

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

**SHSY-5Y HÜCRELERİNDE GİNGEROL ve SHOGAOL'ün
AMİLOİD-BETA TOKSİSİTESİ ÜZERİNE
ETKİLERİ**

Proje No: BAP (TYL-2013-4565)

Yüksek Lisans Tezi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Doç. Dr. Mükerrerem Betül YERER-AYCAN
Eczacılık Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı

Araştırmacı:
Mehmet Kaan Tiryaki

Mayıs 2014
KAYSERİ



**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ECZACILIK FARMAKOLOJİSİ ANABİLİM DALI**

**SHSY-5Y HÜCRELERİNDE GİNGEROL ve SHOGAOL'ün
AMİLOİD-BETA TOKSİSİTESİ ÜZERİNE
ETKİLERİ**

**Hazırlayan
MEHMET KAAN TİRYAKİ**

**Danışman
Doç. Dr. M. BETÜL AYCAN**

Yüksek Lisans Tezi

**Ağustos 2013
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ECZACILIK FARMAKOLOJİSİ ANABİLİM DALI**

**SHSY-5Y HÜCRELERİNDE GİNGEROL ve SHOGAOL'ün
AMİLOİD-BETA TOKSİSİTESİ ÜZERİNE
ETKİLERİ**

**Hazırlayan
MEHMET KAAAN TİRYAKİ**

**Danışman
Doç. Dr. M. BETÜL AYCAN**

Yüksek Lisans Tezi

**Bu proje Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TYL-2013-4565 kodu ile desteklenmiştir.**

**Ağustos 2013
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Mehmet Kaan Tiryaki

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“SHSY-5Y hücrelerinde ginderol ve shgoalün amyloid-beta toksisitesi üzerine etkileri” adlı Yüksek Lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan
M. Kaan Tiryaki
Aycan

İmza

Danışman
Doç. Dr. M. Betül

İmza

FARMAKOLOJİ ABD Başkanı

Doç. Dr. M. Betül Aycan

İmza

KABUL ONAY SAYFASI

Doç. Dr. M. Betül Aycan danışmanlığında **M. Kaan Tiryaki** tarafından hazırlanan “SHSY-5Y hücrelerinde gingerol ve shogaolün amyloid-beta toksisitesi üzerine etkileri” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalında **yüksek lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

19 / 08 / 2013

JÜRİ:

Danışman : Doç. Dr. M. Betül Aycan Farmakoloji Anabilim Dalı 
 Üye : Yrd. Doç. Dr. İpek Boşgelmez Farmakoloji Anabilim Dalı 
 Üye : Yrd. Doç. Dr. Ahmet Cumanoglu Farmakoloji Anabilim Dalı 

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 22 AĞU 2013 tarih ve
 593 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

22 AĞU 2013



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
no	
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
KISALTMALAR.....	iv
TABLO ve ŞEKİL LİSTESİ	v

1. GİRİŞ VE AMAÇ

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer hastalığının histopatolojisi

2.1.1. Nörofibriler yumaklar

2.1.2. Amiloid plaklar

2.1.3. Nöron kaybı

2.1.4. Kolinerjik kayıp

2.1.5. Serotenerjik kayıp

2.1.6. Dopaminerjik kayıp

2.2. Alzheimer Hastalığında Amiloidin Rolü

2.3. Zingiber Officinale

2.3.1. Kullanım alanları

2.3.2. Bileşimi

2.3.3 Ferulik asit

2.4. GSK-3 β enzimi

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Materyal

3.1.1. Hücre Kültürü

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

3.2. Metod

3.2.1. Hücre Kültürünün Hazırlanması ve Yapılan İşlemler

3.2.2. Altın plate yöntemi ile hücre sayımı ve canlılığı testi

3.2.3. Amiloid beta oligomerlerinin ve agragatlarının hazırlanması

3.2.4. GSK-3 β inhibisyonunun in vitro olarak değerlendirilmesi

4. BULGULAR

4.1. Amyloid beta agregatlarının hücelere uygulanmasından sonra gingerol ve shogoal grubunun etkisi

4.1.1. Hüceler üzerinde amyloid beta toksisitesi oluşturulmadan gingerolün etkisi

4.1.2. Hüceler üzerinde amyloid beta toksisitesi oluşturulduktan sonra gingerolün etkisi

4.1.3 Hüceler üzerinde amyloid beta toksisitesi oluşturulmadan shogoalün etkisi

4.1.4. Hüceler üzerinde amyloid beta toksisitesi oluşturulduktan sonra shogoalün etkisi

4.2. Amyloid beta oligomerlerinin hücelere uygulanmasından sonra gingerol ve shogoal grubunun etkisi

4.2.1. Hüceler üzerinde amyloid beta toksisitesi oluşturulmadan gingerolün etkisi

4.2.2. Hüceler üzerinde amyloid beta toksisitesi oluşturulduktan sonra gingerolün etkisi

4.2.3 Hüceler üzerinde amyloid beta toksisitesi oluşturulmadan shogoalün etkisi

4.2.4. Hüceler üzerinde amyloid beta toksisitesi oluşturulduktan sonra shogoalün etkisi

4.3. GSK-3 β inhibisyonunun değerdendirilmesi

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

6. KAYNAKLAR

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

SHSY-5Y HÜCRELERİNDE GİNGEROL ve SHOGAOL'ün AMİLOİD-BETA TOKSİSİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Mehmet Kaan Tiryaki

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Eczacılık Farmakolojisi Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Ağustos 2013

Danışman: Doç. Dr. M. Betül Aycan

KISA ÖZET

Alzheimer hastalığı (AH), kronik nörodejeneratif bir hastalıktır. Her yıl dünyada ortalama 5 milyon yeni AH olgusu geliştiği tahmin edilmektedir. 60-65 yaş arasında olan popülasyonda görülme sıklığı yaklaşık %0.1 iken 85 yaşın üzerinde görülme sıklığı %47'ye kadar çıkar. Yaşlanmakta olan dünya nüfusu göz önüne alındığında günümüzün en sık rastlanan hastalıkları arasında yer alan hastalığın fizyopatolojisinden nörofibriler yumak (NFY) oluşumu, bileşeni amiloid beta proteini (A β) olan senil amiloid plaklar (SP), sinaps-nöron kaybı sorumlu olduğu düşünülmektedir. Son çalışmalar hastalığın patolojisinde GSK-3 β enziminin önemli rolü olabileceğini göstermiştir. O nedenle çalışmamızda, Zingiber officinale bitkisinin ana saf maddelerinden olan gingerol ve shogaolün A β toksisitesindeki koruyucu rolünün ve bu rolünde GSK-3 β inhibisyonunun etkisinin aydınlatılması amaçlanmıştır.

Çalışmada SHSY-5Y nöroblastoma hücrelerinde A β oligomerleri ve agregatları ile oluşturulan nörotoksistide 0.01-100 μ M doz aralığında gingerol ve shogaolün koruyucu etkileri gerçek zamanlı hücre analizörü XCelligence cihazı ile analiz edilmiştir. Ayrıca aynı dozlarda her iki maddenin GSK-3 β enzimi inhibisyonu yapıp yapmadıkları luminometrik olarak tayin edilmiştir. Çalışmada sonuçlar daha önce her iki etkisi de bilinen 4 μ M ferulik asitin etkileri ile karşılaştırılmıştır. İstatistiksel değerlendirmelerde SPSS 15.0 programı üzerinden Oneway Anova ve Student-t testi kullanılmıştır.

Çalışma sonuçlarına göre, hem A β agregatı hem de oligomeri ile oluşturulan toksistide gingerol de shogaol de hücre indeksini artırmış ancak gingerol için bu artış istatistiksel anlamlı bulunmazken, shogaolün düşük dozları için doza bağımlı ve anlamlı iken yüksek dozlarının toksik olduğu gözlenmiştir. Ayrıca enzim inhibisyonunun yüksek olduğu konsantrasyonlarda hücre indeksi artmış yani maddelerin hücreler üzerindeki koruyucu etkileri artmış,

inhibisyonun az olduğu dozlarda ise hücrelerdeki koruyucu etkinlik azalmış hatta shogaolün yüksek dozlarında toksisiteye neden oldukları gözlenmiştir.

Sonuç olarak, gingerolün bütün dozları için shogolün de düşük dozları için hem hücre indeksi artışında hem de enzim inhibisyonunda ferulik asitten daha etkili olduğu ve koruyucu etkilerinin enzim inhibisyonu ile ilişkilendirilebileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Gingerol; shogol; amyloid beta toksisitesi; ferulik asit; GSK-3 β

THE EFFECTS OF GINGEROL AND SHOGAOL ON THE AMYLOID BETA TOXICITY ON SHSY-5Y CELLS

Mehmet Kaan Tiryaki

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences

ABSTRACT

Alzheimer disease (AD), is a cronic neurodegenerative disease. Every year around 5 million people is estimated to have AD. The prevelans of the disease increases from 0.1% at an age of 60-65 to 47% at the age of 85. Considering the aging population in the world, being one of the most common diseases of nowadays, the neurofibrillary tangles, senile amiloid plaques which is mainly formed by amiloid beta protein and neural loss is thought to be responsible form its physiopathology. Recent studies have shown GSK-3 β enzyme can also have a role in its pathology. For this reason, two main components of Zingiber Officinale, gingerol and shogaol were used to see whether they have protective effects on A β toxicicty and to clarify its relation to their GSK-3 β inhibitory effects.

In tih sstudy, the protective effcets of gingerol and shogaol at a dose range of 0.01-100 μ M in neurotoxixicy formed by A β oligomers and aggregates in SHSY-5Y neuroblastoma cell lines were analyzed by real time cell analyzer XCelligence. Furthermore the GSK-3 β inhibitory effects of the two compounds were measured by luminometer and the results were compared by ferulic acid which was shown to have both effects. Statistical analyzez were peroformed by SPSS 15.0 program using Oneway Anova ve Student-t tests.

According to the results, in the toxixicty formed even by A β aggregate and oligomers both gingerol and shogaol increased the cell index. However this results were not significant for gingerol but significant for shogaol's low doses whereas the high doses of shogaol was found to be toxic on these cell line. Furthermore the more the inhibitory effect on GSK-3 β increase the more the components increase the cell index. In the doses of inhibitory effects are low the protection decreases and for high doses of shogaol even it turns to toxicity.

As a result, for all doses of gingerol and low doses of shogaol, they are found to be more potent in improving cell index and inhibiting GSK-3 β enzyme. Their protective effects can also be correlated by their GSK-3 β inhibitry effects.

Keywords: Laminated composite materials; free vibration; single lap joint; tubular jap joint; modal analysis.

KISALTMALAR

AH: Alzheimer hastalığı

SP: Senil amiloid plaklar

NFY: Nörofibriler yumak

A β : Amiloid beta proteini

APP: Amiloid prekürsör protein

TNF: Tümör nekrozis faktör

TRIAL: TNF Related Apoptosis-Inducing Ligand

AchE: Asetil kolin esteraz

5-HT-erjik: Serotonerjik

SSRI: 5-HT geri alım blokleri

NA-erjik: Noradrenerjik

LC: Locus ceruleus

SNc: Substantia nigra pars compacta

DNA: Deoksiribonükleik asit

GSK3 β : Glikojen Sentaz Kinaz 3- β

kDa: Kilodalton

ATCC: American Type Culture Collection

EMEM: Eagle's Minimum Essential Medium

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Media

MEM: Minimum Eagle's Medium

TABLO ve ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 4.1. Amiloid beta agregatı uygulanmadan hücreler üzerine gingerol dozlarının etkisi

Şekil 4.2. Amiloid beta agregatı ile oluşturulan toksisiteden sonra hücreler üzerine gingerol dozlarının etkisi

Şekil 4.3. Gingerol için amiloid beta agregatı ile oluşturulan toksisiteden sonra 24. Saatteki sigmoidal doz-cevap eğrisi

Şekil 4.4. Gingerol için amiloid beta agregatı ile oluşturulan toksisiteden sonra 24 saatlik zaman dilimindeki sigmoidal doz-cevap eğrisi

Şekil 4.5. Amiloid beta agregatı ile oluşturulan toksisiteden sonra gingerol uygulamasının 24. Saatinde hücre indeksindeki değişiklikler

Şekil 4.6. Amyloid beta agregatı uygulanmadan hücreler üzerine shogaol dozlarının etkisi

Şekil 4.7. Amyloid beta agregatı ile oluşturulan toksisiteden sonra hücreler üzerine shogaol dozlarının etkisi

şekil 4.8. Shogaol için amiloid beta agregatı ile oluşturulan toksisiteden sonra 24. Saatteki sigmoidal doz-cevap eğrisi

şekil 4.9. Shogaol için amiloid beta agregatı ile oluşturulan toksisiteden sonra 24 saatlik zaman dilimindeki sigmoidal doz-cevap eğrisi

Şekil 4.10. Amiloid beta agregatı ile oluşturulan toksisiteden sonra shogaol uygulamasının 24. Saatinde hücre indeksindeki değişiklikler

Şekil 4.11. Amyloid beta oligomeri uygulanmadan hücreler üzerine gingerol dozlarının etkisi

Şekil 4.12. Amyloid beta oligomeri ile oluşturulan toksisiteden sonra hücreler üzerine gingerol dozlarının etkisi

Şekil 4.13. Amiloid beta oligomeri ile oluşturulan toksisiteden sonra gingerol uygulamasının 24. Saatinde hücre indeksindeki değişiklikler

Şekil 4.14. Gingerol için amiloid beta oligomeri ile oluşturulan toksisiteden sonra 24. Saatteki sigmoidal doz-cevap eğrisi

Şekil 4.15. Gingerol için amiloid beta oligomeri ile oluşturulan toksisiteden sonra 24 saatlik zaman dilimindeki sigmoidal doz-cevap eğrisi

Şekil 4.16. Amyloid beta oligomeri uygulanmadan hücreler üzerine shogoal dozlarının etkisi

Şekil 4.17. Amyloid beta oligomeri ile oluşturulan toksisiteden sonra hücreler üzerine shogoal dozlarının etkisi

Şekil 4.18. Amiloid beta oligomeri ile oluşturulan toksisiteden sonra shogaol uygulamasının 24. Saattinde hücre indeksindeki değişiklikler

Şekil 4.19. Shogaol için amiloid beta oligomer ile oluşturulan toksisiteden sonra 24. Saatteki sigmoidal doz-cevap eğrisi

Şekil 4.20. Shogaol için amiloid beta oligomer ile oluşturulan toksisiteden sonra 24 saatlik zaman dilimindeki sigmoidal doz-cevap eğrisi

Şekil 4.21. Gingerolün doza bağımlı % inhibisyonu

Şekil 4.22. Shogolün doza bağımlı % inhibisyonu

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Alzheimer hastalığı (AH), kronik nörodejeneratif bir hastalıktır. Her yıl dünyada ortalama 5 milyon yeni AH olgusu geliştiği tahmin edilmektedir. 1907 yılında Alman hekim Alois Alzheimer tarafından klinik ve nöropatolojik özellikleri ile tanımlanmıştır. Hastalığın görülme riski yaşa bağlı bir şekilde logaritmik olarak artar. 60-65 yaş arasında olan popülasyonda görülme sıklığı yaklaşık %0.1 iken 85 yaşın üzerinde görülme sıklığı %47'ye kadar çıkar. 2050 yılında dünya nüfusunun %25'inden fazlasının 65 yaşın üzerinde olacağı tahmin edilmektedir. Bu rakamlar artan yaşlı nüfusu ile birlikte logaritmik oranda artan AH'nin gelecekte en önemli sağlık sorunlarından biri olacağını düşündürmektedir. 1999 yılında ülkemizden bildirilen bir çalışmada Türkiye'deki Alzheimer hastası sayısının 200.000'in üzerinde olduğu tahmin edilmektedir.

Halen kesin fizyopatolojisi ortaya çıkarılamamıştır. Histopatolojik olarak senil amiloid plaklar (SP), nörofibriler yumak (NFY) oluşumu, sinaps-nöron kaybı ve beyinde belirgin bir atrofi mevcuttur. NFY'lerin temel bileşeni hiperfosforile 'tau' proteinidir. AH patogenezinde hiperaktif kinazlar ve/veya hipoaktif fosfatazlar, tau proteininin hiperfosforilizasyonuna yol açarak mikrotübüllere bağlanma yeteneğini bozarlar. Bağlanmamış fosforilize tau çözölemeyen çift sarmallı filamanlara polimerize olur. Bunlar zaman içinde intranöronal NFY'ler haline gelir. NFY'ler hücre iskeletinin bütünlüğünü ve aksonal transportu bozarak hücre ölümüne neden olur. AH'deki ikinci

temel nöropatolojik değişiklik, ana bileşeni amiloid beta proteini (A β) olan, amiloid plaklardır.

Amiloid β , diffüz plaklar halinde agrege olur ve daha sonra yoğun nöritik plaklara dönüşür. Zararsız amiloid β içeren gevşek plakların nasıl β kıvrımlı zararlı yoğun plaklara dönüştüğü net açıklanamamıştır. Gevşek plaklarda amiloid β birikimi oksidatif gerilim ve serbest radikallerin oluşumuna, bu faktörler de plakların fiziksel değişimine yol açıyor olabilir. Nöritik plak oluştuktan sonra, inflamasyon, eksitotoksisite ve muhtemelen apoptozisten oluşan sekonder kaskad ek hasar oluşmasına aracılık eder. Erken demansı olan olguların beyin dokuları ve BOS'unda artmış amiloid β 42 ve amiloid β oligomerleri bulunur ve bu düzeyler kognitif azalma ile koreledir. Lipid peroksidasyonunun da AH'de anlamlı rolü olabilir. AH'deki kognitif kötüleşmenin ciddiyeti amiloid depozisyonundan ziyade NFY miktarı ile koreledir. Bazı çalışmalar primer nörotoksik oluşumun NFY'den ziyade mutant tau proteini olduğunu düşündürmektedir. Öte yandan hem NFY'ler hem de amiloid plakları, AH patogenezinin mediatörleri değil sonuç ürünleri de olabilir. AH ile ilişkili tüm risk faktörleri ve patolojik ürünler, nöroplastisiteyi bozuyor olabilir. Plastisite sağlanamazsa, serbest tau polimerlerinden NFY oluşumu ve A β 'nın gevşek plaklarda birikmesi ve sonrasında katı plaklara dönüşmesi artacaktır.

Daha önce yapılan bir takım çalışmlarda Alzheimer Hastalığı üzerinde gingerol ve shogoalün dimeri olan ferulik asitin amiloid β toksisitesinde koruyucu rolü olabileceği gösterilmiştir.

Bu çalışmada; Alzheimer hastalığının fizyopatolojisinde önemli bir rol oynayan Amiloid β toksisitesinde zencefil bitkisinde (*Zingiber officinale*) yüksek konsantrasyonlarda bulunan gingerol ve shogaolün koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlanmaktadır. Bu iki madde ile ilgili literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanamamıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığının Histopatolojisi

AH'de beyin dokusunun histopatolojik olarak değerlendirilmesi kesin tanı için gerekli olsa da bugün modern radyolojik yöntemlerle %90'ın üzerinde tanı konabilmektedir. Makroskopik olarak beyin ağırlığı ortalama 900-1200 gr arasındadır. Serebral giruslarda düzleşme ve sulkuslarda genişleme gözlenir. AH'de genel olarak temporal lob (özellikle hipokampus), daha az olarak da frontal ve parietal loblar etkilenir. Oksipital lob ve motor korteks ise genellikle sağlamdır. Ancak bu atrofi paterni AH için spesifik bir olay değildir. Fikse beyinden alınan örneklerde kortikal örtü oldukça incelmış görülür. Beyaz madde normal görünüm ve yapıdadır, ancak hacminde azalma izlenir. Parankim kaybına ikincil olarak ventriküler sistemde özellikle de lateral ventriküllerin temporal boynuzlarında genişleme oluşur(1). Orta beyinde substansia nigra normal pigmentasyonunu korur. Lokus Seruleus ise sıklıkla normalden daha soluk görünümündedir (2). Mikroskopik olarak AH birkaç morfolojik anomalinin varlığı ile karakterizedir. Ancak bunlardan hiçbiri AH için spesifik tanı kriteri değildir. Gözlenen ana patolojik değişikliklerden biri plak adı verilen spesifik amiloid depolanmasıdır. Bu normal bir nöronal membran proteini olan APP'den proteolitik yıkımla meydana gelen A β peptid yapısında bir amiloiddir. İkinci ana patolojik değişiklik nörofibriler yumak adı verilen intranöronal filamentöz inklüzyonlardır(3).

2.1.1. Nörofibriler Yumaklar

Nörofibriler yumaklar NFY'lerin temel bileşeni hiperfosforile 'tau'proteinidir. Tau 17.kromozom tarafından kodlanan mikrotübül asosiye protein ailesinden bir proteindir.Tau

proteini mikrotübüllerin stabilizasyonu, hücre iskeletinin bütünlüğü ve aksonal transportta önemli bir rol alır. AH patogenezinde hiperaktif kinazlar ve/veya hipoaktif fosfatazlar tau proteininin hiperfosforilasyonuna yol açarak mikrotübüllere bağlanma yeteneğini bozarlar. Bağlanmamış fosforilize tau çözilemeyen çift sarmallı filamanlara polimerize olur(3). Bunlar zaman içinde intranöronal NFY'ler haline gelir. Bu sürecin yıllar süren uzun bir dönem olduğu düşünülmektedir. Bu süreçte tau hedefli tedavi stratejilerinin, çözilemeyen çift sarmallı filamanların NFY şeklinde çökmesini azaltması ile AH progresyonunu azaltabileceği düşünülmektedir. NFY; hücre iskeletinin bütünlüğünü ve aksonal transportu bozarak nihayetinde hücre ölümüne neden olur. Hücre ölümüyle ortaya çıkan ekstraselüler NFY'a "hayalet yumak" adı verilir. AH'deki kognitif kötüleşmenin ciddiyeti amiloid depozisyonundan ziyade NFY miktarı ile koreledir(2-3). Fareler üzerinde yapılan çalışmalar primer nörotoksik oluşumun NFY'den ziyade mutant tau proteini olduğunu düşündürmektedir(4-5). Bu nedenle hem NFY'ler hem de amiloid plakları, AH patogenezinin mediatörleri değil sonuç ürünleri olabilir. Bununla beraber beyinde tau oluştuğu zaman, doğrudan nörodejenerasyona sebep olduğu gösterilmiştir(6). Yaşlılık sürecinde NFY sayısı kronolojik yaş arasında korelasyon gösterilmiştir. AH'de NFY'ler entorhinal korteksten önce paralimbik alanlara, sonra heteromodal neokortikal alanlara yayılırlar. Patolojik olarak NFY'lerin bu bölgesel yayılımı, klinikte normal yaşlanma, hafif ve ağır demans evrelerine karşılık gelir. Tau depozitleri AH dışında, progresif supranükleer palsy, kortikobazal ganglionik dejenerasyon, Pick Hastalığı, argirofilik grain hastalığı ve Guam'ın Parkinson-Demans kompleksi gibi diğer bazı nörodejeneratif hastalıklarda da bulunur(2). AH dışındaki hiçbir tau patolojisinde amiloid β depozitleri yoktur(5).

2.1.2. Amiloid plaklar

AH'deki sekonder nöropatolojik değişiklik olan amiloid plaklar farklı morfolojik yapılar olabilir ancak ana bileşeni amiloid beta proteindir ($A\beta$). $A\beta$ amiloid 40-42 aminoasitten oluşan bir proteindir. Daha büyük bir transmembran protein olan, 19. kromozomda kodlanan ve işlevi tam olarak anlaşılamamış bir transmembran protein olan amiloid prekürsör protein (APP)'den proteolitik yolla oluşur (7-8). Buradan da çıkarabileceğimiz gibi, Amiloid β , APP'nin metabolizma ürünlerindendir. APP geninin yok edildiği transjenik farelerde (APP knock-out mice) anlamlı bir mortalite ya da morbidite gözlenmemiştir. APP'nin nörotrofik ve nöroprotektif aktivitesi olabilir. $A\beta$ amiloid'in normal fonksiyonu ise tam olarak bilinmemektedir(7). Solübl amiloid fibrillerinin oluşması, AH'deki ilk patolojik olay olabilir

ve bu olay nöritik plakları meydana getirebilir. Bütün transmembran proteinlerde olduğu gibi APP'nin de hücre içi karboksi ucu, membran içinde seyreden 28 aminoasitlik bölümü ve hücre dışı amino ucu vardır. Amiloid β , APP'nin membran içi 28 aminoasitlik bölgesini de içeren bir parçasıdır(8). APP bir dizi proteolitik enzimle kesilerek metabolize edilir. Bu enzimlere α , β ve γ sekretaz adları verilir. α -sekretaz APP'yi Amiloid β 'nin ortasından keser. Bu kesim sonunda çözülebilir Amiloid β yerine APP ya da sAPP adı verilen ekstraselüler yeni protein oluşur. Bu molekülün hücre kültüründe, nöronlar üzerine olumlu nörotrofik etkileri gösterilmiştir. Ancak diğer iki enzim (β ve γ -sekretaz- lar), APP'yi amino ucundan (β -sekretaz) veya karboksi ucundan (γ -sekretaz) böler. Bu bölünme sonucunda ürün olarak amiloid β oluşur. Oluşan Amiloid β 'ler 40 veya 42 aminoasit uzunluğundadır. Bunlardan daha fazla amiloidojenik olanı 42 aminoasitlik yapısal uzunluğundadır ve ilk çöken de budur (9). Hemen sonrasında amiloid β diffüz plaklar halinde agregre olur ve yoğun nöritik plaklar dönüşür (10). A β amiloid'in serebral arteriollerde birikmesi "amiloid anjiopati" olarak adlandırılır ve serebral lobe kanamalara sebep olabilir. AH'li olguların beyinlerinde de meningeal kan damarlarında Amiloid β tespit edilmiştir. Erken demansı olan olguların beyin dokuları ve BOS'unda artmış Amiloid β 42 ve Amiloid β oligomerleri bulunur ve bu düzeyler kognitif azalma ile koreledir(11). Bu bulgular, AH'deki nörotoksitenin mediatörlerinin amiloid plakların değil, küçük amiloid β oligomerlerinin olduğu hipotezini desteklemektedir(12-13). Bununla beraber Amiloid β normalde de oluşan bir üründür(14). Bu durum henüz anlaşılmamış da olsa onun fizyolojik bir fonksiyonu olduğunu düşündürmektedir. APP mutasyonları ya toplam amiloid β üretimini ya da daha amiloidojenik form olan amiloid β 42 üretimini artırır (15-16). AH'de α -sekretaz yolu baskılanırken, dengenin β ve γ -sekretaz yollarına saptığı ileri sürülmektedir. Son yıllarda β - sekretazın geni bulunarak karakterize edilmiş ve BACE (beta-site APP cleaving enzyme) adı verilmiştir. γ -sekretazın ise presenilin ile aynı şey mi olduğu yoksa presenilinle aktive edilen bir proteaz mı olduğu tartışmaları halen devam etmektedir (17). AH'nin bilinen bütün genetik mekanizmaları amiloid β oluşumunu artırmaktadır. Genetik mekanizmalar neticesinde ya substrat olan APP mitarında artış olması ile (Down sendromu) ya da APP'den amiloid β üreten β -sekretaz veya γ -sekretaz aktivasyonuna bağlı aşırı üretim olması sebebi ile "amiloid β miktarı" artar. Ancak, tau proteini genindeki mutasyonlar AH dışı dejenerasyonlara neden olmaktadır. Normal bireylerde APP işlenmesinde bu 3 yolda kullanılırken, büyük ölçüde 60 yaşından itibaren, ileride demans geliştirecek olsun olmasın, herkeste β ve γ -sekretaz ürünü amiloid β temizlenemeyip plaklarda birikmeye başlar. İlk birikim NFY'lerin aksine limbik

sistemde değil, neokortekste olur ve gevşek plaklar halindedir. Bunlar, lokal nörotoksik etkilere sahip olan β kıvrımlı transforme olmuş amiloid değildir. Zararsız amiloid β içeren gevşek plakların β kıvrımlı zararlı yoğun plaklara dönüşümünü açıklayan bir dizi teori vardır. Gevşek plaklarda amiloid β birikimi oksidatif gerilim ve serbest radikallerin oluşumuna, bu faktörler de plakların fiziksel değişimine yol açıyor olabilir. Bununla birlikte, gliosis ve mikrogial aktivasyon ile oluşan inflamatuvar değişiklikler de plakların yoğunlaşmasına sebep olabilir(15). AH tedavisinde denenen serbest radikal önleyici ajanların (E vitamini, selegilin, Ginkgo biloba) ve anti-inflammatuarların bu mekanizmalara etki edeceği düşünülmüştür. Nöritik olmayan katı plaklar demanssız beyinlerde de görülebilir. Katı plakların lokal nörotoksitesi, hücre ölümü ve nöritik dejenerasyona neden olur. Bu aşamadan sonra dejenere nöritler içeren katı plaklara “nöritik plaklar” adı verilir(2). Nöritik plaklar, nöritik olmayan katı plakların aksine, yalnızca demanslı beyinlerde görülür. Nöritik plaklarda A β amiloid, pro- teoglikanlar, ApoE4, alfa1 antikimotripsin ve diğer pro- teinlerden oluşan merkezi bölge vardır. Nöritik bileşen, sinaptik artık ve nörofilamanlardan oluşur ve çoğu aynı zamanda tau için de pozitif immünreaksiyon gösterir. Tau (+) plaklarda nöritik bileşenin NFY içeren nöronların kalıntıları olduğu söylenebilir. Böylelikle bölgesel olarak farklı başlangıç yatkınlıklarına sahip olan NFY ve SP’ler hastalığın seyri içinde tau (+) plaklar halinde yan yana gelmiş olurlar. Nöritik plak oluşuktan sonra, inflamasyon, eksitotoksite ve muhtemelen apoptozisten oluşan sekonder kaskad, ek hasar oluşmasına aracılık eder(16). Hem amnestik MCI’de (sıklıkla AH’nin prodromal evresini temsil eder) hem de ileri AH olgularında benzer lipid peroksidasyon bulgularının olması, lipid peroksidasyonunun AH’de anlamlı etyolojik rolü olduğunu düşündürmektedir (18). Amiloid ile NFY’ler arasındaki bağlantıyı anlamak AH patogenezi anlamak için kesinlikle gereklidir ve muhtemelen AH fizyopatolojisindeki en büyük bilinmezi oluşturmaktadır (19). Varsayılan bağlantılardan biri, apoptoz başlatıcıları olan sistein aspartil proteazlarını içermektedir. Giderek artan kanıtlar A β protein birikiminin kaspazların aktivasyonunu tetiklediği, böylelikle tau’nun kaspaz tarafından indüklenen bölünmesine sebep olduğunu ve bu işlemin erken AH’de olduğunu düşündürmektedir. Tau’nun bölünmesi NFY oluşmasında kritik olay gibi görünmektedir. Hem amiloidin hem de tau patolojisinin birbirinden bağımsız olduğu, muhtemelen NFY’lerin plaklardan önce ortaya çıktığı düşünülmektedir. Ancak ileri evrelerde, neokortekste yaygın amiloid beta depozisyonunun ciddi NFY patolojisinden önce görüldüğü bildirilmiştir (20). Bu bulguya göre, amiloid beta depozisyonu yaşla ilişkili tau patolojisini artırıyor olabilir. Bu hipotez, APP gen mutasyonlu olgularda da görülen amiloid β 42

üretimini tau disfonksiyonuna öncülük ettiği bulgusu ile de uyumludur. Tau'daki mutasyonlar ise NFY oluşumuna, nörodejenerasyona ve demansa sebep olurken, amilod beta depozisyonuna yol açmaz. Bir başka hipoteze göre NFY ve SP'ler birbirinden bağımsız oluşumlar olup sonuç bulgularıdır. Bu hipoteze göre AH, genetik ve çevresel etkilerle yaşam boyunca artarak biriken plastisite yükünün artık kaldırılamaz olması neticesinde normal yaşlanmadan sapmanın sonuçlarıdır (17). Gelişimsel dönemde bir hemisferektomiye tolere edebilecek durumda olan merkezi sinir sistemi (MSS), erişkinliğe ulaştıktan sonra bir hemisferin çok daha sınırlı bir alanındaki hasar sonucu ağır düzeyde sakatlanabilir. Bununla birlikte, nöroplastisite erişkin dönemle birlikte tümden durmaz. Yeni öğrenme, aşınma ve hasar onarımı amaçlı olarak MSS'nin belli bölgelerin- de daha belirgin olmak üzere devam eder(19). Bunlar aksonal tomurcuklanma, dendritik dallanma, yeni sinaps oluşumu (sinaptogenez) ve varolan sinapsın yeniden şekillenmesi (sinaptik "remodeling") ve uzun süreli potansiyasyon (LTP) şeklindedir. AH ile ilişkili tüm risk faktörleri ve patolojik ürünler, nöroplastisiteye müdahale ediyor olabilir. Nöroplastisite potansiyeli, AH'de NFY oluşumunun yayılımı ile benzer şekilde en yüksek limbik sistemde iken, azalan sırayla paralimbik yapılar, asoiasiyon neokorteksi ve en az da primer sensoryel-motor kortekslerdedir(20). Özellikle plastisite yükünün yüksek olduğu bölgelerde kinaz-fosfataz dengesinin bozulması, fosforillenmiş taunun defosforilizasyonunun sağlanamayarak patolojik katlanmasına ve oligomerlere dönüşmesine neden olmaktadır. APP ise nöroplastisitedeki rolü deneysel olarak gösterilmiş bir membran proteinidir. APP proteolizi sonucunda a-sekretaz ile kesilen ürün olan sAPP'nin de nörit büyümesi ve LTP'deki rolü bilinmektedir. Buna karşılık, β ve γ -sekretazlarla alternatif kesim sonucu oluşan A β fragmanı nörotoksiktir, aksonal tomurcuklanma ve LTP'yi inhibe eder. PSN1'in, Notch proteini ile etkileşimin erişkin beyinde plastisite yükseltici etkileri gösterilmiştir. PSN1 ve PSN2 mutasyonları APP proteolizini A β yoluna kaydırmanın yanı sıra Notch ile etkileşim gösteremeyen bozuk ürünlere yol açarak da plastisite potansiyelini baskılıyor olabilir(18). Kolesterol ve fosfolipidlerin transselüler naklinde rol oynayan ve dolayısıyla aksonal büyüme ve sinaptogeneze katkıda bulunduğu düşünülebilecek ApoE de plastisite ile ilişkilidir. Buna göre ApoE- ϵ 4 plastisiteyi baskımlarken, ApoE- ϵ 3 ve ϵ 2 yükseltici etki göstermektedir. Yine östrojenin nörotrofik etkileri bilinmektedir(19). Yaş AH için temel risk faktörüdür. Uzun ömür aşınma, yıpranma ve hasarlanmanın artmasıyla kompensatuar plastisite ihtiyacını artırmaktadır. Yaşla artan bu ihtiyacı karşılamak için gerek tau fosforilasyonunda ve gerekse de APP ekspresyonundaki adaptif artışla plastisite korunabilirse AH'den korunulabilir.

Plastisite sağlanamazsa, serbest tau polimerlerinden NFY oluşumu ve A β 'nin gevşek plaklarda birikmesi ve sonrasında katı plaklara dönüşmesi artıyabilir (17).

2.1.3. Nöron kaybı

AH'de nöron kaybı entorhinal korteksten başlar. Limbik sistemi takiben superior temporal sulkusta tespit edilir. Nöron kaybının zaman içinde ilerleme ve anatomik yatkınlık tarzı genel anlamda NFY'nin tarzına benzer. NFY ile nöron sayılarının arasında anlamlı negatif korelasyon vardır. Bununla birlikte nöron ölümünden tek başına NFY'ler sorumlu tutulamaz. Subkortikal çekirdekler gibi NFY'lerin bulunduğu bölgelerde mutlaka nöron kaybının olması gerekmez. Öte yandan, NFY'lerin az sayıda olduğu ya da hiç bulunmadığı bölgelerde ağır nöron kaybı görülebilir. Amiloid nörotoksisitesi ve transsinaptik dejenerasyon, hücre ölümünde rol oynadığı düşünülen diğer etkenlerdir. Hücre ölümünün bir başka mekanizması olarak da apoptozis ya da programlanmış hücre ölümü üzerinde durulmaktadır (17).

Sinaps kaybı Sinaps kaybı kortikal biyopsi örneklerinde klinik demans ağırlığıyla en yüksek korelasyon gösteren yapısal değişikliklerin başında gelir. Sinaptofizin gibi sinaptik proteinlerin miktarlarının demans ağırlığıyla korelasyonu gösterilmiştir. Sinaps kaybı daha çok NFY ve nöron ölümünün anterograd Wallerian dejenerasyon sonucu sekonder etkisi ile açıklanır. Ancak primer hasarın sinapslarda olması ve bozukluğun retrograd olarak hücre gövdesine taşınarak, NFY oluşumu ve nihayetinde hücre ölümüne yolaçması da olasıdır (17).

Gliozis ve inflamasyon NFY ve amiloid plaklara, astroglial ve mikrogliyal aktivasyonun eşlik etmesi ve plakların çevresinde akut faz proteinleri, sitokinler, kompleman elemanları ve proteazlar gibi inflamasyon sürecine katılan bir çok maddenin varlığının saptanmış olması AH'de inflamatuvar süreçlerin ve glial aktivasyonun da patojenik sürecin bir parçası olduğunu ya da en azından hastalığın ilerlemesine katkıda bulunduğunu düşündürmektedir (21). Amiloid β birikiminin mikrogliyal ve astroglial hücreleri aktive ettiği anlaşılmaktadır. Öne sürülen patojenik mekanizmalardan biri amiloid peptid ve inflamatuvar uyaranlarla aktive olan mikrogliyal hücrelerden sitokinlerin salgılanması, akut faz reaktanları ve komplemanın aktive edilmesiyle inflamasyon oluşması, salınan proinflamatuvar sitokinlerin ve nörotoksinlerin nöronal hasara yol açması ya da şiddetlendirmesidir(20). AH'de inflamatuvar süreçlerin katkısını destekleyen bulgulardan biri de antiinflamatuvar tedavi yaklaşımlarının bu hastalıkta kısmen yarar göstermesidir. İnflamasyonun, serbest radikallerin ortaya çıkışı, oksidatif gerilim, kalsiyum homeostazı ve mitokondriyal membranda bozulmalar ile birlikte gittiği düşünülmektedir. Non-steroid anti-inflamatuvar ilaç (NSAİİ) kullanımının AH'li

beyinde toplam Amiloid β sayısına etki etmezken, aktive mikroglia sayısını azalttığı saptanmıştır. Astrositler bütiril kolin esterase (BChE) gibi normalde aktivitesi ihmal edilecek düzeyde olan bir dizi molekülün de kaynağı ve nöritik plağa evrimin başka açılardan da tetikleyicisi gibi durmaktadırlar(21). Öte yandan, mikroglial hücrelerin diğer monosit-makrofaj soyundan hücrelere benzer biçimde yüzeylerinde eksprese ettikleri hücre ölüm reseptörü ligandları aracılığıyla da hedef hücre ölümünü tetiklemesi olasıdır. Tümör nekrozis faktör (TNF) ailesinden olan “TNF Related Apoptosis-Inducing Ligand” (TRAIL) bunlardan birisidir. Mikroglial hücrelerin aynı soydan olduğu periferik mononükleer fagositer hücreler, yukarıda belirtilen salgılanma ürünleri yanısıra immün yanıtta, yüzeylerinde eksprese ettikleri ve inflamasyon koşullarında ekspresyonu artan TRAIL gibi hücre ölüm ligandları aracılığıyla da katılmaktadır. Benzeri bir mekanizma glial hücreler için de geçerli olabilir. Gerçekten de astroglial hücrelerde interlökin-1 ve TNF-a ile indüksiyon sonucunda TRAIL mRNA ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir. Mikroglial hücrelerde TRAIL ekspresyonu varlığı da gösterilmiştir (22).

2.1.4. Kolinerjik kayıp

Asetil kolin (Ach) hipokampusu serebral kortekse bağlayan nörotransmitterdir. Kolin ve asetil koA’dan ‘asetil transferaz’enzimi ile ‘asetil kolin’oluşur. AH’de primer defisit beyindeki kolinerjik sistemin, özellikle öğrenme ve bellek ile ilgili bölgelerde bozulmasıdır (23). Ach sentezinden sorumlu olan kolin asetil transferaz seviyesi, hipokampus ve neokortekste %58-90 azalmıştır. Asetil kolin presinaptik nöronlardaki veziküllerden salınır ve postsinaptik reseptörlere bağlanır. Sinaptik aralıkta difüzyonla ilerleyen Ach postsinaptik membranda nikotinik reseptörlere bağlanarak doğrudan, muskarinik reseptörlere bağlanarak G-proteini ilişkili ikincil mesajcılar üzerinden etkisini gösterir(22-23). Nikotinik etkilerin hücrenin uyarılabilirliğini artırarak dikkat tonusunun sağlanmasında rol oynadığı, muskarinik etkilerin ise kalıcı sinaptik değişikliklerle yeni bilginin depolanması şeklindeki nöroplastisite mekanizmalarının unsuru olduğu bilinmektedir. Hem nikotinik, hem de muskarinik stimülasyon kaybının A β oluşumunun artması ve A β nörotoksitesinin artması şeklinde in vitro etkileri gösterilmiş, A β ’nın sentez, salınım ve postsinaptik etkinliğini azaltabileceği de ortaya konmuştur. Asetil kolin esterase (AChE) enzimi Ach’yi “asetat” ve “kolin”e hidrolize ederek Ach’nin post-sinaptik aktivitesini durdurur(23). Kolinesterazların iki formu bulunur: asetil kolinesteraz (daha çok beyinde bulunur) ve bütiril kolinesteraz (daha çok periferde bulunur). Buna göre, AH’de kolinerjik kaybın kendisi de amiloid plak oluşumuna katkıda bulunan özelliklerdendir. A β da muhtemelen kolinerjik kaybı artırarak bir kısır döngü ortaya

çıkarmaktadır. Östrojen limbik nöronlarda sinaptogeneze katkıda bulunup nöroplastisitede rol oynarken, Meynert'te Ach üretimine de katkıda bulunur. Ek olarak, bazal önbeyinde kolinerjik nöron dejenerasyonu olur. Bu nedenle, Ach üretiminde ilerleyici bir düşüş olur(23-24). Bütün korteksin kolinerjik innervasyonu temel limbik yapılardan biri olan bazal ön beyindeki Meynert çekirdeğinden sağlanır. Bu innervasyon dikkat ve bellek işlevlerinin optimal sürdürülebilmesi açısından büyük önem taşır. Tau hiperfosforilazasyonun ilk görüldüğü alanlardan biri de Meynert çekirdeğidir. AH'de limbik alanlardaki yaygın NFY formasyonu ve nöron kaybı Meynert çekirdeğini de etkiler. Kolinerjik aksonların kaybı diğer patolojik özellikler gibi bir bölgesel yatkınlık gösterir. Lokal internöronlardan sağlanan striatal kolinerjik innervasyon ve talamusun beyin sapı pedinkülopontin çekirdek kaynaklı kolinerjik innervasyonu etkilenmezken, Meynert kaynaklı kolinerjik innervasyonda etkilenir. Kortekste en fazla etkilenen bölgeler limbik ve asosiasyon korteksleri iken, primer sensoryel ve motor korteksler görece olarak sağlam kalırlar (24).

2.1.5. Serotonerjik kayıp

AH'de serotonerjik (5-HT-erjik) dorsal raphe çekirdeğinde Meynert düzeyinde olmasa bile kayda değer nöron kaybı ve kalan nöronlarda NFY'ler görülür. Kortikal 5- HT-erjik akson terminallerinde 5-HT'nin salınımı ve geri alınımı ciddi düzeyde bozulmuştur. AH'de 5-HT-erjik kayıpla depresyon ve saldırgan davranışın korelasyonu bildirilmektedir. 5-HT geri alım bloklerinin (SSRI) AH'deki depresyon ve agresyonun tedavisindeki rasyoneli bu gözlemlere dayanmaktadır (17).

Noradrenerjik kayıp beyin sapındaki noradrenerjik (NA-erjik) çekirdek olan "locus ceruleus"ta (LC) da dorsal raphe benzeri bir nöronal kayıp ve NFY oluşumu gözlenir. LC'deki patoloji seçici yatkınlığa uygun biçimde LC'nin kortikal projeksiyonları olan anterior ve medial bölümlerini etkilerken spinal ve serebellar projeksiyonları içeren kaudal ve lateral bölümleri sağlam kalır. NA-erjik kaybın klinik karşılığı iyi belirlenmemiştir(17).

2.1.6. Dopaminerjik kayıp

AH ileri evrelerinde parkinsonizm sıra dışı bir olgu değildir. Bu olguların patolojik karşılığı büyük sıklıkla "substantia nigra pars compacta" dopaminerjik (DA-erjik) nöronlarında kayıp ve Lewy cisimcikleridir. DLB kendine özgü bir antite olarak ortaya çıkmışken, DLB ve AH'nin iç içe geçtiği durumlar olan hem NFY-SP hem de kortikal Lewy cisimciklerinin sonucu olan klinik durumların DLB mi yoksa Lewy varyantlı AH olarak mı adlandırılacağı tartışmalıdır. Parkinsonizm genellikle postür bozuklukları ve rijidite tarzındadır (17).

2.2. Alzheimer Hastalığında Amiloidin rolü

AH'de depolanan A β amiloid, büyük APP molekülünden köken alır. APP; transmembran yerleşimli, hücre yüzeyinde eksprese olan bir proteindir. 21. kromozomda lokalize geni vardır. APP'nin ana yapısı hücre içi, transmembran ve büyük ekstrasellüler alan olmak üzere 3 alan içerir. Fonksiyonu tam olarak bilinmemekle beraber hücre-hücre ve hücre-matriks ilişkisinde rolü olduğu düşünülmektedir. Suda erimiş halde bulunan APP; hücre yüzeyinden α -sekretaz enzimi ile olarak ayrılır(22). Proteolitik enzim α -sekretaz; APP'nin A β bölgesini ortasından ayırır. Böylece A β fragmanlarını arttırmaz. Bununla birlikte yüzey APP hücre içine alınabilir ve farklı sellüler komponentlerin yapısında çeşitli formlarda bulunabilir. Bu formlarda APP, N ucundan A β peptid transmembran bölge hemen üzerinden β -sekretaz ile parçalanır. Transmembran bölgedeki bölüm ise γ - sekretaz ile ayrılır. Bu proteoliz sonucu 39/40 ve 42/43 aminoasitlik iki predominant A β peptid yapısı oluşur(20). Vasküler alanlarda biriken amiloid genellikle A β 39/40 iken plaklardaki A β peptit formu 42/43 aminoasitlik fragmanlardan oluşur. A β 39/40 peptidinin damar duvarında birikmesinin olası mekanizması tam açık olmamakla birlikte A β 39/40 endositozisi, kan damarlarına selektif transportu ve putative dekarboksil transferaz ile A β 42/43 proteolizi ile A β 39/40'a indirgenmesidir. İn vitro olarak A β ve bunun agregatlarının nörotoksitesi demansın patogenezinde bunların rol oynayabileceğinin düşünülmesine yol açmıştır (23).

Genetik araştırmalar AH'nin küçük bir bölümünü oluşturan ailesel AH'de APP ve A β peptidlerinin patogeneizde sorumlu olabileceğini düşündürmektedir. Erken başlangıçlı AH'de 21. kromozomda çeşitli mutasyonlara rastlanmıştır. Londra mutasyonu 717. kodonda meydana gelen bir nokta mutasyonudur. İsveç mutasyonu ise 670 ve 671. kodonlarda meydana gelen çiftli mutasyondur. A β peptidinin sellüler sekresyonunda artışa rastlanır. Flaman mutasyonunda 692. kodonda nokta mutasyonu vardır. Bu mutasyon erken başlangıçlı ailesel demansta izlenir(2).

Hollanda mutasyonu 693. kodonda meydana gelen bir nokta mutasyonudur. Amiloid içeren herediter serebral kanama hastalığında gözlenir. Damar duvarlarında hızlı amiloid birikimi ile karakterizedir (2).

Geç başlangıçlı Alzheimer mutasyonu 665. kodonda saptanan bir nokta mutasyonudur. Bu yalnızca bir akrabalıkta kaydedilmiştir (3).

2.3. Zingiber officinale

Taze ve kuru olarak tüketilebilen zencefil, rizom köklerinden meydana gelmektedir. İngiliz botanikçi William Roscoe (1753-1831) 1807 yılında zencefili tanımladı ve *Zingiber officinale* adını verdi. Zencefilin vatanı Güney Asya olmakla beraber asıl orjin merkezi tam olarak bilinmemektedir. Bugün dünya üzerinde pek çok yerde yetişen türün yabanisi hakkında da bilgi yoktur. Subtropikal ve özellikle tropikal bölgelerde tarımı yapılmaktadır (25).

Zencefil, Zingiberaceae familyasına dahil bir türdür. Bu familya 24 kadar cinsi ve 300 civarında türü kapsar. Zingiber cinsi de 20 kadar türe sahiptir. Zencefil bitkisi çok yıllık yumru veya rizom köklere sahiptir. Bitki 60- 90cm yüksekliğinde dik, koyu yeşil yapraklı tek yıllık sap (yalancı gövde) oluşturur. Sapları, saptan ayrılan düz kınla kaplıdır. Gövde üzerinde iki sıralı 8-12 yaprak bulunur. Yapraklar uzun kınlı, alternat (alması), mızraksı, şeritsi-mızraksı, sivri uçlu, düz ve sapsız kınlı, 10-21 cm uzunluğunda, 2-2.5 cm genişliğindedir. Çiçek kümesi kökten tek başına küçük bir sap ile yükselir. Çiçek kümesinin yerden yüksekliği 12-30 cm dir. Kınlarla sarılmış bir kafa şeklindedir. En sondaki kın katlanarak ayrılır. Çiçek kümesi aşağı yukarı bir baş parmak büyüklüğündedir. Çiçekler küçük ve soluk sarı renklidir. Anterler çift, taçlı uzun, ince kumlu, oluklu ve boynuz şeklindedir. Ovaryum oval, üç hücreli her birinde pek çok yumurta ile iplikçik biçimli, stigma huni biçimli, sınırsal tüylü ve zirvenin hemen altında boynuz şeklinde anter vardır(26).

2.3.1. Kullanım alanları

Geleneksel Hint tıbbında, pıhtılaşmayı ve kollestorölü önleyici, mafsallı iltihabını tedavi edici olarak kullanılmaktadır . Arap kültüründe kullanım şekli afrodisyak şeklindedir. Ayrıca bazı Afrikalılar zencefili düzenli olarak yedikleri zaman sivrisineği uzaklaştırdığına inanmaktadırlar. Afrika'da diğer bir kullanım şekli ise gaz giderici (carminative) ve baharat şeklindedir (27). Epstein-Barr virus enfeksiyonu kanser nedenleri arasındadır. Zencefilin bu virus enfeksiyonu durdurarak kanseri önlediği bildirilmektedir. Ayrıca, zencefilin aktif maddelerinden, 6- gingerol ve 6-paradol bileşimlerinin promyelotik lösemiye durdurma etkisi vardır. Bu da kanser hücresi DNA sentezini bozarak etkileme şeklindedir. Antiemflamatuar etkisi ile artrit ve baş ağrısını tedavi edici etkisi vardır. Zencefil extrelerinin bakteri önleyici etkileri için kullanıldığı zaman gram pozitif ve gram negatif bakteri suşlarına (*Clostridium*, *Listeria*, *Enterococcus* ve *Staphylococcus*) karşı etkiye sahip olduğu fakat bu etkinin pişirildiği zaman kaybolduğu bildirilmektedir. Mantar önleyici etkisinin de olduğu, fakat bu etkiyi

sadece laboratuvar ortamında gösterdiği bildirilmiştir. Zencefilin insanlar üzerindeki direkt etkisi, mide bağırsak sisteminde, mide bulantısını azaltıcı şekildedir(27).

2.3.2. Bileşimi

Kurutulmuş zencefil rizomları buharda damıtıldığında %2-3 oranında uçucu yağ elde edilir. Rizomlar ayrıca ortalama %9 protein, %6 sabit yağ, %70 karbon hidratlı maddeler, %6 ham selüloz ve %4.5 kadar da ham kül ihtiva eder. Zencefil rizomlarının ağız ve burunda oluşturduğu tat ve koku iki farklı kimyasal gruptan gelir. Bunlardan uçucu yağlar; terpenoidlerle karışık olup zencefillin özel tat ve kokusunu veren maddelerdir. Ağzımızda sıcaklık hissi veren ve uçucu yağ olmayan acı maddeler ise gingerol ve zingeron'dur. Zencefilin potansiyel aktif madde içeriği; **shogoal**, **gingerol**, bisapolen, zingiberen, zingiberol, sesquifellanden, kurkumin, 6- dehidrogingerdion, galanolakton, gigesulfonik asid, geraniol, neral, monoasidigalaktosiliklerd gingerlikolipid 'dir. Başlıca aktif haldeki madde; bisapolene, zingiberene ve zingiberol' dur (28). Zencefillin aktif maddeleri farklı fizyolojik etkiye sahiptir. Örnek olarak gingerols'un in vitro ve hayvanlar üzerinde yapılan denemelerinde, ağrı kesici, yatıştırıcı, ateş düşürücü ve bakteri önleyici özelliği olduğu tespit edilmiştir (28).

2.3.3. Ferulik asit

Bitkiler metabolik faaliyetleri sırasında hayati fonksiyonları için gerekli olmayan ve “sekonder metabolitler” olarak adlandırılan çok sayıda yan ürünler sentezlemektedir. Bu klasik tanımdan da anlaşıldığı gibi önceleri bu ürünler, bitkiler tarafından oluşturulan ve bitkide hiçbir işlevi olmayan ara maddeler olarak kabul edilmekteydi. Ancak bugün bu metabolitlerin, savunma, korunma, ortama uyum sağlama, hayatta kalma ve soyunu sürdürmek için bitkiler tarafından geliştirilmiş oldukça karmaşık mekanizmaların ürünleri olduğu anlaşılmıştır. Bitki sekonder ürünlerinin önemli bir sınıfını fenolik bileşikler oluşturmaktadır. Bu bileşikler arasında ferulik asit 'de yer almaktadır.

Ferulik asit kahve, elma, yer fıstığı, portakal, ananas, enginar gibi bir çok bitkinin yaprak ve tohumlarında bulunur, fakat en çok tahıllarda özellikle kahverengi pirinç, buğday ve yulafta bulunur. Ferulik asit, hidroksisinnamik asit ailesine mensup sarı renkte bir tozdur. Allelopatik kimyasallar arasında yer almaktadır(23).

2.4. Glikojen Sentaz Kinaz 3- β enzimi (GSK3 β)

GSK3 β enzimi adını substratı olan glikojen sentaz enziminden alır. Bu enzim erişkin ve embriyonik dönemde birçok sinyol yolunda görev alan Serin/Treonin kinazdır. Yarı Serin ve Treonin rezidülerini fosforillemektedir. İlk olarak 1980 yılında saptanan bu enzimin α ve β olmak üzere iki izoformu vardır. İlişkili oldukları molekküller birbirinden farklı olmasına rağmen bu iki izoformun kinaz aktivitesine sahip bölgeleri birbiri ile % 97 oranında homoloji gösterir(29). Wnt/ β -katenin sinyal yolunda bu enzimin GSK3 β izoformu görev yapar. GSK3 β yaklaşık olarak 47 kDa molekül ağırlığında ve 420 aminoasit uzunluğundadır(30).

Bu enzim sitoplazmada bulunan yıkıcı kompleksin yapısında bulunur ve β -katenin proteininin fosforilenmesinden sorumludur(31). GSK3 β enzimi Wnt/ β -katenin sinyal yolundaki bu görevinin yanısıra inflamasyon, osteojenez, kondrojenez, adipojenez ve mitokondri bağımlı apoptoz mekanizmalarında rol alan birçok kritik biyomolekülün fosforillenmesinden de sorumludur(32).

Aynı zamanda bu molekülde meydana gelen bozuklukların diyabet, bipolar mental bozukluk, Alzheimer hastalığı ve çeşitli kanserlere neden olduğu da son yıllarda yapılan çalışmalarda ortaya çıkarılmıştır. GSK3 β enziminin Alzheimer hastalığının oluşumunu uyardığı ve demansı etkilediği ileri atılmaktadır. Bu biyomelekülün aktivitesinin ortadan kaldırılması ile Alzheimer hastalığının tedavi edilebileceği yönünde çalışmalar mevcuttur(33).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Hücre kültürü ile ilgili deneyler, Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı araştırma laboratuvarında bulunan hücre kültürü laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından (Proje kodu:TYL-2013-4565) desteklenmiştir.

3.1. MATERYAL

3.1.1. Hücre Kültürü

Çalışmada SHSY-5Y (ATCC Cat No CRL-2266™) hücreleri kullanıldı. Hücreler, hücre kültürü laboratuvarında 5% CO₂ içeren CO₂' li etüvde 37 °C' de yaşatıldı ve çoğaltıldı. Hücrelerin çoğaltılma işlemi için ATCC prosedürlerine göre Dulbecco Eagle's Minimum Essential Medium ve F12 Medium'un 1:1'lik karışımı (Catalog No. Sigma D6421) kullanıldı. Yüzeye tutunan hücre olmaları nedeniyle sayım ve belirli sayıda plakalara ekim sırasında hücreler taze hazırlanmış 0.25% tripsin (Catalog no. Sigma T4049), 0.53 mM EDTA (Catalog No. Sigma E5134) çözeltisi ile muamele edildi.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

DMEM + F12 Medium' un 1:1'lik karışımı (Catalog No. Sigma D6421)

Trypsin (Catalog No. Sigma T4049)

EDTA (Catalog No. Sigma E5134)

FBS (Catalog No. Sigma F7524)

Penisilin/Streptomisin (Catalog No. Multicell 450-201-KL)

L-Glutamin (Catalog No. Sigma D6421)

β -Amiloid 1-42 (Catalog No. Anaspec. 20276-1 mg)

Kinase-Glo Luminescent Kinase assay (Catalog No. Promega V6711)

Hücre besiyerleri +4°C'de, FCS, L-glutamin, antibiyotik solüsyonları -20°C'de, hemen kullanılacak hücre stokları, -80°C'de muhafaza edildi.

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

- İnvert mikroskop (NICON ECLIPSE TS 100)
- Su banyosu (NÜVE ST402)
- Soğutmalı santrifüj (NÜVE NF 1200R)
- CO₂'li incubator (NEW BRUNSWICK GALAXY 170 R)
- Güvenlik kabini (İFO KİMYA- SAFE FAST ELİTE)
- Deiyonize su cihazı (MİLL İPORE- EL İX5)
- Distile su cihazı (NÜVE NS 112)
- Etüv (NÜVE FN120)
- Otomatik pipetler (EPPENDORF)
- Hassas Terazî (OHAUS PIONEER)
- Buzdolabı (SIEMENS)

3.2. METOD

3.2.1. Hücre kültürünün hazırlanması ve yapılan işlemler

Bu çalışmada SHSY-5Y hücreleri kullanıldı. Hücreler, hücre kültürü laboratuvarında 5% CO₂ içeren CO₂' li etüvde 37 °C' de yaşatılmış ve çoğaltıldı. Hücrelerin çoğaltılma işlemi için ATCC prosedürlerine göre Dulbecco Eagle's Minimum Essential Medium ve F12 Medium'un 1:1'lik karışımı kullanıldı. Çalışmamızda antibiyotik seçimi olarak penisilin- streptomisin kombinasyonu kullanıldı. Hücreler haftada iki veya üç kez büyüme çözeltileri değiştirilerek beslendi.

Çalıştığımız deneyde gingerol ve shogaolün 0.01 µM ,0.1 µM, 1 µM, 10 µM, 100 µM' lık dozları kullanıldı. Gingerolde ve shogaolde toplamda 400 µM' lık bir ana stok hazırlandı. Yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona doğru dilüsyon işlemi yapılarak, kuyucuklara uygulanacak esas konsantrasyon elde edildi ve önceden belirlenmiş kuyucuklara 50 µL içinde gerekli doz ilave edildi.

Çalışmamızda ferulik asit için belirlenen doz 4 µM'dır. Ferulik asit için de 250 µL' lik ana stok hazırlandı. Önceden belirlenmiş kuyucuklara 50 µL içinde gerekli doz ilave edildi.

3.2.2. Altın plate yöntemi ile hücre sayımı ve canlılığı testi

SHSY-5Y hücrelerinde β -Amiloid fragmanı 1-42 (A β 42) ile oluşturulan nörotoksisitede, saf maddelerin koruyucu etkileri altın plate canlılık ve sayım testi kullanılarak Xcelligence cihazında gerçek zamanlı olarak incelendi. İlk olarak 5x10⁴ hücre/ kuyucuk yoğunluğunda hücre alınıp steril 96 altın plate içine ekildi. Altın plate'in kuyucuklarına yerleşim şemasına göre hazırladığımız miktarda besiyeri, hücre, amyloid beta, gingerol, shogoal ve ferulik asit ilave edildi. Cihazda hücrelerin yüzeye tutunmaları sırasında oluşan kompedansa göre hesaplanan hücre indeksi (Cell Index) üzerinden maddelerin hücre çoğalması üzerine etkileri incelendi.

3.2.3. Amiloid beta oligomerlerinin ve agregatlarının hazırlanması

Deney için temin edilen β -Amiloid 1-42 (Catalog No. Anaspec. 20276) fraksiyonu peptit ile beraber gelen protokole uygun olarak hazırlandı. Bu protokole göre; 1 mg peptit %1 NH₄OH içeren PBS ile muamele edildi. Elde ettiğimiz çözeltiden bir ana stok hazırlandı.

Amiloid beta oligomerini hazırlamak için elde ettiğimiz ana stoktan deney için gerekli hacimde 22 µM dozunda çözelti hazırlandı. Amyloid beta oligomeri altın platede daha öncesinden yerini belirlediğimiz kuyucuklara muamele edildi ve toksisite oluşturmaları için 24 saat inkübasyona alındı.

Amiloid beta agregatlarını hazırlamak için amiloid beta oligomerlerinden hesaplanan hacimde alındı ve 72 saat 37 °C inkübatörde bekletilerek agregat şekline getirildi.

3.2.4. GSK-3β inhibisyonunun in vitro olarak değerlendirilmesi

Ekstre, ana fraksiyon ve saf maddelerin GSK-3β inhibisyon düzeyleri ölçümü Kinase-Glo Luminescent Kinase Assay (Promega) yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemle göre inhibitör aktivitesi denenecek olan test maddesi DMSO' da 10 mM olacak şekilde çözüldü ve istenen konsantrasyonlara analiz tamponu (50 mM 4-(2-hidroksietil)piperazin-1-etansulfonik asit (HEPES, pH 7,5), 15 mM magnezyum asetat, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA) ile seyreltildi. 10 µL (10 µM) test çözeltisi daha sonra 96' lık siyah (amber) renkli plakalarda 10 µL (20 ng) GSK-3β enzimi, 25 µM substrat ve 1 µM ATP içeren 20 µL analiz çözeltisiyle karıştırıldı ve 30°C' de 30 dakika inkübe edildi. Reaksiyon 40 µL Kinase-Glo reaktifi ilave edilerek durduruldu. 30°C' de 10 dakikalık inkübasyondan sonra multifonksiyonel mikroparka okuyucuda lüminesans değerleri okundu. Negatif kontrol olarak standart GSK-3β inhibitörü, pozitif kontrol olarak da herhangi bir inhibitör madde taşımayan test çözeltisi kullanıldı ve % inhibisyon değeri, aşağıdaki formülle hesaplandı.

% inhibisyon= 100 x (inhibitör test çözeltisinin lüminesansı- ortalama pozitif kontrol lüminesansı)/(ortalama negatif kontrol lüminesansı- ortalama pozitif kontrol lüminesansı)

Tüm test çözeltileri en az iki bağımsız denemede her konsantrasyon için üç defa tekrarlanarak hesaplandı.

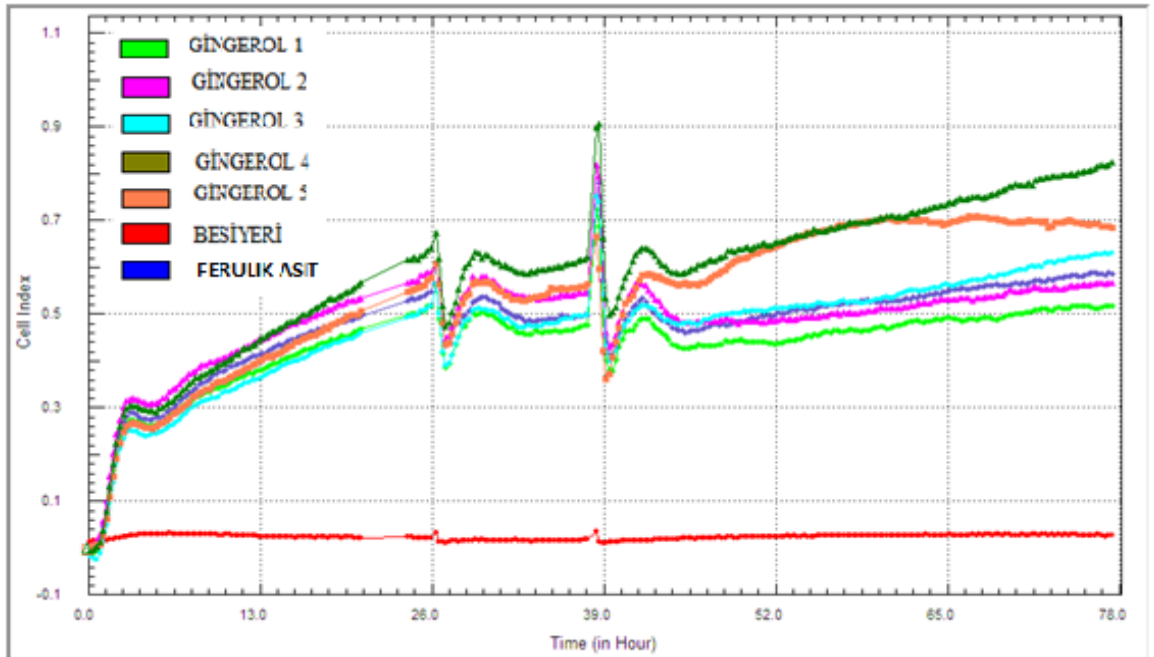
İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışmada SPSS 15.0 istatistik bilgisayar yazılımı kullanılarak gruplar arası farklar için One-Way-Anova ve grup içi farklılıklar için Student-t testi kullanılmıştır. p<0.05 olan p değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. AMYLOİD BETA AGREGATLARININ HÜCRELERE UYGULANMASINDAN SONRA GİNGEROL ve SHOGOALÜN ETKİSİ

4.1.1. HÜCRELER ÜZERİNDE AMYLOİD BETA TOKSİSİTESİ OLUŞTURULMADAN GİNGEROL ÜN ETKİSİ

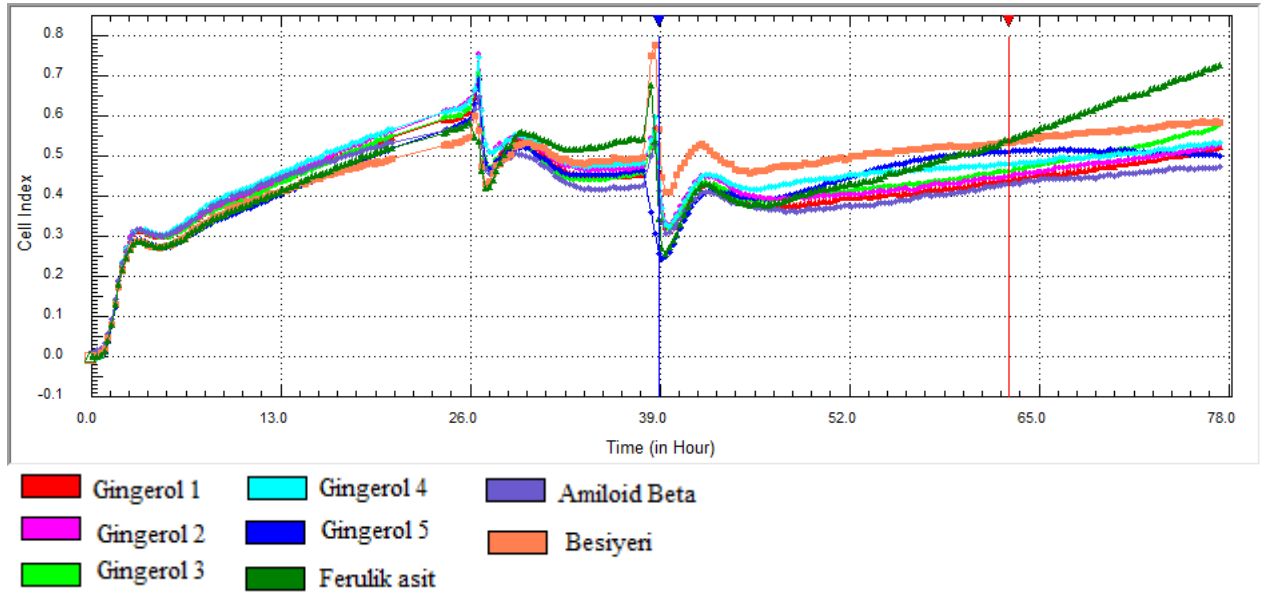


(Gingerol 1 0.01 μ M; Gingerol 2 0.1 μ M; Gingerol 3 1 μ M; Gingerol 4 10 μ M; Gingerol 5 100 μ M)

Şekil 4.1. Amyloid beta agregatı uygulanmadan hücreler üzerine gingerol dozlarının etkisi

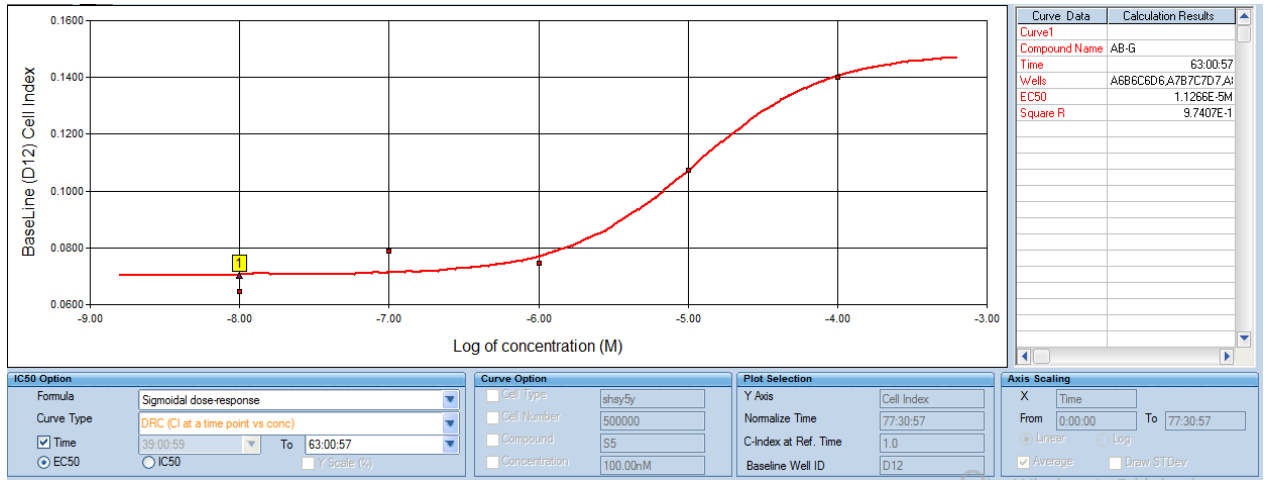
Gingerolün hücre indeksi üzerindeki etkileri incelendiğinde hücre indeksini artırdığı ancak bu artışın doza bağımlı olmadığı ve istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı bulundu. Ancak gingerolün belirli dozlarında (1 μ M, 10 μ M, 100 μ M) hücre indeksini ferulik asitten daha fazla artırdığı gözlenmiştir.

4.1.2. HÜCRELER ÜZERİNDE AMYLOİD BETA TOKSİSİTESİ OLUŞTURULDUKTAN SONRA GİNGEROLÜN ETKİSİ



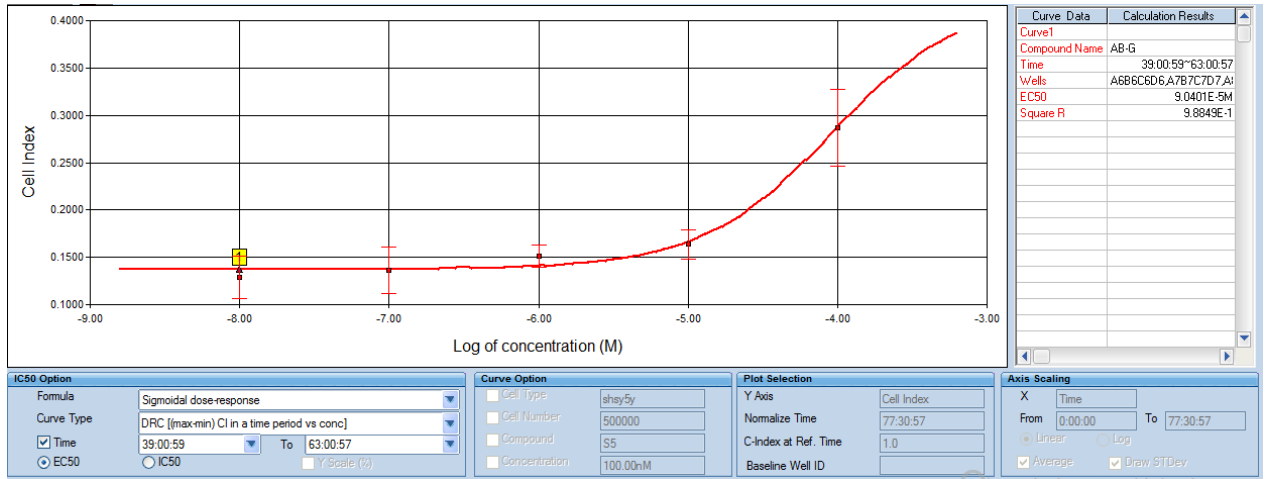
(Gingerol 1 0.01 μ M; Gingerol 2 0.1 μ M; Gingerol 3 1 μ M; Gingerol 4 10 μ M; Gingerol 5 100 μ M)
Şekil 4.2. Amyloid beta agregatı ile oluşturulan toksisiteden sonra hücreler üzerine gingerol dozlarının etkisi

Hücre indeksi artarken uyguladığımız amyloid beta agregatı, oluşturduğu toksisite nedeniyle hücre indeksini kayda değer bir şekilde düşürmüştür. Gingerolün sırayla 0,01-0,1-1-10-100 mikromolarlık dozları aynı anda uygulandığında hücre indeksinde en fazla artışının olduğu kuyucuğun 100 μ M dozda uygulandığı kuyucuk olduğu gözlenmiştir. Artış hızının en yavaş olan kuyucuk ise 0.01 μ M dozda gingerolün uygulandığı kuyucuktur. Bu durumda gingerolün uygulanan dozu ile hücre indeksine etkisi açısından aralarında doğru orantı vardır. Ayrıca amyloid beta agregatı ile oluşturulan toksisitede ferulik asit hücre indeksini en çok artıran madde olmuştur.



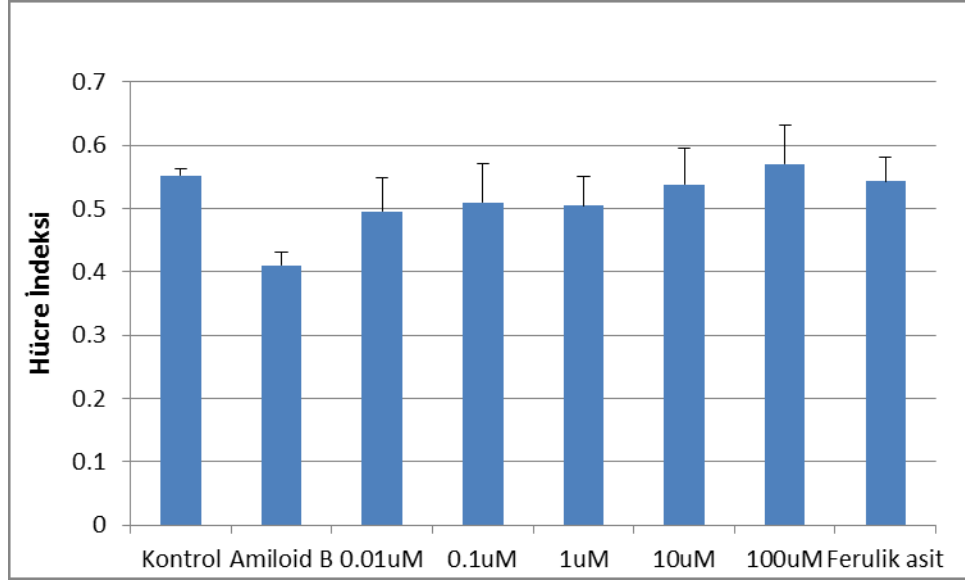
Şekil 4.3. Gingerol için Amiloid beta agregatı ile oluşturulan toksisiteden sonra 24. Saatteki sigmoidal doz- cevap eğrisi

Amiloid beta agregatı ile toksisite oluşturulduktan sonra 24. Saatte gingerolün doz yanıt eğrisi üzerinde EC50 değeri 11.2 μ M olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.4. Gingerol için Amiloid beta agregatı ile oluşturulan toksisiteden sonra 24 saatlik zaman dilimindeki sigmoidal doz- cevap eğrisi

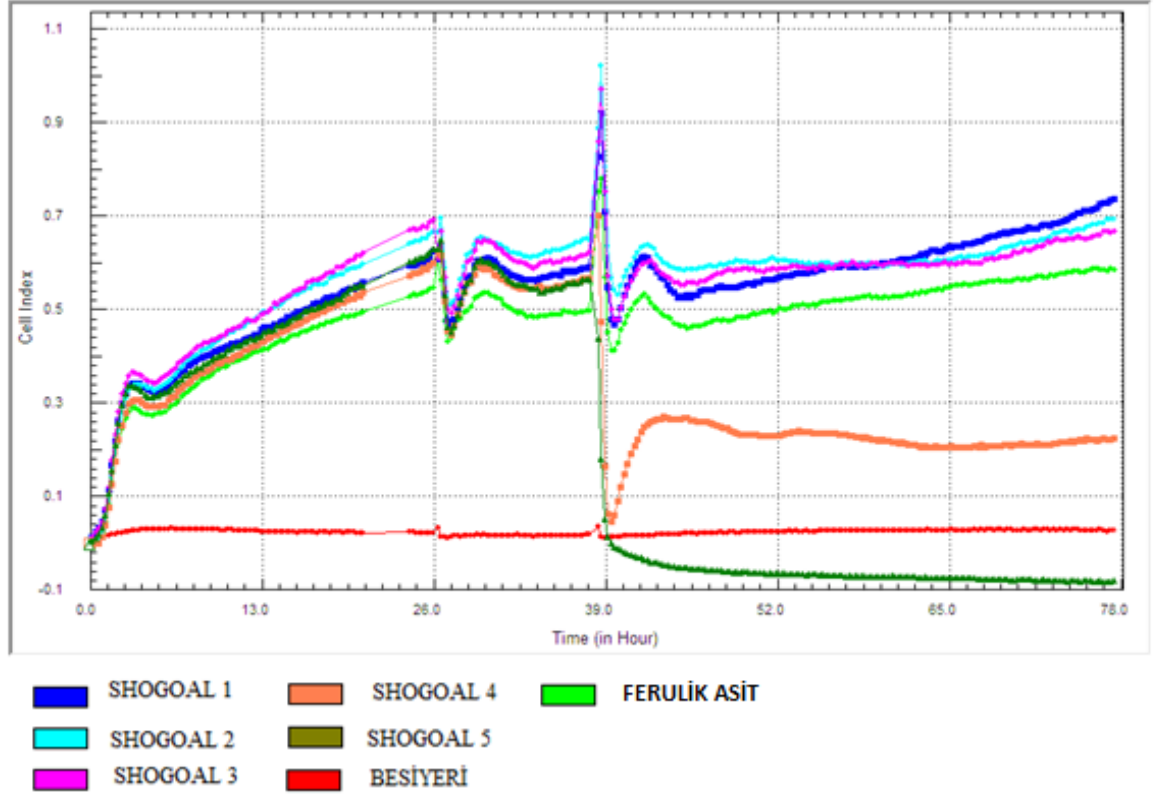
Amiloid beta agregatı ile toksisite oluşturulduktan sonra 24 saatlik zaman dilimindeki gingerolün doz yanıt eğrisi üzerinde EC50 değeri 90.4 μ M olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.5. Amiloid beta agregatı ile oluşturulan toksisiteden sonra gingerol uygulamasının 24. Saatinde hücre indeksindeki değişiklikler

Amiloid beta agregatı uygulanması ile hücre indeksinde kontrole göre belirgin bir düşüş gözlemlendi. Gingerol uygulamasından sonra 24. saatte gingerolün uygulanan bütün dozlarının hücre indeksini doza bağımlı olarak artırdığı görüldü. Ayrıca bu artışın hemen hemen ferulik asitle paralellik gösterdiği bulundu.

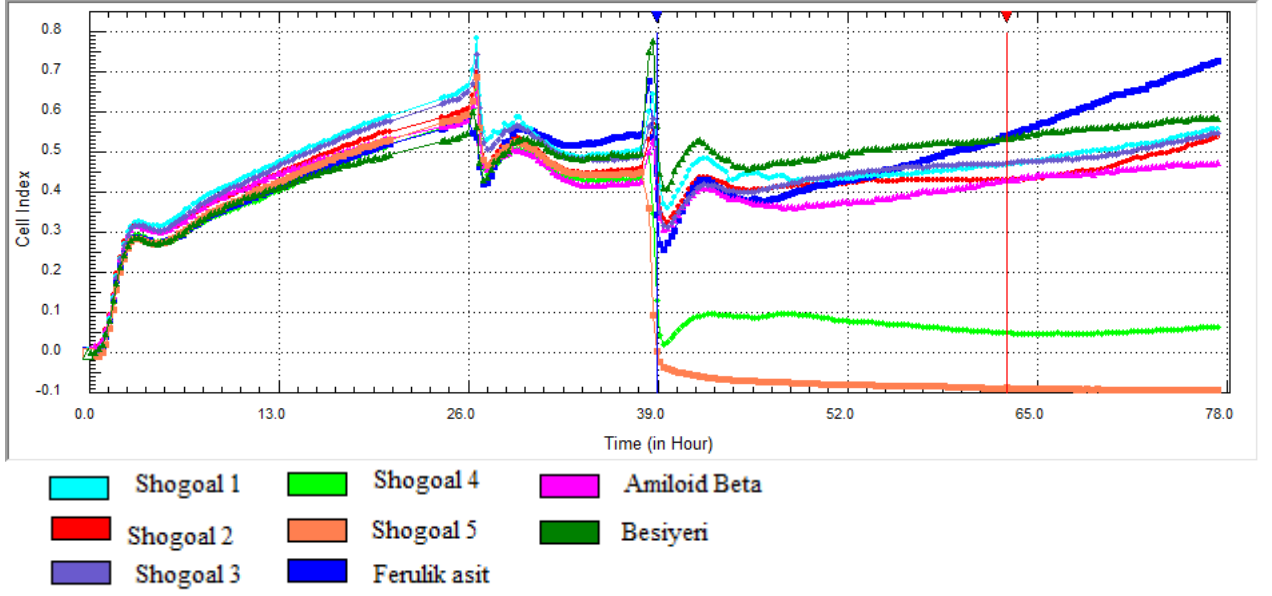
4.1.3. HÜCRELER ÜZERİNDE AMYLOİD BETA TOKSİSİTESİ OLUŞTURULMADAN SHOGOALÜN ETKİSİ



(Shogoal 1 0.01 μ M; Shogoal 2 0.1 μ M; Shogoal 3 μ M; Shogoal 4 10 μ M; Shogoal 5 100 μ M)
Şekil 4.6. Amyloid beta agregatı uygulanmadan hücreler üzerine shogoal dozlarının etkisi

Amiloid beta agregatı ile toksisitesi oluşturulmadan shogaolün hücre indeksinde oluşan değişiklikler incelendiğinde shogaolün düşük dozlarada hücre indeksini artırdığı hatta bu etkilerinin ferulik asitten daha iyi olduğu ancak yüksek dozlarda toksisite gösterdiği gözlenmiştir.

4.1.4. HÜCRELER ÜZERİNDE AMYLOİD BETA TOKSİSİTESİ OLUŞTURULDUĞUNDA SHOGOAL IN ETKİSİ

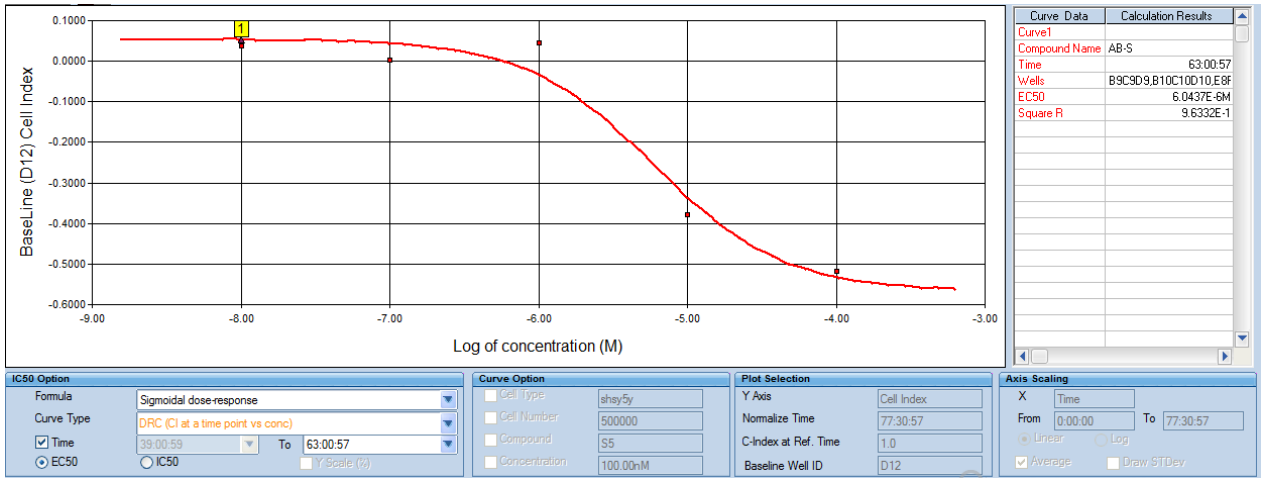


(Shogoal 1 0.01 μ M; Shogoal 2 0.1 μ M; Shogoal 3 μ M; Shogoal 4 10 μ M; Shogoal 5 100

μ M)

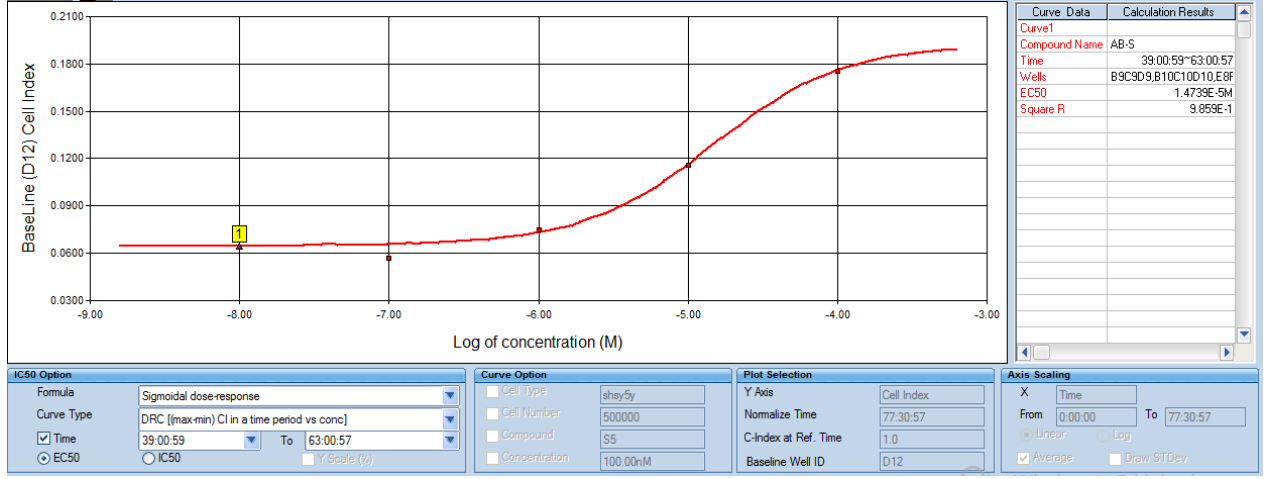
Şekil 4.7. Amyloid beta agregatı ile oluşturulan toksisiteden sonra hücreler üzerine shogoal dozlarının etkisi

Hücreler üzerine amiloid beta agregatı ile oluşturulan toksisitede hücre indeksini toksisite oluşturulmadan önceki gibi artıran dozların 0.01 μ M , 0.1 μ M, 1 μ M dozlar olduğu, 10 μ M, 100 μ M dozlarda ise hücreler üzerine toksik etkisi olduğu gözlenmiştir.



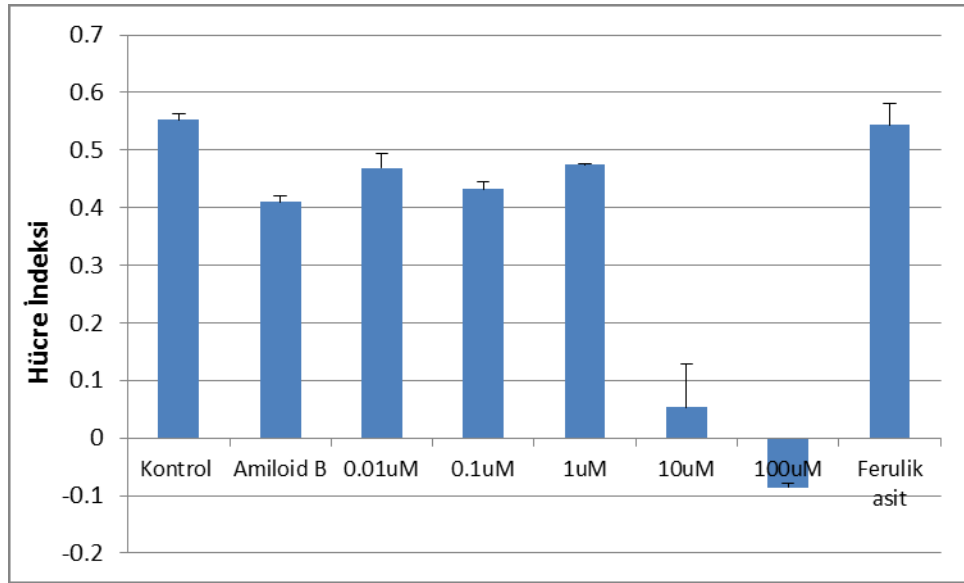
Şekil 4.8. Shogaol için Amiloid beta agregatı ile oluşturulan toksisiteden sonra 24. Saatteki sigmoidal doz-cevap eğrisi

Amiloid beta agregatı ile toksisite oluşturulduktan sonra 24. Saatte shogaol doz yanıt eğrisi üzerinde EC50 değeri 6 μ M olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.9. Shogaol için Amiloid beta agregatı ile oluşturulan toksisiteden sonra 24 saatlik zaman dilimindeki sigmoidal doz-cevap eğrisi

Amiloid beta agregatı ile toksisite oluşturulduktan sonra 24 saatlik zaman dilimindeki shogaol doz yanıt eğrisi üzerinde EC50 değeri 14.7 μ M olarak hesaplanmıştır.

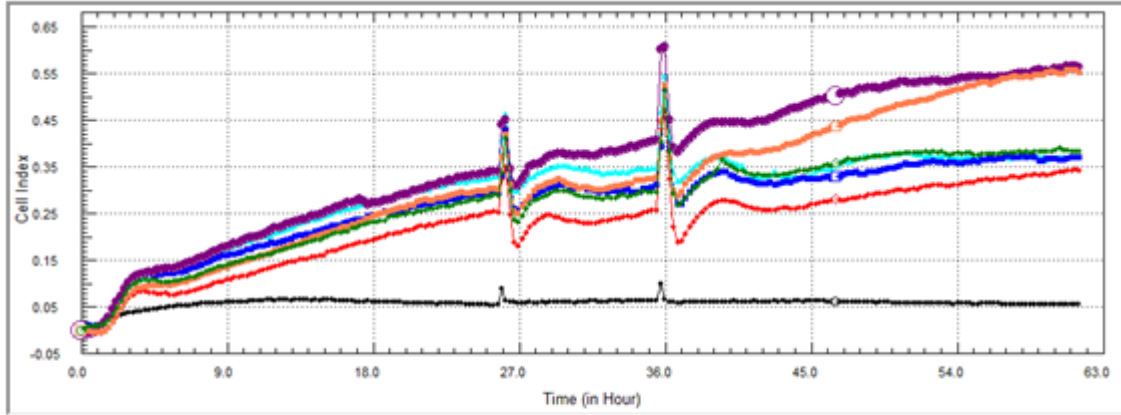


Şekil 4.10. Amiloid beta agregatı ile oluşturulan toksisiteden sonra shogaol uygulamasının 24. Saattinde hücre indeksindeki değişiklikler

Amiloid beta agregatı uygulanması ile hücre indeksinde kontrole göre belirgin bir düşüş gözlemlendi. Shogaol uygulamasından sonra 24. saatte shogaolün 1 μ M'dan sonra hücre indeksini doza bağımlı olarak düşürdüğü görüldü. Shogaolün düşük dozlarında hücre indeksini artırıcı etkisi ise her doz için ferulik asitten düşük bulundu.

4.2. AMYLOİD BETA OLİGOMERLERİNİN HÜCRELERE UYGULANMASINDAN SONRA GİNGEROL SHOGOALÜN ETKİSİ

4.2.1. HÜCRELER ÜZERİNDE AMYLOİD BETA TOKSİSİTESİ OLUŞTURULMADAN GİNGEROL ÜN ETKİSİ



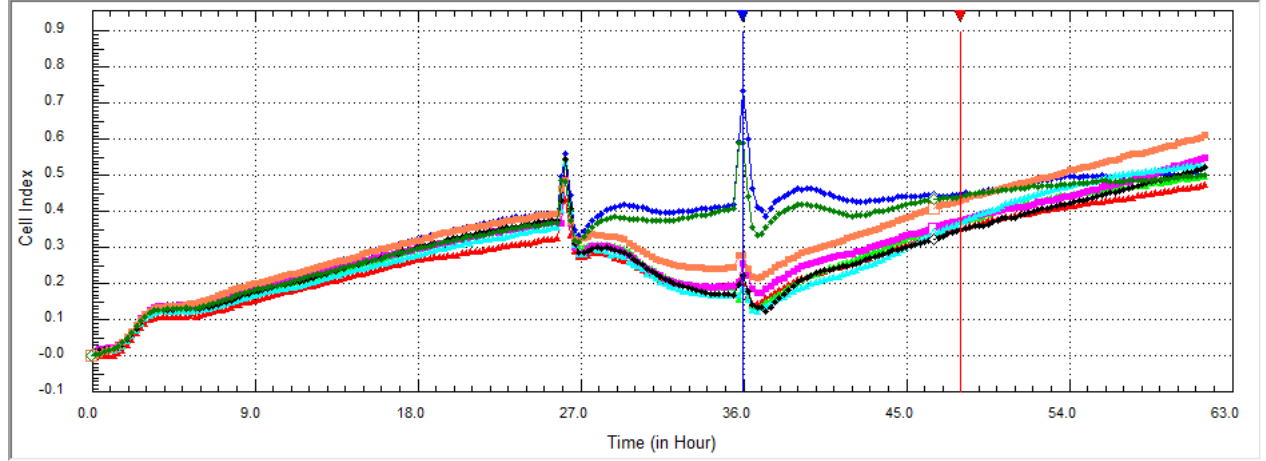
BESİYERİ GİNGEROL 2 GİNGEROL 5
FERULİK ASİT GİNGEROL 3
GİNGEROL 1 GİNGEROL 4

(Gingerol 1 0.01 μ M; Gingerol 2 0.1 μ M; Gingerol 3 1 μ M; Gingerol 4 10 μ M; Gingerol 5 100 μ M)

Şekil 4.11. Amyloid beta oligomeri uygulanmadan hücreler üzerine gingerol dozlarının etkisi

Amiloid beta oligomeri ile toksisite oluşturulmadan önce gingerolün hücreler üzerindeki etkileri incelendiğinde gingerolün her dozda feruli asite kıyasla hücre indeksini daha fazla artırdığı ve etkisinin hemen hemen doza bağımlı bir etkie sahip olduğu gözlemlendi.

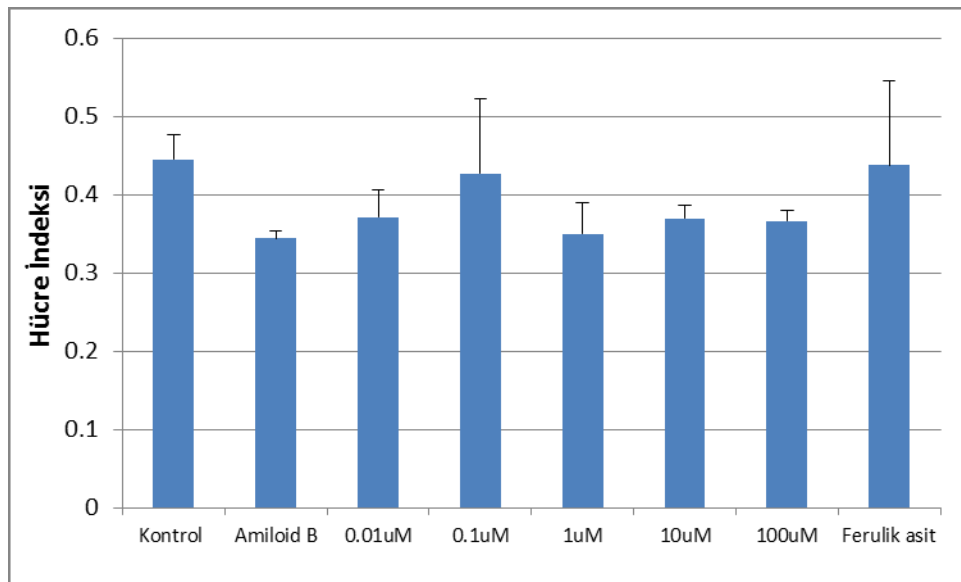
4.2.2. HÜCRELER ÜZERİNDE AMYLOİD BETA TOKSİSİTESİ OLUŞTURULDUKTAN SONRA GİNGEROLÜN ETKİSİ



(Gingerol 1 0.01 μ M; Gingerol 2 0.1 μ M; Gingerol 3 1 μ M; Gingerol 4 10 μ M; Gingerol 5 100 μ M)

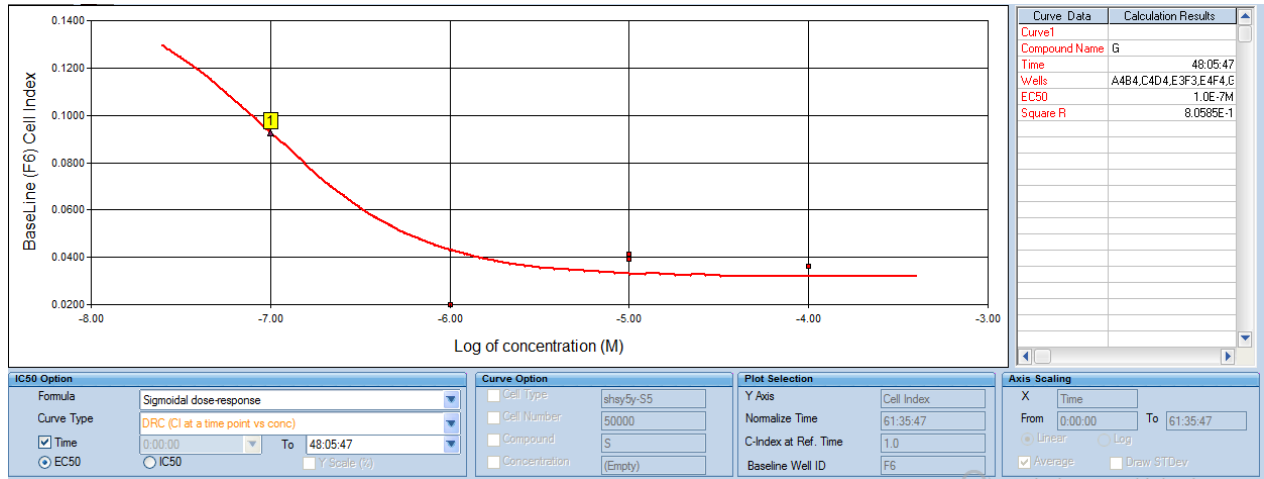
Şekil 4.12. Amyloid beta oligomeri ile oluşturulan toksisiteden sonra hücreler üzerine gingerol dozlarının etkisi

Amyloid beta oligomerleri ile toksisite oluşturduktan sonra gingerol uygulanması durumunda gingerolün hücre indeksini önemli derecede artırdığı ve toksisiteden koruduğu ve gingerolün en son iki dozunda ferulik asitten daha etkili olduğu bulundu.



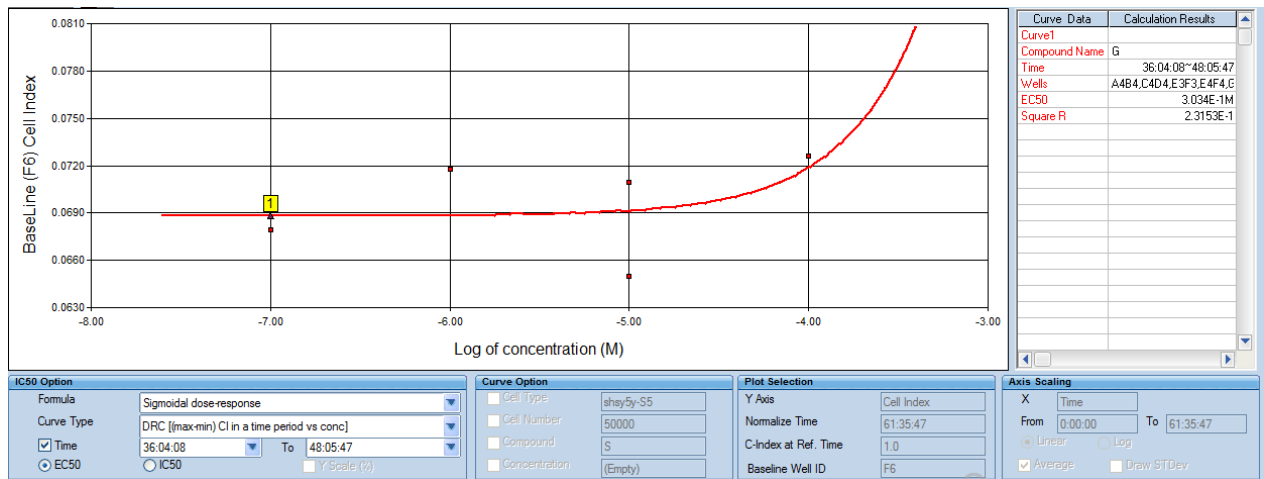
Şekil 4.13. Amyloid beta oligomeri ile oluşturulan toksisiteden sonra gingerol uygulamasının 24. Saatinde hücre indeksindeki değişiklikler

Amiloid beta oligomeri uygulanması ile hücre indeksinde kontrole göre belirgin bir düşüş gözlemlendi. Gingerol uygulamasından sonra 24. saatte gingerolün uygulanan bütün dozlarının hücre indeksini artırdığı gözlemlendi. Fakat hem ferulik asitteki hemde ginderoldaki artış oligomerin oluşturduğu toksisiteyi geriye döndürecek kadar kuvvetli değildir. Bu yüzden istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 4.14. .Gingerol için Amiloid beta oligomeri ile oluşturulan toksisiteden sonra 24. Saatteki sigmoidal doz-cevap eğrisi

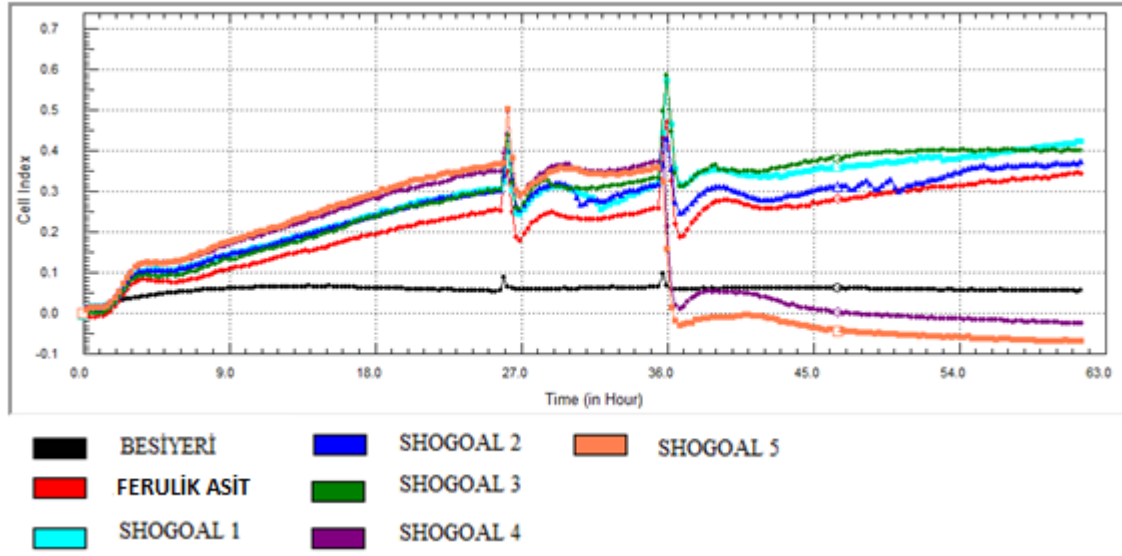
Amiloid beta oligomeri ile toksisite oluşturulduktan sonra 24. Saatte gingerolün doz yanıt eğrisi üzerinde EC50 değeri $0.1\mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.15. Gingerol için Amiloid beta oligomeri ile oluşturulan toksisiteden sonra 24 saatlik zaman dilimindeki sigmoidal doz-cevap eğrisi

Amiloid beta oligomeri ile toksisite oluşturulduktan sonra 24 saatlik zaman dilimindeki gingerolün doz yanıt eğrisi üzerinde EC50 değeri 0.1 M olarak hesaplanmıştır.

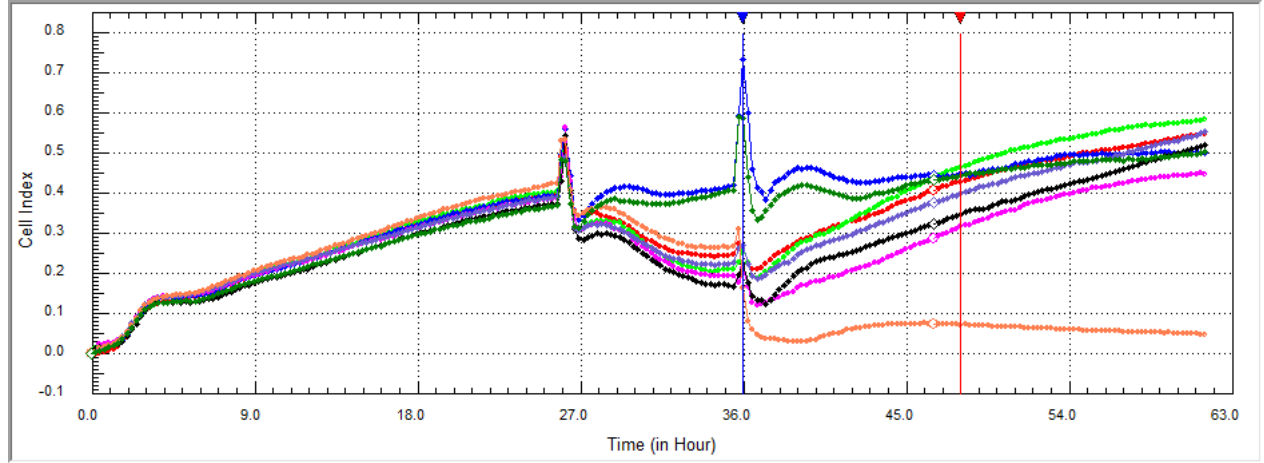
4.2.3. HÜCRELER ÜZERİNDE AMYLOİD BETA TOKSİSİTESİ OLUŞTURULMADAN SHOGOALÜN ETKİŐİ



(Shogoal 1 0.01 μ M; Shogoal 2 0.1 μ M; Shogoal 3 μ M; Shogoal 4 10 μ M; Shogoal 5 100 μ M)
Şekil 4.16. Amyloid beta oligomeri uygulanmadan hücreler üzerine shogoal dozlarının etkisi

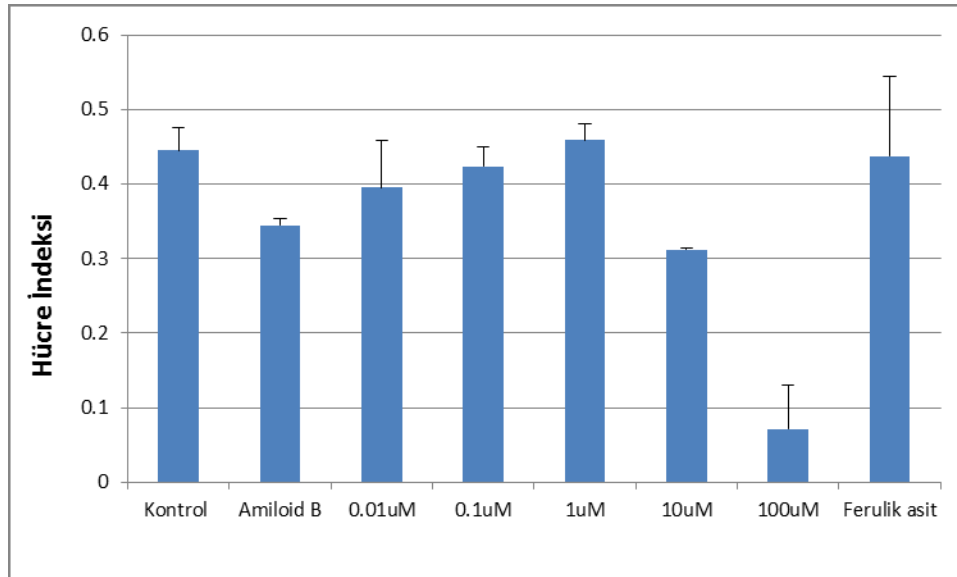
Amiloid beta oligomeri ile toksisite oluşturulmadan shogaolün hücre indeksinde oluşan değışiklikler incelendiğinde shogaolün düşük dozlarada cell indeksi artırdığı hatta bu etkilerinin ferulik asitten daha iyi olduğu ancak yüksek dozlarda toksisite gösterdiği gözlenmiştir.

4.2.4. HÜCRELER ÜZERİNDE AMYLOİD BETA TOKSİSİTESİ OLUŞTURULDUKTAN SONRA SHOGAOLÜN ETKİSİ



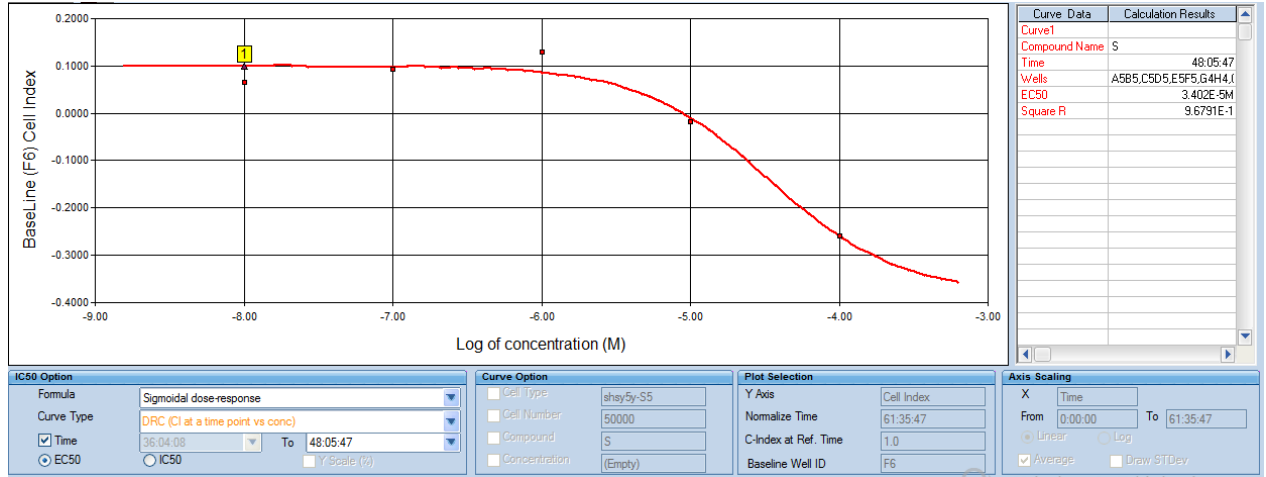
(Shogol 1 0.01 μ M; Shogol 2 0.1 μ M; Shogol 3 μ M; Shogol 4 10 μ M; Shogol 5 100 μ M)
Şekil 4.17. Amyloid beta oligomeri ile oluşturulan toksisiteden sonra hücreler üzerine shogol dozlarının etkisi

Amiloid beta oligomerleri ile oluşturulan toksisitede shogaolün etkileri incelendiğinde hücre indeksini 0.01 ve 0.1 μ M dozlarda artırdığı 1 μ M ve daha yüksek dozlarda ise shogaolün kendisinin toksisite gösterdiği bulundu.



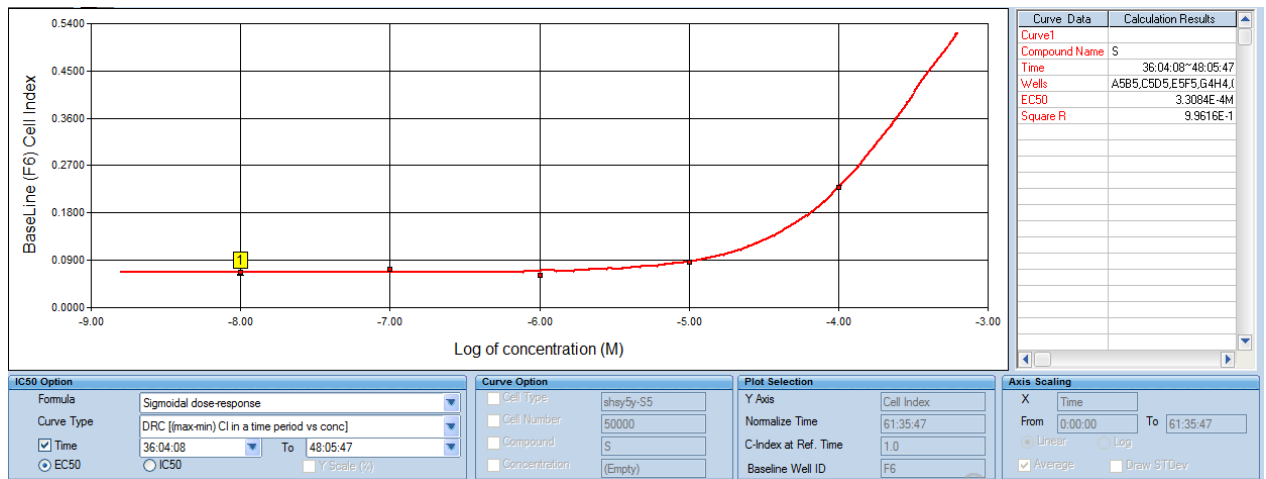
Şekil 4.18. Amiloid beta oligomeri ile oluşturulan toksisiteden sonra shogaol uygulamasının 24. Saattinde hücre indeksindeki değişiklikler

Amiloid beta oligomeri uygulanması ile hücre indeksinde kontrole göre belirgin bir düşüş gözlemlendi. Shogaol uygulamasından sonra 24. saatte shogaolün 1 μ M'dan sonra hücre indeksini doza bağımlı olarak düşürdüğü görüldü. Shogaolün düşük dozlarında hücre indeksini artırıcı etkisi ise her doz için ferulik asitten düşük bulundu.



Şekil 4.19. Shogaol için Amiloid beta oligomer ile oluşturulan toksisiteden sonra 24. Saatteki sigmoidal doz-cevap eğrisi

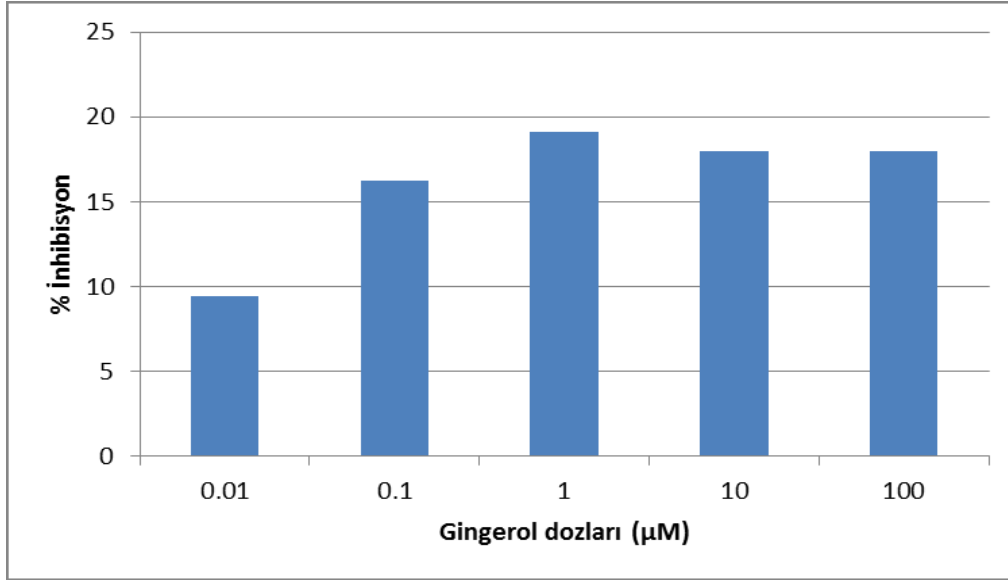
Amiloid beta oligomer ile toksisite oluşturulduktan sonra 24. Saatte shogaol doz yanıt eğrisi üzerinde EC50 değeri 34 μ M olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.20. Shogaol için Amiloid beta oligomer ile oluşturulan toksisiteden sonra 24 saatlik zaman dilimindeki sigmoidal doz-cevap eğrisi

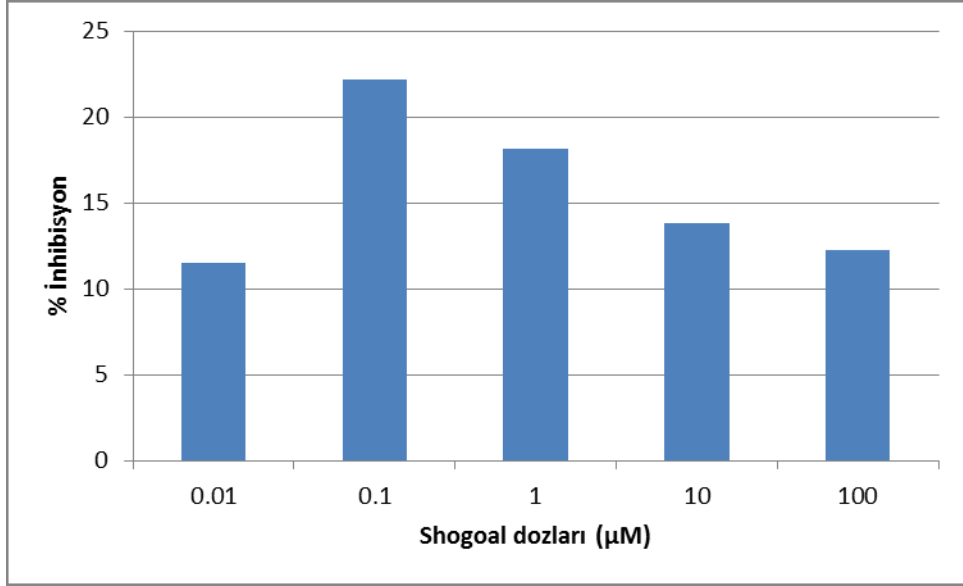
Amiloid beta oligomer ile toksisite oluşturulduktan sonra 24 saatlik zaman dilimindeki shogaol doz yanıt eğrisi üzerinde EC50 330μM değeri olarak hesaplanmıştır.

4.3. GSK-3β inhibisyonunun değerlendirilmesi



şekil 4.21. Gingerolün doza bağımlı % inhibisyonu

GSK-3β enziminin aktivitesi üzerine gingeroln etkileri incelendiğinde gingerolün doza bağımlı olarak enzimi inhibe ettiği gōzlendi.



Şekil 4.22. Shogaolün doza bağımlı % inhibisyonu

GSK-3 β enziminin aktivitesi üzerine shogaolün etkileri incelendiğinde shogaolün 0.1 μ M’lık dozunda en yüksek inhibisyona sahip olduğu sonrasında doza bağımlı olarak inhibisyonun azaldığı gözlemlendi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzün en yaygın hastalıklarından biri olan Alzheimer patolojisinde önemli bir rolü olan amiloid beta toksisitesinden korunmada bu zamana kadar birçok sentetik ve doğal bileşiğin etkinliği (Rhein V 2010-33), denenmiş ve birçok mekanizma üzerinden amiloid beta toksisitesi aydınlatılmaya çalışılmıştır. Amiloid beta toksisitesinde daha önce bulunan enflamatuar teori, oksidatif stress teorisi vb teorilere ek olara son zamanlarda yapılan çalışmalar GSK-3 β enziminin önemli bir role sahip olabileceğini göstermiştir (Koh Seong-Ho, 2008 34).

Yapılan çalışmalar GSK-3 β enzim inhibisyonunun nörodejeneratif hastalıklarda koruyucu rolünün olabileceğini göstermiştir. Bu nedenle son yıllarda bu enzimin inhibisyonu üzerinden koruyucu etkiye sahip olabilecek sentetik ve doğal bileşikler bulunmaya çalışılmıştır(35). Söz konusu enzim üzerinde inhibitör etkinlik göstererek amiloid beta toksisitesinde korunmada denenen bazı bitkisel ekstrakter ve saf maddelerin hücreler üzerinde koruyucu etkiye sahip oldukları gösterilmiştir(36). Saf maddelerde ferulik asidin amiloid beta toksisitesi üzerinde koruyucu etkileri tanımlanmıştır. Yapıca ferulik aside benzeyen ve Zingiber officinale (zencefil) bitkisinde yoğun bir şekilde bulunan gingerol ve shogaol saf maddelerinin amiloid beta toksisitesi üzerindeki koruyucu etkilerini gösteren ve bu maddelerin GSK-3 β enzimi inhibisyonu yapıp yapmadığına dair literatürde herhangi bir bilgiye rastlanamamıştır. O nedenle çalışmamızda hem amiloid beta agregatları hemde oligomerleri ile oluşturulan toksisitede gingerol ve shogaolün SHSY-5Y nöroblastoma hücreleri üzerine hücre proliferasyonu üzerine etkileri araştırılmış hem de bu maddelerin GSK-3 β enzim inhibitörü olup olmadıkları belirlenerek hücrelerdeki koruyucu etkilerinin enzim inhibisyonu ile ilişkili olup olmadığı aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Gerçekleştirilen deneyler sonucunda gingerolün kullanılan her dozunda hücre indeksini hem amiloid beta toksisitesi oluşturulan hem de oluşturulmayan hücrelerde artırdığı, diğer bir ifade ile hücre proliferasyonunu desteklediği, shogaolün ise düşük dozlarda hücre indeksini artırdığı ancak yüksek dozlarda toksik etkiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

GSK-3 β enzimi üzerindeki inhibitör etkileri incelendiğinde ise gingerolün doza bağımlı olarak enzimi %20'lere kadar inhibe ettiği, shogaolün ise 0.1 μ M'lık dozunda en yüksek inhibisyona sahip olduğu ancak bundan daha yüksek dozlarda enzim üzerindeki inhibitör etkisinin doza bağımlı olarak giderek azaldığı sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlar hücre indeksi sonuçları ile de paralellik göstermektedir. Şöyle ki, enzim inhibisyonunun yüksek olduğu konsantrasyonlarda hücre indeksi artmış yani maddelerin hücreler üzerindeki koruyucu etkileri artmış, inhibisyonun az olduğu dozlarda ise hücrelerdeki koruyucu etkinlik azalmış hatta shogaolün yüksek dozlarında toksisiteye neden oldukları gözlenmiştir. Ayrıca gingerolün bütün dozları için shogaolün de düşük dozları için hem hücre indeksinde hem de enzim inhibisyonunda ferulik ssitten daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 1991; 82: 239-59.
2. Bennett DA, Schneider JA, Wilson RS, et al. Neurofibrillary tangles mediate the association of amyloid load with clinical Alzheimer disease and level of cognitive function. *Arch Neurol* 2004; 61: 378.
3. Tanzi RE. Tangles and neurodegenerative disease a surprising twist. *N Engl J Med* 2005; 353:1853.
4. Santacruz K, Lewis J, Spires T, et al. Tau suppression in a neurodegenerative Mouse model improves memory function. *Science* 2005; 309: 476.
5. Spillantini MG, Murrell JR, Goedert M, et al. Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 7737-41.
6. Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 120: 885-90.
7. Masters CL, Simms G, Weinman NA, et al. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 4245-9.
8. Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, et al. Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron* 1994; 13: 45-53.
9. Cummings JL. Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2004; 351: 56.
10. Georganopoulou DG, Chang L, Nam JM, et al. Nanoparticle-based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 2273
11. Keln WL, Kraft GA, Finch CE. Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum *Trends Neu rosci* 2001; 24: 219.
12. Gandy S. The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J Clin Invest* 2005; 115: 1121
13. Keln WL, Kraft GA, Finch CE. Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neu- rosci* 2001; 24: 219. Gandy S. The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J Clin Invest* 2005; 115: 1121

14. Citron M, Oltersdorf T, Haass C, et al. Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 1992; 360: 672-4.
15. Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, et al. An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science* 1994; 264:1336-40
16. Grvit H. Sinir Sisteminin Dejeneratif Hastalıkları. Demans Sendromu, Alzheimer Hastalığı ve Alzheimer dışı demanslar. In: Öge AE; eds. Nöroloji. İstanbul: Nobel Matbaacılık; 2004: 367-415.
17. Markesbery WR, Kryscio RJ, Lovell MA et al. Lipid peroxidation is an early event in the brain in amnesic mild cognitive impairment. *Ann Neurol* 2005; 58: 730.
18. Goedert M, Spillantini MG. A century of Alzheimer's Disease. *Science*. 2006; 314: 777-781.
19. Price JL, Morris JC. Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1999; 45: 358-68.
20. Akiyama H, Barger S, Barnum S, et al. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2000; 21: 383-421.
21. Choi C, Park JY, Lee J et al. Fas ligand and fas are expressed constitutively in human astrocytes and the expression increases with IL-1, IL-6, TNF- α , or IFN- γ . *J Immunol* 1999; 162: 1889-1895.
22. Genç Ş, Kızıldağ S, Genç K. İnflamatuvar uyaranların mikrogial TRAIL ekspresyonu üzerine etkisi. *Geriatri* 2002; 5: 44-48,.
23. Marin DB, Sewell MC, Schlechter A. Alzheimer's disease: accurate and early diagnosis in the primary care setting. *Geriatrics* 2002; 57: 36-40.
24. Mintun MA, Larossa GN, Sheline YI, et al. [¹¹C]PIB in a nondemented population: potential antecedent marker of Alzheimer disease. *Neurology* 2006; 67: 446-52.
25. Luchsinger JA, Tang MX, Stern Y, et al. Diabetes mellitus and risk of Alzheimer's disease and dementia with stroke in a multiethnic cohort. *Am J Epidemiol* 2001; 154: 635-41.
26. Luchsinger JA, Tang MX, Shea S, et al. Antioxidant vitamin intake and risk of Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2003; 60: 203-8.
27. Black SE, Patterson C, Feightner J. Preventing dementia. *Can J Neurol Sci* 2001; 28 Suppl 1: 56-66.

28. Wu D, Pan W. GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling. *Trends Biochem Sci* 2010;35:161-168.
29. Doble BW, Woodgett JR. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci* 2003;116:1175-1186.
30. Verheyen EM, Gottardi CJ. Regulation of Wnt/beta- catenin signaling by protein kinases. *Dev Dyn* 2010; 239: 34-44.
31. Hofmann C, Dunger N, Schölmerich J, Falk W, Obermeier F. Glycogen synthase kinase 3- β : a master regulator of toll-like receptor-mediated chronic intestinal inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2010;16:1850-1858.
32. Boonen RA, van Tijn P, Zivkovic D. Wnt signaling in Alzheimer's disease: up or down, that is the question. *Ageing Res Rev* 2009;8:71-82.
33. Rhein V, Giese M, Baysang G, Meler F, Rao S, Schulz K L, Hamburger M, Eckert A, Ginkgo Biloba Extract Ameliorates Oxidative Phosphorylation performance and rescues AB- induced failure. *Plos One* August 2010 volume 5 issue 8
34. Koh S, Noh M Y, Kim S H, Amyloid beta induced neurotoxicity is reduced by inhibition of glycogen synthase kinase-3, *Brain research* 2008;1188:254-262
35. Meijer L, Flajolet M, Greengard P, Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3, *Trends in Pharmacological Sciences* Vol.25 no:9 september 2004
36. Zhou Y, Li W, Xu I, Chen L, In salvia miltiorrhiza, phenolic acids possess protective properties against amyloid B-induced cytotoxicity, and tanshinones act as acetylcholinesterase inhibitors; *Environmental toxicology and pharmacology* 2011;443-452

ÖZ GEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Mehmet Kaan Tiryaki
Uyruğu: Türkiye (TC)
Doğum Tarihi ve Yeri: 2 Mayıs 1987, Kırşehir
Medeni Durumu: Bekâr
Tel: +90 386 214 32 28
Fax: +90 386 214 32 28
email: eczmkt@gmail.com
Yazışma Adresi: Tiryaki Eczanesi
Ahi Evran Mah.
Yavuz Sultan Selim Bulvarı
Keleş Apt. No: 19/A
Kırşehir/ Merkez

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	EÜ Eczacılık Fakültesi	2010
Lise	H.F.E Anadolu Lisesi, Kırşehir	2005

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2011- Halen	Tiryaki Eczanesi	Sahip ve Mesul Müdürü
2010–2011	Kayseri Acıbadem Hastanesi	Sorumlu Eczacı

YABANCI DİL

İngilizce