getirdiği risk faktörlerinin eklenmesidir. Kalıtsal ve sporadik AH'nin etiyojileri bakımından benzerlikleri yoktur ancak beynin varlığı morfolojik son nokta ve klinik tablo aynıdır; demans belirtileri birbirinden ayırt edilemez. Etiyojileri farklı olup klinik seyri benzeyen bir başka hastalık ikilisi ise T1DM ve T2DM'dir (17). T2DM için, fetal hayatta doku ve organların gelişmesinde kritik olan dönemlerde yaşanan olayların uzun soluklu sonuçları olabileceği hipotezi vardır. Aynı şekilde sporadik AH için de hamileliğin son trimesterinde fetal beyne gelecek bir zararın genetik yatkınlık oluşturabileceği ve yetişkinlikteki risk faktörleri de buna eklenirse AH'nin gelişeceği hipotezi bulunmaktadır. Bunlar temel alınarak sporadik AH'nin beynin tip II diyabeti olduğu öne sürülmüştür (17).

AH patolojisinde uzun yıllardır A β ya da tau hipotezleri tartışılırken herkesin hemfikir olduğu bir gerçek; hastalığın ilk evrelerinden itibaren görüntüleme yöntemleriyle tespit edilebilen, AH'ye duyarlı beyin bölgelerindeki nöronların glukoz kullanımında meydana gelen azalmadır (17). Bunun sonucunda glukozdan adenosin trifosfat üretimi %50 oranında düşer (17), böylece AH'li beyinlerde %20 enerji eksikliği ortaya çıkar ve bu eksiklik hastalık sürecinde giderek ilerler. Glukoz beyin hücrelerinde enerji metabolizmasını sağlar (45). Nöronal glukoz metabolizması insülin sinyal iletim sisteminin kontrolü altındadır. Bu sistemin aksaması glukoz ve enerji metabolizmasında bozukluklara yol açtığı için AH gelişmesinde hayati önem taşır (17). Beynin glukoz kullanımındaki azalmanın insülin reseptörünün insüline olan duyarlılığını yitirmesinden kaynaklandığı ileri sürülmüş ve buna dayanarak AH için "Tip 3 Diyabet" terimi ortaya atılmıştır (19).

İnsülin sinyal iletim sisteminin nöronlar içine glukoz alımı, metabolik aktivite, sağ kalım, büyüme ve plastisite açısından çok önemli olduğu bilinmektedir (19, 46, 47). İnsülin veya insülin benzeri büyüme faktörü (IGF)-I aktivitesinin inhibe edilmesi durumunda mitokondri fonksiyonlarının bozulduğu, nöronal sağ kalımın azaldığı ve nöronların apoptozise sürüklendiği gösterilmiştir (13, 19, 46, 47). İnsülin

hipokampusun enerji metabolizmasında ve bellek edinmeyi kolaylaştırmada önemli role sahiptir (48). STZ enjeksiyonu ile diyabetik olan sıçanların uzaysal öğrenme ile ilgili bilişsel fonksiyonlarında kötüleşme olduğu, hipokampal plastisitenin bozulduğu ve insülin tedavisiyle bu durumun düzeltildiği gösterilmiştir (49). Benzer şekilde bir T1DM modeli olan BB/Wor sıçanların bilişsel fonksiyonlarının gittikçe bozulduğu, bunun insülin ve IGF-I aktivitelerindeki baskılanmadan ve hipokampustaki apoptozisten ileri geldiği ve bu durumun insülinomimetik olan C-peptid ile geri döndürüldüğü bildirilmiştir (50, 51). İnsülinin intraserebroventriküler (i.s.v) enjeksiyonu serebral kortekste ve hipokampusta glikolitik yolda yer alan enzimleri aktive eder ve enerjice zengin fosfatların üretimini artırır (17). İ.s.v STZ enjeksiyonu ise insülinin bu yararlı etkilerinin tam tersi değişiklikler oluşturur (52). İnsülinin sıçanlarda i.s.v (53) insanlarda ise intravenöz (54) yoldan optimal dozda uygulanmasının bazal glukoz ulaşılabilirliğini artırarak belleği iyileştirdiği gösterilmiştir. İntranazal insülin uygulanması farelerde kan glukoz düzeyini değiştirmeksizin bilişsel fonksiyonları güçlendirmiştir (55). Aynı şekilde AH'li hastalarda intranazal insülin uygulamasının insülinin direkt beyne ulaşmasını sağlayarak periferde insülin ve glukoz düzeylerini etkilemeksizin belleği iyileştirdiği gösterilmiştir (56). Erken dönem AH'de bozulan bellek performansı insülin artışı ile iyileştirilmiş, insülin artışının eşlik etmediği plazma glukoz düzeyindeki artış performansına etki etmemiştir (19).

Nöronal glukoz alımı glukoz taşıyıcıları aracılığı ile olmaktadır. Beyinde çok miktarda bulunan glukoz taşıyıcı (GLUT)-3 nöronlar için temel glukoz taşıyıcısıdır (57, 58). İnsülin, kas hücreleri gibi diğer hücrelerde glukoz alımını GLUT-4 taşıyan veziküllerin membrana yaklaşmasını ve membranla füzyon yapmasını sağlayarak gerçekleştirir. Nöronlarda ise GLUT-3 taşıyan vezikülün membrana taşınması yine insülin aracılığıyla, ancak membranla füzyon yapmasını membran depolarizasyonu sağlar (45).

Beyindeki insülin büyük ölçüde pankreasın β hücrelerinden gelmektedir (17, 59). Plazmadaki insülin kan beyin bariyerini doyurulabilir reseptörler aracılığıyla geçer ve bu geçiş en hızlı olfaktör bulbusta gerçekleşir (60). Periferik insülinin akut

olarak yükselmesi beyinde ve beyin omurilik sıvısındaki insülin konsantrasyonunu artırırken, sürekli hiperinsülinemi kan beyin engelindeki insülin reseptörlerini *down* regüle ederek insülin geçişini azaltmaktadır (61). Beyindeki fazla insülinin beyin omurilik sıvısı aracılığı ile uzaklaştırıldığı düşünülmektedir (19, 45). Son zamanlarda yapılan çalışmalar beyinde de insülin üretimi olduğunu göstermiştir (62, 63). Hipokampus, prefrontal korteks, entorinal korteks ve olfaktör bulbus gibi yerlerdeki piramidal nöronlar insülin sentezleyebilmektedir (64, 65). Serebral dolaşımdaki insülin ve IGF'nin beyin kan akımı ve enerji metabolizmasını düzenlediği, beyinde üretilen insülinin ise öğrenme ve bellek gibi fonksiyonlarda gelişen lokal ve ani ihtiyaçları karşılamada rol oynadığı ileri sürülmüştür (47). Sağlıklı kişilerde bile yaşlanmayla birlikte beyindeki insülin, insülin reseptörünün bağlama kapasitesi ve post reseptör yolakta yer alan tirozin kinaz aktivitesi azalma gösterir (66). AH'li kişilerin beyinlerinde insülin ve IGF-I düzeylerinin, bozulmuş kan beyin engeli yüzünden azaldığı bildirilmiştir (39). Periferde gelişmiş olan insülin direnci ve hiperinsülinemi kandan beyne insülin geçişinde azalmaya neden olduğundan, AH'li kişilerde beyin omurilik sıvısında insülin azalır ve beyin sürekli insülin eksikliği ile karşı karşıya kalır (67).

Beyinde insülin reseptörleri en yoğun olarak olfaktör bulbus, hipotalamus, serebral korteks ve hipokampusta bulunur (19). Bunlar moleküler özellikleri bakımından periferdeki insülin reseptörleriyle aynıdır (68). İnsülin reseptörlerinin sıçan hipokampus ve medyal temporal korteksinde bulunması insülinin belleği etkilediğine dair kanıt olarak ileri sürülmüştür (69). İnsülin, reseptörlerine bağlandığında IRS-PI3K-AKT yolağını, mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolağını ya da transkripsiyon faktörlerini aktive eder (68).

Yaşlanmayla birlikte beyindeki insülin konsantrasyonu ve insülinin reseptörüne bağlanması azalır (17). Postmortem AH'li ve sağlıklı insan beyinde yapılan bir çalışmada AH'li beyinlerde (korteks, hipokampus ve hipotalamustan alınan örneklerde) insülin, IGF-I ve IGF-II düzeylerinde ve ilişkili reseptörlerinde dramatik bir azalma bulunmuştur (19). Aynı çalışmada AH'li beyinlerin hipokampusunda insülin ve IGF-I reseptörlerinin fosforilasyonunun ve bu

reseptörlerin hücre içi yolaklarında yer alan bazı proteinlerin (IRS-I, fosfoAKT gibi) düzeylerinin de azaldığı gösterilmiştir (19). Braak derecelendirmesine göre farklı evrelerden seçilmiş AH'li hastaların beyinlerinde insülin, IGF-I ve reseptörlerinin mesajcı ribonükleik asit (mRNA) düzeylerinde hastalığın şiddeti ile orantılı bir azalma görülmüştür (46). İnsülin reseptör sinyal yolağının bozulması PI3K-AKT yolağının aktivitesinin azalması ve GSK3β'nin aktivitesinin artması, dolayısıyla tau hiperfosforilasyonu ile sonuçlanır (70-72). GSK3β normalde aktif olan ancak insülin sinyaliyle inaktif hale gelen bir kinazdır (73).

İnsülin reseptörü homozigot olarak silinmiş farelerin doğumdan hemen sonra şiddetli diyabetik ketoasidoz geliştiği için öldüğü buna karşın heterozigot farelerin %10'unda diyabet geliştiği bilinmektedir (19). Heterozigot olarak insülin reseptörü yok edilmiş fareler yeni nesne tanıma testinde başarısız olmuştur (74). Nöronal insülin reseptörü silinmiş transgenik fare modelinde farelerin yiyecek tüketiminde artış gösterdiği, obezite ve insülin direnci geliştirdiği ayrıca tau fosforilasyonunda artış olduğu gösterilmiştir (70, 75, 76).

Diyabette gelişen beyin insülin eksikliği BACE1 *up* regülasyonu ve APP artışı sonucunda APP'nin kesilme reaksiyonlarını kolaylaştırarak Aβ oluşumunu tetikler (35). İnsülin APP'nin üretildiği yer olan Golgi ağından plazma membranına iletiminde ve Aβ'nin hücre dışına taşınmasında rol oynamaktadır (77, 78). Ayrıca Aβ insülin reseptörüne bağlanmak için insülinle yarışarak reseptörün otofosforilasyonunu inhibe eder (79, 80).

Beyinde insülin direnci gelişmesine, azalmış AKT aktivitesi, artmış GSK3β aktivitesi ve tau hiperfosforilasyonu eşlik eder ki bunlar AH'de görülen değişiklikler ile benzerlik gösterir (19). Tau'nun fizyolojik fosforilasyonundan sorumlu başlıca kinazlar insülin ve IGF-I ile aktive olan kinazlardır (19). İnsülin ve IGF-I sinyalinin bozulması sonucu GSK3β aktivitesinin artışı ise tau hiperfosforilasyonuna neden olmaktadır (19).

İnsülin sinyal sisteminin bozulması ya da insülin direnci gelişmesi, trofik faktörleri ortadan kaldırarak, enerji metabolizmasını bozarak, asetilkolin homeostazını da içeren, insülinin regüle ettiği genlerin ekspresyonlarını durdurarak

nöronların ölümüne neden olur (47). AH patolojisinde beyindeki insülin sinyal sisteminin ve glukoz metabolizmasının bozulması nörodejeneratif kaskatların temelinde yer almakta ve AH bu nedenle “Tip 3 Diyabet” olarak anılmaktadır.

2.5. Seladin-1

3-beta-hidroksisterol-delta-24-redüktaz (DHCR24) kolesterol biyosentezinin son basamağındaki desmosterolden kolesterol oluşum reaksiyonunu katalizleyen 60 kilodaltonluk (kDa) bir enzimdir (81). İnsanlarda DHCR24 mutasyonu, plazma ve dokularda desmosterol birikmesi, çoklu malformasyon ve zekâ geriliği ile karakterize otozomal resesif desmosterolosis hastalığına neden olur (82).

DHCR24 enziminin Alzheimer’lı hastalarda sağlıklı kişilerden alınan beyin örneklerine kıyasla daha az eksprese edildiği gösterilmiş, bunun üzerine bu enzim *Selective Alzheimer’s Disease Indicator-1* (Seladin-1) olarak isimlendirilmiştir (83, 84). Seladin-1 *down* regülasyonu görülen insan ve transgenik hayvan dokularında hiperfosforile tau miktarında artış vardır (84).

Seladin-1 geni heterozigot ve homozigot olarak silinmiş fareler üretilerek bu genin önemi ve fonksiyonları araştırılmıştır (85). DHCR24 $-/-$ farelerin doku ve plazmalarında neredeyse hiç kolesterol bulunmayıp total sterolün %99’u desmosteroldür. DHCR24 $-/-$ fareler, DHCR24 $+/-$ farelerden %10-17 olasılıkla üretilebilmiştir. Bu ihtimalin %25 olması beklendiğinden (85) DHCR24 $-/-$ farelerin doğmadan ölmüş olabileceği ileri sürülmüştür. DHCR24 $-/-$ fareler, DHCR24 $+/-$ ve DHCR24 $+/+$ farelerden %25 daha küçük doğmuştur. Hem dişi hem de erkek DHCR24 $-/-$ fareler yetişkin yaşa kadar sağlıklı farelerden daha düşük bir büyüme eğrisiyle olsa da yaşamışlardır ancak iki cins de infertildir. Bu hayvanların yaşam seyri- nin mutant DHCR24 geni taşıyan desmosterolosis hastalarına göre daha hafif olması farelerin aksine insanlarda hamilelik sırasında kolesterolün anneden bebeğe geçmemesi ile yorumlanmıştır (85). Daha sonra başka bir grup tarafından DHCR24 $-/-$ farelerin kolesterol eksikliğinden dolayı bir aydan daha fazla yaşayamadığı belirtilmiştir (86). DHCR24 $+/-$ farelerde seladin-1 mRNA’sı yabanıl türe göre %43,8 azalmış bulunmuş, DHCR24 $-/-$ farelerde ise hiç seladin-1 mRNA’sı

bulunmamıştır. Yabanıl türe kıyasla DHCR24 +/- farelerin beyinde membran kolesterolü %29, total kolesterol de %15 azalmışken; DHCR24 -/- farelerde yok denecek kadardır. Beyin desmosterol düzeyi heterozigot türde 5,7 kat; homozigot türde ise 50 kat artmış bulunmuştur (86).

Birçok çalışma, seladin-1'in akut ve kronik oksidatif strese karşı nöroprotektif etkilerini (87) ve anti-apoptotik özelliklerini ortaya koymuştur (83, 84, 88, 89). Greeve ve ark. (83) insan nörogloma H4 hücrelerinde yaptıkları bir çalışmada, seladin-1 ekspresyonunun A β ya da oksidatif stres sonucu aktifleşen kaspaz-3 enzimini inhibe ederek hücreleri apoptotik ölümden kurtardığını göstermiştir (83). Seladin-1 geni silinmiş farelerden elde edilen fibroblastlarda serum yoksunluğu yapıldığında hücrelerde kolesterolün ve insülin reseptörlerinin azaldığı ve apoptozise daha duyarlı hale geldiği görülmüştür (88). H₂O₂ uygulamasına cevap olarak oluşturulan reaktif oksijen türevleri seladin-1 sayesinde azalmış, seladin-1 bu H₂O₂ süpürücü etkisi nedeniyle oksidatif stresle gelişen apoptozise karşı koruyucu etki göstermiştir (89). Apoptotik koşullar altında insan nöroblastoma hücrelerinde seladin-1 ekspresyonunun azalması kaspaz-3 aktivitesinin artması ve BACE1'in parçalanmasında rol oynayan *Golgi-localized γ -ear-containing adenosine diphosphate-ribosylation factor-binding protein* (GGA3)'ün eksilmesi BACE1 düzeyinin ve aktivitesinin artmasına ve böylece A β birikmesine neden olmaktadır (90).

DHCR24 +/- farelerde görülen seladin-1 eksikliği kolesterol miktarını azalttığı için plazma membranındaki deterjan-dirençli bölgelerin dezorganizasyonuna neden olarak bu bölgede gerçekleşen plazminojen bağlanmasını ve plazmin aktivitesini azaltır (86). Plazminojen A β degrade edici enzim olan plazmini aktifleştirir. Ayrıca deterjan-dirençli bölgelerde bulunan BACE1 ve bu bölgelerin dışında bulunan APP etkileşimi, DHCR24 +/- hayvanlarda BACE1'in APP'nin bulunduğu membran bölgesine kayması yönünde değişmiştir. Sonuçta APP'nin β kesilmesi ve buna bağlı olarak A β 40 miktarı total beyin ekstraktlarında yabanıl farelere kıyasla %152 artmıştır (86). Yabanıl farelerde A β 42 miktarı ölçülemeyecek kadar az olduğundan DHCR24 +/- fareler ve Tg2576 SwAPP fareler çiftleştirilerek (*cross bred*)

SwAPP/Seladin-1 transgenik fareler üretilmiş ve bunlarda SwAPP farelere kıyasla A β 40'ın %270 ve A β 42'nin de %150 arttığı bulunmuştur (86).

İnsan nöroblastoma hücrelerinde seladin-1'in aşırı ekspresyonunun sağlanması ya da polietilen glikol-kolesterolü ile işlem görmesi hem total ve hem membran kolesterolünü artırırken (91) aynı hücrelerin seçici seladin-1 inhibitörleri olan 5,22E-kolestadien-3-ol ya da metil- β -siklodoktrin ile inkübasyonu her ikisini de azaltmıştır. Seladin-1'i aşırı eksprese eden ve membran kolesterol düzeyi artan hücrelerde A β 42 oligomerlerinin hücre membranına bağlanması azalmış, seladin-1 inhibitörleriyle işlem gören hücrelerin membranında ise A β 42 oligomerlerinin daha hızlı ve fazla miktarda biriktiği görülmüştür. Hücrelerdeki seladin-1 aktivitesini dolayısıyla membrandaki kolesterol miktarını değiştirmek A β 42 ile inkübe edilen hücrelerdeki hücre içi Ca⁺² artışını ve hücrelerin sağ kalımını değiştirmektedir (91).

Seladin-1'in estrogenin nöroprotektif etkilerinden sorumlu mediyatör olduğu ileri sürülmüştür (92-95). İnsan fetal nöroepitelyal hücrelerinde, estrogenin ve seçici estrogen reseptör modülatörlerinin α -estrogen reseptörleri aracılığıyla konsantrasyona bağımlı bir şekilde seladin-1 ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (92). Yine bu hücrelerde yapılan bir diğer çalışmada β -amiloid ve H₂O₂'nin toksisitesine karşı estrogenin gösterdiği koruyucu etki seladin-1 geninin susturulması ile ortadan kalktığı için seladin-1'in estradiolün koruyucu etkisinden sorumlu olduğu ileri sürülmüştür (93). Bu çalışmada ayrıca seladin-1'i kodlayan genin üzerinde estradiol cevap elementi ile homoloji gösteren bölgeler olduğu bildirilmiştir (93).

Diyabetik nöropatide sorumlu tutulan yüksek glukoz ve kontrol edilemeyen diyabettekine benzeyen aralıklı yüksek glukoz konsantrasyonunun seladin-1 üzerine etkilerinin fetal epitelyal hücrelerde araştırıldığı bir çalışmada (96) hem 20 mM devamlı hem de 20/10 mM aralıklı yüksek glukoz tedavisinin seladin-1 ekspresyonunu azalttığı, IGF-I'in ise seladin-1 mRNA düzeyini artırdığı bulunmuştur. Nöronlardaki farklılaşma, sağ kalım ve rejenerasyon açısından estrogenler ile IGF ailesinin bugüne dek bildirilen sıkı bağlantıları göz önünde bulundurularak, estrogen ile seladin-1 arasındaki ilişkiye benzer bir ilişkinin IGF-I sistemi ile seladin-1 arasında da olabileceği ileri sürülmüştür (94, 96).

Estradiol ve IGF-I dışında adrenokortikotropik hormon (97), tiroid hormonu (98), gonadotropin saliverdirici hormon (99), testosteron (100) ve DNA metilasyonu (101, 102) seladin-1 düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Hücre kolesterol homeostazını sağlayan bileşenlerden biri olan *Liver X* reseptörleri (LXR) de deride seladin-1 ekspresyonunu artırır (103). Hücre kolesterol homeostazını sağlayan bir diğer bileşen olan ve hücrede kolesterol ihtiyacı olduğunda aktifleşen *sterol regulatory element binding protein-2*'nin de seladin-1 transkripsiyonunu artırdığı, LXR'in bu düzenlemede bir katkısının olmadığı belirtilmiştir (104).

Tüm bunlara karşın Laura Sharpe ve ark. (105) 2012 yılında, yıllardır referans gösterilen çalışmayı (83) eleştirerek seladin-1'in AH için seçici bir indikatör olmadığını öne sürmüştür (105). Blalock'un yaptığı çalışmada (106) seladin-1'in değişmediğini, Iovenen ve Dunckley'in yaptığı çalışmalarda (84, 107) ise yalnızca tau yumaklarının olduğu alanlarda seladin-1 azalması görüldüğünü bildiren Sharpe ve ark. kendi çalışmalarında da AH'li ve sağlıklı kişiler arasında seladin-1 mRNA düzeyinde fark görmemiştir (105). Seladin-1 azalmasının AH'ye neden olmadığını ancak AH'ye sekonder geliştiğini ileri sürmüşler ve nöroprotektif etkileri artık tartışılmayan (104) bu enzim için AH seçici indikatörlüğünü tartışmaya açarak seladin-1 ismi yerine DHCR24 isminin yaygın olarak kullanılmasını önermişlerdir (105).

2.6. İnsülin Degrade Edici Enzim

AH patolojisinde A β 'nin üretimindeki aşırılık ya da eliminasyonundaki yetersizlik önemli rol oynar. Dolayısıyla A β 'nin aşırı üretiminin durdurulmaya çalışılması kadar, degrade edildiği yolların keşfedilmesi ve bu yolla A β 'nin azaltılmaya çalışılması da önem kazanmıştır. İDE insülinin hücre içine alınmasını takiben yıkan, 110 kDa'luk tiyol çinko-metalloproteaz yapısında bir enzimdir (108). Bugüne kadar İDE'nin yanı sıra, düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü ile ilişkili protein-1, neprilizin, endotelin dönüştürücü enzim, anjiyotensin dönüştürücü enzim, matriks metalloproteinaz-2, matriks metalloproteinaz-9, lizozomal katepsin-D ve nötral

endopeptidaz gibi moleküllerin A β eliminasyonunda rol aldığı gösterilmiştir (41, 108).

Nöronal ve nöronal olmayan hücre serilerinde A β degrade edici proteazlarla ilgili yapılan bir çalışmada bir mikroglia hücre serisinden saliverilen bir metalloproteazın İDE ile benzerlik gösterdiği, daha sonra bunun İDE olduğu tespit edilmiştir (109). Bu çalışmada İDE'nin mikroglia hücre serisinde sitozolde bulunduğu gibi hücrelerden vasata da salıverildiği gösterilmiştir. İDE hem endojen hem de sentetik A β 'yı degrade etmiştir (109). Bu hücreler lipopolisakkarit ile aktive edildiğinde saliverilen İDE'nin miktarı arttığından A β 'nın degrade edilme derecesinin fizyolojik ve patolojik durumlarda farklı seyredebileceği ileri sürülmüştür (109). Ayrıca sağlıklı insanlardan alınan beyin omurilik sıvısında İDE'nin varlığının gösterilmesi fizyolojik koşullarda da İDE'nin hücre dışına çıkarak A β degradasyonu yaptığını işaret etmektedir.

Çoğunlukla sitozolde ve peroksisomlarda bulunan İDE'nin (110) az miktarda da olsa endoplazmik retikulum ve plazma membranında yer aldığı, ayrıca hücre dışına salıverildiği de bilinmektedir (109, 111). Hem sıçan hem de insan beyinde İDE, esas A β degrade edici enzim olarak kabul edilir (112). İDE substratlarının konformasyon ve boyutlarının enzim tarafından tanınmalarında önemli olduğu, İDE'nin C ve N uçlarının substrat bağlanmasında rol aldığı ve bu uçların birbirinden uzaklaşması ya da yaklaşmasının substratın bağlanmasını düzenlediği gösterilmiştir (113). Substratların primer aminoasit diziliminde benzerlik olmasa da sekonder yapıları benzerlik gösterir (16). İDE başta insülin olmak üzere atriyal natriüretik peptid, glukagon ve A β gibi ortak bir amiloidojenik motif barındıran farklı substratları parçalar (108). AH'li ve sağlıklı kişilerden elde edilen sitozolik beyin homojenatlarında yapılan bir çalışmada İDE'nin insülin, *transforming* büyüme faktörü α , atriyal natriüretik peptid ve IGF-II gibi yüksek afiniteli ve glukagon, epidermal büyüme faktörü, IGF-I, endorfin ve A β analogları gibi düşük afiniteli substratlarının varlığı karakterize edilmiştir (108). Bu çalışmada aşırı insülin A β 40 ve A β 42'nin, A β türevleri de insülinin yıkımını karşılıklı olarak inhibe etmiştir (108). Substratların arasındaki yarışma İDE'nin yıkıcı etkisinde önemli bir rol oynar. İnsülin

daha hızlı ve öncelikle tercih edilen substrat olması nedeniyle hiperinsülinemi ve AH arasındaki ilişkide, İDE şüphelenen unsurlardan biridir. Aşırı insülinin İDE'ye karşı A β ile yarışarak onun yıkımını engellediği ve böylece AH'de görülen A β birikmesine neden olduğu ileri sürülmektedir (16).

AH'li kişilerin beyinlerinde A β yıkıcı kapasite yarı yarıya azalmışken, insülin yıkıcı kapasite %30 azalmıştır. Bu da İDE'nin hücrelerdeki metabolik anormalliklere bağlı olarak insülin ya da A β substratlarına afinitesinin değiştiğini düşündürmektedir (108).

Hafif bilişsel bozukluk gösteren kişilerin hipokampus dokusunun membran fraksiyonunda İDE düzeyi ve aktivitesi sağlıklı kişilere kıyasla düşüktür (114). AH evreleri ilerlemiş gruplarda İDE düzeyindeki ve aktivitesindeki azalma artmakta (114, 115) ve A β 42 içeriğiyle de negatif korelasyon göstermektedir (114). İDE azalmasının AH'nin Braak derecelendirmesine göre hastalığın erken evrelerinde dahi görülmesi, gelecekte İDE'nin biyobelirteç olarak kullanılmasını gündeme getirmiştir (116).

İDE geni homozigot olarak silinmiş fareler (İDE -/-) üretilerek bu genin önemi ve fonksiyonları araştırılmıştır (117). İDE -/- fareler 42 haftalık olana dek izlenmiş ve aynı yaştaki yabanıl fareler ile aralarında ağırlık farkı bulunmamıştır. Fertil olduğu bildirilen İDE -/- farelerin tüm dokularının histolojik incelemesi normal bulunmuştur. İDE -/- farelerin beyinlerinde İDE ++ farelere kıyasla hem membran hem de sitozolik fraksiyonda A β degradasyonunun önemli miktarda azaldığı gösterilmiştir. Benzer şekilde İDE -/- primer nöronal hücrelerde de A β degradasyonu %70-90 düzeyinde azalmıştır. İDE -/- farelerin beyinde A β 40 ve A β 42 birikmiştir. İDE -/- farelerde İDE ++ farelere kıyasla, karaciğer ve beyin membran ve sitozolik fraksiyonunda insülin degradasyonu da azalmıştır. İDE -/- fareler sürekli olarak İDE eksikliğiyle yaşamlarını sürdürdüklerinden serum insülin düzeyi yabanıl farelere kıyasla 2,8 kat artmıştır. Bu farelerin açlık kan glukoz düzeyleri yabanıl farelere göre değişmezken, glukoz yüklemesi yapıldığında glukoz intoleran oldukları da gözlenmiştir (117).

İDE geni hem homozigot hem de heterozigot olarak silinmiş fareler (İDE -/- ve İDE +/-) üretilerek yapılan bir diğer çalışmada da bu farelerin genel fenotipinin sorunsuz olduğu ancak A β degradasyonunda yabanıl farelere (İDE ++) göre azalma

olduğu bildirilmiştir (111). İDE +/- farelerin beyinlerinde İDE mRNA, protein ve aktivite düzeyi yabanıl hayvanların %50'si kadar bulunmuştur. İDE -/- ve +/- farelerde gen miktarı ile orantılı azalan A β degradasyonu gösterilmiştir. Heterozigot farelerde bile görülen A β degradasyon azalmasından yola çıkan araştırmacılar İDE düzeyini %50 azaltacak bir mutasyonun bile AH için tetikleyici bir faktör olacağını çünkü İDE'nin fonksiyonunu kompanse eden bir mekanizmanın olmadığını ileri sürmüşlerdir (111).

Nöronlarında insan İDE geni aşırı ekspresyonu sağlanmış bir transgenik hayvan modelinde A β düzeylerine etkinin araştırılabilmesi için bu fareler APP aşırı ekspresyonu yapan bir diğer transgenik fare ile çiftleştirilmiştir (118). Elde edilen transgenik farelerde (2XİDE+APP) yalnızca APP aşırı ekspresyonu yapan gruba kıyasla A β yıkımında %100 artış görülmüş A β 40 ve A β 42 düzeyleri daha düşük bulunmuştur (118).

Glukoz tolerans testinde en yüksek kan glukoz seviyesine sahip olan sıçanların *inbred* çiftleştirilmesiyle elde edilmiş olan bir T2DM modeli (Goto-Katizaki-GK sıçanları) İDE geninde mutasyon olduğu fark edilmiştir (119). Bu mutasyonlar %31 düzeyde İDE fonksiyon kaybına neden olmuştur. GK sıçanların beyinlerinin çözünür ve membranal fraksiyonlarında; bu modelden elde edilen fibroblastlarda ve primer nöronlarda yabanıl sıçanlara kıyasla hem A β hem de insülin degradasyonunda azalma görülmüştür. Bu modelde yapılan hücre kültürü vasatında A β 40 ve A β 42 biriktiği görülmüştür. Ancak GK sıçanların beyinlerinde 14 haftalık olana dek A β birikmemiştir. Araştırmacılar A β 'nin eliminasyonunda *in vivo* koşullarda mikrogliaların, astrositlerin ve kana transferin de rol oynadığını belirtmiş ve geç gelişen bu durumu hastalardaki geç gelişen AH'ye benzetmişlerdir. İDE mutasyonunun neden olduğu İDE fonksiyon kaybı T2DM ve geç gelişen AH'de rolü olduğu düşünülen ortak bir hedef gibi gözükmektedir (119).

İDE protein ve mRNA düzeyleri AH'li hastaların beyinlerinde sağlıklı kişilere göre azalmıştır (120). AH'li kişilerin beyin omurilik sıvısında ise sağlıklı kişilere kıyasla insülin azalmış, plazmalarındaki insülin ise artmış bulunmuştur. AH ne kadar ilerlemiş ise beyin omurilik sıvısındaki insülin azalması o kadar şiddetlidir (54, 67). AH'li hastalardaki insülin ve İDE azalmasındaki bu paralellik göz önünde

bulundurulması ile insülinin, insülin reseptör yolağı üzerinden negatif bir *feedback* mekanizması ile İDE ekspresyonunu düzenleyip düzenlemediğı araştırılmıştır (121). Primer hipokampal nöronlarda yapılan çalışmada İDE ekspresyonunun artan insülin konsantrasyonuna paralel olarak arttığı gösterilmiştir (121). Çeşitli inhibitörler kullanılarak bu düzenlemenin insülin reseptör yolağında yer alan PI3K aracılı olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada AH'li hastaların hipokampus ve temporal korteksinde sağlıklı kişilere kıyasla daha az İDE bulunmuştur (121). Ayrıca aspir yağı içeriğı yüksek diyetle beslenen Tg2576 farelerde de insülin sinyal yolağındaki bozukluklarla korele şekilde İDE düzeyi azalmıştır (121).

İDE düzenlenmesinde peroksizom proliferatör ile aktifleşen reseptör γ (PPAR- γ)'nin da rolü vardır (122). PPAR- γ agonisti ile tedavi edilen hipokampal ve serebellar nöronlarda İDE mRNA ve protein düzeyinde artış görülürken, PPAR- γ antagonisti ile azalma görülmüştür. İnsülinin İDE ekspresyonunu PI3K aracılığıyla artırmasını (121) PPAR- γ 'nin da dahil olduğu bir hücre içi yolak üzerinden gerçekleştirdiğini ileri sürmüşlerdir (122).

Tg2576 farelerde İDE düzenlenmesinin araştırıldığı bir diğer çalışmada, yağ içeriğı yüksek (%60) diyetle beslenerek vücut ağırlığı artışı, hiperinsülinemi ve glukoz intoleransı geliştiğı gösterilip insülin direnci oluşturulmuştur. Hipokampusunda A β 40 ve A β 42; serebral korteksinde A β plakları artmış olan insülin direnci geliştirmiş bu farelerin uzaysal öğrenmeleri azalmış, insülin reseptör sinyal yolakları bozulmuş ve İDE düzeyleri azalmıştır (123).

APP aşırı ekspresyonu yapan transgenik farelerde ve yabanıl farelerde STZ ile oluşturulmuş diyabetin 12 hafta sonunda bilişsel fonksiyonları bozduğu ve AH'ye özgü belirteçleri artırdığı gösterilmiştir (37). Bu çalışmada STZ ile DM oluşturulmuş grupta ve APP aşırı ekspresyonu yapan grupta yabanıl farelere kıyasla İDE düzeyleri yaklaşık %20 azalmıştır. APP aşırı ekspresyonu yapan STZ'li grupta İDE düzeyleri ise yabanıl farelere kıyasla %30 azalmıştır (37).

Primer hipokampal hücre kültüründe yapılan bir çalışmada 17 β -estradiol (17 β -E2)'nin zamana bağımlı olarak İDE mRNA ve protein düzeyini artırdığı bildirilmiştir (124). Seçici α -estrogen reseptör agonisti propilprazol-triol ile değil

ancak seçici β -estrogen reseptör agonisti diarilpropionitril ile görülen İDE artışı, 17β -E2'nin İDE üzerine etkisini β -estrogen reseptörü aracılığıyla yaptığını gösterir. 17β -E2'nin İDE artışını PI3K inhibitörleri (wortmanin ve LY-294002) varlığında gösterememesi 17β -E2 tarafından İDE düzenlenmesinde PI3K aktivasyonunun rol aldığını düşündürür. Dişi sıçanlarda overektomi uygulandığında hipokampusta İDE ekspresyonu azalmış ve 17β -E2 tedavisi ile bu azalma düzelmiştir (124). Üç farklı gen (APP-İsveç, presenilin1-M146V ve tau-P301L) üzerinde değişikliğin yapıldığı transgenik AH modeli farelerde (3xTg-AD) yaşla birlikte A β birikirken hipokampusta İDE düzeyi azalmıştır. Overektomi yapılmış 3xTg-AD farelere 17β -E2 uygulanması hipokampustaki azalmış İDE düzeyini düzeltmiş ve A β plaklarını azaltmıştır (124).

STZ'nin intraperitoneal olarak 30 mg/kg uygulandığı bir çalışmada sıçanların hipokampusundaki İDE düzeyi yaklaşık %25 azalmış, A β 42 miktarı ise 2 katına çıkmıştır (125). İ.s.v STZ enjeksiyonu yapılmış sıçanların bilişsel performanslarının bozulduğu ve hipokampusta İDE düzeyinin azaldığı görülmüştür (68). Aynı grubun yaptığı bir diğer çalışmada i.s.v olarak uzun etkili insülin analogu detemir enjeksiyonu i.s.v STZ enjeksiyonu grubunda görülen bilişsel bozuklukları önlediği gibi hipokampustaki İDE, insülin reseptörü ve AKT düzeylerini de artırmıştır (126). İ.s.v detemir tedavisi, STZ ile oluşturulmuş ve araştırmacıların 'beyin diyabeti' diye adlandırdığı modelde ciddi miktarda artmış olan A β düzeyini de kontrol düzeyine düşürmüştür (126). Araştırmacılar buradan yola çıkarak insülinin bilişsel bozuklukların iyileştirilmesinde umut verici olduğunu ileri sürmektedir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü İnkübasyon Grupları

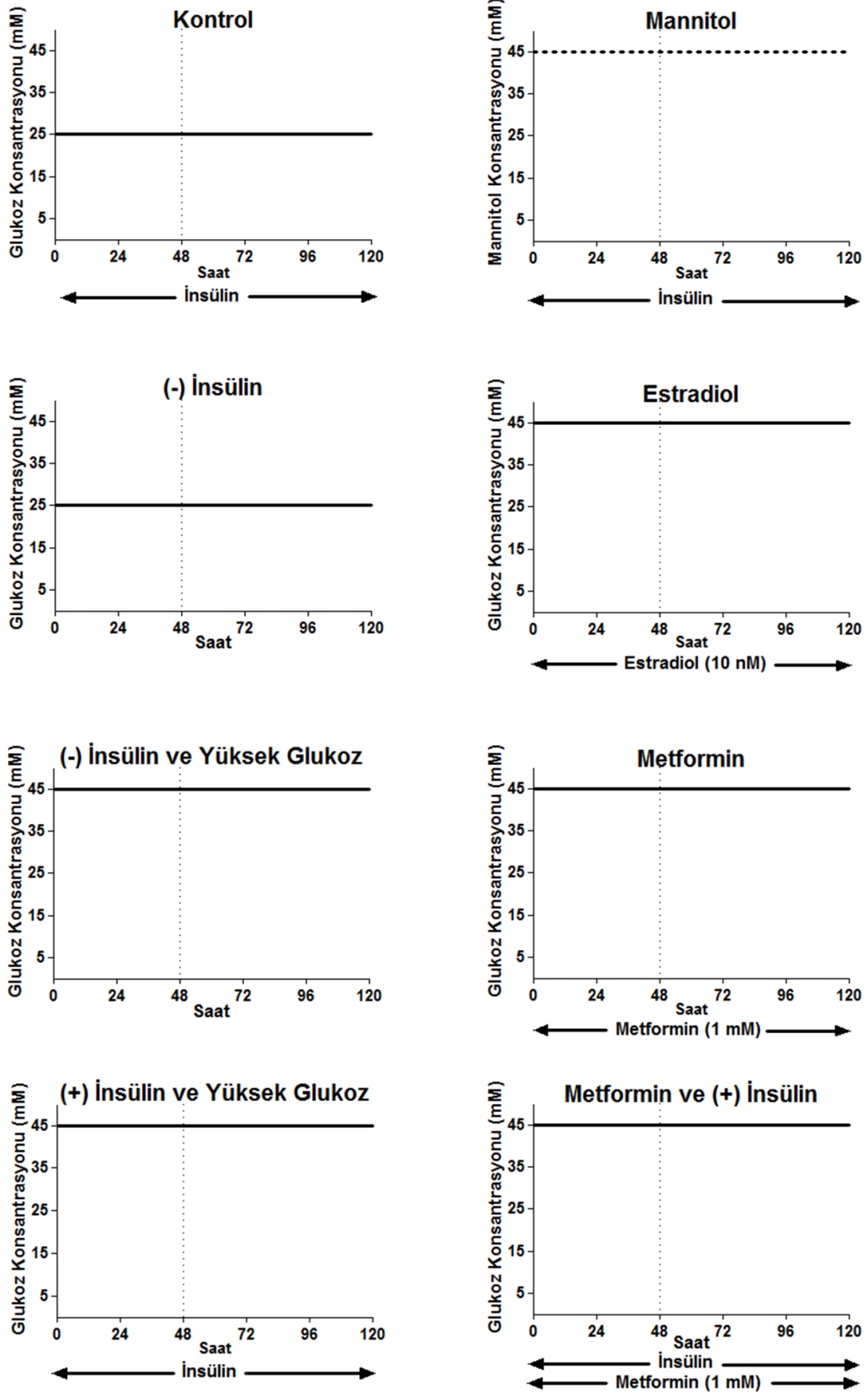
Hücre kültüründe inkübasyon süreleri yapmış olduğumuz ön deney sonuçlarına göre akut ve kronik diyabetin taklidi için sırasıyla 48 saat ve 5 gün olarak belirlendi. Nöronların hücresel özellikleri nedeniyle yüksek glukoz ihtiyaçları dikkate alınarak normal glukoz konsantrasyonu 25 mM, yüksek glukoz konsantrasyonu ise 45 mM olarak belirlendi (127, 128). İnsülin içeren vasat ile inkübe edilen gruplar için nöronal hücre kültürü vasatı *suplemanı (B-27 Supplement)*, insüliniz inkübasyon gruplarında ise aynı *suplemanın* insülin içermeyen formu (*B-27 Supplement Minus Insulin*) kullanıldı.

Yüksek glukoz inkübasyonunun neden olacağı hiperozmolariteye eş değer ozmolarite artışı sağlamak için mannitol (45 mM) ile inkübasyon grubu oluşturuldu.

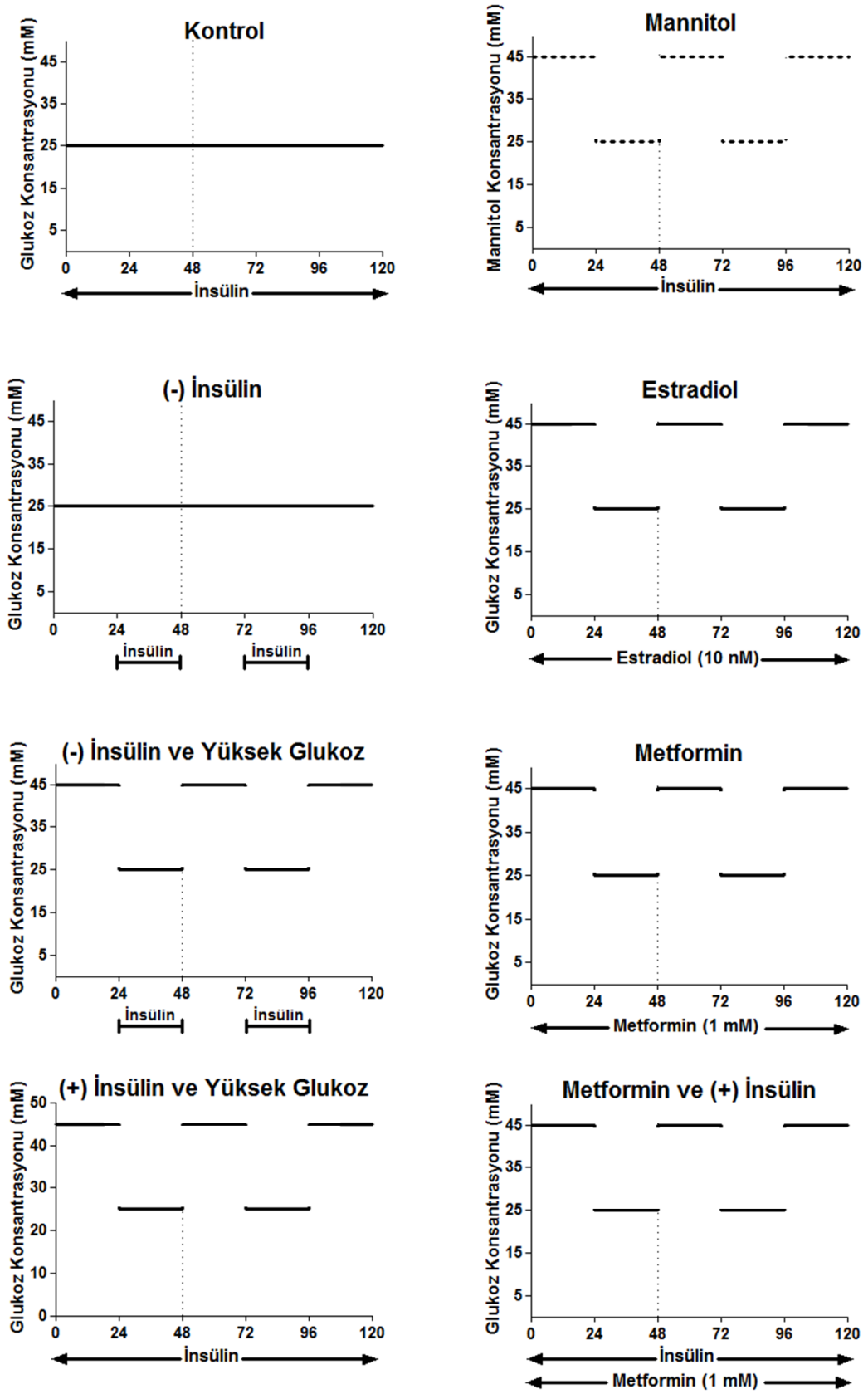
Kan glukoz düzeyleri kontrol edilemeyen diyabeti taklit etmek amacıyla yüksek glukozlu vasat ile aralıklı (*intermittent*) biçimde inkübe edilen bir grup oluşturuldu. Bu grupta her 24 saatte bir normal glukoz (25 mM) içeren vasat yüksek glukoz içeren vasatla (45 mM) değiştirildi. Aynı şekilde her 24 saatte bir insülin içermeyen vasat insülinli vasatla değiştirildi.

Estradiolün nöroprotektif etkileri düşünülerek diyabet taklidi yapılan gruplarda eş zamanlı olarak devamlı estradiol inkübasyonu (10 nM) yapıldı (92, 124).

Bir diğer diyabet grubunda ise metformin (1 mM) inkübasyonu uygulandı (129). Hücre kültüründeki tüm gruplar Şekil 3.1. ve Şekil 3.2.'de özetlenmiştir.



Şekil 3.1. 48 saat ve 5 gün devamlı inkübasyon grupları.



Şekil 3.2. 48 saat ve 5 gün aralıklı inkübasyon grupları.

3.2. Sıçan Primer Hücre Kültürü

Primer hücre kültüründeki tüm uygulamalar Karolinska Enstitüsü yerel etik kurulu izni ile (Etik Kurul karar no: S194-1) ulusal ve yerel hayvan bakım kullanım kurallarına uygun bir şekilde gerçekleştirildi. Tüm uygulamalar sırasında hayvanların acı çekmeleri en aza indirilmeye çalışıldı.

Charles River Laboratuvarından sağlanan gebe sıçanlar Karolinska Enstitüsü Hayvan Ünitesinde 1 hafta barındırıldıktan sonra gebeliklerinin 21. gününde CO₂ solutularak bayıltılıp dekapite edildi. Anneden izole edilen sıçan embriyoları da dekapite edildi ve kafaları buz içindeki *neurobasal* vasatına alındı. Embriyoların kortikal ve hipokampal dokuları laminar akışlı kabinde mikroskop altında izole edilerek dokulara özgü olacak şekilde farklı tüplerde birleştirildi. Dokular yenilenen serumuz *neurobasal* vasatı içinde vasatın pipetle çekilip bırakılması suretiyle mekanik olarak homojenize edildi. Hücreler daha önceden poli-D-lizin ile kaplanmış 6 kuyucuklu plaklara ekildi. İmmünohistokimya yapılacak deneylerde ise poli-D-lizin ile kaplanmış 24 kuyucuklu plaklar kullanıldı. Nöronların canlılığını koruyabilmeleri için %2 B27 *suplemanı*, %1 penisilin-streptomisin (10000 U/mL) ve %0,25 Glutamaks eklenerek hazırlanan *neurobasal* vasatı kullanıldı. Bu vasat özellikle nöronların canlılıklarını korumalarını, astrosit ya da glia gibi diğer hücrelerin canlılıklarını yitirmelerini sağlayan bir özellik taşıdığı için elde edilen sonuçlar yalnızca nöronlardan oluşan hücre topluluğundan alınmış kabul edildi. Hücreler 37°C'de ve %95 hava - %5 CO₂ içeren bir hücre kültürü atmosferinde tutuldu ve vasatlar her 3-4 günde bir değiştirildi, nöronların canlılıkları ya da kontaminasyon olup olmadığı mikroskop altında incelenerek takip edildi. Nöronlar, farklılaşım olgunlaşmalarının ardından (genellikle 14. gün) deney için kullanıldı. Nöronlar 48 saat ve 5 günlük inkübasyon süreleri sonunda toplandı ve 4°C'de 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pelletler deney gününe kadar -20°C'de muhafaza edildi.

3.3. Deneysel Diyabetin Oluşturulması

Deneylerde Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Biriminden sağlanan dişi Wistar (200-250 g) sıçanlar kullanıldı. Hayvanlar su ve yem kısıtlaması olmaksızın 12 saat aydınlık/12 saat karanlık periyoduna göre Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında barındırıldı. Çalışmalarda canlı omurgalı deney hayvanı kullanmak için Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulundan gerekli izin alındı (Karar no: 2013/18-09).

Diyabet oluşturmak için çalışmanın başlangıcında ağırlıkları ölçülen sıçanlara 0,1 M sitrat tamponu (pH 4,5) içinde çözölen STZ (65 mg/kg) intraperitoneal yoldan uygulandı (130). Kontrol gruplarına STZ çözücüsü olan sitrat tamponu enjeksiyonu yapıldı. Diyabet grubu sıçanlara standart diyetin yanında enjeksiyonu takip eden 24 saat süresince içme suyu olarak %10'luk glukozlu su verildi. 72. saatin sonunda hayvanların kan glukoz düzeyleri ölçöldü. Kan glukoz konsantrasyonu ≥ 250 mg/dL olan hayvanlar diyabetik (DM grubu) kabul edildi. Kan glukoz konsantrasyonu kuyruk veninden alınan kanın glikofilm üzerine damlatılarak, glukoz oksidaz yöntemi ile oluşun renk şiddetinin kan glikometresinde okunması yolu ile ölçöldü.

Estrojenin rolünü değerlendirebilmek amacı ile bir grup sıçana overektomi yapılarak en önemli estrojen kaynağı olan overler uzaklaştıırıldı. Bu cerrahi operasyon ketamin/ksilazin (90/10 mg/kg, intraperitoneal) ile oluşturulan derin anestezi altında gerçekleştirildi. Sıçanların sırt bölgesinde iki tarafta da oluşturulan küçük kesilerden yağ dokusunun bir kısmının vücut dışına çıkarılmasının ardından ulaşılan overler kesilerek uzaklaştıırıldı. Kesiler dikiş atılarak kapatıldı. Overektomili hayvanların (OVX grubu) kontrol grubu için *sham* operasyon uygulandı. Bu gruptaki hayvanlara derin anestezi altında overektomi grubunda yapıldığı gibi iki tarafa da kesi açıldı. Yağ dokusunun bir kısmı ve overler vücut dışına çıkarıldı ancak kesilmedi, kesiler dikiş atılarak kapatıldı. Overektomi ve diyabetin bir arada olduğu başka bir grup (OVX+DM grubu) daha oluşturuldu. Bu sıçanlara overektomiden 4 hafta sonra STZ enjekte edilerek diyabet de olmaları sağlandı. Diyabet grubunda uygulanan tüm işlemler bu grup için de tekrarlandı. Bu grubun kontroluna *sham* grubuna yapılan

işlemlerin aynısı uygulandıktan 4 hafta sonra yalnızca sitrat tamponu enjeksiyonu yapıldı.

STZ enjeksiyonundan 12 hafta sonra ağırlık ve kan şekerleri yeniden ölçülen tüm gruplar CO₂ solutulduktan sonra dekapite edildi. Korteks ve hipokampus dokuları önceden hazırlanıp dondurulmuş beyin omurilik sıvısı üzerinde izole edildi ve hızlıca sıvı azot içine alındı. Dokular deney gününe kadar -80°C derin dondurucuda muhafaza edildi.

3.4. *Western Blot* Analizleri

Hücre kültüründe elde edilen ve deney gününe kadar derin dondurucuda muhafaza edilen nöronlar içine kondukları lizis çözeltisinin pipetle çekilip bırakılmasıyla; hayvanların korteks ve hipokampus dokuları ise 20 sn'de bir soğutularak toplamda 1 dakika boyunca ultrasonik homojenizatör yardımıyla uygun lizis çözeltisi içinde homojenize edildi. Hücre kültüründen elde edilen pelletlerde pelletin büyüklüğüne göre 60-80 µL, dokularda ise dokunun mg olarak ağırlığının 10 katı hacimde (µL) lizis çözeltisi kullanıldı. Soğutmalı santrifüjde 13000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenip süpernatantları saklandı. Pierce sığır serum albumin kiti kullanılarak protein tayini yapıldı. Yükleme çözeltisi eklenip 90°C'de 5 dakika ısıtılıp eşit miktarda yüklenen (hücre kültürü deneylerinde 10-20 µg, doku homojenatlarında 20-30 µg) proteinler %10'luk sodyum dodesil sülfat (SDS) poliakrilamid jellerde Biorad PowerPac 300 cihazı kullanılarak elektroforez yöntemiyle ayrıldı. Proteinler yine elektroforez yöntemiyle nitroselüloz membranlara transfer edildi. Transfer sonunda eşit miktarda protein yüklemesi yapıp yapılmadığının ve transfer verimliliğinin değerlendirilebilmesi için membranlar *Ponceau S* çözeltisi ile boyandı. Membranlar TBS-T ile yıkanıp *Ponceau S* boyaması uzaklaştırıldı. Membranlar nonspesifik bağlanma noktalarının kapatılması için TBS-T içinde hazırlanmış %5'lik yağsız süt tozu çözeltisi ile 2 saat boyunca oda sıcaklığında bloklandı. Bloklamanın ardından membranlar Tablo 3.2.'de belirtilen primer antikolar ile 4°C'de gece boyunca inkübe edildi. Primer antikor ile inkübasyonu takiben 2 saat boyunca oda sıcaklığında 1:10000 *anti-rabbit* ya da *anti-mouse* sekonder antikorla inkübe edildi.

İnkübasyon süresi sonunda membranlar güçlendirilmiş ışımaya reaktifleri (ECL) ile muamele edilerek immünoreaktif bantlar görünür hale getirildi. Bantların optik yoğunlukları ImageJ programı kullanılarak görece *arbitrary* birim olarak saptandı. β -aktin antikoru internal kontrol olarak kullanıldı (Tablo 3.2.). Gerekli görülen membranlarda sıyırma (*stripping*) yapılarak diğer primer antikolarla inkübe edildi. Sıyırma işlemi için sıyırma çözeltisi ile 15 dakika 37°C'de bırakılan membranlar TBS-T ile 3 kez 10 dakika yıkanarak sıyırma çözeltisinin iyice uzaklaşması sağlandı. Otuz dakika kadar yağsız süt tozu çözeltisi ile bloke edilerek inkübasyon işlemleri baştan itibaren tekrarlandı.

3.5. Gerçek Zamanlı Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizleri

Total RNA, *Qiagen-RNeasy mini kit* kullanılarak primer sıçan nöronal kültüründen ekstre edildi. Bu kit RNA'ların seçici bağlanma özelliği gösteren bir silika membran üzerine santrifüj gücüyle bağlanması prensibine göre çalışır. Etanol bu bağlanmanın gerçekleşmesi için uygun ortamı sağlar. Nöronlardaki total RNA membrana bağlanırken kalan hücre kısımları uzaklaştırıldı. Total RNA ise 30-100 μ L su içinde seyreltildi. RNA örnekleri agaroz jelde yürütülerek DNA kontaminasyonu olup olmadığı kontrol edildi. Yüksek kapasiteli *cDNA Reverse Transcription Kit* kullanılarak komplementer deoksiribonükleik asit (cDNA) elde edildi. Gerçek zamanlı ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (*Real-time RT-PCR*) amplifikasyon testi için göreceli standart yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde sıçan ya da fareden elde edilmiş örneklerden göreceli bir standart eğri oluşturulur ve bu standartlar birçok plakta kullanılabilir. Bilinmeyen örneklerin ve standartların yüklendiği plaklarda her bir örneğin mRNA miktarı *cycle threshold* (Ct) değeri hesaplandı ve standartların Ct değerlerinden oluşturulan standart eğriye göre göreceli değerleri hesaplandı. Hedef genlerin ve endojen kontrol genlerin ölçümleri farklı PCR reaksiyonlarıyla yapıldı. Termal siklus ve floresans ölçümü *TaqMan* gen ekspresyon analizi protokolüne göre ABI PRISM 7000 Sekans Deteksiyon Sistemi kullanılarak yapıldı. Her bir kuyuya 10 μ L *PCR Master Mix*, 10 ng RNA'ya karşılık gelecek 2 μ L cDNA, 1 μ L primer ve 7 μ L PCR için

su eklenerek toplam 20 µl yüklendi. Kullanılan primerler gene uygun olarak, reaksiyon sayısı düşünülerek ve çalışılacak hayvan türü göz önünde bulundurularak *ThermoScientific* kataloğundan seçildi ve primerlere ilişkin bilgiler Tablo 3.2.'de belirtildi. Hedef genlerin (Seladin-1, İDE ve BACE1) mRNA kopya sayısı endojen kontrol geni olarak kullanılan RPLPO mRNA kopya sayısı ile normalize edildi. Değerler kontrol grubuna kıyasla ve ortalama \pm standart hata olarak verildi.

3.6. Kolesterol ve Desmosterol Ölçümleri

Beş gün devamlı inkübasyondan sonra toplanan primer kortikal nöronlarda kolesterol ve desmosterol düzeyleri gaz kromatografisi/kütle spektrometresi yöntemiyle Björkhem ve ark. (131) tarafından ölçüldü.

3.7. İmmünohistokimya Analizleri

İmmünohistokimya analizleri primer sıçan hipokampal nöronları kullanılarak yapıldı. Nöronlar 20 dakika boyunca paraformaldehit ile fikse edildi. Nöronlar öncelikle primer antikorla gece boyunca, daha sonra 30 dakika sekonder antikorla (*Alexa fluor 488 chicken anti-rabbit*) inkübe edildi. Hücre çekirdekleri 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) ile boyanarak gösterildi. Negatif kontrollarda primer antikorla inkübasyon dışındaki işlemler tekrar edildi. Konfokal görüntüleme Zeiss LSM 510 META konfokal lazer tarama sistemi ile gerçekleştirildi. DAPI ve Alexa 488 floresanları farklı kanallar aracılığıyla ve 40X büyütmede kaydedildi. Her bir inkübasyon grubundan 6 adet örnekten fotoğraf çekilerek aralarından grubu en iyi temsil eden fotoğraf seçildi ve *Photoshop* programı kullanılarak kırmızı renkte boyamalar dışındaki tüm boyamalar kaldırıldı. Böylece kırmızı boyama yapılan ilgilendiğimiz proteinler yalnız bırakılarak gruplar arasında daha kolay karşılaştırma yapılması sağlandı.

3.8. Hücre Canlılığı

Hücre canlılığı 4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi ile kontrol edildi. Bu yöntemde MTT, metabolik olarak aktif hücreler tarafından

nikotinamid adenin dinükleotit hidrojen, nikotinamid adenin dinükleotit fosfat hidrojenine indirgenir ve reaksiyonun sonunda renkli formazan kristalleri oluşturur. Renk değişikliği spektrofotometre kullanılarak 540 nm’de okunur. Üretilen formazan miktarı canlı hücre sayısı ile doğru orantılı olarak artar.

3.9. İstatistiksel Analiz

Veriler ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. Çoklu gruplar arasındaki karşılaştırmalarda iki yönlü varyans analizi (ANOVA) yapıldı ve *post hoc* olarak da Bonferroni testi yapıldı. İki grup arasındaki karşılaştırmalarda da Student’ın t testi kullanıldı. Analizler Graphpad Prism 5.0 yazılımı kullanılarak yapıldı. Tüm istatistiksel karşılaştırmalarda $P < 0,05$ ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.10. Deneylerde Kullanılan Çözelti, İlaç ve Reaktifler

Tablo 3.1. Deneylerde kullanılan çözeltiler.

Çözelti	İçeriği
Lizis çözeltisi (pH 7,4)	50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, %1 triton X-100, 1:500 proteaz inhibitörü, 1:100 fosfataz inhibitörü
(1 L için 1X dilüsyonda)	
Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8)	60,6 g Tris Baz
Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8)	181,7 g Tris Baz
(500 mL için 1X dilüsyonda)	
Beyin omurilik sıvısı	3,51 g NaCl, 0,093 g KCl, 0,25 g MgSO ₄ , 0,147 g CaCl ₂ , 1,092 g NaHCO ₃ , 0,098 g NaH ₂ PO ₄ , 0,991 g glukoz
Sıyırma çözeltisi	100 mL %10'luk SDS, 62,5 mL Tris-HCl 0,5 M, 338 mL distile su, 3 mL β -merkaptoetanol
(1 L için 10X dilüsyonda)	
Sürükleme çözeltisi	30,3 g Tris-Baz, 144 g glisin, 15 g SDS (100 mL stok 900 mL distile su ile 1X'e dilüe edilir.)
Transfer çözeltisi (pH 8,3)	30 g Tris-Baz, 144 g glisin (200 mL stok, 200 mL metanol ve 600 mL distile su ile 1X'e dilüe edilir.)
TBS-T (pH 7,4)	60,5 g Tris-Baz, 87,6 g NaCl (100 mL stok 900 mL distile su ile 1X'e dilüe edilir ve %0,1 Tween-20 eklenir.)
(10 mL için 1X dilüsyonda)	
Yükleme çözeltisi	3,2 mL Tris-HCl 0,5 M, 4 mL %10'luk SDS, 2 mL gliserol, 500 μ L 100 mM EDTA, 200 μ L bromofenol mavisi, 100 μ L distile su, 150 mg DTT

Deneylerde kullanılan çözelti ve reaktifler Tablo 3.1.'de gösterilmiştir.

Ketamin Pfizer İlaçları Limited Şirketi, ksilazin Ege Veteriner Hayvancılık Sanayi ve Ticaret Limited Şirketi, Türkiye'den temin edildi. Metformin Abdi İbrahim ilaç firması tarafından hibe edildi. Poli-D-Lizin (P6407), estradiol (E8875), proteaz inhibitörü (P8340) ve fosfataz inhibitörü (P0044), *Poncea S* (P7170), MTT tozu (M5655), Trizma baz (T1503), DAPI (D9542), SDS (L4390), amonyum persülfat (A3678), glisin (G7126), metanol (32213), agaroz (A9539), NaCl (S7653), sığır serum albumini (A9647), paraformaldehit (47608), süt tozu (70166), gliserol (G5516), bromofenol mavisi (B0126), STZ (S0130) Sigma St. Louis, Missouri'den alındı. *Neurobasal* (21103049), penisilin-streptomisin (10000 U/mL) (15140122), Glutamaks (35050-61), *B27 suplemanı* (17504-044), *B27 Supplement Minus* insülin (A1895601), ribonükleaz inhibitörü (N8080119), MuVL ters transkriptaz (N8080118), Taqman Universal PCR Master Mix (4364338), nükleaz içermeyen su (R0582), Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (A11034), Pierce BSA Protein tayini kiti (23225) ve Pierce ECL Western Blot Substratı (32106) Life Technologies, Carlsbad, Kaliforniya'dan alındı. Akrilamid (0311) Amresco, TEMED (1610801) Biorad, Hercules, Kaliforniya'dan alındı. RNeasy mini kit (74106), ribonükleaz içermeyen deoksiribonükleaz seti (79254) Qiagen, Hilden, Almanya'dan alındı. ECL deteksiyonu için hiperfilm (Amersham, 28906836) GE Healthcare Life Sciences, Hilden, Almanya'dan alındı.

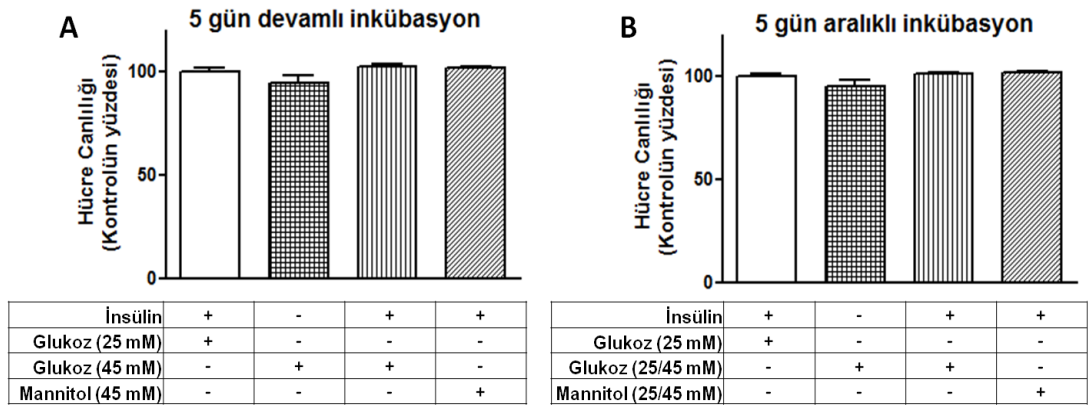
Tablo 3.2. Deneylerde kullanılan antikorlar.

	Antikorlar		PCR Primerleri	
	Ab	Şirket	Primer	Şirket
Seladin-1	Orb6782	Biorbyt	Rn01417370_m1	Life Technologies
İDE	Ab32216	Abcam	Rn00565839_m1	Life Technologies
BACE1	Ab2077	Abcam	Rn00569988_m1	Life Technologies
Aktin	A2066	Sigma	-	-
RPLPO	-	-	Rn03302271GH	Life Technologies

4. BULGULAR

4.1. Hücre Kültüründe Uygulanan İşlemlerin Hücre Canlılığına Etkisi

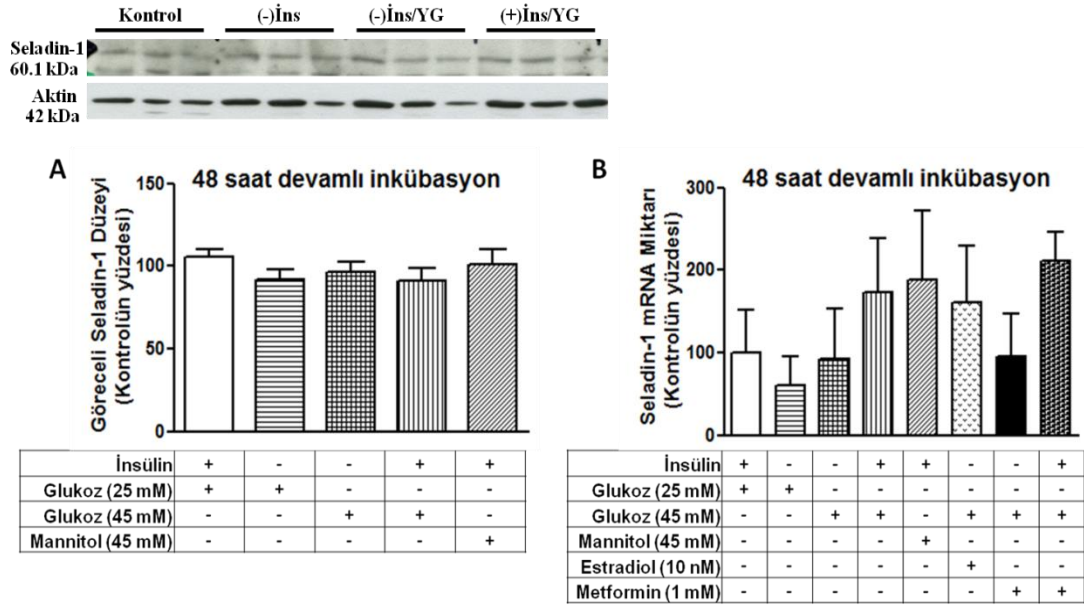
Beş gün devamlı ya da aralıklı yüksek glukoz inkübasyonunun insülin varlığında ya da yokluğunda hücrelerin canlılığı üzerine olumsuz bir etkisi olmadı. Mannitol inkübasyonunun da hücre canlılığına zarar vermediği görüldü (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Sıçan korteks nöronlarından elde edilen primer hücre kültüründe 5 gün devamlı (A) ve aralıklı (B) yüksek glukoz inkübasyonunun hücre canlılığına etkisinin MTT testi ile gösterilmesi (n=6).

4.2. Hücre Kültüründe 48 saat Devamlı İnkübasyonun Seladin-1 Protein ve mRNA Düzeyine Etkisi

Kırk sekiz saat devamlı inkübasyon seladin-1 protein ve mRNA düzeyinde anlamlı bir değişiklik yapmadı (Şekil 4.2.).

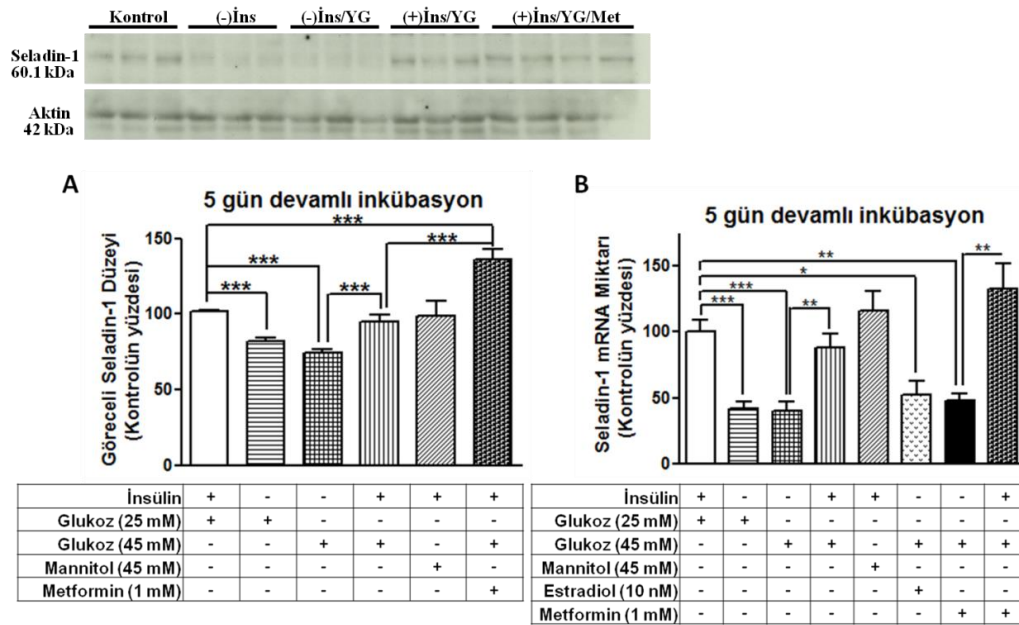


Şekil 4.2. Siçan korteks nöronlarından elde edilen primer hücre kültüründe 48 saat devamlı inkübasyonun seladin-1 protein (**A**) ve mRNA (**B**) düzeyine etkisi (**A**: n=4-6, **B**: n=3).

4.3. Hücre Kültüründe 5 gün Devamlı İnkübasyonun Seladin-1 Protein ve mRNA Düzeyine Etkisi

Beş gün devamlı inkübasyondan sonra (-)insülin ve (-)insülin/yüksek glukoz gruplarında seladin-1 protein düzeyi kontrola göre sırasıyla %18,20 ve %25,53 azaldı (Şekil 4.3.A). (+)insülin/yüksek glukoz grubunda ise seladin-1 düzeyi değişmedi (Şekil 4.3.A). Mannitol grubunda da değişiklik saptanmadı. Metformin/(+)insülin grubunda seladin-1 düzeyi hem kontrola hem de (+)insülin/yüksek glukoz grubuna kıyasla sırasıyla %35,91 ve %42,10 arttı (Şekil 4.3.A).

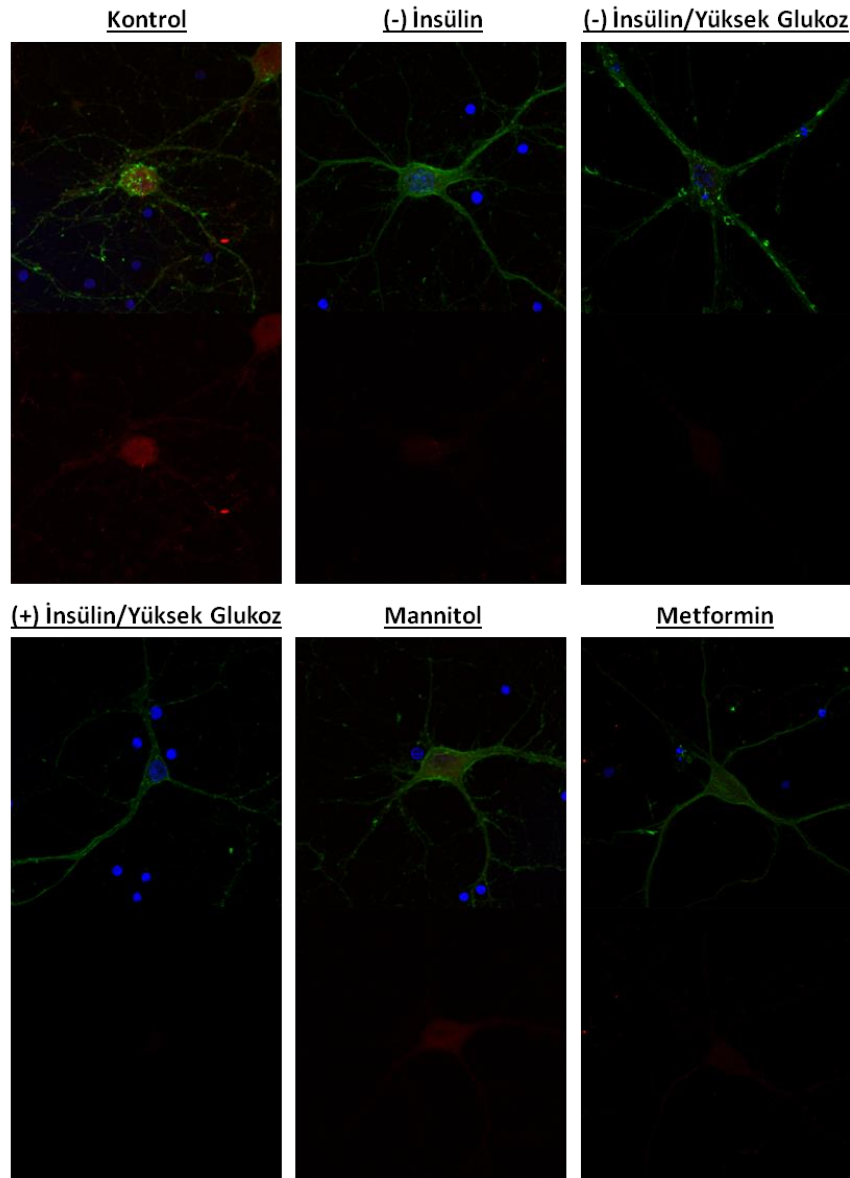
Beş gün devamlı inkübasyondan sonra (-)insülin ve (-)insülin/yüksek glukoz gruplarında seladin-1 mRNA düzeyi kontrola göre sırasıyla %58,44 ve %60,30 azaldı (Şekil 4.3.B). Estradiol ve metformin inkübasyonu bu azalmayı önlemedi. (+)insülin/yüksek glukoz grubunda seladin-1 mRNA düzeyi kontrola göre değişmezken, (-)insülin/yüksek glukoz grubuna göre %125,60 arttı. Metformin/(+)insülin grubunda seladin-1 mRNA düzeyi metformin grubuna göre %175,57 arttı (Şekil 4.3.B).



Şekil 4.3. Siçan korteks nöronlarından elde edilen primer hücre kültüründe 5 gün devamlı inkübasyonun seladin-1 protein (A) ve mRNA (B) düzeyine etkisi (A: n=7-20, metformin/(+)insülin n=4, B: Kontrol, (-)insülin, (-)insülin/yüksek glukoz, (+)insülin/yüksek glukoz n=6 diğer gruplarda n=3, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; Çizgilerle belirtilen gruplar arasında istatistiksel olarak fark vardır).

4.4. Hücre Kültüründe 5 gün Devamlı İnkübasyonun Seladin-1 Proteini Üzerine Etkisinin Konfokal Mikroskopi ile Gösterilmesi

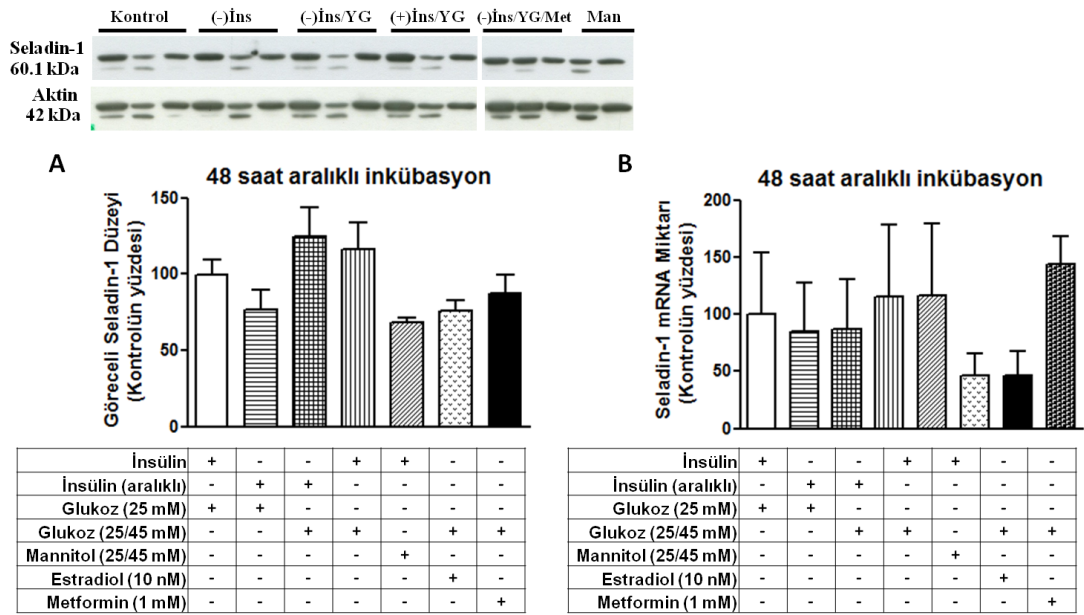
Hücre gövdesi, çekirdeği, akson ve dendritleri incelendiğinde immünohistokimya çalışmaları tüm gruplardaki nöronların morfolojik olarak normal olduğunu gösterdi. Seladin-1 boyaması beklendiği gibi (104) hücre içinde homojen olarak görüldü. Bu yöntem nicel bulgu sağlamasa da insülin ve/veya yüksek glukozlu gruplarda seladin-1 boyamasında azalma görüldü (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. Primer hipokampal nöronlarda 5 gün devamlı inkübasyondan sonra yapılan seladin-1 boyamasının temsili fotoğrafları (Seladin-1 (kırmızı), tübülün (yeşil) ve hücre çekirdeği (mavi) ile boyanmıştır).

4.5. Hücre Kültüründe 48 saat Aralıklı İnkübasyonun Seladin-1 Protein ve mRNA Düzeyine Etkisi

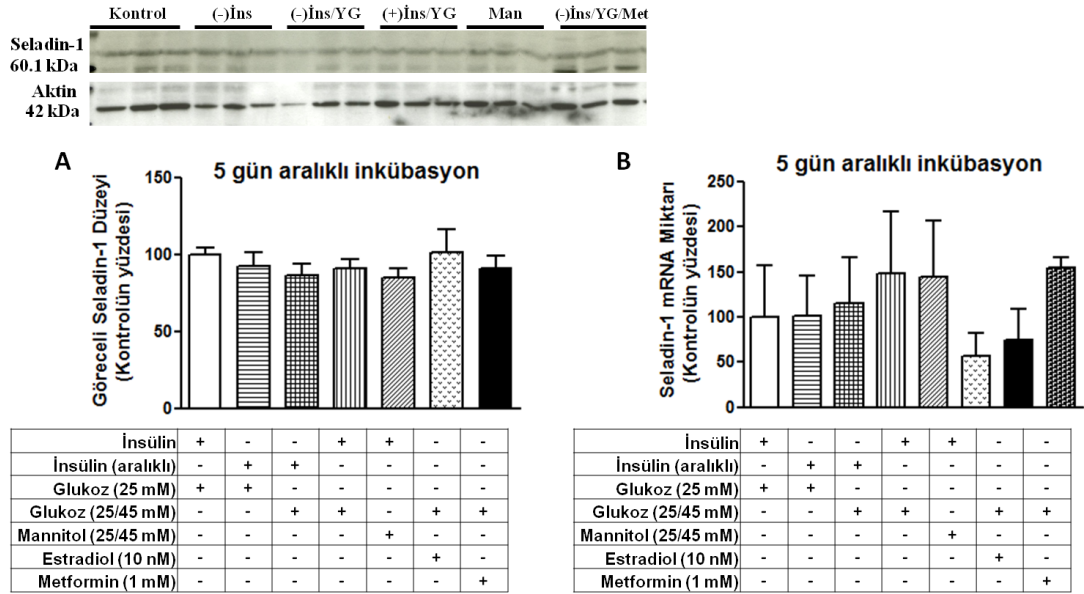
Kırk sekiz saat aralıklı inkübasyon seladin-1 protein düzeyinde her hangi bir değişiklik yapmadı (Şekil 4.5.A). Seladin-1 mRNA düzeyinde görülen değişiklikler ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. İnsülsiz gruplarda seladin-1 mRNA düzeyinde anlamlı olmayan hafif bir azalma paterni gözlemlendi (Şekil 4.5.B).



Şekil 4.5. Sıçan korteks nöronlarından elde edilen primer hücre kültüründe 48 saat aralıklı inkübasyonun seladin-1 protein (**A**) ve mRNA (**B**) düzeyine etkisi (**A**: n=6-9, **B**: n=3).

4.6. Hücre Kültüründe 5 gün Aralıklı İnkübasyonun Seladin-1 Protein ve mRNA Düzeyine Etkisi

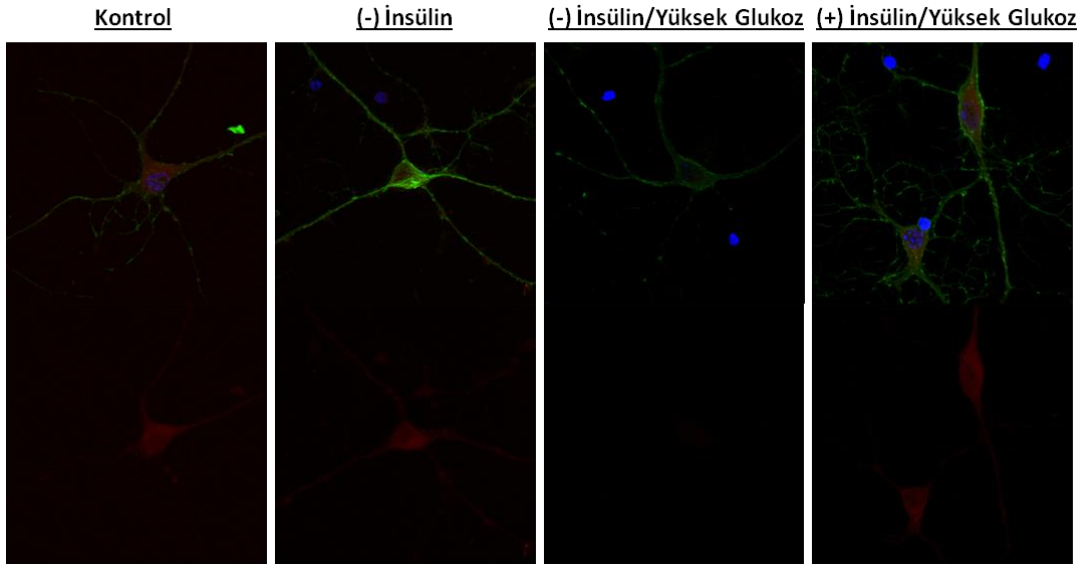
Beş gün aralıklı inkübasyon seladin-1 protein ve mRNA (Şekil 4.6. A ve B) düzeyinde değişiklik yapmadı.



Şekil 4.6. Siçan korteks nöronlarından elde edilen primer hücre kültüründe 5 gün aralıklı inkübasyonun seladin-1 protein (**A**) ve mRNA (**B**) düzeyine etkisi (**A**: n=9-12, **B**: n=3).

4.7. Hücre Kültüründe 5 gün Aralıklı İnkübasyonun Seladin-1 Proteini Üzerine Etkisinin Konfokal Mikroskopi ile Gösterilmesi

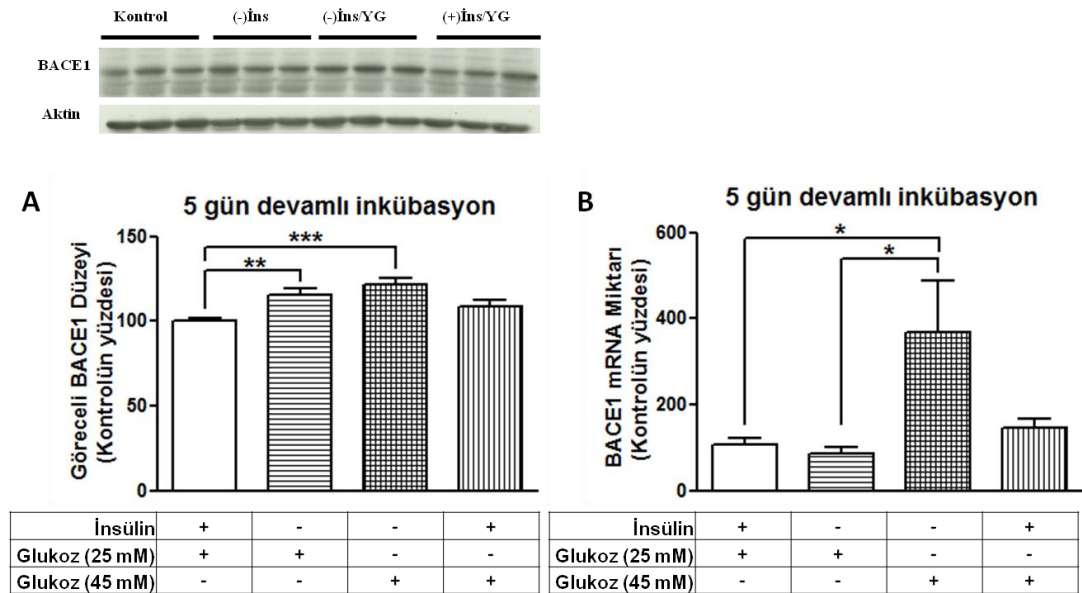
Beş gün aralıklı inkübasyonun ardından yapılan immünohistokimya çalışmalarında da tüm gruplardaki nöronların morfolojik olarak normal olduğu saptandı (Şekil 4.7.). Aralıklı inkübasyon gruplarında da seladin-1'in hücre içinde homojen olarak boyandığı görüldü (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. Primer hipokampal nöronlarda 5 gün aralıklı inkübasyondan sonra yapılan seladin-1 boyamasının temsili fotoğrafları (Seladin-1 (kırmızı), tübülin (yeşil) ve hücre çekirdeği (mavi) ile boyanmıştır).

4.8. Hücre Kültüründe 5 gün Devamlı İnkübasyonun BACE1 Protein ve mRNA Düzeyine Etkisi

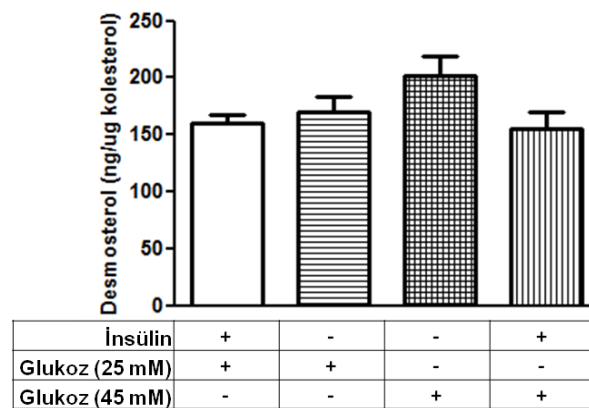
Beş gün devamlı inkübasyondan sonra (-)insülin ve (-)insülin/yüksek glukoz gruplarında BACE1 protein düzeyi kontrola göre sırasıyla %15,70 ve %21,82 arttı (Şekil 4.8.A). (+)insülin/yüksek glukoz grubunda ise BACE1 düzeyi değişmedi (Şekil 4.8.A). BACE1 mRNA düzeyi kontrola göre (-)insülin grubunda değişmezken, (-)insülin/yüksek glukoz grubunda anlamlı olarak arttı (Şekil 4.8.B). Kırk sekiz saat inkübasyondan sonra seladin-1 düzeyleri değişmediği için BACE1 düzeyleri de araştırılmadı.



Şekil 4.8. Siçan korteks nöronlarından elde edilen primer hücre kültüründe 5 gün devamlı inkübasyonun BACE1 protein (A) ve mRNA (B) düzeyine etkisi (A: n=9-15, B: n=6, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; Çizgilerle belirtilen gruplar arasında istatistiksel olarak fark vardır).

4.9. Hücre Kültüründe 5 gün Devamlı İnkübasyonun Desmosterol/Kolesterol Oranına Etkisi

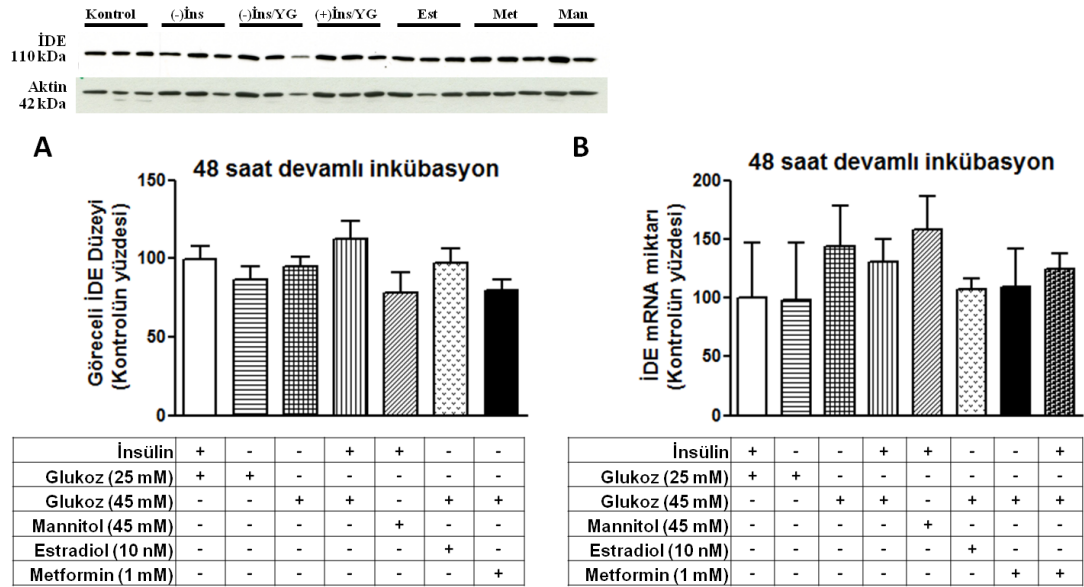
Beş gün devamlı inkübasyondan sonra (-)insülin ve (-)insülin/yüksek glukoz gruplarında kontrole göre desmosterol miktarında istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış paterni saptandı (Şekil 4.9.). Kırk sekiz saat inkübasyondan sonra seladin-1 düzeyleri değişmediği için desmosterol ya da kolesterol düzeyleri ölçülmedi.



Şekil 4.9. Sıçan korteks nöronlarından elde edilen primer hücre kültüründe 5 gün devamlı inkübasyonun desmosterolden kolesterol oluşmasına etkisi (n=6, $P<0,09$).

4.10. Hücre Kültüründe 48 saat Devamlı İnkübasyonun İDE Protein ve mRNA Düzeyine Etkisi

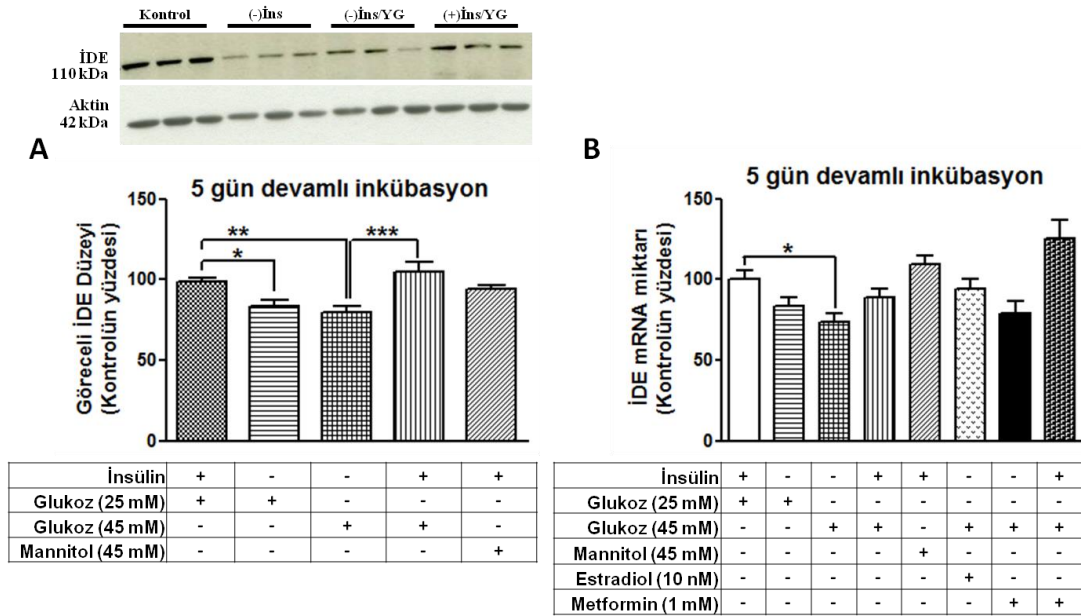
Kırk sekiz saat devamlı inkübasyon İDE protein (Şekil 4.10.A) ve mRNA (Şekil 4.10.B) düzeyinde değişiklik yapmadı.



Şekil 4.10. Sıçan korteks nöronlarından elde edilen primer hücre kültüründe 48 saat devamlı inkübasyonun İDE protein (A) ve mRNA (B) düzeyine etkisi (A: n=6-12, B: n=3).

4.11. Hücre Kültüründe 5 gün Devamlı İnkübasyonun İDE Protein ve mRNA Düzeyine Etkisi

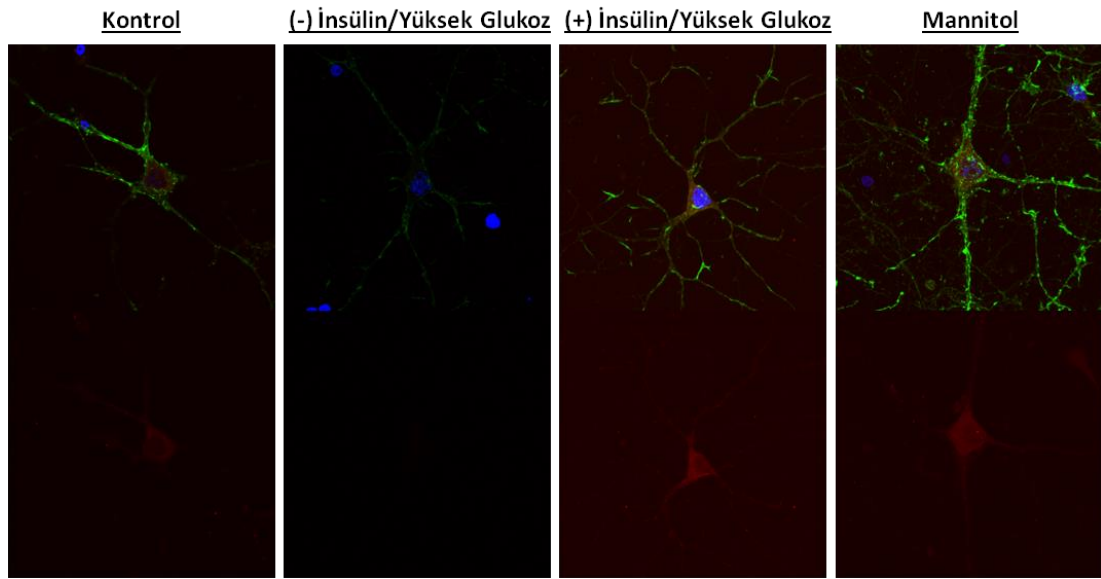
Beş gün devamlı inkübasyondan sonra (-)insülin ve (-)insülin/yüksek glukoz gruplarında İDE protein düzeyi kontrola göre sırasıyla %16,78 ve %20,52 azaldı (Şekil 4.11.A). (+)insülin/yüksek glukoz ve mannitol gruplarında İDE protein düzeyi kontrola göre değişmedi (Şekil 4.11.A). Beş gün devamlı inkübasyondan sonra yalnızca (-)insülin/yüksek glukoz grubunda İDE mRNA düzeyi kontrola göre %26,41 azaldı (Şekil 4.11.B).



Şekil 4.11. Sığan korteks nöronlarından elde edilen primer hücre kültüründe 5 gün devamlı inkübasyonun İDE protein (A) ve mRNA (B) düzeyine etkisi (A: n=17-22, mannitol n=5, B: n=3, * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$; Çizgilerle belirtilen gruplar arasında istatistiksel olarak fark vardır).

4.12. Hücre Kültüründe 5 gün Devamlı İnkübasyonun İDE Proteini Üzerine Etkisinin Konfokal Mikroskopi ile Gösterilmesi

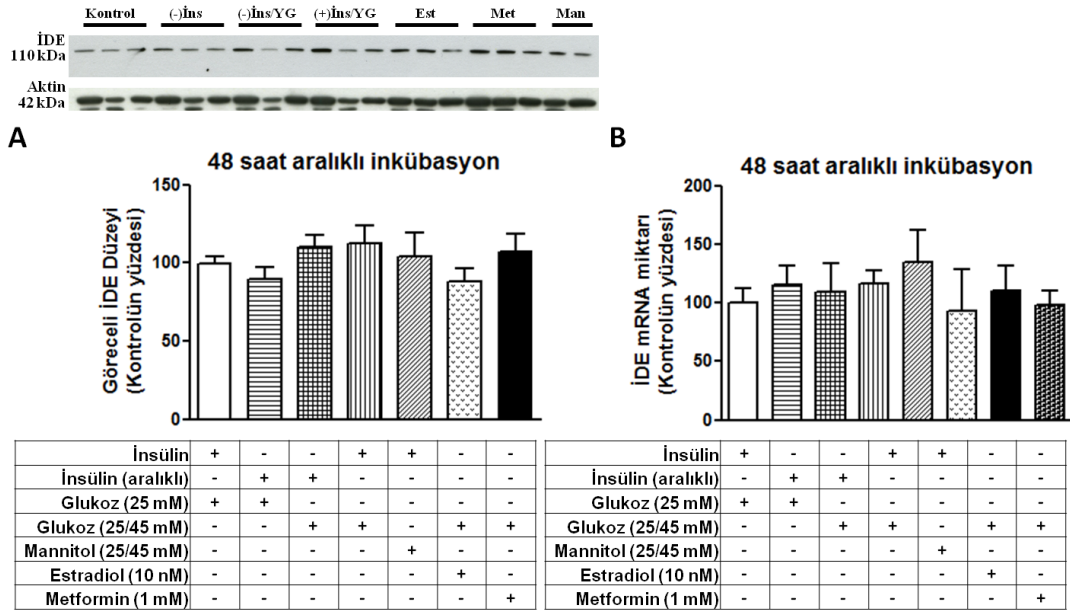
Beş gün devamlı inkübasyon yapılan gruplarda nöronların morfolojisinin normal olduğu saptandı. (-)insülin/yüksek glukoz grubundan alınan örneklerde İDE proteinini göstermeye yönelik immünohistokimya bulgularının nicel olmasa da ilgili proteinde saptanan azalmayı (Bkz. Şekil 4.11.) destekler nitelikte olduğu görüldü (Şekil 4.12.).



Şekil 4.12. Primer hipokampal nöronlarda 5 gün devamlı inkübasyondan sonra yapılan İDE boyamasının temsili fotoğrafları (İDE (kırmızı), tübülün (yeşil) ve hücre çekirdeği (mavi) ile boyanmıştır).

4.13. Hücre Kültüründe 48 saat Aralıklı İnkübasyonun İDE Protein ve mRNA Düzeyine Etkisi

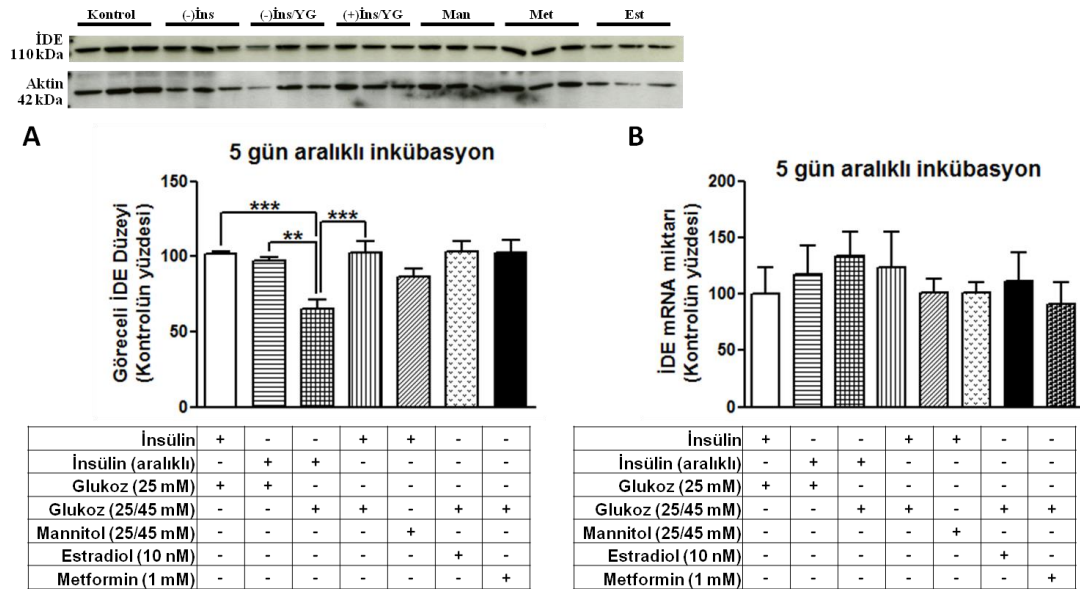
Kırk sekiz saat aralıklı inkübasyon İDE protein (Şekil 4.13.A) ve mRNA (Şekil 4.13.B) düzeyinde değişiklik yapmadı.



Şekil 4.13. Sıçan korteks nöronlarından elde edilen primer hücre kültüründe 48 saat aralıklı inkübasyonun İDE protein (**A**) ve mRNA (**B**) düzeyine etkisi (**A**: n=6-12, **B**: n=3).

4.14. Hücre Kültüründe 5 gün Aralıklı İnkübasyonun İDE Protein ve mRNA Düzeyine Etkisi

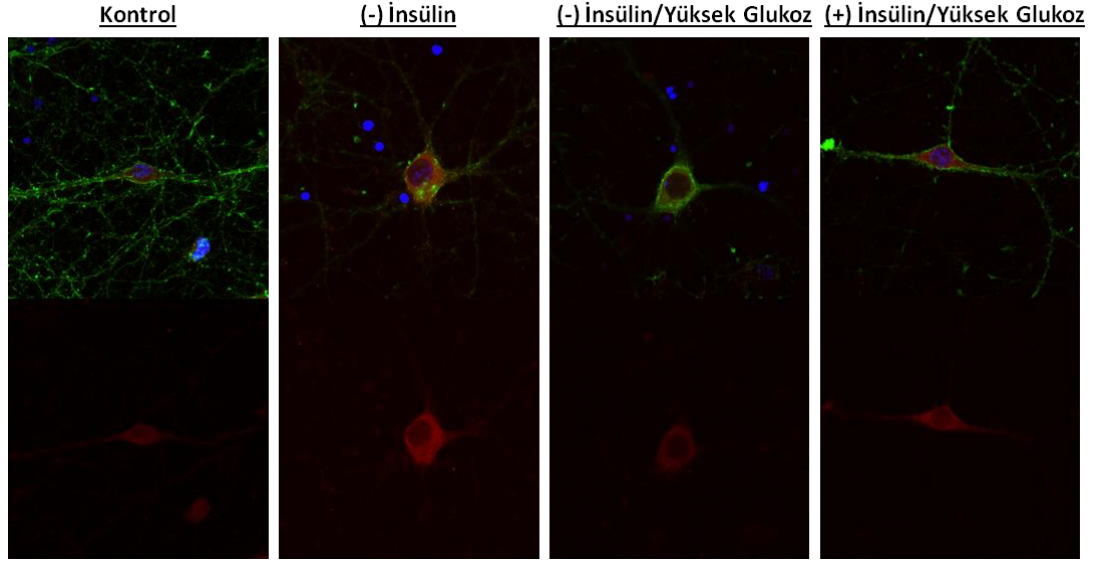
Beş gün aralıklı inkübasyon sonrası İDE protein düzeyi (-)insülin/yüksek glukoz grubunda kontrole göre %34,79 azaldı (Şekil 4.14.A). Bu azalma (-)insülin ve (+)insülin/yüksek glukoz gruplarında görülmedi. Mannitol grubunda kontrole göre İDE düzeyi değişmedi (Şekil 4.14.A). Estradiol ve metformin inkübasyonları kontrol grubu ile kıyaslandığında aralıklı yüksek glukozun etkisine karşı koruyucu etki gösterdi (Şekil 4.14.A). İDE protein düzeyinde görülen bu değişiklikler mRNA düzeyinde saptanmadı (Şekil 4.14.B).



Şekil 4.14. Sıçan korteks nöronlarından elde edilen primer hücre kültüründe 5 gün aralıklı inkübasyonun İDE protein (**A**) ve mRNA (**B**) düzeyine etkisi (**A**: n=6-11, **B**: n=3, ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; Çizgilerle belirtilen gruplar arasında istatistiksel olarak fark vardır).

4.15. Hücre Kültüründe 5 gün Aralıklı İnkübasyonun İDE Proteinini Üzerine Etkisinin Konfokal Mikroskopisi ile Gösterilmesi

Beş gün aralıklı inkübasyon ardından İDE boyamasının yapıldığı immünohistokimya çalışmasının bulgularında gruplar arasında belirgin bir fark görülmedi (Şekil 4.15.).



Şekil 4.15. Primer hipokampal nöronlarda 5 gün aralıklı inkübasyondan sonra yapılan İDE boyamasının temsili fotoğrafları (İDE (kırmızı), tübülün (yeşil) ve hücre çekirdeği (mavi) ile boyanmıştır).

4.16. Deneysel Diyabetin Kan Glukoz Düzeyi ve Vücut Ağırlığına Etkisi

On iki hafta sonunda yapılan ölçümlere göre, DM ve OVX+DM gibi deneysel diyabet oluşturulan grupların kan glukoz düzeyi kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde arttı (Tablo 4.1.). DM grubunda vücut ağırlığı kontrole göre azaldı (Tablo 4.1.). Kontrol, OVX, *sham* ve *sham*+çözücü grupları arasında kan glukoz düzeyi ve vücut ağırlığı bakımından fark saptanmadı (Tablo 4.1.).

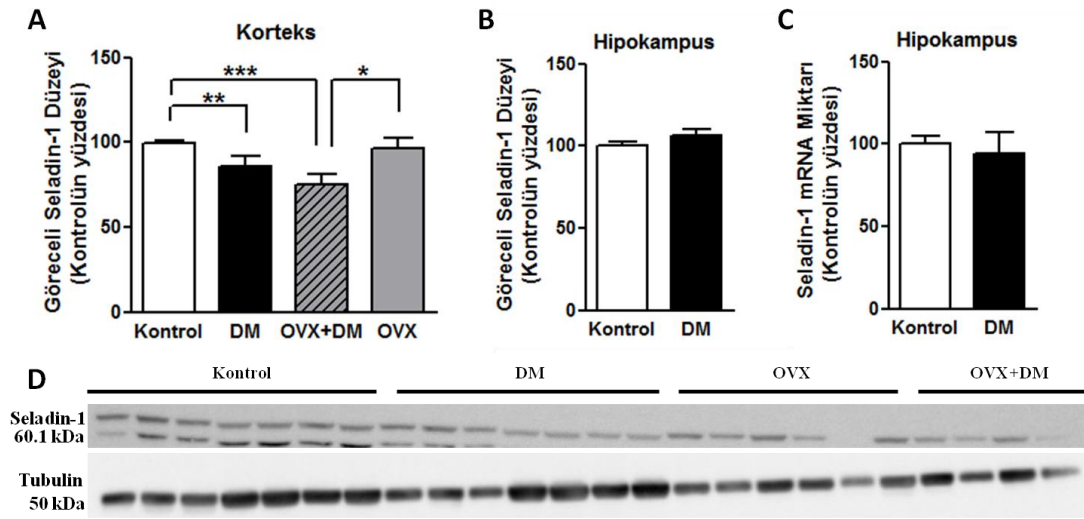
Tablo 4.1. Diyabet ve/veya overektominin kan glukoz düzeyine ve vücut ağırlığına etkisi.

	Kan glukozu (mg/dL)	Vücut ağırlığı (g)
Kontrol	135,7±8,5	292,8±15,8
DM	518,4±36***	225,5±11,8*
OVX+DM	391±63,2***	241,5±10
OVX	149,5±10,1	272,3±10
Sham	118,3±7,2	241,3±1,9
Sham+Çözücü	133,3±16,8	240±4,5

(Kontrol n=13, DM n=7, OVX+DM n=4, OVX n=6, Sham n=3, Sham+çözücü n=3, *P<0,05; ***P<0,001; kontrol grubundan istatistiksel olarak farklıdır.)

4.17. Deneysel Diyabetin Seladin-1 Protein ve mRNA Düzeyine Etkisi

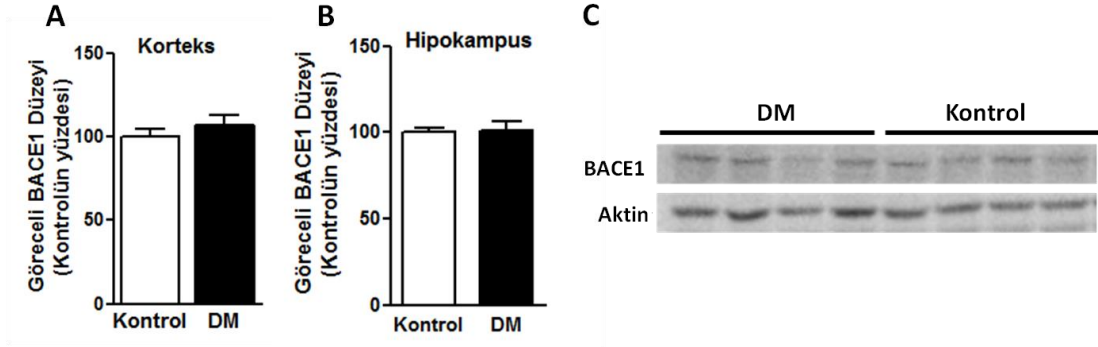
On iki hafta sonunda DM ve OVX+DM gruplarının serebral korteksindeki seladin-1 düzeyi kontrole göre sırasıyla %14,28 ve %24,75 azaldı (Şekil 4.16.A). Yalnızca overektomi yapılmış grupta seladin-1 düzeyi kontrole göre değişmedi (Şekil 4.16.A). On iki hafta diyabet, sıçanların hipokampus dokusunda seladin-1 protein (Şekil 4.16.B) ve mRNA (Şekil 4.16.C) düzeyini kontrole göre değiştirmede.



Şekil 4.16. Diyabetin sıçan serebral korteksinde (**A** ve **D**), hipokampusunda (**B**) seladin-1 protein ve hipokampusunda seladin-1 mRNA (**C**) düzeylerine etkisi (**A**: Kontrol n=13, DM n=7, OVX+DM n=4, OVX n=6, **B**: Kontrol n=10, DM n=8, **C**: n=4, * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$; Çizgilerle belirtilen gruplar arasında istatistiksel olarak fark vardır).

4.18. Deneysel Diyabetin BACE1 Protein Düzeyine Etkisi

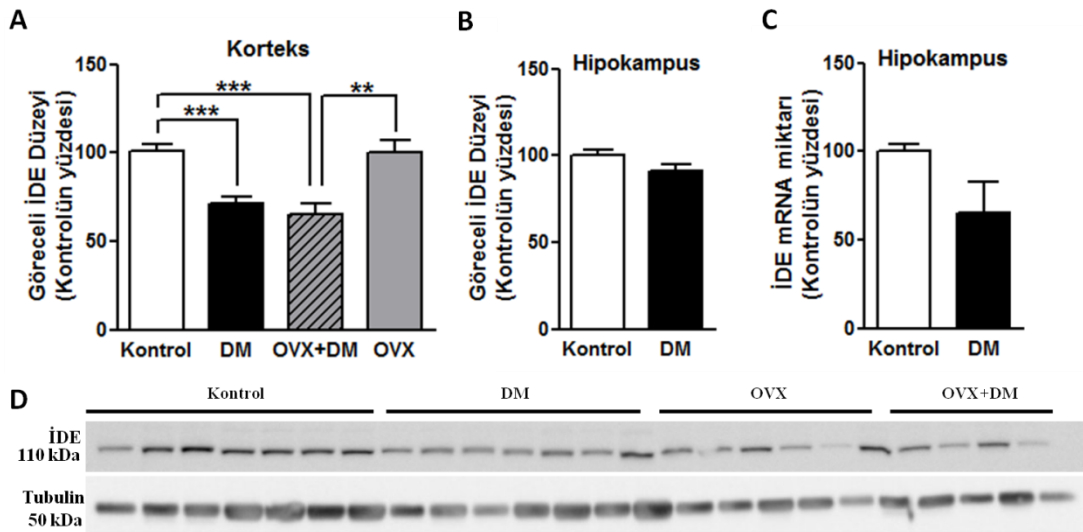
Deneysel diyabet sıçanların serebral korteksinde ve hipokampusunda BACE1 protein düzeylerini kontrole göre değiştirmede (şekil 4.17.).



şekil 4.17. Diyabetin sıçan serebral korteksinde (**A** ve **C**) ve hipokampusunda (**B**) BACE1 protein düzeyine etkisi (**A**: Kontrol n=10, DM n=7, **B**: Kontrol n=10, DM n=8).

4.19. Deneysel Diyabetin İDE Protein ve mRNA Düzeylerine Etkisi

On iki hafta sonunda, DM ve OVX+DM gruplarının serebral korteksindeki İDE düzeyi kontrole göre sırasıyla %28,29 ve %34,63 azaldı (Şekil 4.18. A ve D). Yalnızca overektomi yapılmış grupta İDE düzeyi kontrole göre değişmezken, OVX+DM grubuna göre %34,63 arttı (Şekil 4.18. A ve D). On iki hafta diyabet, sıçanların hipokampus dokusunda İDE protein (Şekil 4.18.B) ve mRNA (Şekil 4.18.C) düzeylerini değiştirmede. DM grubunda İDE mRNA düzeyi kontrole kıyasla azalsa da istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 4.18.C).



Şekil 4.18. Diyabetin sıçan serebral korteksinde (**A** ve **D**), hipokampusunda (**B**) İDE protein ve hipokampusunda mRNA (**C**) düzeyine etkisi (**A**: Kontrol n=13, DM n=7, OVX+DM n=4, OVX n=6, **B**: Kontrol n=9, DM n=8, **C**: n=4, ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; Çizgilerle belirtilen gruplar arasında istatistiksel olarak fark vardır).

5. TARTIŞMA

Son yıllarda yapılan çok sayıda klinik ve epidemiyolojik çalışma diyabetli kişilerde AH gelişme riskinin artmış olduğunu göstermektedir (38). Tüm bu çalışmalara rağmen bu iki hastalık arasındaki ilişkinin moleküler mekanizmalarının araştırıldığı çalışmalar sınırlı sayıdadır. Bu tez kapsamında DM ve AH arasındaki moleküler mekanizmaların araştırılması amacıyla, deneysel diyabetin AH ile ilişkili proteinler olan seladin-1 ve İDE üzerine etkisi incelendi. Ayrıca bu proteinleri nöroprotektif 17β-E2'nin ve antidiyabetik ilaç metforminin ne yönde etkilediği de araştırıldı.

Primer hücre kültüründe oluşturduğumuz insülin-siz ya da yüksek glukozlu gruplar *in vivo* hipoinsülinemi ve hiperglisemi gibi birlikte seyreden diyabetik koşulların birbirinden bağımsız araştırılmasını sağladı. Hücre kültüründe oluşturulan bu gruplarda 5 gün inkübasyondan sonra bile hücre canlılığında azalma görülmemesi incelenen proteinlerin düzeylerindeki değişimin bundan kaynaklanmadığını gösterdi.

5.1. Diyabetin Seladin-1 Üzerine Etkisi

Alzheimer'lı hastalarda azaldığı bilinen seladin-1 enzimi (83) kolesterol biyosentezinin son basamağındaki desmosterolden kolesterol oluşum reaksiyonunu katalizler (81). Çeşitli araştırmalarla seladin-1'in nöroprotektif ve antiapoptotik olduğu ortaya konmuştur (83, 86-91). Bu araştırmalarda seladin-1 düzeyinde görülen azalmanın nöronlarda çeşitli hasarlara neden olduğu bildirilmiştir. Bu hasar bazen kolesterol sentezinde azalma (85, 86, 88, 91) sonucu plazma membranının bütünlüğünde bozulma, bazen de apoptotik yolda aktivite artışı sonucu hücre ölümü ile meydana gelmektedir (83, 88-90).

Diyabetik koşulların seladin-1 düzeyini azaltıp azaltmadığı bu tez kapsamında incelenen konulardan birisidir. Hücre kültürü ortamında 48 saat devamlı olarak insülin-siz, yüksek glukoz içeren ve her iki durumun birlikte olduğu vasatta inkübe edilen primer nöronal hücrelerin seladin-1 protein ve mRNA düzeylerinde değişiklik görülmedi. Estradiol ve metformin inkübasyonu da 48 saat sonunda seladin-1 mRNA düzeyinde kontrole göre anlamlı bir fark oluşturmadı. Bu sonuçlara göre 48 saat süren inkübasyonun seladin-1 düzeyinde değişiklikler görmek için yeterli olmadığı

söylenbilir. Zira aynı işlemlerin 5 gün boyunca uygulandığı gruplarda seladin-1 protein ve mRNA düzeylerinde azalma saptandı. İnsüliniz grupta 5 gün sonunda seladin-1 protein ve mRNA düzeyleri kontrole kıyasla azaldı. İnsüliniz ve yüksek glukozun birlikte uygulandığı grupta da seladin-1 düzeyinde azalma görüldü. İlginç olarak yalnızca glukozun yüksek olduğu grupta seladin-1 düzeyi değişmedi. Bu sonuçlar seladin-1 düzeyini düşürücü asıl etkenin insülin eksikliği olduğunu işaret etmektedir. Bizim sonuçlarımızı destekleyen bir çalışmada diyabette kolesterol sentezleyen enzimlerin azalmasında major etkenin hiperglisemi değil insülin eksikliği olduğu (132), kan glukoz düzeyi normale döndürülse bile bu azalmanın düzelmediği saptanmıştır. Çalışmamız insülinin seladin-1 ekspresyonunda düzenleyici bir faktör olarak rol oynadığını gösteren ilk araştırmadır.

Öte yandan literatürde bizim sonuçlarımıza ters düşecek şekilde yüksek glukozun seladin-1 mRNA düzeyini azalttığını bildiren bir çalışma bulunmaktadır (96). Fötal nöroepitelyal hücrelerde yapılan bu çalışmada kullanılan hücre tipinin ve kullanılan glukoz konsantrasyonunun (20 mM) bizimkinden farklı olması ve hücrelerin yüksek glukozu ne kadar süre maruz bırakıldığına bildirilmemesi bu çelişkinin sebepleri olarak düşünülebilir.

Çalışmamızda 5 günlük inkübasyon sonunda estradiolün, insüliniz ve yüksek glukozlu ortamda seladin-1 mRNA düzeyindeki azalmayı önleyici bir etkisi görülmedi. Oysa seladin-1'in estradiolün nöroprotektif etkilerinden sorumlu olduğunu işaret eden (93, 95) ve artan konsantrasyonlarda estradiolün seladin-1 mRNA düzeyini artırdığını gösteren (92) yayınlar mevcuttur. Bu çelişkili durum seladin-1 düzenlenmesinde farklı hücrelerde farklı mekanizmaların rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Bahsedilen çalışmalarda (92, 93, 95) insan fötal nöroepitelyal hücreler, bizimkinde ise sıçan primer kortikal nöronlar kullanılmıştır. Öte yandan seladin-1'in hücrel stres ve normal koşullardaki düzenlenmesinin farklılık gösterebildiği de bildirilmektedir (90). Bizim uyguladığımız insüliniz ve yüksek glukozlu ortam nöronları fizyolojik koşulların dışına itebileceğinden stres yaratarak estradiolün seladin-1 üzerine etkisini maskeleyebilir.

Uzun yıllardır diyabette reçete edilen başlıca ilaçlardan biri olan metformin kan beyin bariyerini geçen ve antiinflamatuvar ve nöroprotektif etkileri bilinen bir bileşiktir (133, 134). Metforminin son zamanlarda yaşlanmayı geciktirici (135) ve bilişsel fonksiyonları düzeltici (136) etkileri dikkat çekmektedir. Nitekim bir çalışmada T2DM hastalarında demans görülme riskinin sağlıklı kişilere göre 2,41 kat fazla olduğu, metformin tedavisi görenlerde bu riskin 1,77'ye düştüğü bildirilmiştir (137). Ayrıca metforminin primer nöronal hücre kültüründe apoptozise karşı koruyucu olduğunu (134), tau fosforilasyonunu önlediğini (138) gösteren çalışmalar da vardır. Fare nöroblastoma hücre serisinde yüksek insülin inkübasyonu ile insülin direnci geliştirilen hücrelerde yapılan bir çalışmada, metforminin insülin aktivitesine duyarlılığı artırdığı, moleküler ve patolojik AH belirteçlerine karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (129). Yüksek yağ içerikli diyetle beslenen sıçanlarda metformin tedavisi periferdeki olumlu etkilerinin yanı sıra, beyindeki artmış mitokondriyal stresi azaltmış, bozulmuş öğrenme ve belleği düzeltmiştir (136). Db/db farelere 18 hafta metformin uygulandığı bir çalışmada da tau fosforilasyonunda azalma ve sinaptofizinde artış olduğu gösterilmiştir (139). Tüm bu bilgiler ışığında metforminin diyabetik koşullarda seladin-1 düzeyinde artışa neden olup olmayacağı bu tez kapsamında incelendi. Beş gün boyunca insüliniz yüksek glukozlu ortamda azalmış olan seladin-1 düzeyi metformin inkübasyonu ile artmadı. İlginç olarak ortamda insülin bulunması, glukoz yüksek olsa dahi, seladin-1 düzeyini kontrolden da yüksek bir düzeye çıkardı. Bu sonuçlar metforminin seladin-1 düzeyinde etki göstermesi için ortamda insülinin olması gerektiğini akla getirmektedir. Dolayısıyla metforminin seladin-1 üzerindeki düzenleyici etkisinin pleiotropik etkiden ziyade daha önce de gösterilmiş olan (129) hücrelerin insüline duyarlılığını artırıcı etkisinden kaynaklandığı ileri sürülebilir.

Mannitol grubu, olası değişikliklerin yüksek glukoz konsantrasyonunun neden olduğu ozmolarite artışına mı yoksa glukozun kendi etkisine mi bağlı olduğunun anlaşılması için oluşturuldu (128). Beş günlük inkübasyondan sonra mannitol grubunda kontrole kıyasla seladin-1 protein ve mRNA düzeylerinde bir

değişiklik görülmemesi ozmolarite artışının seladin-1 düzeyine katkısının olmadığını gösterdi.

İmmünohistokimyasal sonuçlara bakıldığında 5 gün inkübasyonun ardından tüm gruplardaki nöronların morfolojik olarak normal olduğu gösterildi. Seladin-1 literatürde belirtildiği (104) gibi hücre içinde homojen boyandı. Hücresel stres durumlarında çekirdeğe yerleştiği bilinen seladin-1 (140) oluşturduğumuz çeşitli inkübasyon gruplarında herhangi bir lokalizasyon değişikliği sergilemedi.

Diyabette glisemik kontrolün bilişsel performansı etkilediği bilinmektedir. İyi kontrol edilmiş glisemi psikomotor yetenekleri, motor hızı, belleği, sözel yetenek skorlarını ve akademik başarıyı iyileştirirken (10) iyi kontrol edilemeyen glisemi beyne hasar verebilir (128). Literatürde glukoz dalgalanmalarının sürekli yüksek glukozla maruz kalmaktan daha zararlı olduğunu gösteren çalışmalar vardır (96, 128, 141). Bu tez kapsamında primer nöronların 24 saat normal, 24 saat yüksek glukozla maruz bırakılmasıyla yaratılan aralıklı inkübasyon grupları literatürdeki benzer çalışmalardan yola çıkılarak oluşturuldu. Kırk sekiz saat ya da 5 gün aralıklı uygulama sonucunda seladin-1 düzeylerinde değişiklik olmaması glukoz dalgalanmasının nöronlarda oluşturduğu hasarda seladin-1'in rol almadığını gösterdi. Seladin-1 düzeyinde insülin dalgalanmasının daha etkili olması öngörülse de herhangi bir değişiklik saptanmadı. Bu durum insülinin seladin-1 üzerindeki regülasyonunun daha uzun süre maruziyetten sonra ortaya çıkabileceğini düşündürmektedir.

Seladin-1 geni silinmiş farelerde azalmış kolesterol düzeyi nedeniyle bütünlüğü bozulmuş plazma membranlarında APP'nin amiloidojenik kesilmesi artar ve A β birikir (86). Seladin-1 aktivitesindeki azalma membran kolesterolünde azalmaya neden olarak nöronların A β 42 toksisitesine açık hale gelmesine neden olur (91). Seladin-1 düzeyinde azalma görülen bir çalışmada BACE1 düzeyinin yükselmesi nedeniyle APP kesilmesinde ve A β birikmesinde artış meydana geldiği bildirilmiştir (90). Seladin-1'in amiloidojenik yolaktaki rolüyle ilgili tüm bu bulgular göz önüne alınarak çalışmamızda diyabetik koşullarda seladin-1 düzeyindeki azalmaya BACE1 düzeyinde bir artış eşlik edip etmediği araştırıldı. BACE1 protein düzeyi insülin eksikliğinin tek başına ya da yüksek glukozla birlikte olduğu gruplarda kontrole göre

artmış bulundu. Yalnızca yüksek glukoz grubunda BACE1 protein düzeyinin değişmemesi seladin-1 regülasyonunda olduğu gibi BACE1 regülasyonunda da insülini öne çıkarmaktadır. İlginç olarak mRNA düzeyinde incelendiğinde yalnızca insülin ve yüksek glukozun bir arada olduğu grupta BACE1 artışı görüldü. Benzer şekilde BACE1 protein düzeyi artarken mRNA düzeyinin değişmediğini bildiren bazı çalışmalar mevcuttur (43, 142). Bu durum daha önce belirtildiği üzere (43) BACE1'in transkripsiyonel ve translasyonel anlamda farklı regüle edilen bir protein özelliği taşıması ile açıklanmıştır. Bir diğer olasılık ise yalnızca insülin eksikliğinin BACE1 mRNA'sında artış için yeterli olmamasıdır. Her ne kadar seladin-1 düzeyindeki azalmanın direkt olarak BACE1 artışına neden olduğunu göstermesek de diyabetik koşullarda BACE1 düzeyinin artmış olması APP kesilmesindeki artışta ve bunun sonucu olarak da A β birikmesinde oldukça önemli bir bulgudur. BACE1 düzeyindeki artışın daha fazla A β üretimine (143, 144) ve birikmesine neden olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bu tez kapsamında A β düzeylerinin de *Western blot* yöntemiyle ölçülmesi planlandı. Ancak büyük olasılıkla vasatta çok az miktarda (ölçüm sınırlarının altında) bulunduğundan A β 'ya ait bantlar tespit edilemedi. İlerde daha duyarlı yöntemlerle bu ölçümün yapılması önemli bir sorunun yanıt bulmasını sağlayacaktır.

Çalışmamızda insülin ve yüksek glukozlu inkübasyonun seladin-1 düzeyinde yaptığı azalmanın fonksiyonel bir anlam taşıyıp taşımadığı desmosterol/kolesterol oranı ölçülerek değerlendirildi. Desmosterol artışı istatistiksel bakımdan anlamlı olmamakla birlikte en fazla insülin ve yüksek glukozlu grupta görüldü. Bu artış seladin-1 düzeyindeki azalmanın en fazla görüldüğü grupta olması nedeniyle beklenen bir durumdur. Öte yandan burada ölçülen kolesterol total hücre kolesterolü olup membran kolesterolü hakkında bir fikir vermemektedir. Nitekim literatürde seladin-1 düzeyindeki azalmanın membran kolesterolünü azaltırken total hücre kolesterolünü çok az etkilediğini bildiren bir çalışma vardır (86).

Çeşitli araştırmalar STZ ile oluşturulan diyabetin bilişsel fonksiyonlarda ve uzaysal bellekte bozukluklar yaptığını (35, 49) ve Alzheimer benzeri patoloji

gösterdiğini ortaya koymuştur (37, 41-43). Çalışmamızda STZ'li hayvanlar diyabetik koşulların seladin-1 ve İDE üzerine etkilerini *in vitro* sonuçlarla karşılaştırma amacıyla kullanıldı. *In vitro* bulgularımızla paralel olarak 12 haftalık diyabetik sıçanların serebral korteksinde seladin-1 düzeyi kontrol grubuna göre azaldı. Tüm serebral kortekste yapılan bu ölçümler ileriki çalışmalarda inferior temporal korteks gibi seladin-1 düzeyinin azaldığı bildirilen (83) özgül bölgelerde yapılırsa görülmesi beklenen seladin-1 azalmasının miktarında artış görülebilir. Beyin insülin düzeyi kandaki ile paralel seyrettiği (61, 145) ve STZ'li hayvanların beyinlerinde insülin düzeyinin azaldığı (37, 146, 147) bilindiği için gözlediğimiz seladin-1 azalması insülin düzeyinin seladin-1 ekspresyonunu regüle ettiği savımızı desteklemektedir. Öte yandan 12 haftalık STZ'li sıçanların beyinde BACE1 düzeyi değişmedi. Seladin-1 düzeyindeki azalmanın miktarı BACE1 artışı için yeterli olmamış olabilir. Ayrıca BACE1 için dokudaki düzeyi kadar aktivitesi de önemlidir zira seladin-1 +/- farelerde BACE1 düzeyi aynı kalsa da APP ile etkileşimi arttığı için A β üretiminde artış görüldüğü bildirilmiştir (86).

Seladin-1'in estradiolün nöroprotektif etkilerinden sorumlu olduğunu ve estradiol tarafından regüle edildiğini bildiren çalışmalar (92, 93, 95) ışığında, *ex vivo* koşullarda bu etkileri araştırmak için vücuttaki en önemli estradiol kaynağı olan overler cerrahi yolla uzaklaştırıldı. Overektomi grubunda seladin-1 düzeyinde bir azalma saptanmadı. Overektomili hayvanların bir kısmına STZ enjeksiyonu yapıldığında ise seladin-1 düzeyinde azalma bulundu. Overektomili+diyabetik grupla sadece diyabetik grup arasında bir fark görülmemesi ve tek başına overektomili grupta seladin-1 düzeylerinin kontrole kıyasla değişmemesi, overektominin değil esas olarak diyabetin seladin-1 düzeyini azalttığının göstergesidir. *Ex vivo* bulgularımız *in vitro* bulgularımızda olduğu gibi seladin-1 regülasyonunda estradiolün rolünün olmadığı yönündedir. Bu konuda benzer koşullarda estrogen reseptör antagonistlerinin kullanılması daha aydınlatıcı olabilir. Zira santral sinir sisteminde bir çok bölgede lokal olarak estrogen sentezlendiği bilinmektedir (148).

Seladin-1 gerek kolesterol sentezini sağlayıp fonksiyonel bir hücre membranı oluşturmasıyla (86-88, 91, 149) gerekse nöronal onarım mekanizmalarında görev

almasıyla (83, 89) nöroprotektif etki gösterir. Bugüne dek seladin-1'in ekspresyonunu regüle eden birçok faktör bildirilmiştir (104). Bu tez kapsamında insülinin seladin-1'i regüle eden faktörlerden biri olabileceği ilk defa gösterilmiştir. Seladin-1'in insülin ile aynı hücre içi yolağı kullanan IGF-I tarafından *up* regüle edilmesi (94) insülin sinyal yolağının seladin-1'i regüle ettiği hipotezini güçlendirmektedir.

5.2. Diyabetin İDE Üzerine Etkisi

İDE insülin ve A β gibi ortak bir amiloidojenik motif barındıran çeşitli substratları degrade eden bir enzimdir (108). Yüksek bir afiniteyle insülini, daha düşük bir afiniteyle A β 'yı degrade eden İDE'nin kapasitesi AH'li beyinlerde azalmıştır (108). AH'lilerin hipokampusunda İDE düzeyi ve aktivitesi sağlıklı kişilere kıyasla azalmıştır ve bu azalma AH şiddetiyle doğru orantılı olarak artar (114). İDE geni silinmiş farelerde A β degradasyonunda ciddi azalma görülmüştür (111, 117).

Çalışmamızda diyabetik koşulların İDE düzeyinde azalmaya neden olup olmadığı incelendi. Hücre kültürü ortamında 48 saat devamlı olarak insülinsiz, yüksek glukozlu ve her iki durumun birlikte olduğu vasatta inkübe edilen primer kortikal nöronların İDE protein ve mRNA düzeyinde değişiklik görülmedi. Estradiol ve metformin inkübasyonu da 48 saat sonunda İDE düzeyinde kontrole göre anlamlı bir fark oluşturmadı. Bu sonuçlara göre 48 saat süren inkübasyon süresinin seladin-1'de olduğu gibi İDE üzerinde değişiklikler görmek için de yeterli olmadığı söylenebilir.

Beş gün boyunca insülinsiz vasatta inkübe edilen grupta İDE protein düzeyleri kontrol gruba kıyasla azaldı. Ancak, bu grupta İDE mRNA düzeyinde görülen azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. İnsülinsiz vasatta yüksek glukoz ile inkübe edilen nöronlarda ise hem protein hem mRNA düzeylerinde azalma görüldü. Yalnızca glukozun yüksek olduğu grupta İDE düzeyi değişmediğinden bulgularımız İDE'nin de seladin-1 gibi insülin tarafından regüle edildiğini düşündürmektedir. Bulgularımız primer hipokampal nöronlardaki İDE ekspresyonunun insülin reseptör yolağında yer alan PI3K aracılığıyla, artan insülin konsantrasyonuna paralel olarak arttığını gösteren çalışma (121) ile uyumludur ve İDE regülasyonunda insülinin rolünü işaret

etmektedir. Bu çalışmada da belirtildiği üzere insülin, insülin reseptör yolağı üzerinden negatif bir *feedback* mekanizma ile İDE ekspresyonunu düzenliyor olabilir.

Mannitol grubu ozmolarite kontrol grubu olarak İDE deneyleri için de oluşturuldu (128). Beş günlük inkübasyondan sonra mannitol grubunda kontrole kıyasla İDE protein ve mRNA düzeylerinde bir değişiklik olmaması hiperozmolaritenin rol oynamadığının kanıtı kabul edildi.

Estradiolün primer hipokampal hücre kültüründe zamana bağımlı olarak İDE mRNA ve protein düzeylerini β -estrogen reseptörü ve PI3K aktivasyonu aracılığıyla artırdığı bilinmektedir (124). Çalışmamızda estradiolün diyabetik koşullarda İDE üzerine etkisine bakıldığında 5 günlük inkübasyon sonunda insülin ve yüksek glukozlu ortamda estradiol uygulaması İDE mRNA düzeyinde bir değişiklik yapmadı. İnsülin ve yüksek glukozlu ortamda azalması beklenen İDE mRNA düzeyi değişmediği için estradiolün koruyucu etki gösterdiği speküle edilebilir.

Metforminin antiinflamatuvar, nöroprotektif (150), apoptozise karşı koruyucu (134) ve insülin duyarlılığını artırıcı (129) etkileri göz önünde bulundurularak İDE üzerine etkileri de bu tez kapsamında araştırıldı. Diyabetik koşullarda metforminle 5 günlük inkübasyon sonunda İDE mRNA düzeyleri değişmediği ve insülin varlığında metformin bir artış paternine neden olduğu için İDE üzerinde koruyucu bir rolünün olduğu söylenebilir. Bu koruyucu etkiyi insülin duyarlılığını artırarak mı gerçekleştirdiği yapılacak daha ileri çalışmalarla aydınlatılabilir.

Çalışmamızda diyabette glisemik kontrolün etkilerini anlamak için oluşturduğumuz aralıklı inkübasyon gruplarındaki glukoz ve insülin dalgalanmalarının İDE'yi nasıl etkilediği araştırıldı. Kırk sekiz saat aralıklı inkübasyon sonucunda İDE protein ve mRNA düzeyleri değişmezken, 5 günlük inkübasyon İDE düzeyinde azalmaya neden oldu. Hem insülin hem de glukozun dalgalandığı grupta kontrole göre ve tek başına insülin ya da glukozun dalgalandığı gruplara göre İDE protein düzeyinde düşüş saptandı. Yalnızca insülin ya da glukoz dalgalanması nöronlarda İDE azalmasına neden olacak ölçüde etki yapmamış olabilir. Sürekli inkübasyon sonuçlarından yola çıkarak seladin-1'de olduğu gibi glukozdan daha

ziyade insülinin İDE düzeylerinde regüle edici olduğunu düşündüğümüzden glukoz dalgalanmasının etki oluşturmaması sürpriz olmadı. Ancak bir arada dalgalanmalarının İDE düzeyini azaltması glukoz dalgalanmasının nöronları insülin dalgalanmasının etkisine daha duyarlı kıldığını akla getirmiştir.

Beş gün aralıklı inkübasyondan sonra İDE protein düzeyindeki azalmaya rağmen mRNA düzeylerinin değişmediği görüldü. Benzer şekilde devamlı inkübasyon gruplarında da ancak insülin ve yüksek glukozlu vasat gibi iki değişken bir arada olduğunda mRNA değişikliğinin görülmesi RNA transkripsiyonunun İDE proteinin düzenlenmesinden sorumlu yegâne yolak olmadığını ya da İDE için mRNA düzeyinde bir düzenlemenin ancak iki değişkenin bir arada bulunduğu durumda gerçekleştiğini akla getirir. Azalmış İDE düzeyine rağmen mRNA düzeyinin değişmemesini İDE'nin yarılanma ömrü ile açıklayan bir çalışma da vardır (115). mRNA düzeyinde ya da post-transkripsiyonel düzeyde olsun insülinin İDE üzerinde regüle edici bir rolü olduğu söylenebilir.

Beş gün devamlı uygulamanın sonunda elde edilmiş immünohistokimyasal bulgulara bakıldığında bu bulgular her ne kadar yarı nicel olsa da insülin eksikliğinin ve yüksek glukozun birlikte olduğu grupta İDE boyamalarında görülür bir azalma saptandı. Nöronlardaki lokalizasyonuna bakıldığında soma, akson ve dendritlerde homojen olarak boyanmış görülen İDE'nin en çok sitozolde ve peroksisomlarda yerleştiği bildirildiğinden (110) bulgularımız literatürle uyumludur.

Çalışmamızın *ex vivo* kısmında STZ ile oluşturulan diyabetin İDE üzerine etkilerine bakıldı. *In vitro* bulgularımızla paralel olarak diyabetik grupların serebral korteksinde İDE düzeyi kontrol gruba göre azaldı. Bizim bulgumuzla uyumlu olarak STZ'li hayvanlarda İDE düzeylerinin azaldığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (37, 125). Bunlardan birinde STZ ile yapılan diyabetin transgenik bir AH fare modelinde azalmış olan İDE miktarını daha da azalttığı, bu azalmanın da beyinde A β birikmesine neden olduğu gösterilmiştir (37). Bir başka transgenik AH modelinde (Tg2576) ise diyetle indüklenen insülin direnci İDE aktivitesinde azalmaya neden olmuş (123), başka bir çalışmada 'kötü' bir diyetle beslenen bu farelerde PI3K azalmasına paralel seyreden İDE azalması görülmüştür (121). Azalmış PI3K aktivitesi

sonucu İDE düzeyinin azaldığı AH'li beyinlerde de gösterilmiştir (121). Tüm bu *in vivo* çalışmalar gerek insülin eksikliği, gerekse insülin direnci ile seyreden diyabetin İDE düzeyinde azalmaya neden olabileceğini işaret etmektedir.

Estradiolün İDE düzenlenmesinde β -estrogen reseptör üzerinden etki ettiği (124) *in vitro* olarak gösterilmiştir. Ayrıca overektomi yapılmış sıçanların hipokampusunda İDE ekspresyonu azalmış ve 17β -E2 tedavisi ile bu azalma düzeltilmiştir (124). Bizim çalışmamızda overektomi grubunun serebral korteks ya da hipokampusunda İDE düzeyleri değişmedi. Bunun nedeni farklı yaşlarda sıçanlar kullanılması olabilir zira bahsi geçen çalışmada overektomiden 2 hafta sonra ölçüm yapıldığında sıçanlar yetişkin yaştadır dolayısıyla kontrol ve overektomi arasında fark bulunmuştur. Oysa bizim çalışmamızda İDE ölçümleri overektomiden 16 hafta sonra yapıldığı için sıçanlar orta yaş üstündedir. Yaşa bağımlı İDE düzeylerinin ölçüleceği ileri deneyler bu durumu aydınlatmakta yardımcı olacaktır.

Overektomi ve diyabet yapılmış grupta İDE düzeyleri kontrole kıyasla azaldı. Sadece overektomi yapılan grupta değişiklik görülmemesi, bize overektomi ve diyabet grubunda görülen azalmanın seladin-1'de de olduğu gibi diyabetten kaynaklandığını düşündürmektedir.

Hem insülini hem de A β 'yı degrade eden bir enzim olarak İDE diyabet ile AH arasındaki ilişkide kritik bir role sahiptir. T2DM'de görülen hiperinsülinemide A β birikmesinin İDE'nin A β yerine insülini yıkması sonucu geliştiğini ileri süren ve T2DM'de görülen İDE genindeki varyasyonların da İDE'yi azalttığı yönünde yayınlar vardır (16). Aslında insülin eksikliği ile karakterize olan T1DM'nin de İDE azalmasına neden olduğu gösterilmiştir (37, 125). Hatta beyinde insülin direnci geliştirilerek yapılan bir AH modelinde (i.s.v-STZ) İDE'nin azaldığı (68) ve bu durumun bir insülin analogu ile tedavi edilince düzeldiği (126) gösterilmiştir. Yaşlanma, T2DM ve AH'ye sekonder gelişen beyindeki insülin direnci ya da T1DM'de görülen insülin eksikliği İDE azalmasına ve bunun sonucunda A β birikmesine neden olabilir. İDE'yi daha fazla eksprese etmek için kullanılacak insülin duyarlılığını artıran ilaçlar AH'den korunmak için hedeflenen yeni tedavi stratejileri arasında düşünülmektedir (122).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez kapsamında hücre kültüründe oluşturulmuş diyabetik koşulların ve STZ ile oluşturulan diyabetin AH ile ilişkili iki protein olan seladin-1 ve İDE düzeylerine etkisi incelenmiştir. Seladin-1 ve İDE düzeylerine nöroprotektif olduğu birçok çalışma ile gösterilmiş olan estradiolün ve antidiyabetik bir ilaç olan metforminin olumlu etkilerinin olup olmadığı da araştırılmıştır.

Hem *in vitro* hem *ex vivo* koşullarda yaptığımız çalışmalarda seladin-1 ve İDE düzeylerinin insülin eksikliğinde azaldığı gösterilmiştir. Çalışmamız insülin eksikliğinin seladin-1 ve İDE ekspresyonunda düzenleyici bir faktör olarak rol oynadığını gösteren ilk çalışmadır.

AH'nin beyin insülin eksikliği veya insüline cevabındaki bozukluğu ile ilişkili bir nöroendokrin hastalık olduğuna dair bulgular gittikçe artmaktadır. DM ve AH arasındaki ilişkide moleküler mekanizmalar henüz aydınlatılmamıştır ancak insülin sinyal yolağının bozulması DM'de AH gelişmesini tetikleyen bir faktör olabilir. İnsülin tarafından regüle edildiği öne sürülen seladin-1 ve İDE'nin diyabetik koşullarda azalması AH gelişme riskini artıran moleküler mekanizmalarda yer aldıkları fikrini güçlendirmektedir. Diyabette azalan seladin-1 ve İDE düzeylerinin düzeltilmesi gelecekte yapılacak çalışmalarda hedef olabilir ve diyabetik ya da prediyabetik hastalarda AH gelişme riskini azaltabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Organization WH. Global Reports on Diabetes. Switzerland: World Health Organization; 2016.
2. International AsD. World Alzheimer Report 2015. London, UK: Alzheimer's Disease International; 2015 August, 2015.
3. Brands AM, Biessels GJ, de Haan EH, Kappelle LJ, Kessels RP. The effects of type 1 diabetes on cognitive performance: a meta-analysis. *Diabetes Care*. 2005;28(3):726-35.
4. Strachan MW, Deary IJ, Ewing FM, Frier BM. Is type II diabetes associated with an increased risk of cognitive dysfunction? A critical review of published studies. *Diabetes Care*. 1997;20(3):438-45.
5. Ott A, Stolk RP, van Harskamp F, Pols HA, Hofman A, Breteler MM. Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. *Neurology*. 1999;53(9):1937-42.
6. Luchsinger JA, Tang MX, Shea S, Mayeux R. Hyperinsulinemia and risk of Alzheimer disease. *Neurology*. 2004;63(7):1187-92.
7. Arvanitakis Z, Wilson RS, Bienias JL, Evans DA, Bennett DA. Diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease and decline in cognitive function. *Arch Neurol*. 2004;61(5):661-6.
8. Joslin EP, Kahn CR. *Joslin's diabetes mellitus*. 14th ed. Philadelphia, Pa.: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. xiv, 1209 p. p.
9. Virkamaki A, Ueki K, Kahn CR. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*. 1999;103(7):931-43.
10. J SR-F, Sa-Roriz TM, Rosset I, Camozzato AL, Santos AC, Chaves ML, et al. (Pre)diabetes, brain aging, and cognition. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1792(5):432-43.
11. Maher PA, Schubert DR. Metabolic links between diabetes and Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother*. 2009;9(5):617-30.
12. Mathew A, Yoshida Y, Maekawa T, Kumar DS. Alzheimer's disease: cholesterol a menace? *Brain Res Bull*. 2011;86(1-2):1-12.
13. Steen E, Terry BM, Rivera EJ, Cannon JL, Neely TR, Tavares R, et al. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? *J Alzheimers Dis*. 2005;7(1):63-80.
14. Vina J, Lloret A. Why women have more Alzheimer's disease than men: gender and mitochondrial toxicity of amyloid-beta peptide. *J Alzheimers Dis*. 2010;20 Suppl 2:S527-33.
15. Pike CJ. Sex and the development of Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*. 2017;95(1-2):671-80.
16. Qiu WQ, Folstein MF. Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid-beta peptide in Alzheimer's disease: review and hypothesis. *Neurobiol Aging*. 2006;27(2):190-8.
17. Hoyer S. The brain insulin signal transduction system and sporadic (type II) Alzheimer disease: an update. *J Neural Transm (Vienna)*. 2002;109(3):341-60.
18. Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2010;362(4):329-44.

19. de la Monte SM, Wands JR. Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: relevance to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2005;7(1):45-61.
20. de la Monte SM. Contributions of brain insulin resistance and deficiency in amyloid-related neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Drugs*. 2012;72(1):49-66.
21. Kivipelto M, Helkala EL, Laakso MP, Hanninen T, Hallikainen M, Alhainen K, et al. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *BMJ*. 2001;322(7300):1447-51.
22. Bertram L, Blacker D, Mullin K, Keeney D, Jones J, Basu S, et al. Evidence for genetic linkage of Alzheimer's disease to chromosome 10q. *Science*. 2000;290(5500):2302-3.
23. Myers A, Holmans P, Marshall H, Kwon J, Meyer D, Ramic D, et al. Susceptibility locus for Alzheimer's disease on chromosome 10. *Science*. 2000;290(5500):2304-5.
24. Ertekin-Taner N, Graff-Radford N, Younkin LH, Eckman C, Baker M, Adamson J, et al. Linkage of plasma A β 42 to a quantitative locus on chromosome 10 in late-onset Alzheimer's disease pedigrees. *Science*. 2000;290(5500):2303-4.
25. Brayne C, Gill C, Huppert FA, Barkley C, Gehlhaar E, Girling DM, et al. Vascular risks and incident dementia: results from a cohort study of the very old. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 1998;9(3):175-80.
26. Yoshitake T, Kiyohara Y, Kato I, Ohmura T, Iwamoto H, Nakayama K, et al. Incidence and risk factors of vascular dementia and Alzheimer's disease in a defined elderly Japanese population: the Hisayama Study. *Neurology*. 1995;45(6):1161-8.
27. Peila R, Rodriguez BL, Launer LJ, Honolulu-Asia Aging S. Type 2 diabetes, APOE gene, and the risk for dementia and related pathologies: The Honolulu-Asia Aging Study. *Diabetes*. 2002;51(4):1256-62.
28. MacKnight C, Rockwood K, Awalt E, McDowell I. Diabetes mellitus and the risk of dementia, Alzheimer's disease and vascular cognitive impairment in the Canadian Study of Health and Aging. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2002;14(2):77-83.
29. Xu WL, Qiu CX, Wahlin A, Winblad B, Fratiglioni L. Diabetes mellitus and risk of dementia in the Kungsholmen project: a 6-year follow-up study. *Neurology*. 2004;63(7):1181-6.
30. Leibson CL, Rocca WA, Hanson VA, Cha R, Kokmen E, O'Brien PC, et al. Risk of dementia among persons with diabetes mellitus: a population-based cohort study. *Am J Epidemiol*. 1997;145(4):301-8.
31. Katzman R, Aronson M, Fuld P, Kawas C, Brown T, Morgenstern H, et al. Development of dementing illnesses in an 80-year-old volunteer cohort. *Ann Neurol*. 1989;25(4):317-24.
32. Butterfield DA, Di Domenico F, Barone E. Elevated risk of type 2 diabetes for development of Alzheimer disease: a key role for oxidative stress in brain. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842(9):1693-706.
33. Gudala K, Bansal D, Schifano F, Bhansali A. Diabetes mellitus and risk of dementia: A meta-analysis of prospective observational studies. *J Diabetes Investig*. 2013;4(6):640-50.

34. Dominguez RO, Pagano MA, Marschoff ER, Gonzalez SE, Repetto MG, Serra JA. Alzheimer disease and cognitive impairment associated with diabetes mellitus type 2: associations and a hypothesis. *Neurologia*. 2014;29(9):567-72.
35. Derakhshan F, Toth C. Insulin and the brain. *Curr Diabetes Rev*. 2013;9(2):102-16.
36. Janson J, Laedtke T, Parisi JE, O'Brien P, Petersen RC, Butler PC. Increased risk of type 2 diabetes in Alzheimer disease. *Diabetes*. 2004;53(2):474-81.
37. Jolivald CG, Hurford R, Lee CA, Dumaop W, Rockenstein E, Masliah E. Type 1 diabetes exaggerates features of Alzheimer's disease in APP transgenic mice. *Exp Neurol*. 2010;223(2):422-31.
38. Biessels GJ, Staekenborg S, Brunner E, Brayne C, Scheltens P. Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *Lancet Neurol*. 2006;5(1):64-74.
39. Li ZG, Zhang W, Sima AA. Alzheimer-like changes in rat models of spontaneous diabetes. *Diabetes*. 2007;56(7):1817-24.
40. Arab L, Sadeghi R, Walker DG, Lue LF, Sabbagh MN. Consequences of Aberrant Insulin Regulation in the Brain: Can Treating Diabetes be Effective for Alzheimer's Disease. *Curr Neuropharmacol*. 2011;9(4):693-705.
41. Liu Y, Liu H, Yang J, Liu X, Lu S, Wen T, et al. Increased amyloid beta-peptide (1-40) level in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Neuroscience*. 2008;153(3):796-802.
42. Kim B, Backus C, Oh S, Hayes JM, Feldman EL. Increased tau phosphorylation and cleavage in mouse models of type 1 and type 2 diabetes. *Endocrinology*. 2009;150(12):5294-301.
43. Devi L, Alldred MJ, Ginsberg SD, Ohno M. Mechanisms underlying insulin deficiency-induced acceleration of beta-amyloidosis in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2012;7(3):e32792.
44. Takeda S, Sato N, Rakugi H, Morishita R. Molecular mechanisms linking diabetes mellitus and Alzheimer disease: beta-amyloid peptide, insulin signaling, and neuronal function. *Mol Biosyst*. 2011;7(6):1822-7.
45. Uemura E, Greenlee HW. Insulin regulates neuronal glucose uptake by promoting translocation of glucose transporter GLUT3. *Exp Neurol*. 2006;198(1):48-53.
46. Rivera EJ, Goldin A, Fulmer N, Tavares R, Wands JR, de la Monte SM. Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine. *J Alzheimers Dis*. 2005;8(3):247-68.
47. de la Monte SM. Insulin resistance and Alzheimer's disease. *BMB Rep*. 2009;42(8):475-81.
48. Craft S, Newcomer J, Kanne S, Dagogo-Jack S, Cryer P, Sheline Y, et al. Memory improvement following induced hyperinsulinemia in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 1996;17(1):123-30.
49. Biessels GJ, Kamal A, Ramakers GM, Urban IJ, Spruijt BM, Erkelens DW, et al. Place learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*. 1996;45(9):1259-66.

50. Li ZG, Zhang W, Grunberger G, Sima AA. Hippocampal neuronal apoptosis in type 1 diabetes. *Brain Res.* 2002;946(2):221-31.
51. Sima AA, Li ZG. The effect of C-peptide on cognitive dysfunction and hippocampal apoptosis in type 1 diabetic rats. *Diabetes.* 2005;54(5):1497-505.
52. Kadowaki T, Kasuga M, Akanuma Y, Ezaki O, Takaku F. Decreased autophosphorylation of the insulin receptor-kinase in streptozotocin-diabetic rats. *J Biol Chem.* 1984;259(22):14208-16.
53. Park CR, Seeley RJ, Craft S, Woods SC. Intracerebroventricular insulin enhances memory in a passive-avoidance task. *Physiol Behav.* 2000;68(4):509-14.
54. Craft S, Asthana S, Cook DG, Baker LD, Cherrier M, Purganan K, et al. Insulin dose-response effects on memory and plasma amyloid precursor protein in Alzheimer's disease: interactions with apolipoprotein E genotype. *Psychoneuroendocrinology.* 2003;28(6):809-22.
55. Marks DR, Tucker K, Cavallin MA, Mast TG, Fadool DA. Awake intranasal insulin delivery modifies protein complexes and alters memory, anxiety, and olfactory behaviors. *J Neurosci.* 2009;29(20):6734-51.
56. Kulstad JJ, Green PS, Cook DG, Watson GS, Reger MA, Baker LD, et al. Differential modulation of plasma beta-amyloid by insulin in patients with Alzheimer disease. *Neurology.* 2006;66(10):1506-10.
57. Maher F, Davies-Hill TM, Lysko PG, Henneberry RC, Simpson IA. Expression of two glucose transporters, GLUT1 and GLUT3, in cultured cerebellar neurons: Evidence for neuron-specific expression of GLUT3. *Mol Cell Neurosci.* 1991;2(4):351-60.
58. Bingham EM, Hopkins D, Smith D, Pernet A, Hallett W, Reed L, et al. The role of insulin in human brain glucose metabolism: an 18fluoro-deoxyglucose positron emission tomography study. *Diabetes.* 2002;51(12):3384-90.
59. Messier C, Teutenberg K. The role of insulin, insulin growth factor, and insulin-degrading enzyme in brain aging and Alzheimer's disease. *Neural Plast.* 2005;12(4):311-28.
60. Banks WA. The source of cerebral insulin. *Eur J Pharmacol.* 2004;490(1-3):5-12.
61. Wallum BJ, Taborsky GJ, Jr., Porte D, Jr., Figlewicz DP, Jacobson L, Beard JC, et al. Cerebrospinal fluid insulin levels increase during intravenous insulin infusions in man. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987;64(1):190-4.
62. Gerozissis K. Brain insulin: regulation, mechanisms of action and functions. *Cell Mol Neurobiol.* 2003;23(1):1-25.
63. Nemoto T, Toyoshima-Aoyama F, Yanagita T, Maruta T, Fujita H, Koshida T, et al. New insights concerning insulin synthesis and its secretion in rat hippocampus and cerebral cortex: amyloid-beta1-42-induced reduction of proinsulin level via glycogen synthase kinase-3beta. *Cell Signal.* 2014;26(2):253-9.
64. Plata-Salaman CR. Insulin in the cerebrospinal fluid. *Neurosci Biobehav Rev.* 1991;15(2):243-58.
65. Schechter R, Abboud M. Neuronal synthesized insulin roles on neural differentiation within fetal rat neuron cell cultures. *Brain Res Dev Brain Res.* 2001;127(1):41-9.

66. Frolich L, Blum-Degen D, Bernstein HG, Engelsberger S, Humrich J, Laufer S, et al. Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna)*. 1998;105(4-5):423-38.
67. Craft S, Peskind E, Schwartz MW, Schellenberg GD, Raskind M, Porte D, Jr. Cerebrospinal fluid and plasma insulin levels in Alzheimer's disease: relationship to severity of dementia and apolipoprotein E genotype. *Neurology*. 1998;50(1):164-8.
68. Shingo AS, Kanabayashi T, Murase T, Kito S. Cognitive decline in STZ-3V rats is largely due to dysfunctional insulin signalling through the dentate gyrus. *Behav Brain Res*. 2012;229(2):378-83.
69. Singh BS, Rajakumar PA, Eves EM, Rosner MR, Wainer BH, Devaskar SU. Insulin gene expression in immortalized rat hippocampal and pheochromocytoma-12 cell lines. *Regul Pept*. 1997;69(1):7-14.
70. Schubert M, Gautam D, Surjo D, Ueki K, Baudler S, Schubert D, et al. Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(9):3100-5.
71. Schubert M, Brazil DP, Burks DJ, Kushner JA, Ye J, Flint CL, et al. Insulin receptor substrate-2 deficiency impairs brain growth and promotes tau phosphorylation. *J Neurosci*. 2003;23(18):7084-92.
72. Grunblatt E, Salkovic-Petrisic M, Osmanovic J, Riederer P, Hoyer S. Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. *J Neurochem*. 2007;101(3):757-70.
73. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 1995;378(6559):785-9.
74. Das P, Parsons AD, Scarborough J, Hoffman J, Wilson J, Thompson RN, et al. Electrophysiological and behavioral phenotype of insulin receptor defective mice. *Physiol Behav*. 2005;86(3):287-96.
75. Mauvais-Jarvis F, Kulkarni RN, Kahn CR. Knockout models are useful tools to dissect the pathophysiology and genetics of insulin resistance. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2002;57(1):1-9.
76. Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, et al. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science*. 2000;289(5487):2122-5.
77. Gasparini L, Gouras GK, Wang R, Gross RS, Beal MF, Greengard P, et al. Stimulation of beta-amyloid precursor protein trafficking by insulin reduces intraneuronal beta-amyloid and requires mitogen-activated protein kinase signaling. *J Neurosci*. 2001;21(8):2561-70.
78. Gasparini L, Netzer WJ, Greengard P, Xu H. Does insulin dysfunction play a role in Alzheimer's disease? *Trends Pharmacol Sci*. 2002;23(6):288-93.
79. Ling X, Martins RN, Racchi M, Craft S, Helmerhorst E. Amyloid beta antagonizes insulin promoted secretion of the amyloid beta protein precursor. *J Alzheimers Dis*. 2002;4(5):369-74.

80. Xie L, Helmerhorst E, Taddei K, Plewright B, Van Bronswijk W, Martins R. Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor. *J Neurosci*. 2002;22(10):RC221.
81. Waterham HR, Koster J, Romeijn GJ, Hennekam RC, Vreken P, Andersson HC, et al. Mutations in the 3beta-hydroxysterol Delta24-reductase gene cause desmosterolosis, an autosomal recessive disorder of cholesterol biosynthesis. *Am J Hum Genet*. 2001;69(4):685-94.
82. FitzPatrick DR, Keeling JW, Evans MJ, Kan AE, Bell JE, Porteous ME, et al. Clinical phenotype of desmosterolosis. *Am J Med Genet*. 1998;75(2):145-52.
83. Greeve I, Hermans-Borgmeyer I, Brellinger C, Kasper D, Gomez-Isla T, Behl C, et al. The human DIMINUTO/DWARF1 homolog seladin-1 confers resistance to Alzheimer's disease-associated neurodegeneration and oxidative stress. *J Neurosci*. 2000;20(19):7345-52.
84. Iivonen S, Hiltunen M, Alafuzoff I, Mannermaa A, Kerokoski P, Puolivali J, et al. Seladin-1 transcription is linked to neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 2002;113(2):301-10.
85. Wechsler A, Brafman A, Shafir M, Heverin M, Gottlieb H, Damari G, et al. Generation of viable cholesterol-free mice. *Science*. 2003;302(5653):2087.
86. Crameri A, Biondi E, Kuehnle K, Lutjohann D, Thelen KM, Perga S, et al. The role of seladin-1/DHCR24 in cholesterol biosynthesis, APP processing and Abeta generation in vivo. *EMBO J*. 2006;25(2):432-43.
87. Kuehnle K, Crameri A, Kalin RE, Luciani P, Benvenuti S, Peri A, et al. Prosurvival effect of DHCR24/Seladin-1 in acute and chronic responses to oxidative stress. *Mol Cell Biol*. 2008;28(2):539-50.
88. Lu X, Kambe F, Cao X, Yoshida T, Ohmori S, Murakami K, et al. DHCR24-knockout embryonic fibroblasts are susceptible to serum withdrawal-induced apoptosis because of dysfunction of caveolae and insulin-Akt-Bad signaling. *Endocrinology*. 2006;147(6):3123-32.
89. Lu X, Kambe F, Cao X, Kozaki Y, Kaji T, Ishii T, et al. 3beta-Hydroxysteroid-delta24 reductase is a hydrogen peroxide scavenger, protecting cells from oxidative stress-induced apoptosis. *Endocrinology*. 2008;149(7):3267-73.
90. Sarajarvi T, Haapasalo A, Viswanathan J, Makinen P, Laitinen M, Soininen H, et al. Down-regulation of seladin-1 increases BACE1 levels and activity through enhanced GGA3 depletion during apoptosis. *J Biol Chem*. 2009;284(49):34433-43.
91. Cecchi C, Rosati F, Pensalfini A, Formigli L, Nosi D, Liguri G, et al. Seladin-1/DHCR24 protects neuroblastoma cells against Abeta toxicity by increasing membrane cholesterol content. *J Cell Mol Med*. 2008;12(5B):1990-2002.
92. Benvenuti S, Luciani P, Vannelli GB, Gelmini S, Franceschi E, Serio M, et al. Estrogen and selective estrogen receptor modulators exert neuroprotective effects and stimulate the expression of selective Alzheimer's disease indicator-1, a recently discovered antiapoptotic gene, in human neuroblast long-term cell cultures. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(3):1775-82.

93. Luciani P, Deledda C, Rosati F, Benvenuti S, Cellai I, Dichiarà F, et al. Seladin-1 is a fundamental mediator of the neuroprotective effects of estrogen in human neuroblast long-term cell cultures. *Endocrinology*. 2008;149(9):4256-66.
94. Peri A, Serio M. Neuroprotective effects of the Alzheimer's disease-related gene seladin-1. *J Mol Endocrinol*. 2008;41(5):251-61.
95. Peri A, Serio M. Estrogen receptor-mediated neuroprotection: The role of the Alzheimer's disease-related gene seladin-1. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2008;4(4):817-24.
96. Giannini S, Benvenuti S, Luciani P, Manuelli C, Cellai I, Deledda C, et al. Intermittent high glucose concentrations reduce neuronal precursor survival by altering the IGF system: the involvement of the neuroprotective factor DHCR24 (Seladin-1). *J Endocrinol*. 2008;198(3):523-32.
97. Battista MC, Roberge C, Otis M, Gallo-Payet N. Seladin-1 expression in rat adrenal gland: effect of adrenocorticotrophic hormone treatment. *J Endocrinol*. 2007;192(1):53-66.
98. Benvenuti S, Luciani P, Cellai I, Deledda C, Baglioni S, Saccardi R, et al. Thyroid hormones promote cell differentiation and up-regulate the expression of the seladin-1 gene in in vitro models of human neuronal precursors. *J Endocrinol*. 2008;197(2):437-46.
99. Rosati F, Sturli N, Cungi MC, Morello M, Villanelli F, Bartolucci G, et al. Gonadotropin-releasing hormone modulates cholesterol synthesis and steroidogenesis in SH-SY5Y cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011;124(3-5):77-83.
100. Zu H, Wu J, Zhang J, Yu M, Hong Z. Testosterone up-regulates seladin-1 expression by iAR and PI3-K/Akt signaling pathway in C6 cells. *Neurosci Lett*. 2012;514(1):122-6.
101. Simi L, Malentacchi F, Luciani P, Gelmini S, Deledda C, Arvia R, et al. Seladin-1 expression is regulated by promoter methylation in adrenal cancer. *BMC Cancer*. 2010;10:201.
102. Drzewinska J, Walczak-Drzewiecka A, Ratajewski M. Identification and analysis of the promoter region of the human DHCR24 gene: involvement of DNA methylation and histone acetylation. *Mol Biol Rep*. 2011;38(2):1091-101.
103. Wang Y, Rogers PM, Stayrook KR, Su C, Varga G, Shen Q, et al. The selective Alzheimer's disease indicator-1 gene (Seladin-1/DHCR24) is a liver X receptor target gene. *Mol Pharmacol*. 2008;74(6):1716-21.
104. Zerenturk EJ, Sharpe LJ, Ikonen E, Brown AJ. Desmosterol and DHCR24: unexpected new directions for a terminal step in cholesterol synthesis. *Prog Lipid Res*. 2013;52(4):666-80.
105. Sharpe LJ, Wong J, Garner B, Halliday GM, Brown AJ. Is seladin-1 really a selective Alzheimer's disease indicator? *J Alzheimers Dis*. 2012;30(1):35-9.
106. Blalock EM, Geddes JW, Chen KC, Porter NM, Markesbery WR, Landfield PW. Incipient Alzheimer's disease: microarray correlation analyses reveal major transcriptional and tumor suppressor responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(7):2173-8.

107. Dunckley T, Beach TG, Ramsey KE, Grover A, Mastroeni D, Walker DG, et al. Gene expression correlates of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2006;27(10):1359-71.
108. Perez A, Morelli L, Cresto JC, Castano EM. Degradation of soluble amyloid beta-peptides 1-40, 1-42, and the Dutch variant 1-40Q by insulin degrading enzyme from Alzheimer disease and control brains. *Neurochem Res*. 2000;25(2):247-55.
109. Qiu WQ, Walsh DM, Ye Z, Vekrellis K, Zhang J, Podlisny MB, et al. Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J Biol Chem*. 1998;273(49):32730-8.
110. Authier F, Posner BI, Bergeron JJ. Insulin-degrading enzyme. *Clin Invest Med*. 1996;19(3):149-60.
111. Miller BC, Eckman EA, Sambamurti K, Dobbs N, Chow KM, Eckman CB, et al. Amyloid-beta peptide levels in brain are inversely correlated with insulin activity levels in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(10):6221-6.
112. Kurochkin IV, Goto S. Alzheimer's beta-amyloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme. *FEBS Lett*. 1994;345(1):33-7.
113. Fernandez-Gamba A, Leal MC, Morelli L, Castano EM. Insulin-degrading enzyme: structure-function relationship and its possible roles in health and disease. *Curr Pharm Des*. 2009;15(31):3644-55.
114. Zhao Z, Xiang Z, Haroutunian V, Buxbaum JD, Stetka B, Pasinetti GM. Insulin degrading enzyme activity selectively decreases in the hippocampal formation of cases at high risk to develop Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2007;28(6):824-30.
115. Stargardt A, Gillis J, Kamphuis W, Wiemhoefer A, Kooijman L, Raspe M, et al. Reduced amyloid-beta degradation in early Alzheimer's disease but not in the APPswePS1dE9 and 3xTg-AD mouse models. *Aging Cell*. 2013;12(3):499-507.
116. Reits E SA, inventor qAb: An early diagnostic and prognosis marker for sporadic Alzheimer's Disease,. Amsterdam, Netherlands; 2013.
117. Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, et al. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(7):4162-7.
118. Leissring MA, Farris W, Chang AY, Walsh DM, Wu X, Sun X, et al. Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron*. 2003;40(6):1087-93.
119. Farris W, Mansourian S, Leissring MA, Eckman EA, Bertram L, Eckman CB, et al. Partial loss-of-function mutations in insulin-degrading enzyme that induce diabetes also impair degradation of amyloid beta-protein. *Am J Pathol*. 2004;164(4):1425-34.
120. Cook DG, Leverenz JB, McMillan PJ, Kulstad JJ, Ericksen S, Roth RA, et al. Reduced hippocampal insulin-degrading enzyme in late-onset Alzheimer's disease is associated with the apolipoprotein E-epsilon4 allele. *Am J Pathol*. 2003;162(1):313-9.
121. Zhao L, Teter B, Morihara T, Lim GP, Ambegaokar SS, Ubeda OJ, et al. Insulin-degrading enzyme as a downstream target of insulin receptor signaling cascade: implications for Alzheimer's disease intervention. *J Neurosci*. 2004;24(49):11120-6.

122. Du J, Zhang L, Liu S, Zhang C, Huang X, Li J, et al. PPARgamma transcriptionally regulates the expression of insulin-degrading enzyme in primary neurons. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;383(4):485-90.
123. Ho L, Qin W, Pompl PN, Xiang Z, Wang J, Zhao Z, et al. Diet-induced insulin resistance promotes amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J*. 2004;18(7):902-4.
124. Zhao L, Yao J, Mao Z, Chen S, Wang Y, Brinton RD. 17beta-Estradiol regulates insulin-degrading enzyme expression via an ERbeta/PI3-K pathway in hippocampus: relevance to Alzheimer's prevention. *Neurobiol Aging*. 2011;32(11):1949-63.
125. Liu J, Zhang Y, Deng X, Yin F. Geniposide decreases the level of Abeta1-42 in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2013;45(9):787-91.
126. Shingo AS, Kanabayashi T, Kito S, Murase T. Intracerebroventricular administration of an insulin analogue recovers STZ-induced cognitive decline in rats. *Behav Brain Res*. 2013;241:105-11.
127. Xu X, Jiang H, Liu H, Zhang W, Xu X, Li Z. The effects of galanin on dorsal root ganglion neurons with high glucose treatment in vitro. *Brain Res Bull*. 2012;87(1):85-93.
128. Russo VC, Higgins S, Werther GA, Cameron FJ. Effects of fluctuating glucose levels on neuronal cells in vitro. *Neurochem Res*. 2012;37(8):1768-82.
129. Gupta A, Bisht B, Dey CS. Peripheral insulin-sensitizer drug metformin ameliorates neuronal insulin resistance and Alzheimer's-like changes. *Neuropharmacology*. 2011;60(6):910-20.
130. Kazkayasi I, Burul-Bozkurt N, Onder S, Kelicen-Ugur P, Pekiner C. Effects of experimental diabetes on C/EBP proteins in rat hippocampus, sciatic nerve and ganglia. *Cell Mol Neurobiol*. 2013;33(4):559-67.
131. Acimovic J, Lovgren-Sandblom A, Monostory K, Rozman D, Golicnik M, Lutjohann D, et al. Combined gas chromatographic/mass spectrometric analysis of cholesterol precursors and plant sterols in cultured cells. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2009;877(22):2081-6.
132. Suzuki R, Lee K, Jing E, Biddinger SB, McDonald JG, Montine TJ, et al. Diabetes and insulin in regulation of brain cholesterol metabolism. *Cell Metab*. 2010;12(6):567-79.
133. Saisho Y. Metformin and Inflammation: Its Potential Beyond Glucose-lowering Effect. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2015;15(3):196-205.
134. El-Mir MY, Daille D, G RV, Delgado-Esteban M, Guigas B, Attia S, et al. Neuroprotective role of antidiabetic drug metformin against apoptotic cell death in primary cortical neurons. *J Mol Neurosci*. 2008;34(1):77-87.
135. Blagosklonny MV. Validation of anti-aging drugs by treating age-related diseases. *Aging (Albany NY)*. 2009;1(3):281-8.
136. Pintana H, Apaijai N, Pratchayasakul W, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. Effects of metformin on learning and memory behaviors and brain mitochondrial functions in high fat diet induced insulin resistant rats. *Life Sci*. 2012;91(11-12):409-14.

137. Hsu CC, Wahlqvist ML, Lee MS, Tsai HN. Incidence of dementia is increased in type 2 diabetes and reduced by the use of sulfonylureas and metformin. *J Alzheimers Dis.* 2011;24(3):485-93.
138. Kickstein E, Krauss S, Thornhill P, Rutschow D, Zeller R, Sharkey J, et al. Biguanide metformin acts on tau phosphorylation via mTOR/protein phosphatase 2A (PP2A) signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(50):21830-5.
139. Li J, Deng J, Sheng W, Zuo Z. Metformin attenuates Alzheimer's disease-like neuropathology in obese, leptin-resistant mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2012;101(4):564-74.
140. Wu C, Miloslavskaya I, Demontis S, Maestro R, Galaktionov K. Regulation of cellular response to oncogenic and oxidative stress by Seladin-1. *Nature.* 2004;432(7017):640-5.
141. Piconi L, Quagliaro L, Assaloni R, Da Ros R, Maier A, Zuodar G, et al. Constant and intermittent high glucose enhances endothelial cell apoptosis through mitochondrial superoxide overproduction. *Diabetes Metab Res Rev.* 2006;22(3):198-203.
142. O'Connor T, Sadleir KR, Maus E, Velliquette RA, Zhao J, Cole SL, et al. Phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha increases BACE1 levels and promotes amyloidogenesis. *Neuron.* 2008;60(6):988-1009.
143. Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, et al. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science.* 1999;286(5440):735-41.
144. Li R, Lindholm K, Yang LB, Yue X, Citron M, Yan R, et al. Amyloid beta peptide load is correlated with increased beta-secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(10):3632-7.
145. Margolis RU, Altszuler N. Insulin in the cerebrospinal fluid. *Nature.* 1967;215(5108):1375-6.
146. Frank HJ, Pardridge WM, Jankovic-Vokes T, Vinters HV, Morris WL. Insulin binding to the blood-brain barrier in the streptozotocin diabetic rat. *J Neurochem.* 1986;47(2):405-11.
147. Zhang Y, Yin F, Liu J, Liu Z, Guo L, Xia Z, et al. Geniposide attenuates insulin-deficiency-induced acceleration of beta-amyloidosis in an APP/PS1 transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 2015;89:7-16.
148. Arevalo MA, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors. *Nat Rev Neurosci.* 2015;16(1):17-29.
149. Lu X, Li Y, Wang W, Chen S, Liu T, Jia D, et al. 3 beta-hydroxysteroid-Delta 24 reductase (DHCR24) protects neuronal cells from apoptotic cell death induced by endoplasmic reticulum (ER) stress. *PLoS One.* 2014;9(1):e86753.
150. Labuzek K, Suchy D, Gabryel B, Bielecka A, Liber S, Okopien B. Quantification of metformin by the HPLC method in brain regions, cerebrospinal fluid and plasma of rats treated with lipopolysaccharide. *Pharmacol Rep.* 2010;62(5):956-65.

8. EKLER

EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1090-1082 • Faks: 0 (312) 310 0580
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index_hdk.php

Sayı: 52338575 -66

10 NİSAN 2013

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 10.04.2013 (SALI)
TOPLANTI SAYISI : 2013/04
DOSYA KAYIT NUMARASI : 2013/18
KARAR NUMARASI : 2013/18-09
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ : Prof.Dr.Can PEKİNER
HAYVAN DENEYLERİNDEN
SORUMLU ARAŞTIRMACI : Uzm.Ecz.İnci KAZKAYASI
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR : Dr.Ecz.Nihan Burul BOZKURT
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI : 96 adet Wistar sıçan

Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Can PEKİNER'in araştırma yürütücüsü olduğu 2013/18 kayıt numaralı "*Diyabet ve Alzheimer Hastalığı Arasındaki İlişkide Seladin-1'in Rolünün Araştırılması*" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür.

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Başkan

EK-2: Tez Çalışması ile İlgili Bildiriler ve Yayınlar

1. Yayınlar

Kazkayasi I, Ismail MA, Parrado-Fernandez C, Björkhem I, Pekiner C, Uma S, Cedazo-Minguez A, Burul-Bozkurt N. Lack of insulin results in reduced seladin-1 expression in primary cultured neurons and in cerebral cortex of STZ-induced diabetic rats. *Neurosci. Lett.* 2016; 28(633):174-181 (doi: 10.1016/j.neulet.2016.09.018)

2. Posterler

Kazkayasi I, Burul-Bozkurt N, Uma S, Cedazo-Minguez A. Diabetic conditions alter insulin degrading enzyme levels. 7th European Congress of Pharmacology (EPHAR), June 26-30, 2016, Istanbul-Turkey.

Kazkayasi I, Burul-Bozkurt N, Lodeiro M, Pekiner C, Ismail MA, Cedazo-Minguez A. Possible role of insulin degrading enzyme (IDE) in relationship between Diabetes Mellitus and Alzheimer's Disease. 12th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases (AD/PD), March 18-22, 2015, Nice-France.



Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neulet

Research article

Lack of insulin results in reduced seladin-1 expression in primary cultured neurons and in cerebral cortex of STZ-induced diabetic rats



İnci Kazkayasi^{a,*}, Muhammad-Al-Mustafa Ismail^b, Cristina Parrado-Fernandez^b,
Ingemar Björkhem^c, Can Pekiner^a, Serdar Uma^a, Angel Cedazo-Minguez^b,
Nihan Burul-Bözçüktürk^{a,1}

^a Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacology, 06100, Sıhhiye, Ankara, Turkey

^b Department of Neurobiology, Care Sciences and Society, Center for Alzheimer Research, Division for Neurogeriatrics, Karolinska Institute, 141 87, Huddinge, Sweden

^c Department of Laboratory Medicine, Division of Clinical Chemistry, Karolinska University Hospital, Huddinge, Sweden

HIGHLIGHTS

- Growing evidence shows that diabetes enhances the risk for Alzheimer's disease.
- Insulin deprivation decreased seladin-1 expression.
- Insulin deprivation increased BACE-1 expression.
- STZ-induced diabetes decreased seladin-1 but not BACE-1 expression in rat cortex.
- Insulin may act as a regulator of seladin-1 expression.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 June 2016
Received in revised form 17 August 2016
Accepted 13 September 2016
Available online 14 September 2016

Keywords:

Seladin-1
Insulin
Alzheimer's disease
Diabetes mellitus
BACE-1

ABSTRACT

Several studies demonstrated that Diabetes mellitus (DM) enhances the risk for Alzheimer's disease (AD). Although hyperglycemia and perturbed function of insulin signaling have been proposed to contribute to AD pathogenesis, the molecular mechanisms behind this association is not clear yet.

Seladin-1 is an enzyme catalyzing the last step in cholesterol biosynthesis converting desmosterol to cholesterol. The neuroprotective function of seladin-1 has gained interest in AD research recently. Seladin-1 has anti-apoptotic properties and regulates the expression of β -secretase (BACE-1). Here we measured seladin-1 mRNA and protein expressions in rat primary cultured neurons under diabetic conditions and also in the brains of rats with streptozotocine (STZ)-induced diabetes.

We show that constant lack of insulin for 5 days decreased seladin-1 levels in cultured rat primary neurons. Similarly, a decrease in seladin-1 was found in the brains of rats with STZ-induced diabetes. However, if the lack of insulin and/or high glucose treatment was intermittent, neuronal seladin-1 levels were not affected *in vitro*. On the other hand, treatment of neurons with metformin resulted in a significant increase in seladin-1. Constant lack of insulin for 5 days, as well as high glucose treatment, increased the neuronal expression of BACE-1 *in vitro*, but not in the *in vivo* model.

Our study defines insulin as a regulator of seladin-1 expression for the first time. The relevance of these findings for the association of DM with AD is discussed.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Diabetes mellitus (DM), characterized by insulin resistance and/or decreased insulin production, has been shown by epidemiological studies to increase the risk of Alzheimer's disease (AD) [1–4]. Although hyperglycemia, perturbed function of insulin and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) signaling have been proposed to contribute to AD pathogenesis; the molecular mechanism behind

* Corresponding author.

E-mail addresses: inci.kazkayasi@hacettepe.edu.tr, incikazkayasi@gmail.com (I. Kazkayasi).

¹ Present address: Turkish Medicines and Medical Devices Agency, Clinical Trials Department, Ankara, Turkey.

this association is not clear yet [5]. The reduced expression of insulin receptor downstream targets like phospho-Akt, phospho-GSK-3 β accompanying increased AD pathological hallmarks was shown in the frontal cortex of transgenic diabetic mice [5]. Perturbed insulin receptor signaling and enhanced amyloid β (A β) burden have also been described in the brains of streptozotocine (STZ)-induced diabetic amyloid precursor protein (APP) transgenic mice [6]. STZ administration was also shown to accelerate A β accumulation in the brain of a transgenic mice model carrying familial AD mutations (5XFAD mice) [7]. Moreover, levels of A β and hyperphosphorylated tau were increased in the brains of STZ-induced diabetic rats [8] and mice [9]. Increased tau phosphorylation was also found in the brain of db/db mice, a transgenic obesity, diabetes and dyslipidemia mouse model [9]. As a possible mechanism, it has been suggested that brain insulin deficiency, seen in diabetic conditions, may change APP processing to favor A β formation through both upregulation of β -Secretase (BACE-1) and APP synthesis [10] and may cause tau hyperphosphorylation by reducing the activity of phospho-GSK-3 β and phosphatidylinositol-3-kinase-Akt pathway [11–13].

An interesting study with neuroepithelial cells showed that chronic and intermittent high glucose concentrations reduced the amount of seladin-1 mRNA [14]. Additionally, seladin-1 was found downregulated in the vulnerable brain regions of AD patients [15]. Furthermore, down-regulation in seladin-1 transcription was associated with hyperphosphorylated tau in brains from AD individuals [16], although others have reported contradictory results [17]. On the other hand, a reduction in seladin-1, seen under apoptosis, resulted in enhanced BACE-1 levels and activity and thus increased β -amyloidogenic processing of APP and A β production [18].

The main function of seladin-1, also known as 3-beta-hydroxysterol delta-24-reductase (DHCR24) is to catalyze the last step of cholesterol biosynthesis converting desmosterol to cholesterol [19]. Greeve et al. [15] reported that expression of seladin-1 protected the cells from apoptotic cell death by inhibition of caspase-3 activation after either A β -mediated toxicity or oxidative stress. There is growing evidence about the anti-apoptotic properties and neuroprotective effects of seladin-1 against acute and chronic oxidative stress [15,16,20–22]. Seladin-1 also has been suggested to mediate the neuroprotective effects of estrogen [23–26]. Indeed, estrogen and selective estrogen receptor modulators increased the expression of seladin-1 [23]. Furthermore, silencing of the seladin-1 gene completely abrogated the protective effect of estradiol against the toxic insults of A β and H₂O₂ [24]. Decreased estrogen have been associated with type 1 diabetes [27] and in STZ-induced diabetic rats [28]. Taken together, these findings suggest that DM may affect seladin-1 expression. In the present study, we investigated whether diabetic conditions would affect seladin-1 expression in rat primary cultured neurons and in the brains of STZ-induced diabetic rats.

2. Materials and methods

In vitro experiments were performed in primary cultured cortical and hippocampal neurons.

2.1. Rat primary culture

All procedures of primary culture were approved by the local ethical committee of Karolinska Institute, Stockholm (permit number: S194-11), and performed in compliance with national and local animal care and use guidelines. All the efforts were made to minimize the suffering of the animals. Cortical and hippocampal tissues from 21-day-old rat embryos were pooled and homogenized in serum-free neurobasal medium. Cells were seeded in dishes pre-

coated with poly-D-lysine in neurobasal medium with (2%) B27 supplement, (1%) penicillin-streptomycin and (0.25%) glutamax. Cultures were kept at 37 °C in a moist atmosphere (95% air–5% CO₂). Medium was changed every 3–4 days. 14-day-old mature cultures were used for all experiments.

2.2. In vitro experiments

Mature primary neurons were incubated for 48 h and 5 days as acute and chronic incubation durations respectively. High and normal glucose concentrations were considered as 45 mM and 25 mM respectively according to the physiology of neurons compatible with high glucose consumption [29,30]. The source of insulin was B27 supplement. Both B27 and insulin free B27 supplements (B-27[®] Supplement Minus Insulin) were used in the study. Control group was incubated with 25 mM glucose and B27 supplement. (–) insulin group was incubated with 25 mM glucose and insulin free B27 supplement. (–) Insulin with high glucose group was incubated with 45 mM glucose and insulin free B27 supplement. (+) Insulin with high glucose group was incubated with 45 mM glucose and B27 supplement. Mannitol group was created as a control group for osmolarity and incubated with 45 mM mannitol and B27 supplement. Metformin groups were incubated with 1 mM metformin, 45 mM glucose and insulin free B27 supplement or B27 supplement. All groups can be seen in tables given under figures. Physiological glucose concentration (25 mM) was replaced with high glucose concentration (45 mM) every 24 h in intermittent treatment groups. Insulin content was adjusted every other day as well. Cell viability was assessed by MTT (4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) assay.

2.3. In vivo experiments

All animal procedures of *in vivo* experiments were approved by Hacettepe University Animal Ethics Committee (permit number: 2013/18-09), and performed in compliance with national and local animal care and use guidelines. Female Wistar rats (200–250 g) obtained from Hacettepe University Unit of Experimental Animals were housed under a 12 h light/dark cycle with food and water *ad libitum*. Diabetes was experimentally induced by a single i.p. injection of STZ (65 mg/kg) in 0.1 M citrate buffer (pH 4.5). For control group, animals were injected with citrate buffer. Hyperglycemia was confirmed 72 h after STZ injection by measuring tail vein blood glucose levels using a glucometer. Animals with mean blood glucose levels above 250 mg/dL were considered diabetic. At the end of the experiments, blood glucose levels and body weights of all animals were measured again. Animals were sacrificed by decapitation under CO₂ anesthesia after 12 weeks. Cerebral cortex was dissected and immediately frozen in liquid nitrogen and stored in –80 °C deep freezer until usage.

2.4. Western blot

After treatment periods, cells were collected and centrifuged (10000 rpm for 10 min) at +4 °C. Pellets or tissues obtained from STZ animals were lysed in the same lysis buffer (50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 1% triton X-100; pH 7.4) containing freshly added 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, protease and phosphatase inhibitors. Pierce BSA kit was used for protein determination. Equal amounts of proteins were separated by electrophoresis on (10%) sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. Proteins were transferred electrophoretically to nitrocellulose membranes. After blocking with 5% low-fat dried milk in TBS-T, membranes were incubated with the following primary antibodies: Anti-Seladin (1:400), anti-BACE (1 μ g/mL), anti-Actin (1:200). The incubation with primary antibodies was followed by incubation with secondary antibod-

ies at 1:10000 dilutions. Immunoreactive bands were detected by ECL detection system. The immunoreactivity of the bands was calculated using ImageJ software. β -actin antibody was used as an internal control.

2.5. RNA purification, reverse transcription (RT), and relative real-time RT-PCR (qRT-PCR) by relative standard curve method

Total RNA from rat primary neurons was extracted by using the RNeasy mini kit acquired from Qiagen (CA, USA) and DNase treatment (RNase-Free DNase Set, Qiagen). Genomic DNA contamination was evaluated by running RNA samples on agarose gels and the purity was assessed by RNA 260/280 ratio. 200 ng of total RNA of each sample was reverse-transcribed using High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). To perform real-time RT-PCR amplification assays, we used Relative Standard Method supplied by Applied Biosystem as shown before [31]. Thermocycling and fluorescence detection was performed using a ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System with a total volume of 20 μ l in each well containing 10 μ l of PCR Master Mix, 2 μ l of cDNA corresponding to 10 ng of RNA, and 1 μ l of each TaqMan® Gene Expression Assays. mRNA copy numbers of seladin-1 (DHCR-24 Primer for rat, Rn01417370-m1, Life Technologies) and BACE (BACE Primer for rat, Rn00569988-m1, Life Technologies) were calculated with those of a standard curve run on the same plate and were adjusted by mRNA copy numbers of RPLPO (RPLPO primer for rat, Rn01417370-m1). Changes in gene expression were expressed in percentage compared to controls (set at 100%) and reported as the mean \pm SEM in all experiments.

2.6. Immunocytochemistry

Immunocytochemistry was performed on hippocampal neuronal cells from primary cultures. Cells were fixed with paraformaldehyde. Cover slips were incubated with both the primary (seladin-1) and secondary (Alexa fluor 488 chicken anti-rabbit) antibodies. DAPI was used to identify the nuclei of cell bodies. For negative control the primary antibody was omitted. Confocal imaging was performed with a Zeiss LSM 510 META confocal laser scanning system. The fluorescence of DAPI and Alexa 488 was recorded through separate channels with a 40 \times lens.

2.7. Cholesterol and desmosterol measurements

Levels of cholesterol and desmosterol were assayed using isotope dilution-mass spectrometry as described previously [32].

2.8. Statistical analysis

Results were expressed as a mean \pm standard error of mean (SEM). Tests were analyzed with two ways analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post hoc test and Student's T test using Graphpad Prism software. The level of statistical significance was set at $p < 0.05$ for all parameters.

3. Results

3.1. A 5 days constant lack of insulin and high glucose condition decreased seladin-1 expression

The effects of lacking insulin, high glucose (45 mM) or both conditions on seladin-1 expression were investigated after 5 days constant treatment. Lack of insulin caused a significant decrease of seladin-1 protein expression in primary cultured cortical neurons ($p < 0.001$) compared to controls ((+) insulin and 25 mM glucose). The combination of insulin deprivation with high glucose (45 mM)

further decreased seladin-1 levels ($p < 0.001$) (Fig. 1A). However, adding insulin in the presence of high glucose managed to rescue the expression of seladin-1 to levels comparable to control. Mannitol (45 mM) was used as control for the possible effects of changes in media osmolarity [30] revealing no significant difference in relation to the control. Addition of metformin (1 mM), a drug commonly used to treat DM, to high glucose and (+) insulin conditions caused a significant increase in seladin-1 levels, as compared to all groups investigated ($p < 0.001$) (Fig. 1A).

Fig. 1B shows effects on seladin-1 mRNA levels that were found similar to those seen in protein levels. In these experiments, an additional group was investigated: the combination of metformin (1 mM) with high glucose concentrations in the absence of insulin (black bar). As seen in Fig. 1B, under all conditions where insulin was absent, a significant decrease in seladin-1 mRNA levels was found. Similar results were also presented in hippocampal primary neurons (Fig. 1C).

Immunocytochemical studies confirmed that lack of insulin and both lack of insulin and high glucose conditions caused an apparent decrease in seladin-1 staining (red labeled) (Fig. 1E, a compared to b and c). Treated neurons seemed morphologically normal. Seladin-1 staining was found mainly in areas consistent with the endoplasmic reticulum localization, as previously described [21]. No apparent change in the localization of seladin-1 was found among the different groups under investigation.

A shorter treatment period (48 h) with the same conditions described above was also investigated. None of the 48 h conditions affected seladin-1 protein (Fig. 1F) or mRNA levels (Fig. 1G).

3.2. Lack of insulin and/or high glucose concentration did not affect cell viability

The effects of high glucose and lack of insulin on cell viability were investigated, as to explore the possibility that the effects seen above on seladin-1 expression were due to cell loss. As seen in Fig. 1H, none of the used conditions for 5 days resulted in change of cell viability, as determined by the MTT assay.

3.3. Conditions of intermittent lack of insulin and/or high glucose did not alter seladin-1 expression in primary neurons

We next investigated if intermittent fluctuations of glucose and/or insulin would alter seladin-1 expression. Fig. 2 shows the obtained results for 5 days (Fig. 2A and B) and 48 h treatment (Fig. 2C and D). None of the intermittent conditions investigated resulted in significant changes on seladin-1 expression.

Addition of metformin to intermittent glucose treatment did not alter seladin-1 expression significantly (Fig. 2). Moreover, none of the investigated conditions affected cell viability after 5 days intermittent treatment (Fig. 2E).

3.4. Desmosterol levels in diabetic conditions

We further investigated whether the reduced effects on seladin-1 expression due to the lack of insulin and/or high glucose would affect the main activity of seladin-1 in converting desmosterol to cholesterol. As seen in Fig. 3, a 5 days treatment with lacking insulin and high glucose induced an increase in the desmosterol/cholesterol ratio ($p < 0.09$).

3.5. A 5 days constant lack of insulin and high glucose condition increased BACE-1 expression

We examined BACE-1 expression in primary cortical neurons according to the same pattern investigated in Fig. 1; diabetic conditions (5 days constant treatment). We found that lack of insulin,

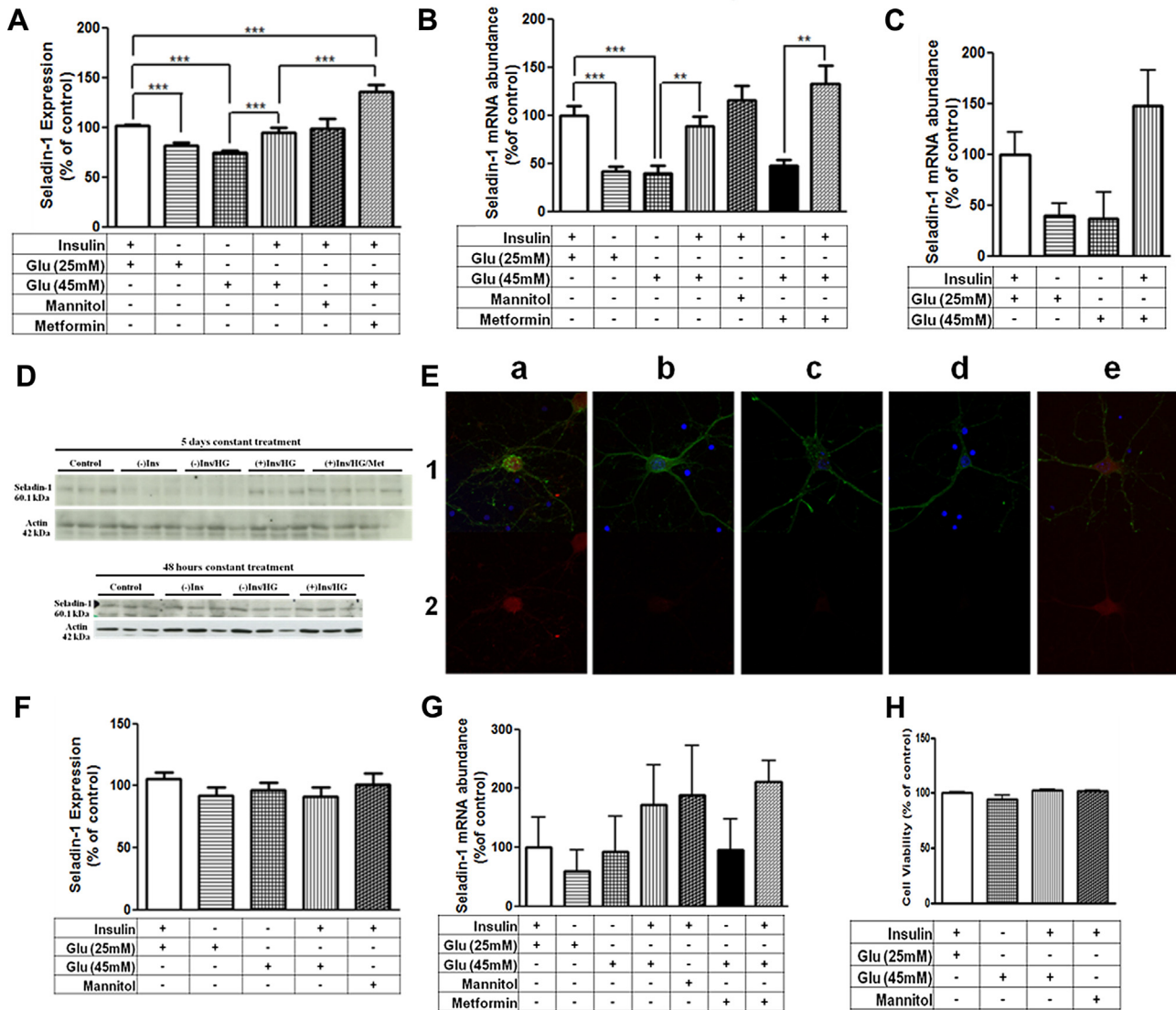


Fig. 1. (A) Western blot results of seladin-1 after 5 days constant treatment of primary cortical neurons (*** $p < 0.001$) Control $n = 20$, (-) Insulin $n = 12$, (-) Insulin/High Glucose $n = 15$, (+) Insulin/High Glucose $n = 16$, Mannitol $n = 7$, Metformin/Insulin $n = 4$, (B) RT-PCR results of seladin-1 after 5 days constant treatment of primary cortical neurons (*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$) Control, (-) Insulin, (-) Insulin/High Glucose, (+) Insulin/High Glucose; $n = 6$ in each group, Mannitol, Metformin/Insulin; $n = 3$ in each group, (C) RT-PCR results of seladin-1 after 5 days constant treatment of primary hippocampal neurons $n = 3$ in all groups. (D) Representative images of Western blots of primary cortical neurons. (E) Immunocytochemistry results of seladin-1 after 5 days of constant treatment of primary hippocampal neurons stained for seladin-1 (red), tubulin (green) and nuclei (blue). Column a: Control, b: (-) Insulin, c: (-) Insulin/High Glucose, d: (+) Insulin/High Glucose, e: Mannitol (F) Western blot results of seladin-1 after 48 h constant treatment of primary cortical neurons. Control $n = 6$, (-) Insulin $n = 6$, (-) Insulin/High Glucose $n = 6$, (+) Insulin/High Glucose $n = 6$, mannitol $n = 4$, (G) RT-PCR results of seladin-1 after 48 h constant treatment of primary cortical neurons, $n = 3$ in all groups. (H) Cell viability after 5 days constant high glucose treatment in primary cultured cortical neurons ($n = 6$ in each group). ANOVA followed by Bonferroni was used to check statistically significance.

independent of glucose levels, resulted in a significant increase in BACE-1 protein expression (Fig. 4A). However, with regard to effects on mRNA, only the group with high glucose in the absence of insulin displayed a significant increase in BACE-1 mRNA levels (Fig. 4B).

3.6. STZ-induced diabetes decreased seladin-1 expression but did not alter BACE-1 expression in rat cortex

Effects of insulin deficiency and hyperglycemia were investigated in rats made diabetic by STZ injection. 12 weeks after STZ injection, seladin-1 expression in cerebral cortex was measured. Seladin-1 expression was reduced by $14.21 \pm 4.8\%$ in the cortex of the diabetic group compared to the control group (Fig. 5A). There was no significant change in BACE-1 expression in cerebral cortex (Fig. 5B) and in seladin-1 expression and mRNA levels

in hippocampus of diabetic rats (data not shown). Blood glucose concentration was significantly increased in diabetic group (518.4 ± 36.03 mg/dL, $n = 7$) compared to vehicle injected control group (135.7 ± 8.5 mg/dL, $n = 13$) ($p < 0.0001$).

4. Discussion

Five days constant exposure of cells to insulin free media decreased seladin-1 expression in primary cultured cortical neurons. In the absence of insulin, treatment with high glucose (45 mM) produced a further decrease in seladin-1 levels whereas exposure of the cells to high glucose in the presence of insulin had no effect. These results suggest that insulin rather than glucose is the major determinant of brain seladin-1 levels. Consistent with our results Suzuki et al. [33] had indicated that hyperglycemia was not the major driver for the suppression of cholesterol synthesis in dia-

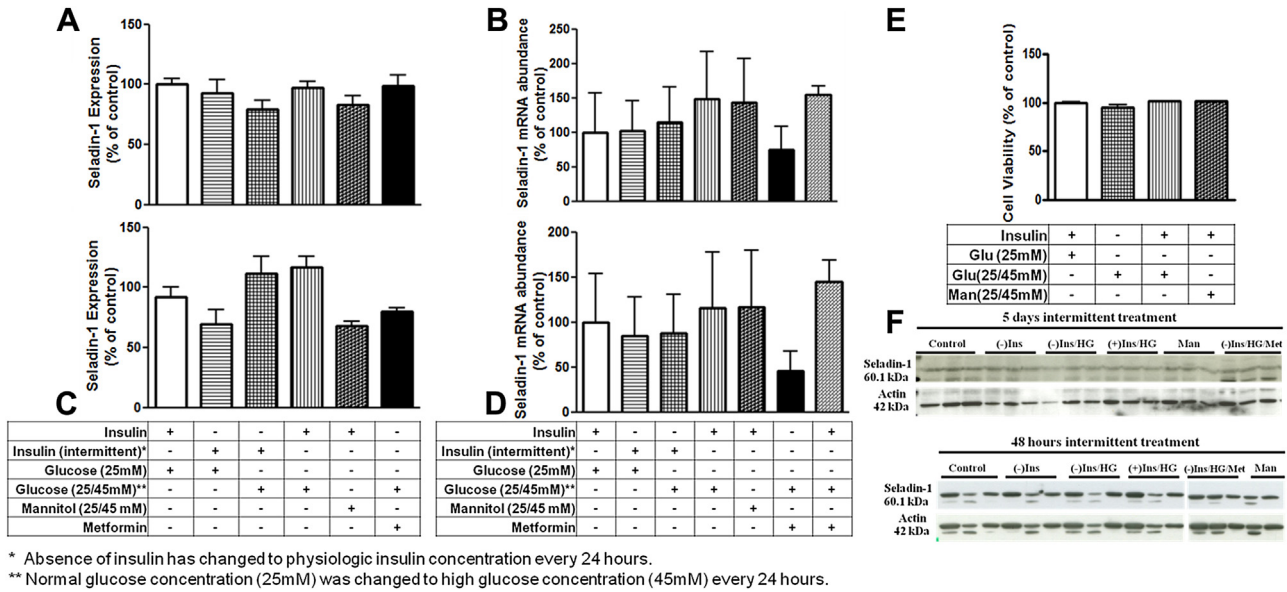


Fig. 2. (A) Western blot results of seladin-1 after 5 days intermittent treatment of primary cortical neurons. Control n = 12, (-) Insulin n = 9, (-) Insulin/High Glucose n = 12, (+) Insulin/High Glucose n = 9, mannitol n = 8, metformin n = 3. (B) RT-PCR results of seladin-1 after 5 days intermittent treatment of primary cortical neurons. n = 3 in all groups. (C) Western blot results of seladin-1 after 48 h intermittent treatment of primary cortical neurons. Control n = 5, (-) Insulin n = 6, (-) Insulin/High Glucose n = 5, (+) Insulin/High Glucose n = 5, mannitol n = 4, metformin n = 3. (D) RT-PCR results of seladin-1 after 48 h intermittent treatment of primary cortical neurons. n = 3 in all groups. (E) Cell viability after 5 days intermittent high glucose treatment in primary cultured cortical neurons (n = 6 in each group). (F) Representative images of Western blots of primary cortical neurons. ANOVA followed by Bonferroni was used to check statistically significance.

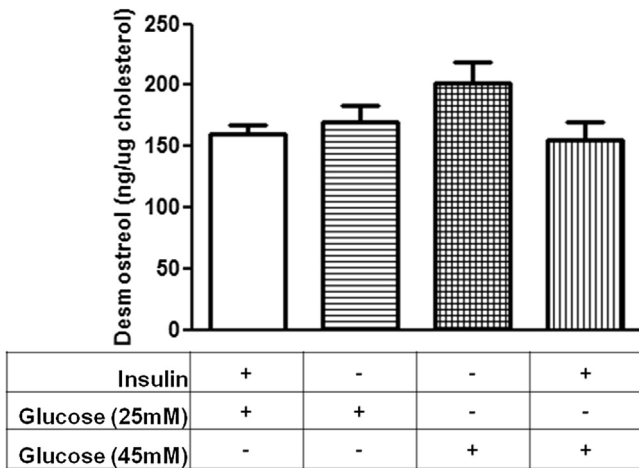


Fig. 3. Desmosterol-to-cholesterol conversion ratio after 5 days constant treatment of primary cortical neurons (n = 4 in each group) (p < 0.09). ANOVA followed by Bonferroni was used to check statistically significance.

betes by showing that reduction of blood glucose using phlorizin in STZ-induced mice did not reverse suppression of cholesterol biosynthesis. Our study has presented evidence for the first time that insulin may act as a regulator of seladin-1 expression. However, it is reported that constant high glucose concentration alone decreased mRNA of seladin-1 in fetal neuroepithelial cells [14]. The reason for this discrepancy is unknown, although it could be speculated that it might be due to differences of the cell type and/or of the incubation periods.

To analyze the functional effects of lacking insulin and high glucose condition on decreased seladin-1 levels, we measured the desmosterol-to-cholesterol conversion ratio. Only the treatment lacking insulin and high glucose resulted in accumulation of desmosterol. Since this condition caused the highest reduction in seladin-1 expression in our paradigm, it is suggested that small reductions in seladin-1 levels do not affect its functional activ-

ity in the synthesis of cholesterol. Even though there is no study in the literature measuring the desmosterol/cholesterol ratio in brains of STZ-induced diabetic animals, it has been shown that seladin-1 deficient mouse brains had increased ratio of desmosterol/cholesterol [34,35] indicating a possible correlation *in vivo*.

Distinct exposure periods were designed to mimic the acute and chronic phases of diabetes under variable conditions that allow distinguishing the effects of insulin signaling disturbances and hyperglycemia. 48 h treatment with the same conditions of 5 days exposure did not affect seladin-1 protein or mRNA expression suggesting that it is a short incubation period to detect any change on seladin-1 level.

Recent studies have shown that metformin which is frequently prescribed in DM, could be a promising medication for AD [36–38] as it has been shown to attenuate the development of dementia in patients with diabetes [39,40]. In our study, neurons treated with metformin in the presence of insulin displayed increased seladin-1 expression compared to controls indicating to an enhanced insulin effect in the presence of metformin.

Glucose fluctuations similar to those observed in poorly controlled diabetic patients have been considered to be more deleterious than being exposed to continuous levels of high glucose [14,30,41]. In the present work, the goal of executing intermittent treatments with varying glucose concentrations (25/45 mM) in primary cultured cortical neurons was to mimic the conditions of poorly controlled diabetes. However, none of the intermittent treatments performed (48 h or 5 days) affected seladin-1 levels suggesting that this deleterious effect is not related to reduced seladin-1 levels.

The neuroprotective function of seladin-1 has gained interest in AD research. In the brain of seladin-1 deficient mice, reduced levels of cholesterol and disorganized cholesterol-rich detergent-resistant membrane domains have been shown to cause increased APP amyloidogenic cleavage which leads to Aβ peptide accumulation [34]. A reduction of the enzymatic activity of seladin-1 was shown to decrease plasma membrane cholesterol and to increase the cell vulnerability to Aβ42 oligomers [42]. Moreover, a reduc-

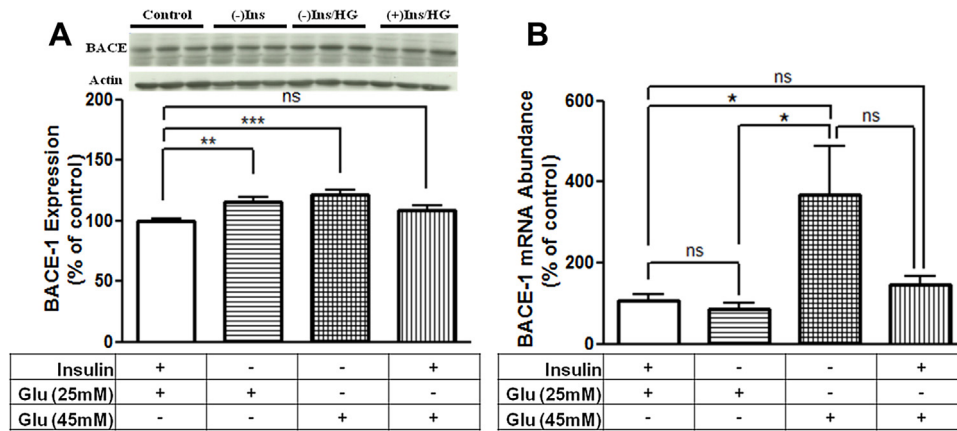


Fig. 4. (A) Western blot results of BACE-1 after 5 days constant treatment of primary cortical neurons ($***p < 0.001$, $**p < 0.01$) Control $n = 15$, (-) Insulin $n = 14$, (-) Insulin/High Glucose $n = 10$, (+) Insulin/High Glucose $n = 11$, (B) RT-PCR results of BACE-1 after 5 days constant treatment of primary cortical neurons ($*p < 0.05$) $n = 6$ in all groups. ANOVA followed by Bonferroni was used to check statistically significance.

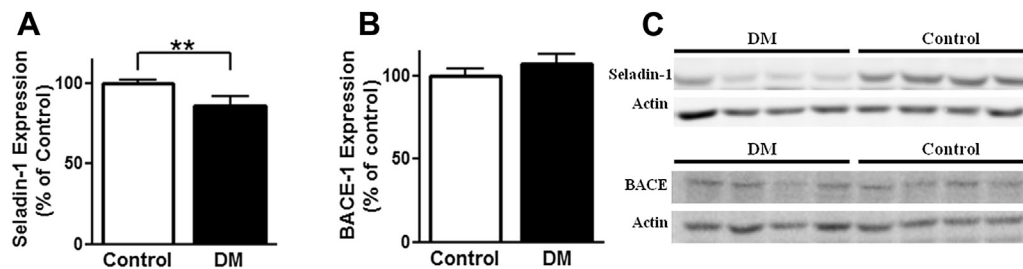


Fig. 5. Western blot results of (A) seladin-1 and (B) BACE-1 in cerebral cortex, 12 weeks after STZ injection ($**p < 0.01$) Control $n = 13$, DM (Diabetes Mellitus) $n = 7$. (C) Representative images of Western blots in cerebral cortex of STZ-induced rats. Student's T test was used to check statistically significance.

tion in seladin-1 level, seen under apoptosis, resulted in enhanced BACE-1 levels and activity and thus increased β -amyloidogenic processing of APP and $A\beta$ production [18]. In view of our results, a decrease in seladin-1 levels could be a factor responsible for the negative effects of DM on neurons. We found that lack of insulin resulted in a significant increase in BACE-1 protein expression independent of high glucose levels. Interestingly, an insulin-free media containing high glucose also resulted in a significant increase in BACE-1 mRNA levels whereas no difference was measured in insulin-free media alone. Similar results showing elevated levels of BACE-1 protein with no changing in mRNA levels have been reported in different studies [7,43]. BACE-1 might be one of the proteins regulated differently in terms of transcriptional and translational mechanisms as suggested previously by Devi et al. [7]. Thus, lack of insulin alone could have been insufficient to trigger the elevation of mRNA of BACE-1. Although we could not provide evidence demonstrating a direct relation between decreased seladin-1 and increased BACE-1, elevated BACE-1 under diabetic conditions may represent an important consequence of amyloidogenic processing of APP and $A\beta$ accumulation which gives support to the studies showing excess $A\beta$ production following a rise in BACE-1 [44,45].

Previous studies showed that STZ-induced insulin deficient mice develop cognitive dysfunction and impaired abilities for spatial memory [10,46]. Several reports have examined the incidence of Alzheimer type pathologies in STZ-induced DM models [6–9]. We found that peripheral administration of STZ reduced seladin-1 levels in cerebral cortex of 12 week diabetic rats. Since brain insulin level positively correlates with the blood insulin [47–49] and STZ-induced diabetic animals display decreased brain insulin levels [6,50,51] our *in vivo* results showing reduced levels of seladin-1 is in agreement with the *in vitro* results, and with the idea that low insulin levels may decrease seladin-1 expression in brain.

However, STZ administration did not result in increased BACE-1 levels. The extent of the reduction in seladin-1 levels might be insufficient to increase BACE-1 levels in 12 week diabetic rats. On the other hand, activity of BACE-1 might be as important as its tissue levels since in a mouse model with reduced seladin-1 (seladin-1 +/-) APP membrane segregation and its functional interaction with BACE-1 have been shown to be affected [34].

Seladin-1 has been shown to cause neuroprotection by several mechanisms including its function on cholesterol synthesis and thereby maintaining a functional membrane and participating in neuronal repair mechanisms [20,22,34,42,52]. Besides, seladin-1 displays anti-apoptotic features by inhibiting caspase-3 [15] and a H_2O_2 scavenger activity [53]. Furthermore, seladin-1 was shown to contribute to the neuroprotective effects of estradiol [23,24]. On the other hand, estrogen and other hormones like androgens, adrenocorticotropic hormone and thyroid hormone, as well as regulators of lipid homeostasis like the sterol regulatory element binding protein and liver X receptors have been shown to regulate seladin-1 expression [21]. Our study has demonstrated that insulin may also act as a regulator of seladin-1 expression. The fact that insulin-like growth factor-1, which shares the downstream pathways with insulin, has also been shown to regulate seladin-1 expression [26], strengthens the concept of insulin signaling as a regulator of seladin-1 synthesis.

Several studies demonstrated that DM enhances the risk for AD [1,2,54]. Growing evidence suggest that AD is associated with brain insulin deficiency [55] and/or responsiveness to insulin and IGF stimulation [56,57]. Further studies are needed to clarify the exact role of insulin on seladin-1 production in neurons. In view of the positive roles of seladin-1 on apoptosis, neuroprotection and cholesterol synthesis, a reduction of its expression due to impaired insulin signaling may have an important role in the pathogenesis

of AD and could be one of the mechanisms behind the association between DM and AD.

Acknowledgments

This study was supported by The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) (Programme: 2214-A), Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project numbers: 013D07301002-347 and TBI-2015-6639) and by the following Swedish foundations: Swedish Brain Power, the regional agreement on medical training and clinical research (ALF) between Stockholm County Council and Karolinska Institutet, Strategic Neuroscience Program, Margaretha af Ugglas Foundation, Olle Engkvist Byggmästare Stiftelse, Gun och Bertil Stohnes Stiftelse, Karolinska Institutet fund for geriatric research, Stiftelsen Gamla Tjänarinnor, Hjärnfonden and Alzheimerfonden. We would like to thank to Paula Merino-Serrais for her generous helps with the immunocytochemistry method.

References

- [1] C.L. Leibson, W.A. Rocca, V.A. Hanson, R. Cha, E. Kokmen, P.C. O'Brien, P.J. Palumbo, The risk of dementia among persons with diabetes mellitus: a population-based cohort study, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 826 (1997) 422–427.
- [2] A. Ott, R.P. Stolk, F. van Harskamp, H.A. Pols, A. Hofman, M.M. Breteler, Diabetes mellitus and the risk of dementia: the Rotterdam study, *Neurology* 53 (1999) 1937–1942.
- [3] R. Peila, B.L. Rodriguez, L.J. Launer, S. Honolulu-Asia Aging, Type 2 diabetes, APOE gene, and the risk for dementia and related pathologies: the Honolulu-Asia aging study, *Diabetes* 51 (2002) 1256–1262.
- [4] J.A. Luchsinger, M.X. Tang, S. Shea, R. Mayeux, Hyperinsulinemia and risk of Alzheimer disease, *Neurology* 63 (2004) 1187–1192.
- [5] Z.G. Li, W. Zhang, A.A. Sima, Alzheimer-like changes in rat models of spontaneous diabetes, *Diabetes* 56 (2007) 1817–1824.
- [6] C.G. Jolivalt, R. Hurford, C.A. Lee, W. Dumaop, E. Rockenstein, E. Masliah, Type 1 diabetes exaggerates features of Alzheimer's disease in APP transgenic mice, *Exp. Neurol.* 223 (2010) 422–431.
- [7] L. Devi, M.J. Alldred, S.D. Ginsberg, M. Ohno, Mechanisms underlying insulin deficiency-induced acceleration of beta-amyloidosis in a mouse model of Alzheimer's disease, *PLoS One* 7 (2012) e32792.
- [8] Y. Liu, H. Liu, J. Yang, X. Liu, S. Lu, T. Wen, L. Xie, G. Wang, Increased amyloid beta-peptide (1–40) level in brain of streptozotocin-induced diabetic rats, *Neuroscience* 153 (2008) 796–802.
- [9] B. Kim, C. Backus, S. Oh, J.M. Hayes, E.L. Feldman, Increased tau phosphorylation and cleavage in mouse models of type 1 and type 2 diabetes, *Endocrinology* 150 (2009) 5294–5301.
- [10] F. Derakhshan, C. Toth, Insulin and the brain, *Curr. Diabetes Rev.* 9 (2013) 102–116.
- [11] M. Schubert, D.P. Brazil, D.J. Burks, J.A. Kushner, J. Ye, C.L. Flint, J. Farhang-Fallah, P. Dikkes, X.M. Warot, C. Rio, G. Corfas, M.F. White, Insulin receptor substrate-2 deficiency impairs brain growth and promotes tau phosphorylation, *J. Neurosci.* 23 (2003) 7084–7092.
- [12] M. Schubert, D. Gautam, D. Surjo, K. Ueki, S. Baudler, D. Schubert, T. Kondo, J. Alber, N. Galldik, E. Kustermann, S. Arndt, A.H. Jacobs, W. Krone, C.R. Kahn, J.C. Bruning, Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 3100–3105.
- [13] E. Grunblatt, M. Salkovic-Petrisic, J. Osmanovic, P. Riederer, S. Hoyer, Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein, *J. Neurochem.* 101 (2007) 757–770.
- [14] S. Giannini, S. Benvenuti, P. Luciani, C. Manuelli, I. Cellai, C. Deledda, A. Pezzatini, G.B. Vannelli, E. Maneschi, C.M. Rotella, M. Serio, A. Peri, Intermittent high glucose concentrations reduce neuronal precursor survival by altering the IGF system: the involvement of the neuroprotective factor DHCR24 (Seladin-1), *J. Endocrinol.* 198 (2008) 523–532.
- [15] I. Greeve, I. Hermans-Borgmeyer, C. Brellinger, D. Kasper, T. Gomez-Isla, C. Behl, B. Levkau, R.M. Nitsch, The human DIMINUTO/DWARF1 homolog seladin-1 confers resistance to Alzheimer's disease-associated neurodegeneration and oxidative stress, *J. Neurosci.* 20 (2000) 7345–7352.
- [16] S. Iivonen, M. Hiltunen, I. Alafuzoff, A. Mannermaa, P. Kerokoski, J. Puolivali, A. Salminen, S. Helisalmi, H. Soininen, Seladin-1 transcription is linked to neuronal degeneration in Alzheimer's disease, *Neuroscience* 113 (2002) 301–310.
- [17] L.J. Sharpe, J. Wong, B. Garner, G.M. Halliday, A.J. Brown, Is seladin-1 really a selective Alzheimer's disease indicator? *J. Alzheimers Dis.* 30 (2012) 35–39.
- [18] T. Sarajarvi, A. Haapasalo, J. Viswanathan, P. Makinen, M. Laitinen, H. Soininen, M. Hiltunen, Down-regulation of seladin-1 increases BACE1 levels and activity through enhanced GGA3 depletion during apoptosis, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 34433–34443.
- [19] H.R. Waterham, J. Koster, G.J. Romeijn, R.C. Hennekam, P. Vreken, H.C. Andersson, D.R. FitzPatrick, R.I. Kelley, R.J. Wanders, Mutations in the 3beta-hydroxysterol delta24-reductase gene cause desmosterolosis, an autosomal recessive disorder of cholesterol biosynthesis, *Am. J. Hum. Genet.* 69 (2001) 685–694.
- [20] X. Lu, F. Kambe, X. Cao, T. Yoshida, S. Ohmori, K. Murakami, T. Kaji, T. Ishii, D. Zadworny, H. Seo, DHCR24-knockout embryonic fibroblasts are susceptible to serum withdrawal-induced apoptosis because of dysfunction of caveolae and insulin-Akt-Bad signaling, *Endocrinology* 147 (2006) 3123–3132.
- [21] E.J. Zerenturk, L.J. Sharpe, E. Ikonen, A.J. Brown, Desmosterol and DHCR24: unexpected new directions for a terminal step in cholesterol synthesis, *Prog. Lipid Res.* 52 (2013) 666–680.
- [22] X. Lu, Y. Li, W. Wang, S. Chen, T. Liu, D. Jia, X. Quan, D. Sun, A.K. Chang, B. Gao, 3 beta-hydroxysteroid-delta 24 reductase (DHCR24) protects neuronal cells from apoptotic cell death induced by endoplasmic reticulum (ER) stress, *PLoS One* 9 (2014) e86753.
- [23] S. Benvenuti, P. Luciani, G.B. Vannelli, S. Gelmini, E. Franceschi, M. Serio, A. Peri, Estrogen and selective estrogen receptor modulators exert neuroprotective effects and stimulate the expression of selective Alzheimer's disease indicator-1, a recently discovered antiapoptotic gene, in human neuroblast long-term cell cultures, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90 (2005) 1775–1782.
- [24] P. Luciani, C. Deledda, F. Rosati, S. Benvenuti, I. Cellai, F. Dichiarà, M. Morello, G.B. Vannelli, G. Danza, M. Serio, A. Peri, Seladin-1 is a fundamental mediator of the neuroprotective effects of estrogen in human neuroblast long-term cell cultures, *Endocrinology* 149 (2008) 4256–4266.
- [25] A. Peri, M. Serio, Estrogen receptor-mediated neuroprotection: the role of the Alzheimer's disease-related gene seladin-1, *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 4 (2008) 817–824.
- [26] A. Peri, M. Serio, Neuroprotective effects of the Alzheimer's disease-related gene seladin-1, *J. Mol. Endocrinol.* 41 (2008) 251–261.
- [27] A. Salonia, R. Lanzi, M. Scavini, M. Pontillo, E. Gatti, G. Petrella, G. Licata, R.E. Nappi, E. Bosi, A. Briganti, P. Rigatti, F. Montorsi, Sexual function and endocrine profile in fertile women with type 1 diabetes, *Diabetes Care* 29 (2006) 312–316.
- [28] N. Burul-Bozkurt, C. Pekiner, P. Kelicen, Diabetes alters aromatase enzyme levels in gonadal tissues of rats, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 382 (2010) 33–41.
- [29] X. Xu, H. Jiang, H. Liu, W. Zhang, X. Xu, Z. Li, The effects of galanin on dorsal root ganglion neurons with high glucose treatment in vitro, *Brain Res. Bull.* 87 (2012) 85–93.
- [30] V.C. Russo, S. Higgins, G.A. Werther, F.J. Cameron, Effects of fluctuating glucose levels on neuronal cells in vitro, *Neurochem. Res.* 37 (2012) 1768–1782.
- [31] W. Tajeddin, T. Persson, S. Maioli, J. Calvo-Garrido, C. Parrado-Fernandez, T. Yoshitake, J. Kehr, P. Francis, B. Winblad, K. Högglund, A. Cedazo-Minguez, D. Aarsland, 5-HT1B and other related serotonergic proteins are altered in APPswe mutation, *Neurosci. Lett.* 594 (2015) 137–143.
- [32] J. Acimovic, A. Lovgren-Sandblom, K. Monostory, D. Rozman, M. Golicnik, D. Lutjohann, I. Bjorkhem, Combined gas chromatographic/mass spectrometric analysis of cholesterol precursors and plant sterols in cultured cells, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 877 (2009) 2081–2086.
- [33] R. Suzuki, K. Lee, E. Jing, S.B. Biddinger, J.G. McDonald, T.J. Montine, S. Craft, C.R. Kahn, Diabetes and insulin in regulation of brain cholesterol metabolism, *Cell Metab.* 12 (2010) 567–579.
- [34] A. Cramer, E. Biondi, K. Kuehnl, D. Lutjohann, K.M. Thelen, S. Perga, C.G. Dotti, R.M. Nitsch, M.D. Ledesma, M.H. Mohajeri, The role of seladin-1/DHCR24 in cholesterol biosynthesis, APP processing and Abeta generation in vivo, *EMBO J.* 25 (2006) 432–443.
- [35] A. Wechsler, A. Brafman, M. Shafir, M. Heverin, H. Gottlieb, G. Damari, S. Gozlan-Kelner, I. Spivak, O. Moshkin, E. Fridman, Y. Becker, R. Skaliter, P. Einat, A. Faerman, I. Bjorkhem, E. Feinstein, Generation of viable cholesterol-free mice, *Science* 302 (2003) 2087.
- [36] Metformin in the Prevention of Alzheimer's Disease, *Clinical Trials*, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00620191>, 16.06.2016.
- [37] Effect of Insulin Sensitizer Metformin on AD Biomarkers, *Clinical Trials*, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01965756>, 16.06.2016.
- [38] Insulin Resistance and Mild Cognitive Impairment (IRMCI) Study (IRMCI), *Clinical Trials*, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02409238>, 16.06.2016.
- [39] C.C. Hsu, M.L. Wahlqvist, M.S. Lee, H.N. Tsai, Incidence of dementia is increased in type 2 diabetes and reduced by the use of sulfonylureas and metformin, *J. Alzheimers Dis.* 24 (2011) 485–493.
- [40] J.A. Luchsinger, Type 2 diabetes, related conditions, in relation and dementia: an opportunity for prevention? *J. Alzheimers Dis.* 20 (2010) 723–736.
- [41] L. Piconi, L. Quagliaro, R. Assaloni, R. Da Ros, A. Maier, G. Zuodar, A. Ceriello, Constant and intermittent high glucose enhances endothelial cell apoptosis through mitochondrial superoxide overproduction, *Diabetes Metab. Res. Rev.* 22 (2006) 198–203.
- [42] C. Cecchi, F. Rosati, A. Pensalfini, L. Formigli, D. Nosi, G. Liguri, F. Dichiarà, M. Morello, G. Danza, G. Pieraccini, A. Peri, M. Serio, M. Stefani, Seladin-1/DHCR24 protects neuroblastoma cells against Abeta toxicity by increasing membrane cholesterol content, *J. Cell. Mol. Med.* 12 (2008) 1990–2002.
- [43] T. O'Connor, K.R. Sadleir, E. Maus, R.A. Velliquette, J. Zhao, S.L. Cole, W.A. Eimer, B. Hitt, L.A. Bembinster, S. Lammich, S.F. Lichtenthaler, S.S. Hebert, B. De Strooper, C. Haass, D.A. Bennett, R. Vassar, Phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha increases BACE1 levels and promotes amyloidogenesis, *Neuron* 60 (2008) 988–1009.

- [44] R. Vassar, B.D. Bennett, S. Babu-Khan, S. Kahn, E.A. Mendiola, P. Denis, D.B. Teplow, S. Ross, P. Amarante, R. Loeloff, Y. Luo, S. Fisher, J. Fuller, S. Edenson, J. Lile, M.A. Jarosinski, A.L. Biere, E. Curran, T. Burgess, J.C. Louis, F. Collins, J. Treanor, G. Rogers, M. Citron, Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE, *Science* 286 (1999) 735–741.
- [45] R. Li, K. Lindholm, L.B. Yang, X. Yue, M. Citron, R. Yan, T. Beach, L. Sue, M. Sabbagh, H. Cai, P. Wong, D. Price, Y. Shen, Amyloid beta peptide load is correlated with increased beta-secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 3632–3637.
- [46] G.J. Biessels, A. Kamal, G.M. Ramakers, I.J. Urban, B.M. Spruijt, D.W. Erkelens, W.H. Gispen, Place learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-induced diabetic rats, *Diabetes* 45 (1996) 1259–1266.
- [47] R.U. Margolis, N. Altszuler, Insulin in the cerebrospinal fluid, *Nature* 215 (1967) 1375–1376.
- [48] S.C. Woods, D. Porte Jr., Relationship between plasma and cerebrospinal fluid insulin levels of dogs, *Am. J. Physiol.* 233 (1977) E331–E334.
- [49] B.J. Wallum, G.J. Taborsky Jr., D. Porte Jr., D.P. Figlewicz, L. Jacobson, J.C. Beard, W.K. Ward, D. Dorsa, Cerebrospinal fluid insulin levels increase during intravenous insulin infusions in man, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 64 (1987) 190–194.
- [50] H.J. Frank, W.M. Pardridge, T. Jankovic-Vokes, H.V. Vinters, W.L. Morris, Insulin binding to the blood-brain barrier in the streptozotocin diabetic rat, *J. Neurochem.* 47 (1986) 405–411.
- [51] Y. Zhang, F. Yin, J. Liu, Z. Liu, L. Guo, Z. Xia, J. Zidichouski, Geniposide attenuates insulin-deficiency-induced acceleration of beta-amyloidosis in an APP/PS1 transgenic model of Alzheimer's disease, *Neurochem. Int.* 89 (2015) 7–16.
- [52] K. Kuehnle, A. Cramer, R.E. Kalin, P. Luciani, S. Benvenuti, A. Peri, F. Ratti, M. Rodolfo, L. Kulic, F.L. Heppner, R.M. Nitsch, M.H. Mohajeri, Prosurvival effect of DHCR24/seladin-1 in acute and chronic responses to oxidative stress, *Mol. Cell. Biol.* 28 (2008) 539–550.
- [53] X. Lu, F. Kambe, X. Cao, Y. Kozaki, T. Kaji, T. Ishii, H. Seo, 3beta-Hydroxysteroid-delta24 reductase is a hydrogen peroxide scavenger, protecting cells from oxidative stress-induced apoptosis, *Endocrinology* 149 (2008) 3267–3273.
- [54] G.J. Biessels, S. Staekenborg, E. Brunner, C. Brayne, P. Scheltens, Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review, *Lancet Neurol.* 5 (2006) 64–74.
- [55] S. Hoyer, The brain insulin signal transduction system and sporadic (type II) Alzheimer disease: an update, *J. Neural Transm. (Vienna)* 109 (2002) 341–360.
- [56] S.M. de la Monte, Brain insulin resistance and deficiency as therapeutic targets in Alzheimer's disease, *Curr. Alzheimer Res.* 9 (2012) 35–66.
- [57] E. Steen, B.M. Terry, E.J. Rivera, J.L. Cannon, T.R. Neely, R. Tavares, X.J. Xu, J.R. Wands, S.M. de la Monte, Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease—is this type 3 diabetes? *J. Alzheimers Dis.* 7 (2005) 63–80.

9. ÖZGEÇMİŞ

1. Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı: İNCİ KAZKAYASI

Doğum yeri ve tarihi: Ankara, 23 Ağustos 1985

Uyruğu: Türkiye Cumhuriyeti

İletişim adresi ve telefonu: Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji
AbD Sıhhiye/Ankara 0312 305 21 31

2. Eğitim

2011-2016 **Doktora**, Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji
Anabilim Dalı, Ankara

2008-2011 **Yüksek Lisans**, Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji
Anabilim Dalı, Ankara

Tez konusu: Deneysel diyabetin sıçan hipokampus, siyatik sinir ve
gangliyonlarında C/EBP proteinleri üzerine olan etkileri

Danışman: Prof. Dr. Can Pekiner

2004-2008 **Lisans**, Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Ankara

2000-2004 **Lise**, Ankara Atatürk Lisesi, Ankara

3. Mesleki Deneyim

2015 Konuk araştırmacı (3 ay), Karolinska Enstitüsü, Alzheimer Hastalığı
Araştırma Merkezi, Stokholm, İsveç

2013-2014 Konuk araştırmacı (1 yıl), Karolinska Enstitüsü, Alzheimer Hastalığı
Araştırma Merkezi, Stokholm, İsveç

2009 Araştırma görevlisi, Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
Farmakoloji Anabilim Dalı, Ankara

2007 Stajyer Öğrenci (6 hafta), Eczacıbaşı İlaç Pazarlama, Ar-Ge
Departmanı, Lüleburgaz, Kırklareli

4. Bilimsel Faaliyetler

Yayınlar

1. (2016) Lack of insulin results in reduced seladin-1 expression in primary cultured neurons and in cerebral cortex of STZ-induced diabetic rats, **Kazkayasi I.**, Ismail MA., Parrado-Fernandez C., Björkhem I., Pekiner C., Uma S., Cedazo-Minguez A., Burul-Bozkurt N. (Neurosci. Lett., Vol 633, Pages 174-181)

2. (2015) Novel thiazolo[3,2-b]-1,2,4-triazoles derived from naproxen as analgesic/anti-inflammatory compounds: Synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies, Sarigol D., Uzgoren-Baran A., Tel B.C.,

Somuncuoğlu E.I., **Kazkayasi I.**, Ozadali-Sari K., Unsal-Tan O., Okay G., Ertan M., Tozkoparan B. (Bioorg Med Chem., Vol 23(10), 2518-28)

3. (2013) Effects of experimental diabetes on C/EBP proteins in rat hippocampus, sciatic nerve and ganglia, **Kazkayasi I.**, Burul-Bozkurt N., Onder S., Kelicen-Ugur P., Pekiner C., (Cell Mol Neurobiol., Vol 33(4) Pages 559-67)
4. (2012) Thiazolo[3,2-b]-1,2,4-triazole-5(6H)-one substituted with ibuprofen: Novel non-steroidal anti-inflammatory agents with favorable gastrointestinal tolerance, Uzgoren-Baran A., Tel BC, Sarigol D., Ozturk El., **Kazkayasi I.**, Okay G., Ertan M., Tozkoparan B., (Eur J Med Chem., Vol 57, Pages 398-406)

Sözlü sunum

DeneySEL Diyabetin Sıçan Hipokampus, Sıyatik Sinir ve Gangliyonlarında C/EBP Proteinleri Üzerine Etkileri

21. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 19-22.10.2011 Eskişehir, Türkiye

Poster sunumları

1. Synthesis, characterization and pharmacological evaluation of some new bis mannich bases derived from 1,2,4-triazoles, Sert SS., Tozkoparan B., Ertan M., Ozturk El., **Kazkayasi I.**, Tel BC., 4th International Meeting on Medicinal and Pharmaceutical Chemistry (IMMPC-4) and 6th International Symposium on Pharmaceutical Chemistry (ISPC-6), 30.09- 2.10.2010 Ankara, Turkey.
2. Naproksen Yapısı İçeren Tiazolotriazol Bileşiklerinin Analjezik, Antiinflamatuvar aktivitesi ve Ülserojenik Etkisi, Öztürk El., **Kazkayasi İ.**, Sarigöl D., Uzgören A., Okay G., Ertan M., Tel BC. 21. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 19-22.10.2011 Eskişehir, Türkiye
3. Fenil Asetik Asit İçeren Kondanse Triazol Bileşiklerin Analjezik, Antiinflamatuvar aktivitesi ve Ülserojenik Etkisi, **Kazkayasi İ.**, Öztürk El., Sert S., Tozkoparan B., Ertan M., Tel BC. 21. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 19-22.10.2011 Eskişehir, Türkiye
4. Novel Bis Mannich Bases Derived From 1,2,4-Triazoles: Synthesis, Characterization and Evaluation of Pharmacological Properties, Sert SS., Tozkoparan B., Tel BC., **Kazkayasi I.**, Ozturk El., Ertan M. Emerging Targets and Treatments: Opportunities and Challenges for Drug Design, 25.11.2011 Het Pand, Gent, Belgium
5. Novel Thiazolo[3,2-b]-1,2,4-triazole-5(6H)-ones Substituted with Ibuprofen as Potent and Safer Antiinflammatory/Analgesic Agents, Ozturk El., **Kazkayasi I.**, Sarigol D., Uzgoren A., Okay G., Ertan M., Tozkoparan B., Tel BC. 6th European Congress of Pharmacology (EPHAR), 17-20.07.2012 Granada, Spain

6. Possible role of insulin degrading enzyme (IDE) in relationship between Diabetes Mellitus and Alzheimer's Disease, **Kazkayasi I.**, Burul-Bozkurt N., Lodeiro M., Pekiner C., Ismail M.A., Cedazo-Minguez A. 12th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases (AD/PD), 18-22.03.2015, Nice, France

7. Does higher alpha-synuclein aggregate density lead to more severe dopaminergic cell loss in the AAV-mediated over-expression model of PD? Cinar E., Yalcin-Cakmakli G., Mutluay SU., Telli G., **Kazkayasi I.**, Tel BC., Ayse U., Saka E., Elibol B. 19th International of Parkinson's Disease and Movement Disorders, 14-18.06.2015, San Diego

8. Novel 1,2,4-Triazole-based bicyclic derivatives bearing naproxen moiety as analgesic/anti-inflammatory agents, Uzgoren A., Sarigol D., Tel BC., Somuncuoglu EI., **Kazkayasi I.**, Okay G., Ertan M., Tozkoparan B. International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development, 15-17 October 2015, Eskisehir, Turkey

9. Diabetic conditions alter insulin degrading enzyme levels, **Kazkayasi I.**, Burul-Bozkurt N., Uma S., Cedazo-Minguez A. 7th European Congress of Pharmacology (EPHAR), 26-30.06.2016 Istanbul, Turkey

Aldığı Burslar

- Hayatboyu Öğrenme Programı ERASMUS Öğrenci Hareketliliği (2006-2007)
- TÜBİTAK, 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı (2013-2014)

Projeler

- Deneysel diyabetin sıçan sıyatik sinirinde C/EBP ve SREBP proteinleri üzerine olan etkileri, Can Pekiner, Nihan-Burul Bozkurt, **İnci Kazkayasi**
H. Ü. Bilimsel Araştırmalar Birimi, Hızlı Destek Projesi, Proje No: 010D03 301 002
- Synthesis, characterization and pharmacological evaluation of some new bis mannich bases derived from 1,2,4-triazoles, Mevlut Ertan, Birsen Tozkoparan, Banu Cahide Tel, Seyma Sert, Elif Inci Ozturk, **İnci Kazkayasi**
H. Ü. Bilimsel Araştırmalar Birimi, Hızlı Destek Projesi
- Naproksen artığı taşıyan tiyazolo[3,2-b]-1,2,4-triazol-5(6H)-on yapısında bileşiklerin COX-1 ve COX-2 enzim inhibisyon aktivitelerinin araştırılması, Banu Cahide Tel, **İnci Kazkayasi**, Keriman Özadalı, Oya Ünsal Tan, Birsen Tozkoparan
H. Ü. Bilimsel Araştırmalar Birimi, Kritik Destek Projesi
- Diyabet ve Alzheimer Hastalığı Arasındaki İlişkinin Araştırılması; İnsulin Degrade Edici Enzim ve Seladin-1'in Olası Rollerini, Can Pekiner, Nihan Burul-Bozkurt, Angel Cedazo-Minguez, **İnci Kazkayasi**
TÜBİTAK, 2214 Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı

- Diyabet ile Alzheimer Hastalığı Arasındaki İlişkide İnsülin Degrade Edici Enzimin Rolünün Araştırılması, Serdar Uma, **İnci Kazkayası**
H. Ü. Bilimsel Araştırmalar Birimi, Hızlı Destek Projesi
- Diyabet ile Alzheimer Hastalığı İlişkisinde İnsülin Degrade Edici Enzimin Olası Rolü, **İnci Kazkayası**
H. Ü. Bilimsel Araştırmalar Birimi, Bilimsel Başarı Desteği, Proje: TBB-2015-5401
- Diyabet ve Alzheimer Hastalığı Arasındaki İlişkide Seladin ve Kolesterolün Rolü, **İnci Kazkayası**
H. Ü. Bilimsel Araştırmalar Birimi, Bilimsel İşbirliği Geliştirme Projesi, TBI-2015-6639
- Bazal gangliyonlarda ve limbik kortekste viral vektör aracılı alfa sinüklein aşırı ifadesine dayalı Parkinson hastalığı modelinde motor ve davranışsal değişikliklerin patoloji ile karşılaştırmalı olarak incelenmesi ve bu modelde rapamisin uygulamasının etkisinin araştırılması, Ali Celalettin Sinan Yürüker, Ayşe Ulusoy, Banu Cahide Tel, Bülent Elibol, Elif Çınar, Esen Saka Topçuoğlu, Gökçen Telli, Gül Yalçın Çakmaklı, **İnci Kazkayası**, İpek Baysal, Samiye Yabanoğlu Çiftçi, Sevgi Uğur Mutluay
H. Ü. Bilimsel Araştırmalar Birimi, Kapsamlı Proje, Proje Kodu: TBI-2015-5291

Katıldığı Kongreler

- Türk Farmakoloji Derneği, 20. Ulusal Farmakoloji Kongresi 4-7 Kasım 2009, Antalya
- Türk Farmakoloji Derneği 19. Prof. Dr. M. Oğuz Güç Kış Toplantısı 17-19 Mart 2010, Bursa
- 16th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WorldPharma2010), 17-23 July 2010, Copenhagen, Denmark
- Türk Farmakoloji Derneği, 21.Ulusal Farmakoloji Kongresi, 19-22 Ekim 2011, Eskişehir
- Türk Farmakoloji Derneği 21. Dr. Nejat F. Eczacıbaşı Kış Toplantısı 7-9 Mart 2012, Kayseri
- 8th FENS Forum of Neuroscience, 14-18 July 2012, Barcelona, Spain
- Türk Farmakoloji Derneği 22. Ecz. Nezhil Ulagay Kış Toplantısı, 4-6 Mart 2013, Bursa
- 11.Ulusal Sinirbilim Kongresi, 28 Nisan-1 Mayıs 2013, İzmir
- 12. Uluslar arası Alzheimer ve Parkinson Hastalıkları Konferansı, 18-22 Mart 2015, Nice, France
- 7. Avrupa Farmakoloji Kongresi, 26-30 Haziran 2016, İstanbul