



T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



**DOKTORA TEZİ**

**NÖRONAL HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE VİNPOSETİN, LEVOSİMENDAN VE  
İBUDİLAST'IN AMİLOİD BETA PEPTİD İLE İNHİBE EDİLEN SİRTUİN-1'E  
ETKİLERİ**

**KÜBRA SAYGISEVER FAİKOĞLU**

**DANIŞMAN**

**PROF. DR. SİBEL ÖZYAZGAN**

**II. DANIŞMAN**

**PROF. DR. EMİNE PELİN KELİCEN UĞUR**

**TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TIBBİ FARMAKOLOJİ VE KLİNİK FARMAKOLOJİ PROGRAMI**

**İSTANBUL-2020**

**TEZ ONAYI**

Bu çalışma 13.01.2020 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Doktora Programı Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

**TEZ JÜRİSİ**

Prof. Dr. Sibel ÖZYAZGAN  
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa  
Fakülte



Prof. Dr. A. Gökhan AKKAN  
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa  
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Matem TUNÇDEMİR  
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa  
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi



Prof. Dr. Zeliha YAZICI  
Biruni Üniversitesi  
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Aydın BARLAS  
Altınbaş Üniversitesi  
Tıp Fakültesi

**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Kübra SAYGISEVER FAİKOĞLU



## İTHAF



*Tüm desteğiyle yanımda olan biricik eşime ve sevgili aileme ithaf ediyorum.*

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca gece gündüz demeden desteğini esirgemeyen, her durumda bilgi ve hayat tecrübesi ile yol gösteren Tez Danışmanım kıymetli hocam Prof. Dr. Sibel Özyazgan'a,

Doktora tez aşamalarım sırasında 2. Danışman hocam olarak hayatıma giren, tez çalışma aşamalarımın her aşamasına eşsiz bilimsel katkılarını ve her konuda sınırsız desteğini esirgemeyen, tanıdığım ve öğrencisi olabildiğim için kendimi çok şanslı hissettiğim, alçak gönüllülüğü ve içtenliği ile her zaman bana örnek olan kıymetli hocam Prof. Dr. Emine Pelin Kelicen Uğur'a;

Ve doktora eğitimim boyunca her konuda öğretmenliği ile bizlere ışık tutan ve her zaman destek olan değerli hocam Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Gökhan Akkan'a ,

Tez aşamasında hayatıma giren, çalışkanlığını ve azmini örnek aldığım, pratik zekasıyla her konuda maximum desteğini hissettiğim kıymetli hocam Prof. Dr. Barkın Berk'e,

Güler yüzü, samimi ve hoş sohbetiyle her konuda konuşabilme olanağı sağlayan, paylaşımlarımızdan her zaman zevk aldığım sevgili hocam Prof. Dr. Zeliha Yazıcı'ya,

Kıymetli deneyimlerini keyifle paylaşan ve her zaman güler yüzü ile hepimizi rahatlatan sevgili hocam Prof. Dr. Aydın Barlas'a,

Değerli deneyimlerini ve bilgilerini bizlerle her zaman paylaşan, dinlemekten zevk aldığım değerli hocam Prof. Dr. Öner Süzer'e,

Deneyimleri ve paylaşımları ile hayatıma katkıda bulunan sevgili hocam Prof. Dr. Okan Yıllar' a,

Lisansüstü eğitimim boyunca destek aldığım sevgili arkadaşlarım Dr. Çağla Köse, Uzm. Bylg. Hande Çelik, Dr. Hande Erdal ve Dr. Tuğçe Büşra Erdem'e,

Her zaman, her konuda hep desteğini hissettiğim, dostluğunu da esirgemeyen anabilim dalı sekreterimiz sevgili Esmâ Bilmez Karaaslan'a,

Güler yüzleriyle destek olan sevgili Necmi Türker, İbrahim Koçer ve Faruk Çağman'a,

Ortaokul yıllarında hayatıma giren, aramızda mesafeler olsa da kalplerimizin hep birlikte attığı canım dostum Dr. Nilgün Yılmaz Şahin'e,

Hayatıma girdiği günden beri her zaman mutluluk veren ve her zaman destek olan kıymetli kardeşim Psk. Melis Saygısever' e,

Hayatımın her alanında hep yanımda olan sevgili aileme ve canım teyzeme,

Hayatımın her anında desteğini ve sevgisini sonuna dek veren, varlığından dolayı her zaman şanslı hissettiğim, kıymetli eşim, hayat arkadaşım Dr. Gökhan Faikoğlu' na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 31103

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                       |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| TEZ ONAYI .....                                                                                       | İİ  |
| BEYAN.....                                                                                            | İİİ |
| İTHAF.....                                                                                            | İV  |
| TEŞEKKÜR.....                                                                                         | V   |
| İÇİNDEKİLER .....                                                                                     | VI  |
| TABLolar LİSTESİ.....                                                                                 | İX  |
| ŞEKİLLER LİSTESİ .....                                                                                | X   |
| SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....                                                                 | Xİ  |
| ÖZET .....                                                                                            | XİV |
| ABSTRACT.....                                                                                         | XV  |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ.....                                                                                 | 1   |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                                                                               | 5   |
| 2.1. Alzheimer Hastalığı .....                                                                        | 5   |
| 2.1.1. AH Patogenezi ile ilgili hipotezler.....                                                       | 5   |
| 2.1.1.1. Kolinergic Hipotez.....                                                                      | 5   |
| 2.1.1.2. Amiloid kaskadı hipotezi .....                                                               | 5   |
| 2.1.1.3. Tau Hipotezi.....                                                                            | 7   |
| 2.1.1.4. Kolesterol Hipotezi .....                                                                    | 8   |
| 2.2. Lizozomlar ve Otofaji .....                                                                      | 8   |
| 2.3. Otofaji-Lizozom Yolağı (ALP).....                                                                | 11  |
| 2.4. Otofaji-Lizozom Yolağı (ALP) ve Alzheimer Hastalığı ile ilişkisi.....                            | 14  |
| 2.5. Sirtuinler .....                                                                                 | 17  |
| 2.6. Fosfodiesteraz Enzimi, İnhibitörleri ve Beyindeki Önemleri .....                                 | 22  |
| 2.6.1. Fosfodiesteraz 1 ve inhibitörleri .....                                                        | 25  |
| 2.6.2. Fosfodiesteraz 3, 3/4 ve inhibitörleri .....                                                   | 27  |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM.....                                                                               | 29  |
| 3.1. Hücre Kültürü .....                                                                              | 29  |
| 3.1.1. Hücrelerin Pasajlanması.....                                                                   | 29  |
| 3.1.2. Deneysel AH Hücre Kültürü Modeli için A $\beta$ <sub>25-35</sub> proteinin hazırlanması: ..... | 30  |
| 3.1.3. Sitotoksikite Deneyleri .....                                                                  | 30  |

|                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1.4. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Tedavisi .....                                                                | 31 |
| 3.1.5. mRNA- RT-qPCR.....                                                                                               | 31 |
| 3.1.5.1. mRNA İzolasyonu.....                                                                                           | 31 |
| 3.1.5.2. cDNA Sentezi.....                                                                                              | 32 |
| 3.1.5.3. Real-Time qPCR .....                                                                                           | 33 |
| 3.1.5.4. Relatif Kantitasyon Hesaplanması .....                                                                         | 35 |
| 3.2. Western Blot .....                                                                                                 | 36 |
| 3.2.1. Hücrelerden Total Protein Ekstrelerinin Elde Edilmesi.....                                                       | 36 |
| 3.2.2. Hücrelerden Sitoplazmik ve Çekirdek Proteini Ekstrelerinin Elde Edilmesi ...                                     | 36 |
| 3.2.3. Protein Miktar Ölçümü .....                                                                                      | 38 |
| 3.2.4. Protein Elektrophorezi .....                                                                                     | 38 |
| 3.2.4.1. Protein Örneklerinin Denatüre Edilmesi .....                                                                   | 38 |
| 3.2.4.2. Örneklerin Jele Yüklenmesi ve SDS-PAGE Elektrophorez .....                                                     | 38 |
| 3.2.5. Blotlama .....                                                                                                   | 39 |
| 3.2.5.1. Antikorla inkübasyon .....                                                                                     | 39 |
| 3.3. Kimyasallar ve Malzemeler .....                                                                                    | 40 |
| 3.4. Kullanılan Cihazlar .....                                                                                          | 42 |
| 3.5. İstatistiksel Analiz.....                                                                                          | 42 |
| 4. BULGULAR.....                                                                                                        | 43 |
| 4.1. Sitotoksisite Sonuçlarının Değerlendirilmesi .....                                                                 | 43 |
| 4.2. İn vitro A $\beta$ <sub>25-35</sub> ve PDEİ Uygulamalarının RT-qPCR sonuçları .....                                | 44 |
| 4.2.1. PDEİ uygulamalarının RT-qPCR sonuçları:.....                                                                     | 45 |
| 4.2.1.1. A $\beta$ <sub>25-35</sub> ve PDEİ uygulamasının SIRT-1 gen ekspresyonu:.....                                  | 45 |
| 4.2.1.2. A $\beta$ <sub>25-35</sub> ve PDEİ uygulamasının otofaji alt yollarından ATG5 gen ekspresyonuna etkisi: .....  | 46 |
| 4.2.1.3. A $\beta$ <sub>25-35</sub> ve PDEİ uygulamasının otofaji alt yollarından BECN1 gen ekspresyonuna etkisi: ..... | 47 |
| 4.2.2. PDEİ uygulamalarının Western Blot sonuçları:.....                                                                | 49 |
| 4.2.2.1. SIRT1 Protein Ekspresyonu:.....                                                                                | 49 |
| 4.2.2.2. Aktif AMPK (p-AMPK) Protein Ekspresyonu:.....                                                                  | 50 |
| 4.2.2.3. Aktif mTOR (p-mTOR) Protein Ekspresyonu:.....                                                                  | 52 |
| 4.2.2.4. LC3II Protein Ekspresyonu:.....                                                                                | 53 |
| 5. TARTIŞMA .....                                                                                                       | 55 |

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| SONUÇ VE ÖNERİLER.....          | 63 |
| KAYNAKLAR .....                 | 64 |
| İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI..... | 78 |
| ÖZGEÇMİŞ .....                  | 79 |



**TABLolar LİSTESİ**

|                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 1-1.</b> PDE Ailesinin Substrat Çeşitleri ve Dağılımları .....                            | 23 |
| <b>Tablo 3-1.</b> Deney gruplarının oluşturulması.....                                             | 31 |
| <b>Tablo 3-2.</b> cDNA sentezi için kullanılan mastermix bilgileri.....                            | 32 |
| <b>Tablo 3-3.</b> cDNA mastermix üzerine eklenen bileşenler.....                                   | 33 |
| <b>Tablo 3-4.</b> cDNA sentezi için kullanılan reverse transkripsiyon reaksiyonunun koşulları..... | 33 |
| <b>Tablo 3-5.</b> Ekpresyon analizi için kullanılan primer bilgileri.....                          | 34 |
| <b>Tablo 3-6.</b> Real-Time qPCR için kullanılan mastermix bilgileri.....                          | 34 |
| <b>Tablo 3-7.</b> Real-Time qPCR Reaksiyonu Koşulları.....                                         | 35 |
| <b>Tablo 3-8.</b> (A,B). A. Çekirdek Ekstre Tamponu; B. Sitoplazmik Ekstre Tamponu.....            | 37 |
| <b>Tablo 3-9.</b> Kullanılan primer antikor tablosu.....                                           | 40 |

## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                                                                                                                                                                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1-1. Alzheimer Hastalığının patogenezi.....                                                                                                                                                                                          | 4  |
| Şekil 2-1. Amiloid (A $\beta$ ) kaskad hipotezi .....                                                                                                                                                                                      | 6  |
| Şekil 2-2. Alzheimer hastalığı'nda Tau: Mekanizmalar ve Terapötik Sistemler.....                                                                                                                                                           | 7  |
| Şekil 2-3. Lizozomların çoklu fonksiyonları konumlandırma ve hareketliliklerinden etkilenir.....                                                                                                                                           | 10 |
| Şekil 2-4. Otofajiye genel bakış.....                                                                                                                                                                                                      | 11 |
| Şekil 2-5. Beclin-Vps34 Kompleksi.....                                                                                                                                                                                                     | 12 |
| Şekil 2-6. Sirtuin protein deasetilaz ailesi. ....                                                                                                                                                                                         | 18 |
| Şekil 2-7. SIRT1'in hedefindeki fizyolojik olaylar .....                                                                                                                                                                                   | 18 |
| Şekil 2-8. Nörodejeneratif hastalık oluşumunu etkileyen faktörler.....                                                                                                                                                                     | 20 |
| Şekil 2-9. CAMP ve cGMP sinyallerinin sentezlenmesi, yürütülmesi ve parçalanmasından sorumlu sinyal kaskadları.....                                                                                                                        | 22 |
| Şekil 4-1. Fare hipokampal hücre hatlarında (HT-22), artan konsantrasyonlarda PDEİ uygulamalarının (A) ve/veya eş zamanlı A $\beta$ 25-35'in (5 $\mu$ M) ile beraber tedavilerinin hücre canlılığına etkilerini gösteren MTT grafiği. .... | 44 |
| Şekil 4-2. PDEİ ve A $\beta$ 25-35 uygulamasının SIRT1 gen ekspresyonuna etkisi.....                                                                                                                                                       | 45 |
| Şekil 4-3. PDEİ ve A $\beta$ 25-35 uygulamasının ATG5 gen ekspresyonuna etkisi.....                                                                                                                                                        | 46 |
| Şekil 4-4. PDEİ ve A $\beta$ 25-35 uygulamasının BECN1 gen ekspresyonuna etkisi.....                                                                                                                                                       | 47 |
| Şekil 4-5. PDEİ ve A $\beta$ 25-35 uygulamasının SIRT1 protein ekspresyonuna etkisi.....                                                                                                                                                   | 49 |
| Şekil 4-6. PDEİ ve A $\beta$ 25-35 uygulamasının p-AMPK protein ekspresyonuna etkisi.....                                                                                                                                                  | 50 |
| Şekil 4-7. PDEİ ve A $\beta$ 25-35 uygulamasının aktif m-TOR (p-mTOR) protein ekspresyonuna etkisi.....                                                                                                                                    | 52 |
| Şekil 4-8. PDEİ ve A $\beta$ 25-35 uygulamasının LC3II protein ekspresyonuna etkisi.....                                                                                                                                                   | 53 |

## SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

A $\beta$  Beta-amiloid  
 AB Avrupa Birliği  
 ABD Amerika Birleşik Devletleri  
 Ach Asetilkolin  
 ACTB Beta-aktin insan geni ve protein kısaltması/ human gene and protein abbreviation ACTB/ACTB  
 AD Alzheimer's disease  
 AH Alzheimer hastalığı  
 ALP Autophagy-Lyzosome Pathway; Otofaji-lizozom yolağı  
 ALS Amyotrofik lateral skleroz  
 AMP Adenozin Mono Fosfat/ Adenosine monophosphate  
 AMPK Adenosine monophosphate-activated protein kinase; Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz  
 APOE Apolipoprotein E  
 APP Amiloid prekürsör protein  
 APP-CTF amiloid prekürsör proteinin parçalanmış C terminali fragmanı  
 APP/PS1 APP<sup>swe</sup>/PS1dE9 (Tg) transgenik fare modeli  
 ATCC American Tissue Cell Culture  
 ATG5 Otofaji ilişkili Genler 5/ Autophagy Related Genes 5  
 ATPaz Adenozin Mono Fosfat Yıkıcı Enzim  
 BACE1 Beta Sekretaz 1/ Beta-Secretase 1  
 BAP Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi  
 BDNF Beyin kaynaklı nörotrofik faktör  
 BECN1 BCL2 ile etkileşen protein/ BCL2-interacting protein  
 Ca Kalsiyum  
 CA1 Hipokampusun spasyal (uzaysal) öğrenme ve bellek için gerekli olan bölgesi  
 cAMP Siklik AMP  
 cDNA Tamamlayıcı DNA/ Complementary DNA  
 CE Sitoplazmik Ekstre Tamponu /Cytoplasmic Extract  
 cGMP Siklik guanozin monofosfat  
 CREB Hücresel transkripsiyon faktörü/ Cellular transcription factor  
 ÇET Çekirdek Ekstresi Tamponu  
 DMEM Dulbecco's modified Eagle's medium  
 DMSO Dimetil sülfoksit  
 DNA Deoksiribonükleik Asit  
 DNS Tiyeotriazolopirimidinon fosfodiesteraz-1 (PDE1) inhibitörü/  
 dNTP mix Deoksiribonükleotid Trifosfatlar  
 DS Down sendromu  
 DTT Dithiothreitol  
 EDTA Etilen diamin tetraasetik asit  
 EMA Avrupa İlaç Ajansı  
 FBS Fetal bovine serum; Fetal sığır serumu  
 FDA U. S. Food and Drug Administration  
 FoxO Forkhead box protein  
 GDNF Glial hücre kaynaklı nörotrofik faktör/ Glial cell-derived neurotrophic factor

GSH İndirgenmiş Glutatyon, Glutamilsisteinilglisin/ Glutamylcysteinylglycine  
 HEPES [4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonik asit](4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)]  
 HH Huntington hastalığı  
 HT-4 Fare hipokampal nöronal hücre hattı  
 HT-22 Fare hipokampal nöronal hücre hattı  
 İB İbudilast  
 IL İnterlökin  
 İUC İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa  
 KATP ATP-duyarlı K<sup>+</sup> kanal (KATP) aktivatörü  
 KBE Kan beyin engeli  
 KCl Potasyum Klorür  
 LC3II Microtubule associated protein light chain 3; Mikrotübülle ilişkili protein hafif zinciri 3  
 LDH Lizozomal depo hastalıkları  
 LDH Laktat dehidrojenaz  
 LEV Levosimendan  
 LTP Uzun süreli potansiyasyon; Long term potentiation  
 MDA Malondialdehit  
 MIF Migrasyon inhibitör faktörü  
 MPTP 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin/ 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine  
 Mrna Mesajcı Ribonükleik Asit  
 MS Multiple sklerosis  
 MT1/MT2 Melatonerjik reseptör agonisti  
 MTT 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür  
 mTOR Mammalian target of rapamycin; rapamisinin memelilerdeki hedefi  
 MTORC1 mammalian target of rapamycin complex 1 or mechanistic target of rapamycin complex 1-Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi  
 NaCl Sodyum Klorür  
 NAD<sup>+</sup> Nikotinamid adenin dinükleotid  
 NE Çekirdek Ekstresi Tamponu (Nuclear Extract)  
 NFκB aktive B hücrelerinin nükleer faktör kappa-hafif zincir arttırıcısı/ nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells  
 NGF Sinir büyüme faktörü  
 NMDA N-metil-D-aspartat  
 NO Nitrik Oksit  
 NP-40 çeşitli protein yöntemlerinde kullanım için noniyonik bir deterjan  
 PAS Fagozomal montaj bölgesi (Phagosomal Assembly Site)  
 PH Parkinson hastalığı  
 PBS Phosphate buffered saline; Fosfat tamponlu çözelti  
 PDE Fosfodiesteraz enzimi  
 PDEİ Fosfodiesteraz enzimi inhibitörleri  
 PGC1α Peroksizom proliferatör-aktif reseptör gama koaktivatörü 1-alfa (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha)  
 PH Parkinson hastalığı  
 PI3K Fosfotidil inositol 3-kinaz  
 PKA Protein kinaz A  
 PKG Protein kinaz G

PPAR-c Peroksizom proliferatör-aktive reseptör  
PSEN1 Presenilin 1  
p-AMPK Fosforile(Aktif) AMP-activated protein kinase  
p-mTOR Fosforile (Aktif) Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi  
RB1 Buffer RNA Bağlama Tamponu/ RNA Binding Buffer  
RNA Ribonükleik Asit  
ROT Reaktif oksijen türleri  
RNW Buffer Yıkama Tamponu  
RQC Ribosome quality control; ribozom kalite kontrol  
RT-qPCR Real Time Q-PCR  
SE Sitoplazmik ekstre  
SET Sitoplazmik Ekstre Tamponu  
SH-SH5Y İnsan nöroblastoma hücre hatları  
SIRT Silent information regulators of gene transcription; gen transkripsiyonunun sessiz bilgi düzenleyicileri  
SIRT1 Silent information regulators of gene transcription; gen transkripsiyonunun sessiz bilgi düzenleyicileri-1  
SOD Süperoksit Dismutaz  
SSS Santral sinir sistemi  
SW1 Buffer Yıkama Tamponu  
TLR-4 Toll benzeri reseptör 4  
TNFα Tümör Nekrozis Faktörü Alfa  
ULK-1 Unc-51 benzeri otofaji aktive edici kinazın  
UVRAG UV radyasyon direnci ile ilişkili gen  
UPS Ubikülin-proteazom sistemi  
VIN Vinposetin  
Vps34 Vakuolar Protein Sıralayıcı 34

## ÖZET

Saygısever-Faikoğlu, Kübra (2019). Nöronal Hücre Kültürlerinde Vinpocetin, Levosimendan ve İbudilast'ın Amiloid Beta Peptid ile İnhibe edilen SİRTUİN-1'e Etkileri. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tıbbi Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji AD. Doktora Tezi. İstanbul Bu çalışma İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı ve Atlas Biyoteknoloji işbirliği ile Atlas Biyoteknoloji Laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

Çalışmada amaç; AH'nin mekanizmasının daha iyi anlaşılması ve etkin tedavi yaklaşımlarının oluşturulması için ön çalışma niteliğindeki bu projeye sirtuin-1 ile PDE arasındaki olası bir ilişkiyi *in vitro* yöntemlerle aydınlatmaktır. Nörodejeneratif hastalıklardan Alzheimer hastalığı (AH), bilişsel fonksiyonların azaldığı ve demansın gözlemlendiği, beyinde nörofibriler yumakların oluşumu ve amiloid-beta (A $\beta$ ) peptidlerin birikimi ile karakterize, nöron kaybı ve inflamasyonun eşlik ettiği bir hastalıktır. Yapılan çalışmalarda Alzheimer hastalığı patolojisi ile otofaji yolları arasında da sıkı bir ilişki olduğu gözlenmektedir. Sirtuinler (SIRT) gen transkripsiyonunun sessiz bilgi düzenleyicileri olarak bilinirler ve hücrel immünitede, otofaji indüksiyonunda, apoptozisin inhibisyonunda, oksidatif strese ve inflamasyonun baskılanmasında rolleri bulunmaktadır. Çalışmamızda AH'nin patogenezinin sorumlu nörotoksik protein A $\beta$ <sub>25-35</sub> uygulanan fare hipokampal nöron (HT-22) hücre kültürlerinde PDEİ'lerden vinpocetin (VİN), levosimendan (LEV) ve ibudilastın (İB) hücre canlılığı ve korunmasında rol alan sirtuin-1 (SIRT1) ekspresyonuna ve bazı otofaji proteinlerine olan etkilerini değerlendirdik. Elde ettiğimiz bulgulara göre, HT-22 hücre hatlarında, A $\beta$ <sub>25-35</sub> (5  $\mu$ M) uygulaması, SIRT-1 ekspresyonunda azalmaya neden olmuş, A $\beta$ <sub>25-35</sub> ile eş zamanlı PDEİ uygulaması, SIRT-1 ekspresyonundaki bu azalmayı geri çevirmiştir. Otofaji proteinlerinden ATG5, beclin-1 (BECN1) ve otofaji belirteci LC3II'nin de ekspresyonları A $\beta$ <sub>25-35</sub> uygulaması ile azalmış, A $\beta$ <sub>25-35</sub> ile eş zamanlı PDEİ uygulaması, bu azalmayı geri döndürmüştür. PDEİ olan Vinpocetin, Levosimendan ve İbudilast'ın A $\beta$  hasarı sırasında farmakolojik etkisini, SIRT1, ATG5, BECN1, aktif AMPK (p-AMPK), aktif mTOR (p-mTOR) ve LC3II gen ekspresyonlarını değiştirerek gösterdiği sonucuna varabiliriz.

**Anahtar Kelimeler:** Fosfodiesteraz enzim inhibitörleri, Alzheimer hastalığı, sirtuin-1, otofaji.

**Destekleyen Kuruluş:** İUC BAP (Proje Numarası: TDK-2018-31103)

## ABSTRACT

Faikoglu-Saygisever, K .The Effects of Vinpocetine, Levosimendan and Ibudilast on SIRTUIN-1 Inhibited by Amyloid Beta Peptides in Neuronal Cell Cultures. Istanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Department of Medical Pharmacology, Doctoral Thesis. İstanbul. This study was performed in Atlas Biotechnology Laboratories in collaboration with Istanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Department of Medical Pharmacology and Atlas Biotechnology.

The aim of this project, which is a preliminary study to understand the mechanism of AD better and to establish effective treatment approaches that to elucidate a possible relationship between sirtuin-1 and PDE in vitro method. Alzheimer's disease (AD), a neurodegenerative disease, is characterized by decreased cognitive functions and dementia with the formation of neurofibrillary tangles in the brain and accumulation of amyloid-beta ( $A\beta$ ) peptides that accompanied by neuronal loss and inflammation. Studies have shown that there is a close relationship between Alzheimer's disease pathology and autophagy pathways. Sirtuins (SIRT) are known as silent information regulators of gene transcription and have a role in cellular immunity, autophagy induction, apoptosis inhibition, oxidative stress and suppression of inflammation. Sirtuin-1 (SIRT1), which is involved in cell viability and protection of PDEIs, vinpocetine (VIN), levosimendan (LEV) and ibudilast (IBT) in mouse hippocampal neuron (HT-22) cell cultures treated with neurotoxic protein  $A\beta_{25-35}$  which is responsible for the pathogenesis of AD and have effects on some autophagy proteins. According to our findings, the application of  $A\beta_{25-35}$  (5  $\mu$ M) in HT-22 cell lines caused a decrease in SIRT-1 expression and concurrent administration of PDEI with  $A\beta_{25-35}$  , reversed this decrease in SIRT-1 expression. Expression of autophagy proteins ATG5, beclin-1 (BECN1) and autophagy marker LC3II also decreased with  $A\beta_{25-35}$  administration also concomitant administration of PDEI with  $A\beta_{25-35}$  reversed this decrease. We can conclude that PDEI, Vinpocetine, Levosimendan and Ibudilast show pharmacological effect during  $A\beta$  injury by altering SIRT1, ATG5, BECN1, active AMPK (p-AMPK), active mTOR (p-mTOR) and LC3II gene expressions.

**Key Words:** Phosphodiesterase enzyme inhibitors, Alzheimer's disease, sirtuin-1, autophagy.

**Supporting Institution:** İUC BAP (Project Number: TDK-2018-31103)

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

20. yüzyıldan önce ve sonra yapılan tarihsel derleme çalışmalarında demans ve Alzheimer hastalığı (AH) kavramlarına ilişkin olayların yanı sıra, AH kavramının “demans” kelimesinden ayrılması da tarihsel olarak önemlidir [1],[2].

4 Kasım 1906'da, Almanya'nın güneybatısında bir psikiyatrist toplantısında Emil Kraepelin'in grubunun bir üyesi olan Alois Alzheimer'ın tarif ettiği pre-senil demans vakası ile tanımlanan yeni hastalık 20. yüzyıla damgasını vurmuştur [2],[3].

Alman nöropatolog Alois Alzheimer, 1901 yılında Auguste Deter (1850-1906) adlı 51 yaşında bir kadında kendi adını taşıyan hastalığı teşhis etmiştir. Deter'in kocası, karısının son bir yılda unutkan, akli karışmış, endişeli, şüpheli, disiplinsiz ve çılgına dönmüş bir hale geldiğini ifade etmiştir. Aynı zamanda Auguste'nin artık günlük yaşam aktivitelerini yerine getiremediği ve halusinasyonlarının olduğunu da dile getirilmiştir [2],[4].

1901 yılının kasım ayında AH'nın anlama, dil ve hafıza üzerine bilişsel anlamdaki etkileri kaydedilmiştir. Sonraki yıllarda nöropatolog, hastasının sağlık durumu ile ilgili periyodik güncellemeleri de takip etmiştir. 1906 yılında Auguste Deter'in vefatı üzerine hastanın beynindeki nörofibriler yumaklar ve senil plakların varlığını ortaya koyan bir otopsi incelemesi sonucunda, Alzheimer daha sonra kendi adıyla anılan hastalığın klinik ve patolojik incelemesini içeren ilk konsensusu da başlatmıştır [2],[4].

Nörodejeneratif hastalıklardan biri olan AH, beyinde amiloid-beta (A $\beta$ ) peptidlerin birikimi ve nörofibriler yumakların oluşumu ile karakterize, nöron kaybı ve beyinde inflamasyonun eşlik ettiği, bilişsel fonksiyonların azaldığı ve demansın gözlemlendiği nörodejeneratif bir hastalıktır [5],[6]. İnsan ömrünün giderek uzamasıyla birlikte demans gibi daha çok yaşlıları etkileyen hastalıkların görülme sıklığında önemli bir artış olmuştur. Demans bildirilen tüm vakaların % 50-70'ini oluşturan AH, en yaygın görülen demans şeklidir. Dünyada 26 milyondan fazla insan şu anda AH ile yaşamaktadır; etkili tedaviler bulunmadığı takdirde 2050'de bu sayının 106 milyonu aşacağı tahmin edilmektedir [7]. Bu nedenle A $\beta$  birikimini veya toksisitesini azaltacak yaklaşımlar ile AH gelişimi önlenabilir ya da yavaşlatılabilir [8].

AH patofizyolojisinde A $\beta$  birikimi ve tau fosforilasyonu sonucunda oluşan nörofibriler yumakların, nörodejeneratif hasarı başlatan olaylar olduğu düşünülmektedir [9]. Bu nöropatolojik oluşumların en fazla hafıza ve bilinçle ilgili beyin bölgesi olan hipokampusta görülmesi de AH'nin en belirleyici semptomlarından olan hafıza kaybı, görsel-uzaysal yeteneklerde azalma ile yakından ilişkisini ortaya koymaktadır [8].

AH'nın birçok faktöre bağlı olarak geliştiği düşünülmektedir. Ancak ilerleyen yaş, aile öyküsü, kadın cinsiyeti, tip 2 diyabet, periferik vasküler hastalıklar, ateroskleroz, kardiyovasküler hastalıklar, kafa travmaları, serebrovasküler hastalıklar ayrıca genetik olarak apoprotein (APO) E  $\epsilon$ 4 alel taşıyan kişiler  $\epsilon$ 3 alel taşıyanlara kıyasla artmış AH riski altında bulunmaktadır [10]–[12].

Son zamanlarda yapılan çalışmalar AH patofizyolojisi ve otofaji yolları arasında anlamlı bir bağ olduğunu göstermektedir. Otofaji, AH'nin patolojisini oluşturan A $\beta$  gibi protein agregatlarının lizozomal yıkımla parçalanmasında ve hücreden uzaklaştırılmasında yaşamsal öneme sahiptir [13]–[17]. Postmitotik sinir hücreleri ve A $\beta$  peptid gibi yanlış katlanan nörodejeneratif proteinlerin ve hasarlı organellerin enzimatik yolla parçalanarak hücreden uzaklaştırılmaları için otofajiye ihtiyaçları vardır. A $\beta$ 'nın beyin dokularındaki aşırı birikimi oksidatif strese neden olarak çoğu hücre içi organelle zarar verebilir. Hasarlı organellerin ve makromoleküllerin kontrollü uzaklaştırılması otofajinin nöron koruyucu rolleri arasındadır. Bu nedenle AH tedavisinde, bir yandan oksidatif hasarı önleyen, diğer yandan da otofajik yolları harekete geçiren yeni tedavi yaklaşımlarının hızla önem kazandığı bir dönemece girilmiştir [13], [18].

AH yaklaşık bir asırdır bilinmesine rağmen [4] yalnızca üç kolinesteraz inhibitörü (donepezil, galantamin, rivastigmin) ve bir N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonisti (memantin) ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından AH tedavisi için onaylanan ilaçlardır. Bu ilaçlar semptomatik tedavi sağlar, ancak hastalığın seyrini değiştirmezler. Günümüzde nörodejeneratif hastalıkların mekanizmasını aydınlatmak üzere yapılan çalışmalar ile giderek artan hücre içi sinyal yollarına yenileri eklenmekte ve bu hastalıklardan korunmak veya bu hastalıkları tedavi etmek üzere geliştirilecek etkin tedavi seçenekleri detaylandırılmaktadır. Nörodejeneratif hastalıkların mekanizmasını aydınlatmak üzere yapılan çalışmalar çeşitli enzim inhibitor ya da aktivatörlerinin bu hastalıklardan korunmak veya tedavi etmek üzere

geliştirilecek etkin tedavi seçenekleri arasında yer aldığını göstermektedirler. Bahsi geçen enzimler çok çeşitli sinyal yollarını aktive ya da inhibe ederek nörodejeneratif hasarı yavaşlatılabilmekte ve/veya azaltılabilmektedirler.

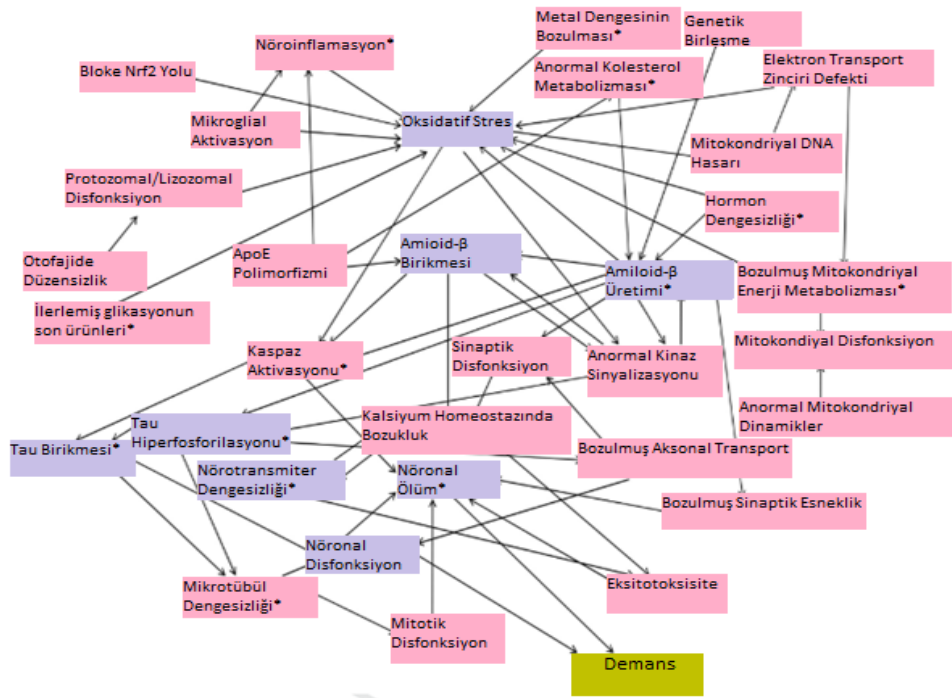
Maya homologlarından sonra isim almış olan sessiz bilgi düzenleyicileri (*Silent Information Regulator 2 Homologue 1*; Sirtuinler ya da SIRTler), faaliyetlerini nikotinamid adenin dinükleotide (NAD<sup>+</sup>) bağlı olarak düzenleyen ve NAD<sup>+</sup> tarafından regüle edilen histon deasetilaz grubudur. Bugüne kadar yedi çeşit sirtuin (SIRT1-SIRT7) tanımlanmıştır. Bunlar arasında SIRT1 en iyi tanımlananıdır [19]. SIRT1 metabolizması, stres yanıtları, hücrel sağkalım, transkripsiyon, yaşlanma ve diğer çeşitli olaylarla ilişkilendirilmiştir [19], [20]. Ayrıca şimdiye kadar yapılan çalışmalar SIRT1'in nöronal fonksiyonlar, yaşlanma süreci, AH ve diğer nörodejeneratif hastalıklarda önemli bir rol oynadığını göstermiştir. SIRT1 sadece aksonları dejenerasyondan korumakla kalmaz [21]; aynı zamanda hipokampusta hafızayı ve sinaptik plastisiteyi düzenler [22]. Ayrıca, SIRT1 azalması, AH hastalarının beyinlerinin kortekslerinde A $\beta$  ve mikrotübüle bağlı proteinlerin (tau) birikimi ile de yakından ilişkili bulunmuştur [23]. Bu nedenle SIRT1, yaşa bağlı bilişsel bozukluklara karşı olası hafızayı ve sinaptik plastisiteyi düzenler. Ek olarak, A $\beta$  öncü/prekürsör proteini (amyloid precursor protein; APP-), tau, presenilin 1 (PS EN1), presenilin 2 (PSEN2) ve ApoE4 gibi proteinlerin AH'nin patolojisi ve ilerlemesine doğrudan katkı sağladığı bilinmektedir. Bu proteinleri kodlayan genlerdeki ekspresyon değişiklikleri veya mutasyonlar AH'nin patolojik sürecinde önemli rol oynayabilir [24]–[27].

Siklik guanozin monofosfat (cGMP), merkezi sinir sistemi de dahil olmak üzere çeşitli biyolojik sistemlerde haberci ikincil bir sinyal iletimi sistemidir. Üretimi, guanil siklaz tarafından yapılan katalizasyon ve fosfodiesterazlar (PDE'ler) tarafından gerçekleştirilen degradasyon sayesinde dengelenir. cGMP sinaptik plastisite ve bellekte önemli bir molekül olarak tanındığından, sayısı artmaya devam eden birçok çalışma cGMP seviyelerini düzenlemeyi amaçlayan stratejilere odaklanmışlardır. Halihazırda yaşlanma ve AH'de, hipokampusta cGMP'ye bağlı sinyal iletiminde bir azalma olduğu da gösterilmiştir.

cGMP'deki yaşa bağlı azalma NMDA reseptör bağımlı nitrik oksit (NO)-cGMP yolunu [28] inhibe edebilirken; PDE ekspresyonunda [29] ve AH patogeneğinde anahtar

molekül olan A $\beta$  peptidinin aktivitesinde ve birikimindeki artışla ilgili bulunmuştur [30], [31].

Bu çalışmada bazı PDE inhibitörlerinin fare hipokampal nöronal hücre hatlarında (HT-22) A $\beta$  ile inhibe edilmiş, sinir koruyucu ve antioksidan olan SIRT-1 üzerinden otofaji yolları üzerindeki etkileri incelenecektir.



**Şekil 1-1. Alzheimer Hastalığının patogenezi.** R. Anand vd. [11]'nden Türkçe'ye uyarlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Alzheimer Hastalığı

#### 2.1.1. AH Patogenezi ile ilgili hipotezler

##### 2.1.1.1. Kolinerjik Hipotez

Kolinerjik fonksiyon bozukluğuna dayalı en eski hipotezdir [32]. Kolinerjik hipotez 1982 yılında Bartus ve arkadaşlarının hipotezlerinde yaşlılıktaki hafıza bozukluğu ile kolinerjik sistem arasındaki ilişkiden bahsetmeleriyle ilk kez dile getirilmiştir [33].

Alzheimer hastasının beyninin biyokimyasal incelemesinde normal beyin ile karşılaştırıldığında, beyin korteksindeki ve tüm diğer alanlardaki kolin asetil transferaz ve asetilkolinesteraz aktivitesinde azalma olduğu gözlenmektedir[34].

Bu incelemeler bazal ön beyin çekirdeğindeki (Meynert ve medial septumun nükleus bazalisi) kolinerjik nöron kaybı, kortikal ve hipokampal asetilkolin azalması ile birlikte seyreden bilişsel işlev bozukluğu ile sonuçlanmıştır [35]. Ek olarak presinaptik kolinerjik terminallerde bulunan nikotinik ve muskarinik asetilkolin reseptörü sayısındaki azalmanın bilişsel işlevi azalttığı da yine çalışmalarla gösterilmiştir [36], [37].

Ayrıca kolinerjik hipotezi yine santral sinir sistemi (SSS) hastalıklarında önemli rolü olduğu düşünülen eksitotoksikite mekanizmasını desteklemektedir. Bu hipoteze göre; memeli SSS'deki nöronların uyarıcı amino asitlere, özellikle glutamata aşırı veya uzun süreli maruz kalması sonucunda katalitik enzimler aktive olmakta, toksik serbest radikallerin oluşumu ve hücre enerji üretiminin bozulması anormal miktarda hücre içi  $Ca^{+2}$  üretilmesine neden olmaktadır. ATP'nin tükenmesi de membran iyon pompalarının doğru çalışmasına izin vermediğinden, transmembran elektrokimyasal gradyanların çökmesi, sinir hücresi fonksiyonunun kaybına, nöron hasarına, nekroza veya apoptozise yol açmaktadır [38].

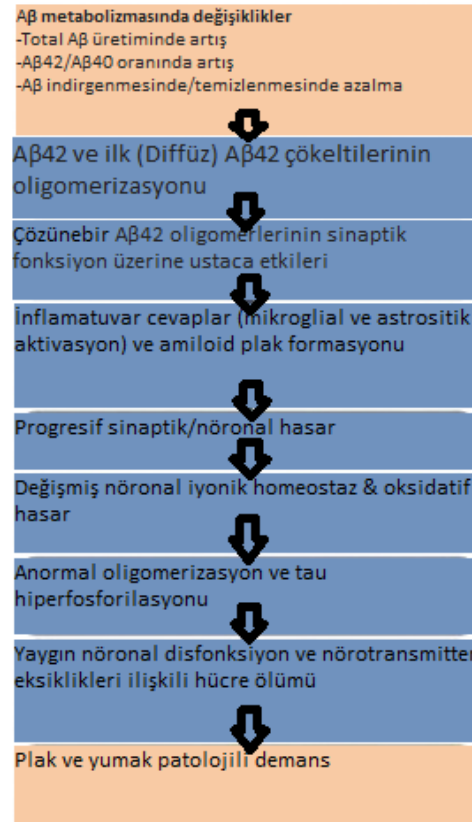
##### 2.1.1.2. Amiloid kaskadı hipotezi

Amiloid kaskadı hipotezi, AH'de nörodejenerasyonun, beyin çeşitli alanlarında anormal A $\beta$  plaklarının birikmesinden kaynaklandığını ileri sürer [39], [40]. A $\beta$  plaklarının birikimi nöronda hasarlanmaya yol açan patolojik bir kaskadın

tetiklenmesine neden olur. Ayrıca tau proteini yoluyla nörofibriller yumakların oluşumu, nöronal disfonksiyona ve AH'de hücre ölümüne yol açmaktadır [39], [41], [42] Genetik, biyokimyasal ve patolojik kanıtlar, A $\beta$  plaklarının birikmesinin AH'nin başlıca nedeni olduğunu öne süren amiloid kaskadı hipotezini desteklemektedir[43]–[45]

A $\beta$  birikimi ve plak oluşumu lokal mikroglial aktivasyona, sitokin salıverilmesine, reaktif astrositoza ve inflamatuvar tepkiye yol açmaktadır[46]–[48].

APP [49], PSEN1 ve PSEN2 [50]–[52] genindeki otozomal dominant mutasyonlar erken başlangıçlı ailesel AH'ye neden olurken, tipik geç başlangıçlı hastalık için APOE [53] geninde mutasyon ana genetik risk faktörüdür. Genetik çalışmalar, AH'deki nörodejeneratif reaksiyonların, A $\beta$  peptidi üretimi ve klirensi arasındaki dengesizliğin bir sonucu olduğunu da göstermektedir [54].



**Şekil 2-1. Amiloid (A $\beta$ ) kaskad hipotezi.** Haass ve Selkoe vd. [55] 'nden Türkçe'ye uyarlanmıştır.



#### 2.1.1.4. Kolesterol Hipotezi

Yüksek serum kolesterol düzeylerinin AH gelişme riskini arttırdığı ifade edilmiştir [61]. Kolesterol ve AD üzerine yapılan erken bir araştırma, apoE genotipinin ve Alzheimer hastalarının toplam kolesterol seviyelerine, yaşlarına ve cinsiyetine bağlı olduğunu bildirmiştir[62].

ApoE, plazmadaki ana apolipoproteinlerden ve beyindeki kolesterolün ana taşıyıcılarından biridir. İnsanlarda ApoE geninin üç alleli bilinmektedir:  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  a  $\epsilon 4$ . Birçok çalışma, ApoE  $\epsilon 4$  alelinin AH için artmış bir risk ile ilişkili olduğunu gösterirken, ApoE  $\epsilon 2$ 'nin AH'den koruma sağladığı görülmüştür[10], [63], [64].

İn vitro ve in vivo çalışmalar ApoE'nin; nöroinflamasyonu kötüleştirebilen, sinaptik plastisiteyi bozabilen ve nöronal hasara cevabı değiştirebilen A $\beta$ 'den bağımsız bir rolü olduğunu doğrulamıştır [65]. Bununla birlikte, ApoE'nin en önemli işlevi A $\beta$  metabolizmasındaki mediyatör rolüdür. ApoE'nin A $\beta$  üzerinden patolojik bir takım değişikliklere neden olabileceği varsayılmıştır [66]. ApoE A $\beta$ 'yi bağlar, nörondan A $\beta$ 'nin temizlenmesini bozarak A $\beta$  birikimini tetikler. Ayrıca, ApoE, belirli ApoE alellerine bağlanarak da A $\beta$  birikimini artırır [67], [68].

Hücre içi kolesterolün, sekretaz aktivitesini, sekretaz veya APP'nin hücre içine transferini düzenlemesi yoluyla APP'nin işlenmesini düzenleyebileceği düşünülmektedir. Artan kolesterol konsantrasyonu  $\gamma$ -sekretaz aktivitesini ve amiloidojenik yolak aktivitesini kuvvetlendirir, ayrıca düşük kolesterol seviyeleri de amiloidojenik yolu teşvik eder. Tüm bunlar kolesterolün AH'daki rolünü desteklemektedir. Kolesterol metabolizması ile AH arasında bağlantı oluşturan bir çok genetik faktör vardır, ancak yalnızca ApoE geni için bu ilişki kanıtlanmıştır [69], [70].

#### 2.2. Lizozomlar ve Otofaji

Lizozomlar, ökaryotik hücrelerin primer parçalayıcı bölümü olarak bilinmektedir. Bu dinamik organeller, 1955 yılında Liège Üniversitesi'ndeki Belçikalı biyokimyacı Christian de Duve tarafından keşfedilmiştir [71], [72]. Lizozomların tanımlayıcı bir özelliği, vakuolar H<sup>+</sup> ATPase (v-ATPase) tarafından oluşturulan ve Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup> ve K<sup>+</sup> gibi bir başka iyon türünün akışına yardımcı olan asidik iç pH (4,5-5,5)'larıdır [73]–[75]. Düşük pH, lümenal hidrolazların işlevi için optimal bir ortam sağlar ve böylece geniş makromolekül dizilerinin parçalanmasını kolaylaştırır. Bu da hücreye alınan maddelerden amino asitlerin, monosakaritlerin ve serbest yağ asitlerinin ortaya

çıkmasını sağlamaktadır [76]–[79]. Ayrıca self-katabolik bir süreç olarak bilinen otofajide sitoplazmik makromoleküller, hasarlı ya da yanlış katlanmış proteinler ve de bütün organeller lizozom tarafından yakalanır ve parçalanır [80], [81]. Bu fonksiyonlar, hücresel sağlığın korunmasında lizozomların temel bir rolü olduğunu vurgulamaktadır. Bu durum, hidrolazlar ve permeazlar gibi önemli lizozomal proteinleri etkileyebilen, genetik mutasyonlar, metabolik işlev bozuklukları, nörodejenerasyon ve ciddi büyüme bozuklukları ile karakterize lizozomal depo hastalıkları (LDH) olarak bilinen bir kalıtsal sendrom grubuna yol açabilir [82]–[84]. Özellikle, genetik veya çevresel faktörlerden kaynaklanan lizozomal işlev bozukluğu, artan bir nörodejenerasyon ve bilişsel bozulma riski ile güçlü bir şekilde ilişkilidir [18],[84]–[86]. Son yıllarda, artan çalışmalar, lizozom hakkındaki görüşümüzü yalnızca bir terminal yıkıcıdan ziyade hücresel adaptasyon için sofistike bir ağız merkezi düğümü olduğu yönünde radikal bir şekilde değiştirdi.

Lizozomal enzimler, salgı proteinleri ve plazma membran proteinleri ile birlikte, kaba endoplazmik retikulum üzerinde zara bağlı olan polizomlar üzerinde sentezlenirler. Lizozomal enzimlerin glikozidazlar, lipazlar, asit fosfatazlar ve sülfatazlar gibi farklı türleri de vardır [88]. Bu farklı türler, golgi aygıtındaki mannoz 6-fosfat reseptörlerine yüksek afinite ile bağlanmasına yol açan bir tanıma belirtecinin bu enzimlere yerleştirilmesiyle elde edilirler[89].

Lizozomların zarı, lümenin asidik pH'sini koruyan hücre içine proton taşıyan bir V tipi ATPaz, iyon taşıyıcıları ve lümen iyon bileşimini düzenleyen kanallar, birçok parçalanma ürününü taşıyan kanallar; sitozolde, zarı lizozomal hidrolazlar tarafından parçalanmaya karşı koruyan bir dizi glikozile edilmiş lizozom ile ilişkili zar proteinleri ve lizozomların diğer sitoplazmik organellerle teması ve füzyonunu destekleyen bağlanma faktörleri dahil olmak üzere 200'den fazla integral zar proteini içerir.

Lizozomlar, biyosentetik taşınma, endositoz, fagositoz ve otofaji yoluyla kendilerine verilen materyalleri parçalayabilirler. Hücre içi yıkımdaki belirgin rollerinden ötürü, lizozomlar hücrenin 'çöp atma sistemi' olarak ün kazanmışlardır. Ancak son yıllarda, sadece parçalayıcı organeller olan bu lizozom algısı, hücre içi patojenlerin öldürülmesi, antijen sunumu, plazma zarı onarımı, eksozom salıverilmesi, tümör invazyonu ve metastazı, apoptoz, metabolik sinyal ve gen regülasyonu, hücre adezyonu ve göçü de dahil olmak üzere diğer birçok hücresel sürece katıldığının farkedilmesiyle değişmeye

başlamıştır [90], [91]. Ek olarak lizozomal bozuklukların sadece nadir görülen LDH’lerde değil; AH, Parkinson hastalığı (PH) ve Huntington hastalığı (HH) ve amiotrofik lateral skleroz (ALS) gibi nörodejeneratif hastalıklarda da rolü olduğu gösterilmiştir [92], [93].



**Şekil 2-3. Lizozomların çoklu fonksiyonları konumlandırma ve hareketliliklerinden etkilenir.** Jing Pu vd [94]’nden Türkçe’ye uyarlanmıştır.

Otofaji lizozomal yolağı (autophagy-lyzosome pathway; ALP), yanlış katlanmış veya hasar görmüş proteinlerin ve işlevsiz organellerin temizlenmesinin yanı sıra membran biyogenezine ve veziküler taşınmaya katkıda bulunan karmaşık bir olaylar zinciridir [10], [11]. Bu hücrel makine, besin açlığı, oksidatif stres ve nöronal eksitotoksisite dahil olmak üzere çeşitli sinyallerle indüklenir [10], [12], [95]. Bu işlemle hücreler hasarlı veya gereksiz bileşenleri parçalayabilir, enerji ve hücrel tadilat için hücrel homeostazı koruyan substratları geri kazanabilirler [12].

Üç otofaji şekli vardır:

- Şaperon-aracılı otofaji: Spesifik motiflerin tanınması yoluyla seçici olarak lizozom içine sitoplazmik proteinlerin gönderilmesidir.
- Mikrootofaji: Sitoplazmik bileşenlerin doğrudan lizozom tarafından sarıldığı otofaji biçimidir[96].
- Makrofotofaji: Otofaji proteinlerinin hiyerarşik olarak aktivitesini düzenleyen; sitoplazmik bileşenlerin, otofaji vakuelleri tarafından yutulması ve lizozomlarla

füzyondan sonra proteazlar tarafından parçalanmasına yol açan otofaji şeklidir [97]–[99].

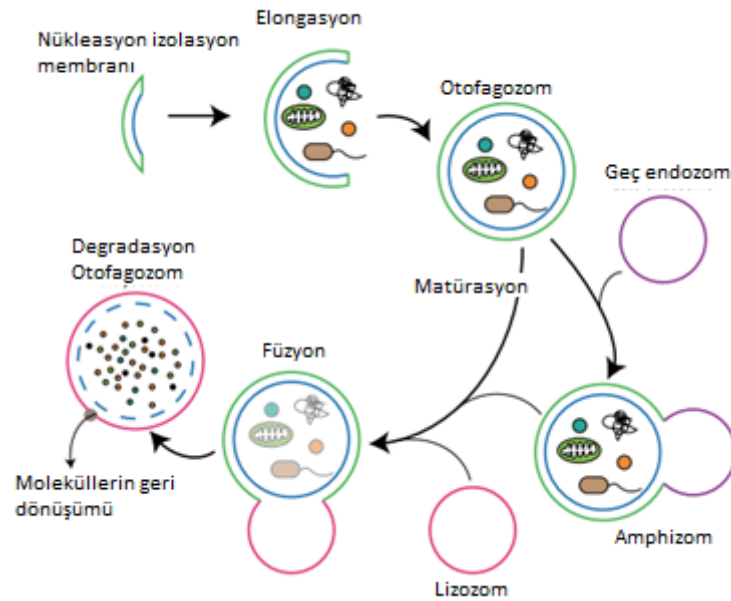
### 2.3. Otofaji-Lizozom Yolağı (ALP)

Otofaji kelimesi, Yunanca “oto” (öz) ve “faji” (yemek) köklerinden türemiştir ve genel olarak sitoplazmik hedef malzemenin parçalanma için lizozomlara taşındığı hücresel katabolik süreçleri ifade eder. Lizozom çalışmaları nedeniyle Nobel Ödülü'nü alan Christian de Duve, ilk kez 1963 yılında otofaji terimini kullanmıştır [100]

ALP, fagoforun doğumuyla başlar ve otofagozomun ölümüyle sona erer. Bu yolun hücresel ve moleküler yaşam döngüsü, 1950'lerin sonlarından beri araştırmacıları bu döngüyü araştırmaya itmektedir.

Otofaji birkaç aşamaya ayrılabilir:

- 1-İzolasyon zarının (fagofor) oluşumu (çekirdeklenme),
- 2-İzolasyon zarının uzaması (uzama) [101],
- 3-Otofagozomun tamamlanması ve taşınması (olgunlaşma),
- 4-Otofagozom ve lizozomun kenetlenmesi (füzyon)
- 5-Otolizozom içindekilerin parçalanması (bozunma) [102].

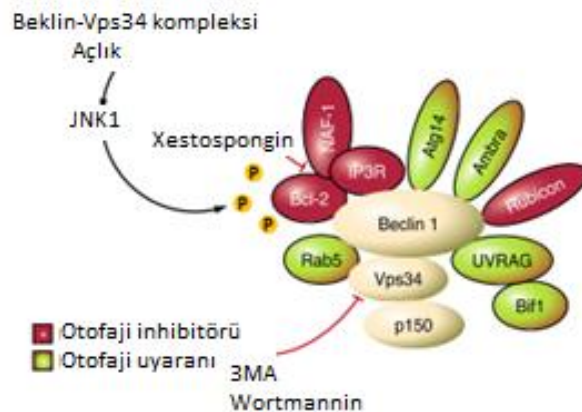


**Şekil 2.4. Otofajiye genel bakış.** Shuhei Nakamura vd [102]'nden Türkçe'ye uyarlanmıştır.

Mayalardan insanlara büyük ölçüde korunarak geçen otofaji, uzun ömürlü protein ve organellerin temizlenmesinde yer alan toplu bir parçalanma işlemidir. Otofaji sırasında, fagoforlar otofagozomlar denilen iki zarlı veziküller içinde [otofagosomal yapılar (fagozomal montaj bölgesi; Phagosomal Assembly Site, PAS) olarak da adlandırılır] uzarken, sitoplazmanın bir kısmını içine çeker. Bu evrede kaba endoplazmik retikulumun ön-otofagozomal yapıların hem dış hem de iç yüzeylerini çevrelediği bilinmektedir.

Ayrıca son zamanlarda, mitokondrinin açlık sırasında otofagozomlara bir membran kaynağı olabileceği de öne sürülmüştür.

Otofaji sırasında MTORC1(mammalian target of rapamycin complex 1 or mechanistic target of rapamycin complex 1-Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi)'in inhibisyonu, otofaji ön-başlatma kompleksi içeren unc-51 benzeri otofaji aktive edici kinazın (ULK-1) aktivasyonuna izin verir. Yeni otofagozom oluşumu, sınıf III fosfatidilinozitol 3-kinaz (PI3K), Vps34'ün aktivitesini gerektirir. Vps34 aktivitesinin ürünü olan fosfatidilinozitol-3 fosfat (PI3-P), otofaji yolunun ilk aşamalarında önemli bir rol oynar. Vps34, beclin 1/Atg6, Atg14/barkor ve p150/Vps15'ten oluşan otofajiyi düzenleyen makromoleküler kompleksin (PI3K kompleksi) bir parçasıdır [103]–[105]. Vps34'ün etkinliği, beclin 1 [106] etkileşimi ile artar. Birkaç beclin 1 bağlayıcı protein tanımlanmıştır ve bunların beclin 1 ile etkileşimlerinin bozulması, otofagozom oluşumunu etkiler. Ayrıca anti-apoptotik proteinler olan Bcl-2 veya Bcl-XL'in beclin 1'e bağlanması otofajiyi önler [107].



**Şekil 2-5. Beclin-Vps34 Kompleksi.** Brinda Ravikumar, vd [100]'nden Türkçe'ye uyarlanmıştır.

Otofagozomlar ilk önce, yakalanan sitozolik içeriğin parçalandığı asidik lizozomlarla birleşen amfizom adı verilen hibrid organeller oluşturmak için endozomlarla birleşmektedir.

Pre-otofagozomal yapıların uzamasında ubikütün benzeri iki reaksiyon söz konusudur. Tepkimelerin ilkinde ubikütün benzeri protein Atg12 kovalent olarak Atg5 [108] ile etiketlenir. Atg12 ilk önce Atg7 (E1 ubikütün aktive edici enzim benzeri) tarafından aktive edilir ve daha sonra Atg10'a (E2 ubikütün konjuge edici enzim benzeri) aktarılır. Atg12-Atg5 daha sonra Atg16L1 ile bir konjugat oluşturur. Bu kompleks (Atg12-Atg5-Atg16L1), pre-otofagozomal membranın uzaması için esastır. Oluştuktan sonra, ofagosomlar aktif olarak sitozol içerisinden mikrotüpler üzerinde taşınırlar ve burada olgunlaşırlar ve endozomal bölmeyle etkileşerek asitleşirler [109], [110].

İkinci ubikütün benzeri reaksiyon, mikrotübül-ilişkili protein 1 hafif zincir 3 (İngilizcesi italik; LC3)'ü içerir. LC3, proteaz Atg4B [111], [112] tarafından bir öncül form olarak sentezlenir ve bu, LC3-I sitozolik izoformunu oluşturur. LC3-I, LC3-II'yi oluşturmak için Atg7 (E1 benzeri) ve Atg3 (E2 benzeri) içeren bir reaksiyonda fosfatidiletanolamin (PE) ile birleştirilir [113], [114]. LC3-II spesifik olarak uzayan ofagosom membranını hedef alır ve otolizozomların sitoplazmik yüzünde LC3-II, Atg4 tarafından lipitten ayrılır ve tekrar döngüye katıldıktan sonra Atg12-Atg5-Atg16L1 kompleksinin aksine, tamamlanmış ofagosomlar üzerinde lizozomlarla kaynaşana kadar kalır [112].

Beklin 1 ile etkileşime giren bir protein olan UVRAG da, füzyon makinesini ofagosomlar üzerine alarak olgunlaştırma adımı da yer alır. Bu fonksiyon, beklin 1 ile olan etkileşiminden bağımsızdır [115].

Yakın zamanda tanımlanmış bir beklin 1 etkileşimli proteini olan rubikon ayrıca ofagosomların olgunlaşmasında da işlev görür [116], [117]

Otofaji, hücre içi ve hücre dışı maddeler tarafından düzenlenir ve en sık olarak, ofajinin merkezi bir baskılayıcısı olan mTOR1(The mammalian target of rapamycin-Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi)'in mekanik hedefine yaklaşan sensörlere zarar verir [118].

ALP, proteinlerin kalitesini denetleyen bir yolaktır ve hasarında mitokondri dinamiğinde defektler ve hücre içinde toksik materyallerin birikimiyle sonuçlanır. Bu da nörodegeneratif hastalıkların gelişmesi ve ilerlemesinde rol oynamaktadır.

Mitokondri, enerji üretiminde, kalsiyum homeostazında, hücre yaşamında ve ölümünde kilit rol oynadığından nörodejeneratif hastalıklarda görülebilen advers stimülasyonlar mitokondriyal dinamikte dengesizlik, serbest radikal üretimi, kalsiyum birikimi, intrinsik hücre ölümü yolunun aktivasyonu ve sonunda hücre ölümü ile sonuçlanabilmektedir [119]. Bu durum PH, HH, AH, ALS, Friedreich ataksisi ve Charcot-Marie Tooth gibi nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde rol oynamaktadır[120].

Yaşa bağlı proteostazda düşüş görülür. Bu yaşa bağlı düşüş, AH'de A $\beta$  ve tau proteinlerinin, PH'de  $\alpha$ -sinüklein nörodejeneratif hastalık proteinlerinin toksik birikimini kolaylaştırır [121], [122]. Bu patolojilerin ayırt edici özellikleri, amiloid benzeri  $\beta$ -fibrilleri içeren agregatların hücre içi veya hücre dışı birikimidir. Şaperonların, primer çekirdeklenme, fibrillerde uzama [123], [124],fibril yüzeyinden sekonder çekirdeklenme ve toplama kaskadının [125] çeşitli aşamalarına müdahale ettiği gösterilmiştir. Ribozom üzerinde yanlış çeviri sonucu oluşan polipeptit zincirleri ribozom kalite kontrol makineleri ve ubikütin-proteazom sistemi (UPS) tarafından etkin bir şekilde temizlenemediğinde toksik agregatlar birikir [126]–[129]. A $\beta$  ve tau proteinleri gibi toksik agregatlar da AH'nin erken döneminde kritik öneme sahiptir. Otofaji, nöronlarda esansiyel homeostatik bir yoldur [130], [131]. Diğer hücrelere benzer şekilde nöronal hücrede de yaşlanma süreciyle birlikte uygun hücre içi homeostazı korumak için otofaji ile temizlenmesi gereken hücre için toksik maddeler veya hasar görmüş mitokondri gibi organelleri biriktirme görülebilmektedir [132]. Bununla birlikte, diğer hücre tiplerinin aksine, nöronlar toksik maddeyi asla mitozla azaltamayan post-mitotik hücredir. Bu nedenle otofajiye bağımlı protein/organel klirensi nöronlarda daha önemli olmaktadır [133].

#### **2.4. Otofaji-Lizozom Yolağı (ALP) ve Alzheimer Hastalığı ile ilişkisi**

Yu ve diğ., 2005 yılında nöron dendritlerinde ve somada biriken otofajik vakuollerin A $\beta$  plakları ortaya çıkmadan önce bile var olduğunu göstermiştir [134]. Ayrıca bazı otofajiye bağlı proteinlerin ekspresyonlarındaki değişiklikler, AH'de otofaji fonksiyon bozukluğunu da göstermiştir. Örneğin, Rubinsztein, Alzheimer hastalarının erken evresinde lizozomal proteaz ekspresyon seviyesinin arttığını bildirmiştir [135].Yakın zamanda Drosophila melanogaster'ler üzerinde yapılan bir çalışma, yaşlanmayla birlikte otofaji aktivitesinin azalmasının ve A $\beta$  üretiminin aşırı artmasının, geç başlangıçlı

nöronal disfonksiyon ve AH'nin fenotipiyle korele olduğunu [136] ve bu durumun da otofajiye bağlı gen ekspresyonunun yaşa bağlı azalmasının AH'nin geç başlangıcı ile ilişkili olduğunu düşündürmüştür.

Alzheimer hastalarında görülen A $\beta$  plakları ve nörofibriler yumaklar bu hastalıktaki iki önemli nöropatolojik değişikliktir. Ortaya çıkan kanıtlar, AH'nin ilerlemesine yol açabilecek otofaji, A $\beta$  ve tau proteinleri arasında karmaşık etkileşimler göstermiştir. İlki olan otofaji, APP, A $\beta$  ve amiloid prekürsör proteinin parçalanmış C terminali fragmanı (APP-CTF) dahil olmak üzere tüm APP parçalanma ürünlerinin parçalanmasını ve temizlenmesini kolaylaştırır [137]–[139]. Mikroglia içindeki A $\beta$ , otofaji reseptörü optinörin vasıtasıyla parçalanır[140].

İkincisi de fizyolojik koşullar altında A $\beta$ 'nin parçalanması için önemli olan ALP ve ayrıca patolojik koşullarda veya yaşlanma sürecinde A $\beta$  üretimi için yeni bir yol olduğudur [134]. A $\beta$ 'nin lizozom, endoplazmik retikulum ve golgi aygıtında üretildiği düşünülmekle birlikte, çalışmalarda otofaji aktivasyonu sonrası otofajik vakuollerde A $\beta$  oluşumunun tespit edildiğine dair kanıtlar bulunmuştur [141].

Üçüncüsü, otofaji A $\beta$  salıverilmesinde da rol oynar. Son bulgular, otofajinin A $\beta$ 'nin hücre dışı salıverilmesinden sorumlu olduğunu desteklemektedir. Otofaji eksikliği olan farelerde yapılan bir çalışma otofaji eksikliğine bağlı hücre dışı A $\beta$  sekresyonunun % 90 oranında azaldığı, otofajinin restorasyonu ile birlikte A $\beta$  sekresyonunun normal seviyelere çıktığını ortaya koymuştur [142].

Taunin yıkılımı için, UPS ana yol olarak kabul edilmesine rağmen, son zamanlarda yapılan çalışmalarda, otofajinin tau için başka bir etkili parçalanma rotası olduğu ileri sürülmüştür [143], [144]. Ayrıca, otofaji tau'nun fosforilasyon durumunu etkileyebilir. Hiperfosforile tau, otofaji yapamayan farelerin beyinlerinde birikmiş ve bu fosfo-tau birikimi, beyin yeniden otofaji yapabilir hale geldikten sonra büyük ölçüde azalmıştır [145]. Öte yandan tau hiperfosforilasyonu, otofaji fonksiyon bozukluğuna neden olabilir [146], [147]. Tau, otofagozomun geriye dönüşünü (autophagosome retrograde trafficking) ve otofagozomun olgunlaşıp lizozomla kaynaşması için kritik olan mikrotübül montajını ve stabilizasyonunu kolaylaştırmak için ayrıntılı olarak açıklanmıştır. Ancak hiperfosforile tau, otofagozomun geriye dönüşünü inhibe edebilir ve böylece aksonlarda olgunlaşmamış otofagozomları biriktirebilecek olan mikrotübül hücre iskeletinin dengesizleşmesine ve parçalanmasına yol açabilir[133].

Alzheimer hastalarının beyinlerinde yıllardır yapılan patolojik incelemelerde, AH'nin hem erken hem de geç evresinde anormal aksonal taşınma birçok kez tanımlanmıştır [148]. Aksonal transport, nöronal homeostazı sürdürmek için gerekli bir süreçtir. Bozulmuş aksonal taşınma, akson dejenerasyonuna neden olabilir ve AH de dahil olmak üzere birçok nörodejeneratif hastalıkta gözlemlenmektedir [149]. Memeli hücrelerinde, yeni oluşan otofagozomlar mikrotübül hattı ile hareket ederler. Bu işlem sırasında otofagozomlar uzun ömürlü proteinleri, yanlış katlanmış proteinleri veya mitokondri gibi zarar görmüş organelleri içine çeker ve daha sonra lizozomla kaynaştıktan sonra parçalanırlar. Aksonal taşımadaki eksiklikler genellikle büyük miktarlarda otofagozom birikimine neden olur [133]. Ayrıca fosforile tau seviyesi, aksonal taşınım ve bozulmayı da etkiler [150]. Bu verilerin ışığında anormal protein birikimlerinin aksonları bozduğunu ve böylece otofagozomların sitoplazmaya taşınamadıklarını ve lizozomlarla kaynaşmadıklarını desteklemiştir. Bunun aksine, bazı çalışmalar, lizozomal proteaz anormalliklerinin aksonal dejenerasyonun nedeni olduğu yönündedir [151]. Ancak sonuç olarak bu transport mekanizmasının bozulmasının altında yatan mekanizmalar hala net değildir.

Şu an AH tedavisi için mevcut olan ilaçların çoğu, kolinerjik hipoteze göre geliştirilmiştir. Bazı geleneksel Çin bitkileri de AH tedavisinde potansiyel etkiler göstermektedir[152], [153]. Bununla birlikte, bu ilaçlar sadece AH'nin bazı semptomlarını hafifletebilir. AH patogenezi önlemek için yenilikçi ilaçların geliştirilmesi, her zaman dikkat çeken bir alan olmuştur. AH'nin anormal protein birikiminden kaynaklanması nedeniyle, toksik agregatların parçalanmasını artırabilen yeni stratejiler etkili tedavi için şarttır. Birikmiş proteinlerin ve organellerin temizlenmesi için ana yolu temsil eden otofaji, AH patogenezi bloke etmek için ortaya çıkan ve gelecek vaad eden bir terapötik hedef görevi görebilir.

Otofajinin ana bir düzenleyicisi olarak mTOR, otofajinin düzenlenmesi için farmakolojik bir hedef olarak kabul edilmektedir. Ayrıca son yıllarda yapılan araştırmalar da mTOR ile ilişkili proteazların AH karşıtı ilaç hedefi olarak potansiyel bir rol oynadığını ortaya koymuştur. Bugüne değin yapılan çalışmalarla mTOR'u düzenleyebilme etkisi olan kimyasalların dozları tanımlanmış olup ve bazıları AH tedavisi için yakın gelecekte potansiyel aday olabilirler[133].

Her ne kadar bazı otofaji indükleyicileri diğer nörodejenerasyon hastalıklarında ümit verici bir etki gösterse de, seçici otofaji düzenleyicisinin AH tedavisi için potansiyel ilaçlar olarak tanımlanması için araştırmalar halen devam etmektedir[133].

Farmakolojik kimyasallara ek olarak, gen terapisi de AH gündeminde yerini almaya başlamıştır. Gen terapisi fonksiyonun avantajı doku yönelimi ile seçici bir yaklaşım olmasıdır. Çeşitli çalışmalar, lentivirüs veya adenovirüs-ilişkili viral uygulamanın otofajiyi düzenleyerek yaşlanma ve nörodejeneratif hastalıklar da dahil olmak üzere çeşitli insan hastalıklarında olumlu etkileri olduğunu göstermiştir.

Ayrıca başka bir gen terapisi yöntemi de iyi bilinen bir otofaji indükleyicisi olan BECN1 gen kodlu protein beclin-1 üzerine yapılmıştır.

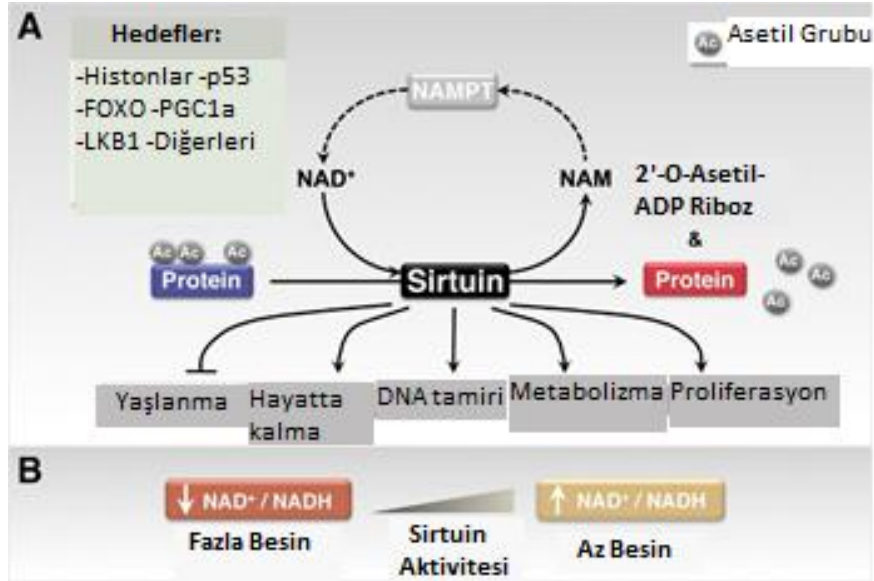
Şimdiye kadar, gen terapisi ile otofajiyi arttırmayı düşünen çok az çalışma yayınlanmıştır. Devam eden araştırmalar bu yeni yaklaşımın başarılı bir şekilde uygulanması için muazzam bir potansiyele sahip görünmektedir [133].

## 2.5. Sirtuinler

Bu sinyal yollarından birisi de Sirtuin (SIRT, silent information regulators of gene transcription; gen transkripsiyonunun sessiz bilgi düzenleyicileri) ailesidir. SIRT, aktivasyonu ve düzenlenmesi nikotinamid adenin dinükleotide (NAD<sup>+</sup>) bağlı bir histon deasetilaz enzimidir. Sinir hasarına karşı hedefe yönelik stratejilerin yeni tedavi anlayışını oluşturduğu günümüzde SIRT1 bu amacı gerçekleştirecek yeni, güvenli ve etkili tedavi stratejilerinin belirlenmesine aday bir molekül olma yolunda ilerlemektedir.

Şimdiye kadar sirtuinlerin memeli hücrelerinde ortak katalitik bölgeye ve NAD<sup>+</sup>-bağlama bölgesine sahip yedi izoformu (SIRT1-7) tanımlanmıştır. SIRT1 sitoplazmada ve çekirdekte; 6 ve 7 çekirdekte; 3, 4 ve 5 mitokondride yerleşiktir. SIRT2 fizyolojik şartlarda sitoplazmada bulunurken bazı durumlarda çekirdeğe de transloke olabilmektedir.

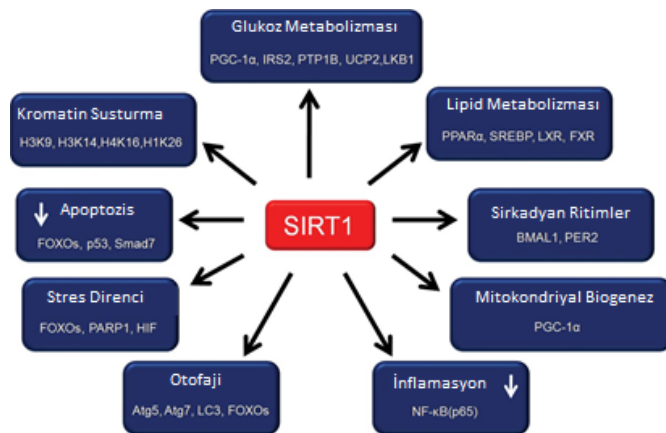
Sirtuinlerin hücrel immünitede, otofaji indüksiyonunda, apoptozun inhibisyonunda, oksidatif strese, kan basıncının düzenlenmesinde, fibrozisin ve metabolizmanın düzenlenmesinde ve inflamasyonun baskılanmasında rolleri bulunmaktadır [154], [155].



**Şekil 2-6. Sirtuin protein deasetilaz ailesi.** Mark F. Oellerich vd [156]'nden Türkçe'ye uyarlanmıştır.

Sinir hücreleri, primer nöronlar ve nörolojik fare hastalık modellerinde yapılan araştırmalar bu ailenin üyesi olan SIRT1'in hasara karşı nöron koruyucu etkisini işaret etmektedirler[157].

SIRT1'in stres cevabına, apoptoza, mitokondri fonksiyonlarına, hücre yenilenmesine ve sinir hasarına karşı koruyucu etkinliği bilinmektedir ve çeşitli metabolik ve sinyal proteinlerinin deasetilasyonunda rolü bulunmaktadır.



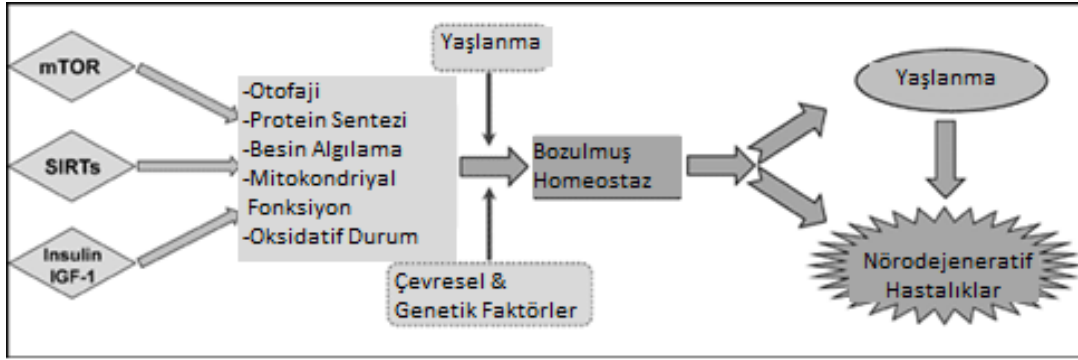
**Şekil 2-7. SIRT1'in hedefindeki fizyolojik olaylar.** Hayat vd.[158]'nden Türkçe'ye uyarlanmıştır.

AH'de SIRT1 ekspresyonunun azaldığı, APP'nin arttığı tespit edilmiştir. AH'de düşen SIRT1'in ekspresyonunun artan NF $\kappa$ B aktivitesine bağlı olduğu ve bunun da A $\beta$  toksisitesi ve inflamatuvar yollara aracılık ettiği gösterilmiştir. SIRT1 aksonları hasardan korumakla kalmayıp hipokampüste hafıza ve sinaptik plastisiteden de sorumludur. SIRT1 eksikliği/kaybı A $\beta$  ve mikrotübül bağımlı protein tau'nun Alzheimer'li hastaların beyin korteksinde birikimine yol açmaktadır [159]. A $\beta$ 25-35'in toksik fragmanı A $\beta$ 25-35'e maruz kalan SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde sinir koruyucu SIRT1 ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir [160]. AH'da A $\beta$ 25-35 biriken bölgenin çevresinde yer alan astrositlerde de SIRT1 protein ekspresyonunda azalma gözlenmiştir [161]. Intrahipokampal A $\beta$  enjekte edilen sıçan AH modelinde melatoninin hipokampal SIRT1 ekspresyonunu arttırarak sinir koruyucu etki gösterdiği bulunmuştur[162]. ApoE4 eksprese eden fare AH modelinde, ApoE4 hedefli potansiyel terapötik bir aday ilaç olan A03'ün hipokampüste azalmış SIRT1 seviyesini geri çevirerek sinir koruyucu etki gösterdiği ve hafıza fonksiyonlarını düzelttiği gözlenmiştir[163].

PH, çoklu sistem atrofisi ve Lewy cisimcikli demans gibi nörodejeneratif hastalıklarda rol oynayan  $\alpha$ -sinüklein agregatlarının biriktiği fare beyinlerinde SIRT1 ekspresyonu düşmektedir[164].

Mitokondri hasarı nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde başı çekmektedir [165]. Mitokondri hasarı hücrede enerji yoksunluğuna, serbest radikal üretiminde artışa, proapoptotik faktörlerin mitokondri dışına sızmasına, oksidatif strese ve AH, PH, HH, ALS ve Down sendromu (DS) gibi nörodejeneratif hastalıklarda gözlenen hücre ölümüne neden olmaktadır [166]. SIRT1, enerjiye duyarlı ana molekül AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK; AMP activated protein kinase) ile sinerjistik olarak beraber çalışmaktadır. Nörodejeneratif hastalıklarda hasarlı mitokondrinin AMPK/SIRT1 aksinin inhibisyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ek olarak AMPK aktivasyonu mTOR (mammalian target of rapamycin) kompleksini baskılayarak otofaji ilişkili mekanizmalarla nöral enerji statüsünü yükseltmektedir. AMPK aktivasyonu mTOR ilişkili mekanizmalarla otofajiyi uyararak nöronal fonksiyonları korumaktadır [167]. Sirtuin deasetilaz aktivitesinin esansiyel substratı NAD<sup>+</sup> seviyelerindeki düşüş mitokondri hasarı ile de ilişkilidir. Böylelikle, NAD<sup>+</sup>-bağımlı SIRT1 aktivitesindeki

düşme otofaji-lizozom işlevini hasarlayarak mitokondri homeostazında değişikliğe ve hasarlı mitokondri birikimine neden olmaktadır [168]. Çok sayıda araştırma sinir hücrelerinde yaşlanma, hasarlı otofaji ve spontan apoptozun nörodejenerasyona neden olduğunu kanıtlamaktadır [169]. Ketojenik diyetin SIRT1 seviyesini arttırıp mTOR seviyesini azaltarak beyinde makrotofajiyi arttırdığı gösterilmiştir [170].



**Şekil 2-8. Nörodejeneratif hastalık oluşumunu etkileyen faktörler.** Caio Mazucanti, vd [171]'nden Türkçe'ye uyarlanmıştır.

ALP proteinlerin kalite kontrolünden sorumlu bir yolaktır ve ALP'nin hasarı toksik proteinlerin, fonksiyon görmeyen mitokondri gibi hasarlı organellerin birikimine neden olarak nörodejeneratif hastalıkların gelişimi ve ilerlemesine neden olmaktadır. Ribozomal stres durumunda ribozom kalite kontrol (ribosome quality control; RQC) sistemi hasarlanmaktadır. Mitokondri ile benzer olarak RQC mekanizması aşırı sentezlenen proteinlerin birikimini önleyen bir sistemdir. RQC'deki işlev bozukluğu da düzensiz proteinlerin birikimine ve sinir hasarına neden olur [128]. SIRT1 aşırı ekspresyonunun endoplazmik retikulum stresini azaltarak sitotoksik durumlara karşı hücreyi koruduğu gösterilmiştir. SIRT1'in yaşamın uzamasında anahtar rol oynadığı gösterilmiştir [172]. SIRT1 NAD<sup>+</sup>'yi ko-substrat olarak kullanarak histonları, çeşitli sinyal proteinlerini ve DNA tamir faktörlerinin deasetilasyonunu gerçekleştirir. Sirtuinlerin beyin farklı gelişim evrelerini düzenlediği de bilinmektedir. SIRT1 aktivitesindeki azalmanın sıçan ve insan beyinde proapoptotik asetillenmiş p53 seviyesindeki artış ile paralel gittiği bulunmuştur [173]. Kalori kısıtlaması ve açlığın SIRT1 ekspresyonunu arttırarak p53 ve diğer bazı proteinlerin deasetilasyonunu sağladığı ve bu yolla DNA tamirine katılan genlerin yaşamlarını uzattığı gösterilmiştir. SIRT1 yoksunluğu yaşlanma kanser ve tip 2 diyabet ile ilişkilidir [174]. AH ile

bağlantısı olduğu düşünölen ve obezite, insölin direnci, tip 2 diyabet ve metabolik sendrom gibi hastalıklarla kanda dolaşımı artan bir trigliserid olan palmitik asitin, nöronlarda NAD<sup>+</sup> miktarını düşöürerek SIRT1 aktivitesini inhibe ettiğı ve BACE1 aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir[175]. Çalışmalar depresyonda da beyinde SIRT1 seviyesinde azalmanın olduğunu göstermiştir[176]

SIRT1'in farmakolojik aktivasyonunun ve ekspresyonunun nörodejeneratif hastalık patogenezinin azalttığı gözlenmiştir. Bununla ilgili en etkin çalışmalar bir bitkisel polifenol olan resveratrol ile yapılmıştır. Resveratrol aynı zamanda nonspesifik fosfodiesteraz enzim (PDE) inhibitörüdür ve cAMP/AMPK/SIRT1 sinyal yolağını indüklemiş ve beynin ATP enerji tüketimini yeniden düzenleyerek sıçanda iskemik inmeye karşı sinir koruyucu etkinlik göstermiştir [177]. AH'da SIRT1 aktivasyonu otofaji aracılı mekanizma ile tau agregasyonunu inhibe edebilmektedir [178]. SIRT1'in farmakolojik aktivasyonu asetillenmiş p53 ve diğör proapoptotik faktörlerin down-regölasyonuna neden olarak nöron ölümünü önlemektedir [179]. SIRT-AMPK yolağının aktivasyonu otofaji aracılı mekanizmalarla hücre ömrünün uzamasını düzenler [180]. Nonspesifik PDE inhibitörü (PDEİ) olan bitkisel polifenol resveratrolün SIRT1/AMPK aktivasyonu yaparak nörit uzaması ve nöral plastisiteye neden olduğu gösterilmiştir [181], [182]. PC12 hücrelerinde A $\beta$ 25-35 ile oluşturulan nörotoksisitenin resveratrol ile indüklenen otofaji yoluyla azaldığı ve bu azalmada SIRT1 artışının kısmen katkısı olduğu gösterilmiştir[183].

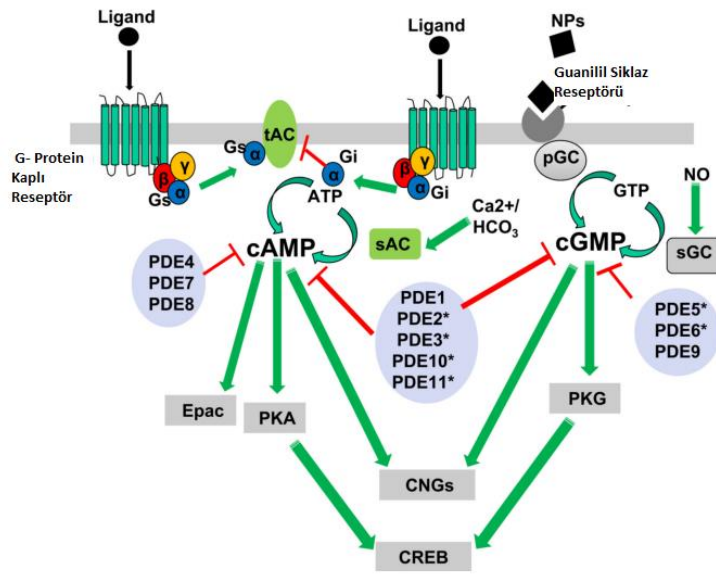
Benzer çalışmalar spesifik PDE3 inhibitörü silostazol ile de yapılmıştır. Bu bileşiğın nöronal hücrelerde SIRT1 ekspresyonunu arttırdığı ve endojen A $\beta$  üretimini baskıladığı [184] gösterilmiştir. Ek olarak aynı nöron hücrelerinin dışarıdan A $\beta$ 25-35 maruziyeti ile ya da transgenik olarak endojen A $\beta$  sentezleyen hatlarında azalan SIRT1'nin ve yanı sıra beclin-1, Atg5, LC3-II gibi otofaji proteinlerinin ekspresyonlarının silostazol tedavisi ile arttığı gösterilmiştir [185].

Zerdeçalın etken maddesi kurkuminin PDE4D enzim inhibitörü etki göstererek hafıza fonksiyonlarını arttırdığı ve bu etkisini SIRT1 üzerinden yaptığı düşünölmektedir[186].

Resveratrol gibi nonspesifik ve kurkuminin ve silostazol gibi spesifik iki PDE inhibitörünün SIRT1, AH hastalık modelleri ve otofaji üzerindeki etkileri bizi bu enzim ve inhibitörleri üzerinde yapılan diğör SSS çalışmalarını detaylı incelemeye itmştir.

## 2.6. Fosfodiesteraz Enzimi, İnhibitörleri ve Beyindeki Önemleri

Fosfodiesterazlar (PDE'ler), ikincil ulaklar olan siklik adenosin monofosfat (cAMP) ve siklik guanosin monofosfatları (cGMP) kendi inaktif 5'-monofosfatlarına metabolize eden metallofosfohidrolaz enzimleridir. Diğer bir deyişle PDE'ler, ikincil ulak siklik nükleotidlerden cAMP ve cGMP'nin kendi asiklik türevlerine (AMP, GMP) hidrolizini katalize eden enzimlerdir.



**Şekil 2-9. CAMP ve cGMP sinyallerinin sentezlenmesi, yürütülmesi ve parçalanmasından sorumlu sinyal kaskadları.** Kelly vd [187]'ten Türkçe'ye uyarlanmıştır.

Tek tek PDE izoformlarını kodlayan ve 21 memeli genini kapsayan 11 familya tanımlanmıştır. Fosfodiesterazlar, farklı posttranslasyonel modifikasyonlara göre sınıflandırılmışlardır: 11 yapısal olarak benzer, işlevsel olarak farklı aileye (PDE1-PDE11) ayrılırlar ve hidrolizine neden oldukları siklik nükleotid substratına (cAMP ve / veya cGMP) göre tanımlanırlar. Bazı PDE'ler spesifik olarak cAMP'yi (PDE4, PDE7 ve PDE8) hidrolize ederken, diğerleri cGMP'yi (PDE5, PDE6 ve PDE9) hidrolize eder. Diğerleri ise her iki siklik nükleotidi de hidrolize eder (PDE1, PDE2, PDE3, PDE10 ve PDE11. Bu enzimlerin tümü beyinde de eksprese edilmektedir (Tablo1)[188].

**Tablo 1-1. PDE Ailesinin Substrat Çeşitleri ve Dağılımları.** M.D. Houslay vd [188]'nden Türkçe'ye uyarlanmıştır.

| Tablo 1 PDE Ailesinin Substrat Çeşitleri ve Dağılımları |                    |                                                                          |
|---------------------------------------------------------|--------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| PDE                                                     | Substrat Çeşitleri | Ana Doku Lokalizasyonu                                                   |
| 1                                                       | cGMP>cAMP          | Beyin,kalp, damar düz kası                                               |
| 2                                                       | cGMP=cAMP          | Adrenal korteks, beyin,kalp, korpus kavernozum                           |
| 3                                                       | cAMP/cGMP          | Kalp, korpus kavernozum, karaciğer,pankreas, damar düz kası, plateletler |
| 4                                                       | cAMP               | Akciğer, mast hücreleri, damar düz kası                                  |
| 5                                                       | cGMP               | Korpus kavernozum, Akciğer, damar düz kası, plateletler, beyin, özofagus |
| 6                                                       | cGMP>cAMP          | Retina                                                                   |
| 7                                                       | cAMP>cGMP          | İskelet kası, T hücreleri                                                |
| 8                                                       | cAMP               | Testis,Tiroid                                                            |
| 9                                                       | cGMP               | Genel olarak exprese edilir, özel olarak tanımlanmamış.                  |
| 10                                                      | cGMP>cAMP          | Beyin, testis                                                            |
| 11                                                      | cAMP=cGMP          | İskelet kası, prostat, karaciğer, böbrek,hipofiz, testis                 |

Beyinde spesifik PDE inhibitörleri kullanılarak yapılan ilk fonksiyonel in vivo bölgesel taramalarda kortekste PDE1, -2 ve -5/9'un cGMP'yi parçaladığı, PDE9'un hipokampuste majör rol oynadığı, PDE5/9 ve PDE1'in en çok aktif olan PDE'ler olduğu ancak PDE2 ve -3'ün de degradasyona katıldığı, beyincikte PDE5/9'un cGMP'yi hidroliz eden ana enzim olduğu ancak PDE1 ve -4'ün de önemli oranda parçalanmaya katkıda bulunduğu bildirilmiştir[189].

PDE izoformları türe özgü (sıçan, fare, insan) ekspresyon paterni göstermektedir. PDE1B, PDE1C, PDE2A, PDE4A, PDE4D, PDE5A, PDE7A, PDE8A, PDE8B, PDE10A ve PDE11A'nın mRNA ekspresyonları, en az bir ila dört beyin bölgesinde (hipokampus, korteks, striatum ve serebellumda) yaşa bağlı artış ya da azalma göstermektedir. PDE1A, PDE3A, PDE3B, PDE4B, PDE7A, PDE7B ve PDE9A'nın mRNA ekspresyonları ise yaşla değişmemektedir. PDE11A4, PDE8A3, PDE8A4/5 ve PDE1C1'in protein ekspresyonları yaşa bağlı olarak artmaktadır. Yaşa bağlı PDE

değişiklikleri sadece ekspresyon düzeyinde değil PDE'nin bölgesel yerleşiminde de göze çarpmaktadır[187], [190].

PDE inhibitörleri, pulmoner hipertansiyon (PDE5 inhibitörü sildenafil), erektil disfonksiyon (PDE5 inhibitörleri sildenafil, vardenafil, tadalafil), kronik obstrüktif akciğer hastalığı (PDE4 inhibitörü roflumilast), sedef hastalığı ve psoriatik artrit (PDE4 inhibitörü apremilast) ve kalp yetmezliği (PDE3 inhibitörü milrinon) gibi bir dizi hastalık için tedavi potansiyeli göstermişlerdir. Ancak son zamanlarda PDE inhibitörlerinin nörolojik ve psikiyatrik hastalıklardaki etkilerine de vurgu yapan çalışmalar gündemdedir. Siklik nükleotid hidrolizinin selektif PDE inhibitörleri ile bloke edilmesinin faydası depresyon, şizofreni, AH ve iskemi gibi çeşitli beyin patolojilerinde görülebilmektedir. Üstelik PDE inhibitörleri, beyinde sıklıkla gözlenen bilişsel düşüş ve duygulanım bozukluklarının tedavisinde terapötik araçlar olarak düşünülmüştür. Günümüzde PDE inhibitörlerinin hem yaşa bağlı bilişsel düşüş hem de AH'nin tedavisinde potansiyel tedavi stratejisi olarak kullanılması kayda değer bulunmaktadır. cAMP ve cGMP'nin nöronal plastisite üzerindeki varsayılan etkileri nedeniyle, PDE inhibitörleri, SSS bozuklukları için potansiyel yararlar sağlayabilirler. İnsan beyninde bol miktarda PDE ekspresyonunun gösterilmesi, sinir iletiminde ve sinaptik plastisitede etkin siklik nükleotidlerin metabolizasyonu için gerekli olduklarına işaret etmektedir. Bu da nörolojik ve psikiyatrik bozuklukların tedavisi için uygun beyin penetrasyonuna sahip selektif PDE inhibitörlerini keşfetme çabalarını haklı kılmaktadır. Beyin penetrasyonu olan PDE10A inhibitörleri şizofreni ve HH tedavisinde ilaç adayları olarak açıklanmışlardır. Bunun yanı sıra PDE9A inhibitörleri bilişsel bozuklukların tedavisinde aday gösterilmiştir. Bu bulgular, cGMP ve cAMP'in bellek üzerinde farklı bölge ve zamanlardaki etkilerini işaret etmektedir. Siklik nükleotidleri seçici olarak hidroliz eden PDE'lerin inhibisyonunun, bellek performansını arttırmak için güvenilir bir yöntem olabileceği öne sürülmüştür. Duygulanım bozuklukları ve/veya bilişsel işlevleri etkileyen hastalıkların terapötik hedefleri açısından PDE'lerin potansiyellerine olan ilgi artmaktadır[191]–[193]. Genel olarak PDE'ler, hücre çoğalması ve farklılaşması, gen ekspresyonu, inflamasyon, apoptoz ve metabolizma gibi sayısız fizyolojik süreçlere katılırlar. Beyinde, cAMP/protein kinaz A (PKA)/cAMP'ye duyarlı element bağlayan protein (CREB) ve cGMP/protein kinaz G (PKG)/CREB sinyal yollarının aktivasyonu, uzun süreli potansiyasyon (LTP; long term potentiation) bilişsel hafıza ve bellek oluşumu ile ilişkilendirilmiştir. İkincil ulak cAMP, PKA

aracılığıyla CREB'i aktive eder ve böylelikle beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) gibi sinaptik plastisiteyle ilişkili genlerin transkripsiyonunu düzenleyebilir. cAMP/PKA/CREB yolağı, hafızanın nörofizyolojik kontrolünü sağlayan LTP'nin artırılmasında rol oynar[194]. Bir çalışmada HT-22 hücrelerinde A $\beta$ 25-35 uygulaması ile artan mitokondriyal Ca<sup>2+</sup> yükünün ve ROT üretiminin PDE5 inhibitörü sildenafil ve selektif ATP-duyarlı K<sup>+</sup> kanal (KATP) aktivatörü diazoksit ile baskılandığı gözlenmiştir. Sildenafil ve diazoksitin bu etkisinin KATP inhibitörü 5-hidroksidekanoik asit ile ortadan kalkması sildenafilin KATP bağımlı etki ile nöronal koruma yaptığını düşündürmektedir[195].

### 2.6.1. Fosfodiesteraz 1 ve inhibitörleri

cAMP ve cGMP gibi siklik nükleotidler sinaptik plastisite, hafıza ve öğrenmede önemli rol oynarlar. Siklik nükleotidlerin cAMP cevap elementi bağlayan protein yoluyla (CREB) PKA ve PKG'yi aktive etmeleri bilişsel fonksiyonlarda önemlidir. PDE enzim inhibisyonu ikincil ulak aracılı sinyalleme ve bunun sonucunda hafıza ve öğrenme fonksiyonlarını tetiklemede önemlidir. Tip I fosfodiesterazlar (PDE1) Ca<sup>2+</sup>-kalmmodulin aracılı fosfodiesteraz ailesindendir ve hem cGMP'nin hem de cAMP'nin degradasyonunda rol oynarlar. PDE1'in hipokampal ve kortikal nöronlarda anlamlı oranda ekspresyonu hafıza oluşumu ve depolanmasında önemli bölgelerin hücrelerarası cGMP ve cAMP seviyelerini kontrol ettiğinin bir göstergesidir. cGMP/PKG/CREB ve cAMP/PKA/CREB yolakları PDE inhibitörlerinin bilişsel faaliyetleri artırıcı etki gösterdiği yolaklardır. Vinposetinin CREB fosforilasyonu yaparak sıçanlarda hafıza fonksiyonlarını arttırdığı gösterilmiştir. Vinposetin vinkamin alkaloidinin sentetik türevidir ve serebrovasküler orjinli SSS hastalıklarının tedavi ve önlenmesinde yaygın olarak kullanılır. Serebral kan akımını da arttırdığı gösterilmiştir. PDE1 inhibisyonu sGMP seviyesini artırarak serebral arter dilatasyonu yapar. Vinposetinin veratridinin indüklediği Na<sup>+</sup> kanal aktivitesini ve glutamat salıverilmesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Vinposetin LTP'yi artırır ve dendritlerin yapısal dinamiklerini artırarak hafızada rol oynar, skopolaminin yaptığı hafıza kaybını geri döndürür ve insanda bilişsel fonksiyonlarda artışa neden olur. Streptozotosinin deneysel olarak sıçanlara icv enjeksiyonu, sporadik AH'da gözlenen nöropatolojik ve biyokimyasal değişikliklere neden olarak AH'ın erken patofizyolojik değişikliklerini taklit eden geçerli bir modeldir. Vinposetinin bu modelde bilişsel fonksiyonlar ve oksidatif stres üzerine olan etkileri

incelenmiş ve streptozotosinin oluşturduğu davranış değişikliğini, kolinerjik fonksiyon bozukluğunu ve oksidatif-nitritif stresi (MDA, LDH, nitrit artışı, GSH azalması) geri çevirdiği gözlenmiştir[196].

Beyinde bilateral arter oklüzyonu ile gerçekleştirilen kronik hipoperfüzyon modelinde, melatoninin MT1 ve MT2 reseptör agonisti agomelatin ve PDE1 selektif inhibitörü vinposetinin vasküler demansı, bilişsel fonksiyonları, kolinerjik fonksiyon kaybını ve oksidatif stresi (katalaz, glutasyon ve superoksit dismutaz enzimindeki azalmayı, malondialdehit artışını) geri çevirdiği, infarkt bölgesinde anlamlı azalma yaptığı gözlenmiştir [197].

Bir grup tiyanotriazolo pirimidinon yapıları potent PDE1 inhibitörler keşfedilmiş ve bu inhibitörlerden DNS-0056 kodlu maddenin, X-ray kristalografisinde PDE1B ve PDE10A katalitik bölgesine sahip olduğu bulunmuştur. Optimizasyon çalışmalarında bu maddenin PDE1B potansi ve PDE selektivitesine sahip olduğu gözlenmiştir. 6-(4-metoksibenzil)-9-((tetrahidro-2H-piren-4-metil)-8, 9, 10, 11-tetrahidropirido [4',3':4,5]tiyeno[3,2-e][1,2,4]triazol[1,5-c] pirimidin-5(6H)on yapısına sahip bu bileşiğin oral biyoyararlanımının ve beyin penetrasyonunun yüksek olduğu gözlenmiştir. Yüksek PDE1B enzim inhibisyonu yapabilen bu kimyasalın obje tanıma testinde kuvvetli hafıza arttırıcı etkisi olduğu gözlenmiştir[198].

PDE1 inhibitörü vinposetin ve KATP kanal açıcı nikorandilin 3- nitropropionik asit ile oluşturulan HH modelinde azalan kilo kaybını, lokomotif aktivite kaybını, bozulan bilişsel fonksiyonları, striatumda gelişen oksidatif (MDA, GSH, SOD ve KAT) ve nitrosatif (nitrit/nitrat) stresi, asetil kolin esterase aktivitesini, inflamasyonu ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğunu geri çevirdikleri gözlenmiştir [197]. Kronik (14 gün) uygulanan vinposetinin sıçanlarda MPTP ile oluşturulan PH modelinde anlamlı ve doza bağımlı olarak hareket bozukluğunu ve oksidatif-nitrosatif stresi azalttığı ve siklik nükleotid seviyesini arttırarak azalan dopamini kontrol düzeylerine çıkardığı gösterilmiştir[199].

L tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanal blokörü aktivitesi sebebiyle kullanılan bir diğer non spesifik PDE1 inhibitörü nimodipinin LTP'yi ve öğrenmeyi arttırdığı gösterilmiştir. Ancak çalışmalar L tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının nöronal plastisitede rol aldıklarını göstermektedir ve bu nedenle nimodipinin PDE1 inhibisyonundan

kaynaklanan nöronal plastisite üzerine olan etkileri konusunda çelişkiler bulunmaktadır[200].

### 2.6.2. Fosfodiesteraz 3, 3/4 ve inhibitörleri

Silostazol, PDE3'ü inhibe ederek hücre içi siklik AMP (cAMP) seviyelerini artırır. A $\beta$  kaynaklı hafıza ve sinaptik plastisite defektleri, azalmış cAMP ve nörotoksisite PDE3 inhibitörleri ile ortadan kaldırılabilir [200]. Silostazolün peroksizom proliferatör-aktive reseptör (PPAR)-c aktivasyonu yoluyla da nöronal ölümü azalttığı bildirilmiştir [201]. Araştırmalar PDE3 inhibitörü silostazolün ve PDE3'e silostazolden daha spesifik ve daha potent bir bileşik olan antitrombotik etkili K-134'ün orta serebral arter tıkanıklığı ile oluşturulmuş iskemi modelinde nöron koruyucu etki gösterdiğini kanıtlanmıştır[202]. PDE3 inhibitörü taksifolinin sıçan serebral amiloid anjiyopati modelinde A $\beta$  oligomer oluşumunu inhibe ederek damar bütünlüğünü ve bilişsel ve hafıza fonksiyonları koruduğu gösterilmiştir[203].

Olprinon, pozitif inotropik ve vazodilatör etkileri olan, klinikte akut kalp yetmezliğinde ve serebral iskemide kullanılan bir selektif PDE3 inhibitörüdür. Serebral arterlerde cAMP seviyesini artırarak vazodilatör etkisiyle beyin kan akımını artırır. Ayrıca hücre Ca<sup>2+</sup> seviyesini ve kontraktıl elementlerin Ca<sup>2+</sup> duyarlılığını azaltarak damar kontraktilitesini inhibe eder. Bunlara ek olarak fibrojen aracılı trombosit agregasyonunu da inhibe etmektedir. Ayrıca sıçanlarda deneysel iskemi/reperfüzyonun aracılı akut renal hasar, lipopolisakkarit aracılı akciğer hasarı ve endotoksik şok modelinde antiinflamatuvar etkinliği kanıtlanmıştır[204].

PDE3 inhibitörü levosimendanın asfiksi ile kardiyak arrest oluşturulmuş sıçanlarda, serebral ya da sistemik inflamasyon parametrelerine bağlı olmayan yollarla nöronları hasardan koruduğu gösterilmiştir[205].

PDE 3/4 inhibitörü zardaverin ve PDE4 inhibitörü rolipramın izole hipokampal CA1 piramidal nöron hücrelerinde eksitabiliteyi  $\beta$ -adrenoreseptör uyarımı aracılığıyla arttırdıkları gözlenmiştir [206].

İbudilast bronşial astımın tedavisinde bronkodilatör etkinliği nedeniyle kullanılan bir non selektif PDE 3, 4, 10 ve 11 inhibitörüdür. Siklik nükleotidleri metabolize ederek hücre farklılaşması, sinaptik plastisite ve inflamatuvar cevaplar üzerinde rol oynar. İbudilastın prelinik ve klinik çalışmalarda daha geniş etki alanı olduğu gösterilmiştir.

Bunlar arasında proinflamatuvar sitokinleri (IL-6, IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ) baskılamak, toll benzeri reseptör 4 (TLR-4) blokajı yapmak, makrofaj migrasyon inhibitör faktörünü (MIF) inhibe etmek, antiinflamatuvar sitokin (IL10) upregülasyonu ve nörotrofik faktörleri (GDNF, NGF, NT-4) arttırmak sayılabilir. İbudilastın glial aktiviteyi azaltıcı etkisinin PDE inhibitör aktivitesinden bağımsız olduğu gösterilmiştir. Kan beyin engelini (KBE) geçmesi, iyi tolere edilebilmesi ve oral yolla uygulanabilmesi gibi avantajlarının bulunması, mevcut tedavi yaklaşımlarının optimumun altında etkinlikleri ve zayıf tolere edilebilirlikleri nedeniyle nöroinflamatuvar durumlarda iyi bir terapötik ajan olmaya adaydır[207]. SSS'ne hedefli antiinflamatuvar aktivitesinden dolayı multiple sklerosis (MS), nöropatik ağrı, opiyat toleransını düşürerek opiyat etkinliğinin ve güvenilirliğinin artırılmasında potansiyel ilaç adayıdır[208]

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Hücre Kültürü

Hayvan hücrelerinin, canlı vücudunun dışında incelenebilmesi amacıyla Harisson tarafından 1907 yılında hücre kültürü keşfedilmiştir. Hücrenin vücut dışında kültüre edilmesi, vücudun normal homeostazisi nedeniyle ortaya çıkacak sistemik değişikliklere yol açmasından ve bunların deney üzerinde olumsuz etkilerinden bağımsız olarak, hücreyi inceleme imkânı sağlamıştır. Harrison hayvan modeli olarak, öncelikle kurbağayı seçmiş ve doku parçalarının vücut dışında canlılığını koruyabilmesini amaçlamıştır. Harisson'dan sonra bu çalışmalar farklı araştırmacılar tarafından da devam ettirilmiştir. Earle ve arkadaşları 1943 yılında farelerde tümör hücrelerini izole edebilmeyi başarmış ve 1961 yılında Leonard Hayflick hücrelerin, kültür ortamında sınırlı yaşam süresine sahip olduklarını rapor etmiştir. Bu konu üzerine yapılan çalışmaların giderek ilerlemesiyle, hücre içerisinde gerçekleşen aktiviteleri, hücrenin bulunduğu ortam, hücrelerin birbirleriyle olan etkileşimleri ve bunlara karşı verilen tepkileri hücresel boyutta inceleme ve değerlendirebilme imkânı sağlamıştır[209].

Hipokampusün hafıza kayıplarındaki rolünü anlama çabalarının bir parçası olarak kolinerjik nöronlar ve hipokampal bir kolinerjik (ACh salgılayan) nöronal hücre modeli araştırılması ve mevcut hipokampal nöronal hatlar arasında HT4 hücreleri, sıcaklığa duyarlı küçük bir virüs-40 T antijeni kullanılarak primer fare hipokampal nöronlarından ölümsüzleştirilmiştir [210]. Ölümsüz hale getirilmiş bir fare hipokampal hücre dizisi olan HT-4 hücreleri ve HT-22 alt tipi 1994 yılında klonlanmıştır [211].

İn vitro Alzheimer Hastalığı modeli oluşturmak için bu hücre hattı American Tissue Cell Culture (ATCC)'dan temin edilmiştir. Deneyler Atlas Biyoteknoloji Laboratuvarları'nda bulunan Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

##### 3.1.1. Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler %10 FBS (fötal bovine serum), %1 Penisilin/Streptomisin ve %1 L-glutamin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) kültür ortamında %5'lik CO<sub>2</sub> inkübatöründe yetiştirildiler. Hücreler petriyi %80 kapladığında komplet hücre kültür ortamı, PBS (Phosphate Buffered Salin) eklenip, %25 Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik

Asit(EDTA) ile kaldırılarak çalışmada gereken grup sayısına göre pasajlandılar. Kontrol grubu ise yalnızca Dimetil sülfoksit (DMSO) ile pasajlandı.

### **3.1.2. Deneyisel AH Hücre Kültürü Modeli için A $\beta$ <sub>25-35</sub> proteinin hazırlanması:**

Ticari olarak satın alınan liyofilize haldeki A $\beta$ <sub>25-35</sub> ( $\geq 97\%$  HPLC, A4559-1MG, Sigma-Aldrich-131602-53-4), nörotoksisite çalışmalarında gerekli liyofilize peptid agregatları steril saf su ile çözülerek 1 mg/ml konsantrasyonda stok hazırlandı.

### **3.1.3. Sitotoksisite Deneyleri**

#### **Hücre Canlılığının MTT ile ölçülmesi**

Hücre canlılığının kolorimetrik ölçümüne dayanan MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] deneyi, suda çözündüğünde sarı renkli görünüme sahipken, mitokondriyal redüktaz aktivitesiyle hücrelerin canlılığıyla orantılı olarak çözünemeyen mor renkli formazana dönüşür ve kantitatif bir ölçüm sağlar. %70'in altında kalan değerler sitotoksik kabul edilmektedir.

HT-22 hücreleri %80 kaplama oranına ulaştıktan sonra besi yerleri aspire edilerek edilerek PBS çözeltisi ile yıkandı, 300  $\mu$ l Trypsin-EDTA eklendi ve 37°C'deki CO<sub>2</sub> inkübatöründe 1-2 dakika (dk) inkübe edildi. Kaldırma işlemi faz-kontrast mikroskopunda kontrol edildi. Üzerlerine taze hazırlanan hücre besiyeri eklenerek enzim reaksiyonu durduruldu ve 15 ml'lik falkona aktararak 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılarak hücre pelleti 1 ml besiyerinde dağıtıldı. Hücre sayım cihazında (Cell counter, BioRad) hücre sayımı yapıldı ve hücre sayısı 105 hücre/ml olacak şekilde besiyeri eklendi. Pipetleme yapılarak eşit bir şekilde 96 kuyucuklu kostarlara her kuyucukta 104 hücre/ml (100  $\mu$ l) olacak şekilde ekim yapıldı.

24 saat sonra eski besiyeri ortamdan uzaklaştırılarak taze hazırlanmış besiyeri eklendi. Hücreler PDEİ'lerin farklı konsantrasyonlarıyla 32 saat inkübasyona bırakılarak deney grupları oluşturuldu. Süre sonunda hücrelerden besiyerleri aspire edildi. MTT (mg/ml) DMEM'de çözüldü, 0.22  $\mu$ 'luk filtreden geçirildi ve her bir kuyucuğa 50 $\mu$ l eklendi. 37°C'lik CO<sub>2</sub> inkübatöründe hücreler MTT çözeltisi ile 3 saat inkübe edildi. Süre sonunda her kuyucukta mor renkli çökeltiler gözlemlendi ve sıvı kısım aspire edildi. Kuyucuk diplerindeki çökeltilerin üzerine 100  $\mu$ l izopropanol eklenerek homojen bir karışım

oluşuncaya kadar pipetleme yapıldıktan sonra Microplate Reader'da 570 nmabsorbans değeri okutuldu.

### 3.1.4. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Tedavisi

Deney grupları aşağıdaki tabloda gösterilmektedir.

**Tablo 3-1. Deney gruplarının oluşturulması.**

| Deney grupları; (n=3) |                                         | Deney grupları; (n=3) |                                                                                      |
|-----------------------|-----------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 1                     | Kontrol (%0.01 DMSO)                    | 9                     | A $\beta$ <sub>25-35</sub> (5 $\mu$ M; 32 saat)                                      |
| 2                     | Vinposetin (VİN; 30, 100, 300 $\mu$ M)  | 10                    | A $\beta$ <sub>25-35</sub> (5 $\mu$ M; 32 saat) + Vinposetin (30, 100, 300 $\mu$ M)  |
| 3                     | Levosimendan (LEV; 30,100, 300 $\mu$ M) | 15                    | A $\beta$ <sub>25-35</sub> (5 $\mu$ M; 32 saat) + Levosimendan (30,100, 300 $\mu$ M) |
| 4                     | İbudilast (İB; 25, 50, 100 $\mu$ M)     | 16                    | A $\beta$ <sub>25-35</sub> (5 $\mu$ M; 32 saat) + İbudilast (25, 50, 100 $\mu$ M)    |

\*Koyu ile gösterilenler literatürdeki etkin konsantrasyonlardır.

PDEİ'ler, literatürdeki etkin ilaç konsantrasyonlarını içine alan üç farklı konsantrasyonda uygulanmışlardır.

Çözücü olarak tüm PDEİ'lerde DMSO kullanıldı. Kontrol grubunda ve PDEİ'lerin yer aldığı tedavi gruplarının besiyerlerinde son DMSO konsantrasyonu %0.1 olarak ayarlandı.

### 3.1.5. mRNA- RT-qPCR

#### 3.1.5.1. mRNA İzolasyonu

mRNA izolasyonu için aşağıda markası, adı ve katalog numarası verilen materyaller kullanılmıştır.

mRNA izolasyon protokolü aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir.

1. Hücre homojenizasyonu: 1x10<sup>7</sup> kültür hücresi üzerine 1 ml RiboEx eklendi ve pipetaj yapılarak karışması sağlandı.
2. Oda ısısında 5 dk inkübe edildi.

3. Karışım 11.000rpm, 10 dk, 4°C koşullarında santrifüj yapıldı ve süpernatant başka bir tüpe aktarıldı.
4. Karışım üzerine 200 µl kloroform eklendi karıştırıldı, 2 dk inkübe edildi.
5. +4°C de 12.000×g'de 15 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant temiz bir tüpe alındı.
6. Süpernatantın hacmi kadar RB1 Buffer (RNA Binding Buffer; RNA Bağlama Tamponu) eklendi. Pipetleme yapılarak karıştırıldı.
7. 700 µl karışım kolona aktarıldı.
8. 10.000×g'de 30 sn santrifüj yapıldı. Collection tüp yenisi ile değiştirildi.
9. Karışımdan kalan miktar olması durumunda 7-8 işlemler tekrarlandı.
10. Kolon üzerine 500 µl SW1 Buffer(Yıkama Tamponu) eklendi.
11. 10.000×g de 30 sn santrifüj yapıldı. Collection tüp yenisi ile değiştirildi.
12. Kolon üzerine 500 µL RNW Buffer(Yıkama Tamponu) eklendi.
13. 10.000×g de 30 sn santrifüj yapıldı. Collection tüp yenisi ile değiştirildi.
14. Kolon içinde kalan yıkama solüsyonlarını uzaklaştırmak için 10.000×g de 1 dk santrifüj yapıldı. Daha sonra kolon temiz bir tüpe alındı.
15. Kolon üzerine 50 µl RNase-free su eklendi ve 1dk oda sıcaklığında bekletildi.
16. Sonra 10.000×g de 1 dk santrifüj yapılarak elde edilen mRNA örnekleri -80°C sıcaklıkta donduruldu.

### 3.1.5.2. cDNA Sentezi

mRNA izolasyonu sonrasında cDNA sentezi aşamasına geçilmiştir. cDNA sentezi için kullanılan kitin markası, adı ve katalog numarası aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

1. cDNA sentezi için kullanılan mastermix bilgileri aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

**Tablo 3-2. “cDNA” sentezi için kullanılan “mastermix” bilgileri.**

| Bileşen                    | Hacim |
|----------------------------|-------|
| RNA örneği                 | 2 µl  |
| Primer                     | 1 µl  |
| dNTP mix                   | 1 µl  |
| RNase-Free Distilled Water | 10 µl |

2. cDNA mastermix hazırlandıktan sonra 65 °C sıcaklıkta 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında karışım buz üzerine alındı.

3. Aşağıdaki tabloda adı ve miktarları belirtilen bileşenler cDNA mastermix üzerine eklendi ve homojen olarak karışması saplandı.

**Tablo 3-3. cDNA mastermix üzerine eklenen bileşenler.**

| Bileşen                    | Hacim |
|----------------------------|-------|
| 10X RTase Reaksiyon Buffer | 2     |
| 0.1 M DTT                  | 2     |
| Reverse Transcriptase      | 1     |
| RNase Inhibitor            | 1     |

4. cDNA sentezi için mastermix hazırlandıktan sonra reverse transkripsiyon reaksiyonuna geçilmiştir. cDNA sentezi için kullanılan reverse transkripsiyon reaksiyonunun koşulları aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

**Tablo 3-4. cDNA sentezi için kullanılan reverse transkripsiyon reaksiyonunun koşulları.**

| cDNA Sentez Reaksiyonu Koşulları |        |        |
|----------------------------------|--------|--------|
|                                  | Adım 1 | Adım 2 |
| Sıcaklık (°C)                    | 55     | 85     |
| Süre                             | 60 dk. | 5 dk   |

### 3.1.5.3. Real-Time qPCR

cDNA elde edildikten sonra Real Time (RT)-qPCR aşamasına geçilmiştir. RT-qPCR için kullanılan kitin markası, adı ve katalog numarası aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Elde edilen cDNA örnekleri RT-qPCR aşamasına kadar -80°C sıcaklıkta donduruldu.

Ekpresyon analizi için kullanılan primer bilgileri aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

**Tablo 3-5. Ekpresyon analizi için kullanılan primer bilgileri**

| Primer Adı | Primer Dizisi               | Sentezleyen Firma |
|------------|-----------------------------|-------------------|
| ATG5-F     | GCAGATGGACAGTTG<br>CACACAC  | Sentebiolab       |
| ATG5-R     | GAGGTGTTTCCAACA<br>TTGGCTCA | Sentebiolab       |
| ACTB-F     | CACCATTGGCAATGA<br>GCGGTTC  | Sentebiolab       |
| ACTB-R     | AGGTCTTTGCGGATG<br>TCCACGT  | Sentebiolab       |
| BECN1-F    | CTGGACACTCAGCTC<br>AACGTCA  | Sentebiolab       |
| BECN1-R    | CTCTAGTGCCAGCTCC<br>TTTAGC  | Sentebiolab       |
| SIRT1-F    | TAGACACGCTGGAAC<br>AGGTTGC  | Sentebiolab       |
| SIRT1-R    | CTCCTCGTACAGCTTC<br>ACAGTC  | Sentebiolab       |

**Tablo 3-6. Real-Time qPCR için kullanılan mastermix bilgileri**

| MasterMix Bileşenleri          | Hacim |
|--------------------------------|-------|
| 2X MasterMix (with SYBR-Green) | 10 µl |
| ROX Dye                        | 1 µl  |
| Forward Primer (10 µM)         | 1 µl  |
| Reverse Primer (10 µM)         | 1 µl  |
| cDNA Template                  | 4 µl  |
| RNase-Free Distilled Water     | 3 µl  |
| TOPLAM                         | 20 µl |

Mastermix hazırlandıktan sonra RT-qPCR reaksiyonuna geçilmiştir. RT-qPCR için kullanılan reaksiyon koşulları aşağıdaki tabloda belirtilmiştir. RT-qPCR reaksiyonu Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time qPCR cihazında gerçekleştirilmiştir.

## Real-Time qPCR Reaksiyonu Koşulları

**Tablo 3-7. Real-Time qPCR Reaksiyonu Koşulları**

| RT-qPCR Step         | Sıcaklık (°C) | Süre           | Döngü |
|----------------------|---------------|----------------|-------|
| Initial Denaturation | 95            | 300 sn.        | 1     |
| Denature             | 95            | 15 sn.         | 40    |
| Anneal               | 55 - 68       | 60 sn.         | 40    |
| Melting Curve        | 65 - 95       | 2 - 5 sn./step | 1     |

### 3.1.5.4. Relatif Kantitasyon Hesaplanması

mRNA ekspresyonları kantitasyonu ACTB transkripti referans olarak kullanılıp kontrol gurubuna göre normalize edilmiştir. Relatif kantifikasyon hesaplamasında “ $\Delta\Delta C_t$  Yöntemi” kullanılmıştır.  $\Delta\Delta C_t$  hesaplaması aşağı açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

1. Hem hedef grupta hem de referans grupta her bir örneğin hem hedef mRNA hem de referans RNA için RT-qPCR sonucunda  $C_t$  değerleri elde edilmiştir.
2. Hedef grupta hedef mRNA  $C_t$  değerinden referans RNA  $C_t$  değeri çıkarılarak hedef grup  $\Delta C_t$  değerleri elde edilmiştir.
3. Referans grupta hedef mRNA  $C_t$  değerinden referans RNA  $C_t$  değeri çıkarılarak referans grup  $\Delta C_t$  değerleri elde edilmiştir.
4. Hedef grup  $\Delta C_t$  değerlerinden referans grup  $\Delta C_t$  değerleri çıkarılarak  $\Delta\Delta C_t$  değerleri elde edilmiştir.
5.  $\Delta\Delta C_t$  değerleri  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  şeklinde işleme alınarak kat değişimi (fold change) hesaplanması yapılmıştır.
6. Fold change değeri 1’in üzerinde çıkması durumunda hedef grubu mRNA ekspresyonunun referans grubun mRNA ekspresyonuna göre relatif olarak artış gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır. Fold change değeri 1’in altında çıkması durumunda ise hedef grubu mRNA ekspresyonunun referans grubun mRNA ekspresyonuna göre relatif olarak azalış gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır.

### 3.2. Western Blot

#### 3.2.1. Hücrelerden Total Protein Ekstrelerinin Elde Edilmesi

A $\beta_{25-35}$  uygulamaları ve/veya eş zamanlı PDEİ tedavileri sonrasında hücrelerin morfolojik özellikleri faz-kontrast mikroskopunda kontrol edildi. İlk olarak 25 cm<sup>2</sup> flasktan besiyeri aspire edildi ve 800  $\mu$ L steril soğuk fosfat tamponlu salin çözeltisi (Phosphate Buffered Saline; PBS) eklenerek bir kez yıkama yapıldı. 1 ml ProtinEx Total Protein Extraction Solution (GeneAll, Cat No: 701-001) eklenerek pipetaj yapıldı. 16.000 rpm'de +4 °C'de 15 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant temiz bir tüpe alındı. Çalışma buz üzerinde yapıldı.

#### 3.2.2. Hücrelerden Sitoplazmik ve Çekirdek Proteini Ekstrelerinin Elde Edilmesi

A) Materyaller:

- Hücre (5 - 10 x 10<sup>6</sup> hücreler)
- PBS (Fosfat Tamponlu Serum-Phosphate Buffered Saline)
- Çekirdek Ekstresi Tamponu (NE-Nuclear Extract )  
(HEPES [4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonik asit](4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)] [20 mM] pH 7.9, NaCl [0.4 M], EDTA [1 mM], Gliserol 25%, Proteaz İnhibitörü 1x (kullanılmadan hemen önce eklendi))\*
- Sitoplazmik Ekstre Tamponu (CE- Cytoplasmic Extract ) (HEPES [10 mM] pH 7.9, KCl [10 mM], EDTA [0.1 mM], NP-40 0.3% (kullanılmadan hemen önce eklenecek), Proteaz İnhibitörü 1x (kullanılmadan hemen önce eklendi))\*

\*tamponların 50 mL'si :

Solüsyon Hazırlama:

- 1 M HEPES (MW: 238,3012 g/mol) : 2.38 gr HEPES, 10 mL oluncaya kadar su eklendi.
- 5 M NaCl (MW: 58,44 g/mol) : 2.922 gr NaCl, 10 mL oluncaya kadar su eklendi.
- 2 M KCl (MW: 74,5513 g/mol): 1.491 gr KCl, 10 mL oluncaya kadar su eklendi.
- 0.5 M EDTA (MW: 292,24 g/mol) : 1.461 gr EDTA, 10 mL oluncaya kadar su eklendi.

**Tablo 3-8 (A,B). A. Çekirdek Ekstre Tamponu; B. Sitoplazmik Ekstre Tamponu**

| A                                      |                  | B                                       |                  |
|----------------------------------------|------------------|-----------------------------------------|------------------|
| Çekirdek Ekstresi Tamponu (ÇET; 50 mL) |                  | Sitoplazmik Ekstre Tamponu (SET; 50 mL) |                  |
| 1 M HEPES                              | 1 mL             | 1 M HEPES                               | 0.5 mL           |
| 5 M NaCl                               | 4 mL             | 2 M KCl                                 | 0.25 mL          |
| 0.5 M EDTA                             | 100 µL           | 0.5 M EDTA                              | 10 µL            |
| Gliserol                               | 12.5 mL          | NP-40                                   | Yeterli Miktarda |
| Proteaz                                | Yeterli Miktarda | Proteaz                                 | Yeterli Miktarda |

**B) Prosedür:**

1. Hücreler kazıyıcı ile kazınarak 1 ml soğuk PBS içine alındı, 6000 rpm'de 5dk boyunca santrifüj edildi ve supernatant atıldı.
2. Kalan pellet üzerine 1 ml soğuk PBS eklendi ve tekrar süspande edildi.
3. Soğuk odada 5 dakika boyunca 6000 rpm'de santrifüj edildi.
4. Süpernatant atıldı.
5. Bu aşamadan sonraki işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. Tüpler buz üzerine konuldu ve pelletin 5 katı kadar SET eklendi. (Örneğin pellet 20 µL ise, 100 µL SET eklendi).
6. Pellet SET ile yeniden süspande edildi ve 5 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edildi, zaman zaman vortekslendi.
7. Süre bitiminde 5 dakika boyunca 3000 rpm'de soğuk odada santrifüjlendi.
8. Süpernatant toplandı (Bu sitoplazmik ekstre (SE)'dir).
9. NP-40 içermeyen 100 µL SET içinde pelet yeniden süspande edildi.
10. Soğuk odada 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve SE'ye eklendi.
11. Bu pellete, pelletle aynı miktarda ÇET eklendi (Örneğin pelet 40 µL ise, 40 µL ÇET eklendi).
12. Süspande edildi ve 10 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edildi, zaman zaman vortekslendi.
13. 4° C'de 5 dakika boyunca 14.000 rpm'de santrifüj edildi.
14. Süpernatant toplandı (Bu çekirdek ekstresi (ÇE)'dir).
15. Western Blot için -80° C'de saklandı.

**3.2.3. Protein Miktar Ölçümü**

### 3.2.3. Protein Miktar Ölçümü

Protein miktar ölçümü Qubit® Protein Assay Kits (Thermo Fisher Scientific, Cat No: Q33211) kiti kullanılarak Qubit® 3.0 Fluorometer cihazı (Thermo Fisher Scientific, Cat No: Q33216) kullanılarak gerçekleştirildi.

### 3.2.4. Protein Elektroföresi

#### 3.2.4.1. Protein Örneklerinin Denatüre Edilmesi

Protein örneği (50 µg) üzerine 4X NuPAGE LDS Sample Buffer (Thermo Fisher Scientific, Cat No: NP0004) (5 µl), 10X NuPAGE Sample Reducing Agent (Thermo Fisher Scientific, Cat No: B0004) (2 µl) ve toplam hacim 20 µl olacak şekilde distile su eklendi. Hazırlanan karışım 70 °C’de 10 dk inkübe edildi ve ardından 2 dk buz üzerine alındı.

#### 3.2.4.2. Örneklerin Jele Yüklenmesi ve SDS-PAGE Elektroföres

1. Buffer core dikey jel sistemi tankı (XCell SureLock, Invitrogen) içerisine yerleştirildi. %4-12’lik Bis-Tris gradient jeli (Invitrogen, NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel) plastik ambalajından çıkartılıp, jel kaseti üzerinde yer alan beyaz bant söküldü ve jel kuyucuklarını bozmadan jel tarağı dikkatlice çıkarıldı.
2. Jel kasetinin alçak kısmı buffer Core’a bakacak şekilde dikey jel sistemi tankı içerisine yerleştirildi. Diğer tarafa diğer jel kasetini alçak kısmı buffer core’a bakacak şekilde yerleştirildi.
3. Jel sıkıştırma aparatına dikey jel tankı (Gel tension wedge) yerleştirilip herhangi bir dengesizlik engellendi.
4. 20X MES Sürükleme Tamponundan ’dan (MES Running Buffer ThermoFisher, B0002) 25 ml alıp bir mezür’e eklendi ve üzerine 475 ml distile su ekleyerek 1X MES tampona sulandırıldı.
5. Hazırlanan sürükleme tamponu ile ilk önce buffer core içinde kalan üst tampon çözelti odasını jel kuyucuklarının üzerini 0.5 cm üzerine kadar dolduruldu. Kalan tampon çözeltisi alt buffer odasına ilave edildi.
6. Örnekleri yüklemekten önce 200 µl’lik pipete steril bir pipet ucu takıldı ve kuyucuklar pipetaj yapılarak temizlendi.
7. Jel kasetinde yer alan kuyucuklardan en baştaki ve en sondakine 5 µl marker (MB090, NZY Colour Protein Marker II, Nzytech, Portekiz) yüklendi.
8. Kalan kuyuculara hazırlanan protein örneğinden 50 µg/20 µl protein örneği yüklendi.

### 3.2.5. Blotlama

1. Yürütme işlemi sonunda jel güç kaynağı ve dikey jel sisteminin elektrot kablolarını güç kaynağından çıkarılıp kapağı açıldı. Jel sıkıştırma aparatı çıkarıldıktan sonra jel kaseti çıkarıldı.

2. Jel kaseti, jel bıçağı kullanılarak kenar bağlantıları kopartılarak açıldı. Jelin tarak kısımları ve alt tarafındaki kalın jel kesilerek uzaklaştırıldı. İçerisinde distile su bulunan bir kap içerisine dikkatlice atıldı.

3. Blotlama için Iblot Gel Transfer Sistemi kullanıldı. Iblot transfer stack Nitrocellulose (NC) kitinde (Invitrogen, IB23001) yer alan anot stack kutudan çıkartılıp üzerinde yer alan jelatin açıldı. Anot stack plastiğı ile birlikte cihaza yerleştirildi. Anot stack üzerinde yer alan membran üstüne dikkatli bir şekilde jel yerleştirildi. Kit içerisinde yer alan filtre kağıdı distile su ile ıslatıldı. Jelin üstüne ıslak filtre kâğıdı koyuldu. Hava kabarcıkları uzaklaştırıldı. Kit içerisinde yer alan katot stack kutudan çıkartılıp üzerinde yer alan jelatin açıldı. Katot stack plastiğinden uzaklaştırıldı ve bakır yüzey yukarı, jelimsi yüzey ıslak filtre kağıdına bakacak şekilde filtre kağıdının üzerine dikkatlice yerleştirildi. Jel merdanesi kullanarak hava kabarcıklarını tekrar uzaklaştırıldı. Kit içerisinde yer alan sünger üzerindeki metal, Iblot cihaz kapağının sağ tarafında yer alan elektrota denk gelecek şekilde kapağa yerleştirildi ve kapağı dikkatlice kapatıldı. Program düğmesinden P3 programı seçildi ve 7 dk'lık sürede işlem tamamlandı.

4. Membran dikkatli bir şekilde distile su içerisine alındı.

#### 3.2.5.1. Antikorla inkübasyon

Kullanılan primer antikor bilgileri aşağıdaki tablodaki gibidir.

**Tablo 3-9. Kullanılan primer antikor tablosu**

| Marka         | Cat No      | Kitin Adı                         | Dilüsyon Oranı |
|---------------|-------------|-----------------------------------|----------------|
| Elabscience   | E-AB-30422  | Beta Actin                        | 1:1000         |
| Bt-Laboratory | BT-AP09795  | AMPK $\alpha$ 1/2                 | 1:1000         |
| Bt-Laboratory | BT-PHS00575 | AMPK $\alpha$ 1/2<br>(Thr183/172) | 1:1000         |
| Bt-Laboratory | BT-MCA0986  | LC3A                              | 1:1000         |
| Bt-Laboratory | BT-AP05645  | mTOR                              | 1:1000         |
| Bt-Laboratory | BT-PHS00176 | mTOR (phospho<br>ser2448)         | 1:1000         |
| Bt-Laboratory | BT-AP08324  | SIRT1                             | 1:1000         |

1. Primer antikor inkübasyonu için Western Breeze Kit kullanıldı (Invitrogen, Chromogenic Immunodetection System, Rabbit Primary Antibody Cat: WB7105).
2. Bloklama için; dilüent A: 2 ml, dilüent B: 3 ml, distile su: 5 ml eklendi ve 90 dk yavaş çalkalayıcıda bekletildi. Fosforile antikorların bloklamasında PBS içinde hazırlanan %2 lik PBS-sığır serumu albümini (Bovine Serum Albumin; BSA) karışımı kullandı.
3. Bu aşamadan sonra membran 20 ml distile su ile 2x5 dk yıkandı.
4. Primer antikorlar tarif üzerine, belirtilen oranda sulandırıldı ve gece boyu +40C'de bekletildi.
5. Membran 3x5 dk distile su ile hızlı devirde çalkalayıcıda yıkandıktan sonra üzerine 10 ml sekonder antikor eklendi ve 45 dk yavaş devirde çalkalayıcıda bekletildi.
6. Daha sonra membran 3x5 dk 20 ml Antibody Wash ile hızlı çalkalayıcıda yıkandı.
7. 2X2 dk 20ml distile su ile hızlı çalkalayıcıda yıkandı.
8. Kemiluminescent kullanıldı ve 2.375  $\mu$ l substrate ve 0.125  $\mu$ l enhancer karışım yapılarak membrana eklendi.
9. Görüntüleme cihazı olarak *GEN-BOX Imager CFX* kullanıldı.
10. Görüntüleme sonrası membranlar 2x2 dk 20ml distile su ile hızlı devirde çalkalayıcıda yıkandı.
11. Elde edilen sonuçlar Image J programıyla analiz edildi.

### 3.3. Kimyasallar ve Malzemeler

Capricorn-DMEM-HA (Capricorn Scientific) Capricorn-L-Glutamin-GLN B (Capricorn Scientific), Capricorn-Trypsin EDTA-TRY-1B (Capricorn Scientific), Capricorn-FBS

Heat inactivated-FBS-HI-11B (Capricorn Scientific), Capricorn-PBS-PBS-1A (Capricorn Scientific)

Qubit assay tüpleri (500'lük set, Cat. No. Q32856- Thermo Fisher Scientific) ya da Axygen PCR-05-C tüpleri (VWR, part no. 10011-830- PCR-05-C Corning), Güçlendirilmiş kemilüminesans substratı (ECL "Invitrogen, Novex™ ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit WP20005")

mRNA İzolasyonu İçin Kullanılan Materyaller RiboEx (Cat No:301-001,Gene All), Hybrid-R (Cat No: 305-101, Gene All), cDNA Sentezi İçin Kullanılan Materyaller HyperScript™ First strand synthesis kit (Cat No:601-005,Gene All), cDNA sentezi için kullanılan mastermix bilgileri RNA örneği, Primer, dNTP mix, RNase-Free Distilled Water, RTase Reaksiyon Buffer, DTT, Reverse Transcriptase, RNase Inhibitor, Real-Time qPCR İçin Kullanılan Materyaller RealAmp™ SYBR qPCR Master mix (Cat No:801-051,Gene All), Primerler (ATG5-F, ATG5-R, ACTB-F, ACTB-R, BECN1-F, BECN1-R, SIRT1-F, SIRT1-R; Sentebiolab), Real-Time qPCR İçin Kullanılan MasterMix Bileşenleri (MasterMix (with SYBR-Green), ROX Dye, Forward Primer, Reverse Primer, cDNA Template, RNase-Free Distilled Water)

Western blot için kullanılan materyaller ProtinEx Total Protein Extraction Solution (GeneAll, Cat No: 701-001), Protein miktar ölçümü kiti Qubit® Protein Assay Kits (Thermo Fisher Scientific, Cat No: Q33211), NuPAGE LDS Sample Buffer (Thermo Fisher Scientific, Cat No: NP0004), NuPAGE Sample Reducing Agent (Thermo Fisher Scientific, Cat No: B0004), Bis-Tris gradient jeli (Invitrogen, NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel), MES Running Buffer'dan (ThermoFisher, B0002), marker (NZY Colour Protein Marker II), Iblot transfer stack Nitrocellulose (NC) kitinde (Invitrogen, IB23001), Beta Actin (Cat No: E-AB-30422, Elabscience), AMPK  $\alpha$ 1/2 (Cat No: BT-AP09795, Bt-Laboratory), AMPK  $\alpha$ 1/2 (Thr183/172) (Cat No: BT-PHS00575 Bt-Laboratory), LC3A (Cat No: BT-MCA0986 Bt-Laboratory), mTOR (Cat No: BT- AP05645 Bt-Laboratory), mTOR (phospho ser2448) (Cat No: BT- PHS00176 Bt-Laboratory), SIRT1 (Cat No: BT- AP08324 Bt-Laboratory), Western Breeze Kit (Chromogenic Immunodetection System, Rabbit Primary Antibody Cat: WB7105, Invitrogen), "Invitrogen, Novex™ ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit WP20005"

### 3.4. Kullanılan Cihazlar

Laminar akım kabini (Nüve, Türkiye), CO<sub>2</sub> inkübatörü (Sanyo, Japonya), faz kontrast mikroskobu (Leica, Almanya), otoklav (Nüve, Türkiye), su banyosu (Nüve, Türkiye), ultrasonik homojenizatör (Omni, ABD), soğutmalı santrifüj (Kubota, Japonya), vorteks (FinePCR, Kore), orbital çalkalayıcı (FinePCR, Kore), membran görüntüleme cihazı (Kodak, ABD), spektrofotometrik mikroplak okuyucu (Heales, MB-530, China).

### 3.5. İstatistiksel Analiz

Çoklu grupların istatistiksel karşılaştırılması GraphPad Prism 7.0 programı kullanılarak iki yönlü ANOVA ve Tukey testleri ile değerlendirildi. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata olarak verildi. \* $P < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



## 4. BULGULAR

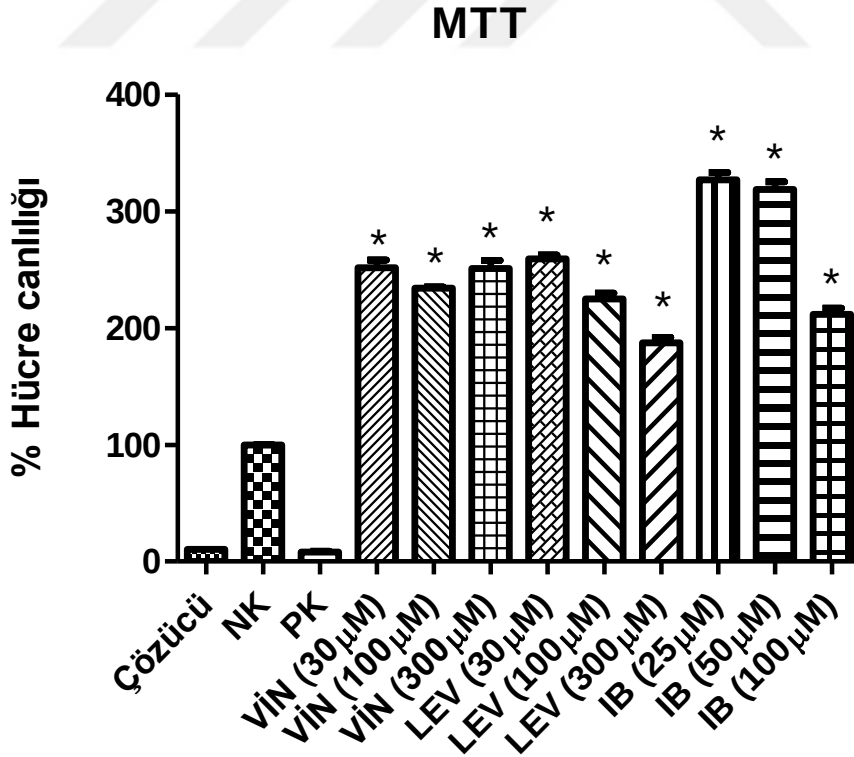
### 4.1. Sitotoksosite Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Fare hipokampal hücre hatları (HT-22), PDEİ'lerin (VİN; 30 $\mu$ M, 100  $\mu$ M,300  $\mu$ M; LEV 30 $\mu$ M, 100  $\mu$ M,300  $\mu$ M, İB 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M) farklı konsantrasyonları ve A $\beta_{25-35}$ 'in 5  $\mu$ M konsantrasyonu ile 32 saat inkübasyona bırakılarak hücre sağ kalımları negatif ve pozitif kontrolle karşılaştırmalı olarak MTT yöntemi ile ölçüldü.

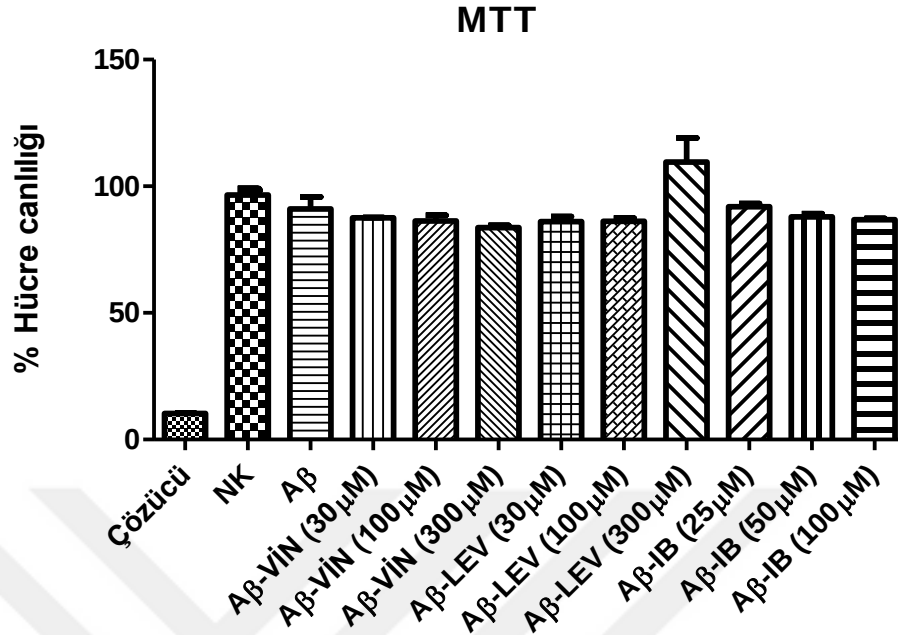
PDEİ'lerin farklı konsantrasyonları negatif kontrolle karşılaştırıldığında hücre canlılığında artış yapmıştır ( $p<0.05$ ;  $n=4$ ).

Hücrelere tek başına A $\beta_{25-35}$  uygulaması ve PDEİ'ler ile beraber uygulaması hücre canlılığında anlamlı azalmaya neden olmamıştır (Şekil 4.1B;  $p>0.05$ ;  $n=4$ ).

A



B



**Şekil 4-1(A,B).** Fare hipokampal hücre hatlarında (HT-22), artan konsantrasyonlarda PDEİ uygulamalarının (A) ve/veya eş zamanlı Aβ<sub>25-35</sub>'in (5 μM) ile beraber tedavilerinin hücre canlılığına etkilerini gösteren MTT grafiği. Hücreler, 32 saat boyunca ViN (30μM, 100 μM,300 μM); LEV (30μM, 100 μM,300 μM) ve İB (25 μM, 50 μM, 100 μM) ile ve/veya Aβ<sub>25-35</sub> (5 μM) ile tedavi edildiler. Kontrol grupları ise %0.1 DMSO ile inkübe edilmiştir.

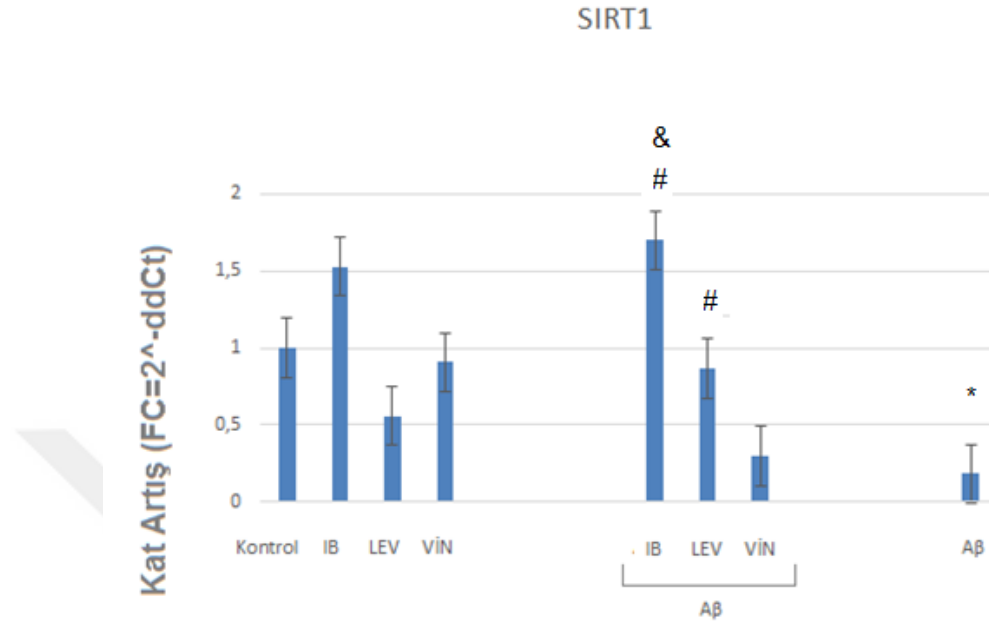
PDEİ'lerin literatürdeki etkin konsantrasyonları ViN (100 μM), LEV (30μM) ve İB (50 μM) ve Aβ<sub>25-35</sub> 5 μM konsantrasyonda sitotoksik etki göstermedikleri için deneylere bu konsantrasyonlarla devam edilmiştir.

#### 4.2. İn vitro Aβ<sub>25-35</sub> ve PDEİ Uygulamalarının RT-qPCR sonuçları

PDEİ'ler uygulanan konsantrasyonlarda hücre canlılığı üzerine olumsuz etkide bulunmamışlar, hücreler 32 saat boyunca normal büyümelerine devam ederek canlılıklarını sürdürmüşlerdir. Bu sonuçlardan hareketle PDEİ'lerin literatürdeki etkin konsantrasyonları ile deneylere devam edilmiştir.

#### 4.2.1. PDEİ uygulamalarının RT-qPCR sonuçları:

##### 4.2.1.1. $A\beta_{25-35}$ ve PDEİ uygulamasının SIRT-1 gen ekspresyonu:



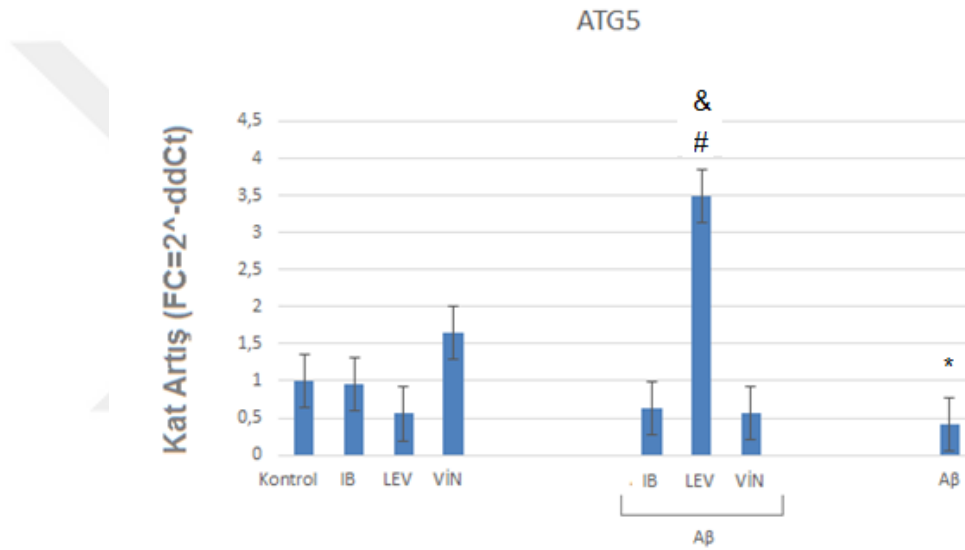
**Şekil 4-2. PDEİ ve  $A\beta_{25-35}$  uygulamasının SIRT1 gen ekspresyonuna etkisi.**

Fare hipokampal nöron hücrelerinde (HT-22),  $A\beta_{25-35}$  (5  $\mu$ M) uygulamasının ve/veya eş zamanlı PDEİ VİN (100  $\mu$ M), LEV (30 $\mu$ M) ve İB (50  $\mu$ M) tedavisinin SIRT1 gen ekspresyonu üzerindeki etkilerini gösteren RT-qPCR grafiği. mRNA ekspresyonlarının kantitasyonu ACTB transkripti referans olarak kullanılarak normalize edilmiştir. Hücreler, 32 saat boyunca 5  $\mu$ M  $A\beta_{25-35}$ 'e maruz bırakılmış ve/veya 5  $\mu$ M  $A\beta_{25-35}$  ve PDEİ VİN (100  $\mu$ M), LEV (30 $\mu$ M) ve İB (50  $\mu$ M) uygulamasına tabi tutulmuşlardır. Kontrol grupları ise %0.1 DMSO ile inkübe edilmişlerdir.

Hücrelerin 32 saat boyunca 5  $\mu$ M  $A\beta_{25-35}$  'ile inkübasyonları, SIRT-1 gen ekspresyonunda azalmaya neden olmuştur. IB (50  $\mu$ M) tek başına SIRT-1 ekspresyonunda artış yaparken  $A\beta_{25-35}$  ile birlikte uygulaması  $A\beta_{25-35}$  'in SIRT1 üzerinde yaptığı azalmayı engellemiştir. LEV (100 $\mu$ M) ve VİN (100 $\mu$ M), SIRT-1 gen ekspresyonunda kontrole göre değişiklik yapmamış, LEV (100 $\mu$ M)'in  $A\beta_{25-35}$  ile beraber uygulaması  $A\beta_{25-35}$  ile azalan SIRT1 ekspresyonunu kontrol değerlerine yaklaştırmış, VİN (100 $\mu$ M) ise anlamlı değişiklik yapmamıştır.

Özetle RT-qPCR sonuçlarına göre  $A\beta_{25-35}$  (5  $\mu$ M; 32 saat) uygulaması SIRT1 gen ekspresyonunda azalmaya neden olmuş (\*  $P<0.05$ ),  $A\beta_{25-35}$  ile eş zamanlı İB (50  $\mu$ M) ve LEV (30 $\mu$ M) uygulaması, azalan SIRT1 ekspresyonunda artışa neden olmuştur (#  $P<0.05$ ).  $A\beta_{25-35}$  ile eş zamanlı İB (50  $\mu$ M) uygulaması,  $A\beta_{25-35}$  ile eş zamanlı LEV (30 $\mu$ M) ve VİN (100 $\mu$ M) uygulamasına göre SIRT1 gen ekspresyonunda anlamlı artışa neden olmuştur (&,  $p<0.05$ ).

#### 4.2.1.2. $A\beta_{25-35}$ ve PDEİ uygulamasının otofaji alt yollarından ATG5 gen ekspresyonuna etkisi:



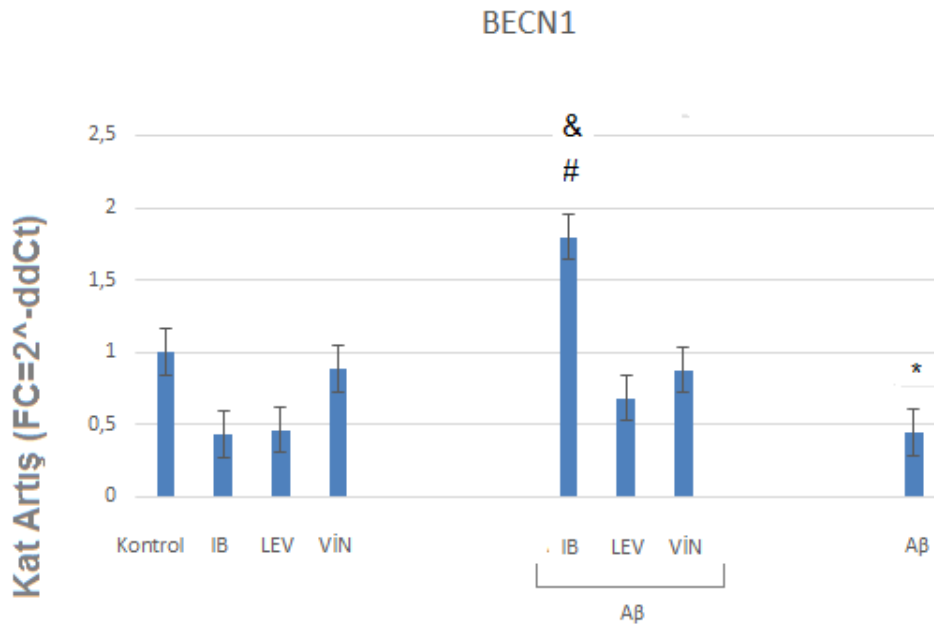
**Şekil 4-3. PDEİ ve  $A\beta_{25-35}$  uygulamasının ATG5 gen ekspresyonuna etkisi.**

Fare hipokampal nöron hücrelerinde (HT-22),  $A\beta_{25-35}$  (5  $\mu$ M) uygulamasının ve/veya eş zamanlı PDEİ VİN (100  $\mu$ M), LEV (30 $\mu$ M) ve İB (50  $\mu$ M) tedavisinin ATG5 gen ekspresyonu üzerindeki etkilerini gösteren RT-qPCR grafiği. mRNA ekspresyonlarının kantitasyonu ACTB transkripti referans olarak kullanılarak normalize edilmiştir. Hücreler, 32 saat boyunca 5  $\mu$ M  $A\beta_{25-35}$ 'e maruz bırakılmış ve/veya 5  $\mu$ M  $A\beta_{25-35}$  ve PDEİ VİN (100  $\mu$ M), LEV (30 $\mu$ M) ve İB (50  $\mu$ M) uygulamasına tabi tutulmuşlardır. Kontrol grupları ise %0.1 DMSO ile inkübe edilmişlerdir. Veriler tek bir deneyden alınmıştır.

Hücrelerin 32 saat boyunca 5  $\mu$ M A $\beta_{25-35}$  ile inkübasyonları, otofaji ile ilişkili ATG5 gen ekspresyonunda azalmaya neden olmuştur. VİN (100  $\mu$ M), LEV (30 $\mu$ M) ve İB (50  $\mu$ M) tek başına kontrole göre ATG5 ekspresyonunu değiştirmezken, LEV (30 $\mu$ M)'in A $\beta_{25-35}$  ile birlikte uygulaması A $\beta_{25-35}$  ile azalan ATG5 ekspresyonunu kontrol değerlerine yaklaştırmıştır, İB (50  $\mu$ M) ve VİN (100 $\mu$ M) ise anlamlı değişiklik yapmamıştır.

Özetle RT-qPCR sonuçlarına göre A $\beta_{25-35}$  (5  $\mu$ M; 32 saat) uygulaması ATG5 gen ekspresyonunda azalmaya neden olmuş (\* P<0.05), tek başına ya da A $\beta_{25-35}$  ile eş zamanlı PDEİ LEV (30 $\mu$ M) uygulaması, azalan ATG5 ekspresyonunda artışa neden olmuştur olmuştur (# P<0.05). A $\beta_{25-35}$  ile eş zamanlı LEV (30 $\mu$ M) uygulaması, A $\beta_{25-35}$  ile eş zamanlı İB (50  $\mu$ M) ve VİN (100 $\mu$ M) uygulamasına göre ATG5 gen ekspresyonunda anlamlı artışa neden olmuştur (&, p<0.05).

#### 4.2.1.3. A $\beta_{25-35}$ ve PDEİ uygulamasının otofaji alt yollarından BECN1 gen ekspresyonuna etkisi:



Şekil 4-4. PDEİ ve A $\beta_{25-35}$  uygulamasının BECN1 gen ekspresyonuna etkisi.

Fare hipokampal nöron hücrelerinde (HT-22),  $A\beta_{25-35}$  (5  $\mu$ M) uygulamasının ve/veya eş zamanlı PDEİ VİN (100  $\mu$ M), LEV (30 $\mu$ M) ve İB (50  $\mu$ M) tedavisinin BECN1 gen ekspresyonu üzerindeki etkilerini gösteren RT-qPCR grafiği. mRNA ekspresyonlarının kantitasyonu ACTB transkripti referans olarak kullanılarak normalize edilmiştir. Hücreler, 32 saat boyunca 5  $\mu$ M  $A\beta_{25-35}$ 'e maruz bırakılmış ve/veya 5  $\mu$ M  $A\beta_{25-35}$  ve PDEİ VİN (100  $\mu$ M), LEV (30 $\mu$ M) ve İB (50  $\mu$ M) uygulamasına tabi tutulmuşlardır. Kontrol grupları ise %0.1 DMSO ile inkübe edilmişlerdir. Veriler tek bir deneyden alınmıştır

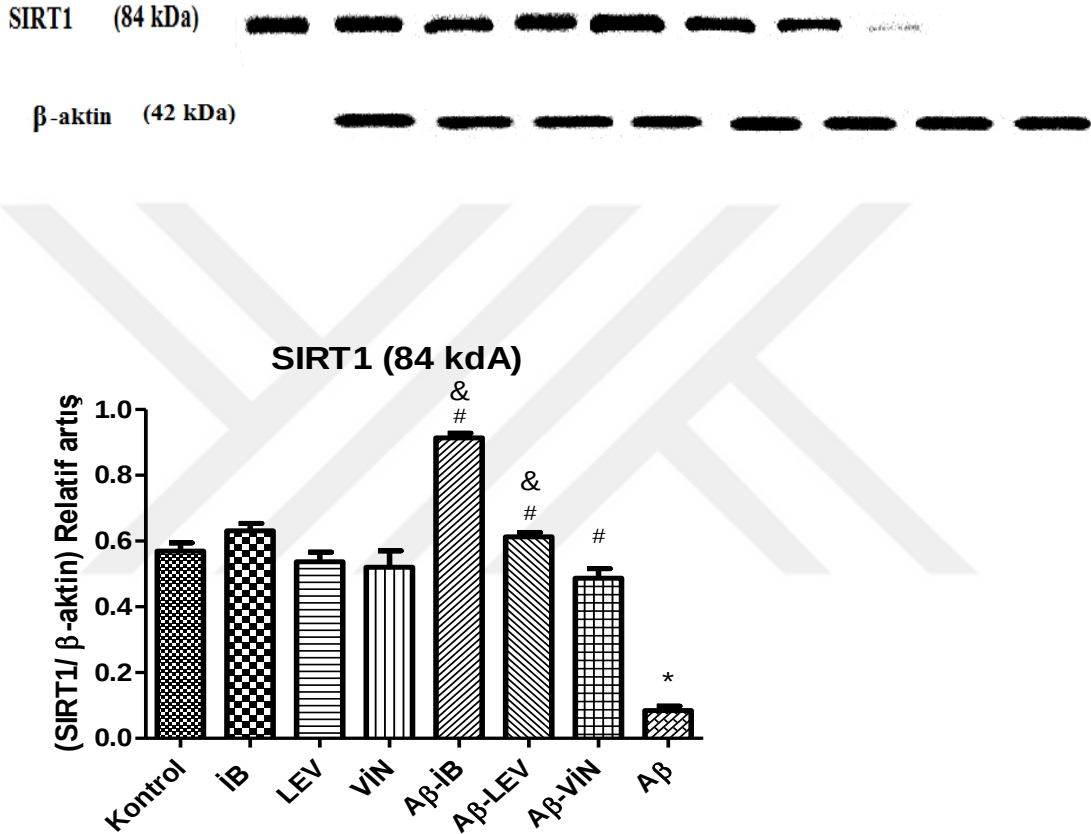
Hücrelerin 32 saat boyunca 5  $\mu$ M  $A\beta_{25-35}$  ile inkübasyonları, otofaji ile ilişkili BECN1 gen ekspresyonunda azalmaya neden olmuştur. VİN (100  $\mu$ M), LEV (30 $\mu$ M) ve İB (50  $\mu$ M), tek başlarına kontrole göre BECN1 ekspresyonunu değiştirmezken, İB (50  $\mu$ M)'ın  $A\beta_{25-35}$  ile beraber uygulaması tek başına  $A\beta_{25-35}$  uygulamasına kıyasla BECN1 gen ekspresyonunu arttırmış, VİN (100  $\mu$ M) ve LEV (30 $\mu$ M) ise anlamlı değişiklik yapmamıştır.

Özetle RT-qPCR sonuçlarına göre  $A\beta_{25-35}$  (5  $\mu$ M; 32 saat) uygulaması BECN1 gen ekspresyonunda azalmaya neden olmuş (\*  $P<0.05$ ), tek başına ya da  $A\beta_{25-35}$  ile eş zamanlı PDEİ İB (50  $\mu$ M) uygulaması, azalan BECN1 ekspresyonunda artışa neden olmuştur (#  $P<0.05$ ).  $A\beta_{25-35}$  ile eş zamanlı İB (50  $\mu$ M) uygulaması,  $A\beta_{25-35}$  ile eş zamanlı LEV (30 $\mu$ M) ve VİN (100 $\mu$ M) uygulamasına göre BECN1 gen ekspresyonunda anlamlı artışa neden olmuştur (&,  $p<0.05$ ).

#### 4.2.2. PDEİ uygulamalarının Western Blot sonuçları:

##### 4.2.2.1. SIRT1 Protein Ekspresyonu:

PDEİ'lerin literatürdende yola çıkarak farklı konsantrasyonlarını uyguladık ve prekliniik hücre kültürü ve hipokampal kesitlerde bu konsantrasyonlarda kullanılan PDEİ'lerin Western blot çalışmalarında SIRT1 üzerinde anlamlı değişiklik göstermediğini gördük. MTT ile de bu konsantrasyonlarının hücreye toksik olmadığını gösterdik (Şekil 4-6).



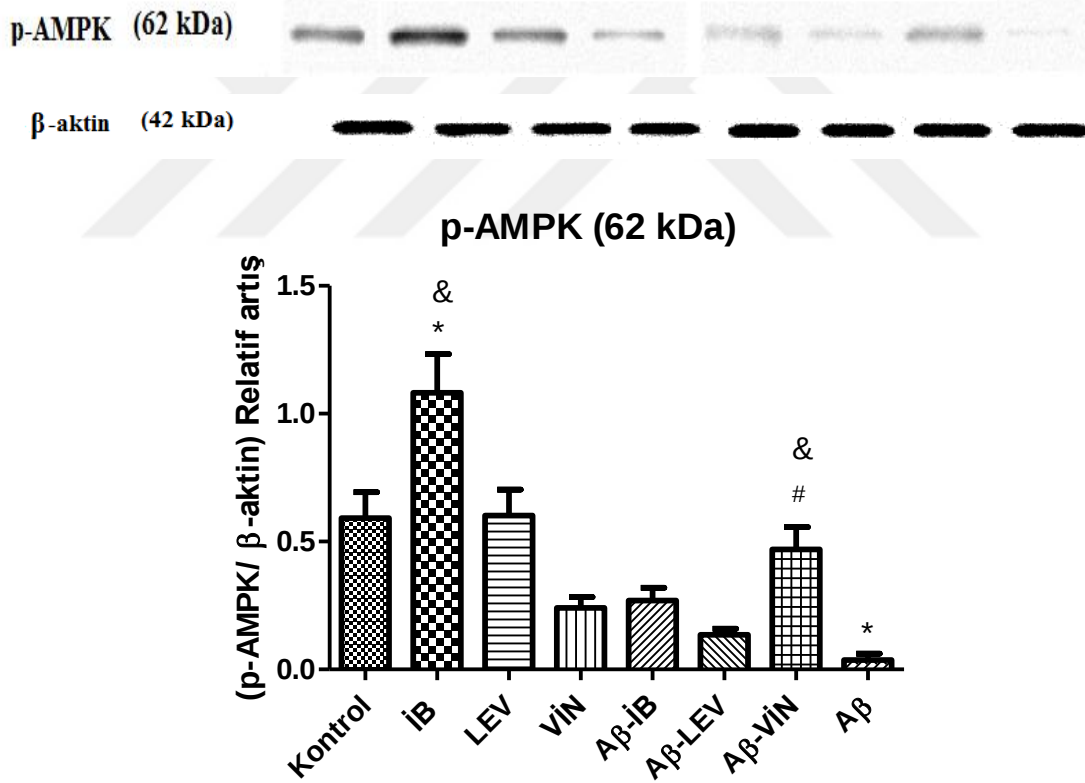
Şekil 4-5. PDEİ ve A $\beta$ <sub>25-35</sub> uygulamasının SIRT1 protein ekspresyonuna etkisi.

Fare hipokampal nöron hücrelerinde (HT-22), A $\beta$ <sub>25-35</sub> (5  $\mu$ M) uygulamasının ve/veya eş zamanlı PDEİ (VİN ;100  $\mu$ M), (LEV ;30 $\mu$ M) ve (İB ;50  $\mu$ M) tedavisinin SIRT1 protein ekspresyonunu gösteren Western blot bantları (A) ve karşılaştırmalı SIRT1 yoğunlukları (B). Bantlar iç standart  $\beta$ -aktine göre normalize edilmişlerdir. Hücreler, 32 saat boyunca 5  $\mu$ M A $\beta$ <sub>25-35</sub>'e maruz bırakılmış ve/veya 5  $\mu$ M A $\beta$ <sub>25-35</sub> ve PDEİ uygulamasına tabi tutulmuşlardır. Kontrol grupları ise %0.1 DMSO ile inkübe edilmişlerdir. Veriler üç bağımsız deneyin ortalama  $\pm$  SH'ı olarak ifade edildi (\* p<0.05 Kontrol grubuna göre anlamlıdır; # p<0.05 10  $\mu$ M A $\beta$ <sub>25-35</sub> grubuna göre anlamlıdır).

Western blot sonuçlarına göre  $A\beta_{25-35}$  (5  $\mu$ M; 32 saat) uygulaması SIRT1 protein ekspresyonunda kontrole göre anlamlı azalmaya neden olmuştur (#  $p<0.05$ ).

VİN (100  $\mu$ M), LEV (30 $\mu$ M) ve İB (50  $\mu$ M) tek başlarına SIRT1 seviyelerinde kontrole göre anlamlı değişiklik yapmazlarken  $A\beta_{25-35}$  ile beraber uygulamaları tek başına  $A\beta_{25-35}$  uygulamasına kıyasla SIRT1 protein ekspresyonunu arttırmıştır (#  $P<0.05$ ). Bu artış LEV (30 $\mu$ M) ve VİN (100  $\mu$ M)'in  $A\beta_{25-35}$  ile beraber uygulamaları ile kontrol seviyesine yaklaşırken, İB (50  $\mu$ M)'nin  $A\beta_{25-35}$  ile beraber uygulaması kontrol değerlerinin üstüne çıkmıştır (#  $P<0.05$ ).  $A\beta_{25-35}$  ile eş zamanlı İB (50  $\mu$ M) uygulaması,  $A\beta_{25-35}$  ile eş zamanlı LEV (30 $\mu$ M) ve VİN (100 $\mu$ M) uygulamasına göre SIRT1 protein ekspresyonunda anlamlı artışa neden olmuştur (&,  $p<0.01$ ).

#### 4.2.2.2. Aktif AMPK (p-AMPK) Protein Ekspresyonu:



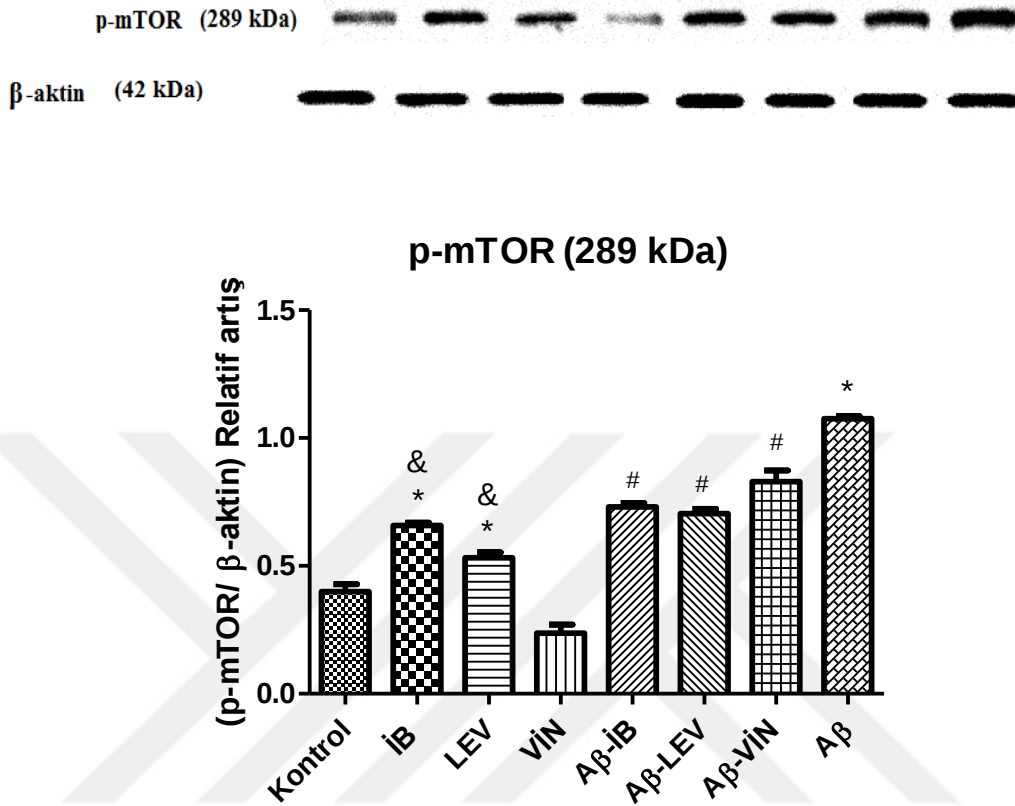
Şekil 4-6. PDEİ ve  $A\beta_{25-35}$  uygulamasının p-AMPK protein ekspresyonuna etkisi.

Fare hipokampal nöron hücrelerinde (HT-22), A $\beta$  A $\beta_{25-35}$  25-35 (5  $\mu$ M) uygulamasının ve/veya eş zamanlı PDEİ (VİN ;100  $\mu$ M), (LEV ;30 $\mu$ M) ve (İB ;50  $\mu$ M) tedavisinin p-AMPK protein ekspresyonunu gösteren Western blot bantları (A) ve karşılaştırmalı p-AMPK yoğunlukları (B). Bantlar iç standart  $\beta$ -aktine göre normalize edilmişlerdir. Hücreler, 32 saat boyunca 5  $\mu$ M A $\beta_{25-35}$  'e maruz bırakılmış ve/veya 5  $\mu$ M A $\beta_{25-35}$  ve PDEİ uygulamasına tabi tutulmuşlardır. Kontrol grupları ise %0.1 DMSO ile inkübe edilmişlerdir. Veriler üç bağımsız deneyin ortalama  $\pm$  SH'ı olarak ifade edildi (\*  $p<0.05$  Kontrol grubuna göre anlamlıdır; #  $p<0.05$  10  $\mu$ M A $\beta_{25-35}$  grubuna göre anlamlıdır).

Western blot sonuçlarına göre A $\beta_{25-35}$  (5  $\mu$ M; 32 saat) uygulaması aktif AMPK (p-AMPK) protein ekspresyonunda azalmaya neden olmuştur ( $p<0.05$ ).

LEV (30 $\mu$ M) tek başına p-AMPK seviyesinde kontrole göre anlamlı değişiklik yapmazken, (İB ;50  $\mu$ M) tek başına p-AMPK seviyesini kontrole göre anlamlı olarak arttırmıştır (\* $p<0.05$ ). LEV (30 $\mu$ M) ve İB'nin (50  $\mu$ M) A $\beta_{25-35}$  ile beraber uygulamaları tek başına A $\beta_{25-35}$  uygulamasına kıyasla p-AMPK protein ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırmıştır (# $p<0.05$ ). VİN (...)’in A $\beta_{25-35}$  ile beraber uygulaması tek başına A $\beta_{25-35}$ ’uygulamasına kıyasla p-AMPK protein ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırmış ve kontrol değerlerine geri döndürmüştür (# $p<0.05$ ). A $\beta_{25-35}$  ile eş zamanlı VİN (100uM) uygulaması, A $\beta_{25-35}$  ile eş zamanlı LEV (30 $\mu$ M) ve İB (50  $\mu$ M) uygulamasına göre p-AMPK protein ekspresyonunda anlamlı artışa neden olmuştur (&,  $p<0.05$ ). Tek başına İB (50  $\mu$ M) uygulaması, tek başına LEV (30 $\mu$ M) ve VİN (100uM) uygulamasına göre p-AMPK protein ekspresyonunda anlamlı artışa neden olmuştur (&,  $p<0.05$ ).

#### 4.2.2.3. Aktif mTOR (p-mTOR) Protein Ekspresyonu:



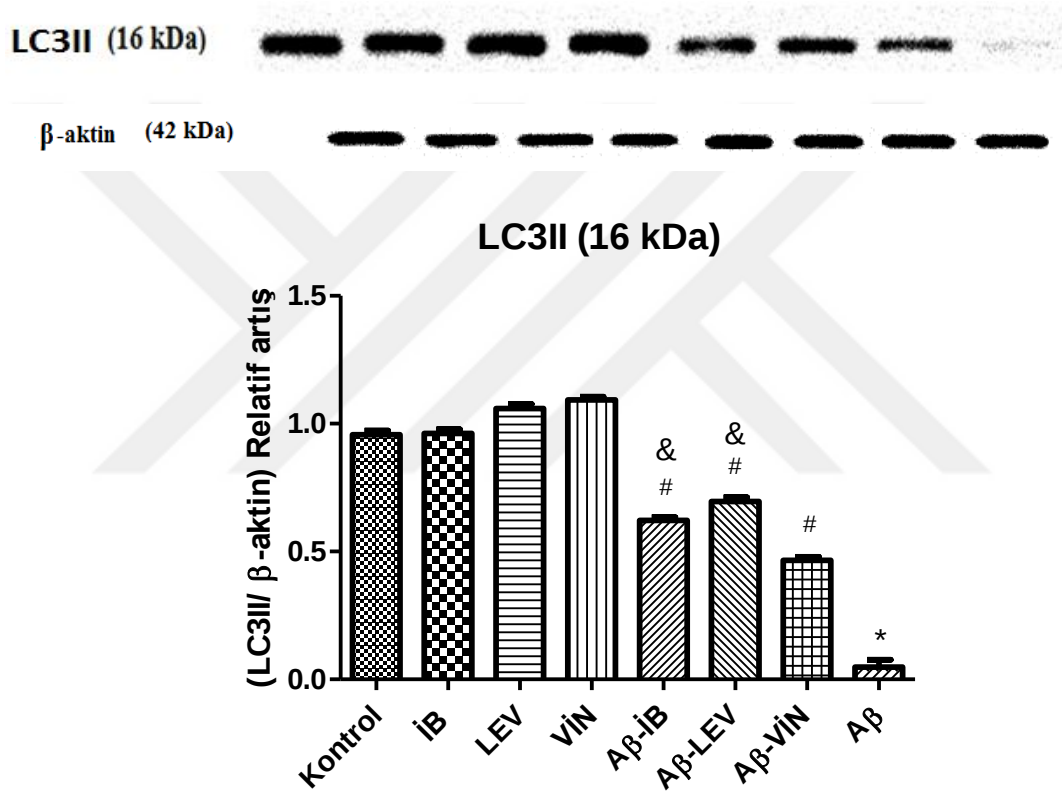
**Şekil 4-7. PDEİ ve A $\beta_{25-35}$  uygulamasının aktif m-TOR (p-mTOR) protein ekspresyonuna etkisi.**

Fare hipokampal nöron hücrelerinde (HT-22), A $\beta_{25-35}$  (5  $\mu$ M) uygulamasının ve/veya eş zamanlı PDEİ (VİN ;100  $\mu$ M), (LEV ;30 $\mu$ M) ve (İB ;50  $\mu$ M) tedavisinin p-mTOR protein ekspresyonunu gösteren Western blot bantları (A) ve karşılaştırmalı p-mTOR yoğunlukları (B). Bantlar iç standart  $\beta$ -aktine göre normalize edilmişlerdir. Hücreler, 32 saat boyunca 5  $\mu$ M A $\beta_{25-35}$ 'e maruz bırakılmış ve/veya 5  $\mu$ M A $\beta_{25-35}$  ve PDEİ uygulamasına tabi tutulmuşlardır. Kontrol grupları ise %0.1 DMSO ile inkübe edilmişlerdir. Veriler üç bağımsız deneyin ortalama  $\pm$  SH'ı olarak ifade edildi (\* p<0.05 Kontrol grubuna göre anlamlıdır; # p<0.05 10  $\mu$ M A $\beta_{25-35}$  grubuna göre anlamlıdır).

Western blot sonuçlarına göre A $\beta_{25-35}$  (5  $\mu$ M; 32 saat) uygulaması aktif mTOR (p-mTOR) protein ekspresyonunda artışa neden olmuştur (#p<0.05).

VİN (...) tek başına p-mTOR seviyesinde kontrole göre anlamlı azalma yaparken (\* $p<0.05$ ), LEV (30 $\mu$ M) ve İB (50  $\mu$ M) tek başına p-mTOR seviyesini (VİN ;100  $\mu$ M) arttırmıştır (\* $p<0.05$ ). VİN (100  $\mu$ M), LEV (30 $\mu$ M) ve İB (50  $\mu$ M)'nin A $\beta_{25-35}$  ile beraber uygulaması tek başına A $\beta_{25-35}$ 'uygulamasına kıyasla p-mTOR protein ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltmıştır (# $p<0.05$ ). Tek başına İB (50  $\mu$ M) ve LEV (30 $\mu$ M) uygulaması, tek başına VİN (100 $\mu$ M) uygulamasına göre p-mTOR protein ekspresyonunda anlamlı azalmaya neden olmuştur (&,  $p<0.05$ ).

#### 4.2.2.4. LC3II Protein Ekspresyonu:



Şekil 4-8. PDEİ ve A $\beta_{25-35}$  uygulamasının LC3II protein ekspresyonuna etkisi.

Fare hipokampal nöron hücrelerinde (HT-22), A $\beta_{25-35}$  (5  $\mu$ M) uygulamasının ve/veya eş zamanlı PDEİ (VİN ;100  $\mu$ M), (LEV ;30 $\mu$ M) ve (İB ;50  $\mu$ M) tedavisinin LC3II protein ekspresyonunu gösteren Western blot bantları (A) ve karşılaştırmalı LC3II yoğunlukları (B). Bantlar iç standart  $\beta$ -aktine göre normalize edilmişlerdir. Hücreler, 32 saat boyunca 5  $\mu$ M A $\beta_{25-35}$ 'e maruz bırakılmış ve/veya 5  $\mu$ M A $\beta_{25-35}$  ve PDEİ uygulamasına tabi tutulmuşlardır. Kontrol grupları ise %0.1 DMSO ile inkübe edilmişlerdir. Veriler üç

bağımsız deneyin ortalama  $\pm$  SH'ı olarak ifade edildi (\*  $p<0.05$  Kontrol grubuna göre anlamlıdır; #  $p<0.05$  10  $\mu$ M  $A\beta_{25-35}$  grubuna göre anlamlıdır).

Western blot sonuçlarına göre  $A\beta_{25-35}$  (5  $\mu$ M; 32 saat) uygulaması LC3II protein ekspresyonunda azalmaya neden olmuştur ( $p<0.05$ ).

VİN (100  $\mu$ M), LEV (30 $\mu$ M) ve İB (50  $\mu$ M) tek başlarına LC3II seviyelerinde kontrole göre anlamlı değişiklik yapmazlarken  $A\beta_{25-35}$  ile beraber uygulamaları tek başına  $A\beta_{25-35}$ 'uygulamasına kıyasla LC3II protein ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırmıştır (# $p<0.05$ ).  $A\beta_{25-35}$  ile eş zamanlı LEV (30 $\mu$ M) ve İB (50  $\mu$ M) uygulaması,  $A\beta_{25-35}$  ile eş zamanlı VİN (100 $\mu$ M) uygulamasına göre LC3II protein ekspresyonunda anlamlı artışa neden olmuştur (&,  $p<0.05$ ).

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmanın amacı, AH'nın patogenezinin sorumlu nörotoksik protein  $A\beta_{25-35}$  uygulanan fare hipokampal nöron (HT-22) hücre kültürlerinde PDEİ'lerden vinposetin (VIN), levosimendan (LEV) ve ibudilastin (İB) hücre canlılığı ve korunmasında rol alan sirtuin-1 (SIRT1) ekspresyonuna ve bazı otofaji proteinlerine olan etkilerini değerlendirmektir. Elde ettiğimiz bulgulara göre, HT-22 hücre hatlarında,  $A\beta_{25-35}$  (5  $\mu$ M) uygulaması, SIRT-1 ekspresyonunda azalmaya neden olmuş,  $A\beta_{25-35}$  ile eş zamanlı PDEİ uygulaması, SIRT-1 ekspresyonundaki bu azalmayı geri çevirmiştir. Otofaji proteinlerinden ATG5, beclin-1 (BECN1) ve otofaji belirteci LC3II'nin de ekspresyonları  $A\beta_{25-35}$  uygulaması ile azalmış,  $A\beta_{25-35}$  ile eş zamanlı PDEİ uygulaması, bu azalmayı geri döndürmüştür.

Günümüzde nörodejeneratif hastalıkların mekanizmasını aydınlatmak üzere yapılan çalışmalar ile giderek artan hücre içi sinyal yollarına yenileri eklenmekte ve bu hastalıklardan korunmak veya bu hastalıkları tedavi etmek üzere geliştirilecek etkin tedavi seçeneklerini detaylandırmaktadır. Nörodejeneratif hastalıkların mekanizmasını aydınlatmak üzere yapılan çalışmalar çeşitli enzim inhibitör ya da aktivatörlerinin bu hastalıklardan korunmak veya tedavi etmek üzere geliştirilecek etkin tedavi seçenekleri arasında yer aldığını göstermektedirler. Bahsi geçen enzimler çok çeşitli sinyal yollarını aktive ya da inhibe ederek nörodejeneratif hasarı yavaşlatılabilmekte ve/veya da azaltılabilmektedir.

Nörodejeneratif hastalıklardan biri olan AH, beyinde  $A\beta$  peptidlerin birikimi ve nörofibriler yumakların oluşumu ile karakterize, nöron kaybı ve beyinde inflamasyonun eşlik ettiği, bilişsel fonksiyonların azaldığı ve demansın gözlemlendiği nörodejeneratif bir hastalıktır[5], [6]. İnsan ömrünün giderek uzamasıyla demans gibi daha çok yaşlıları etkileyen hastalıkların görülme sıklığında önemli bir artış olmuştur. AH'nin en sık görülen demans türü olması nedeniyle yakın gelecekte AH ile daha da sık karşılaşılması olasıdır. Bu nedenle  $A\beta$  birikimini veya toksisitesini azaltacak yaklaşımlar, AH gelişimini önleyebilir ya da yavaşlatabilir.

AH patofizyolojisinde A $\beta$  birikimi ve tau fosforilasyonu sonucu nörofibriler yumak oluşumunun nörodejeneratif hasarı başlatan olaylar olduğu düşünülmektedir [212]. Bu nöropatolojik oluşumların en fazla-hafıza ve bilinçle ilgili beyin bölgesi- hipokampusta görülmesi de AH'nin en belirleyici semptomlarından olan hafıza kaybı, görsel-uzaysal yeteneklerde azalma ile yakından ilişkilidir [8].

Son yıllarda yapılan çalışmalar AH patolojisi ile otofaji yolakları arasında sıkı bir ilişki olduğunu göstermektedir. Otofaji, AH'nin patolojisini oluşturan A $\beta$  gibi protein agregatlarının lizozomal yıkımla parçalanmasında ve hücreden uzaklaştırılmasında yaşamsal öneme sahiptir. Postmitotik sinir hücreleri ve A $\beta$  peptid gibi yanlış katlanan nörodejeneratif proteinlerin ve hasarlı organellerin enzimatik yolla parçalanarak hücreden uzaklaştırılmaları için otofajiye ihtiyaçları vardır. A $\beta$ 'nın beyin dokularındaki aşırı birikimi oksidatif strese neden olarak çoğu hücre içi organellere zarar verebilir. Hasarlı organellerin ve makromoleküllerin kontrollü uzaklaştırılması otofajinin sinir koruyucu rolleri arasındadır. Bu nedenle AH tedavisinde, bir yandan oksidatif hasarı önleyen, diğer yandan da otofajik yolakları harekete geçiren yeni tedavi yaklaşımlarının hızla önem kazandığı bir dönemece girilmiştir [95], [213].

Bu sinyal yolaklarından birisi de Sirtuin (SIRT, gen transkripsiyonunun sessiz bilgi düzenleyicileri) ailesidir. Sinir hasarına karşı hedefe yönelik stratejilerin yeni tedavi anlayışını oluşturduğu günümüzde SIRT1 bu amacı gerçekleştirecek yeni, güvenli ve etkili tedavi stratejilerinin belirlenmesine aday bir molekül olma yolunda ilerlemektedir.

Şimdiye kadar sirtuinlerin memeli hücrelerinde ortak katalitik bölgeye ve NAD<sup>+</sup>-bağlama bölgesine sahip yedi izoformu (SIRT1-7) tanımlanmıştır. SIRT1 sitoplazmada ve çekirdekte; 6 ve 7 çekirdekte; 3, 4 ve 5 mitokondride yerleşiktir. SIRT2 fizyolojik şartlarda sitoplazmada bulunurken bazı durumlarda çekirdeğe de transloke olabilmektedir.

SIRT1'in stres cevabına, apoptoza, mitokondri fonksiyonlarına, hücre yenilenmesine ve sinir hasarına karşı koruyucu etkinliği bilinmektedir ve çeşitli metabolik ve sinyal proteinlerinin deasetilasyonunda rolü bulunmaktadır. Sinir hücreleri, primer nöronlar ve nörolojik fare hastalık modellerinde yapılan araştırmalar bu ailenin üyesi olan SIRT1'in hasara karşı nöron koruyucu etkisini işaret etmektedirler[157].

AH'de SIRT1 ekspresyonunun azaldığı, APP'nin arttığı tespit edilmiştir. AH'de düşen SIRT1'in ekspresyonunun artan NF $\kappa$ B aktivitesine bağlı olduğu ve bunun da A $\beta$

toksisitesi ve inflamatuvar yollara aracılık ettiği gösterilmiştir. SIRT1 aksonları hasardan korumakla kalmayıp hipokampüste hafıza ve sinaptik plastisiteden de sorumludur. SIRT1 eksikliği/kaybı A $\beta$  ve mikrotübül bağımlı protein tau'nun Alzheimer'li hastaların beyin korteksinde birikimine yol açmaktadır[214]. A $\beta$ 'nın toksik fragmanı A $\beta$ <sub>25-35</sub> 'e maruz kalan SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde sinir koruyucu SIRT1 ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir[160]. AH'da A $\beta$ <sub>25-35</sub> biriken bölgenin çevresinde yer alan astrositlerde de SIRT1 protein ekspresyonunda azalma gözlenmiştir[161]. Parkinson hastalığı (PH), çoklu sistem atrofisi ve Lewy cisimcikli demans gibi nörodejeneratif hastalıklarda rol oynayan  $\alpha$ -sinnüklein agregatlarının biriktiği fare beyinlerinde SIRT1 ekspresyonu düşmektedir[164].

SIRT1, ökaryotik hücrelerde hücrenin enerji dengesi için adeta bir enerji sensörü gibi görev yapan AMPK ile yakın ilişkidir ve sinerjistik olarak beraber çalışmaktadır. Nörodejeneratif hastalıklarda hasarlı mitokondrinin SIRT1/AMPK aksinin inhibisyonu göze çarpmaktadır. AMPK bazı çalışmalarda SIRT1'in alt yolağı olarak bazen ise üst yolağı olarak tanımlanmaktadır. Her iki durumda da SIRT/AMPK etkileşimi özellikle nörodejeneratif hastalıklar gibi yaşa bağlı hastalıklarda önemlidir. Özellikle SIRT/AMPK etkileşimi AH'da A $\beta$  birikimi ve bilişsel fonksiyonlarda öne çıkmaktadır[215]. Ampelopsin olarak da bilinen doğal flavonoid yapılı dihidromirisetin isimli bileşiğin SIRT/AMPK yolağını ederek aktive ettiği, bu etkisini inflamatuvar yanıtları ve hipokampal nöronal apoptozu inhibe ederek gerçekleştirdiği; hipokampüslerine A $\beta$  enjekte edilen sıçan AH modelinde öğrenme ve bellek fonksiyonlarını iyileştirdiği gösterilmiştir[215].

SIRT1'in farmakolojik aktivasyonunun ve ekspresyonunun nörodejeneratif hastalık patogenezi azalttığı gözlenmiştir. Bununla ilgili en etkin çalışmalar bir bitkisel polifenol olan resveratrol ile yapılmıştır. Resveratrol aynı zamanda nonspesifik fosfodiesteraz enzim (PDE) inhibitörüdür ve cAMP/AMPK/SIRT1 sinyal yolağını indüklemiş ve beynin ATP enerji tüketimini yeniden düzenleyerek sıçanda iskemik inmeye karşı sinir koruyucu etkinlik göstermiştir[177]. AH'da SIRT1 aktivasyonu otofaji aracılı mekanizma ile tau agregasyonunu inhibe edebilmektedir[178]. SIRT1'in farmakolojik aktivasyonu asetillenmiş p53 ve diğer proapoptotik faktörlerin down-regülasyonuna neden olarak nöron ölümünü önlemektedir[179]. SIRT/AMPK yolağının aktivasyonu otofaji aracılı mekanizmalarla hücre ömrünün uzamasını sağlar[180].

Resveratrol'un SIRT1/AMPK aktivasyonu yaparak nörit uzaması ve nöral plastisiteye neden olduğu gösterilmiştir[181], [182]. PC12 hücrelerinde  $A\beta_{25-35}$  ile oluşturulan nörotoksisitenin resveratrol ile indüklenen otofaji yoluyla azaldığı ve bu azalmada SIRT1 artışının kısmen katkısı olduğu gösterilmiştir[183]. Resveratrolün içv  $A\beta_{1-42}$  enjekte edilen sıçan AH modelinde, hipokampus ve prefrontal kortekste azalan AMPK/PGC-1 $\alpha$  (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; Peroksizom proliferatör-aktif reseptör gama koaktivatörü 1-alfa) ve artan inflamatuvar NF- $\kappa$ B/ IL-1 $\beta$  seviyelerini geri çevirerek hafıza fonksiyonlarını düzelttiği gözlenmiştir[216]. Zerdeçalın etken maddesi antioksidan, antiseptik, analjezik, antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve antikarsinojen özelliklere sahip kurkuminin PDE4D enzim inhibitörü etki göstererek hafıza fonksiyonlarını arttırdığı ve bu etkisini SIRT1 üzerinden yaptığı düşünülmektedir[186].

Resveratrol gibi nonspesifik, kurkumin ve silostazol gibi spesifik üç PDE inhibitörünün SIRT1, AH hastalık modelleri ve otofaji üzerindeki etkileri bizi bu enzim ve inhibitörleri üzerinde yapılan diğer SSS çalışmalarını detaylı incelemeye itmiştir. Öncelikle sitotoksisite çalışmaları gerçekleştirilerek PDEİ'lerin hücre canlılığına olan etkileri ve uygun konsantrasyonları bulunmuştur. PDEİ'ler literatürdeki terapötik konsantrasyonlarını içeren logaritmik ve numerik aralıklardaki tüm konsantrasyonlarında hücre canlılığını arttırmıştır. Bu sonuç PDEİ'lerin hücre proliferasyonunu arttırıcı etkilerinden kaynaklanabilir.

PDE1'in hipokampal ve kortikal nöronlarda anlamlı oranda ekspresyonu hafıza oluşumu ve depolanmasında önemli bölgelerin hücrelerarası cGMP ve cAMP seviyelerini kontrol ettiğinin bir göstergesidir. cGMP/PKG/CREB ve cAMP/PKA/CREB yolakları PDE inhibitörlerinin bilişsel faaliyetleri arttırıcı etki gösterdiği yolaklardır. VIN'in CREB fosforilasyonu yaparak sıçanlarda hafıza fonksiyonlarını arttırdığı gösterilmiştir. VIN vinkamin alkaloidinin sentetik türevidir ve serebrovasküler orjinli SSS hastalıklarının tedavi ve önlenmesinde yaygın olarak kullanılır. Serebral kan akımını da arttırdığı gösterilmiştir. PDE1 inhibisyonu cGMP seviyesini arttırarak serebral arter dilatasyonu yapar. VIN'in veratridinin indüklediği Na<sup>+</sup> kanal aktivitesini ve glutamat salıverilmesini inhibe ettiği gösterilmiştir. VIN LTP'yi arttırır ve dendritlerin yapısal dinamiklerini arttırarak hafızada rol oynar, skopolaminin yaptığı hafıza kaybını geri döndürür ve insanda bilişsel fonksiyonlarda artışa neden olur. Streptozotosinin deneysel

olarak sıçanlara icv enjeksiyonu, sporadik AH'da gözlenen nöropatolojik ve biyokimyasal değişikliklere neden olarak AH'ın erken patofizyolojik değişikliklerini taklit eden geçerli bir modeldir. VİN'in bu modelde bilişsel fonksiyonlar ve oksidatif stres üzerine olan etkileri incelenmiş ve streptozosinin oluşturduğu davranış değişikliğini, kolinerjik fonksiyon bozukluğunu ve oksidatif-nitritif stresi (MDA, LDH, nitrit artışı, GSH azalması) geri çevirdiği gözlenmiştir[196]. Beyinde bilateral arter oklüzyonu ile gerçekleştirilen kronik hipoperfüzyon modelinde melatoninin MT1 ve MT2 resetör agonisti agomelatin ve PDE1 selektif inhibitörü VİN'in vasküler demansı, bilişsel fonksiyonları, kolinerjik fonksiyon kaybını ve oksidatif stresi (katalaz, glutatyon ve superoksid dismutaz enzimindeki azalmayı, malondialdehit artışı) geri çevirdiği, infarkt bölgesinde anlamlı azalma yaptığı gözlenmiştir[197].

Biz çalışmamızda 100  $\mu$ M konsantrasyonda tek başına uygulanan VİN'in SIRT1 gen ekspresyonu (Şekil 4-2) ve protein ekspresyonunu (Şekil 4-5) değiştirmediğini gözlemledik.  $A\beta_{25-35}$ 'in SIRT1 üzerinde yaptığı azalma hem gen hem de protein ekspresyonu ile gösterilmiştir (Şekil 4-2 ve 4-5). VİN (100  $\mu$ M) HT22 hücrelerinde 5  $\mu$ M  $A\beta_{25-35}$ 'in yaptığı SIRT1 ekspresyonundaki bu azalmayı geri çevirmiştir (Şekil 4-2 ve 4-5). Çalışmamızda  $A\beta_{25-35}$ , p-AMPK protein ekspresyonunu azaltırken p-mTOR ekspresyonunu arttırmıştır. VİN (100  $\mu$ M)  $A\beta_{25-35}$ 'in yaptığı p-AMPK ekspresyonundaki azalmayı ve p-mTOR ekspresyonundaki artışı geri döndürmüştür (Şekil 4-6 ve 4-7).

Çalışmalarda spesifik PDE3 inhibitörü silostazolun nöronal hücrelerde SIRT1 ekspresyonunu arttırdığı ve endojen  $A\beta$  üretimini baskıladığı[217] gösterilmiştir. Ek olarak aynı nöron hücrelerine dışarıdan  $A\beta_{25-35}$  uygulaması ile ya da transgenik olarak endojen  $A\beta$  sentezleyen hatlarında azalan SIRT1'nin ve yanı sıra ATG5, BECN1 ve LC3-II gibi otofaji proteinlerinin ekspresyonlarının silostazol tedavisi ile arttığı gösterilmiştir[185]. PDE3 inhibitörü LEV'in asfiksi ile kardiyak arrest oluşturulmuş sıçanlarda, serebral ya da sistemik inflamasyon parametrelerine bağlı olmayan yollarla nöronları hasardan koruduğu gösterilmiştir[205]. Biz çalışmamızda tek başına 30 $\mu$ M konsantrasyonda LEV'in SIRT1 gen ekspresyonunu (Şekil 4-2) ve protein ekspresyonunu (Şekil 4-5) değiştirmediğini gözlemledik. LEV (30 $\mu$ M) HT22 hücrelerinde 5  $\mu$ M  $A\beta_{25-35}$ 'in yaptığı SIRT1 ekspresyonundaki azalmayı geri çevirmiştir

(Şekil 4-2 ve 4-5). LEV (30 $\mu$ M) A $\beta$ <sub>25-35</sub>'in yaptığı p-AMPK ekspresyonundaki azalmayı ve p-mTOR ekspresyonundaki artışı da geri döndürmüştür (Şekil 4-6 ve 4-7).

İbudilast bronşial astımın tedavisinde bronkodilatör etkinliği nedeniyle kullanılan bir non selektif PDE 3, 4, 10 ve 11 inhibitörüdür. Siklik nükleotidleri metabolize ederek hücre farklılaşması, sinaptik plastisite ve inflamatuvar cevaplar üzerinde rol oynar. İbudilastın prelinik ve klinik çalışmalarda daha geniş etki alanı olduğu gösterilmiştir. Bunlar arasında proinflamatuvar sitokinleri (IL-6, IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ) baskılamak, toll benzeri reseptör 4 (TLR-4) blokajı yapmak, makrofaj migrasyon inhibitör faktörünü (MIF) inhibe etmek, antiinflamatuvar sitokin (IL-10) upregülasyonu ve nörotrofik faktörleri (GDNF, NGF, NT-4) arttırmak sayılabilir. İbudilastın glial aktiviteyi azaltıcı etkisinin PDEİ aktivitesinden bağımsız olduğu gösterilmiştir. KBE geçmesi, iyi tolere edilebilmesi ve oral yolla uygulanabilmesi gibi avantajlarının bulunması, mevcut tedavi yaklaşımlarının optimumun altında etkinlikleri ve zayıf tolere edilebilirlikleri nedeniyle nöroinflamatuvar durumlarda iyi bir terapötik ajan olmaya adaydır[207]. SSS'ine hedefli antiinflamatuvar aktivitesinden dolayı MS'te, nöropatik ağrıda, opiyat toleransını düşürerek opiyat etkinliğinin ve güvenirliliğinin arttırılmasında potansiyel ilaç adaydır[208]. Biz çalışmamızda 50  $\mu$ M konsantrasyonda tek başına uygulanan İB'in SIRT1 gen ekspresyonunda artış yaptığını ancak bunun protein ekspresyonuna yansımadığını gözlemledik. Western blot sonuçlarına göre tek başına 50  $\mu$ M konsantrasyonda uygulanan İB SIRT1 protein ekspresyonunu değiştirmemektedir. İB HT22 hücrelerinde 5  $\mu$ M A $\beta$ <sub>25-35</sub>'in yaptığı SIRT1 ekspresyonundaki azalmayı geri çevirmiş ve kontrol değerlerinin üstünde anlamlı artışa neden olmuştur (Şekil 4-2 ve 4-5). İB'in tek başına p-AMPK protein ekspresyonunda kontrole göre anlamlı artış yaptığını p-mTOR protein ekspresyonunu değiştirmedikini gözlemledik. İB A $\beta$ <sub>25-35</sub>'in yaptığı p-AMPK ekspresyonundaki azalmayı ve p-mTOR ekspresyonundaki artışı ise geri çevirmiştir (Şekil 4-6 ve 4-7).

Hücrede enerjiye duyarlı ana molekül AMPK aktivasyonu mTOR kompleksini baskılayarak otofaji ilişkili mekanizmalarla nöral enerji statüsünü yükseltmektedir. AMPK aktivasyonu mTOR'u inhibe ederek otofajiyi uyarmakta ve nöronal fonksiyonları korumaktadır [167]. Bir başka değişle mTOR, hücresel enerji mevcudiyetini algılayan ve hücresel çoğalmayı düzenleyen bir protein kinazdır. mTOR ayrıca otofajide ana negatif regülatör görevi görür. Çalışmalarda mTOR sinyalinin,

Alzheimer hastalarının beyinlerinin seçilmiş bölgelerinde hiperaktif olduğu göstermiştir [218], [219]. Tg2576 farelerinin beyinlerinde, mTOR sinyali ve hipokampustaki gen ekspresyonu genetik olarak azaltılarak otofaji indüksiyonu arttırılmış ve [220] A $\beta$  birikimi düşürülerek bellek bozukluklarından korunmuştur [133].

Otofaji up-regülasyonunun nörodejeneratif hastalıklarda faydalı etkileri ilk önce mTORC1 inhibitörü rapamisin ile gelmiştir. Rapamisin, FDA onaylı antifungal bir antibiyotik, antikanser sitostatik bir ajan ve bir immünosupresandır. Rapamisin, memeli hücrelerinde raptor (mTOR düzenleyici ilişkili protein) /mTOR ilişkisini stabilize eder ve otofaji başlamasını baskılayan mTORC1 aktivitesini inhibe ederek etki gösterir. Bazı çalışmalar AH'de rapamisin ile otofajiyi uyarmanın potansiyel olarak yararlı etki gösterebileceğini ortaya koymuştur. İki AH fare modelinde rapamisin uygulamasının hem A $\beta$  üretiminin azalmasına hem de düşük tau birikimine sebep olduğunu ve böylece daha iyi bilişsel performansa yol açtığını göstermiştir [218], [219]. Bununla birlikte, mTOR sinyal yolunda yer alan proteinleri hedef alan ilaçlar klinik kullanım potansiyeline sahip olsa da mTOR yolağının kendisi hücre büyümesi ve gen transkripsiyonu da dahil olmak üzere birçok kritik hücresel süreçte yer aldığından mTOR'un uzun süreli inhibisyonu hastalar üzerinde toksik yan etkilere neden olabilir. Bu nedenle, rapamisin uzun süreli kullanım için ideal bir ilaç olarak kabul edilmemiştir.

FDA ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından renal hücreli karsinom tedavisi için onaylanan yeni geliştirilen bir bileşik olan temsirolimusun APP/PS1 farelerinin beyinlerinde otofajiye bağlı A $\beta$  klirensini artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca sonuçlar temsirolimusun okadaik asit uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde ve P301S transgenik farelerin beyinde hiperfosforile edilmiş tau'nun otofajik klirensini arttırdığı göstermiştir [221]. Bu arada, davranış testleri temsirolimusun hem APP/PS1 hem de P301S tg farelerde uzaysal öğrenme ve hafıza yeteneklerini geliştirdiğini göstermiştir. [133]. Tüm bu sonuçlar mTOR hiperaktivitesinin A $\beta$  birikimine neden olabileceğini ve mTOR inhibisyonunun AH tedavisi için potansiyel bir terapötik strateji olarak kullanabileceğini belirtmiştir.

Pek çok Atg proteini, işlevlerini yerine getirebilmek için SIRT1 tarafından deasetillenir. Bunlardan biri de beklin-1'dir. SIRT1 otofagozom ve endozomun olgunlaşması için beklin-1'i deasetiller. SIRT1 uyarımının nöronlarda otofajik akışı tetiklediği bilindiğinden AH'de A $\beta$  birikiminden kısmen beklin-1'in SIRT1 aracılı

deasetillenmesindeki bozukluk olduğu sonucu da çıkarılabilir[222]. Beklin-1, otofagozom oluşumunun başlatılmasını düzenleyen bileşenleri birleştiren bir moleküler platform görevi görür. Beklin-1'in aktivasyonu, otofajiyi düzenler. Örneğin BECN1a<sup>-/-</sup>/transgenik farelerde beclin-1 ekspresyonu belirgin şekilde azalmıştır. Becn1 (BECN1a<sup>-/-</sup>) bulunmayan fareler embriyogeneze[223], [224] ölürken, (BECN1<sup>+/-</sup>) fareler yaşayabilirler; ve bu farelerde iskelet kası, bronş epitel hücreleri ve B lenfositlerinde otofagozom oluşumunun azaldığı görülmüştür[223], [225]. Bu durum nöronal otofajinin azalmasına yol açmış ve sonunda nörodejenerasyonla sonuçlanmasına neden olmuştur. Buna paralel olarak, beclin-1'in azalması özellikle AH hastalığının patolojisinde en çok etkilenen beyin bölgelerinde gözlenmiştir. 6 aylık APP transgenik farelerin frontal korteksine ve hipokampusüne 8 hafta boyunca fare beclin-1'i eksprese eden lentivirüs uygulaması, belirgin beclin-1 ekspresyonu ve önemli ölçüde azalmış hücre içi A $\beta$  immünoreaktivitesi ile sonuçlanmıştır [225]. Çalışmamızda HT22 hücrelerinde otofaji belirteci LC3II tek bant olarak gözlenmiş, bantlar LC3I'in LC3II'ye dönüşümü hesaplanmadan  $\beta$ -aktine göre normalize edilmişlerdir. A $\beta_{25-35}$ 'in otofaji belirteci LC3II protein ekspresyonunu ve diğer otofaji genlerinden ATG5 ve BECN1'in ekspresyonlarını azalttığı gözlenmiştir (Şekil 4-8, 4-3, 4-4). VİN (100  $\mu$ M) LC3II protein ekspresyonunu tek başına değiştirmezken A $\beta_{25-35}$  ile azalan LC3II protein ekspresyonunu arttırmıştır. VİN A $\beta_{25-35}$  ile azalan ATG5 ve BECN1 gen ekspresyonunu değiştirmemiş (Şekil 4-3 ve 4-4). LEV (30  $\mu$ M) LC3II protein ekspresyonunu tek başına değiştirmezken A $\beta_{25-35}$  ile azalan LC3II protein ekspresyonunu arttırmıştır. LEV A $\beta_{25-35}$  ile azalan ATG5 gen ekspresyonunda belirgin bir artışa neden olmuş, BECN1 gen ekspresyonunu ise değiştirmemiştir (Şekil 4-3 ve 4-4). İbudilast (50  $\mu$ M) LC3II protein ekspresyonunu tek başına değiştirmezken A $\beta_{25-35}$  ile azalan LC3II protein ekspresyonunu arttırmıştır. İbudilast A $\beta_{25-35}$  ile azalan ATG5 gen ekspresyonunu değiştirmemiş, BECN1 gen ekspresyonunu ise kontrol değerlerinin üzerine çıkarmıştır (Şek 4-3 ve 4-4).

## SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu bulgular doğrultusunda, bahsi geçen PDEİ'lerin  $A\beta_{25-35}$  uygulanan hücrelerde farmakolojik etkisini, SIRT1 ile ilişkili ve hücre koruyucu AMPK aktivasyonu ve otofajinin düzenlenmesinde etkin mTOR üzerinden gerçekleştirdiğini söyleyebiliriz.  $A\beta_{25-35}$  uygulanan hücrelerde değişen SIRT1, p-AMPK, p-mTOR, beclin-1, ATG5, LC3II ekspresyon düzeylerine PDEİ'ler hücre koruyucu ve otofajiyi arttırıcı yönde destek vermişlerdir. PDEİ'lerin SIRT1 ekspresyonunu arttırmalarının yanı sıra SIRT1 ile asetillenmiş beclin-1, LC3II ve ATG5 ekspresyonlarında yaptıkları artışı bu etkinin kanıtı olarak düşünebiliriz. Ancak her bir PDEİ'nin otofajinin farklı komponentleri üzerinden etki gösterdiği söylenebilir.

İleriki çalışmalarımızda,  $A\beta_{25-35}$  uygulaması ile eş zamanlı olarak PDEİ ile tedavi edilen hücrelerde SIRT1 ile otofaji proteinleri arasındaki korelasyonu açıklığa kavuşturmak istiyoruz. Bunun için, SIRT1 inhibitörleri varlığında beclin-1, ATG5 ve LC3II ekspresyon düzeylerine bakmayı amaçlamaktayız. SIRT1 protein ekspresyonundaki artışın enzimatik aktivite artışına etkili olup olmadığını gözlemleyebilmek için SIRT deasetilasyon aktivitesine de bakmayı planlamaktayız.

## KAYNAKLAR

- [1] A. Leibling, "Doença de Alzheimer - (Um)a historia," *Informacao Psiquiatrica*. 1998.
- [2] I. P. Vatanabe, P. R. Manzine, and M. R. Cominetti, "Historic concepts of dementia and Alzheimer's disease: From ancient times to the present," *Revue Neurologique*. Elsevier Masson SAS, 2019.
- [3] G. E. Berrios and T. OLSON, "The History of Mental Symptoms: Descriptive Psychopathology Since the Nineteenth Century," *Nurs. Hist. Rev.*, 1999.
- [4] J. Ramirez-Bermudez, "Alzheimer's Disease: Critical Notes on the History of a Medical Concept," *Archives of Medical Research*. 2012.
- [5] H. Akiyama *et al.*, "Inflammation and Alzheimer's disease," *Neurobiology of Aging*, vol. 21, no. 3. Elsevier Inc., pp. 383–421, 2000.
- [6] D. J. Selkoe, "The cell biology  $\beta$ -amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease," *Trends in Cell Biology*, vol. 8, no. 11. pp. 447–453, 01-Nov-1998.
- [7] N. R. Graff-Radford and B. K. Woodruff, "Frontotemporal dementia," *Seminars in Neurology*, vol. 27, no. 1. pp. 48–57, Feb-2007.
- [8] J. Götz, A. Eckert, M. Matamalas, L. M. Ittner, and X. Liu, "Modes of A $\beta$  toxicity in Alzheimer's disease," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 68, no. 20. pp. 3359–3375, Oct-2011.
- [9] W. Kaplan, "Priority Medicines for Europe and the World 2013 Update Background Paper 6-Priority diseases and reasons for inclusion."
- [10] C. C. Liu, T. Kanekiyo, H. Xu, and G. Bu, "Apolipoprotein e and Alzheimer disease: Risk, mechanisms and therapy," *Nature Reviews Neurology*. 2013.
- [11] R. Anand, K. D. Gill, and A. A. Mahdi, "Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future," *Neuropharmacology*. 2014.
- [12] M. Kivipelto *et al.*, "Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: Longitudinal, population based study," *Br. Med. J.*, 2001.
- [13] R. A. Nixon, "Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease," *Journal of Cell Science*, vol. 120, no. 23. pp. 4081–4091, 01-Dec-2007.
- [14] T. Hara *et al.*, "Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice," *Nature*, vol. 441, no. 7095, pp. 885–889, Jun. 2006.
- [15] J. N. Keller, K. B. Hanni, and W. R. Markesbery, "Impaired proteasome function in Alzheimer's disease," *J. Neurochem.*, vol. 75, no. 1, pp. 436–439, 2000.
- [16] J. R. Kim *et al.*, "Identification of amyloid  $\beta$ -peptide responsive genes by cDNA microarray technology: Involvement of RTP801 in amyloid  $\beta$ -peptide toxicity," *Exp. Mol. Med.*, vol. 35, no. 5, pp. 403–411, Oct. 2003.

- [17] S. Majumder, A. Richardson, R. Strong, and S. Oddo, "Inducing autophagy by rapamycin before, but not after, the formation of plaques and tangles ameliorates cognitive deficits," *PLoS One*, 2011.
- [18] R. A. Nixon, "The role of autophagy in neurodegenerative disease," *Nature Medicine*. 2013.
- [19] F. Zhang *et al.*, "Protective effects and mechanisms of sirtuins in the nervous system," *Progress in Neurobiology*. 2011.
- [20] M. Wojcik, K. Mac-Marcjanek, and L. Wozniak, "Physiological and Pathophysiological Functions of SIRT1," *Mini-Reviews Med. Chem.*, 2012.
- [21] T. Araki, Y. Sasaki, and J. Milbrandt, "Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration," *Science (80-. )*, 2004.
- [22] J. Gao *et al.*, "A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134," *Nature*, 2010.
- [23] C. Julien *et al.*, "Sirtuin 1 reduction parallels the accumulation of tau in alzheimer disease," *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 2009.
- [24] L. Chouliaras *et al.*, "Epigenetic regulation in the pathophysiology of Alzheimer's disease," *Progress in Neurobiology*. 2010.
- [25] L. Migliore and F. Coppedè, "Genetics, environmental factors and the emerging role of epigenetics in neurodegenerative diseases," *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2009.
- [26] D. Mastroeni, A. Grover, E. Delvaux, C. Whiteside, P. D. Coleman, and J. Rogers, "Epigenetic changes in Alzheimer's disease: Decrements in DNA methylation," *Neurobiol. Aging*, 2010.
- [27] T. Zetzsche, D. Rujescu, J. Hardy, and H. Hampel, "Advances and perspectives from genetic research: Development of biological markers in Alzheimers disease," *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2010.
- [28] M. Chalimoniuk and J. B. Strosznajder, "Aging modulates nitric oxide synthesis and cGMP levels in hippocampus and cerebellum: Effects of amyloid  $\beta$  peptide," *Mol. Chem. Neuropathol.*, 1998.
- [29] K. U. Domek-Łopacińska and J. B. Strosznajder, "Cyclic GMP and nitric oxide synthase in aging and alzheimer's disease," in *Molecular Neurobiology*, 2010.
- [30] D. Puzzo *et al.*, "F3/Contactin promotes hippocampal neurogenesis, synaptic plasticity, and memory in adult mice," *Hippocampus*, vol. 23, no. 12, pp. 1367–1382, Dec. 2013.
- [31] D. Puzzo *et al.*, "Effect of phosphodiesterase-5 inhibition on apoptosis and beta amyloid load in aged mice," *Neurobiol. Aging*, 2014.
- [32] A. Contestabile, "The history of the cholinergic hypothesis," *Behavioural Brain Research*. 2011.
- [33] H. Hampel *et al.*, "Revisiting the cholinergic hypothesis in Alzheimer's disease: Emerging evidence from translational and clinical research," *Alzheimer's Dement.*, 2017.

- [34] P. Davies and A. J. F. Maloney, "SELECTIVE LOSS OF CENTRAL CHOLINERGIC NEURONS IN ALZHEIMER'S DISEASE," *The Lancet*. 1976.
- [35] R. Bartus, R. Dean, B. Beer, and A. Lippa, "The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction," *Science* (80-. ), 1982.
- [36] P. J. Whitehouse *et al.*, "Reductions in Acetylcholine and Nicotine Binding in Several Degenerative Diseases," *Arch. Neurol.*, 1988.
- [37] A. Nordberg, I. Alafuzoff, and B. Winblad, "Nicotinic and muscarinic subtypes in the human brain: Changes with aging and dementia," *J. Neurosci. Res.*, 1992.
- [38] J. Olloquequi *et al.*, "Excitotoxicity in the pathogenesis of neurological and psychiatric disorders: Therapeutic implications," *Journal of Psychopharmacology*. 2018.
- [39] J. A. Hardy and G. A. Higgins, "Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis," *Science*. 1992.
- [40] G. Evin and A. Weidemann, "Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease A $\beta$  amyloid peptides," *Peptides*, 2002.
- [41] D. W. Dickson, "Neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease: A perspective from longitudinal clinicopathological studies," *Neurobiol. Aging*, 1997.
- [42] D. J. Selkoe, "Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease," *Nature*. 1999.
- [43] A. Goate *et al.*, "Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease," *Nature*, 1991.
- [44] G. Chen *et al.*, "A learning deficit related to age and  $\beta$ -amyloid plaques in a mouse model of alzheimer's disease," *Nature*, 2000.
- [45] R. Kaye *et al.*, "Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis," *Science* (80-. ), 2003.
- [46] P. Eikelenboom, S. S. Zhan, W. A. van Gool, and D. Allsop, "Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 15, no. 12, pp. 447–450, 1994.
- [47] P. L. McGeer and E. G. McGeer, "The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases," *Brain Research Reviews*, vol. 21, no. 2. pp. 195–218, 1995.
- [48] J. Rogers *et al.*, "Inflammation and Alzheimer's disease pathogenesis," *Neurobiol. Aging*, 1996.
- [49] Y. W. Zhang, R. Thompson, H. Zhang, and H. Xu, "APP processing in Alzheimer's disease," *Molecular Brain*. 2011.
- [50] D. Campion *et al.*, "Mutations of the presenilin I gene in families with early-onset alzheimer's disease," *Hum. Mol. Genet.*, 1995.
- [51] M. Cruts *et al.*, "Molecular genetic analysis of familial early-onset alzheimer's disease linked to chromosome 14q24.3," *Hum. Mol. Genet.*, 1995.

- [52] R. Sherrington *et al.*, "Alzheimer's disease associated with mutations in presenilin 2 is rare and variably penetrant," *Hum. Mol. Genet.*, 1996.
- [53] W. J. Strittmatter and A. D. Roses, "Apolipoprotein E and Alzheimer disease," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995.
- [54] S. H. Barage and K. D. Sonawane, "Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease," *Neuropeptides*, vol. 52. Churchill Livingstone, pp. 1–18, 2015.
- [55] C. Haass and D. J. Selkoe, "Soluble protein oligomers in neurodegeneration: Lessons from the Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 8, no. 2. pp. 101–112, Feb-2007.
- [56] J. Q. Trojanowski and M. P. Mattson, "Overview of Protein Aggregation in Single, Double, and Triple Neurodegenerative Brain Amyloidoses," *NeuroMolecular Medicine*, vol. 4, no. 1–2. pp. 1–5, 2003.
- [57] M. S. Forman, J. Q. Trojanowski, and V. M. Y. Lee, "Neurodegenerative diseases: A decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs," *Nature Medicine*, vol. 10, no. 10. pp. 1055–1063, Oct-2004.
- [58] I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, Y. C. Tung, M. Quinlan, H. M. Wisniewski, and L. I. Binder, "Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1986.
- [59] S. Roy, B. Zhang, V. M. Y. Lee, and J. Q. Trojanowski, "Axonal transport defects: A common theme in neurodegenerative diseases," *Acta Neuropathologica*. 2005.
- [60] Y. Gao, L. Tan, J.-T. Yu, and L. Tan, "Tau in Alzheimer's Disease: Mechanisms and Therapeutic Strategies," *Curr. Alzheimer Res.*, vol. 15, no. 3, Jan. 2018.
- [61] M. A. Pappolla *et al.*, "Mild hypercholesterolemia is an early risk factor for the development of Alzheimer amyloid pathology," *Neurology*, vol. 61, no. 2, pp. 199–205, Jul. 2003.
- [62] G. P. Jarvik, E. M. Wijsman, W. A. Kukull, G. D. Schellenberg, C. Yu, and E. B. Larson, "Interactions of apolipoprotein e genotype, total cholesterol level, age, and sex in prediction of alzheimer's disease: A case-control study," *Neurology*, 1995.
- [63] P. B. Verghese, J. M. Castellano, and D. M. Holtzman, "Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders," *The Lancet Neurology*. 2011.
- [64] G. W. Wood, L. Ling, W. Muller, and G. Eckert, "Cholesterol as a causative agent in Alzheimer disease: a debatable hypothesis," *J Neurochem*, 2014.
- [65] L. Puglielli, R. E. Tanzi, and D. M. Kovacs, "Alzheimer's disease: The cholesterol connection," *Nature Neuroscience*. 2003.
- [66] T. Wisniewski and B. Frangione, "Apolipoprotein E: A pathological chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid," *Neurosci. Lett.*, 1992.
- [67] E. Mohandas, V. Rajmohan, and B. Raghunath, "Neurobiology of *Alzheimer's disease*," *Indian J. Psychiatry*, vol. 51, no. 1, p. 55, 2009.

- [68] D. J. Selkoe, "Alzheimer's disease is a synaptic failure," *Science*. 2002.
- [69] J. Zhang and Q. Liu, "Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain," *Protein Cell*, 2015.
- [70] F. Arenas, C. Garcia-Ruiz, and J. C. Fernandez-Checa, "Intracellular cholesterol trafficking and impact in neurodegeneration," *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2017.
- [71] C. de Duve, "The lysosome turns fifty," *Nat. Cell Biol.*, vol. 7, no. 9, pp. 847–849, Sep. 2005.
- [72] C. de Duve and R. Wattiaux, "Functions of Lysosomes," *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 28, no. 1, pp. 435–492, Mar. 1966.
- [73] M. Forgac, "Vacuolar ATPases: Rotary proton pumps in physiology and pathophysiology," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007.
- [74] Y. Ishida, S. Nayak, J. A. Mindell, and M. Grabe, "A model of lysosomal pH regulation," *J. Gen. Physiol.*, 2013.
- [75] J. A. Mindell, "Lysosomal Acidification Mechanisms," *Annu. Rev. Physiol.*, 2012.
- [76] A. Ježegou *et al.*, "Heptahelical protein PQLC2 is a lysosomal cationic amino acid exporter underlying the action of cysteamine in cystinosis therapy," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2012.
- [77] X. Liu *et al.*, "Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall," *Nature*, 2012.
- [78] Y. Rong *et al.*, "Spinster is required for autophagic lysosome reformation and mTOR reactivation following starvation," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2011.
- [79] C. Sagné *et al.*, "Identification and characterization of a lysosomal transporter for small neutral amino acids," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001.
- [80] J. Kaur and J. Debnath, "Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2015.
- [81] N. Mizushima and M. Komatsu, "Autophagy: Renovation of cells and tissues," *Cell*, vol. 147, no. 4, pp. 728–741, 11-Nov-2011.
- [82] A. Ballabio and V. Gieselmann, "Lysosomal disorders: From storage to cellular damage," *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2009.
- [83] C. M. Bellettato and M. Scarpa, "Pathophysiology of neuropathic lysosomal storage disorders," *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2010.
- [84] F. M. Platt, B. Boland, and A. C. van der Spoel, "Lysosomal storage disorders: The cellular impact of lysosomal dysfunction," *J. Cell Biol.*, 2012.
- [85] M. Filimonenko *et al.*, "Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease," *J. Cell Biol.*, 2007.
- [86] B. Ravikumar *et al.*, "Dynein mutations impair autophagic clearance of aggregate-prone proteins," *Nat. Genet.*, 2005.

- [87] M. R. Spinoso, C. Progidia, A. De Luca, A. M. R. Colucci, P. Alifano, and C. Bucci, "Functional characterization of Rab7 mutant proteins associated with Charcot-Marie-Tooth type 2B disease," *J. Neurosci.*, 2008.
- [88] T. J. C. VAN BERKEL, J. K. KRUIJT, and J. F. KOSTER, "Identity and Activities of Lysosomal Enzymes in Parenchymal and Non-Parenchymal Cells from Rat Liver," *Eur. J. Biochem.*, vol. 58, no. 1, pp. 145–152, 1975.
- [89] S. Kornfeld, "Trafficking of lysosomal enzymes," *FASEB Journal*. 1987.
- [90] A. Ballabio, "The awesome lysosome," *EMBO Mol. Med.*, 2016.
- [91] S. Mukhopadhyay, "Large-scale signal detection: A unified perspective," *Biometrics*, vol. 72, no. 2, pp. 325–334, Jun. 2016.
- [92] G. Parenti, G. Andria, and A. Ballabio, "Lysosomal Storage Diseases: From Pathophysiology to Therapy," *Annu. Rev. Med.*, 2015.
- [93] A. Fraldi, A. D. Klein, D. L. Medina, and C. Settembre, "Brain Disorders Due to Lysosomal Dysfunction," *Annu. Rev. Neurosci.*, 2016.
- [94] J. Pu, C. M. Guardia, T. Keren-Kaplan, and J. S. Bonifacio, "Mechanisms and functions of lysosome positioning," *Journal of Cell Science*. 2016.
- [95] R. A. Nixon, "Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease," *Journal of Cell Science*. 2007.
- [96] W. W. Li, J. Li, and J. K. Bao, "Microautophagy: Lesser-known self-eating," *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2012.
- [97] L. Li, X. Zhang, and W. Le, "Autophagy dysfunction in Alzheimer's disease," *Neurodegenerative Diseases*, vol. 7, no. 4. pp. 265–271, Jun-2010.
- [98] Y. T. Tung *et al.*, "Autophagy: A double-edged sword in Alzheimer's disease," *Journal of Biosciences*. 2012.
- [99] J. Lee, S. Giordano, and J. Zhang, "Autophagy, mitochondria and oxidative stress: Cross-talk and redox signalling," *Biochemical Journal*, vol. 441, no. 2. pp. 523–540, 15-Jan-2012.
- [100] B. Ravikumar *et al.*, "Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology," *Physiological Reviews*. 2010.
- [101] A. R. J. Young *et al.*, "Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes," *J. Cell Sci.*, 2006.
- [102] S. Nakamura and T. Yoshimori, "New insights into autophagosome-lysosome fusion," *Journal of Cell Science*. 2017.
- [103] R. C. Inhorn and P. W. Majerus, "Properties of inositol polyphosphate 1-phosphatase," *J. Biol. Chem.*, 1988.
- [104] A. Kihara, Y. Kabeya, Y. Ohsumi, and T. Yoshimori, "Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network," *EMBO Rep.*, 2001.
- [105] Q. Sun, W. Fan, K. Chen, X. Ding, S. Chen, and Q. Zhong, "Identification of Barkor as a mammalian autophagy-specific factor for Beclin 1 and class III phosphatidylinositol 3-kinase," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2008.

- [106] N. Furuya, J. Yu, M. Byfield, S. Pattingre, and B. Levine, "The evolutionarily conserved domain of Beclin 1 is required for Vps34 binding, autophagy and tumor suppressor function.," *Autophagy*, 2005.
- [107] S. Pattingre *et al.*, "Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy," *Cell*, 2005.
- [108] N. Mizushima, H. Sugita, T. Yoshimori, and Y. Ohsumi, "A new protein conjugation system in human: The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy," *J. Biol. Chem.*, 1998.
- [109] J. M. T. Hyttinen, M. Niittykoski, A. Salminen, and K. Kaarniranta, "Maturation of autophagosomes and endosomes: A key role for Rab7," *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2013.
- [110] E. L. Eskelinen, "Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells.," *Autophagy*. 2005.
- [111] J. Hemelaar, V. S. Lelyveld, B. M. Kessler, and H. L. Ploegh, "A Single Protease, Apg4B, Is Specific for the Autophagy-related Ubiquitin-like Proteins GATE-16, MAP1-LC3, GABARAP, and Apg8L," *J. Biol. Chem.*, 2003.
- [112] I. Tanida, Y. S. Sou, J. Ezaki, N. Minematsu-Ikeguchi, T. Ueno, and E. Kominami, "HsAtg4B/HsApg4B/autophagin-1 cleaves the carboxyl termini of three human Atg8 homologues and delipidates microtubule-associated protein light chain 3- and GABAA receptor-associated protein-phospholipid conjugates," *J. Biol. Chem.*, 2004.
- [113] Y. Kabeya, "LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing," *EMBO J.*, 2000.
- [114] I. Tanida, T. Ueno, and E. Kominami, "LC3 conjugation system in mammalian autophagy," *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2004.
- [115] C. Liang *et al.*, "Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking," *Nat. Cell Biol.*, 2008.
- [116] K. Matsunaga *et al.*, "Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages," *Nat. Cell Biol.*, 2009.
- [117] Y. Zhong *et al.*, "Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex," *Nat. Cell Biol.*, 2009.
- [118] S. Sarkar, "Regulation of autophagy by mTOR-dependent and mTOR-independent pathways: Autophagy dysfunction in neurodegenerative diseases and therapeutic application of autophagy enhancers," *Biochem. Soc. Trans.*, 2013.
- [119] P. A. Li, X. Hou, and S. Hao, "Mitochondrial biogenesis in neurodegeneration," *Journal of Neuroscience Research*. 2017.
- [120] R. K. Chaturvedi and M. F. Beal, "Mitochondrial diseases of the brain," *Free Radical Biology and Medicine*. 2013.
- [121] A. Ben-Zvi, E. A. Miller, and R. I. Morimoto, "Collapse of proteostasis represents an early molecular event in *Caenorhabditis elegans* aging," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2009.

- [122] R. Gupta *et al.*, “Firefly luciferase mutants as sensors of proteome stress,” *Nat. Methods*, 2011.
- [123] S. I. A. Cohen *et al.*, “A molecular chaperone breaks the catalytic cycle that generates toxic A $\beta$  oligomers,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2015.
- [124] G. Schaffar *et al.*, “Cellular toxicity of polyglutamine expansion proteins: Mechanism of transcription factor deactivation,” *Mol. Cell*, 2004.
- [125] T. P. J. Knowles *et al.*, “An analytical solution to the kinetics of breakable filament assembly,” *Science* (80-. ), 2009.
- [126] D. D. Nedialkova and S. A. Leidel, “Optimization of Codon Translation Rates via tRNA Modifications Maintains Proteome Integrity,” *Cell*, 2015.
- [127] S. Preissler *et al.*, “Not4-dependent translational repression is important for cellular protein homeostasis in yeast,” *EMBO J.*, 2015.
- [128] Y. J. Choe *et al.*, “Failure of RQC machinery causes protein aggregation and proteotoxic stress,” *Nature*, vol. 531, no. 7593, pp. 191–195, Mar. 2016.
- [129] D. Balchin, M. Hayer-Hartl, and F. U. Hartl, “In vivo aspects of protein folding and quality control,” *Science*. 2016.
- [130] S. Maday, K. E. Wallace, and E. L. F. Holzbaur, “Autophagosomes initiate distally and mature during transport toward the cell soma in primary neurons,” *J. Cell Biol.*, 2012.
- [131] S. Maday and E. L. F. Holzbaur, “Autophagosome assembly and cargo capture in the distal axon,” *Autophagy*. 2012.
- [132] G. Mariño, F. Madeo, and G. Kroemer, “Autophagy for tissue homeostasis and neuroprotection,” *Current Opinion in Cell Biology*. 2011.
- [133] Q. Li, Y. Liu, and M. Sun, “Autophagy and Alzheimer’s Disease,” *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2017.
- [134] W. Haung Yu *et al.*, “Macroautophagy - A novel  $\beta$ -amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer’s disease,” *J. Cell Biol.*, 2005.
- [135] R. D. Mehra and V. Bijlani, “Ultrastructural features of the developing human visual cortex,” *Indian J. Med. Res.*, vol. 77, pp. 541–8, Apr. 1983.
- [136] Y. Omata, Y. M. Lim, Y. Akao, and L. Tsuda, “Age-induced reduction of autophagy-related gene expression is associated with onset of Alzheimer’s disease,” *Am. J. Neurodegener. Dis.*, 2014.
- [137] F. Zhou, T. van Laar, H. Huang, and L. Zhang, “APP and APLP1 are degraded through autophagy in response to proteasome inhibition in neuronal cells,” *Protein Cell*, 2011.
- [138] S. M. Son, E. S. Jung, H. J. Shin, J. Byun, and I. Mook-Jung, “A $\beta$ -induced formation of autophagosomes is mediated by RAGE-CaMKK $\beta$ -AMPK signaling,” *Neurobiol. Aging*, 2012.
- [139] Y. Tian, J. C. Chang, P. Greengard, and M. Flajolet, “The convergence of endosomal and autophagosomal pathways: Implications for APP-CTF degradation,” *Autophagy*, 2014.

- [140] M. H. Cho *et al.*, “Autophagy in microglia degrades extracellular  $\beta$ -amyloid fibrils and regulates the NLRP3 inflammasome,” *Autophagy*, 2014.
- [141] N. Mizushima, “A $\beta$  generation in autophagic vacuoles,” *Journal of Cell Biology*. 2005.
- [142] P. Nilsson and T. C. Saido, “Dual roles for autophagy: Degradation and secretion of Alzheimer’s disease A $\beta$  peptide,” *BioEssays*, 2014.
- [143] T. Hamano *et al.*, “Autophagic-lysosomal perturbation enhances tau aggregation in transfectants with induced wild-type tau expression,” *Eur. J. Neurosci.*, 2008.
- [144] E. E. Congdon *et al.*, “Methylthioninium chloride (methylene blue) induces autophagy and attenuates tauopathy in vitro and in vivo,” *Autophagy*, 2012.
- [145] K. Inoue *et al.*, “Macroautophagy deficiency mediates age-dependent neurodegeneration through a phospho-tau pathway,” *Mol. Neurodegener.*, 2012.
- [146] F. Lim, F. Hernández, J. J. Lucas, P. Gómez-Ramos, M. A. Morán, and J. Ávila, “FTDP-17 mutations in tau transgenic mice provoke lysosomal abnormalities and tau filaments in forebrain,” *Mol. Cell. Neurosci.*, 2001.
- [147] W. L. Lin, J. Lewis, S. H. Yen, M. Hutton, and D. W. Dickson, “Ultrastructural neuronal pathology in transgenic mice expressing mutant (P301L) human tau,” *J. Neurocytol.*, vol. 32, no. 9, pp. 1091–1105, Nov. 2003.
- [148] K. F. S. Bell and A. Claudio Cuello, “Altered synaptic function in Alzheimer’s disease,” *European Journal of Pharmacology*. 2006.
- [149] I. Monastyrska, E. Rieter, D. J. Klionsky, and F. Reggiori, “Multiple roles of the cytoskeleton in autophagy,” *Biological Reviews*. 2009.
- [150] T. Rodríguez-Martín, I. Cuchillo-Ibáñez, W. Noble, F. Nyenya, B. H. Anderton, and D. P. Hanger, “Tau phosphorylation affects its axonal transport and degradation,” *Neurobiol. Aging*, 2013.
- [151] Y. Xie, B. Zhou, M. Y. Lin, and Z. H. Sheng, “Progressive endolysosomal deficits impair autophagic clearance beginning at early asymptomatic stages in FALS mice,” *Autophagy*, 2015.
- [152] Y. Yu *et al.*, “Xylocoside G reduces amyloid- $\beta$  induced neurotoxicity by inhibiting NF- $\kappa$ B signaling pathway in neuronal cells,” *J. Alzheimer’s Dis.*, 2012.
- [153] M. Sun *et al.*, “Formononetin protects neurons against hypoxia-induced cytotoxicity through upregulation of ADAM10 and sA $\beta$ PP $\alpha$ ,” *J. Alzheimer’s Dis.*, 2012.
- [154] Z. G. Ma *et al.*, “CTRP3 attenuates cardiac dysfunction, inflammation, oxidative stress and cell death in diabetic cardiomyopathy in rats,” *Diabetologia*, vol. 60, no. 6, pp. 1126–1137, Jun. 2017.
- [155] Z. G. Ma *et al.*, “Protection against cardiac hypertrophy by geniposide involves the GLP-1 receptor / AMPK $\alpha$  signalling pathway,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 173, no. 9, pp. 1502–1516, May 2016.
- [156] M. F. Oellerich and M. Potente, “FOXOs and sirtuins in vascular growth, maintenance, and aging,” *Circulation Research*. 2012.

- [157] M. Ajami *et al.*, “Therapeutic role of sirtuins in neurodegenerative disease and their modulation by polyphenols,” *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, vol. 73. Elsevier Ltd, pp. 39–47, 01-Feb-2017.
- [158] M. A. Hayat, *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging*. 2014.
- [159] X. Hou, D. Rooklin, H. Fang, and Y. Zhang, “Resveratrol serves as a protein-substrate interaction stabilizer in human SIRT1 activation,” *Sci. Rep.*, 2016.
- [160] F. Lattanzio, L. Carboni, D. Carretta, S. Candeletti, and P. Romualdi, “Treatment with the neurotoxic A $\beta$  (25-35) peptide modulates the expression of neuroprotective factors Pin1, Sirtuin 1, and brain-derived neurotrophic factor in SH-SY5Y human neuroblastoma cells,” *Exp. Toxicol. Pathol.*, 2016.
- [161] D. Aguirre-Rueda *et al.*, “Astrocytes protect neurons from A $\beta$ <sub>1-42</sub> peptide-induced neurotoxicity increasing TFAM and PGC-1 and decreasing PPAR- $\gamma$  and SIRT-1,” *Int. J. Med. Sci.*, 2015.
- [162] M. Ansari Dezfouli, M. Zahmatkesh, M. Farahmandfar, and F. Khodaghali, “Melatonin protective effect against amyloid  $\beta$ -induced neurotoxicity mediated by mitochondrial biogenesis; involvement of hippocampal Sirtuin-1 signaling pathway,” *Physiol. Behav.*, 2019.
- [163] J. Campagna *et al.*, “A small molecule ApoE4-targeted therapeutic candidate that normalizes sirtuin 1 levels and improves cognition in an Alzheimer’s disease mouse model,” *Sci. Rep.*, 2018.
- [164] S. W. Min, P. D. Sohn, S. H. Cho, R. A. Swanson, and L. Gan, “Sirtuins in neurodegenerative diseases: An update on potential mechanisms,” *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2013.
- [165] G. M. Palomo and G. Manfredi, “Exploring new pathways of neurodegeneration in ALS: The role of mitochondria quality control,” *Brain Research*, vol. 1607. Elsevier B.V., pp. 36–46, 14-May-2015.
- [166] M. Akbar *et al.*, “Mitochondrial dysfunction and cell death in neurodegenerative diseases through nitroxidative stress,” *Brain Res.*, vol. 1637, pp. 34–55, Apr. 2016.
- [167] J. A. Godoy, J. A. Rios, J. M. Zolezzi, N. Braidy, and N. C. Inestrosa, “Signaling pathway cross talk in Alzheimer’s disease,” *Cell Commun. Signal.*, 2014.
- [168] T. A. Prolla and J. M. Denu, “NAD<sup>+</sup> deficiency in age-related mitochondrial dysfunction,” *Cell Metabolism*. 2014.
- [169] D. J. Colacurcio and R. A. Nixon, “Disorders of lysosomal acidification—The emerging role of v-ATPase in aging and neurodegenerative disease,” *Ageing Research Reviews*, vol. 32. Elsevier Ireland Ltd, pp. 75–88, 01-Dec-2016.
- [170] M. F. McCarty, J. J. DiNicolantonio, and J. H. O’Keefe, “Ketosis may promote brain macroautophagy by activating Sirt1 and hypoxia-inducible factor-1,” *Med. Hypotheses*, 2015.

- [171] C. Mazucanti, J. Cabral-Costa, A. Vasconcelos, D. Andreotti, C. Scavone, and E. Kawamoto, "Longevity Pathways (mTOR, SIRT, Insulin/IGF-1) as Key Modulatory Targets on Aging and Neurodegeneration," *Curr. Top. Med. Chem.*, 2015.
- [172] S. J. Mitchell *et al.*, "The SIRT1 activator SRT1720 extends lifespan and improves health of mice fed a standard diet," *Cell Rep.*, 2014.
- [173] "Nutrition and Functional Foods for Healthy Aging - 1st Edition." [Online]. Available: <https://www.elsevier.com/books/nutrition-and-functional-foods-for-healthy-aging/watson/978-0-12-805376-8>. [Accessed: 10-Dec-2019].
- [174] A. Satoh *et al.*, "Sirt1 extends life span and delays aging in mice through the regulation of Nk2 Homeobox 1 in the DMH and LH," *Cell Metab.*, 2013.
- [175] M. Flores-León, M. Pérez-Domínguez, R. González-Barrios, and C. Arias, "Palmitic Acid-Induced NAD<sup>+</sup> Depletion is Associated with the Reduced Function of SIRT1 and Increased Expression of BACE1 in Hippocampal Neurons," *Neurochem. Res.*, 2019.
- [176] L. Lo Iacono *et al.*, "Adversity in childhood and depression: Linked through SIRT1," *Transl. Psychiatry*, 2015.
- [177] D. Wan, Y. Zhou, K. Wang, Y. Hou, R. Hou, and X. Ye, "Resveratrol provides neuroprotection by inhibiting phosphodiesterases and regulating the cAMP/AMPK/SIRT1 pathway after stroke in rats," *Brain Res. Bull.*, 2016.
- [178] J. J. Heinisch and R. Brandt, "Signaling pathways and posttranslational modifications of tau in Alzheimer's disease: The humanization of yeast cells," *Microbial Cell*. 2016.
- [179] B. Peck *et al.*, "SIRT inhibitors induce cell death and p53 acetylation through targeting both SIRT1 and SIRT2," *Mol. Cancer Ther.*, 2010.
- [180] P. Yan, L. Bai, W. Lu, Y. Gao, Y. Bi, and G. Lv, "Regulation of autophagy by AMP-activated protein kinase/sirtuin 1 pathway reduces spinal cord neurons damage," *Iran. J. Basic Med. Sci.*, vol. 20, no. 9, pp. 1029–1036, Sep. 2017.
- [181] R. Frazzi, R. Valli, I. Tamagnini, B. Casali, N. Latruffe, and F. Merli, "Resveratrol-mediated apoptosis of hodgkin lymphoma cells involves SIRT1 inhibition and FOXO3a hyperacetylation," *Int. J. Cancer*, vol. 132, no. 5, pp. 1013–1021, Mar. 2013.
- [182] G. P. Dias, G. Cocks, M. C. Do Nascimento Bevilaqua, A. E. Nardi, and S. Thuret, "Resveratrol: A Potential Hippocampal Plasticity Enhancer," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016.
- [183] H. Deng and M. tian Mi, "Resveratrol Attenuates A $\beta$ <sub>25-35</sub> Caused Neurotoxicity by Inducing Autophagy Through the TyrRS-PARP1-SIRT1 Signaling Pathway," *Neurochem. Res.*, vol. 41, no. 9, pp. 2367–2379, Sep. 2016.
- [184] Y. Li *et al.*, "Hepatic SIRT1 attenuates hepatic steatosis and controls energy balance in mice by inducing fibroblast growth factor 21," *Gastroenterology*, 2014.

- [185] H. R. Lee *et al.*, "Cilostazol upregulates autophagy via SIRT1 activation: Reducing amyloid- $\beta$  peptide and APP-CTF $\beta$  levels in neuronal cells," *PLoS One*, vol. 10, no. 8, Aug. 2015.
- [186] V. Furlan, J. Konc, and U. Bren, "Inverse molecular docking as a novel approach to study anticarcinogenic and anti-neuroinflammatory effects of curcumin," *Molecules*, 2018.
- [187] M. P. Kelly, "Cyclic nucleotide signaling changes associated with normal aging and age-related diseases of the brain," *Cellular Signalling*. 2018.
- [188] M. D. Houslay and G. Milligan, "Tailoring cAMP-signalling responses through isoform multiplicity," *Trends in Biochemical Sciences*. 1997.
- [189] A. Marte, O. Pepicelli, A. Cavallero, M. Raiteri, and E. Fedele, "In vivo effects of phosphodiesterase inhibition on basal cyclic guanosine monophosphate levels in the prefrontal cortex, hippocampus and cerebellum of freely moving rats," *J. Neurosci. Res.*, vol. 86, no. 15, pp. 3338–3347, 2008.
- [190] M. P. Kelly *et al.*, "Select 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases exhibit altered expression in the aged rodent brain," *Cell. Signal.*, vol. 26, no. 2, pp. 383–397, Feb. 2014.
- [191] M. Conti and J. Beavo, "Biochemistry and Physiology of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Essential Components in Cyclic Nucleotide Signaling," *Annu. Rev. Biochem.*, 2007.
- [192] A. T. Bender and J. A. Beavo, "Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Molecular regulation to clinical use," *Pharmacological Reviews*. 2006.
- [193] N. J. Brandon and D. P. Rotella, "Chapter 1 Potential CNS Applications for Phosphodiesterase Enzyme Inhibitors," *Annual Reports in Medicinal Chemistry*. 2007.
- [194] B. E. Lonze and D. D. Ginty, "Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system," *Neuron*, vol. 35, no. 4. Cell Press, pp. 605–623, 15-Aug-2002.
- [195] Y. Son, K. Kim, and H. rae Cho, "Sildenafil protects neuronal cells from mitochondrial toxicity induced by  $\beta$ -amyloid peptide via ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2018.
- [196] R. Deshmukh, V. Sharma, S. Mehan, N. Sharma, and K. L. Bedi, "Amelioration of intracerebroventricular streptozotocin induced cognitive dysfunction and oxidative stress by vinpocetine - a PDE1 inhibitor," *Eur. J. Pharmacol.*, 2009.
- [197] S. Gupta and B. Sharma, "Protective effects of phosphodiesterase-1 (PDE1) and ATP sensitive potassium (KATP) channel modulators against 3-nitropropionic acid induced behavioral and biochemical toxicities in experimental Huntingtons disease," *Eur. J. Pharmacol.*, 2014.
- [198] B. Dyck *et al.*, "Discovery of Selective Phosphodiesterase 1 Inhibitors with Memory Enhancing Properties," *J. Med. Chem.*, 2017.
- [199] S. Sharma and R. Deshmukh, "Vinpocetine attenuates MPTP-induced motor deficit and biochemical abnormalities in Wistar rats," *Neuroscience*, 2015.

- [200] A. E. Medina, "Therapeutic utility of phosphodiesterase type I inhibitors in neurological conditions," *Frontiers in Neuroscience*. 2011.
- [201] S.-H. Park, J.-H. Kim, S.-S. Bae, K.-W. Hong, B.-T. Choi, and H.-K. Shin, "Phosphodiesterase III Inhibitor Cilostazol Protects Amyloid  $\beta$ -Induced Neuronal Cell Injury via Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Activation," *J. Life Sci.*, 2011.
- [202] H. Yoshida *et al.*, "K-134, a Phosphodiesterase 3 Inhibitor, Prevents Brain Damage by Inhibiting Thrombus Formation in a Rat Cerebral Infarction Model," *PLoS One*, 2012.
- [203] S. Saito, Y. Yamamoto, T. Maki, M. Fukushima, R. Takahashi, and M. Ihara, "Taxifolin inhibits amyloid- $\beta$  oligomer formation and fully restores vascular integrity and memory in cerebral amyloid angiopathy," *J. Neurol. Sci.*, 2017.
- [204] T. Genovese, E. Mazzon, I. Paterniti, E. Esposito, and S. Cuzzocrea, "Neuroprotective effects of olprinone after cerebral ischemia/reperfusion injury in rats.," *Neurosci. Lett.*, vol. 503, no. 2, pp. 93–9, Oct. 2011.
- [205] R. F. Kelm, J. Wagenführer, H. Bauer, I. Schmidtman, K. Engelhard, and R. R. Noppens, "Effects of levosimendan on hemodynamics, local cerebral blood flow, neuronal injury, and neuroinflammation after asphyctic cardiac arrest in rats," *Crit. Care Med.*, 2014.
- [206] L. Gaal, C. Schudt, and P. Illes, "Effects of phosphodiesterase inhibition on the excitability of hippocampal pyramidal neurons in vitro.," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 202, no. 1, pp. 117–20, Sep. 1991.
- [207] J. Schwenkgrub, M. Zaremba, D. Mirowska-Guzel, and I. Kurkowska-Jastrzebska, "Ibudilast: a non-selective phosphodiesterase inhibitor in brain disorders," *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)*. 2017.
- [208] P. Rolan, M. R. Hutchinson, and K. W. Johnson, "Ibudilast: A review of its pharmacology, efficacy and safety in respiratory and neurological disease," *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2009.
- [209] Z. G. Koçaklı, K. Akıllıoğlu, and A. Doğan, "Vasküler Düz Kas Hücrelerinin İzolasyonu ve Kültürü," *Arşiv Kaynak Tarama Derg.*, 2015.
- [210] B. H. Morimoto and D. E. Koshland, "Excitatory amino acid uptake and N-methyl-D-aspartate-mediated secretion in a neural cell line," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1990.
- [211] J. B. Davis and P. Maher, "Protein kinase C activation inhibits glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line," *Brain Res.*, 1994.
- [212] B. Duthey, "Background Paper 6.11 Alzheimer Disease and other Dementias," 2013.
- [213] R. A. Nixon, "The role of autophagy in neurodegenerative disease," *Nature Medicine*, vol. 19, no. 8, pp. 983–997, Aug-2013.
- [214] Y. Hou, F. Wang, L. Cheng, T. Luo, J. Xu, and H. Wang, "Expression Profiles of SIRT1 and APP Genes in Human Neuroblastoma SK-N-SH Cells Treated with Two Epigenetic Agents," *Neurosci. Bull.*, 2016.

- [215] P. Sun *et al.*, “Protective role of dihydromyricetin in Alzheimer’s disease rat model associated with activating AMPK/SIRT1 signaling pathway,” *Biosci. Rep.*, vol. 39, no. 1, Jan. 2019.
- [216] Y. Qi *et al.*, “Intracerebroventricular injection of resveratrol ameliorated A $\beta$ -induced learning and cognitive decline in mice,” *Metab. Brain Dis.*, 2019.
- [217] H. R. Lee *et al.*, “Cilostazol suppresses  $\beta$ -amyloid production by activating a disintegrin and metalloproteinase 10 via the upregulation of SIRT1-coupled retinoic acid receptor- $\beta$ ,” *J. Neurosci. Res.*, vol. 92, no. 11, pp. 1581–1590, 2014.
- [218] W. L. An *et al.*, “Up-regulation of phosphorylated/activated p70 S6 kinase and its relationship to neurofibrillary pathology in Alzheimer’s disease,” *Am. J. Pathol.*, vol. 163, no. 2, pp. 591–607, Aug. 2003.
- [219] J. J. Pei and J. Hugon, “mTOR-dependent signalling in Alzheimer’s disease,” *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2008.
- [220] A. Caccamo, V. De Pinto, A. Messina, C. Branca, and S. Oddo, “Genetic reduction of mammalian target of rapamycin ameliorates Alzheimer’s disease-like cognitive and pathological deficits by restoring hippocampal gene expression signature,” *J. Neurosci.*, 2014.
- [221] T. Jiang *et al.*, “Temsilolimus attenuates tauopathy in vitro and in vivo by targeting tau hyperphosphorylation and autophagic clearance,” *Neuropharmacology*, 2014.
- [222] A. R. Esteves, F. Filipe, J. D. Magalhães, D. F. Silva, and S. M. Cardoso, “The Role of Beclin-1 Acetylation on Autophagic Flux in Alzheimer’s Disease,” *Mol. Neurobiol.*, 2019.
- [223] X. Qu *et al.*, “Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene,” *J. Clin. Invest.*, 2003.
- [224] Z. Yue, S. Jin, C. Yang, A. J. Levine, and N. Heintz, “Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2003.
- [225] F. Pickford *et al.*, “The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid  $\beta$  accumulation in mice,” *J. Clin. Invest.*, 2008.

## İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

NÖRONAL HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE VINPOSETİN,  
LEVOSİMENDAN VE İBUDİLAST'IN AMİLOİD BETA PEPTİD  
İLE İNHİBE EDİLEN SİRTUİN-1'E ETKİLERİ

### ORJİNALLIK RAPORU

|                   |                        |            |                  |
|-------------------|------------------------|------------|------------------|
| % <b>13</b>       | % <b>12</b>            | % <b>2</b> | % <b>4</b>       |
| BENZERLİK ENDEKSİ | İNTERNET<br>KAYNAKLARI | YAYINLAR   | ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ |

### BİRİNCİ KAYNAKLAR

|          |                                                                                                                    |             |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>1</b> | <a href="http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080">www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080</a><br>İnternet Kaynağı | % <b>8</b>  |
| <b>2</b> | <a href="http://dergipark.ulakbim.gov.tr">dergipark.ulakbim.gov.tr</a><br>İnternet Kaynağı                         | % <b>1</b>  |
| <b>3</b> | Submitted to Bilkent University<br>Öğrenci Ödevi                                                                   | <% <b>1</b> |
| <b>4</b> | <a href="http://www.stateinfoservices.com">www.stateinfoservices.com</a><br>İnternet Kaynağı                       | <% <b>1</b> |
| <b>5</b> | Submitted to Mugla University<br>Öğrenci Ödevi                                                                     | <% <b>1</b> |
| <b>6</b> | <a href="http://polen.itu.edu.tr">polen.itu.edu.tr</a><br>İnternet Kaynağı                                         | <% <b>1</b> |
| <b>7</b> | Submitted to Istanbul University<br>Öğrenci Ödevi                                                                  | <% <b>1</b> |
| <b>8</b> | <a href="http://www.denizlimimar.org">www.denizlimimar.org</a><br>İnternet Kaynağı                                 | <% <b>1</b> |

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

|                 |                         |                  |                     |
|-----------------|-------------------------|------------------|---------------------|
| <b>Adı</b>      | KÜBRA                   | <b>Soyadı</b>    | SAYGISEVER FAİKOĞLU |
| <b>Doğ.Yeri</b> | KARACABEY               | <b>Doğ.Tar.</b>  | 14.01.1987          |
| <b>Uyruğu</b>   | T.C                     | <b>TC Kim No</b> | 12442870424         |
| <b>Email</b>    | ksaygisever@hotmail.com | <b>Tel</b>       | 0543 940 1979       |

### Eğitim Düzeyi

|                 | Mezun Olduğu Kurumun Adı                              | Mez. Yılı |
|-----------------|-------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Doktora</b>  | İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AB.D. | 2020      |
| <b>Yük.Lis.</b> |                                                       |           |
| <b>Lisans</b>   | TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ                     | 2010      |
| <b>Lise</b>     | KARACABEY ANADOLU LİSESİ                              | 2004      |

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

|    | Görevi        | Kurum                 | Süre (Yıl - Yıl) |
|----|---------------|-----------------------|------------------|
| 1. | MEDİKAL MÜDÜR | BAYER TÜRK A.Ş.       | 2019-..          |
| 2. | AİLE HEKİMİ   | T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI | 2015-2017        |
| 3. | TSM HEKİMİ    | T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI | 2011-2015        |

| Yabancı Dilleri | Okuduğun u Anlama* | Konuşma* | Yazma* | KPDS/ÜDS Puanı | (Diğer) Puanı |
|-----------------|--------------------|----------|--------|----------------|---------------|
| İNGİLİZCE       | ÇOK İYİ            | İYİ      | İYİ    |                | YDS: 67,5     |
|                 |                    |          |        |                |               |

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

|                      | Sayısal | Eşit Ağırlık | Sözel |
|----------------------|---------|--------------|-------|
| <b>LES Puanı</b>     |         |              |       |
| <b>(Diğer) Puanı</b> |         |              |       |

### Bilgisayar Bilgisi

| Program          | Kullanma becerisi |
|------------------|-------------------|
| Microsoft Office | ÇOK İYİ           |
| Mendeley         | ÇOK İYİ           |
|                  |                   |

### Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, 2019

#### Sözlü Bildiri:

25. Ulusal Farmakoloji Kongresi 04-07.11.2019 Kuşadası/AYDIN

SS-53 Fare Hipokampal Nöron Hücre Kültürlerinde Vinposetin, Levosimendan ve İbudilast'ın Amiloid Beta Peptid ile İnhibe edilen Sirtuin-1'e Etkileri  
Kübra Saygısever Faikoğlu, Gökhan Faikoğlu, Hande Çelik, Hande Karahan, Pelin Kelicen Uğur, Ahmet Gökhan Akkan, Sibel Özyazgan