**PROJE ANA ALANI:BİYOLOJİ**

**Proje Tematik Alanı:Sağlık Teknolojileri**

**Proje Adı:İN-VİTRO ALZHEİMER HASTALIĞI MODELİNDE MELATONİN VE SULFORAFAN UYGULAMASININ DOZA BAĞLI KORUYUCU ETKİSİ**

**ÖZET**

Demansın en yaygın şekli olarak karşımıza çıkan Alzheimer hastalığı bilişsel fonksiyon azalmasının görüldüğü ilerleyici bir nörodejenerasyon durumudur. Alzheimer hastalığına sebep olan nörodejenerasyonun sebebi tam olarak anlaşılamamış olsa da bir çok araştırmacı amiloid beta toksisitesinin hastalığın oluşumunda en etkili faktörlerden biri olduğu konusunda hemfikirdir. Yaşa bağlı demanstan farklı bir süreç olan Alzheimer hastalığı normal yaşlanmanın bir sonucu değildir. Beslenme ve düzenli uyku gibi hayat kalitesini artıran faktörler Alzheimer hastalığının gelişmesini önlemek açısından önemli adımlardır. Bizim çalışmamızda melatonin uygulamasının amiloid beta toksisitesine karşı oluşabilecek etkisinin değerlendirilmesi amaçlandı. Ayrıca daha önce koruyucu etkisi olduğu ileri sürülen sulforafan bileşiği ile birlikte melatonin uygulamasının nöron hücre canlılığı üzerine etkisi değerlendirildi. Bunlara ek olarak daha önce araştırılmamış olan sulforafan ve melatoninin agrege ve agrege olmayan formdaki amiloid beta protein uygulaması üzerine etkileri değerlendirildi. Deneyler sonunda, amiloid beta peptitleri agrege olmadan yani plak oluşturmadan düşük doz sulforafan ve melatoninin uygulamasının nöronlar için koruyucu olabileceği gösterildi.

Anahtar Kelimeler: demans ,Alzheimer ,melatonin, amiloid betasulforafan ,nörodejenerasyon.

**AMAÇ**

Bu projede melatonin uygulamasının amiloid beta toksisitesine karşı doza bağlı oluşabilecek etkisinin değerlendirmesi amaçlandı. Ayrıca daha önce koruyucu etkisi olduğu ileri sürülen sulforofan bileşiği ile melatoninin birlikte uygulanmasının nöron hücre canlılığı üzerine etkisi değerlendirildi. Bunlara ek olarak sulforafan ve melatoninin agrege ve agrege olmayan formdaki amiloid beta protein uygulaması üzerine etkileri doz bağımlı olarak belirlendi.

**GİRİŞ**

Ortalama yaşam süresi, artan yaşam kalitesi ve sağlık bakım başarısına bağlı olarak uzamaktadır. Dünya üzerinde daha fazla yaşlı nüfus bulunması, demans ve ilişkili hastalıkların görülme sıklığını ve bu hastalıklara karşı olan farkındalığı artırmıştır.

Alzheimer Hastalığı (AH), seçici bilişsel işlevlerin -özellikle belleğe bağlı olanlar- ilerleyici kaybı ile karakterizedir [1]. Yaşa bağlı demansın en yaygın biçimi olarak karşımıza çıkan AH, dünya çapında 24 milyon insanı etkilemektedir ve bu sayının 2050 yılına kadar dört katına çıkacağı tahmin edilmektedir [2]. Alzheimer hastalığını yalnızca bunu yaşayan insanlar için değil aynı zamanda aileleri, bu kişilere bakım veren diğer insanlar ve genel olarak toplum içinde fiziksel, psikolojik sosyal ve ekonomik etkilere sahiptir. AH vakalarının büyük çoğunluğu (>%95) sporadiktir. İleri yaşla beraber apolipoprotein E4 (ApoE4) polimorfizmi, hipertansiyon, kalp hastalığı ve diyabet, AH gelişiminde ana risk faktörlerini oluşturur [3]. Hastalık mikroskopik düzeyde, β-amiloid peptitten (Aβ) şekillenen senil plaklar (SP) ve hiperfosforile tau kaynaklı nörofibriler yumaklar (NFY) ile karakterizedir [4].

Dejenerasyon sürecinde hasta beyinleri, sinaptik kayıp, bozulmuş nörotransmisyon ve azalmış metabolizmayı içeren bir takım morfolojik ve fonksiyonel değişikliklere uğrar.

Gerçekleşen bu değişikliklerin hepsi nöronal ölüme katkıda bulunur [3]. Hastalığın multifaktöriyel olması, AH patogenezinin tam olarak açıklanmasını güçleştirmektedir. Alzheimer hastalığına sebep olan noörodejenerasyonun sebebi tam olarak anlaşılamamış olsa da birçok araştırmacı **amiloid beta toksisitesinin** Alzheimer hastalığı oluşumunda en etkili faktörlerden biri olduğu konusunda hemfikirdir.(3)

Amiloid proteinler nöron hücre membranı üzerine yerleşmiş amiloid prekürsör protein (APP)’den, sekretaz ismi verilen özel bir enzim grubu tarafından oluştururlar. Hücreler arası boşlukta oluşan amiloid beta proteinler öncelikle monomer yapıdayken, zaman içerisinde monomer yapıdaki proteinler bir araya gelip birleşerek agrege olurlar . Öncelikle oligomerleri, daha sonra fibriler proteinleri ve en son Alzheimer Hastalığının tanı koydurucu bulgusu olan amiloid plakları oluştururlar.

Diagram

Description automatically generated *Şekil 1 Amiloid Beta proteinlerinlerin hücreler arası boşlukta amiloid plakları oluşturma süreci*

Sekretazlar tarafından amiloid öncü proteinin (APP) bölünmesi γ- sekretazın bölünme yerine bağlı olarak farklı kısa (39-40 amino asit) veya uzun (42-43 amino asit) AB fragmanları oluşturulabilir. aktif. Uzun AB çözünmeyen liflerin oluşma ve nörotoksik olma olasılığı daha yüksektir. AB fragmanı 1-40, 40 amino asit kalıntısından oluşan en yaygın (>%60-70) AB fragmanıdır ve su ve sıvı ortamda nispeten çözünür. İkinci en yaygın (~%15) biçim, AB1-42 olarak adlandırılan 42 amino asit kalıntısının tümünü içeren biçimdir.

AB 25-35 fragmanı, 42 amino asit AB peptidinin hidrofobik fonksiyonel alanına lokalize edilmiş bir 11 amino asit C terminal peptididir. Fibriler ve toksik bir parçadır. Şekil 2’de amiloidojenik ya da amiloidojenik olmayan APP’den farklı sekretaz enzimleri ile amiloid proteinlerin oluşumu görülmektedir.

Timeline

Description automatically generated

***Şekil 2*** *Sekretazlar tarafından amiloid öncü proteinin (APP) bölünmesi . Sol tarafta mavi ile işaretlenen kısımda normal fizyolojik yolak görünürken, sağ tarafta AH’da gözlenen amiloid beta proteinlerin oluştuğu yolak görünmektedir. Solda alfa sekretazlarla oluşan proteinler suda çözünür ve çökelme yapmaz. Ancak sağdaki pembe işaretli yolakta beta ve gama sekretaz ile oluşturulan amiloid beta suda kolay çözünmez ve birikme eğilimi gösterir.*

Diagram

Description automatically generated

***Şekil 3 AH’da Amiloid beta proteinlerin nöronların etrafında birikerek, nöron uzantılarını sarması*** *AH’da aynı zamanda nöron sitoplazmasında oluşan nörofibriler iplikçikler de tipik bir patolojik bulgudur. Nöronlardaki bu değişimler zaman içerisinde nörodejenerasyon oluşumunu tetikler ve nöronlar giderek yok olmaya başlar.*

***Deneysel Alzheimer Hastalığı modeli olarak*** *AB 25-35 fragmanı, AH oluşum mekanizmalarıyla ilişkili hayvan deneyleri veya hücre hatları kullanılarak oluşturulmuş deneysel modeller için uygun bir araç olarak sıklıkla kullanılır.*

**Alzheimer Beslenme İlişkisi ve Sulforafan**

Alzheimer hastalığı normal yaşlanmanın bir sonucu değildir.(6)Demansların %40’ı henüz oluşmadan engellenebilir.(7)Beslenme ve uyku bu hastalığın önlenmesi için önemli adımlar arasında yer almaktadır. Öncelikle nasıl beslenmeliyiz?

1.Akdeniz diyeti:  ağırlıklı olarak sebze, meyve, yeşillik, zeytinyağı ve balık ağırlıklı bir beslenme şeklidir

2.DASH(Hipertansiyon diyeti ): Yüksek tansiyonun tedavi edilmesine yardımcı olmak için uygulanan bir diyet türüdür. DASH (Dietary Aproaches to Stop Hypertension)

Diyetinin temel ilkeleri sodyumu düşük düzeyde tutup; toplam yağ, basit şeker, kolesterol ve doymuş yağ asitlerinden fakir; protein, posa, potasyum, magnezyum, kalsiyumdan zengin diyet örüntüsü oluşturmaktır. Diyetin sebze-meyve, tam tahıl, yağlı tohum, kurubaklagil, kümes hayvanı ve balıktan zengin; kırmızı et, işlenmiş et ürünü, rafine karbonhidrat, şekerli içeceklerden, paketli ürünlerden fakir olması gerekmektedir.

3.MIND(Akdeniz diyeti+DASH): MIND diyeti, Akdeniz ve DASH beslenme alışkanlıklarının bir kombinasyonu olup geleneksel akdeniz diyetinde yer alan tahıllar, baklagiller, sebzeler, meyve, fındık ve balık dahil olmak üzere minimum düzeyde işlenmiş gıdalardan oluşur. Chicago’daki Rush Üniversitesi Tıp Merkezi ve Bostan’daki Harvard Halk Sağlığı Okulu’ndaki araştırmacılar 20 yılı aşkın araştırmaları sonucu elde ettikleri veriler ile bu diyet modellerinin Alzheimer hastalığı geliştirme riskini önemli ölçüde azaltma potansiyeline sahip olabileceğini belirtiyor.

Turpgillerden elde edilen güçlü bir diyet biyoaktif ajanı olan sülforafan, hastalıkların önlenmesi ve tedavisindeki etkileri nedeniyle kapsamlı bir şekilde incelenmiştir.Son zamanlarda özellikle brokoli gibi yeşil renkli sebzelerde yer alan sülforafanın beyin sağlığı üzerindeki olası koruyucu etkileri özellikle Alzheimer hastalığı (AH), Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı, amyotrofik lateral skleroz, multipl skleroz, otizm spektrum bozukluğu ve şizofreni dahil olmak üzere çeşitli nörolojik hastalıklar için tartışılmakatadır.

Klinik öncesi kanıtlardaki artış tutarlı bir şekilde sülforafanın AH patofizyolojisi üzerinde çok yönlü bir nöroprotektif etkiye sahip olduğu yönünde umutları artırmaktadır. Hücre kültürü ve hayvan deneylerinde görülen anti-AH benzeri sülforafan kanıtı, AH ön- semptomatik popülasyonlarda ilgili biyobelirteçler için sülforafan araştırmasının sürdürülmesi gerektiğini gösterir.

**Alzheimer Hastalığı, Uyku ve Melatonin**

Alzheimer uyku ilişkisi de Alzheimer’ın engellenmesinde önemli bir adımdır.Uyku sırasında beynimizi toksinlerden arındıran mikroglia (çöpçü hücreler)oldukça aktif çalışırlar.Uyku sırasında beyinde aktifleşen bir diğer drenaj sistemi de gilenfatik sistemdir. Beyindeki kan damarlarının etrafını saran eritrositlerin hücre ile beyindeki sıvı kaynakları arasında köprü oluşturması sonucunda oluşan pompalama sistemi sayesinde, beyin dokusundaki sıvı ve biriken zararlı maddeler özel kanalcıklar üzerinden basınçla damarın içine püskürtülerek beyinden uzaklaştırılır. Toksik maddelerin birikimi ile tetiklenen Alzheimer ve benzeri hastalıklar için çok önemli olduğu bilinen bu sistem, özellikle uyku sırasında çalışarak beyinde istenmeyen maddelerin birikimini engeller. uzaklaştırır. Yetersiz uyku bu toksinlerin beyinde birikimini tetikleyerek nörodejeneratif hastalıkların gelişimine zemin hazırlar.

Uyku süresi yetersiz kaldığında beyin toksinlerden yeterince arınmayarak Alzheimer dahil demansın tüm türlerine karşı risk artar. Uykunun en derin fazı olan REM evresinde geçirdiğimiz sürenin yüzdesi her bir puan azaldığında demans gelişme riski %9 artar.(7)

Melatonin, insan vücudunda doğal olarak bulunan ve uyku-uyanıklık döngüsünü düzenleyen bir hormondur. Beynin hemen altında bulunan pineal bez ya da diğer adıyla epifiz bezi tarafından salınır.(9Melatonin salgısının hücrelerdeki programlı hücre ölümü (apoptozis) mekanizmasını baskıladığı da bilinmektedir. Bu sayede, başta sinir sisteminin temel hücresel elemanı olan nöronlar olmak üzere, vücut için büyük öneme sahip hassas hücrelerin ömrünün uzaması ve kaybının önlenmesi sağlanır.

Melatoninin, Alzheimer hastalığının temel bulgularından biri olan amiloid beta toksisitesi üzerine etkisi henüz net olarak bilinmemektedir. Literatür taramımıza göre melatonin ve sulforafan varlığının birlikte, amiloid beta toksisitesine karşı etkisi henüz gösterilmemiştir.

**Projenin temel araştırma soruları** :

* Melatonin varlığı nöronları amiloid beta toksisitesine karşı ölümden korur mu?
* Sulforafan varlığı bu koruyucu etkiyi artırır mı? şeklinde özetlenebilir.

**Projede öne sürülen hipotezler:**

Bu çalışmada yukarıda sunduğumuz bilgiler ve yaptığımız literatür araştırmalarına göre aşağıda belirtilen hipotezler ileri sürülmüştür.

H1 . Sulforafan uygulaması nöronal hücreleri amiloid beta toksisitesine karşı korur

H2 . Melatonin uygulaması nöronal hücreleri amiloid beta toksisitesine karşı korur

H3. Sulforafan ve melatoninin birlikte uygulanması, ayrı ayrı uygulanmalarına göre koruyucu etkilerini artırır.

Bu çalışmada yukarıda belirtilen hipotezlerin geçerliliğini değerlendirmek için proje planlandı.

**2. MATERYALLER**

**2.1 Materyaller**

|  |  |
| --- | --- |
| **CİHAZ ADI** | **MODEL- KOD** |
| Laminer-air flow | Holten Lamin Air Biosafe 1.2 |
| Karbondioksit inkübatörü | Nuaire Us Autoflow NU-4750 |
| Ters-faz ışık mikroskobu | Nikon Eclipse TS-100 |
| Santrifüj | Eppendorf 5810 R |
| Derin dondurucu (-80°C) | Thermo Forma Model 705 |
| Plak okuyucu | BioTek ELX 800 |
| Otoklav | Hirayama HICLAVE HV-50 |

|  |  |
| --- | --- |
| Hassas terazi | Precisa XB 220 A |
| Saf su cihazı | Milipore Mili-Q ZLX55003Y |

**Tablo 2 : Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **KİMYASAL MALZEME ADI** | | **ÜRETİCİ FİRMA-KOD** |
| Ultra saf su | | Biochrom L0020 |
| Fetal sığır serumu (FBS) | | Biochrom S01115 |
| Donör at serum (DHS) | | Biochrom S9133 |
| Sığır serum albumin (BSA) | | Thermo 23209 |
| Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium  (DMEM) | | Sigma D 5796 |
| Poli D Lizin | | Sigma P1149 |
| PBS (phosphate buffered saline) | | Biochrom L1815 |
| MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-  diphenyl-2H-tetrazolium bromide) | Applichem A2231,0001 | |
| Amiloid beta fragman 25-35 | Sigma A(değişçek) | |
| DMSO (Dimetil sülfoksid) | Sigma D2650 | |
| Tripsin-EDTA | Biochrom L2143 | |

|  |  |
| --- | --- |
| Penisilin/Streptomisin | Biochrom A2210 |
| Triton X-100 | Sigma T 8787 | |
| Melatonin | Sigma m5250 | |
| Sulforofan | Sigma s6317 | |



*Amiloid Beta 25-35 sigma*



*SHSY -5Y Hücre Hattı*

*(insan neuroblastoma hücre hattıdır)*

*L-Sulforaphane Catalog Number S6317 Storage Temperature –20 °C CAS RN: 142825-10-3 Synonyms: (R)-1-Isothiocyanato-4-(methylsulfinyl)- butane H3C S NCS O Product Description Molecular Formula: C6H11NOS2 Molecular Weight: 177.29 Appearance: light yellow oil.*

*Melatonin Sigma m5250*

*Melatonin Sigma m5250*

**2.2 Yöntemler**

**2.2.1 Hücre Kültürü Yöntemi**

A picture containing text, indoor, cluttered

Description automatically generated **A picture containing text

Description automatically generated**

**SHSY-5Y İnsan nöroblastoma hücre hattı:** Esas olarak sempatik sinir sistemi ve adrenalbezin medullasında bulunan embriyonik nöral krestten kaynaklanan primitif, pluripotent sempatik hücrelerden köken alan insan nöroblastoma hücre hattıdır.

SHSY-5Y hücreleri için çoğaltılması amacı ile %17 FBS ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM ortamı kullanıldı. Deneylere geçmeden önce hücreler %70-80 sıklıkta oluncaya kadar hücre sayısının iki katına çıkma süresine göre (katlanma zamanı) ~ 2-3 günde bir %17 serum içeren kültür ortamları ile beslenerek nemli atmosfer ve %5 CO2 basıncı altında 37 °C ’de inkübatör içinde tutuldu. SHSY-5Y hücreleri

%70-80 sıklıkta olunca pasajlanarak deneyler için uygun 96 ’lı/6 ’lı hücre kültür kaplarına her kuyucukta 1-2x104 veya 1-2x106 yoğunluğunda hücre sayısı olacak şekilde ekildi. İlk 18-24 saat boyunca hücreler plak yüzeyine yapışabilmeleri için %17 serumlu ortam, nemli atmosfer, %5 CO2 basıncı altında 37 °C ’de tutulduktan sonra hücrelerin deneyler süresince çoğalmasını yavaşlatmak ve serumun içerebileceği koruyucu faktörlerin etkisinden kurtulmak amacı ile, kültür kapları içindeki ortamların yarısı çekilip atılarak (96 kuyucuklu kap için 1 mL, 6 kuyucuklu kap için 100 µL) aynı oranlarda %1.7 serum içeren ortamlar (deney koşuluna göre uygun konsantrasyonda hazırlanmış olan kimyasal solüsyonlar) ile değiştirildi.

**AB Peptit Toksisitesi**

*AB 25-35 peptit solüsyonunun hazırlanması:* Dengeli tuz çözeltisi içeren fosfat tamponu (PBS) ve DMSO kullanılarak AB stok solüsyonları hazırlandı, stok solüsyonlar tükeninceye kadar -20°C ’de saklandı. SHSY 5Y hücreleri için %1.7 serum içeren ortamlar ile seri seyreltmeler yapıldı. Uygun konsantrasyonlardaki solüsyonlar her deneyden önce taze olarak hazırlandı.

AB peptidinin yapılan ön deneyler ile kontrol grubuna göre ˜ %50 canlılığı azaltan konsantrasyonu toksisite uygulama dozu olarak belirlendi. SHSY5-Y hücreleri için sırası ile AB 25-35 (40 µM) konsantrasyonlarda uygulandı. AB direkt olarak ya da 48 saat inkübe edilip agrege edildikten sonra hücre kültür ortamına eklendi. Eklenen AB 25-35 peptiti 37ºC ’de hücreler ile 72 saat boyunca muamele edildi.

Amiloid beta nöronal toksisite modeli oluşturulurken stok solusyonunun hazırlanmasında kullanılan DMSO’nun hücrelere toksik etki oluşturmaması için son konsantrasyonu <%0.5 olacak şekilde hesaplanarak uygulandı.

#### Sulforofan ve Melatonin Uygulaması

Bizim çalışmamızda, SHSY-5Y hücreleri normal hücre kültür kabından kaldırılarak 96-kuyulu hücre kaplarına 5.000 hücre/kuyucuk yoğunlukta olacak şekilde ekildi. Bu kaplar için 200 μl besi ortamı hacmi kullanıldı. Ekilen hücreler, 24 saat 37°C sıcaklıkta ve %5 CO2 içeren inkübatörde tutularak plak yüzeylerine yapışmaları sağlandı. Daha sonra her bir kuyucuğa melatonin (1-100 uM), sulforafan (1,25-5 uM), Melatonin ve sulforafan ise AB proteini uygulamasından 24 saat önce (pre-treatment) hücrelere eklendi. Melatonin ve sulforafan ile ayrı ayrı ya da birlikte 24 saatlik ön uygulamadan sonra AB proteini (amiloid beta 25- 35 (40 uM)) konsantrasyonda hücrelere direkt olarak ve 48 saat 37°C de ön inkübasyona tutulduktan sonra eklendi.

**2.2.2 TERS FAZ IŞIK MİKROSKOBİK DEĞERLENDİRME**

A picture containing microscope, indoor, white, cluttered

Description automatically generated

*Nikon ECLIPSE TS100*

Amyloid beta , melatonin ve sulforofan uygulanan hücrelerin ışık mikroskobunda oluşan değişiklikleri takip edildi.

**2.2.3 MTT HÜCRE CANLILIK TESTİ**

**MTT** (3- (4,5-dimetiltiyazol-2-il) -2-5-difeniltetrazolyum bromür) **testi**, sitotoksisiteyi veya **hücre canlılığını** değerlendirmek için en sık kullanılan kolorimetrik testlerden biridir. Bu tahlil, temel olarak süksinat dehidrojenaz gibi mitokondriyal enzimlerin aktivitesini ölçer.

MTT Hücre CanlılıkTesti: 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) redüksiyonu yöntemiyle bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem sağlam hücrelerde mitokondrinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır.

Bu reaksiyon mitokondrial bir enzim olan süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağımlıdır. Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Plak kuyularına son konsantrasyon 0.5 mg/mL olacak şekilde MTT stok solüsyonu (5 mg/mL) eklenip, 37°C ’de %5 CO2, %95 hava içeren inkübatörde 3.5 saat (1-5 saat) bekletildi, 1250 rpm hızda 5 dakika santrifüj edildikten sonra üst faz atılarak MTT metabolizma ürünü olan formazan kristallerini solubilize duruma getirmek için tüm kuyulara 200 µL dimetil sülfoksit (DMSO) eklendi ve 37°C ’de 30 dakika bekletildi, ELİSA plak okuyucusunda 590 nm ’de absorbansları okutularak %canlılık hesaplandı.

aksesuar, kılıf içeren bir resim

Açıklama otomatik olarak oluşturuldu

PROJE İŞ-ZAMAN ÇİZELGESİ

Graphical user interface, application

Description automatically generated with medium confidence

**Verilerin Değerlendirilmesi**

SPSS programının 22.0 versiyonu kullanılarak araştırma sonuçlarının istatistik analizi yapıldı. Grafikler GraphPad programı kullanılarak çizildi. Deneyler en az beş kez tekrarlandı. Gruplar arasındaki fark Mann Whitney U testi kullanılarak değerlendirildi. p<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

**BULGULAR**

**Hücrelerin yapısal değişimi**

Deneyler sırasında Amiloid beta , melatonin ve sulforafan uygulanan hücrelerde oluşan değişiklikler ters faz ışık mikroskobu ile takip edildi. Aşağıda 72 saat melatonin (100uM), Sulforafan (5 uM) ve agrege edilmiş AB 25-35 (40 uM) birlikte ve ayrı ayrı uygulamasının SHSY-5Y hücreleri üzerinde oluşturduğu değişimler görülmektedir.

***MEL + SFN (20X)*  *SFN (20X)***

Shape

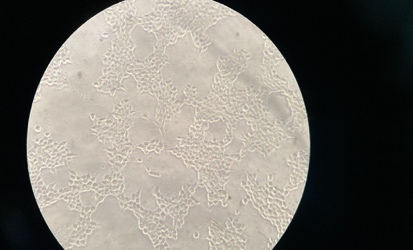
Description automatically generated



***MEL (20X)*  *AB+SFN+MEL(20X)***

A close up of the moon

Description automatically generated with medium confidence



***AB+SFN(20X) AB+MEL(20X)***

A picture containing shape

Description automatically generatedA close up of the moon

Description automatically generated with medium confidence

***AB(20X) Kontrol(20x)***

A picture containing shape

Description automatically generatedA close up of the moon

Description automatically generated with medium confidence

**Hücre canlılığın değerlendirilmesi**

**Nöronal Hücrelerde AB Peptid Toksisitesi**

SHSY-5Y hücrelerine AB 25-35 fragmanları önceden agregasyon ön işlemi yapılarak ya da yapılmadan uygulandı. Grafik 1 ve Grafik 5’de sırasıyla görülebileceği gibi , önceden agrege edilen ve edilmeyen 40 µM AB 25-35 fragmanları 72 saat boyunca hücrelere muamele edildikten sonra hücre canlılığını kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalttığı bulundu (p< 0.05 ).

1. **DENEYİN MTT SONUÇLARI**

Chart, bar chart, histogram

Description automatically generated

***Grafik 1 Amiloid beta toksisite modeli****: Önceden agrege edilmiş 40 uM AB 25-35 uygulaması 72 saatin sonunda SHSY-5Y hücre canlılığını kontrol grubuna göre ~ % 50 oranında azalttı. Sonuçlar ortalama ± SEM olarak ifade edilmiştir. (n=6)*

Chart, bar chart

Description automatically generated

***Grafik 2 Sulforafanın AB toksisitesine karşı etkisi:*** *5 uM Sulforafan uygulaması, amiloid beta toksisitesine karşı koruyuculuk göstermemiştir. 5 uM Sulforafan uygulaması kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığını düşürmüştür.*

**Chart, bar chart

Description automatically generated**

***Grafik 3 Melatoninin AB toksisitesine karşı etkisi.*** *100 uM Melatonin uygulaması amiloid beta toksisitesine karşı koruyuculuk göstermemiştir. 100 uM Melatonin uygulaması kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığını düşürmüştür.*

**Chart, bar chart

Description automatically generated**

***Grafik 4******Sulforafan ve Melatonin kombinasyonunun AB toksisitesine üzerine etkisi:*** *Sulforafan ve Melatoninin kombine uygulanması amiloid beta toksisitesine karşı koruyuculuk etkisi göstermemiştir. Kombine uygulama kontrol grubuna göre azalma göstermiştir.*

1. **DENEYİN MTT SONUÇLARI**

**Chart, bar chart, histogram

Description automatically generated**

\*

***Grafik 5 Amiloid beta toksisite modeli :*** *40 uM önceden agrege edilmemiş AB 25-35 uygulaması 72 saatin sonunda hücre canlılığını kontrol grubuna göre ~ % 58 oranında azalttı. Sonuçlar ortalama ± SD olarak ifade edilmiştir. (n=6) \*Kontrol grubuna göre p<0.05 düzeyinde anlamlı fark)*

**Chart, bar chart

Description automatically generated**

\*

\*

***Grafik 6 Sulforafanın AB toksisitesine karşı etkisi:*** *1.25 uM Sulforafan uygulaması amiloid beta toksisitesine karşı koruyucu etki göstermiştir. 1.25 uM Sulforafan uygulaması kontrol hücrelerine kıyasla hücre proliferasyonunu arttırmıştır. (\* AB grubuna göre anlamlı fark p<0.05, n=5).*

**Chart, bar chart

Description automatically generated**

***Grafik 7 Melatoninin AB toksisitesine karşı etkisi:*** *1 uM Melatonin uygulaması amiloid beta toksisitesine karşı koruyucu etki göstermiştir. Ancak istatistiksel anlamlı bulunmamıştır. 1 uM Melatonin uygulaması kontrol hücrelerine kıyasla hücre proliferasyonunu arttırmıştır. (\* AB grubuna göre anlamlı fark p<0.05, n=5).*

Chart, bar chart

Description automatically generated

***Grafik 8******Sulforafan ve Melatonin kombinasyonunun AB toksisitesine üzerine etkisi****: Sulforafan ve Melatoninin kombine uygulanması amiloid beta toksisitesine karşı koruyuculuk etkisi göstermiştir (\* AB grubuna göre anlamlı fark p<0.05, n=5). AB olmaksızın kombine uygulama AB grubuna göre artma göstermiştir. Ancak bu istatistiksel olarak anlamlı değildir.*

SONUÇ VE TARTIŞMA

Alzheimer hastalığı günümüzde demansın en yaygın şekli olarak karşımıza çıkmaktadır. Hastalığın dünya üzerindeki yaşlı nüfusun artmasına bağlı olarak- görülme sıklığı artmış ve dikkatleri hastalık için etkin bir tedavi geliştirilebilmesi üzerine çekmiştir. Anı depolama mekanizmasının karmaşık yapısı ile beraber AH patogenezinin multifaktöriyel olması ortak bir payda arayışını önemli hale getirmiştir. Projemizde Alzheimer hastalığının in vitro modeli olarak kabul edilen amiloid beta toksisite modelini, nöronal SHSY-5Y hücrelerine AB 25-35 peptidini uygulayarak başarı ile oluşturduk. Agrege ve agrege olmayan AB 25-35 uygulamasının 72 saat sonunda hücre canlılığını kontrol grubuna göre sırası ile yaklaşık ortalama % 50 ve % 58 oranında azalttığını gösterdik. AB 25-35 peptidinin önceden 37 derecede bekletilerek agrege olmasının sağlanması , onun hücrelere daha toksik olmasını sağlamış olabilir. Ancak önceden agrege edilmemiş AB 25-35 peptidi de hücre canlılığını 72 saatlik inkübasyonun sonunda belirgin azaltmıştır.

Projemizi planlarken temel araştırma sorularımız “ Melatonin varlığı nöronları amiloid beta toksisitesine karşı ölümden korur mu? ” ve Sulforafan varlığı bu koruyucu etkiyi artırır mı?”şeklindeydi . Bu sorular için yaptığımız literatür araştırmalarına göre “H1. Sulforan uygulaması nöronal hücreleri amiloid beta toksisitesine karşı koruduğunu” , “ H2. Melatonin uygulaması nöronal hücreleri amiloid beta toksisitesine karşı koruduğunu” ve/veya “H3. Sulforan ve melatoninin birlikte uygulanması, ayrı ayrı uygulanmalarına göre koruyucu etkilerini artırdığını” ileri sürmüştük.

Bu proje çalışmamızın sonuçlarına göre H1 hipotezemizin geçerli olduğunu, önceden hücrelere yapılan düşük dozda sulforafan uygulamasının ( 1,25 uM), hücreleri amiloid beta toksisitesine karşı koruduğunu gösterdik. Ancak tek başına 5 uM sulforan uygulaması hücre canlılığını belirgin artırırken , AB 25-35 ile birlikte uygulanması hücreleri amiloid beta toksisitesine karşı koruyamadı. Bu nedenle sulforafanın koruyucu etkisinin doza bağlı olarak oluştuğunu düşündük. Henüz AB peptitleri agrege olmadan yani plak oluşturmadan düşük doz sulforafan nöronlar için koruyucu olabilir. Bu değerlendirmemiz Genç Ş. ve arkadaşlarının Mayıs 2021’de yaptıkları çalışmayı destekler niteliktedir (10).

H2 hipotezimiz Melatonin uygulaması nöronal hücreleri amiloid beta toksisitesine karşı koruduğunu ileri sürmüştük. Çalışmamızda 1 uM Melatonin uygulamasının amiloid beta toksisitesine karşı koruyucu etkisi olduğunu gösterdik ancak bu koruyucu etki istatistiksel anlamlı değildi. Bu deney sayısının kısıtlı olmasından kaynaklanmış olabilir. Diğer taraftan 1 uM Melatonin uygulaması kontrol hücrelerine kıyasla hücre proliferasyonunu belirgin olarak artırdı. Melatoninin amiloid beta toksisite üzerine yapılan önceki çalışmada YX Shen ve arkadaşlarının 2002 yılındaki araştırma sonucuna uygundur(11). Bu hipotezimizin kısmen geçerli olduğunu olduğunu gösterdik.

H3 hipotezimizde Sulforafan ve melatoninin birlikte uygulanması, ayrı ayrı uygulanmalarına göre koruyucu etkilerini artırdığını ileri sürmüştük.

Literatür taramamıza göre ilk kez bu proje ile Sulforafan ve melatoninin birlikte uygulanmasının AB toksisitesine etkisi değerlendirildi. Ayrı ayrı uygulanmalarına göre koruyucu etkilerinin birlikte uygulanmalarında

artmadığı gözlemlendi. Sonuç olarak çalışmamızda Sulforafanın yüksek dozunun amiloid beta toksisitesine karşı hücre canlılığını azalttığı düşük dozun ise koruduğu değerlendirilmiştir.

**ÖNERİLER**

Gelecekte yapılacak çalışmalarda;

1. Çalışmamızda melatonin ve sulforafan kullanılmıştır bunların çok farklı doz ve uzun süreli etkileri araştırılmalıdır.
2. Çalışmamızda melatonin ve sulforafan etkisi tek bir hücre tipinde incelenmiştir başka hücre hatlarında veya insandan alınan hücreler de denenmelidir .
3. İleride melatonin ve sulforafan etkisi Alzheimer modeli oluşturulan hayvan çalışmalarında denenmelidir

#### KAYNAKLAR

* 1. A. Ghosh and K. P. Giese, “Calcium/calmodulin-dependent

kinase II and Alzheimer‟s disease,” Mol. Brain, vol. 8, no. 1, pp. 1–7, 2015.

* 1. L. C. dos Santos Picanco et al., “Alzheimer‟s Disease: A Review from the Pathophysiology to Diagnosis, New Perspectives for Pharmacological Treatment,” Curr. Med. Chem., 2016.
  2. F. Di Domenico, E. Barone, M. Perluigi, and D. A. Butterfield, “The Triangle of Death in Alzheimer‟s Disease Brain: The Aberrant Cross-Talk among Energy Metabolism, Mammalian Target of Rapamycin Signaling, and Protein Homeostasis Revealed by Redox Proteomics,” Antioxidants Redox Signal., vol. 26, no. 8, pp. 364–387, 2017.
  3. World Alzheimer report(2020)
  4. World Health Organization(Media Centre)
  5. Zhu X,Perry G,Smith MA,Wang X (2013)Abnormal mitocondrial Dynamics in the pathogenesis of Alzheimer Disease
  6. Andrew Octavian Sasmita(2018) Current viral-mediated gene transfer research for treatment of Alzheimer’s disease.
  7. Taybaş Çağlayan (2017) Amyloid Beta plakları ve olimerleri.
  8. Slominski RM, Reiter RJ, Schlabritz-Loutsevitch N, Ostrom RS, Slominski AT. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: Distribution and functions. Mol Cell Endocrinol. 2012; 351:152-166.
  9. Genç Şermin, Kürşad Genç, Kemal Uğur Tüfekçi, Sulforaphane inhibits NLRP3 inflammasome activation in microglia through Nrf2-mediated miRNA alteration, May 2021.
  10. YX Shen,SY Xu,W Wei,XX Sun ,LH Liu,J Yang,C Dong,the protective effects of melatonin from oxidative damage induced by amyloid beta-peptide 25-35 in middle aged rats,journal of pineal research 32(2),85-89,2002.
  11. Eat Right, Academy of Nutrition and Dietetics. The MIND Diet. https://www.eatrightpro.org/news-center/nutrition-trends/health-promotion/the-mind-diet
  12. National Institute on Aging. What Do We Know About Diet and Prevention of Alzheimer’s Disease? https://www.nia.nih.gov/health/what-do-we-know-about-diet-and-prevention-alzheimers-disease
  13. Morris, M.C., Tangney, C. C., Wang,Y., Sacks, F. M., Barnes, L.L., Bennett, D.A., & Aggarwal, N. T.(2015). MIND diet slows cognitive decline with aging. Alzheimer’s & dementia, 11(9), 1015-1022.