



T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
SİNİR BİLİMLERİ ANA BİLİM DALI

ALZHEİMER HASTALIĞI NÖROBİYOLOJİSİNDE TRPM2
KANALININ ROLÜNÜN FARE HİPOKAMPUS KÜLTÜRÜNDE
MOLEKÜLER TEKNİKLER İLE ARAŞTIRILMASI

Ramazan ÇINAR
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU

100/2000 Doktora Bursu

Bu Tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2020-7454 nolu proje ile desteklenmiştir

ISPARTA-2021

KABUL ve ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Sinir Bilimleri Ana Bilim Dalı Doktora Programı** çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 27/12/2021

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU
Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fak. Biyofizik ABD

Üye : Prof. Dr. Nurhan GÜMRAL
Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fak. Fizyoloji ABD

Üye : Prof. Dr. Ramazan BAL
Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fak. Fizyoloji ABD

Üye : Doç. Dr. Ömer ÇELİK
Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fak. Biyofizik ABD

Üye : Doç. Dr. Ayça BİLGİNOĞLU
Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Tıp Fak. Biyofizik ABD

ONAY: Bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'na belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY
Enstitü Müdürü

BEYAN

“Alzheimer Hastalığı Nörobiyolojisinde TRPM2 Kanalınn Rolünün Fare Hipokampus Kültüründe Moleküler Teknikler ile Araştırılması” adlı Doktora tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

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 çalışmayla 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 olmadığını beyan ederim.

Tezi Hazırlayan

Ramazan ÇINAR

Danışman

Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitim süreci boyunca her zaman yol gösteren, fikirleri ile beni aydınlatan ve ilham veren tez danışmanım ve çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU'na,

Doktora eğitimim ve tez yazım aşamalarında desteğini hep hissettiğim Sayın Doç. Dr. Ömer ÇELİK hocama, değerli çalışma arkadaşlarım Sayın Arş. Gör. Dr. Ahmi ÖZ, Sayın Arş. Gör. Dr. Kenan YILDIZHAN ve Sayın Dr. Yener YAZĞAN'a ve laboratuvar çalışmalarında benden yardımlarını ve tecrübelerini esirgemeyen teknisyen arkadaşlarım Sayın Muhammet ŞAHİN ve Sayın Fatih ŞAHİN'e,

Her zaman yanımda olan ve bu tezin sunulduğu güne kadar desteğini her anımda hissettiğim dayım Sayın Prof. Dr. Mehmet ÇAY'a teşekkürlerimi sunarım.

Hayata gözlerimi açtığım ilk andan bu tezin sunulduğu güne kadar desteklerini her anımda hissettiğim, abime, ablalarım ve kardeşime çok teşekkür ederim. Haklarını asla ödeyemeyeceğimi düşündüğüm annem ve babama minnet ve şükranlarımı sunarım.

Sinir bilimleri alt alanı “İnsan Beyni ve Nörobilim” öncelikli alanda doktora eğitimim süresi boyunca bana YÖK 100/2000 Doktora Bursu kapsamında destek sağlayan Yükseköğretim Kuruluna ayrıca teşekkür ederim.

Doktora projemize (Proje no: TDK-2020-7454) maddi destekleyen Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine ve tüm çalışma ekibine teşekkür ederim.

ÖZET

Alzheimer Hastalığı Nörobiyolojisinde TRPM2 Kanalinın Rolünün Fare Hipokampus Kültüründe Moleküler Teknikler ile Araştırılması

Alzheimer hastalığı, protein birikimi ile karakterize, unutkanlık ve hafıza kaybı ile bilinen bir hastalık olup, kesin tedavisi henüz yoktur. Hastalığın etiyolojisindeki iki önemli etken; 1) hipokampus da intrasellüler serbest Ca^{+2} ($[Ca^{+2}]_i$) aşırı girişi ve 2) mitokondriyal oksidatif stres artışıdır. Ca^{+2} geçirgen TRPM2 katyon kanalı DNA hasarı sonucu ADP-riboz (ADPR) ve reaktif oksijen türleri (ROT) tarafından aktive edilir, ancak N-(p-amilsinnamoil) antranilik asit (ACA) ve 2-aminoetoksi-difenil borat (2-APB) gibi spesifik olmayan kimyasallar tarafından inhibe edilir. Alzheimer hastalığı etiyolojisinde ve tedavisinde TRPM2 kanalının rolü henüz yeterince bilinmemektedir. Bu tez çalışmasında, *in vitro* hipokampal Alzheimer hastalığı modelinde oksidatif stres ve apoptozis değerlerindeki değişimleri üzerinde TRPM2 katyon kanalının ve glutatyon (GSH) tedavisinin rolünü araştırdık.

Çalışmada primer olarak yeni doğan farelerden izole edilen hipokampal nöron hücreleri, kontrol, ACA, amiloid beta ($A\beta$), $A\beta$ +ACA ve $A\beta$ +GSH şeklinde beş gruba ayrıldı. Hipokampal nöron hücrelerinde $A\beta$ ile *in vitro* Alzheimer hastalık modeli oluşturuldu. Kontrol ve ACA grubuna kıyasla, $A\beta$ grubunda apoptozis, mitokondriyal depolarizasyon, ROT, lipid peroksidasyon, PARP-1, kaspaz-3, kaspaz-9, $[Ca^{+2}]_i$, intrasellüler Zn^{+2} düzeyleri ve TRPM2 katyon kanal ekspresyonunun anlamlı bir şekilde arttığı belirlenirken, GSH, glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve hücre canlılığı (MTT) düzeylerinin azaldığı gözlemlendi. Bu değişiklikler TRPM2 geni bulunmayan fare hipokampuslarında gözlemlenmedi. Bununla birlikte, TRPM2 antagonistleri (ACA ve 2-APB) ve GSH tedavisi sonrası bu değerlerin azaldığı gözlemlendi. Benzer olumlu etkiler PARP-1 inhibitörleri (DPQ ve PJ34) tedavisi sonrasında da gözlemlendi.

Sonuç olarak, deneysel Alzheimer hastalığı modelinde TRPM2 aracılı $[Ca^{+2}]_i$ artışına neden olduğu ve bu artışın girişin hipokampal nöronlarda mitokondri oksidatif stres ile apoptozis oluşumuna neden olduğu gözlemlendi. TRPM2 kanal inhibisyonunun ve GSH tedavisinin Alzheimer hastalığı tedavisinde fayda sağlayacak gözükmemektedir.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer hastalığı, Apoptozis, Hipokampal nöron, Oksidatif stres, TRPM2 kanalı.

ABSTRACT

Investigation of TRPM2 Channel on the Neurobiology of Alzheimer's Disease in Mouse Hippocampus Culture by Using Molecular Techniques

Alzheimer's disease (AD) is characterized by the increase of hippocampal Ca^{2+} influx-induced apoptosis and mitochondrial reactive oxygen species (ROS). TRPM2 as a Ca^{2+} permeable cation channel is activated by DNA-damage induced ADP-ribose (ADPR) and oxidative stress, although it is inhibited by non specific blockers such as ACA (N-(p-aminocinnamoyl)anthranilic acid) and 2-APB (2-aminoethyl diphenylborinate). The stimulation of TRPM2 channel induces apoptosis and oxidative neurotoxicity, whereas its inhibition via the treatments of glutathione (GSH) and ACA reduces apoptosis and neurotoxicity in several neurons. However, the cellular and molecular effects of TRPM2 on the induction of oxidative neurotoxicity and apoptosis in the hippocampus of AD model (amyloid beta, $\text{A}\beta$) remain elusive. We investigated involvement of TRPM2 channel and GSH treatment on the neurobiology of Alzheimer's Disease in the invit ro hippocampus model.

After the isolation of the hippocampal neurons from the newborn mouse, they were divided into five groups as control, ACA, $\text{A}\beta$, $\text{A}\beta$ +ACA, and $\text{A}\beta$ +GSH. The levels of apoptosis, hippocampus death, cytosolic ROS, cytosolic Zn^{2+} , mitochondrial ROS, caspase-3, caspase-9, lipid peroxidation, and cytosolic Ca^{2+} were increased in the hippocampus of wild type mouse by the treatments of $\text{A}\beta$, although their levels were decreased in the neurons by the treatments of GSH, PARP-1 inhibitors (PJ34 and DPQ), and TRPM2 blockers (ACA and 2APB). The $\text{A}\beta$ -induced decreases of cell viability, cytosolic GSH, reduced GSH, and GSH peroxidase levels were also increased in the $\text{A}\beta$ +GSH and $\text{A}\beta$ +GSH groups by the treatments of GSH and ACA. However, the $\text{A}\beta$ -induced changes were not observed in the hippocampus of TRPM2 knockout mice.

In conclusion, the current data indicate that the maintaining activation of TRPM2 is not only important for the quenching ROS and neurotoxicity in the hippocampal neurons of mice with experimental AD but also equally critical to the modulation of $\text{A}\beta$ -induced apoptosis.

Keywords: Alzheimer's Disease; Apoptosis; Hippocampal Neurons; Oxidative stress; TRPM2 channel.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Alzheimer Hastalığı.....	6
2.1.1. Alzheimer Hastalığının Klinik Özellikleri.....	7
2.1.2. Alzheimer Hastalığının Risk Faktörleri.....	9
2.1.3. Alzheimer Hastalığının Patogenezi	10
2.1.4. Alzheimer Hastalığının Tedavisi	11
2.2. Transient Receptor Potential (TRP) Katyon Kanalları.....	11
2.2.1. TRPM Alt Ailesinin Yapısal ve Biyofiziksel Özellikleri	13
2.2.1.1. TRPM2 Katyon Kanalları	15
2.2.1.1.1. Alzheimer Hastalığı Etiyolojisinde TRPM2 Katyon Kanalının Rolü	16
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	19
3.1. Gereç	19
3.1.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler	19
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	20
3.2. Yöntem	23
3.2.1. Deney Hayvanları	23
3.2.2. Hipokampus İzolasyonu	23
3.2.3. Çalışma Grupları.....	28
3.2.4. İntrasellüler Ca^{+2} Analizi	29
3.2.5. Apoptozis Analizi	30
3.2.6. Hücre Canlılığı (MTT) Testi	30
3.2.7. Kaspaz-3 ve -9 Aktivitesi Analizleri	31
3.2.8. İntrasellüler ROT Üretim Tayini	31
3.2.9. Mitokondriyal Membran Depolarizasyon Analizi.....	32

3.2.10. Western Blot Analizleri	33
3.2.11. Hücre Canlılık Oranının (Hoechst/Propidyum İyodür) Lazer Konfokal Mikroskobu ile Görüntülenmesi	35
3.2.12. İntrasellüler GSH'nın Lazer Konfokal Mikroskobu ile Görüntülenmesi	35
3.2.13. $[Ca^{+2}]_i$ Lazer Konfokal Mikroskop ile Görüntülenmesi	36
3.2.14. İntrasellüler ROT'un (DHR123) Lazer Konfokal Mikroskobu ile Görüntülenmesi.....	36
3.2.15. Mitokondriyal ROT'un Lazer Konfokal Mikroskobu ile Görüntülenmesi	37
3.2.16. İntersellüler Zn^{+2} Lazer Konfokal Mikroskobu ile Görüntülenmesi	38
3.2.17. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) ve rGSH Analizleri	38
3.2.18. Lipit Peroksidasyon (MDA) Analizi	39
3.3. İstatistiksel Analiz	40
4. BULGULAR.....	41
4.1. İntrasellüler Ca^{+2} Düzeyi Analiz Sonuçları.....	41
4.2. Apoptozis ve Hücre Canlılığı (MTT) Sonuçları.....	42
4.3. Kaspaz-3 ve -9 Aktivitesi Analiz Sonuçları	44
4.4. İntrasellüler ROT Üretim Tayini ve Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu Analiz Sonuçları.....	46
4.5. Western Blot Analiz Sonuçları.....	48
4.5.1. TRPM2 Katyon Kanal Protein Bandı Ekspresyon Sonuçları.....	49
4.5.2. PARP-1 Enzimi Protein Ekspresyon Sonuçları.....	50
4.5.3. Kaspaz-3 ve -9 Aktivasyon Analiz Sonuçları	51
4.5.4. Bax ve Bcl2 Enzim Aktivasyon Analiz Sonuçları	53
4.6. Glutasyon Peroksidaz ve Glutasyon Analiz Sonuçları.....	55
4.7. Lipit Peroksidasyon Analiz Sonuçları.....	57
4.8. Lazer Konfokal Mikroskop Sonuçları.....	58
4.8.1. Hücre Canlılık Oranının (Hoechst/Propidyum İyodür) Lazer Konfokal Mikroskop Analiz Sonuçları.....	58
4.8.2. İntrasellüler GSH'nın Lazer Konfokal Mikroskop Analiz Sonuçları.....	60
4.8.3. $[Ca^{+2}]_i$ Lazer Konfokal Mikroskop Analiz Sonuçları.....	63
4.8.4. İntrasellüler ROT ve Mitokondriyal Depolarizasyon Lazer Konfokal Mikroskop Analiz Sonuçları.....	68
4.8.5. İntrasellüler ROT ve Mitokondriyal ROT Yoğunluğunun Lazer Konfokal Mikroskop Analiz sonuçları	71

4.8.6. İntrasellüler Zn^{+2} Yoğunluğunun Lazer Konfokal Mikroskop Analiz Sonuçları.....	74
5. TARTIŞMA	77
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	86
7.KAYNAKLAR	89
EKLER.....	113
ÖZGEÇMİŞ.....	114



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

[Ca⁺²]_e	: Ekstrasellüler Ca ⁺² Konsantrasyonu
[Ca⁺²]_i	: İntrasellüler Ca ⁺² Konsantrasyonu
2-APB	: 2- Aminoethoxydiphenyl Borate
ACA	: N-(p-Amylcinnamoyl) Anthranilic Acid
ADPR	: Adenozin Difosforiboz
ALS	: Amiyotrofik Lateral Skleroz
AMP	: Adenozin Mono Fosfat
APOE	: Apolipoprotein E
APP	: Amiloid Prekürsör Proteini
Aβ	: Amiloid βeta
BSA	: Sığır Serum Albümin
Ca⁺²	: Kalsiyum İyonu
CpX	: Cumene Hydroperoxide
CTM	: Clotrimazole
DHR-123	: Dihydrorhodamine 123
DHS	: Donor Horse Serum
DTNB	: 5,5- Ditiyobis 2- Nitrobenzoik Asit
FFA	: Flufenamic Acid
Fura-2-AM	: Fura-2-Asetoksimetil Ester
GSH	: Glutatyon
GSH-Px	: Glutatyon Peroksidaz
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HCl	: Hidroklorik Asit
HH	: Huntington Hastalığı
MDA	: Malondialdehit (Lipit Peroksidasyon)
MNNG	: N-Methyl-N'-Nitro-N'-Nitrosoguanidine
NMDA	: N-Metil-D-Aspartik asit
PARP-1	: Poli ADP-Riboz Polimeraz 1
PH	: Parkinson Hastalığı
PI	: Propidyum İyodür

PSEN1	: Presenilin-1
PSEN2	: Presenilin-2
RİPA Buffer	: Radioimmunoprecipitation Assay Buffer
RNT	:Reaktif Nitrojen Türlerinin
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
SDS-Page	: Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel
SDT	: Standart Sapma
TBARS	: Tiyoarbitürik Asit
TBS	: Tris Buffered Saline
TCA	: Triklorikasetik Asit
TRP	: Geçici Reseptör Potansiyeli
TRPA	: TRP Ankyrin
TRPC	: TRP Canonical
TRPM	: TRP Melastatin
TRPM2	: TRP Melastatin 2
TRPML	: TRP Mucolipin
TRPP	: TRP Polycystin
TRPV	: TRP Vanilloid

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	TRP üst kanal ailesi ve alt üyeleri	12
Şekil 2.2.	TRP kanallarının şematik gösterimi. Bilindiği üzere, 6 transmembran kısımdan ve hücre içinde değişken N- ve C-terminallerinden meydana gelmektedir.....	13
Şekil 2.3.	TRPM alt ailesinin filogenetiği	14
Şekil 2.4.	TRPM2 katyon kanalının yapısı	15
Şekil 4.1.	Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde, ACA ve GSH tedavisinin $[Ca^{+2}]_i$ değişimi üzerindeki etkilerinin çizgi (A) ve sütun (B) grafiği olarak gösterimi.	42
Şekil 4.2.	Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde apoptozis düzeyleri üzerinde, ACA ve GSH tedavisinin etkileri.....	42
Şekil 4.3.	Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde hücre canlılığı seviyeleri (MTT) üzerinde, ACA ve GSH tedavisinin etkileri.....	43
Şekil 4.4.	Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde kaspaz-3 aktiviteleri üzerinde, ACA ve GSH tedavisinin etkileri.....	45
Şekil 4.5.	Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde kaspaz-9 aktiviteleri üzerinde, ACA ve GSH tedavisinin etkileri.....	46
Şekil 4.6.	Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde intrasellüler ROT üretim düzeyleri üzerinde, ACA ve GSH tedavisinin etkileri.	47
Şekil 4.7.	Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde JC-1 düzeyleri üzerinde, ACA ve GSH tedavisinin etkileri..	48
Şekil 4.8.	Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde TRPM2 katyon kanal ekspresyon düzeyi üzerinde, ACA ve GSH tedavisinin etkileri.	50
Şekil 4.9.	Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde PARP-1 ekspresyon düzeyi üzerinde, ACA ve GSH tedavisinin etkileri.	51
Şekil 4.10.	Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde kaspaz-3 ekspresyon düzeyi üzerinde, ACA ve GSH tedavisinin etkileri.	52
Şekil 4.11.	Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde kaspaz-9 ekspresyon düzeyi üzerinde, ACA ve GSH tedavisinin etkileri.	53

Şekil 4.12. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde Bax ekspresyon düzeyi üzerinde, ACA ve GSH tedavisinin etkileri.....	54
Şekil 4.13. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde Bcl2 ekspresyon düzeyi üzerinde, ACA ve GSH tedavisinin etkileri.....	55
Şekil 4.14. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde rGSH düzeyi üzerinde, ACA ve GSH tedavisinin etkileri. ...	56
Şekil 4.15. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde GSH-Px düzeyi üzerinde, ACA ve GSH tedavisinin etkileri.....	57
Şekil 4.16. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde MDA düzeyi üzerinde, ACA ve GSH tedavisinin etkileri. ...	58
Şekil 4.17. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde, Hoechst/PI floresen boyalarla inkübasyon ardından konfokal mikroskop analizlerinde ACA ve GSH uygulamasının etkileri.....	60
Şekil 4.18. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde intrasellüler GSH düzeyi üzerinde ACA ve GSH tedavi sonrası konfokal mikroskoptaki etkilerinin.....	62
Şekil 4.19. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde intrasellüler Ca ⁺² düzeyi üzerinde ACA ve GSH tedavi sonrası konfokal mikroskopta etkilerinin	65
Şekil 4.20. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde PARP-1 inhibitörü olan PJ34 ve DPQ düzeyleri üzerinde ACA ve GSH tedavi sonrası intrasellüler Ca ⁺² floresan yoğunluğunu konfokal mikroskopta etkilerinin görüntülenmesi	68
Şekil 4.21. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde intrasellüler JC-1 ve DCFH-DA düzeyleri üzerinde ACA ve GSH tedavi sonrası konfokal mikroskopta etkilerinin	70
Şekil 4.22. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde intrasellüler MitoTracker ve DHR-123 düzeyleri üzerinde ACA ve GSH tedavi sonrası konfokal mikroskopta etkilerinin.....	73
Şekil 4.23. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde intrasellüler Zn ⁺² düzeyi üzerinde ACA ve GSH tedavi sonrası konfokal mikroskopta etkilerinin	76
Şekil 6.1. Hipokampal nöron hücrelerinde A β ile oluşturulan alzheimer hastalık modelinde,	87

RESİMLER DİZİNİ

Resim 3.1. Hipokampus izolasyonu için kullanılan streil malzemeler ve laminar flow.....	24
Resim 3.2. Neonatal farelerden hipokampusun alınması ve in vitro koşullarına hazırlanması (a; buz üzerinde anestezi uygulaması, b; %70 etil alkol içerisine alınması, c; neonatal farelerin dekapite edilmesi, d; fare kafalarından beyin çıkarılması, e; beyin, f; beynin iki hemisfere ayrılması g; hipokampus h; CO ₂ inkübatörü).....	26
Resim 3.3. Hipokampal nöron hücrelerinin mikroskopta görüntüleri (a; 2-4 günlük görüntüsü b; 8-10 günlük görüntüsü c; 4-8 günlük görüntüsü d; 12-14 günlük görüntüsü)	26
Resim 3.4. Kalsiyum sinyali analizinde kullanılan floresans spektrofotometre cihazı	29
Resim 3.5. Spektrofotometrik ve floresans analizler için kullanılan kuyucuk okuyucu (plate reader) cihazı	33
Resim 3.6. Western Blot analizinde kullanılan malzemeler.....	34
Resim 3.7. Jel görüntüleme cihazı	34
Resim 3.8. Lazer konfokal mikroskop cihazı, LSM800.....	38
Resim 3.9. GSH, GSH-Px, ve MDA analizlerin yapıldığı spektrofotometre cihazı .	39
Resim 4.1. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde, TRPM2 ve PARP-1 ekspresyon düzeyleri, ACA ve GSH tedavisinin etkileri sonrası bant görüntüleri.	49
Resim 4.2. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde kaspaz-3 ve -9 ekspresyon düzeyi üzerinde, ACA ve GSH tedavisinin etkileri sonrası bant görüntüleri.	51
Resim 4.3. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde Bax ve Bcl2 ekspresyon düzeyi üzerinde, ACA ve GSH tedavisinin etkileri sonrası bant görüntüleri.	53
Resim 4.4. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde, Hoechst/PI floresen boyalarla inkübasyon ardından konfokal mikroskop analizlerinde ACA ve GSH uygulamasının etkilerinin görüntüleri	59
Resim 4.5. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde intrasellüler GSH düzeyi üzerinde ACA ve GSH tedavi sonrası konfokal mikroskoptaki etkilerin görüntüleri	62
Resim 4.6. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde intrasellüler Ca ⁺² düzeyi üzerinde ACA ve GSH tedavi sonrası konfokal mikroskopta etkilerinin görüntüleri	65
Resim 4.7. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde intrasellüler JC-1 ve DCFH-DA düzeyleri üzerinde ACA ve GSH tedavi sonrası konfokal mikroskopta etkilerinin görüntüleri	69

- Resim 4.8.** Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde intrasellüler MitoTracker ve DHR-123 düzeyleri üzerinde ACA ve GSH tedavi sonrası konfokal mikroskopta etkilerinin görüntüleri 72
- Resim 4.9.** Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde intrasellüler Zn⁺² düzeyi üzerinde ACA ve GSH tedavi sonrası konfokal mikroskopta etkilerinin görüntüleri 76



1. GİRİŞ

Nörodejeneratif hastalıklar, özellikle yaşlı nüfusta bulunan, dünya çapındaki insidansı ve büyük ölçüde can kaybının sebebi olan yaygın hastalık grubudur (1). Nörodejeneratif hastalıklar beynin yapı ve fonksiyonunun bozulmasına sebep olan biyokimyasal ve metabolik yolları aktive ederek toksik proteinlerin anormal birikiminden dolayı nöron kaybı ile karakterize edilirler (2). Vakaların çoğunda, bilişsel işlev bozukluğu, davranış bozuklukları ve hafıza kaybı gibi semptomlar görülür. Bu semptomlar, hastalığın ilk zamanlarında kendini çok belli etmezler. ancak hastalığın ilerleyen zamanlarında kendilerini belli ederler. Klinik semptomlar, hastalık sürecinin başlamasından sonra neredeyse on yıllar sonra bile ortaya çıkabilir. Nörodejeneratif hastalıklar, benzer spesifik olmayan klinik semptomlara sahip olmalarına rağmen farklı moleküler patolojiye, epidemiyolojiye, laboratuvar bulgularına, nöron özelliklerine ve değişimlerine bağlı farklı bozukluklar içeren geniş bir hastalık grubudur (3, 4). Bunlardan Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı (PH), amiyotrofik lateral skleroz (ALS) ve Huntington hastalığı (HH) en yaygın dört nörodejeneratif hastalıktır. Bu nörodejeneratif hastalıklar içerisinde en yaygın olanı Alzheimer hastalığı olup demans'ın en belirgin nedenidir (5). 2050 yılına gelindiğinde dünya genelinde Alzheimer hastalarının sayısının yaklaşık olarak 110 milyon olması beklenmektedir (6). 50 yaş ve altı grupta demans prevalansı 4 binde 1'den az olmakla birlikte bunların yaklaşık olarak %30 kadarının Alzheimer hastası olduğu kabul edilmektedir (7).

Alois Alzheimer tarafından ilk defa 1907'de rapor edilen Alzheimer hastalığı, serebral korteksin çeşitli bölgelerinde disfonksiyona neden olan senil plakların ve çoğunlukla fibriller A β peptid ve distrofik nöritlerden oluşan nörofibriller yumakların birikmesi ile karakterizedir (8). Özellikle amigdala, hipokampus, frontal asosiyasyon korteksi, temporal ve parietal loblar, Meynert'in kolinerjik bazal nükleusunda senil plak oluşumu gözlenir. Hastalığın ilerlediği safhalarda sinaps kaybı ve nihayetinde nöron ölümü meydana gelir. Alzheimer hastalığı, özellikle demans ve progresif bir bilişsel düşüş sonucu genelde hastalarda; hafıza kaybı, unutkanlık ve davranış bozuklukları ile kendini göstermektedir (9, 10). Hastalığın etiyopatogenezine bakıldığında senil plakların oluşumu ve nörodejenerasyon süreçlerine oksidatif stresin katkı yaptığı bilinmektedir.

Merkezi sinir sistemi, fazla miktarda doymamış yağ asidi içeren yapısı ve dokularının yüksek oksijen ihtiyacı nedeniyle oksidatif ürünlerin üretimine elverişli ve oksidatif hasara açıktır. Fazla miktarda enerji ve O₂'e ihtiyaç duyan bu nöronal yapılar çok miktarda doymamış yağ asidi içerdiğinden lipid peroksidasyona uğramaya elverişlidir. Nöronal antioksidan/oksidan dengesinin bozulması reaktif oksijen türleri (ROT) üretiminde artışa neden olur. Alzheimer hastalığının etiyolojisi ve patogenezinde oksidatif stresin rolünü irdeleyen çalışmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Hücresel ROT üretiminde artış ile Alzheimer hastalığı patogenezinin ilişkilendiren çalışmalar azımsanamayacak düzeydedir (11-13). Sözü edilen çalışmalarda, Aβ uygulamasının, ROT ve reaktif nitrojen türlerinin (RNT) artışına sebep olduğu ifade edilmektedir.

ROT, hücre membranında ROT duyarlı kalsiyum iyonu (Ca⁺²) geçirgen kanalların aktivasyonu ile sitozole Ca⁺² akışını doğrudan indüklemektedir. Bu nedenle, yavaş yavaş artan sitozolik Ca⁺² yoğunluğunun hücre ölümüne yol açacak boyutlara ulaştığı düşünülmektedir (14). Yaşlı nöronlarda da Ca⁺² seviyelerinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (15). Hücresel Ca⁺² konsantrasyonlarındaki artışının Alzheimer hastalığında nöronal kayıplarda önemli rolünün olduğunu belirten çalışmalar da bulunmaktadır. Bu çalışmalarda, hücresel Ca⁺² seviyelerinin düzensizliğinden yola çıkarak ilerde Alzheimer hastalığı için terapötik hedeflerin olabileceği öngörülmektedir (16-18). Ca⁺² biyolojik sistemlerde önemli rollere sahip bir katyondur. Hücre bölünmesi, hücre apoptoziste, sinaptik transmisyonunda, kas kasılmasında, intrasellüler sekonder haberci molekül olmak üzere birçok rolü olan eşsiz bir iyondur (19, 20). İntrasellüler serbest Ca⁺² ([Ca⁺²]_i) konsantrasyonu (50-100 nM), ekstrasellüler Ca⁺² konsantrasyonuna (1-3 mM) kıyasla 10-20 bin kat daha az olduğundan hücre içi hayati faaliyetlerin sürdürülmesi için hassas bir denge gözetildiği aşikârdır. Nöronların kompleks yapılarında ve çok yönlü fonksiyonlarında Ca⁺² iyonlarının farklı görevler üstlendiği bilinmektedir. Nöronal yapılarda Ca⁺² iyon dengesizliği ([Ca⁺²]_i aşırı artışı) nörodejenarasyona yol açabileceği ifade edilmiştir (21). Alzheimer hastalığında nöronal apoptozis öncesi intrasellüler Ca⁺² iyonunda aşırı artış olduğunu belirten çalışmalar literatürde mevcuttur (22, 23).

Geçici Reseptör Potansiyeli (TRP) kanalları, memelilerde ifade edilen iyon kanallarının geniş bir ailesini oluşturur. Memelilerde primer aminoasit yapılarına göre

altı alt aileye ayrılır ve 28 farklı tipte TRP kanalından oluşur ve bunlar; TRP ankyrin (TRPA), TRP canonical (TRPC), TRP melastatin (TRPM), TRP mucolipin (TRPML), TRP polycystin (TRPP) ve TRP vanilloid (TRPV) alt aileleridir. TRP kanalları, insan vücudunda bulunan her hücrede muhtemelen bir veya daha fazla alt tipi bulunacak şekilde dokular arasında geniş bir şekilde dağılmıştır. Dahası, TRP kanalları; iyonlar, küçük moleküller, ısı, soğuk ve mekanik kuvvete kadar değişebilen çeşitli fiziksel ve kimyasal uyaranlarla açılma-kapanma durumu gösterebilir. Sonuç olarak, insan vücudu için de TRP kanalları sağlık ve hastalık durumunda oldukça önemlidir (24).

TRPM alt ailesi sekiz üyeye ve bu üyelerde kendi aralarında 4 grupta sınıflandırılmıştır (25). Bu üyelerden TRP melastatin 2 (TRPM2), hem iyon kanalına hem de adenosin difosforiboz (ADPR) hidrolaz olarak enzimatik aktiviteye sahip bir 'kanzyme' olması nedeniyle alışılmadık bir proteindir (26). TRPM2 katyon kanalları Ca^{+2} 'a geçirgen seçici olmayan bir katyon kanalı olup çeşitli faktörlerle kanal yapısında bulunan enzimatik bölge sayesinde sitozolik ADPR ve hidrojen peroksit (H_2O_2) tarafından aktive edilir (26, 27) ve nöronal hücrelerde aktivasyonu sonucu ekstraselüler ortamdan sitozole Ca^{+2} akışını artırarak hücreyi apoptozise sürüklediği bildirilmiştir (28, 29). Nasıl ki bu kanalı aktive eden faktörler olduğu gibi kanalı bloke eden kimyasallar da bulunmaktadır. Bunlar arasında, N-(p-Amylcinnamoyl) anthranilic acid (ACA), miconazole, clotrimazole (CTM) (30,31), 2- Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) (32) ve flufenamic acid (FFA) yer almaktadır (33). Doğrudan TRPM2 kanalını bloke eden ve klinikte toksik etkisi olmadan faydalanabilecek antagonist sayısı sınırlıdır. Bundan dolayı özellikle nörolojik hastalıkların tedavi seçeneklerinin araştırılmasında yeni ve fizyolojik yan etkileri daha düşük TRPM2 katyon kanal antagonistlerine de ihtiyaç vardır.

Nörolojik hastalıklarda sitozolik Ca^{+2} 'un aşırı artışı mitokondriyal membran depolarizasyonunun artmasına neden olarak;

- 1) Kaspaz aktivasyonları ile apoptozisin indüklenmesini,
- 2) İntrasellüler ROT üretimi artışını,

3) İntrasellüler ROT üretimi artışı ile aktive olan kanalların, mitokondriyal oksidatif stres ürünlerinin üretimindeki artışla daha fazla açılmasını tetiklemektedir (34, 35).

Nöronal kültürlerde, hücrelerin oksidatif stresin deneysel modeli olan H₂O₂'ye maruz kalması durumunda [Ca⁺²]_i artışına, mitokondriyal fonksiyon bozulmasına ve poli adenozin difosforiboz polimeraz 1 (PARP-1) aktivasyonuna neden olarak hem apoptozis benzeri gecikmeli nöron ölümü hem de nekrozu başlattığı gösterilmiştir (36-38). ADPR, NAD'dan 3 yolla üretilmektedir (39). Bu yollardan bir tanesi çekirdekte DNA hasarı sonucu PARP-1 aktivasyonudur.

Günümüzde nörolojik hastalıkların etiyolojisinde TRP kanallarının rol oynadığı bildirilmiştir (40-44). Bu katyon kanal ailesi içerisinde özellikle oksidatif stres ile aktive olan TRPM2 katyon kanalı inflamasyon ve radikal artışına duyarlılığı sebebiyle dikkat çekmektedir. TRPM2, oksidatif stres ve/veya oksidatif stres redoks sistemleri ile gerçekleşen oksidasyon ürünleri (Ör; ADPR) ile aktive olmaktadır. Alzheimer hastalığı etiyolojisinde de oksidatif stres ürünlerinin ve hipokampus hasarının rol oynadığı iyi bilinmektedir. Antioksidan madde uygulamalarının hastalığın belirtilerini azalttığı bildirilmiştir (41). TRPM2 katyon kanallarının hipokampal nöronlarda yüksek düzeyde eksprese edildiği de bildirilmiştir (43, 45).

Yukarıda belirtilen amaçlar ve analizler sonucunda aşağıdaki hedeflere ulaşılması amaçlanmıştır.

1- Oksidatif stresin Alzheimer hastalığı üzerindeki etkileri hakkında değişik araştırma gruplarınca yapılmış birçok çalışma vardır. Fakat oksidatif stres baskılanmasının tedaviye katkı sağladığı yeterince araştırılmamıştır. Hastalığın etiyolojisinde oksidatif stres aracılı aktive edilen TRPM2 kanallarının rolü açığa çıkarılarak, bu yönlü çalışma sonuçlarının yorumlanmasına kaynak teşkil edilecektir.

2- Hastalığın etiyolojisinde TRPM2 kanal aktivasyonunun rolü aydınlatılarak, literatüre katkı sağlanılacaktır.

3- Hipokampus nöronlarının primer kültürü sayesinde yapılacak birçok teknik ve görüntüleme sonuçları literatüre büyük bir katkı sağlayacaktır.

4- Alzheimer hastalığı tedavisinde yardımcı tedavi maddeleri olarak antioksidan (GSH) ve TRPM2 kanal blokelerinin etkileri ortaya çıkarılacaktır.

Bu tez çalışmasında hipokampal nöronlarda aynı anda A β ile Alzheimer hastalığı oluşumu indüklenerek ve farklı araştırma metotları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak; serbest radikal miktarının artmasıyla, hücre içi mekanizmaları anlaşılmaya çalışılmıştır. Alzheimer hastalığında intrasellüler Ca⁺² konsantrasyon artışının TRPM2 katyon kanalları aracılığı ile gerçekleşebileceğini konfokal görüntüleme yöntemini kullanarak gösterilmiştir. ADPR hücre zarını geçemediğinden, bazı analizlerde (konfokal mikroskop), PARP-1 inhibitörleri (DPQ ve PJ34) kullanılarak TRPM2 kanal aktivasyonundaki değişiklikler dolaylı yoldan test edilmiştir. Yaptığımız literatür taraması sonucu, primer hipokampus kültüründe TRPM2 katyon kanalının yukarıda bahsedilen yollar aracılığı ile Alzheimer hastalığı etiyolojisindeki rolü daha önce çalışılmadığından ilk kez araştırılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

Nörodejenerasyon birçok nörodejeneratif hastalığı kapsayan bir terimdir. Nörodejeneratif hastalıklar sıklıkla nöron kaybı, bellek, mobilite, bağımsızlık veya iyilik halinin zamanla ortadan kalması ile karakterizedir. Her nörodejeneratif hastalığın kendine has özellikleri olmakla birlikte genel anlamda hepsi yavaş ilerleyicidir ve erken ölümle sonuçlanır. Alzheimer hastalığı, dünya çapında 25 milyondan fazla insanı etkileyen kronik bir nörodejeneratif hastalıktır (46-50). Alman bir nöropsikiyatrist olan Alois Alzheimer 1907 yılında ilk kez hastanın semptomlarına göre hastalığın karakteristik özelliklerini tanımlamıştır. Bu semptomların bazıları hafıza kaybı, konuşma ve yazma sorunları, kelimeleri veya soruları anlama eksikliğidir. Hastasının ölümünden sonra, histolojik boyama teknikleri kullanarak beyin kısımlarında yaptığı mikroskobik inceleme sonucu hastalığın ayırt edici özelliği olan amiloid plaklar ve nörofibril yumakları keşfetmiştir (51).

Alzheimer hastalığı günümüzde en yaygın demans türü olarak bilinmektedir. Alzheimer, Demans vakalarının yaklaşık %60-%70'ini oluşturmaktadır. Alzheimer hastalığı'nın spesifik belirtileri olan A β plaklar ve hiperfosforile tau içeren nörofibriler yumaklar serebral korteks ve hipokampusu etkilemektedir (52, 53). Hastalığın anormallikleri ilk frontal ve temporal loblarda ve daha sonra da neokorteksin bazı kısımlarında tespit edilmiştir (52). Alzheimer hastalığı, amiloid prekürsör proteini (APP) ve presenilin gen mutasyonlarının çok nadir neden olduğu bir hastalık olmasına rağmen yaşlanma, genetik yapı ve yaşam tarzı faktörlerinin neden olduğu daha yaygın bir türdür (53-55).

Alzheimer hastalığı'nın tanısından sonra ortalama yaşam süresi 8-10 yıl olmasına rağmen, semptomları uzun yıllar önce ortaya çıkmaktadır (53-55). Alzheimer hastalığı bilinçsel fonksiyon kaybı ile seyreden bir nörodejeneratif hastalıktır. Hastalığın erken döneminde nöronal hasar ve tahrip ile hafıza kaybı gibi bilişsel problemler ortaya çıkmaktadır. Hastalığın ilerlemesiyle birlikte beynin diğer bölümlerindeki nöronlar da zarar görür ve yok olur. Buna bağlı depresyon, halüsinasyonlar gibi bazı psikiyatrik belirtiler de görülmektedir. Nihayetinde günlük

hareketlerin yapılmasını sağlayan refleksif bellek bozularak yemek yeme, yutma, yürüme, giyinme gibi aktivitelerle ilgili zorluklar ortaya çıkmaktadır (5, 55-57). Bu gibi lokomotor bozukluklar sonucu hasta zamanla yatalak hale gelmektedir. Alzheimer hastalığı'nın tanısı klinik olarak konmaktadır ve en önemli husus tedavi edilebilir demanslardan ayrılmasıdır. İlerlemiş safhada radyolojik görüntülemelerde serebral girusların incelenmesi, sulkus ve ventriküllerin genişlemesi ile birlikte diffüz atrofi gözlenmektedir. Histolojik incelemelerde Alzheimer hastalığı serebral kortekste yaygın nöronal kayıp ile ilişkilendirilmiştir. Nöronal kayıp asetilkolin sekresyonundaki azalma ile doğru orantılıdır. Alzheimer hastalığındaki güncel tedaviler hastalığın ilerlemesini durdurmaya veya yavaşlatmaya yöneliktir.

2.1.1. Alzheimer Hastalığının Klinik Özellikleri

Alzheimer hastalığı çok sinsi ve yavaş ilerleyen bir hastalıktır. Klinik semptomlar, beyindeki patolojik değişikliklerin meydana gelmesinden yıllar sonra ortaya çıkmaktadır. Dejenerasyonun klinik özellikleri ortaya çıkmadan 20-30 yıl önce başladığı düşünülmektedir. Hafızayı etkileyen Alzheimer hastalığını anlayabilmek için belleğe dair bazı nöral devreyi de bilmek gerekir. Belleğin nöral devresi medyal temporal sistem ile medyal diensefalik sistem nöronlarınca oluşturulur. Limbik sistemin öğrenme ve hafıza gibi fonksiyonlarda önemli rolü vardır. Duyguların (mutluluk, memnuniyet, neşe, sevgi, heyecan vb.) serebral korteksin aktivitesi sonucu düzenlendiği dışı vurumların (gülme, durgunluk, ağlama, hiddet vb.) ise limbik sistem ve hipotalamus aracılığı ile gerçekleştiği kabul edilir. Limbik sistem içerisinde incelenen önemli yapılar; formasyon hipokampisi, area septalis, girus singuli, girus parahipokampalis, indusium griseum ve korpus amigdaloidumdur. Prefrontal kortekste yerleşik olan kısa süreli bellek bilgilerinin uzun süreli belleğe dönüşümü medyal temporal ve diensefalik sistemlerin birlikte çalışması ile gerçekleştirilir. Uzun süreli bellek bilgileri tüm kortekste depolanırken öncelik uyaranın ilk algılandığı alanlar etrafında konuşludur. Hipokampus, kısa süreli bellek, işlemsel bellek veya belleğin depolanmasında rol oynamazken deklaratif belleğin pekişmesinde görev alır. Tam olarak aydınlatılamamasına rağmen uzun süreli potensiasyonun (LTP) bellek oluşumunda önemli bir role sahip olduğu

düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda hipokampal nöronların düzenli pre-sinaptik uyarımlara karşılık daha geniş post-sinaptik cevap oluşturdıkları gösterilmiştir (58, 59).

Dekleratif bellek hipokampusta özel bir yol takip eder. Bu yol girus dentatus CA1, CA2, CA3, subikulum ve entorinal korteksten oluşmaktadır. Duyusal korteks tarafından algılanan bir uyarım bellek döngüsünü başlatır. Hipokampus girdisi olarak entorinal korteks nöronları tarafından girus dentatusa ulaşan uyarım burada sinaps yaparak CA3 ve CA1'den geçerek subikuluma ulaşır. Hipokampus çıktısı olan subikulum, forniks yolu ile hipotalamusa ve mamiller cisimciklere giden aksonlar yollar. Bazı aksonlar entorinal kortekse geri döner. Entorinal korteks ise bilgiyi duyusal kortekse geri gönderir. Bu bellek devresindeki hasar ise yeni bilginin pekişmesini engeller. Yeni edinilen bilgilerin depolanmasında formasyon hipokampinin rolü olduğu bilinmektedir. Hipokampusu etkileyen lezyon varlığında hastalarda kısa süreli hafızanın uzun süreli hafızaya dönüştürülemediği gözlenmiştir. Lezyon sol hipokampusta olduğu durumda sözel hafıza etkilenirken sağda olduğu durumlarda görsel hafıza etkilenmektedir (60, 61).

Bellek hasarına ilişkin en iyi örnek Henry Molaison (H.M.) olgusudur. Dirençli epilepsi hastalığı nedeniyle temporal lobları ile birlikte hipokampus amigdala entorinal ve peririnal korteksleri rezeke edilen hasta, bu tarihten itibaren hiçbir yeni bellek bilgisini uzun süreli bellek korteksinde depolayamadı. Yeni motor beceriler edinebilmesine rağmen bunları öğrendiğini hatırlayamıyordu. Sonuç olarak H.M. anterograd amnezi modeli oldu. Hipokampusun en yaygın hastalığı CA1'de ağır nöronal hasar sonucu bellek bozukluğu ile ortaya çıkan Alzheimer hastalığıdır. Nöronal dejenerasyon sırasında Aβ plakları ve nörofibril yumaklar bir noktada artarak ilk klinik belirtilere yol açar. Bu evre, epizodik belleğin bozulmasının en yaygın özelliğini temsil eden hafif bilişsel bozukluk olarak adlandırılır (53). Ayrıca, çoklu görev yapma, karar verme, yönlendirme ve güven kaybı ile ilgili zorluklar da ortaya çıkmaktadır. Bilişsel bozulma ilerledikçe, günlük aktivitelerle ilgili sorunlar meydana gelir ve davranış değişiklikleri başlar. Ayrıca, beyin bölümlerinin geniş bölgelerinde Aβ plaklarının dağılımı ve tau proteininin çoğalması ile ilişkili olan atrofi, afazi, apraksi ve agnozi gibi semptomlar görülmektedir.

2.1.2. Alzheimer Hastalığının Risk Faktörleri

Alzheimer hastalığı, çeşitli nedenlerin birleşiminin bir sonucudur. Bu hastalığın gelişmesine yol açan çok sayıda faktör vardır. En önemli ve değiştirilemez risk faktörleri yaş, Apolipoprotein E (APOE) geninin e4 formu ve aile öyküsüdür. Yaş, aralarında en büyük risk faktörüdür. Yapılan araştırmalara göre yaşlanmayla birlikte Alzheimer hastalığına sahip kişilerin sayısı artmaktadır (55-57). Alzheimer hastalarının çoğu 65 yaş ve üstündedir. Hastalığın prevalansı 5 yılda bir 2 kat artar ve bu, 85 yaş ve üstü olduğunda % 30 - % 40'a yaklaşmaktadır (62). Diğer bir risk faktörü olan APOE-e4 formu, kandaki kolesterol taşınmasında rol alan proteini kodlayan bir gendir. APOE geninin üç formu (e2, e3 ve e4) mevcuttur. E4 formu e3 formu ile kıyaslandığında, Alzheimer hastalığı geliştirme riskinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlara rağmen araştırmalar halen devam etmektedir. Ayrıca, aile öyküsü Alzheimer hastalığının prevalansını artırmaktadır. Özellikle birinci derece akrabası Alzheimer olan kişilerde hastalığın gelişme olasılığı daha yüksektir. Bu noktada aile genetiği ve aile üyeleriyle aynı yaşam tarzları önemli olabilir (55-57). Genetik faktörler olarak Alzheimer hastalığının ortaya çıkmasına APP, presenilin-1 (PSEN1) ve presenilin-2 (PSEN2) proteinlerindeki mutasyonlar katkıda bulmaktadır (62).

Alzheimer hastalığı ve demans için bazı risk faktörleri davranış değişikliği ile azaltılabilir. Yaşam tarzı ile ilgili kardiyovasküler risk faktörleri (ör: obezite, diyabet, hipertansiyon), sigara kullanımı, fiziksel ve zihinsel hareketsizlik, düşük eğitim seviyesi, asosyal olma, diyet veya travmatik beyin hasarı (kafa travması) gibi faktörler değiştirilebilmektedir. Uzun süreli eğitim ve zihinsel faaliyetlerin sonucu bilişsel gelişime yol açarak Alzheimer hastalığı riskini azaltmaktadır. Sinaptik plastisite (nörondan nörona etkileşimler) kazanımını artıran davranışsal değişiklikler patolojik süreçlere direnç olmaktadır. Zihinsel aktivite gerektiren işler de riski azaltmaya yardımcı olur. Eğitim aynı zamanda tedaviyi, sağlık hizmetlerini, dolaylı olarak beslenmeyi ve sosyoekonomik durumu da etkilemektedir. Sosyal olarak aktif olmak bilişsel rezerv için çok destekleyicidir. Bu olumlu etkiler her ne kadar nedeni açıklamasa da beyinde yeni bağlantıların oluşmasından kaynaklanmaktadır (55-57). Bazı araştırmalar, beslenmede B12 gibi vitaminlerin, antioksidanların, doymamış yağ

asitlerinin, meyve ve sebzelerin önemine dikkat çekmektedir. Akdeniz tipi diyet, egzersiz ve nonsteroidal anti inflamatuvar ilaçların Alzheimer hastalığı riskini azaltabileceğini vurgulamaktadır (53, 62).

2.1.3. Alzheimer Hastalığının Patogenezi

Alzheimer hastalığının spesifik ayırt edici özellikleri, korteksin bazı kısımları ve temporal lob bölgesindeki senil (amiloid) plaklar ve nörofibril yumaklarıdır. Ayrıca sinapsların dejenerasyonu, nöronal apoptozis, belirli nörotransmitterlerin yüksek düzeyde olması, nöronlara anormal protein birikimi, yüksek düzeyde inflamasyon ve oksidatif stres, Alzheimer hastalığının diğer nörokimyasal ve patolojik belirtileridir (52, 53).

Nörodejenerasyona neden olan $A\beta$ 'nin klirensi ve aşırı üretimi arasındaki denge eksikliğini özetleyen amiloid hipotezidir (63). Amiloid hipotezinde, APP'nin β -sekretaz ve γ -sekretaz enzimleriyle metabolize olması sonucu $A\beta$ peptitleri ($A\beta$ -40 ve $A\beta$ -42) meydana gelir. $A\beta$ -42 peptitleri ($A\beta$ 'nin 42 amino asit izoformları), $A\beta$ -40 formundan daha fazla birikmeye meyillidir. $A\beta$ peptitlerinin aşırı üretimi, oligomerleri oluşturmak için peptitlerin bir araya gelmesine yol açar. Son olarak, fibriller amiloid plaklar ve nörofibril yumakları oluştururlar (52, 53). Trizomi 21 (Down sendromu) olgularında erken dönemde Alzheimer benzeri semptomlar görülmesi de $A\beta$ ve APP'nin fazlaca ekspresyonuna bağlanmaktadır (64,65). Zira Alzheimer patogeneğinde başat rolü olan bu iki protein de 21. kromozom üzerinde yer almaktadır (64,66).

Glutamat, norepinefrin ve serotonin gibi nörotransmitterlerin birikim; nöronlarda fonksiyon bozukluğuna, sinaps kaybına, nöronal hasara ve inflamasyona neden olmaktadır. APP, PSEN1 ve PSEN2 mutasyonları bu patolojinin oluşmasına sebep olmaktadır (67,68). APP mutasyonu, $A\beta$ 'nin bölünmesi ve bir araya gelmesinde rol oynamaktadır. PSEN1 ve PSEN2, APP işlenmesini etkileyen γ -sekretazın katalizör alt birimini etkinleştirmektedir. Bu genlerdeki mutasyonlar, APP'nin işlenmesinde ve daha uzun $A\beta$ peptitlerinin oluşumunda sorunlara yol

açmaktadır. A β -42 peptidlerin yüksek seviyede birikmesine, APP'nin işlenmesi ve A β peptidlerin elongasyonuna sebep olmaktadır (5, 69, 70).

Tau, normal durumda eriyebilen bir mikrotübül proteinidir (71, 72). Ancak patolojik durumda Alzheimer hastalığının diğer bir göstergesidir. Yapılan çalışmalar, Alzheimer hastalarının beyin numunelerinde ve beyin omurilik sıvısında yüksek seviyede tau ve fosforile tau proteini olduğunu göstermiştir (52, 72). Nörofibril yumaklarda kümelenmiş tau proteini fosforile edilmektedir (73). Bu işlem sırasında çözünmeyen tau formu yumak şeklinde bir araya gelmekte ve zamanla nöronların dejenerasyonuna sebep olmaktadır. Tau proteini ve nörofibril yumaklardaki değişiklikler, amiloid kademeli hipotezinde aşırı A β üretimi ile bağlantılıdır (74-76).

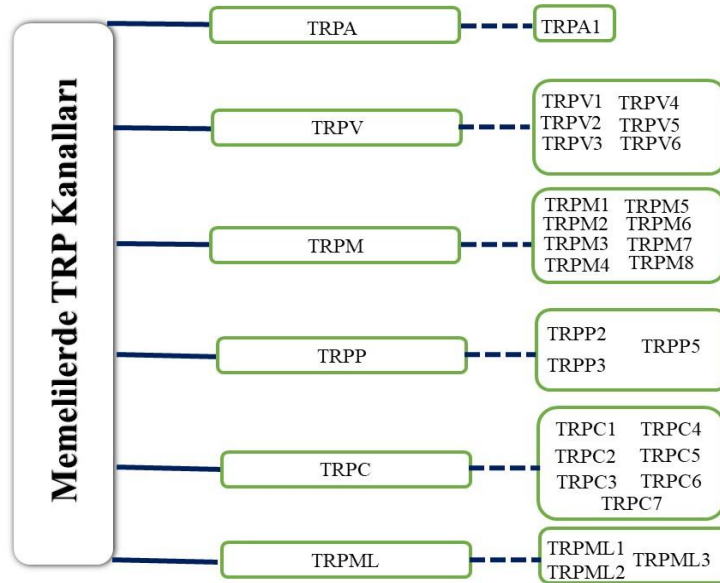
2.1.4. Alzheimer Hastalığının Tedavisi

Nörodejenarasyon sonucu ortaya çıkan nörokimyasal bozukluklar kortikal ve hipokampal nöronlarda asetilkolin eksikliğine yol açmaktadır. Buna karşı Alzheimer hastalığı semptomlarını değiştirmeyi ve azalmış nörotransmitter seviyelerini dengelemeyi amaçlayan farmakolojik tedaviler geliştirilmiştir (53). Hafif ve orta şiddette seyreden Alzheimer hastalığı tedavisinde asetilkolinesteraz inhibitörleri (ör: rivastigmin, galantamin, donepezil ve tacirrin) kullanılmaktadır. Asetilkolinesteraz inhibitörleri sinaptik yarıktaki bulunan asetilkolinesteraz enzimini inhibe ederek asetilkolin konsantrasyonunun artmasına sebep olurlar (8). Orta ve ağır şiddette seyreden Alzheimer hastalığının tedavisinde N-metil-D-aspartik asit (NMDA) reseptör antagonistleri (ör: memantin) kullanılmaktadır. Bu grup ilaçların kullanımındaki temel amaç ise NMDA reseptörleri aracılı glutamat nörotoksitesini azaltmaktır (55-57). Ayrıca asetilkolinesteraz inhibitörleri ve memantin kombine olarak da kullanılmaktadır. A β aşırı gibi anti amiloid hedefli yaklaşımlardan γ - ve β -sekretaz inhibitörleri de yeni terapötik stratejiler olarak karşımıza çıkmaktadır (62).

2.2. Transient Receptor Potential (TRP) Katyon Kanalları

TRP kanalları Drosophila cinsi meyve sineklerinin göz hücrelerinde ilk defa 1989 yılında genetik çalışmalar sonucu tespit edilen (77), çoğunluğu Ca⁺² iyonuna

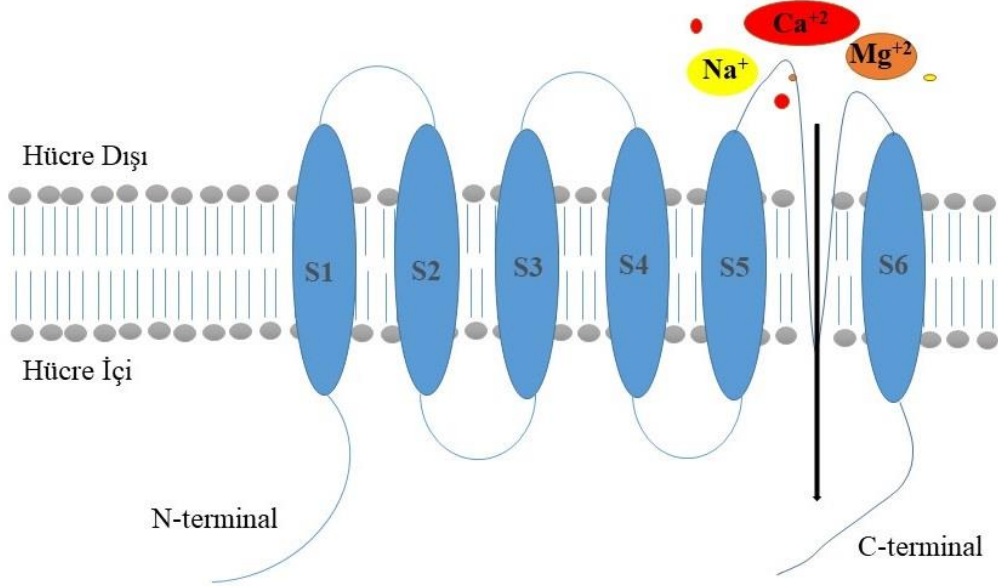
seçici geçirgen olmayan katyon kanallarıdır (78). TRP kanallarının yapısı Şekil 2.2 de gösterilmiştir. Ekstraselüler Ca^{+2} konsantrasyonu intrasellülere oranla yaklaşık olarak 20.000 kat daha fazla olduğundan, sitozoldeki Ca^{+2} yoğunluğunun artıp azalmasına bağlı olarak kapanıp açılan TRP kanallarından geçen iyonların hücrenin yaşamsal faaliyetlerinin sürdürülmesinde büyük önem arz ettiği düşünülmektedir. Memelilerde TRP kanal üst ailesi, kendi aralarında spesifik bağlanma bölgelerine göre toplamda 28 alt tip içeren 6 alt aileye ayrılmıştır (79). Bu alt ailelerden; TRPM alt ailesi 8 alt tip, TRPC alt ailesi 7 alt tip, TRPV alt ailesi 6 alt tip, TRPP alt ailesi 3 alt tip, TRPML alt ailesi 3 alt tip, TRPA alt ailesi 1 alt tip içermektedir (Şekil 2.1). Bu katyon kanalların önemi giderek artmakta ve çeşitli hastalıkların fizyopatolojisine katkıda bulunduğu dair çok sayıda yayın bulunmakta ve kanallar ile ilgili çalışmalar günden güne artmaktadır (80). Örneğin; ağrı modülasyonu konusu geçtiği zaman bu kanallar arasında en fazla ilgi odağı olan kanal TRPV1 olmuştur (81-83).



Şekil 2.1. TRP üst kanal ailesi ve alt üyeleri

TRP kanallarının iyon geçişini sağlayan konformasyonel açılma ve kapanma durumu hücre membranında bulunan voltaja duyarlı kalsiyum kanalları ve kimyasal kapılı kanallardan oldukça farklıdır. Örneğin kırmızı acı biberde (*Capsicum annuum*) bolca bulunan ve bibere yakıcılığı veren kapsaisin, TRPV1 katyon kanal agonistidir. Nanede (*Mentha piperita*) bulunan mentol TRPM8 katyon kanal agonisti ve tarçının (*Cinnamomum zeylanicum*) özünde bulunan sinamaldehit ise TRPA1 kanalının antagonistidir (84, 85). Son zamanlarda yapılan çalışmalarla TRP kanallarının;

diyabet (86), apoptozis (87), kanser (88), gibi hastalıkların beraberinde; migren (89) ve Alzheimer hastalığı (90) gibi nörolojik rahatsızlıklarla ilişkili olduğu ifade edilmiştir.



Şekil 2.2. TRP kanallarının şematik gösterimi. Bilindiği üzere, 6 transmembran kısımdan ve hücre içinde değişken N- ve C-terminallerinden meydana gelmektedir. İyon geçişleri S5 ile S6 arasında bulunan bir kanal vasıtası ile gerçekleştirilir. Bu kanal genellikle Ca²⁺, Na⁺ ve Mg²⁺ için bir akış güzergâhı oluşturur.

2.2.1. TRPM Alt Ailesinin Yapısal ve Biyofiziksel Özellikleri

TRPM alt ailesi, TRP üst ailesinin en büyük ve en çeşitli alt ailesidir. 1998’de TRPM alt ailesinin ilk keşfedilen ve klonlanan üyesi TRPM1 ilk defa melanoma hücrelerinde gösterilmiştir. Melanoma hücresinde keşfedildiğinden dolayı bu aileye ait üyeler hücrenin baş harfi olan ‘M’ ile ifade edilmektedir (91, 92). M olarak ifade edildikten sonra aile TRPM1’den TRPM8’e sekiz alt tipte üyeye ve bu üyeler kendi aralarında 4 gruba ayrılmıştır (Şekil 2.3). Bu gruplar, kanalları meydana getiren aminoasit dizi benzerlikleri temeline dayanarak oluşturulmuştur.

TRPM alt ailesi üyeleri, sadece fizyolojik işlevlerinde değil, aynı zamanda iyon iletimi ve seçiciliği, kapı mekanizması ve ligand tanıma dahil olmak üzere biyofiziksel özellikleri yönünden çeşitlidir. Örneğin, TRPM kanallarının çoğu seçici

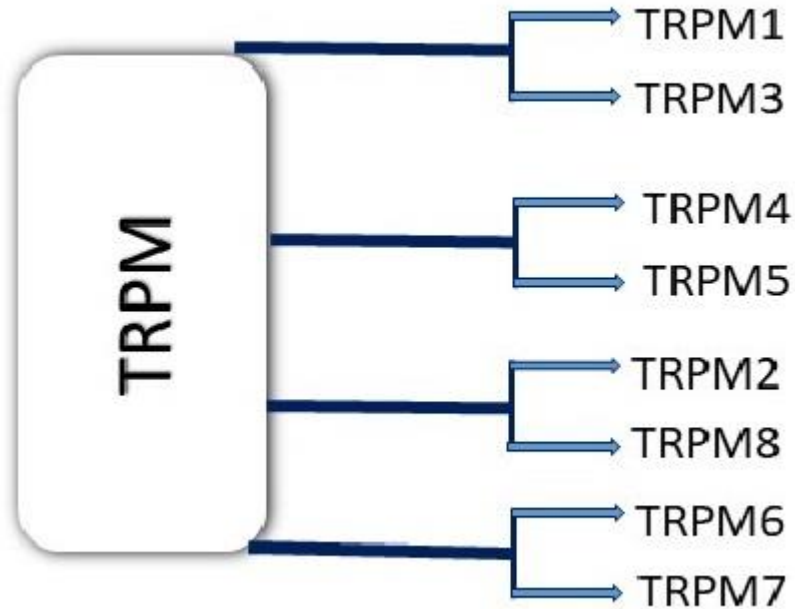
olmayan ve Ca^{+2} geçirgen katyon kanallarıdır, sadece TRPM4 ve TRPM5, Ca^{+2} 'a karşı geçirgen değildir (92).

1. Grup; TRPM1 ve TRPM3'ten meydana gelir. TRPM1'in uyarımı bilinmemekle birlikte, TRPM3'ün ise Ca^{+2} ve pregnenolon sülfat ile uyarıldığı bildirilmiştir (91).

2. Grup; TRPM6 ve TRPM7'den meydana gelir. TRPM6 ve TRPM7'nin karboksi ucunda bulunan kinaz uyarılma bölgesindeki serin/treonin kalıntıları ATP kullanılarak uyarıldığı vurgulanmıştır (92).

3. Grup; TRPM4 ve TRPM5'ten meydana gelir. Bu gruptaki üyeler Ca^{+2} geçirgen olmadığı ancak uyarılmalarının $[\text{Ca}^{+2}]_i$ ile düzenlendiğinden bahsedilmiştir (93).

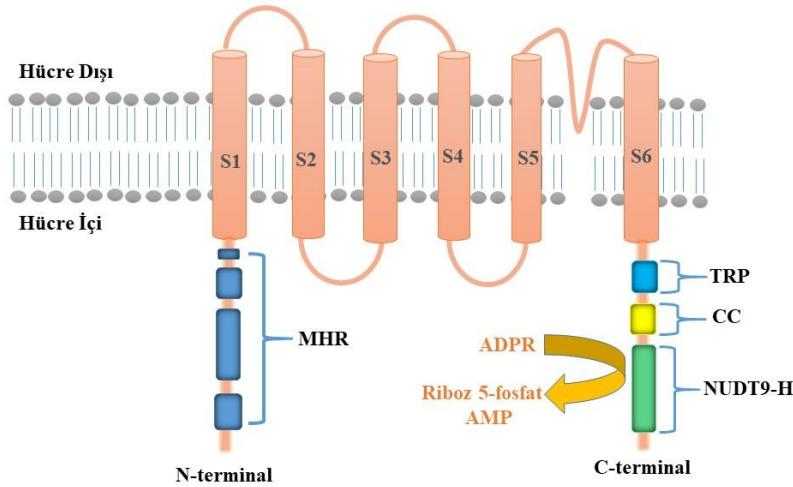
4. Grup; TRPM2 ve TRPM8'den meydana gelir. TRPM2'nin karboksi ucunda bulunan NUDT9-H alanının ADPR pirofosfataz aktivitesiyle ADPR ve deneysel ROT (H_2O_2) ile uyarıldığı; mentol ve düşük sıcaklıklarda ise TRPM8'in uyarıldığı kanıtlanmıştır (94, 95).



Şekil 2.3. TRPM alt ailesinin filogenetiği

2.2.1.1. TRPM2 Katyon Kanalları

TRPM2 geni 21. kromozom üzerinde yer almaktadır (96). TRPM2 katyon kanal proteini kalsiyuma geçirgen ve seçici olmayan özelliktedir (97). Bu katyon kanalı yapısında voltaja duyarlı sodyum kanallarındakine benzer şekilde 6 transmembran segment bulunmakta ve iyonlar 5. ile 6. segmentler arasındaki pordan geçmektedir (98). Kanalin sitozole bakan uçları amino ve karboksil uçlarıdır. Bu katyon kanalının diğer katyon kanallarından farklı olarak karboksil ucunda ‘**nudix domain**’ (NUDT9-H bölgesi) ifade edilmektedir (Şekil 2.4). Burada ADPR pirofosfataz enzim aktivitesi gösteren NUDT9-H bölgesi bulunur. Bundan dolayı TRPM2 kanalında bulunan karboksil ucu ile ADPR’nın etkileşimi sırasında ADPR parçalanarak adenosin monofosfat ve Riboz 5-fosfat meydana gelir ve kanalın uyarılması gerçekleştirilir (99). Kanal inaktivasyonunun ADPR katalizi sonucu toplanan adenosin mono fosfat (AMP)’ın negatif geribildirim mekanizması ile sağlandığı düşünülmektedir (99).



Şekil 2.4. TRPM2 katyon kanalının yapısı

TRPM2, genel olarak beyin, kalp, akciğer, karaciğer, iskelet kası, lökositler ve pankreasta ifade edilir (100). Hücresel düzeylerde, nöronlar (101-106), mikroglia (107-112), astrositler (113), makrofajlar (114, 115), nötrofiller (116-118), dendritik hücreler (119), megakaryositler (120), vasküler endotelial hücreler (121-124),

kardiyomiyositler (125) ve pankreas β adacık hücreleri (126, 127) de dahil olmak üzere birçok doku ve hücre tipinde varlığı bildirilmiştir. Her ne kadar kanallar sodyum (Na^+) ve potasyum (K^+) için geçirgen olsa da bunlarla birlikte aslında hücre içine Ca^{+2} girişinde çok mühim rol alırlar (87). Bilindiği gibi intrasellülerde serbest Ca^{+2} seviyesi (50-100 nM) ekstrasellülere (1-3 mM) kıyasla 10000-20000 misli daha azdır. Metabolik reaksiyonların devamında üretilen H_2O_2 'nin intrasellüler ortama girmesiyle ve TRPM2 katyon kanalını uyarmasıyla Ca^{+2} iyonunun intrasellülere daha fazla girdiği bilinmektedir. Bazı araştırmacıların yaptığı çalışmalar ise H_2O_2 'nin nükleus, mitokondri vs. gibi intrasellüler organlarda ADPR üretimi artırdığını ve bu ADPR'nin artışının da TRPM2 kanalını açtığını göstermiştir (128). Ek olarak *in vitro* çalışmalarda H_2O_2 'nin TRPM2 kanallarını uyardığı gösterilmiştir (129).

İntrasellüler içerisine aşırı Ca^{+2} iyonunun girmesi apoptozise varan birçok patofizyolojik olayın başlatıcısıdır. TRPM2 katyon kanallarının inhibisyonu diğer Ca^{+2} geçirgen kanallarda kullanılan ilaçlar ile tamamen engellenememektedir (130).

Bu sebepten dolayı intrasellüler ortama Ca^{+2} iyonu girişinden sorumlu TRPM2 katyon kanallarını uyaran ve inhibe eden mekanizmaların araştırılarak intrasellüler Ca^{+2} iyonu artışı ile ilgili diyabet, kanser, kalp hastalıklarını ve özellikle Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkların patogenezinin anlaşılması oldukça önemlidir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, 2-APB ve ACA'nın, TRPM2 kanal uyarılma mekanizmasının düzenlemesinde çok önemli roller olabileceği belirtilmiştir (131). ACA'nın etkisinin fosfolipaz A2'yi baskılayarak ortaya çıktığı düşünülmektedir (132).

2.2.1.1.1. Alzheimer Hastalığı Etiyolojisinde TRPM2 Katyon Kanalının Rolü

Son zamanda yapılan çalışmalar; apoptoz, kalsiyum sinyali, oksidatif stres ve mitokondriyal fonksiyonun nörodejenerasyonda hücresel düzeylerde rolü olabileceğine ifade edilmiştir (133–135). Bunun da ötesinde nörodejenerasyon olgularının yaklaşık %10'unun genetik faktörlerle bağlantılı olabileceği de göz önüne

koymuştur (136–138). Çoğu nörodejeneratif hastalıklarda oksidatif stresin uyardığı apoptoz mekanizmaları yer almaktadır. Yağ asitleri açısından zengin, oksijen tüketimi fazla, nöromelanin pigmenti ve demir bakımından fazla olan beyin dokusu, nöronları oksidatif hasara karşı hassas bir yapı kılmaktadır (139). Nrodejenerasyonun bir diğer nedeni de protein fonksiyon kaybı ve fazla agregasyon olarak kabul edilmektedir. Nöronal bazı proteinlerin yanlış üretimi, bazı enzimlerin protein işlemede hataları, genetik yapıdaki kalıcı bozukluklar, mutant proteinlerin meydana gelmesi ve birikmesine neden olmakta ve bu mutant proteinler de nöronlara hasar vermektedir. Ekstrasellüler A β birikmesi ve intrasellüler tau protein fosforilasyonunun Alzheimer hastalığının hücre altı düzeydeki patolojik temellerini oluşturduğu kabul edilmektedir (140, 141)

Oksidatif stres, ROT'un hücrenin biyokimyasal bileşenlerinden proteinler, lipidler ve nükleik asitler üzerinde meydana getirdiği tahribatı belirtmektedir. Hücrede oksidatif strese sebep olan ROT'un temeli olarak başlıca mitokondriler önümüze çıkmaktadır. Mitokondri fonksiyonlarından en önemlisi elektron taşıma zincirinin hatasız sürdürülmesiyle meydana gelen biyokimyasal enerji olan ATP retimidir. ROT retimi; elektron taşıma zincirinin işleyişi sırasında en son elektron alıcısı olan molekülün oksijene elektron iletmesiyle meydana gelmektedir. Normal şartlarda enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar aracılığıyla nötralize edilebilen ROT, patolojik durumlarda antioksidan sistemin zayıflamasıyla bir araya gelen ve oksidatif strese sebep olmaktadır. Normal koşullarda indirgeyici moleküllerin (NADH veya FADH $_2$) dhil edilmesiyle elektron aktarımı esnasında meydana çıkan protonlar da i membrana karşı elektrokimyasal gradiyent oluşturmakta ve membranlar arası alana taşınmaktadır. Proton yoğunluğunun artması sonucu transmembran potansiyel ise protonların ATP sentazinin aktif olması ile içeri alınırken aynı süre ATP sentezine imkan sağlar (142). [Ca $^{+2}$] $_i$ normal fizyolojik sınırların üstüne çıktığında mitokondri membranlarının Ca $^{+2}$ geçirgenliği fazlalaştığı mitokondriyal depolarizasyon meydana getirmekte ve fonksiyonlarını yapmada tehdit oluşturmaktadır. Buna bağlı olarak ROT retimi fazlalaşması aynı zamanda hücresel apoptoz süreçlerinin kaspaz enzimleri vasıtasıyla uyarılmaktadır. Sonuç olarak hücreyi apoptoza götüren bu yolakta Ca $^{+2}$ geçiren iyon kanallarının öncül rolü bulunur. Kalsiyum geçiren iyon kanallarının patolojik şartlarda farklı açılma-

kapanma davranışı gösterdiği kabul edilmektedir. Sonuçta hücrel kalsiyum sinyallerinin bozuklu, mitokondriyal membran depolarizasyonu ve ROT sentezi ile apoptoz arasındaki geri besleme mekanizması antioksidan savunmasının eksik kaldığı zamanda patolojik şartlar hızlandırmaktadır. Bu pozitif geri bildirim mekanizmaları ile nöronal hücreler zaman içerisinde apoptozise yenik düşmektedirler. Alzheimer hastalığının patolojisinde APP yanlış kesimi ardından biriken A β proteinin membranda hücreye kalsiyum girişini uyardığını ve buna bağlı olarak uyara bildiğininde etkileyebileceğini gösterilmiştir (143).

Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda en çok çalışılan yapı olan hipokampus, temporal lobun medial kısmının iç kısmında görülen uzunca bir yapıdır. Davranış nörofizyolojisinin temelini oluşturan hipokampus 1957 yılında yapılan ilk incelemelerin ardından rapor edilmiştir (144). Alzheimer hastalığının ilk evrelerinde hipokampusun CA1 alanında A β oligomerlerin çözülmeye başladığının tespit edilmesi ile mitokondriyal disfonksiyon, endozomal gelişim, dendritik yapı, sinapslar arası iletimin aksaması gibi yapıların bozulmasına sebep olduğu gösterilmiştir (145). TRPM2 katyon kanalının nörodejeneratif hastalıklardaki katkısı uzunca anlatan yayınlara (120) burada kısaca değinilecektir. TRPM2 katyon kanallarının çeşitli hücre tiplerinde var olduğu bildirilmiştir (146). Hipokampal CA1 ara nöronlarının da içerisine dahil olduğu hipokampus piramidal nöronlarında, TRPM2 katyon kanallarının fonksiyonel olarak çok fazla var olduğu bildirilmiştir (147). İskemi durumunda hipokampal nöronlarda meydana gelen nöronal ölümlerin TRPM2 katyon kanalıyla olduğu, yabanıl (wild type) ve genetiği baskılanmış (knock-out) farelerden izole edilen nöronlar *in vitro* olarak elektrofizyolojik sonuçlarla gösterilmiştir. Nöronlarda fazla PARP-1 enziminin üretilmesinin nöronal hücre ölümüne sebep olduğu bilinmesine rağmen bu mekanizmanın nasıl çalıştığı konusunda açık olmayan bildirimler mevcuttur (148). Bu hususta yapılan bir çalışmada PARP-1 enziminin aşırı üretimi N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG, 100 μ M ve 5 dakika inkübasyon) ile tetiklenmiş ve TRPM2 katyon kanalının hipokampal nöron ölümü üzerine etkisinin olmadığını bildirmiştir (148).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma; Süleyman Demirel Üniversitesi (SDÜ) Tıp Fakültesi Biyofizik Ana Bilim Dalı ile BSN SAĞLIK ANALİZ ARGE DANIŞM. ORGANİZ. TARIM SAN. VE TİC. LTD ŞTİ (Göller Bölgesi Teknokenti, Isparta) laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul (MAKÜ HADYEK) Başkanlığı'ndan 18.12.2019 tarihinde ve 594 sayılı kararı ile etik kurul izni alınmıştır.

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

- > Buz yapma makinesi: ITV IQ P5C (ABD)
- > CO2 inkübatör: Heal Force HF90, Smart Cell (Japonya)
- > Çalkalamalı su banyosu cihazı: Biosan (Türkiye)
- > Derin dondurucu (-80°C): Wisd Persnal Digital (Güney Kore)
- > Distile ve ultradistile su cihazı: ELGA Purelab option DU25 (ABD)
- > Falkon tüpleri: ISOLAB, 15 ml ve 50 ml hacimlerde (Almanya)
- > Floresan spektrofloreometre: Cary Eclipse, Varian, (Avustralya)
- > Hassas terazi: Scaltec SPB 32 (İsviçre)
- > Hücre sayım cihazı: Casy TT, Roche, (Almanya)
- > İnverted mikroskop: Zeiss, Primo Vert, (Almanya)
- > Jel görüntüleme cihazı: Syngene G-Box, (İngiltere)
- > Konfokal mikroskop: Zeiss LSM-800 (Almanya)
- > Kültür flaskları: Cell Star, Greiner Bio-One (Almanya)
- > Laminar Flow Kabini: Jouan B4I (Fransa)

- > Manyetik karıştırıcı: Nüve (Türkiye)
- > Orbital Shaker: Biosan PSU-10İ (Türkiye)
- > pH metre: Hanna Instruments (Portekiz)
- > Plate Reader, Infinite M200 Pro, Tecan, (Avusturya)
- > Soğutmalı santrfüj: Kubota (Japonya)
- > Spektrofotometre, UV 1800, Shimadzu (Japonya)
- > Şarjlı pipet uçları: LP Italiana 5 ml, 10 ml hacimlerde (İtalya)
- > Şarjlı pipet: Witeg (Almanya)
- > Vorteks: Nüve NM 100 (Türkiye)
- > Western Blot Yürütme Tankı: Biorad (ABD)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- > 2-Aminoethyl diphenylborinate (2-APB)
- > 5,5'-dithio-bis 2-nitrobenzoic acid (DTNB), Sigma Aldrich (ABD)
- > 5',6,6'tetrachloro1,1',3,3'tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide, Sigma Aldrich (ABD)
- > N-(p-amylcinnamoyl) anthranilic acid (ACA), Sigma Aldrich (ABD)
- > APOPercentage Apoptosis Kit, Biocolor (İngiltere)
- > Bovine insülin (Sigma)
- > Cleaved caspase 3 Antibody, Proteintech (ABD)
- > Cleaved caspase 9 Antibody, Proteintech (ABD)
- > Cumene hydroperoxide, Sigma Aldrich (ABD)

- > Deoksiribonükleaz I (DNaseI), Roche (Basel, İsviçre)
- > Dihydrorhodamine 123 (DHR 123), Sigma Aldrich (ABD)
- > Dimethyl sulphoxide (DMSO), Hybri-Max, Sigma Aldrich (ABD)
- > Donor Horse serum (DHS), Biowest S0900 (ABD)
- > Dulbecco's modified eagle low glucose medium (DMEM), Sigma Aldrich (ABD)
- > Dulbecco's phosphate buffer saline (10X), Biochrom (ABD)
- > Ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), Sigma Aldrich (ABD)
- > Fetal Bovine Serum (FBS), Life Technologies (ABD)
- > Fluo-3-AM (Calbiochem, Almanya)
- > FluoZin-3-AM, Invitrogen (Türkiye)
- > Fura-2-AM, Invitrogen (ABD)
- > HEPES, Sigma Aldrich (ABD)
- > Hidrojen peroksit, (%37) Sigma Aldrich (ABD)
- > 5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide, Life Technologies (ABD)
- > Kalsiyum klorür, Sigma Aldrich (ABD)
- > Kaspaz-3 substrat (AC-DEVD-AMC), Bachem, (İsviçre)
- > Kaspaz-9 (AC-LEHD-AMC) substrat, Bachem, (İsviçre)
- > L-glutamic asit Sigma Aldrich (ABD)
- > MitoTracker Red CM-H2ros boyası firmanın Thermo Fischer (ABD)
- > PARP-1 antibody, Proteintech (ABD)
- > Potasyum klorür Sigma Aldrich (ABD)

- > Sodyum hidroksit (NaOH), Riedel-de H  n (Almanya)
- > ThiolTracker Violet Glutathione Detection Reagent (Invitrogen, T  rkiye)
- > Tripsin-EDTA sol  syonu (%2,5), Sigma Aldrich (ABD)
- > Beta aktin Polyclonal Antibody, Abcam (  ngiltere)
- > Bax Polyclonal Antibody, Proteintech (ABD)
- > Bcl2 Polyclonal Antibody, Proteintech (ABD)
- > Anti TRPM2 Antibody, Abcam (  ngiltere)
- > Western HRP Substrate, Millipore (ABD)
- > Neurobasal-A (NBA) Thermo Fischer (ABD)

3.2. Yöntem

3.2.1. Deney Hayvanları

Çalışmamızda C57BL/6J neonatal (1-3 günlük yeni doğan) ırkı siyah fareler kullanıldı. Tezden çıkan makalede Japonya (Prof. Dr. Makoto Tominaga, NIPS, Okazaki)'dan getirelen TRPM2 knockout C57BL/6J siyah fare yavrulardan edilen sonuçlar da kullanıldı. Bu fare ırkı SDÜ Deney Hayvanları ve Tıp Araştırmaları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde mevcut bulunmadığından Isparta çevresine en yakın olan MAKÜ Hayvan Deneyleri HADYEK Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir. Bu nedenlerden, çalışma etik kurul onayı MAKÜ Hayvan Deneyleri Etik Kurul Başkanlığı aracılığıyla "18.12.2019 tarihli ve 594 sayılı" karar ile onaylanmıştır.

3.2.2. Hipokampus İzolasyonu

Bu çalışmaya başlamadan önce literatür taramasında hipokampal nöron hücreleri hakkında zorluklar ve eleştiriler göz önüne alınarak en uygun yöntem seçildi ve değişiklikler yapılarak tercih edildi (149, 150). Daha sonraki araştırmacıların faydalana bileceği bir şekilde fotoğraflanarak açıklandı.

Çalışma esnasında kullanılan büyütme medyumunda bulunan ek takviyeler Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) hücre kültürü sıvısı içerisine %10 FBS (inaktif), %5'lik (%20'lik) glikoz solüsyonu, %1'lik antibiyotik (penisilin/streptomisin), insülin konsantrasyonu %0,2 olacak biçimde hazırlandı ve Neurobasal-A, %1 glutamine, %1 antibiyotik (penisilin/streptomisin) , %2 B27 supplement içeren besi yeri hazırlandı.

Hipokampal nöron izolasyonu için ilk başta steril tekniğe uygun bir biçimde tüm alet ve ortam sterilizasyonu sağlandı. Steril edilmiş aletler ve kimyasallar laminar flow içerisinde alınıp diseksiyon işlemi bitene kadar aletler laminar flow içerisinde kullanıldı ve aletlerin sterilizasyonu açık alev kullanılarak devam edildi (Resim 3.1).



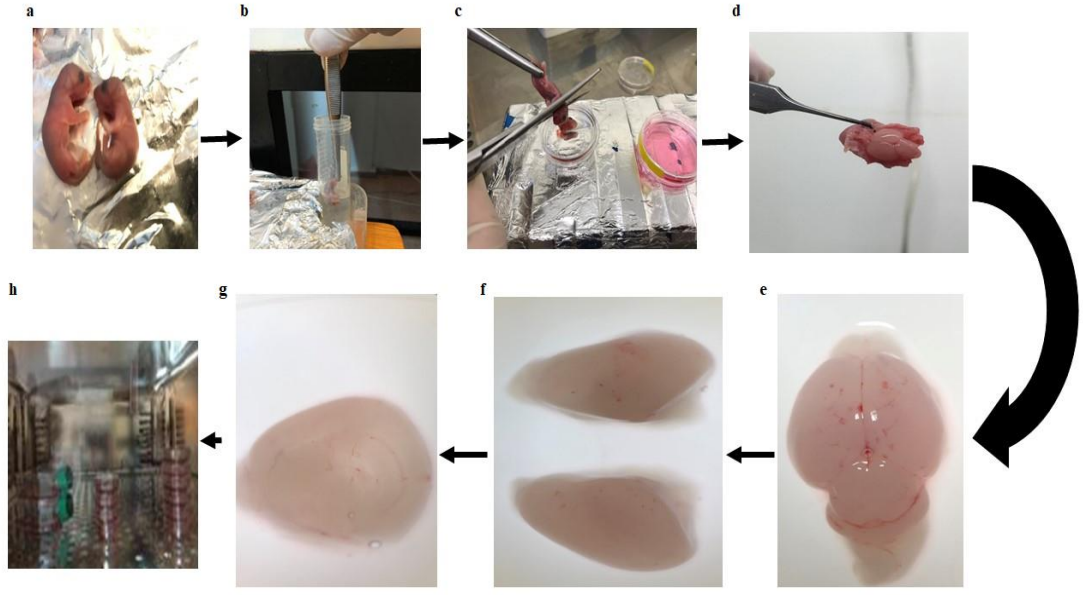
Resim 3.1. Hipokampus izolasyonu için kullanılan streil malzemeler ve laminar flow

Sterilizasyonun ardından çalışmanın ilk aşaması olan buz makinasında daha önce ayarlanmış buzlar hazneli bir kaba alınarak üzerine steril alüminyum folyo jelatini örtüldü. Çalışmaya başlamadan önce laboratuvar ortamından getirilen neonatal hayvanlar diseksiyon işlemi için anestezi etkisi sağlamak üzere steril kaplı buz kabının üzerine bırakıldı ve anestezi etkisi oluşuncaya kadar bekletildi. Anestezi işleminden sonra neonatal fareler 50 ml falkon içerisinde bulunan %70'lik etil alkol içerisine sterilizasyon amaçlı batırılıp çıkarıldıktan sonra laminar flow içerisine alındı. Pens ve makas yardımıyla fareler dekapite edildi. Dekapite edilen hayvanların kafaları %70 lik 10 ml etanol kaba koyularak yıkama işlemi gerçekleştirildi. Ardından yıkanan kafalar 1xPBS içeren 4 kaptan (kaplar buz kütlesi üzerinde) birine alındı ve hipokampus dokusunu çıkarılma aşamasında diğer temiz petri kabına aktarıldı. Alınan beyin dokusu iki hemisfere ayrılarak hipokampusun daha net bir şekilde görüntülenip çıkarılması için ayrılan hemisferlerden meninksler alınarak hipokampusun ortaya çıkması sağlandı ve pens yardımı ile çıkarıldı. Çıkarılan hipokampuslar önceden ayarlanmış medyum ile doldurulmuş petri kabına alındı. Tüm yavrular için yukarıda bahsedilen aşamalar tekrar edildi. Bundan sonraki

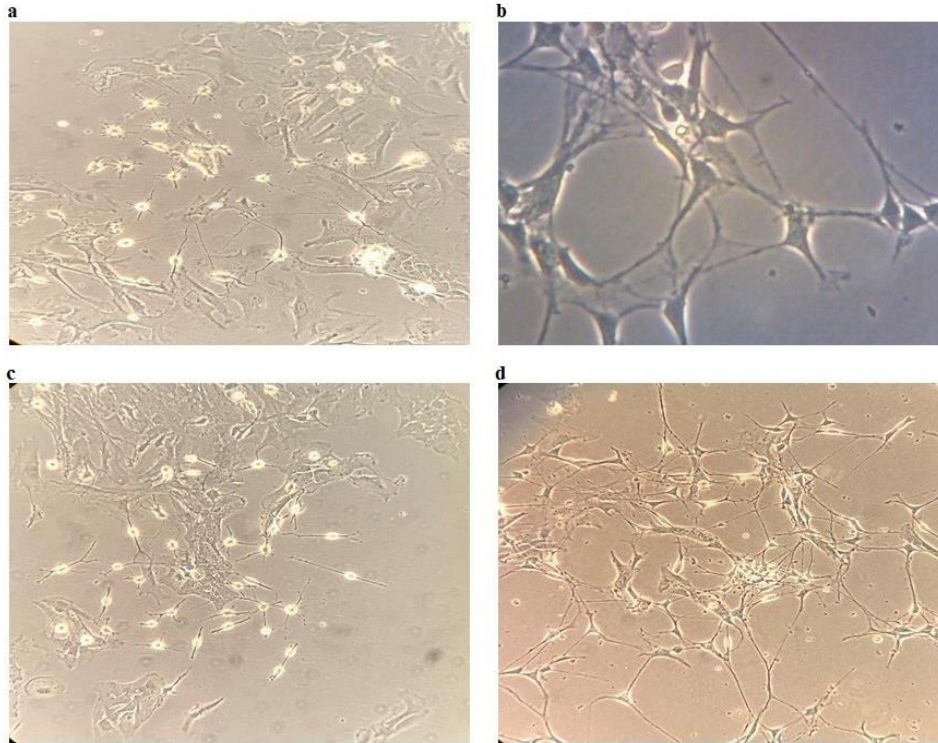
adımında sterilizasyona dikkat edilerek hızlı bir şekilde çalışmaya devam edildi. Tüm çıkarılan hipokampusler 15 ml falkon tüplerine aktarıldı.

Çıkarılan hipokampus dokuları mekanik parçalamak üzere cam pastor pipet ile pipetaj yapıldı. Doku tamamen kremi yapı alıncaya kadar mekanik parçalamaya devam edildi, kremi yapıya gelen doku üzerine son konsantrasyon %1 olacak şekilde üzerine %2,5'lik tripsin EDTA eklendi. Daha sonra önce 37 °C'ye ayarlanmış çalkalamalı su banyosunda 8 dakika bekletildi. Süre sonunda 15 ml falkon tüpüne son konsantrasyon 1 mg/ml olacak şekilde Deoksiribonükleaz I (DNaseI) eklendi ve hemen ardından falkon tüpünün son hacmi 10 ml olacak şekilde üzerine Donor Horse Serum (DHS) ilave edildikten sonra hızlı bir şekilde santrifüj (100 g, 5 dakika) edildi. Santrifüjün ardından süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve üzerine taze medyumdan 10 ml eklenip cam pastor pipet ile pipetaj edildi ve kontaminasyon olasılığını azaltmak üzere gözenek çapı 100 µm'lik filtreden steril 50 ml'lik falkon tüpüne filtre edildi (Resim 3.2).

Son aşamada ekim yapılacak flasklar (75 cm², 250 ml'lik) üzerine hücrenin adı ve ekildiği tarih yazıldı. Filtre edilen hücreler hassas bir şekilde falkondan alınarak (6-8 fare hipokampusu için bir 75 cm²'lik flask olacak biçimde) flaska ekildi. Ekim yapıldıktan sonra 10-15 günlük süre ile inkübatör (37 °C ve %5 CO₂) içerisinde hücre kültürüne bırakıldı. İnkübatörde kalma süre zarfında hücrelerin besi yerleri gün aşırı olarak ihtiyaca göre değiştirildi.



Resim 3.2. Neonatal farelerden hipokampusun alınması ve in vitro koşullarına hazırlanması (**a**; buz üzerinde anestezi uygulaması, **b**; %70 etil alkol içerisinde alınması, **c**; neonatal farelerin dekapite edilmesi, **d**; fare kafalarından beynin çıkarılması, **e**; beyin, **f**; beynin iki hemisfere ayrılması **g**; hipokampus **h**; CO₂ inkübatörü)



Resim 3.3. Hipokampal nöron hücrelerinin mikroskopta görüntüleri (**a**; 2-4 günlük görüntüsü **b**; 8-10 günlük görüntüsü **c**; 4-8 günlük görüntüsü **d**; 12-14 günlük görüntüsü)

ÖZETLE

1-3 günlük neonatal fereler alındı



Buz üzerinde tutuldu



%70'lik etil alkole daldırılır ve farenin kafası kesildi



Kafa derisi ve kafatası alınarak beyin parçalanmadan çıkarıldı



Çıkarılan beyinler medyuma alındı



Mikroskop altında beyin iki hemisfere ayrıldı



Hemisfer meninksi kaldırılır ve pens yardımı ile hipokampus çıkarıldı



Hipokampusler falkona aktarıldı



Cam pipetle tüm hipokampusler pipetaj yapıldı



Üzerine %2,5 tripsin EDTA eklendi



37 °C su banyosunda 8 dakika bekletildi



Üzerine DNaseI ve DHS ilave edildi



100 g 5 dakika santrifüj edildi



Süpernatant kısmı uzaklaştırılıp üzerine taze medyum eklendi



Hücreler 75 cm²'lik flaska ekildi

Hipokampal nöron izolasyonu için önerilen süre zarfı (10-15 gün) boyunca invert mikroskopta flasklar incelendi. Hücreler 10-15 günlük süre sonunda uygun hale gelmiş ve çalışmaya hazır olduğu görüldükten sonra yapılacak çalışmalar doğrultusunda werstern blot, kuyucuk okuyucu ve Ca^{+2} analizleri için 75 cm² flasklar içerisinde inkübasyon yapıldı ve hücreler hücre kaldırma prosedürüne göre hassas bir şekilde kaldırıldı ve sonrasında çalışmalar yapıldı. Fakat konfokal mikroskop analizleri için 75 cm² flaslarda bulunan hipokampal nöronlar hücre kaldırma prosedürüne uygun hassas bir şekilde kaldırıldı. Kaldırılan hücreler 15 ml falkon tüpüne alınarak 100 g 5 dakika boyunca santrüfj edildi. Ardından süpernatant kısmı uzaklaştırılarak taze medyum ilave edildikten sonra pipetaj yapıldı. Daha sonra ortası cam steril petri kaplarına ekimi yapıldı ve inkübatöre bırakıldı.

3.2.3. Çalışma Grupları

Çalışmamızda hipokampal nöron hücreleri beş ana gruba bölündü;

1. Kontrol grubu: Bu gruptaki hipokampal nöron hücreleri hiçbir tedavi almadı. Fakat 24 saat süre ile hücre kültürü ortamında (37 °C, %5 CO² ve %95 hava) inkübatörde bekletildi.

2. ACA grubu: Bu gruptaki hipokampal nöron hücrelerine 25 µM ACA inkübasyon sonrası bir saat hücre kültürü ortamında inkübatörde bekletildi (31, 151).

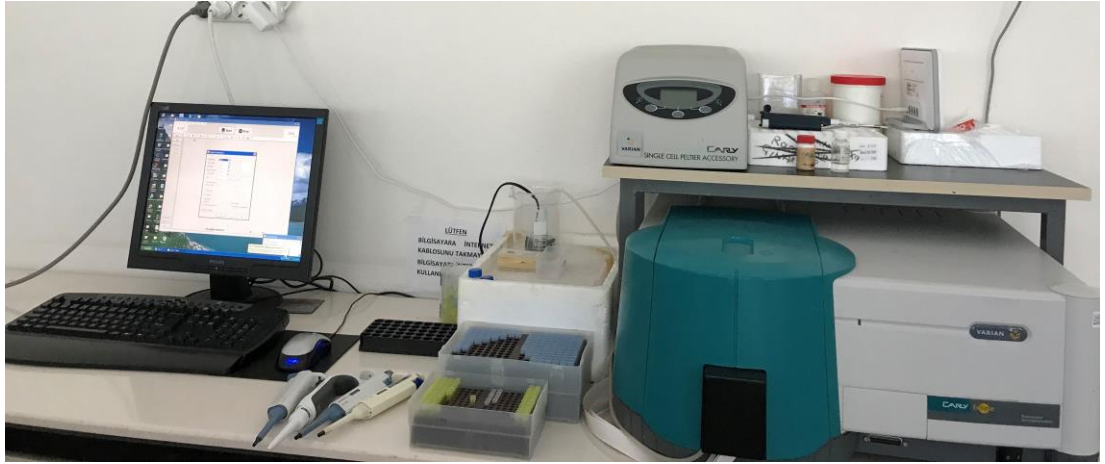
3. Aβ grubu: Bu gruptaki hipokampal nöron hücrelerine 24 saat süre ile 20 µM Aβ 1-42 inkübasyonu yapıldı (152).

4. Aβ+ACA grubu: Bu gruptaki hipokampal nöron hücrelerine 24 saat süre ile 20 µM Aβ 1-42 ile inkübasyon yapıldı. Daha sonra 1 saat süre ile ACA (25 µM) inkübasyonu yapıldı (31, 152).

5. Aβ+GSH grubu: Bu gruptaki hipokampal nöron hücrelerine 24 saat süre ile 20 µM Aβ 1-42 inkübasyon yapıldı. Daha sonra 2 saat süre ile 10 mM GSH ile inkübasyonu yapıldı (152, 153).

3.2.4. İntrasellüler Ca^{+2} Analizi

Primer kültüre alınan hipokampal nöronların her grubunu inkübasyonlar tamamlandıktan sonra rutin kaldırma işlemi yapıldı ve hücreler santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Ardından taze medyum içerisine alınarak 4 μM Fura-2-asetoksimetil ester (Fura-2-AM) (Life Technologies, ABD) ile 37 °C’de 45 dk su banyosunda inkübasyona bırakılarak hücreler boyandı. Boyama işlemi bittikten sonra hipokampal nöronlar 3500 RPM’de 5 dk süre ile santrifüj edildi. Süpernatantları uzaklaştırılarak Ca^{+2} içeren tampon solüsyonuna [Na^{+} -HEPES [(mM cinsinden); NaCl, 140; KCl, 4,7; CaCl_2 , 1,2; MgCl_2 , 1,1; Glukoz, 10 ve HEPES, 10 (pH 7,4)] alınan hipokampal nöronlar manyetik karıştırıcı mıknatıs içeren floresan spektrofotometre (Varian Cary Eclipse, Sydney, Avustralya) kuvvetlerinde hücre konsantrasyonu $2 \times 10^6/\text{ml}$ olacak şekilde kuvet haznesine yerleştirildi. Fura-2-AM boyası için eksitasyon 340 ile 380 nm iken emisyon dalga boyu 505 nm olarak ayarlandı. TRPM2 kanalının stimülasyonu için Cumene hydroperoxide (CpX) (1 mM) kullanıldı ve kayıt süresince bu uyarım kayıt altına alındı. Alınan kayıtlarda intrasellüler Ca^{+2} düzeyini hesaplamak için Grynkiewicz ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş metottan faydalanıldı. (154).



Resim 3.4. Kalsiyum sinyali analizinde kullanılan floresans spektrofotometre cihazı

3.2.5. Apoptozis Analizi

1 ml 1X PBS ile dilüe edilmiş izole hipokampal nöronlardan apoptozis analizi için 150 µl alındı. Sonra alınan hipokampal nöron süspansiyonu 3 farklı eppendorfa 50'şer µl olacak bölündü ve son hacim 1 ml olacak şekilde üzerine 1X PBS koyularak güzel bir şekilde karışması için pipetaj yapıldı. Karışımın üzerine 5 µl apoptozis boyasından (APOPercentage, Biocolor, İngiltere) eklendi ve 37 °C'de 30 dk boyunca çalkalama cihazında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon bittikten sonra 4000 RPM'de 5 dk santrifüj edildi ve sonra süpernatant kısmı atıldı. Daha sonra fazla kalmış boyayı uzaklaştırmak için 1X PBS ile yıkama yaptıktan sonra üzerine 200 µl APOpercentage Dye Release eklendi. Pipetaj ve santrifüj işlemi tekrar yapıldıktan sonra süpernatant kısmı alındı ve numuneler kuyucuklara aktarılıp Plate Reader cihazında 550 nm dalga boyunda okundu. Elde etmiş olduğumuz değerler örnek/kontrol şeklinde hesaplandı ve sonuçlar daha önceki bir çalışmada belirtildiği gibi kontrole kıyasla misli artış olarak verildi (155).

3.2.6. Hücre Canlılığı (MTT) Testi

1X PBS ile dilüe edilmiş hipokampal nöronlardan 150 µl alınarak üç farklı eppendorfa 50 µl olacak şekilde bölündü ve sonra son hacmi 1000 µl olacak şekilde üzerine 1X PBS aktarıldı. Sonra ayrılan üç eppendorfun her birine 13-15 µl MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) boyası eklendi. MTT boyası eklendikten sonra eppendorfların hepsi 10-12 defa yavaş bir şekilde çalkalanıp, 37°C de 1,5 saat süreyle su banyosunda yavaş bir biçimde çalkalamaya bırakıldı. Süre bittikten sonra eppendorflar 4000 RPM de 5 dk süreyle santrifüj edildi. Santrifüj bittikten sonra süpernatant kısmı atıldı. Üç eppendorfun üzerine 450'şer µl DMSO ilave edildi ve pelet kısmı DMSO ile güzel bir biçimde pipetaj yapıldı. Daha sonra numunelerden 150 µl kuyucuklara ilave edildikten sonra Plate Reader cihazında 490 nm ve 650 nm dalga boylarında okundu ve iki dalga boyundan elde ettiğimiz değerler birbirinden çıkarılarak MTT analiz sonuçları elde edildi. (Abs 490 nm – Abs 650 nm: x) (155).

3.2.7. Kaspaz-3 ve -9 Aktivitesi Analizleri

Substrat tamponunu hazırlamak için kaspaz-3 ve -9 ham solüsyonlarından 2,5 ml alınıp 15 ml'lik falkonlara ilave edildi. 100 mM HEPES, pH 7.25, %10 sakaroz, %0.1 CHAPS, 5 mM DTT, %0.001 NP-40'tan oluşan standart bir reaksiyon tamponunda uygun peptit substratı hazırlandı. 40 µM kaspaz-3 substratı (AC-DEVD-AMC) veya 0,1 µM kaspaz-9 substratı (AC-LEHD-AMC) eklendi. Her falkonun üzerine 2,5 µl NP-40 kimyasalı eklenerek vortekslendi ve sonradan üzerine floresan dithiothreitol boyasından 12,5 µl ilave dilip tekrardan vorteks ile karıştırıldı. 1 ml 1X PBS içinde dilüe edilmiş hücrelerden kaspaz-3 ve -9 analizleri için 150 µl ayrıldı. Alınan 150 µl hücre süspansiyonu 10 kuyucuğa eşit olacak şekilde ayrıldı ve üzerine daha önce hazırladığımız kaspaz-3 ve -9 tamponundan kuyucuklara 50 µl ilave edildi ve ortaya çıkan enzim aktivitesini Plate Reader cihazında eksitasyon ve emisyon sırasıyla 360 nm ve 460 nm dalga boylarında okunarak kaspaz-3 ve -9 enzim aktiviteleri analiz edildi. Elde ettiğimiz verileri kontrole oranlanarak grafiklendirildi (155).

3.2.8. İntrasellüler ROT Üretim Tayini

1X PBS ile sulandırılmış hipokampal nöronlardan 150 µl alınarak 3 farklı ependorfa 50'şer µl olacak biçimde bölündü ve ROT üretim tayini analizi yapmak üzere son hacim 1000 µl olacak şekilde ependorfların üzerine 1X PBS koyuldu. Ardından homojen bir karışım elde etmek için 10-12 defa pipetaj yapıldı. Homojen karışım sağlandıktan sonra ROT analizi için 1 µl Dihydrorhodamine 123 (DHR-123, Sigma Aldrich, ABD) boyasından ilave edildi ve boyanın homojen karışması için tekrar 10-12 defa pipetaj yapıldı. Bu işlemlerin ardından ependorflar 30 dk boyunca 37 °C'lik karıştırıcı su banyosu içinde inkübe edildi. 30 dk bittikten sonra 4000 RPM'de 5 dakika süre ile santrifüj yapıldı. Ardından süpernatant kısmı alınıp atılarak ependorfların üzerine 300 µl 1X PBS ilave edildi ve homojen karışımı sağlamak üzere pipetaj yapıldı. Plate kuyucukları 100 µl numune olacak şekilde bölündü. Sonra Plate Reader cihazında eksitasyon (488 nm) ve emisyon (530 nm ve 590 nm)

dalga boyları ayarlanıp okundu ve elde edilen veriler arasındaki fark değer olarak belirlendi (156).

3.2.9. Mitokondriyal Membran Depolarizasyon Analizi

1X PBS ile dilüe edilmiş hipokampal nöronlardan 150 µl alınarak 3 farklı ependorfa 50'şer µl olacak biçimde bölündü ve mitokondriyal membran depolarizasyon analizi yapmak üzere son hacim 1000 µl olacak şekilde ependorfların üzerine 1X PBS koyuldu. Ardından homojen bir karışım elde etmek için 10-12 defa pipetaj yapıldı. Ependorflara 1 µl 5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1, Life Technologies, ABD) boyasından ilave edildi ve boyanın homojen karışması için tekrar 10-12 defa pipetaj yapıldı. Bu işlemlerin ardından ependorflar 30 dk boyunca 37 °C'lik karıştırıcı su banyosu içinde inkübe edildi. 30 dk bittikten sonra 4000 RPM'de 5 dakika süre ile santrifüj yapıldı. Ardından süpernatant kısmı alınıp atılarak ependorfların üzerine 300 µl 1X PBS ilave edildi ve homojen karışımı sağlamak üzere pipetaj yapıldı. Plate kuyucukları 100 µl numune olacak şekilde bölündü. Eksitasyon 488 nm; JC-1 kümeleşmesini okumak için emisyon dalga boyu 590 nm ve JC-1 monomerleri okumak için emisyon dalga 525 nm'dir. Bu dalga boyları Plate Reader cihazından ayarlanıp kuyucuklar okundu ve elde ettiğimiz veriler iki emisyon dalga boyu (590 nm/525 nm) oranıyla hesaplandı. Veriler kontrol grubuna oranlanarak grafiklendirildi (157).



Resim 3.5. Floresans analizler için kullanılan kuyucuk okuyucu (plate reader) cihazı

3.2.10. Western Blot Analizleri

Analizler standart protokol izlenerek yapıldı. Hücreler rutin kaldırma metodu kullanılarak kaldırıldı ve santrifüj edilerek süpernatant kısmı atıldı. Hücreler Radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA buffer) tamponu içerisinde parçalandı. 1300 RPM'de 18 dk süre ile santrifüj edildikten sonra süpernatat kısmı hipokampal nöronlardan uzaklaştırıldı. Bradford yöntemiyle total protein miktarı belirlendi. İmmünoblotlama yapmak için %6 ile %13 arasında değişkenlik gösteren konsantrasyonlarda Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel (SDS-Page) jel hazırlandı ve jellere aynı miktarda protein (her numuneden ~ 25 µg) yüklemesi yapıldı. Yürütme işlemin ardından jellerde bulunan proteinler nitroselüloz membrana transfer edildi. Tris Buffered Saline (TBS) içerisinde %1 Tween 20, %5 yağsız süt tozu (Pınar, Türkiye) veya %3-5 sığır serum albümin (BSA) eklenerek 1 saat 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Ardından nitroselüloz membran TBST bufferla 5'er dk 4 defa yıkanıp sonrasında membran primer antikor (Kaspaz - 9/p35/p10 Polyclonal Antibody; Anti TRPM2 Antibody; Beta aktin Polyclonal Antibody; Kaspaz -3/p17-specific Polyclonal Antibody; Bax Polyclonal Antibody; Bcl2 Polyclonal Antibody; PARP-1 Polyclonal Antibody) ile bir gece boyunca inkübasyon yapıldı. Daha sonra 4 defa 5'er dk yıkandıktan sonra membran sekonder antikor (Amersham ECL Rabbit IgG, HRP-linked whole Ab, İngiltere) ile inkübe edildi. Sonrasında Immobilon Forte Western HRP substrat membranının üzerine aktarılır. Bax, aktif (bölünmüş) kaspaz-3, Bcl2, beta aktin, PARP-1, aktif (bölünmüş) kaspaz-9 ve TRPM2 kanal proteinlerine ait ekspresyon çalışmalarında elde etmiş olduğumuz bantlar, hassas jel görüntüleme cihazı (Syngene G:Box, İngiltere) kullanılarak görüntülendi (158).



Resim 3.6. Western Blot analizinde kullanılan malzemeler



Resim 3.7. Jel görüntüleme cihazı

3.2.11. Hücre Canlılık Oranının (Hoechst/Propidyum İyodür) Lazer Konfokal Mikroskobu ile Görüntülenmesi

Canlı ve ölü hücreler lazer konfokal mikroskop altında floresan renkleri ile ayırt edilir. PI, ölü hücreleri ve hasarlı hücrelerin hücre zarından geçer ve nükleik asitlerle etkileşime girerek kırmızı renk yayar. Ancak Hoechst 33342 ise nükleik asitlere ulaşamadığından hipokampal nöron hücrelerinin sitozolunda mavi renk yayar. İzole edilmiş hipokampal nöronlar Konfokal mikroskobu (LSM 800, Zeiss, Almanya) için hücreler orta kısmı cam petrilere ekildi ve hücre canlılığı oranını görüntülemek için Hoescht/Propidyum İyodür (PI) boya ları kullanılarak görüntüleme sağlandı. Hipokampal nöronları ektiğimiz, ortası cam petri kaplarına inverted mikroskop altında bakıldıktan sonra hangi petrilere hücre oranı yoğunsa o petriler seçildi ve seçilen petriler üzerine PI boyasından 1 μ M ve Hoechst 33342 boyasından ise 2 μ M eklenerek 30 dk karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon bittikten sonra petrilereki medyum alınarak 1X PBS ile yıkandı ve görüntü almak için lazer konfokal mikroskobunun 20X'lik objektifi kullanılarak görüntüler elde edildi. Elde edilen sonuçlar kontrole kıyasla yüzde olarak verildi (159).

3.2.12. İnterasellüler GSH'nın Lazer Konfokal Mikroskobu ile Görüntülenmesi

İzole edilmiş hipokampal nöronlar Konfokal mikroskobu (LSM 800, Zeiss, Almanya) analizleri için orta kısmı cam petrilere ekildi ve petri içerisinde 72 saat inkübatör ortamında (37 °C ve %5 CO₂) bekletildi. Bu işlem tüm konfokal çalışması için aynı şekilde tekrarlandı. İnterasellüler GSH'nın gruplar arasında farklılığı göstermek için Thioltracker Violet Glutathione Detection Reagent (Invitrogen, Türkiye) kiti kullanıldı. Sitozol GSH analizlerinde eksitasyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla 404 nm ve 526 nm'de tutuldu. Lazer uyarımı 405 nm'de gerçekleştirildi. Görüntüler lazer mikroskop cihazı ile 40X floresan yağlı büyütme objektif yardımı ile alındı. Her grupta sitozolik GSH'nın floresan yoğunluğu ZEN 2.3 Blue edition (Zeiss) kullanılarak ölçüldü ve alınan kayıtlar da 15 μ m² alan baz

alınarak tüm hücre sitozolleri içindeki yoğunluk kaydedildi. ‘Arbitrary unit’ olarak sonuçlar verildi (160).

3.2.13. $[Ca^{+2}]_i$ Lazer Konfokal Mikroskop ile Görüntülenmesi

A β 1-42 ile hipokampal nöronlarda indüklenen TRPM2 katyon kanal aktivasyon yoluyla sitozolde artan Ca^{+2} miktarını belirleme işlemi daha önceden yapılmış çalışmalarda tarif edildiği gibi yapıldı (161,162). Her grupta kanal aktivasyonları konfokal mikroskopta analiz edilmek üzere daha önce hücreleri ektiğimiz ortası cam petri kabına analiz yapmadan önce hücreler 1 saat boyunca karanlık ortamda 1 μ M Fluo-3-AM (Calbiochem, Darmstadt, Germany) floresan boyasında inkübasyona bırakıldı (161). Hücreler Fluo-3-AM ile boyandıktan sonra lazer konfokal mikroskopta 488 nm dalga boyuna ayarlandı ve okumalar yapıldı. Çalışmamızdaki gruplar arasında TRPM2 kanalının ne kadar aktive ve inhibe olduğunu anlamak için TRPM2 kanal agonisti (1 mM H_2O_2) (163,164) ve antagonisti (2-APB) kullanıldı (165).

Hücrelerden lazer konfokal mikroskopta görüntü kaydı alınmadan önce TRPM2 katyon kanal blokörü olarak ACA (25 μ M) ve PARP-1 inhibitörü (1 μ M PJ34 ve 30 mM DPQ) kimyasallarla 30 dk inkübasyon yapıldı (160). Daha sonra TRPM2 aktivatörü olan H_2O_2 ile uyarımlar yapıldı ve gruplar arasında TRPM2 katyon kanal aktivasyonu incelendi. Lazer konfokal mikroskopta görüntüler 515 nm dalga boyunda ve 40X floresan yağlı büyütme objektifinde kayıtlar alındı. Fluo-3-AM boya yoğunluğu ZEN 2.3 Blue edition (Zeiss) programı ile aynı objektifte alınan kayıtlar 15 μ m² alan baz alınarak tüm hücre sitozolleri içindeki yoğunluk kaydedildi. ‘Arbitrary unit’ olarak sonuçlar verildi.

3.2.14. İntراسellüler ROT’un (DHR123) Lazer Konfokal Mikroskobu ile Görüntülenmesi

TRPM2 katyon kanal aracılığı ile $[Ca^{+2}]_i$ artması mitokondriyal membran depolarizasyonuna sebep olarak ROT üretiminin artmasını tetikler. Bu artışın

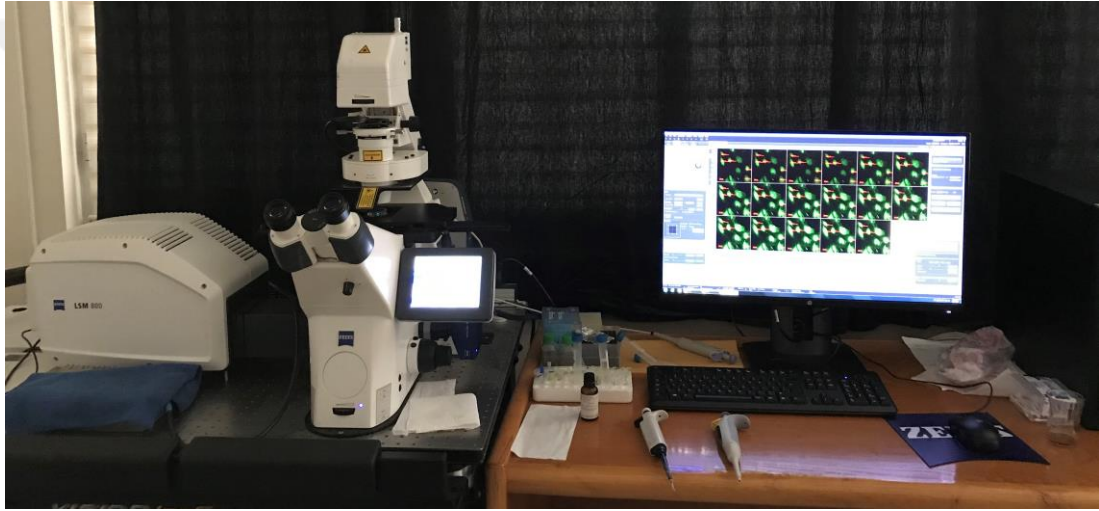
görüntülenmesi için lazer konfokal mikroskop için hücreler ortası cam petrilere ekildi ve petrilere 72 saat besi yeri içinde (37 °C, %5'lik CO₂) inkübatörde bekletildi. Analiz için her gruptaki petrilere 1 ml taze medyum içerisine 1 µM DHR-123 boyası ilave edilerek karanlık ortamda 30 dk boyunca inkübasyonu gerçekleştirildi (166). Sonra petrilere 1X PBS ile yıkandı ve lazer konfokal mikroskopunda sisteme kayıtlı DHR-123 boyası seçilerek görüntüleme yapıldı. ZEN 2.3 Blue edition (Zeiss) programı ile DHR-123 boyasının yoğunluğu aynı objektifte (40X floresan yağlı büyütme) alınan kayıtlar da 15 µm² alan baz alınarak tüm hücre sitozolleri içindeki yoğunluk kaydedildi. 'Arbitrary unit' olarak sonuçlar verildi (160).

3.2.15. Mitokondriyal ROT'un Lazer Konfokal Mikroskobu ile Görüntülenmesi

TRPM2 aracılığı ile [Ca²⁺]_i artması mitokondriyal membran depolarizasyonuna sebep olarak ROT üretiminin artmasını tetikler ve mitokondriyal ROT analizi yapmak üzere lazer konfokal mikroskop için hücreler ortası cam petrilere ekildi ve petrilere 72 saat besi yeri içinde (37 °C, %5'lik CO₂) inkübatörde bekletildi. Analiz için her gruptaki petrilere 1 ml medyum içerisine 200 nM MitoTracker Red CM-H2XROS ilave edilerek karanlık ortamda 30 dk boyunca inkübasyonu gerçekleştirildi (167). Sonra petrilere 1X PBS ile yıkandı ve sonrasında lazer konfokal mikroskobu kullanılarak MitoTracker Red CM-H2XROS (Thermo Fisher: katalog No: M7513) firmanın önerdiği protokol izlenerek görüntüleme yapıldı. Alınan kayıtlarda hücrelerde kırmızılık azalırsa mitokondri fonksiyonlarının bozulduğu ve mitokondriyal ROT üretiminin arttığı gösterilmektedir. ZEN 2.3 Blue edition (Zeiss) programı ile MitoTracker Red CM-H2XROS yoğunluğu aynı objektifte (40X floresan yağlı büyütme) kayıtlar alındı. Bu kayıtlar 15 µm² alan baz alındı ve sitozoll içindeki yoğunluk kaydedildi. 'Arbitrary unit' olarak sonuçlar verildi.

3.2.16. İnterselüler Zn^{+2} Lazer Konfokal Mikroskobu ile Görüntülenmesi

İzole edilmiş hipokampal nöronlarda Zn^{+2} lazer konfokal mikroskobu ile görüntülemek için hücreler orta kısmı cam petrilere ekildi ve petriler 72 saat taze besi yeri içinde (37 °C-%5'lik CO_2) inkübatörde bekletildi. Bu işlem tüm konfokal çalışması için aynı şekilde tekrarlandı. Gruplar arasındaki intrasellüler Zn^{+2} görüntülemek için FlouZin kit (RhodZin3-AM, Invitrogen, Türkiye) kullanılarak analiz edildi. Elde ettiğimiz veriler aynı objektifte (40X floresan yağlı büyütme) alınan kayıtlar da $15 \mu m^2$ alan baz alınarak sitozoll içindeki yoğunluk kaydedildi. 'Arbitrary unit' olarak sonuçlar verildi (160).



Resim 3.8. Lazer konfokal mikroskop cihazı, LSM800.

3.2.17. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) ve rGSH Analizleri

Hipokampal nöronlarda rGSH analizi literatürün belirttiği protokole göre spektrofotometrik olarak yapıldı (168, 169). rGSH analizi için %10 triklorikasetik asit (TCA) solüsyonu olan tris tamponu (0.4 M pH:8.9); 48.46 gram tris-hydroxymethyl-aminomethan'ın ve hidroklorik asit (HCl) 1 litre içerisinde çözülür ve pH 8.9 olacak şekilde hazırlandı. 0.4 ml TCA solüsyonu ile 0.1 ml örnek karıştırıldı. 20 sn boyunca vortekslendi ve 3500 RPM de 5 dk süreyle santrifüj edildi. Süpernatant kısmından 0.1 ml alınıp bir tüp içine aktarıldı ve üzerine 2 ml tris tamponu, 0.9 ml distile su ve 0.1 ml 5,5-ditiyo-bis [2-nitrobenzoik asit] sulfidril

grupları eklendi. Bu ekleme ile birlikte reaksiyon oluştu ve reaksiyon sonucunda sarı renkli bir kompleks meydana geldi. Meydana gelen renk değişimi 412 nm’de spektrofotometrik olarak okundu. GSH-Px enzim aktivite düzeyi Lawrence ve ark’ın belirttiği protokolde göre spektrofotometrik olarak yapıldı (168, 170). Aldığımız absorbans değerler hesaplanarak sonuçlar IU/g protein olarak tanımlandı. GSH-Px, CpX GSH oksidasyona uğrattı ve renk ajanı olarak bilinen 5,5- ditiyobis (2-nitrobenzoik asit; DTNB) solüsyonu hem kr ve hem de numunelerle muamele edildi ve sarı renkte bir kompleks oluştu ve bu oluşan renk spektrofotometrede 412 nm’de okundu. Örneklerdeki toplam protein konsantrasyonları Lowry yöntemi kullanılarak analiz edildi.



Resim 3.9. GSH, GSH-Px, ve MDA analizlerin yapıldığı spektrofotometre cihazı, Shimadzu, UV-1800, (Japonya).

3.2.18. Lipit Peroksidasyon (MDA) Analizi

Placer ve arkadaşlarının bildirdiği protokole göre hipokampal nöronların lipit peroksidasyon seviyeleri tiyobarbitürik asit (TBARS) reaksiyonu ile birlikte dikkatli bir şekilde spektrofotometre cihazında (Shimadzu, UV-1800, Japonya) yapıldı

(171). Prensibi; tüm hücre grupları 1/9 (2,25 ml) oranında olacak biçimde TBARS solüsyonu ile sulandırıldı. 2.25 ml fosfat tamponu ile 1/9 oranında TBARS solüsyonun karışımı kör olarak kullanıldı. Numuneler ve kör, 100 °C'lik kaynar su banyosunda 20 dk boyunca bekletildi ve 20 dk'nın ardından numuneler çeşme suyu altında soğutulduktan sonra 2500 RPM'de 5 dk boyunca santrifüj edildi. Pembemsi bir süpernatant kısmı oluştu. Süpernatant kısmından hassas bir şekilde, ışığın geçişine sahip 1 cm'lik küvete aktarılıp 532 nm dalga boyundaki spektrofotometrede köre karşı okundu. Standart olarak ise 1, 1, 3, 3 tetraethoxy propane solüsyonu aynı oranlarda kullanıldı. Elde etmiş olduğumuz değerler ise nmol/gr protein olarak belirlendi.

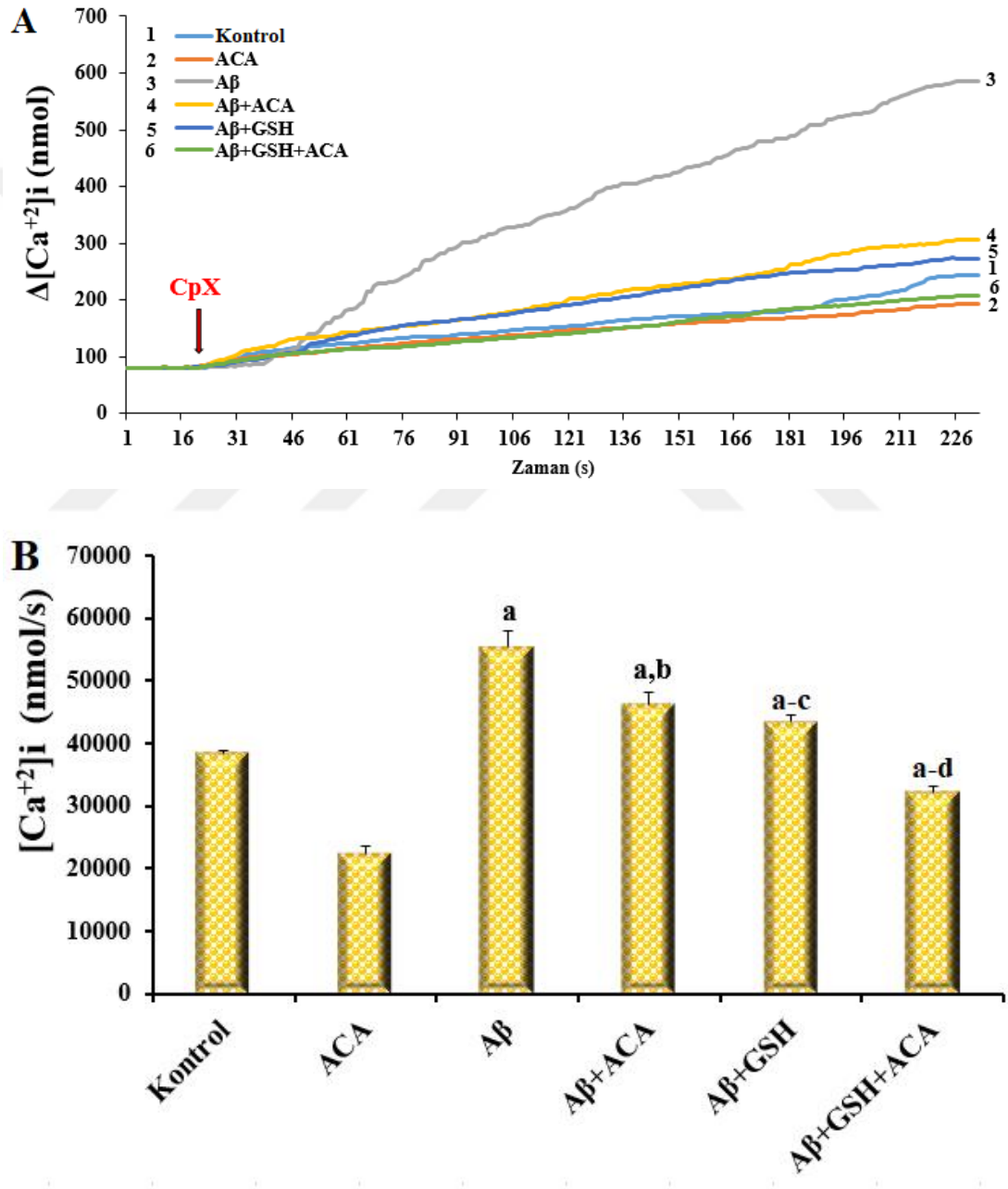
3.3. İstatistiksel Analiz

Bütün veriler ortalama $\pm$ standart sapma [mean $\pm$ standard deviation (STD)] olarak verildi. Hipokampal nöron hücrelerinde çalışılan bilimsel değerlerin aritmetik ortalama değerleri arasındaki farklılıklar, SPSS, Windows 17.0 lisanslı paket bilgisayar programı kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Gruplarda istatistiksel önem varlığı Mann-Whitney *U* testi ve ANOVA ile değerlendirildi. Tüm istatistiki karşılaştırmalarda anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. İntrasellüler Ca^{+2} Düzeyi Analiz Sonuçları

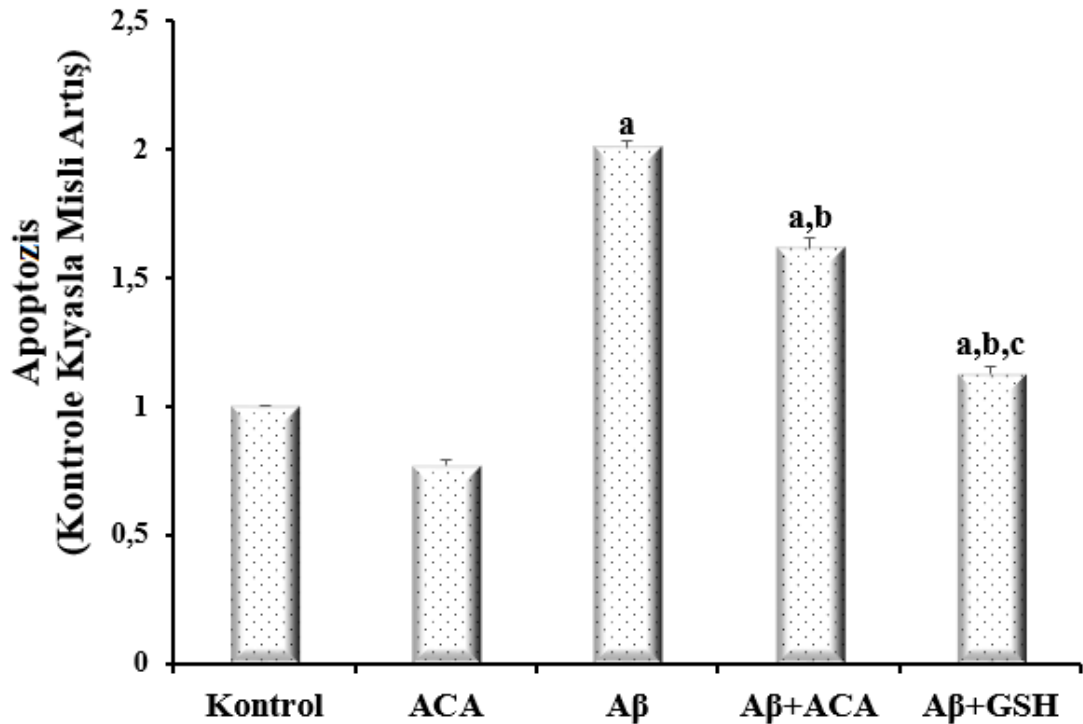
$\text{A}\beta$ ile oluşturulan *in vitro* Alzheimer hastalığı modelinde ACA ve GSH tedavisi sonrasında, hipokampal nöronlarda TRPM2 katyon kanal aktivasyon aracılığı ile intrasellüler Ca^{+2} değişimi, Şekil 4.1’de (A) çizgi (zamana bağlı) ve (B) sütun grafiği olarak gösterildi.



Şekil 4.1. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde, ACA ve GSH tedavisinin [Ca²⁺]_i değişimi üzerindeki etkilerinin çizgi (A) ve sütun (B) grafiği olarak gösterimi. (Ortalama $\pm$ STD ve n=6). (^ap<0,05 ve kontrol ile ACA gruplarına kıyasla. ^bp<0,05 ve A β grubuna kıyasla. ^cp<0,05 ve A β +ACA grubuna kıyasla. ^dp<0,05 ve A β +GSH grubuna kıyasla). (CpX 1mM ve ACA 25 μ M)

4.2. Apoptozis ve Hücre Canlılığı (MTT) Sonuçları

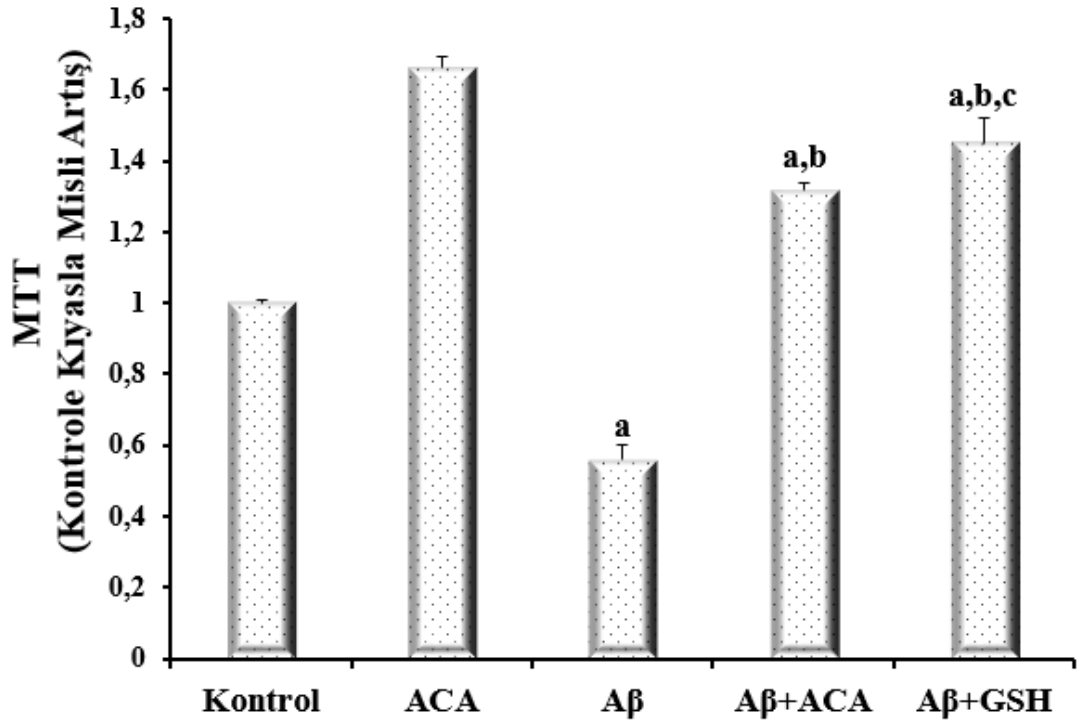
Apoptozis, programlı hücre ölümü olarak tanımlanır ve 3 yolağın (1- intrinsik yol, 2- ekstrinsik yol, 3- Ca²⁺'a bağımlı yol) varlığı literatürde değinilmiştir (172). A β ile indüklenen hipokampal nöronlarda [Ca²⁺]_i üzerine TRPM2 katyon kanal aktivasyonu değerlendirildikten sonra, [Ca²⁺]_i artışına oranla gruplar arasında apoptozis düzeyleri incelendi ve elde edilen sonuçlar kontrol grubuna kıyasla verildi. Apoptozis düzeyleri APOPercentage apoptozis kiti ile incelendi. Hücre canlılık düzeyleri ise her grupta, hücre canlılığı MTT testi ile analiz edildi ve sonuçlar kontrol grubuna kıyasla değerlendirildi.



Şekil 4.2. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde apoptozis düzeyleri üzerinde, ACA ve GSH tedavisinin etkileri. (Ortalama $\pm$ STD ve n=6). (^ap<0,05 ve kontrol ile

ACA gruplarına kıyasla. ^bp<0,05 ve A β grubuna kıyasla. ^cp<0,05 ve A β +ACA grubuna kıyasla).

Tüm grupların apoptozis düzeyleri (Şekil 4.2), kontrol grubuna kıyasla misli artış şeklinde verilmiştir. Protein düzeyleri Bradford yöntemine göre spektrofotometre cihazı (Shimadzu, UV-1800) ile yapıldı. Kontrol ve ACA gruplarına kıyasla A β ile oluşturulan Alzheimer hastalık grubunda apoptozis değerinin önemli seviyede arttığı gözlemlendi (p<0,05). Buna ilaveten A β grubuna kıyasla A β +ACA ve A β +GSH gruplarında apoptozis değerinin önemli seviyede azaldığı gözlemlendi (p<0,05). Bunun ile birlikte ACA ve GSH ile tedavi gruplarında apoptozis değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde (p<0,05) azaldığı gözlemlenirken, A β +ACA grubuna kıyasla A β +GSH grubunun apoptozis değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi (p<0,05).



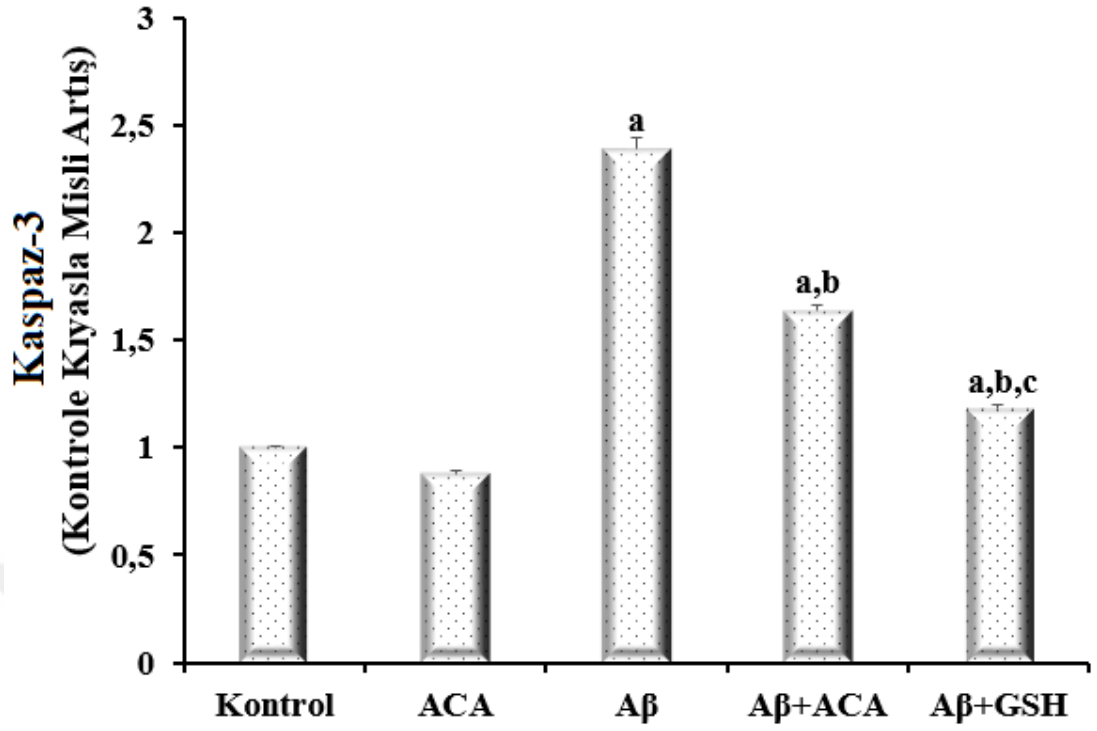
Şekil 4.3. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde hücre canlılığı seviyeleri (MTT) üzerinde, ACA ve GSH tedavisinin etkileri. (Ortalama $\pm$ STD ve n=6). ^ap<0,05 ve kontrol ile ACA gruplarına kıyasla. ^bp<0,05 ve A β grubuna kıyasla. ^cp<0,05 ve A β +ACA grubuna kıyasla).

Hipokampal nöronlarda hücre canlılığı seviyeleri (Şekil 4.3) incelendiğinde, A β grubundaki hücrelerde MTT düzeyinin Kontrol ve ACA, A β +ACA ve A β +GSH

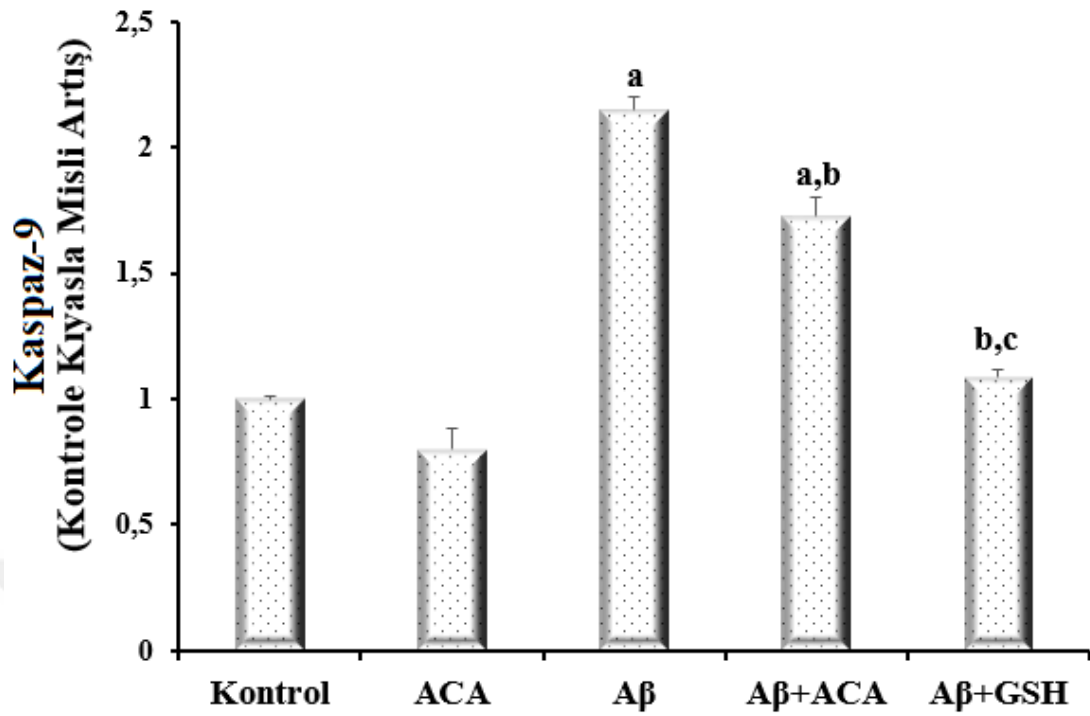
gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde azaldığı görüldü ($p<0,05$). A β +ACA ve A β +GSH grupları A β grubuyla kıyaslandığında MTT düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olduğu gözlemlendi ($p<0,05$). İlâveten A β +ACA grubuna kıyasla A β +GSH grubunda MTT düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ($p<0,05$).

4.3. Kaspaz-3 ve -9 Aktivitesi Analiz Sonuçları

Apoptotik yollarda (ekstrinsik ve intrinsik yol), hücre ölümünün tetiklemesi kaspaz enzim aktivasyonu ile yakın ilişki içindedir. Apoptosis belirteçleri arasında en önemli olanlar kaspaz-3 ve -9 aktivitesi olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (159). Tüm grupların kaspaz-3 ve -9 aktivite değerleri plate reader cihazında optik yoğunluk absorbans değerleri analiz edildi ve sonuçlar Şekil 4.4 ve 4.5'te gösterildi. Bu sonuçlar incelendiğinde, kontrol ve ACA gruplarına kıyasla, A β grubunda kaspaz-3 ve -9 enzim aktivite düzeylerinin istatistiksel belirgin düzeyde arttığı gözlemlenirken, bu değerlerin ACA ve GSH tedavisi sonrası A β +ACA ve A β +GSH gruplarında önemli düzeyde azaldığı gözlemlendi ($p<0,05$). Bu azalma A β +ACA grubuna kıyasla, A β +GSH grubunda daha fazla olduğu görüldü ($p<0,05$).



Şekil 4.4. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde kaspaz-3 aktiviteleri üzerinde, ACA ve GSH tedavisinin etkileri. (Ortalama $\pm$ STD ve n=6). (^ap<0,05 ve kontrol ile ACA gruplarına kıyasla. ^bp<0,05 ve A β grubuna kıyasla. ^cp<0,05 ve A β +ACA grubuna kıyasla).

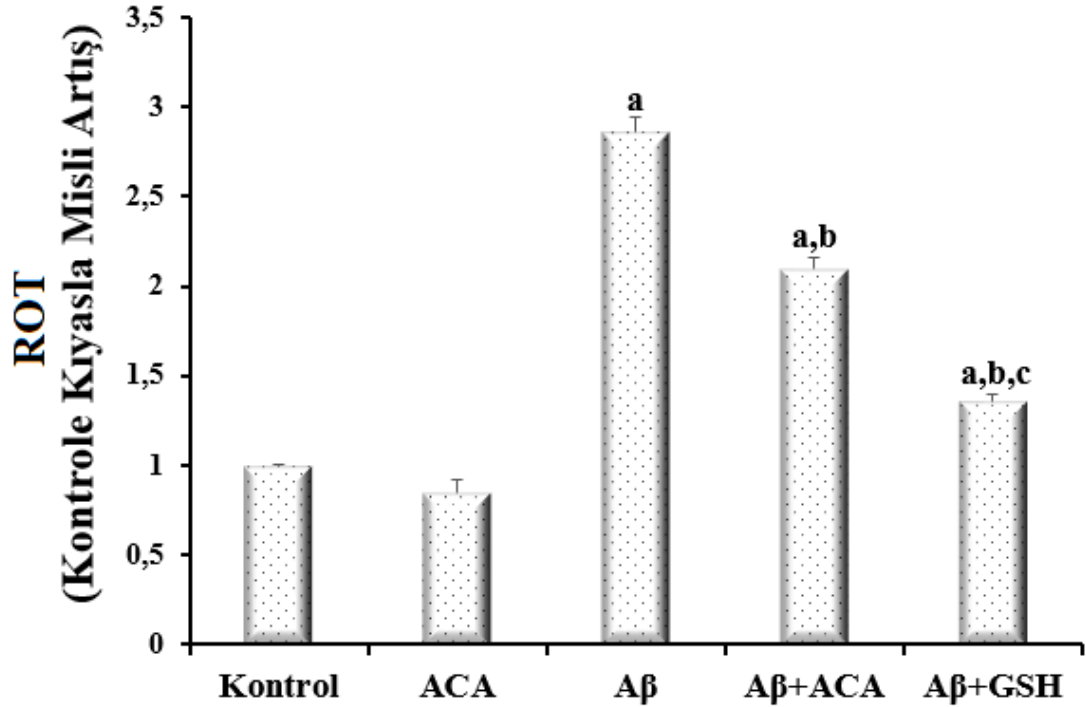


Şekil 4.5. Hipokampal nöronlarda Aβ ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde kaspaz-9 aktiviteleri üzerinde, ACA ve GSH tedavisinin etkileri. (Ortalama±STD ve n=6). (^ap<0,05 ve kontrol ile ACA gruplarına kıyasla. ^bp<0,05 ve Aβ grubuna kıyasla. ^cp<0,05 ve Aβ+ACA grubuna kıyasla).

4.4. İntrasellüler ROT Üretim Tayini ve Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu Analiz Sonuçları

Apoptozis ve MTT düzeylerindeki değişiklik oksidatif stres değişiklikleri ile de oluşabilir. Bu nedenle, hücre ROS düzeyini belirlemeyi amaçladık. Floresan olmayan fakat hücre içi ROT üretimi göstergesi olarak kullanılan Dihydrorhodamine 123 (DHR-123)'ün hücre içine alınmasıyla birlikte serbest oksijen radikalleri oksitlenerek floresans rodamin 123'e dönüşür. Bu tez çalışmasında hücre içi ROT üretimi analizinde kullanılan iki boyadan bir tanesi DHR-123 kullanıldı ve sonuçlar Şekil 4.6'da gösterildi. Bu sonuçlar incelendiğinde, Aβ grubunda intrasellüler ROT üretiminin kontrol ve ACA gruplarına kıyasla neredeyse üç kat arttığı gözlemlendi (p<0,05). Bu değerlerin ACA ve GSH tedavisi sonrası Aβ grubuna kıyasla Aβ+ACA ve Aβ+GSH gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı gözlemlendi

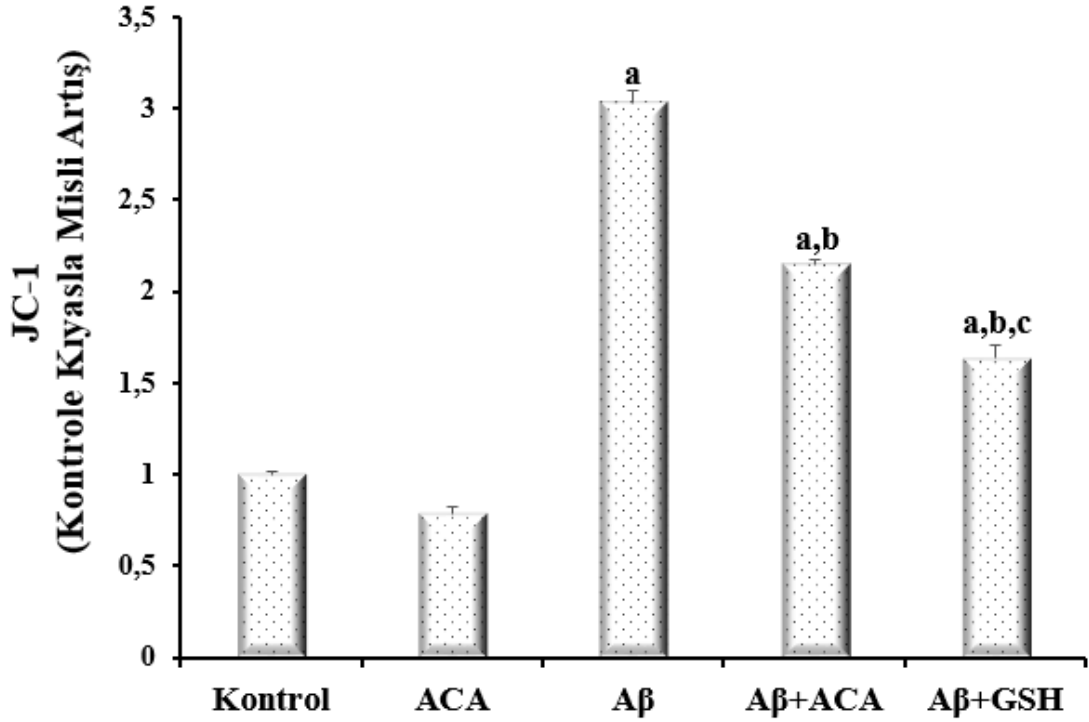
($p<0,05$). Bu intrasellüler ROT üretimindeki azalma $A\beta$ +ACA grubuna kıyasla $A\beta$ +GSH grubunda daha fazla olduğu gözlemlendi ($p<0,05$).



Şekil 4.6. Hipokampal nöronlarda $A\beta$ ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde intrasellüler ROT üretim düzeyleri üzerinde, ACA ve GSH tedavisinin etkileri. (Ortalama $\pm$ STD ve n=6). (^a $p<0,05$ ve kontrol ile ACA gruplarına kıyasla. ^b $p<0,05$ ve $A\beta$ grubuna kıyasla. ^c $p<0,05$ ve $A\beta$ +ACA grubuna kıyasla).

TRPM2 vasıtasıyla fazla miktarda Ca^{+2} hücreye girişi mitokondrinin depolarize olmasını ve membran potansiyelinin artmasını sağlamaktadır. Mitokondriyal membran depolarizasyonun fazla olması ise intrasellüler ROT üretiminin artmasına sebep olmaktadır. Bundan dolayı ROT ve mitokondriyal depolarizasyon parametreleri genellikle bütün olarak değerlendirilmektedir. Elde ettiğimiz sonuçlar Şekil 4.7’de gösterilmiştir. Bu değerler incelendiğinde, kontrol ve ACA gruplarına kıyasla mitokondriyal membran depolarizasyonu $A\beta$ grubunda neredeyse üç kat arttığı gözlemlenirken, ACA ve GSH tedavi sonrası $A\beta$ +ACA ve $A\beta$ +GSH gruplarında mitokondriyal membran depolarizasyonunun istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı gözlemlendi ($p<0,05$). Bu mitokondriyal membran

depolarizasyonunda azalma $A\beta$ +ACA grubuna kıyasla $A\beta$ +GSH grubunda daha fazla olduğu gözlemlendi ($p<0,05$).

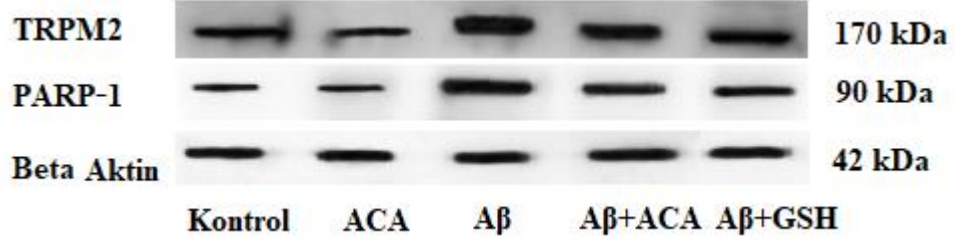


Şekil 4.7. Hipokampal nöronlarda $A\beta$ ile oluşturulan *in vitro* Alzheimer hastalığı modelinde JC-1 düzeyleri üzerinde, ACA ve GSH tedavisinin etkileri. (Ortalama $\pm$ STD ve n=6). (^a $p<0,05$ ve kontrol ile ACA gruplarına kıyasla. ^b $p<0,05$ ve $A\beta$ grubuna kıyasla. ^c $p<0,05$ ve $A\beta$ +ACA grubuna kıyasla).

4.5. Western Blot Analiz Sonuçları

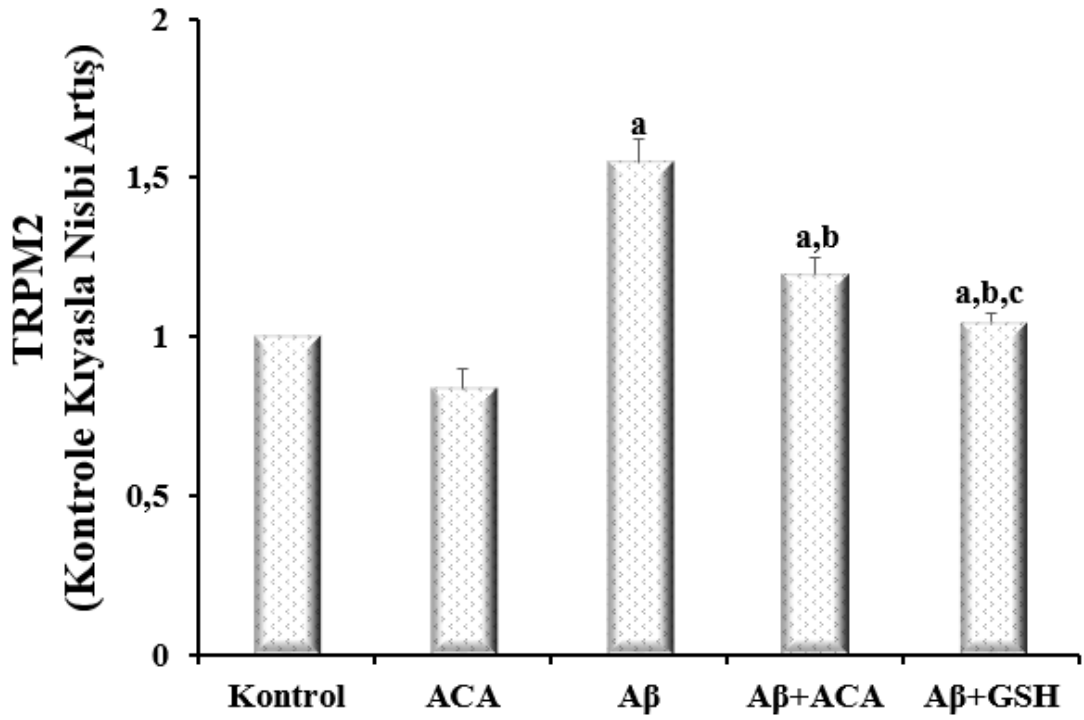
$A\beta$ ile oluşturulan *in vitro* Alzheimer hastalık modeli hipokampal nöronlarda $A\beta$ inkübasyonu sonunda, ACA ve GSH tedavisi uygulanan gruplar arasında Bax, Bcl2, kaspaz-3 ve -9, PARP-1 ve TRPM2 katyon kanal ekspresyon seviyeleri Western blot yöntemi ile analiz edildi. Aşağıdaki sonuçlar elde edildi.

4.5.1. TRPM2 Katyon Kanal Protein Bandı Ekspresyon Sonuçları



Resim 4.1. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde, TRPM2 ve PARP-1 ekspresyon düzeyleri, ACA ve GSH tedavisinin etkileri sonrası bant görüntüleri.

TRPM2 katyon kanal ekspresyon düzeyleri Şekil 4.8 ve bant görüntüleri Resim 4.1’de gösterilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde, kontrol ve ACA gruplarına kıyasla, A β grubunda TRPM2 katyon kanalının ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak belirgin bir biçimde artış gözlemlenirken ($p < 0,05$), bu değerlerde ACA ve GSH tedavisi sonrası (A β +ACA ve A β +GSH gruplarında) önemli düzeyde azalma gözlemlendi. Ayrıca, bu değerler, GSH tedavisi sonrası daha da azalmıştır. Diğer bir ifade ile TRPM2 kanal ekspresyon düzeyinin, A β +ACA grubuna kıyasla, A β +GSH grubunda daha da az olduğu gözlemlendi ($p < 0,05$).

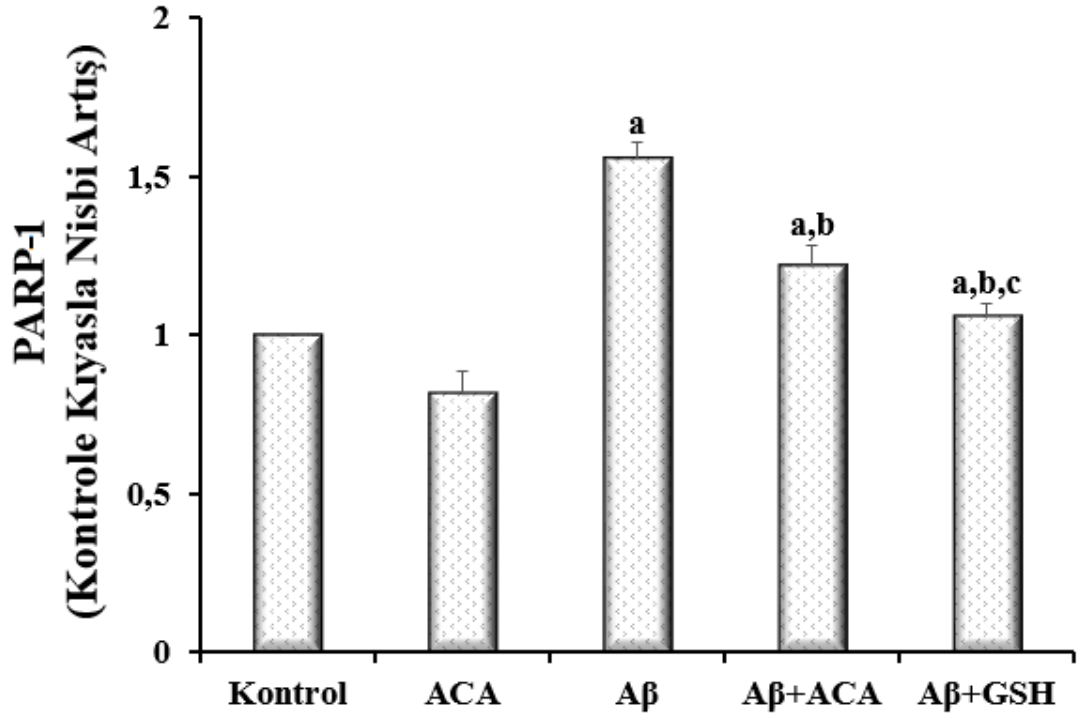


Şekil 4.8. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde TRPM2 katyon kanal ekspresyon düzeyi üzerinde, ACA ve GSH tedavisinin etkileri. (Ortalama $\pm$ STD ve n=3). (^ap<0,05 ve kontrol ile ACA gruplarına kıyasla. ^bp<0,05 ve A β grubuna kıyasla. ^cp<0,05 ve A β +ACA grubuna kıyasla).

4.5.2. PARP-1 Enzimi Protein Ekspresyon Sonuçları

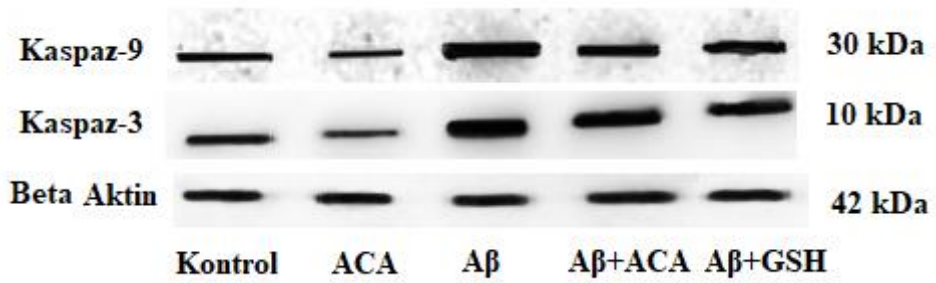
İntrasellüler nukleus DNA'sının zincir kırıklarının onarımında ve ADPR'nin polimerizasyonunda, PARP-1 enziminin önemli rolü olduğu iyi bilinmektedir. PARP-1 enzimi, ADPR'yi polimerleştirerek nukleus DNA'sının kırık bölgesinin onarılmasından ve DNA ligaz gibi aynı enzimlere öncülük edip onarılacak DNA'nın belirlenmesinden sorumludur. Diğer bir ifade ile, PARP-1 enzim seviyesindeki artış ne kadar fazla olursa onarılacak DNA miktarının da o kadar fazla olduğu anlamına gelmektedir. PARP-1 enzim seviyeleri Şekil 4.9 ve bant görüntüleri Resim 4.1'de gösterilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde, kontrol ve ACA gruplarına kıyasla, A β grubunda PARP-1 enzim aktivite düzeyi istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde arttığı gözlemlenirken, bu değerlerin ACA ve GSH tedavisi sonrası (A β +ACA ve A β +GSH gruplarında) önemli düzeyde azaldığı gözlemlendi (p<0,05). Bu azalmaya ilaveten

A β +ACA grubuna kıyasla, A β +GSH grubunda ekspresyon düzeyi daha fazla olduğu gözlemlendi ($p<0,05$).



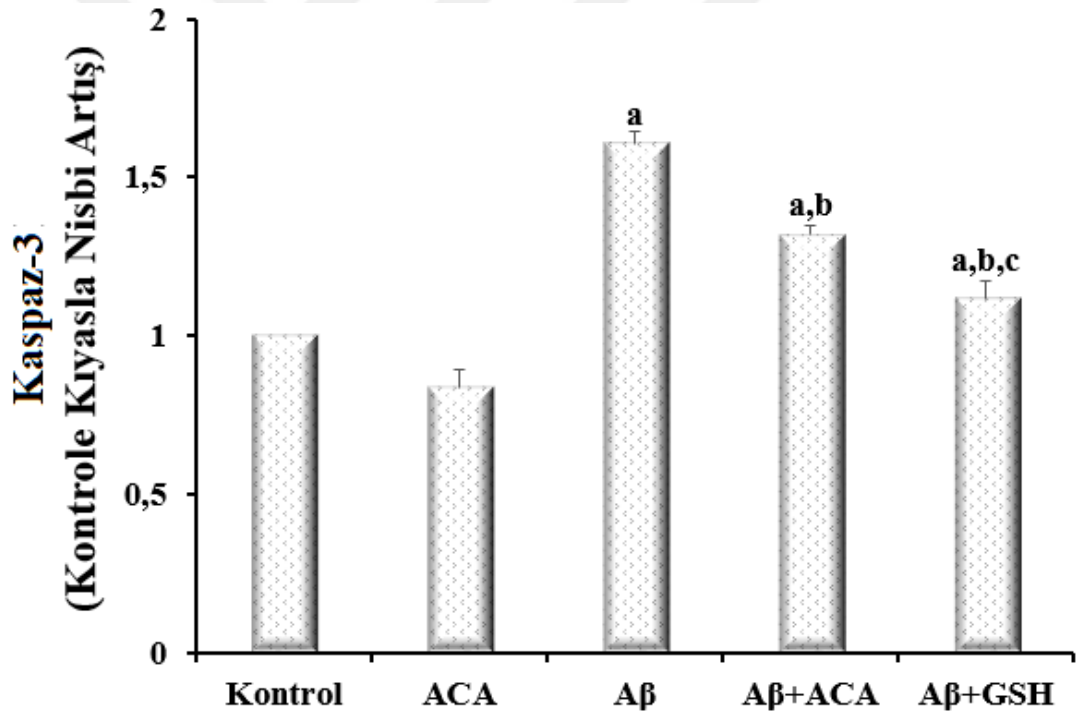
Şekil 4.9. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde PARP-1 ekspresyon düzeyi üzerinde, ACA ve GSH tedavisinin etkileri. (Ortalama $\pm$ STD ve n=3). (^a $p<0,05$ ve kontrol ile ACA gruplarına kıyasla. ^b $p<0,05$ ve A β grubuna kıyasla. ^c $p<0,05$ ve A β +ACA grubuna kıyasla).

4.5.3. Kaspaz-3 ve -9 Aktivasyon Analiz Sonuçları

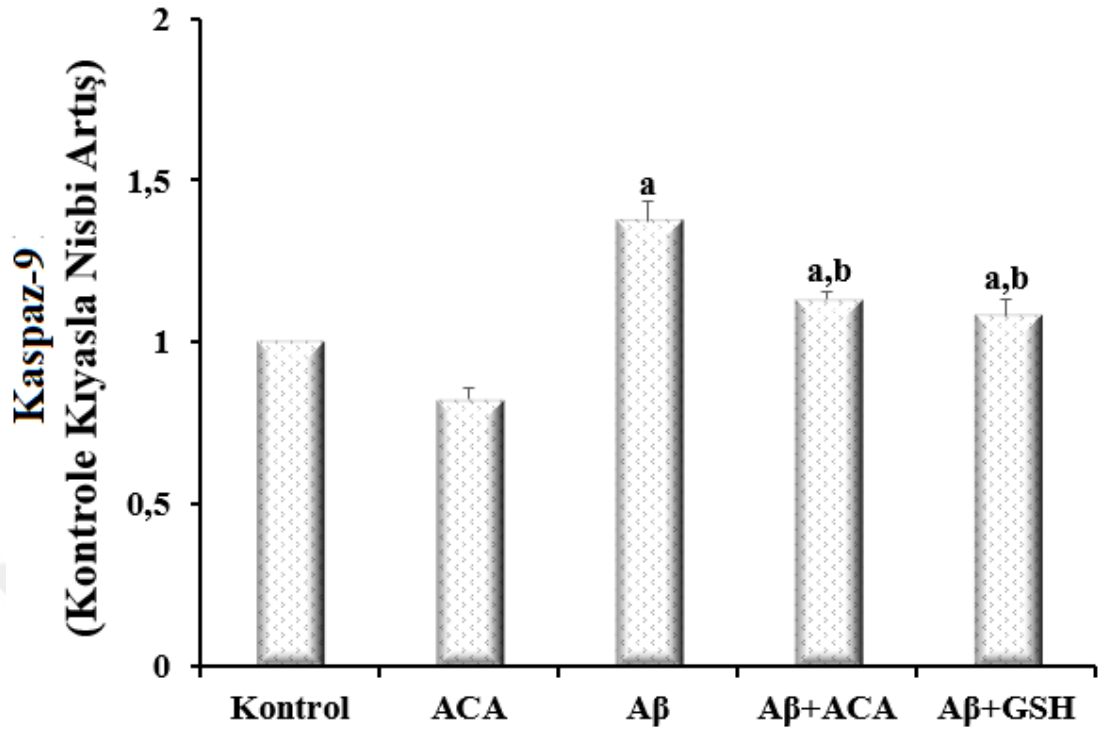


Resim 4.2. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde kaspaz-3 ve -9 ekspresyon düzeyi üzerinde, ACA ve GSH tedavisinin etkileri sonrası bant görüntüleri.

Hücresinin apoptozise hazırlandığının en belirgin göstergeleri kaspaz-3 ve -9 reaksiyonlarıdır. Bu enzimlerin reaksiyonunun başlaması için intrasellüler ve ekstrasellüler arasındaki iyon iletimi (ör; iyon kanalları, ROT agonist vb.) sorumludur. Kaspaz-3 ve -9 ekspresyon düzeyleri sırasıyla Şekil 4.10 ve 4.11, bant görüntüleri Resim 4.2’de gösterildi. Bu elde edilen sonuçlar incelendiğinde, kontrol ve ACA gruplarına kıyasla, A β grubunda kaspaz-3 ve -9 ekspresyon düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde arttığı gözlemlenirken, bu elde edilen değerlerin ACA ve GSH tedavi sonrasında A β +ACA ve A β +GSH gruplarında önemli düzeyde azaldığı gözlemlendi ($p<0,05$). Bu değerlerdeki azalma A β +ACA grubuna kıyasla, A β +GSH grubunda daha fazla olduğu görüldü ($p<0,05$). Kontrol ve ACA grupları ve A β +GSH grubu arasında kaspaz-9 ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak bir fark görülmeydi.

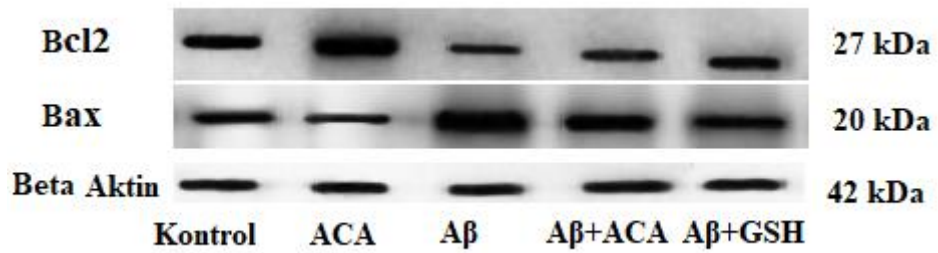


Şekil 4.10. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde kaspaz-3 ekspresyon düzeyi üzerinde, ACA ve GSH tedavisinin etkileri. (Ortalama $\pm$ STD ve n=3). (^a $p<0,05$ ve kontrol ile ACA gruplarına kıyasla. ^b $p<0,05$ ve A β grubuna kıyasla. ^c $p<0,05$ ve A β +ACA grubuna kıyasla).



Şekil 4.11. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde kaspaz-9 ekspresyon düzeyi üzerinde, ACA ve GSH tedavisinin etkileri. (Ortalama $\pm$ STD ve n=3). (^ap<0,05 ve kontrol ile ACA gruplarına kıyasla. ^bp<0,05 ve A β grubuna kıyasla. ^cp<0,05).

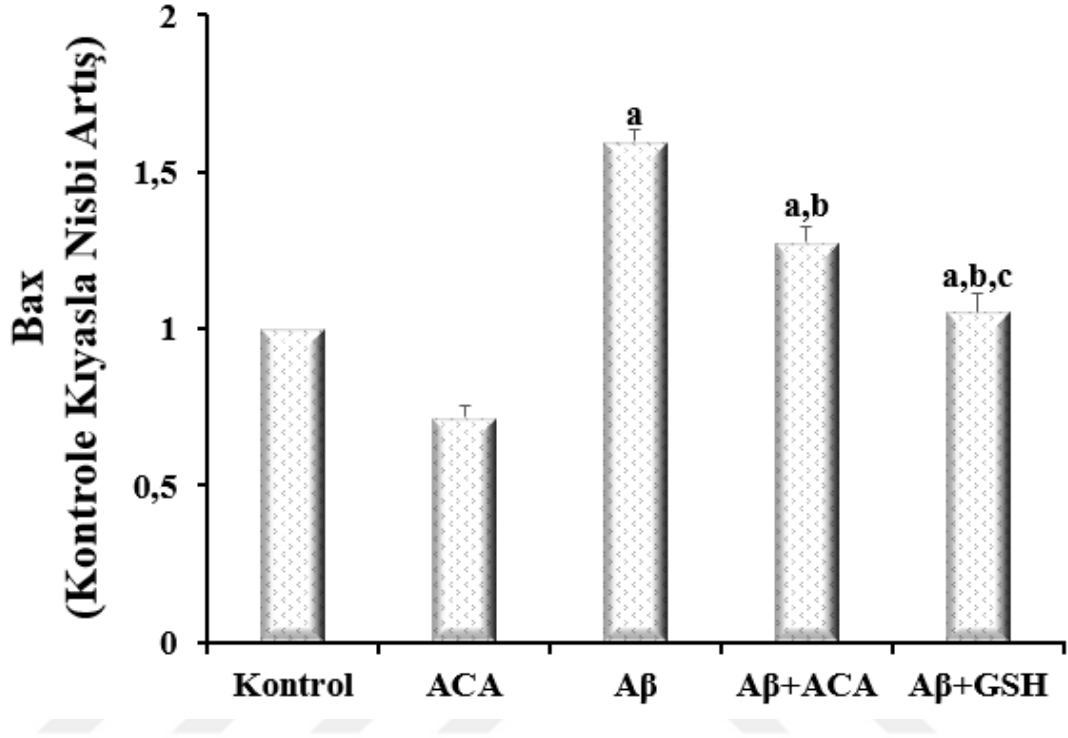
4.5.4. Bax ve Bcl2 Enzim Aktivasyon Analiz Sonuçları



Resim 4.3. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde Bax ve Bcl2 ekspresyon düzeyi üzerinde, ACA ve GSH tedavisinin etkileri sonrası bant görüntüleri.

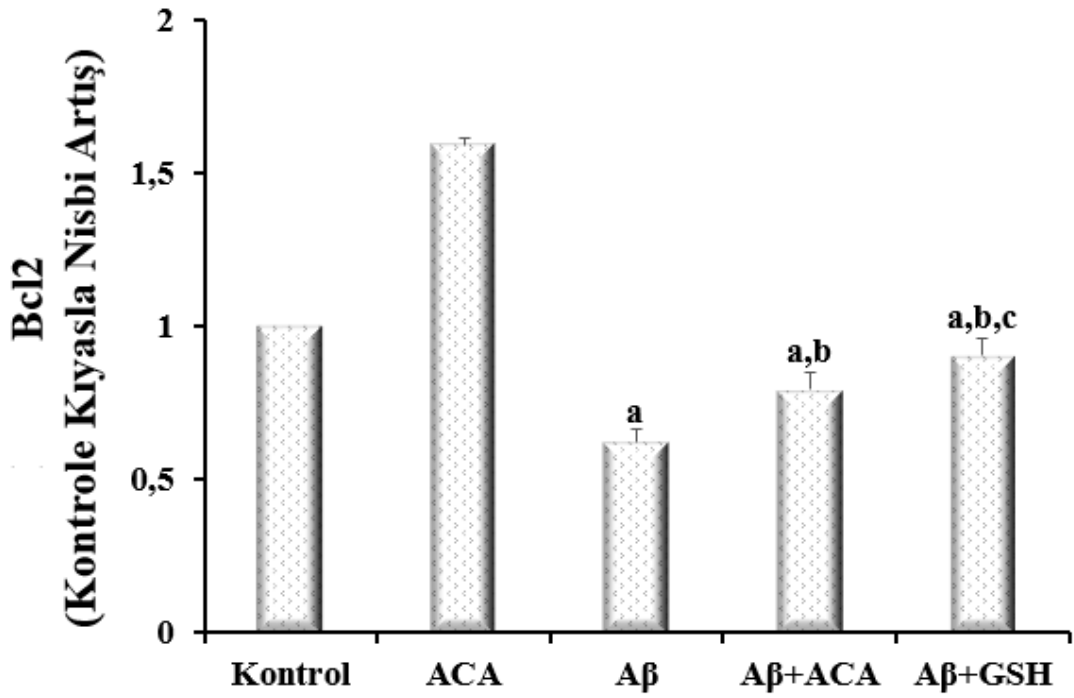
Grupların Bax ekspresyon seviyeleri Şekil 4.12 ve bant görüntüleri Resim 4.3'te gösterildi. Sonuçlar incelendiğinde, kontrol ve ACA gruplarına kıyasla, A β grubunda Bax ekspresyon düzeyi anlamlı düzeyde arttığı gözlemlenirken, elde edilen

bu değerlerin ACA ve GSH tedavi sonrasında, $A\beta$ +ACA ve $A\beta$ +GSH gruplarında önemli düzeyde azaldığı gözlemlendi ($p<0,05$). Bu elde edilen azalmanın $A\beta$ +ACA grubuna kıyasla, $A\beta$ +GSH grubunda daha fazla olduğu görüldü ($p<0,05$).



Şekil 4.12. Hipokampal nöronlarda $A\beta$ ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde Bax ekspresyon düzeyi üzerinde, ACA ve GSH tedavisinin etkileri. (Ortalama $\pm$ STD ve n=3). (^a $p<0,05$ ve kontrol ile ACA gruplarına kıyasla. ^b $p<0,05$ ve $A\beta$ grubuna kıyasla. ^c $p<0,05$ ve $A\beta$ +ACA grubuna kıyasla).

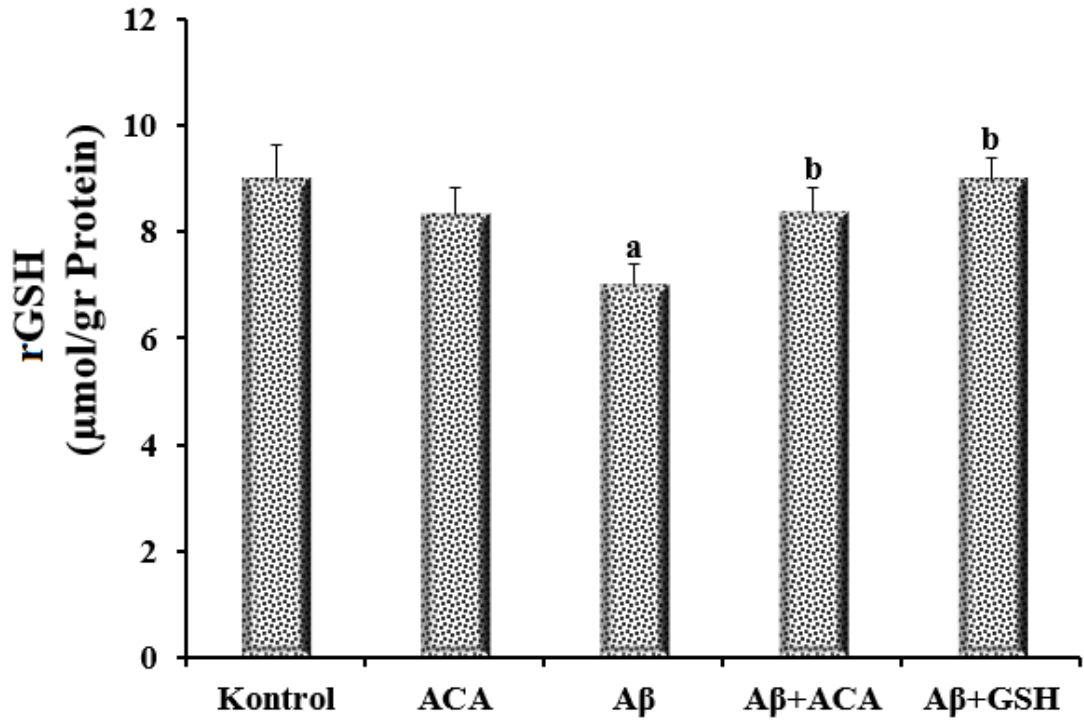
Grupların Bcl2 ekspresyon seviyeleri Şekil 4.13 ve bant görüntüleri Resim 4.3 te gösterildi. Sonuçlar incelendiğinde, kontrol ve ACA gruplarına kıyasla, $A\beta$ grubunda Bcl2 ekspresyon seviyelerinde istatistiksel anlamda belirgin düzeyde azaldığı gözlemlenirken, bu değerlerin ACA ve GSH tedavisi sonrası $A\beta$ +ACA ve $A\beta$ +GSH gruplarında önemli düzeyde arttığı gözlemlendi ($p<0,05$). Bu değerlerdeki artış $A\beta$ +ACA grubuna kıyasla, $A\beta$ +GSH grubunda daha fazla olduğu tespit edildi ($p<0,05$).



Şekil 4.13. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde Bcl2 ekspresyon düzeyi üzerinde, ACA ve GSH tedavisinin etkileri. (Ortalama $\pm$ STD ve n=3). (^ap<0,05 ve kontrol ile ACA gruplarına kıyasla. ^bp<0,05 ve A β grubuna kıyasla. ^cp<0,05 ve A β +ACA grubuna kıyasla).

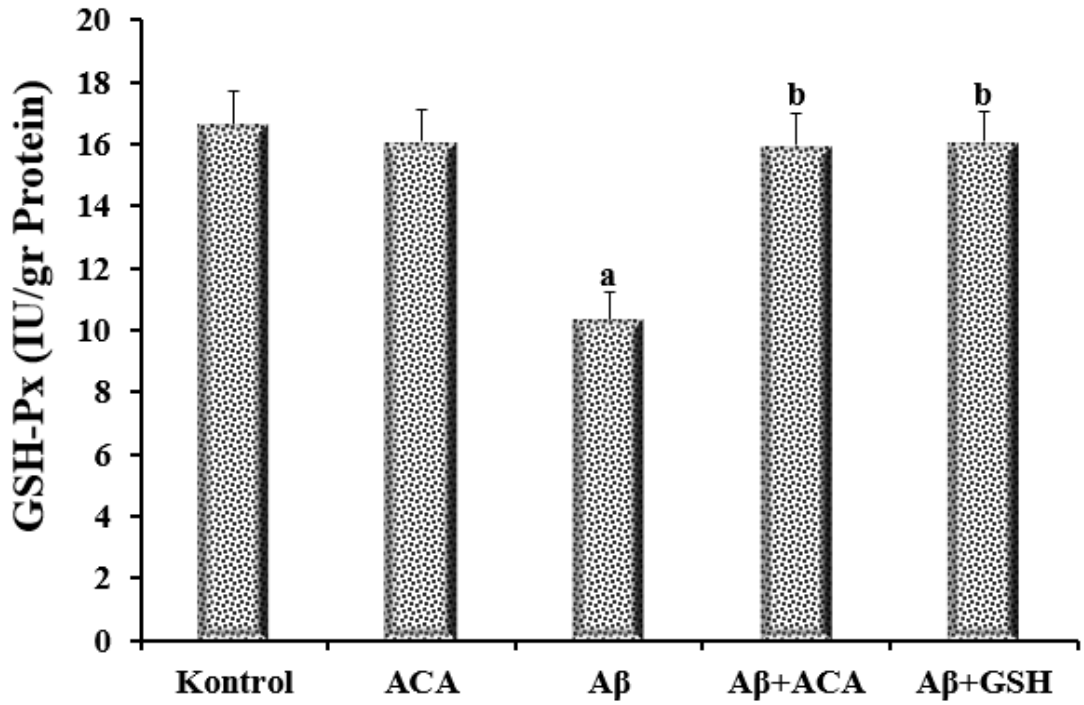
4.6. Glutasyon Peroksidaz ve Glutasyon Analiz Sonuçları

A β inkübasyonu yapılan hipokampal nöronlarda rGSH düzeyleri Şekil 4.14'te gösterildi. Bu sonuçlar incelendiğinde, kontrol ve ACA grubuna kıyasla, A β grubunda rGSH düzeyinin istatistiksel olarak belirgin bir şekilde düştüğü gözlemlenirken, bu elde edilen değerler ACA ve GSH tedavisi sonrası A β +ACA ve A β +GSH gruplarında önemli düzeyde yükseldiği gözlemlendi (p<0,05). Ancak kontrol ve ACA gruplarına kıyasla, A β +ACA ve A β +GSH grupları arasında istatistiksel olarak bir fark görülmedi. A β +ACA ve A β +GSH grupları arasında da anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi (p>0,05).



Şekil 4.14. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde rGSH düzeyi üzerinde, ACA ve GSH tedavisinin etkileri. (Ortalama $\pm$ STD ve n=6). (^ap<0,05 ve kontrol ile ACA grubuna kıyasla. ^bp<0,05 ve A β grubuna kıyasla).

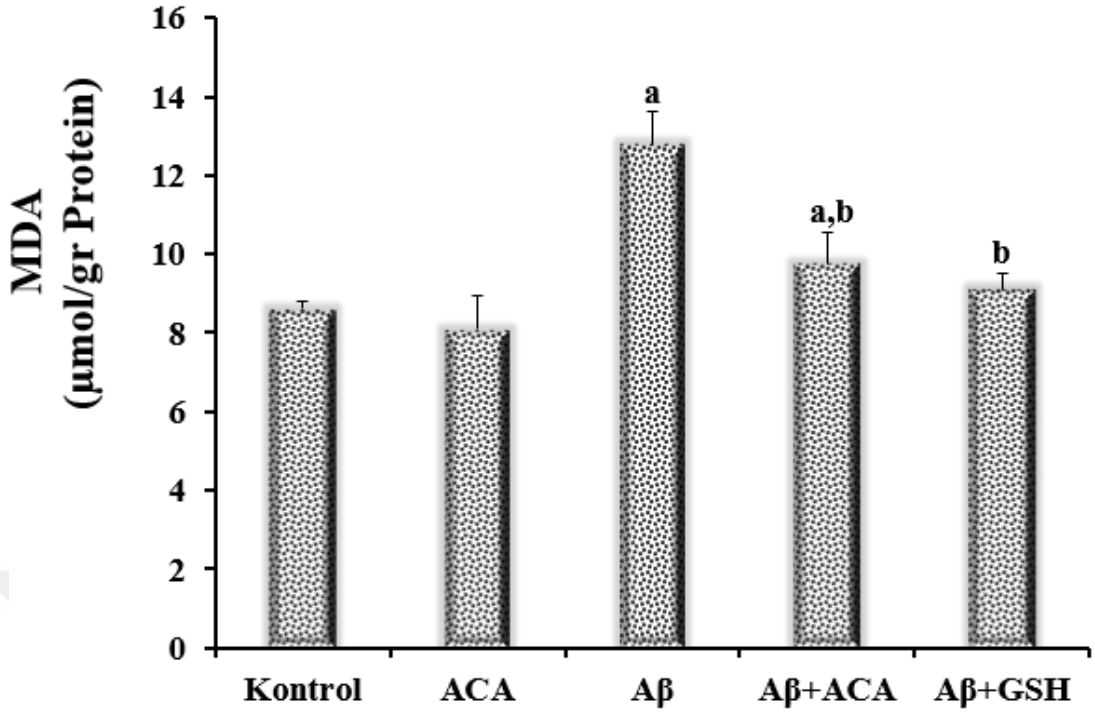
A β inkübasyonu yapılan hipokampal nöronlarda GSH-Px düzeyleri Şekil 4.15 te gösterildi. Verilen değerler incelendiğinde, kontrol ve ACA gruplarına kıyasla, A β grubunda GSH-Px düzeylerinde azalma olduğu gözlemlenirken, bu değerlerde ACA ve GSH tedavisi sonrası A β +ACA ve A β +GSH gruplarında istatistiksel anlamda bir artış olduğu gözlemlendi (p<0,05). İlaveten kontrol ve ACA grubuna kıyasla, A β +ACA ve A β +GSH grupları arasında istatistiksel olarak bir fark görülmedi. A β +ACA ile A β +GSH grupları arasında da anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi (p>0.05).



Şekil 4.15. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde GSH-Px düzeyi üzerinde, ACA ve GSH tedavisinin etkileri. (Ortalama $\pm$ STD ve n=6). (^ap<0,05 ve kontrol ile ACA grubuna kıyasla. ^bp<0,05 ve A β grubuna kıyasla).

4.7. Lipit Peroksidasyon Analiz Sonuçları

A β inkübasyonu yapılan hipokampal nöronlarda MDA düzeyleri Şekil 4.16'da gösterildi. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, kontrol ve ACA gruplarına kıyasla, A β grubunda MDA seviyelerinde yükselme olduğu gözlemlenirken, bu değerlerde ACA ve GSH tedavisi sonrası A β +ACA ve A β +GSH gruplarında istatistiksel anlamda bir azalma olduğu gözlemlendi (p<0,05). İlaveten kontrol ve ACA gruplarına kıyasla, A β +GSH grubu arasında istatistiksel olarak bir fark görülmedi (p>0,05). Bu azalma A β +ACA grubuna kıyasla, A β +GSH grubunda daha fazla görüldü (p<0,05).

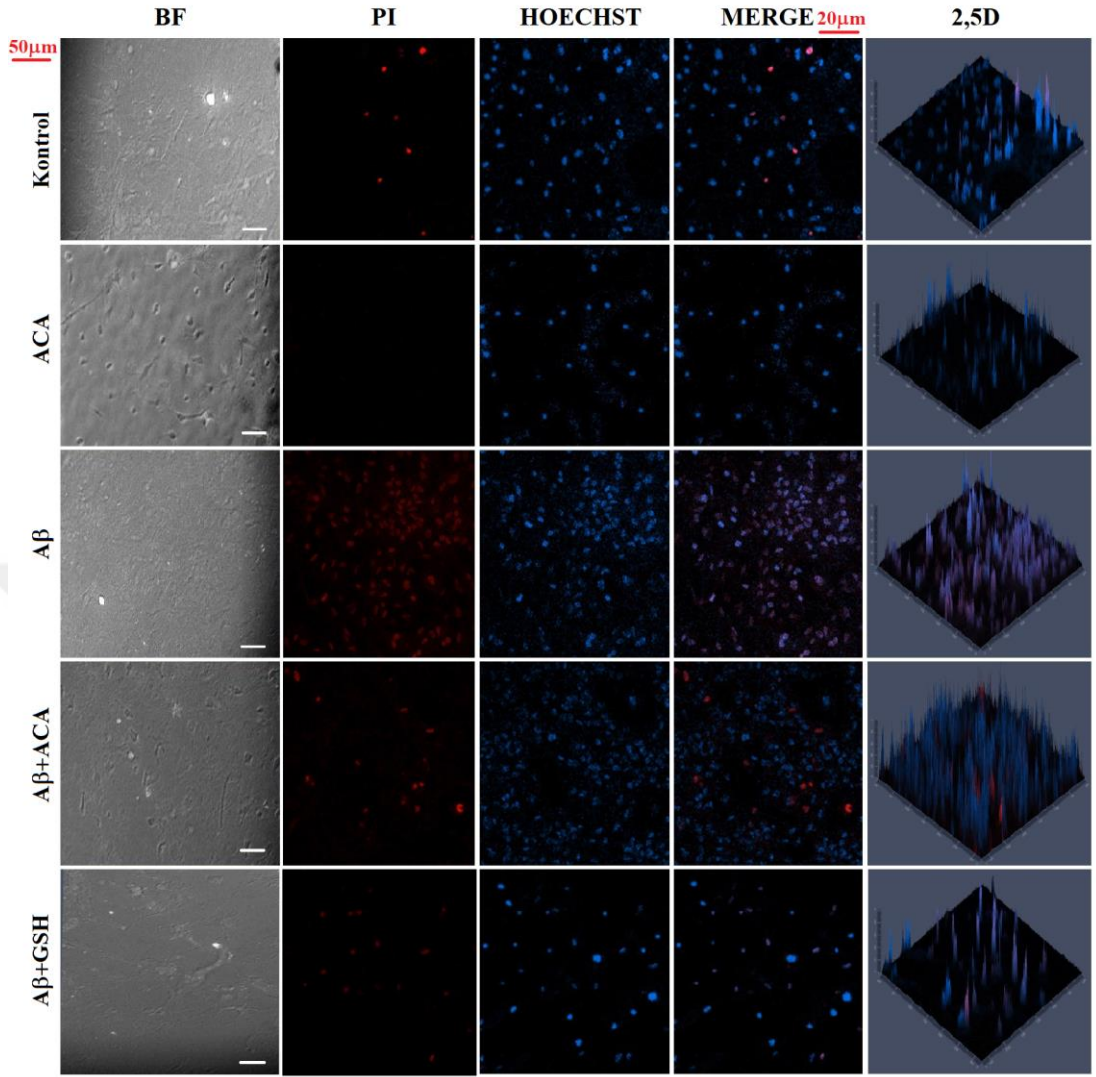


Şekil 4.16. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde MDA düzeyi üzerinde, ACA ve GSH tedavisinin etkileri. (Ortalama $\pm$ STD ve n=6). (^ap<0,05 ve kontrol ile ACA grubuna kıyasla. ^bp<0,05 ve A β grubuna kıyasla).

4.8. Lazer Konfokal Mikroskop Sonuçları

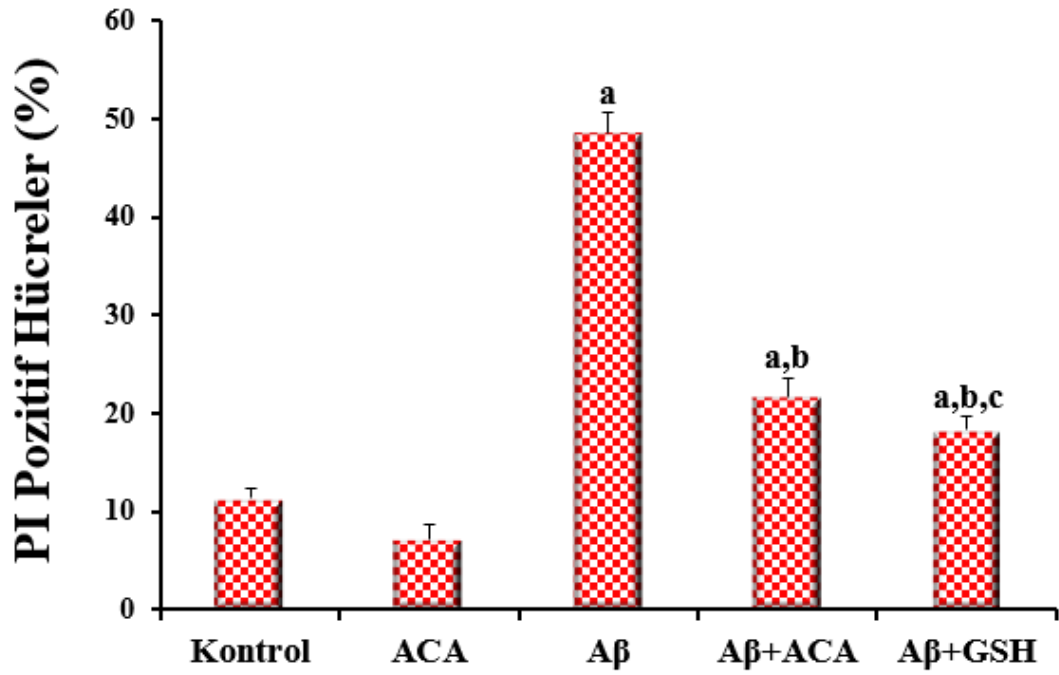
4.8.1. Hücre Canlılık Oranının (Hoechst/Propidyum İyodür) Lazer Konfokal Mikroskop Analiz Sonuçları

Tüm grupların hücre ölüm oranları PI/Hoechst boyaları kullanılarak lazer konfokal mikroskopta analiz edildi ve elde edilen sonuçlar PI pozitif hücre sayısına göre % olarak verildi.



Resim 4.4. Hipokampal nöronlarda Aβ ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde, Hoechst/PI floresen boyalarla inkübasyon ardından konfokal mikroskop analizlerinde ACA ve GSH uygulamasının etkilerinin görüntüleri

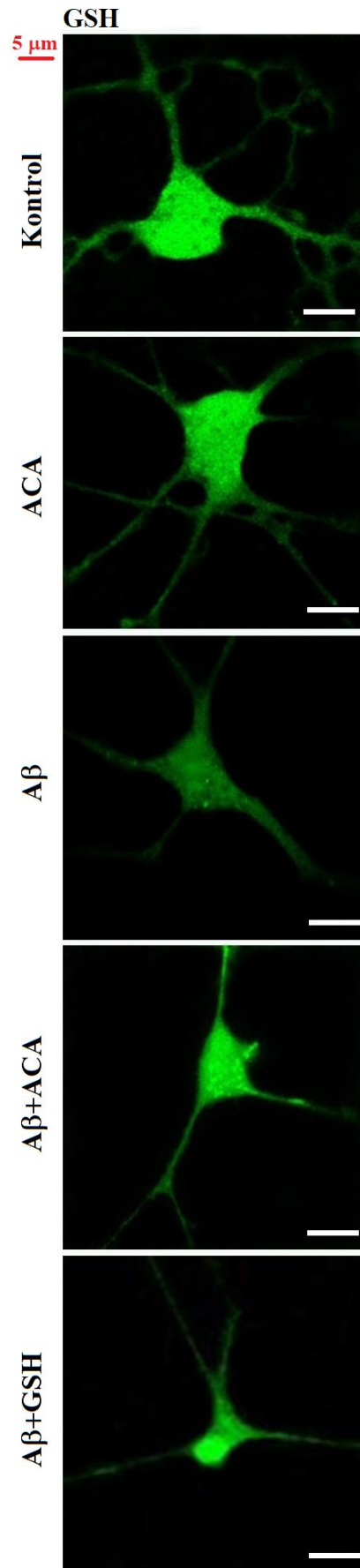
PI pozitif hücre sonuçlarının, gruplar arasındaki farkı Resim 4.4 ve Şekil 4.17’de gösterildi. Sonuçlar incelendiğinde, hipokampal hücrelerinde kontrol ve ACA gruplarına kıyasla, Aβ grubunda hücre ölüm oranı düzeyinde istatistiksel anlamda artış gözlemlenirken, bu değerlerde ACA ve GSH tedavisi altında Aβ+ACA ve Aβ+GSH gruplarında hücre canlılık oranı düzeyinde azalma gözlemlendi ($p < 0,05$). Bu artmalar Aβ+ACA grubuna kıyasla, Aβ+GSH grubunda PI pozitif hücre ölüm oranı düzeyinde daha fazla azalma gözlemlendi ($p < 0,05$).



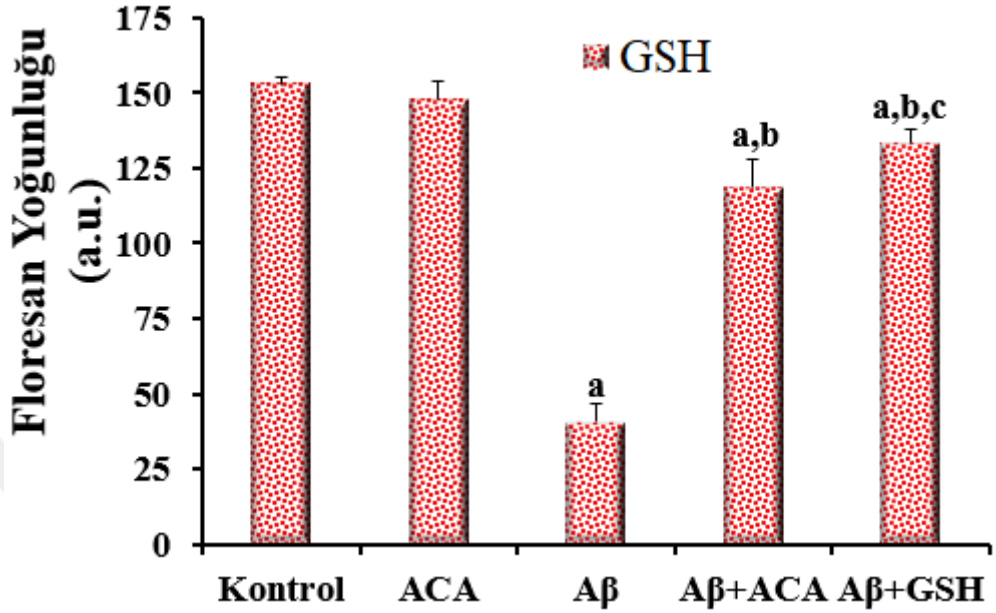
Şekil 4.17. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan *in vitro* Alzheimer hastalığı modelinde, Hoechst/PI floresen boyalarla inkübasyon ardından konfokal mikroskop analizlerinde ACA ve GSH uygulamasının etkileri PI pozitif hücre seviyeleri %100 olarak gösterildi (Ortalama $\pm$ STD ve n=6). (^ap<0,05 ve kontrol ile ACA gruplarına kıyasla. ^bp<0,05 ve A β grubuna kıyasla. ^cp<0,05 ve A β +ACA grubuna kıyasla).

4.8.2. İntrasellüler GSH'nın Lazer Konfokal Mikroskop Analiz Sonuçları

İntrasellüler GSH yoğunluğu, intrasellülerde serbest gezen tiyollerin büyük kısmını ifade etmektedir. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan *in vitro* Alzheimer hastalık modelinde ACA ve GSH tedavi sonrası, intrasellüler GSH düzeyleri tioltrackertm violet tiyol probu kullanılarak lazer mikroskobu ile incelendi.



Resim 4.5. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde intrasellüler GSH düzeyi üzerinde ACA ve GSH tedavi sonrası konfokal mikroskoptaki etkilerin görüntüleri



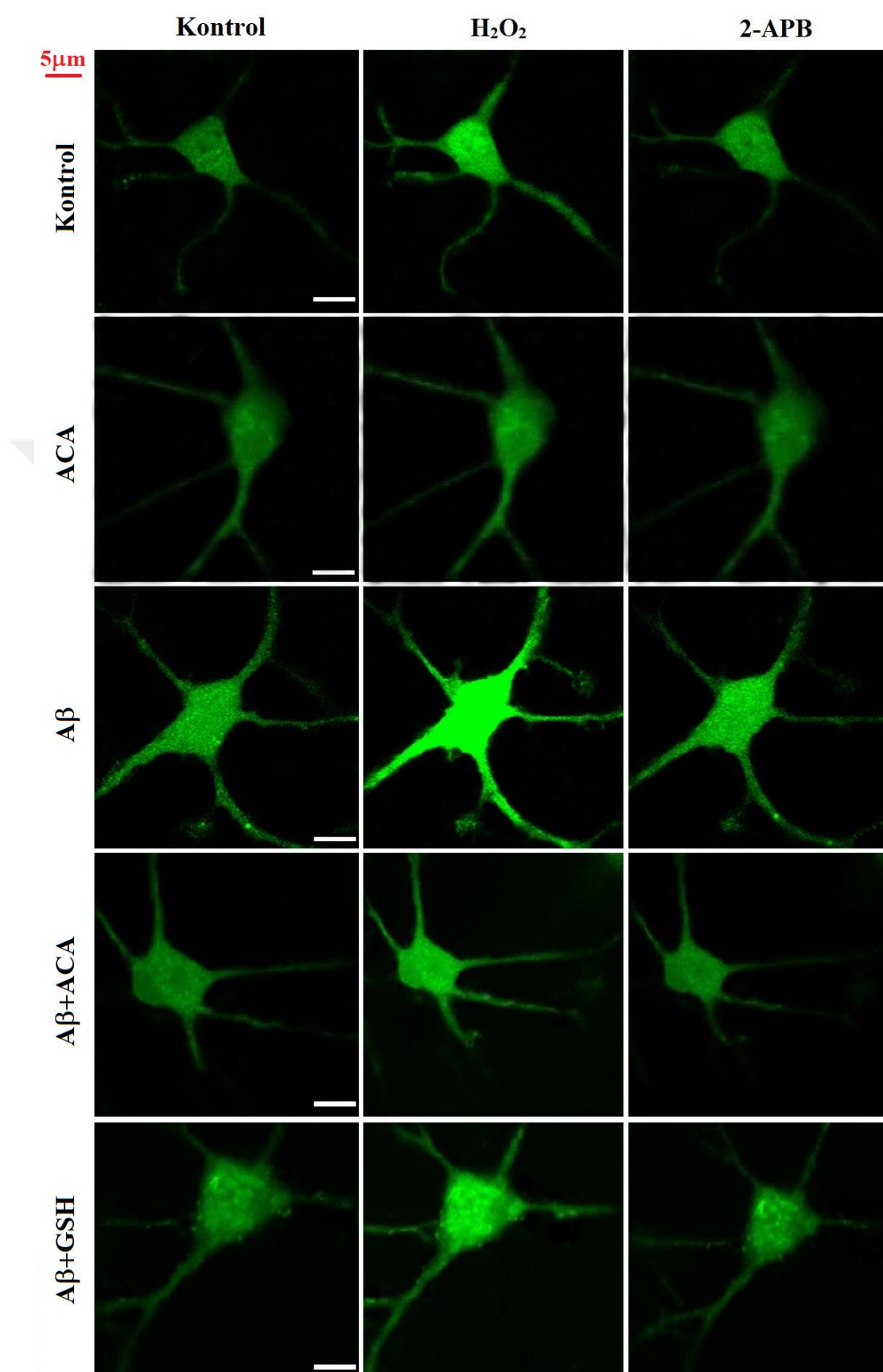
Şekil 4.18. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde intrasellüler GSH düzeyi üzerinde ACA ve GSH tedavi sonrası konfokal mikroskoptaki etkilerinin floresan yoğunluğunun belirlenmesi. (Ortalama $\pm$ STD ve n=6). (^ap<0,05 ve kontrol ile ACA gruplarına kıyasla. ^bp<0,05 ve A β grubuna kıyasla. ^cp<0,05 ve A β +ACA grubuna kıyasla).

Gruplarda intrasellüler GSH yoğunluk düzey sonuçları Resim 4.5 ve Şekil 4.18'de gösterildi. Bu sonuçlar incelendiğinde, kontrol ve ACA grubuna kıyasla, A β grubunda intrasellüler GSH floresan yoğunluğu istatistiksel anlamda belirgin bir azalttığı gözlemlenirken, bu değerler ACA ve GSH tedavisi sonrasında A β +ACA ve A β +GSH gruplarında GSH floresan yoğunluğunda belirgin bir artış olduğu gözlemlendi (p<0,05). Bu artmaya ilaveten A β +ACA grubuna kıyasla, A β +GSH grubunda GSH düzeyi daha fazla olduğu gözlemlendi (p<0,05).

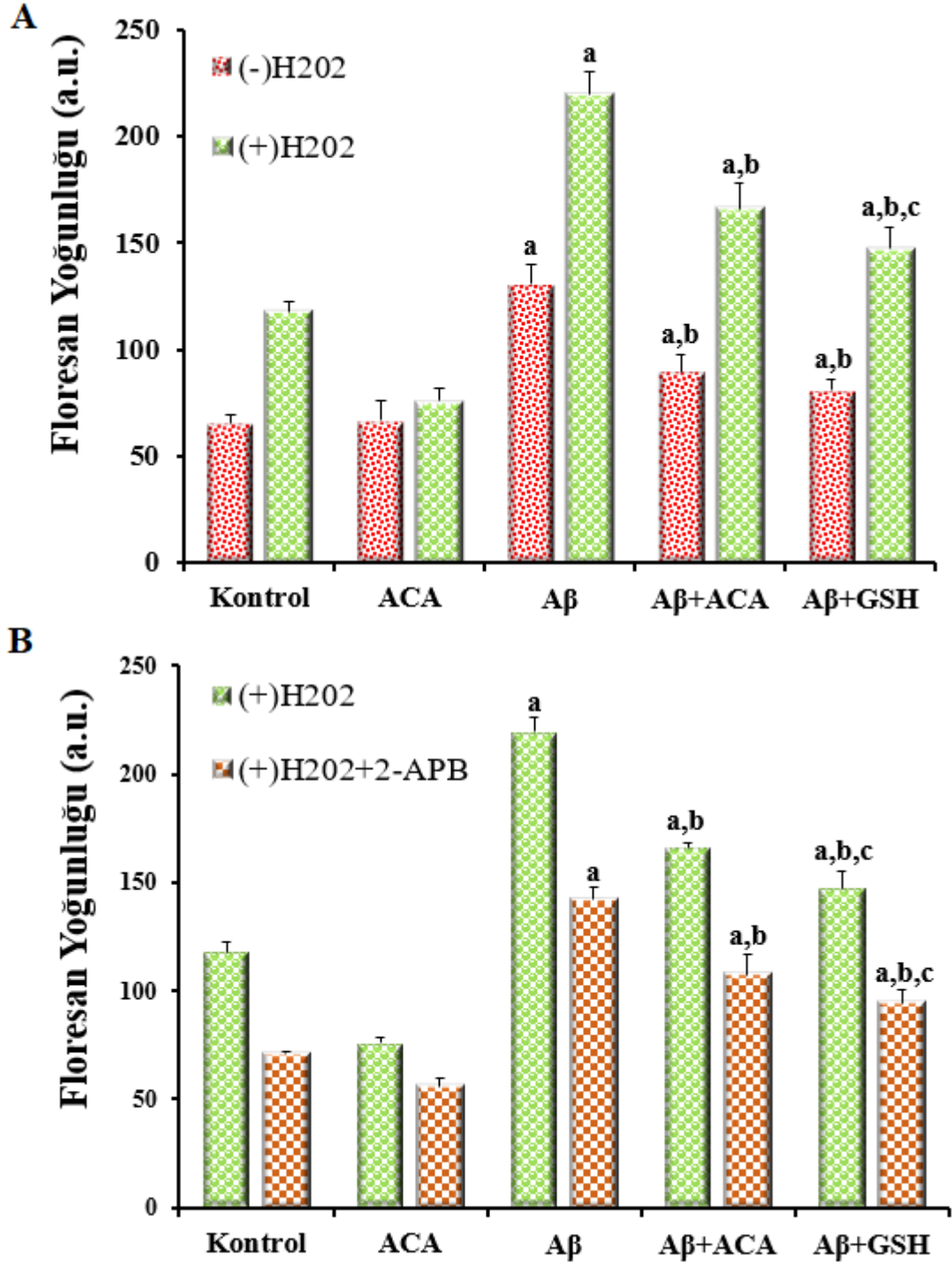
4.8.3. [Ca⁺²]i Lazer Konfokal Mikroskop Analiz Sonuçları

Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan *in vitro* Alzheimer hastalık modelinde ACA ve GSH tedavi sonrası gruplar arasındaki [Ca⁺²]i yoğunluğunun belirlenmesinde Flou-3-AM boyası kullanıldı ve lazer konfokal mikroskobu ile incelendi.





Resim 4.6. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde intrasellüler Ca⁺² düzeyi üzerinde ACA ve GSH tedavi sonrası konfokal mikroskopta etkilerinin görüntüleri

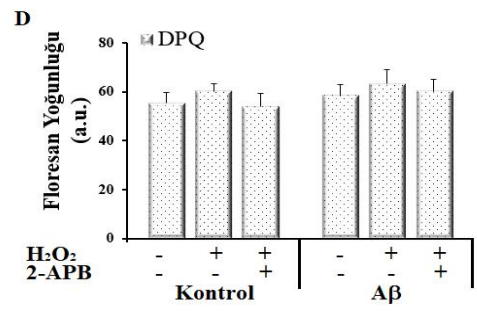
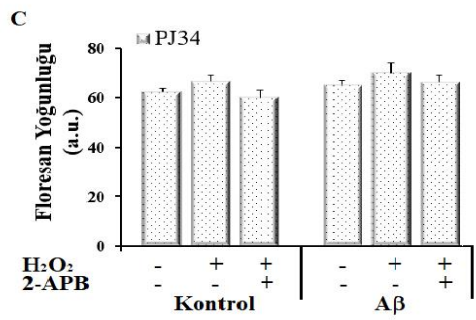
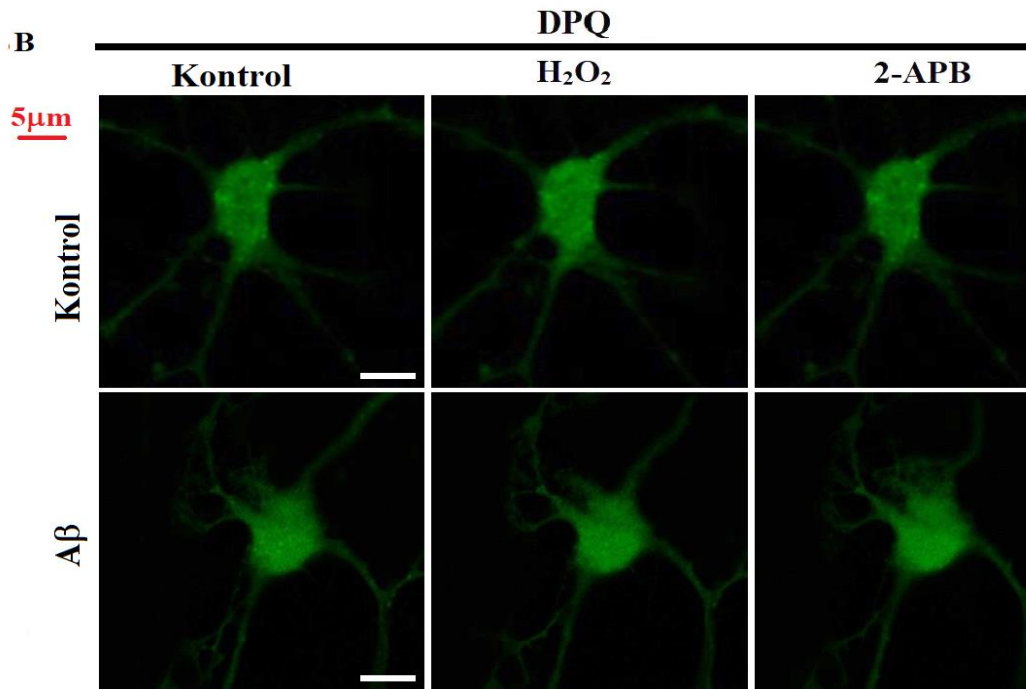
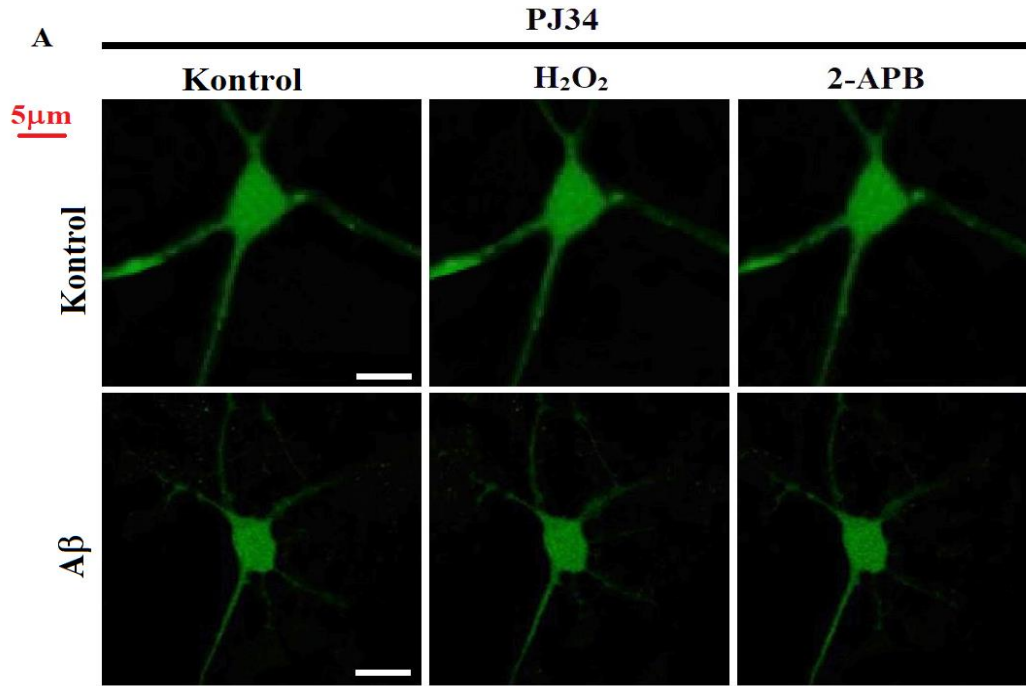


Şekil 4.19. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde intrasellüler Ca⁺² düzeyi üzerinde ACA ve GSH tedavi sonrası konfokal mikroskopta etkilerinin floresan

yoğunluğunun belirtilmesi (A-B). (Ortalama $\pm$ STD ve n=6). (^ap<0,05 ve kontrol ile ACA gruplarına kıyasla. ^bp<0,05 ve A β grubuna kıyasla. ^cp<0,05 ve A β +ACA grubuna kıyasla).

H₂O₂ ile TRPM2 stimülasyonu yapılmadan önceki durumlarına kıyasla H₂O₂ uyarımı yapılması sonucu Fluo-3-AM ile yapılan floresan yoğunluğu değerlerinin belirgin bir şekilde arttığı gözlemlendi (Resim 4.6 ve Şekil 4.19A). Bununla birlikte intrasellüler Ca⁺² düzeylerinin, ACA inhibisyonu sonrası belirgin bir şekilde azaldığı gözlemlendi (p<0,05) (Resim 4.6 ve 4.19B). Bununla birlikte bu değişikliklerin A β grubunda daha fazla olduğu gözlemlendi (p<0,05). Diğer bir ifade ile intrasellüler Ca⁺² düzeylerinin kontrol ve ACA grubuna kıyasla, A β grubunda daha yüksek olduğu gözlemlendi (p<0,05). İntrasellüler Ca⁺² düzeylerinin A β grubuna kıyasla, A β +ACA ve A β +GSH gruplarında önemli düzeyde az olduğu gözlemlendi (p<0,05).

Oksidatif stres ile aktive olan TRPM2 katyon kanal aktivasyon yolunda etkili olan PARP-1 enzim aktivitesini western blot ile gruplar arasında PARP-1 ekspresyon düzeyleri gösterildi (Şekil 4.9). PARP-1 inhibitörü olan DPQ ve PJ34 ile inkübasyon yapıldıktan sonra TRPM2 katyon kanal aktivasyonunun düzenlenmesinin nasıl değiştiğini görmek için kontrol ve A β grupları DPQ ve PJ34 ile inkübe edildi. Daha sonra TRPM2 katyon kanal aktivasyonundaki değişikliği incelemek üzere bu gruplara agonist ve antagonisti (H₂O₂ ve 2-APB) verilerek kontrol ve A β gruplar arasındaki TRPM2 katyon kanal aktivasyonu aracılığı ile [Ca⁺²]_i yoğunluğundaki değişiklik Şekil 4.20’de incelendi. Elde ettiğimiz sonuçlarda, kontrol ile A β grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (p>0.05). A β grubunda beklenen [Ca⁺²]_i yoğunluğunda artışı olmaması PARP-1 inhibitörlerinin (DPQ ve PJ34) kullanılmasından kaynaklandığı ve bu da TRPM2 kanal aktivasyonu ile PARP-1 enzim arasındaki ilişkiyi bizlere bir daha kanıtlamış oldu.

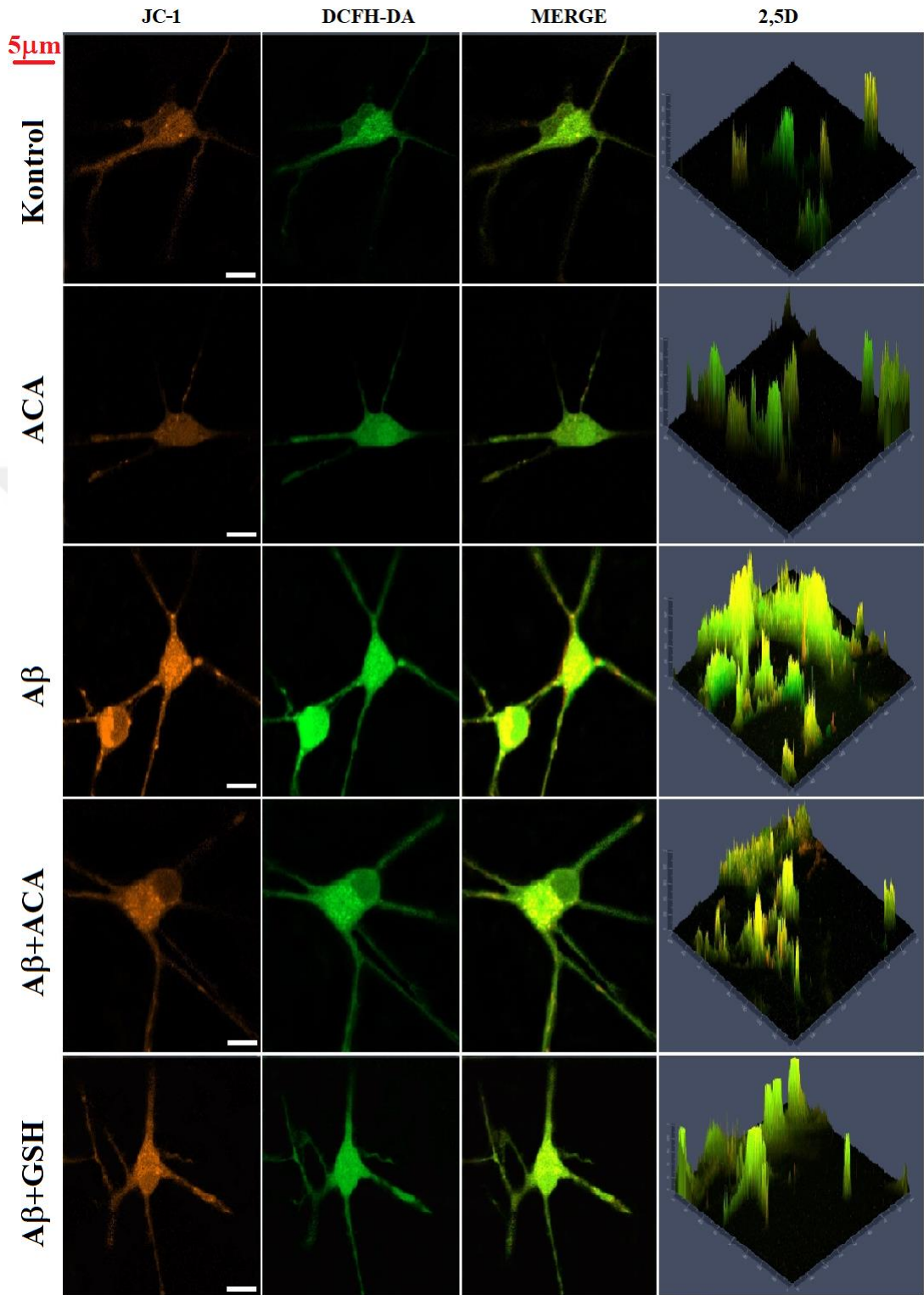


Şekil 4.20. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde PARP-1 inhibitörü olan PJ34 ve DPQ düzeyleri üzerinde ACA ve GSH tedavi sonrası intrasellüler Ca⁺² floresan yoğunluğunu konfokal mikroskopta etkilerinin görüntülenmesi. Sırasıyla PJ34 (A ve C), DPQ (B ve D)

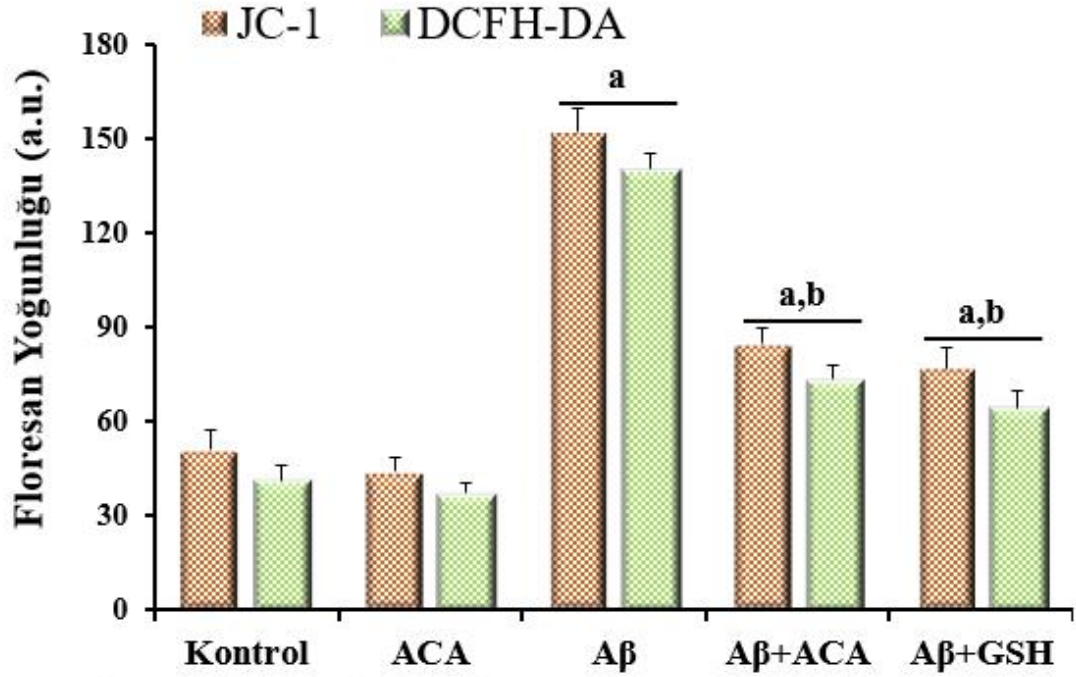
4.8.4. İntراسellüler ROT ve Mitokondriyal Depolarizasyon Lazer Konfokal Mikroskop Analiz Sonuçları

Mitokondriyal depolarizasyon ve intrasellüler ROT yoğunluğunu incelemek üzere gruplara JC-1 ve ROT (DCFH-DA) boyaları uygulanarak lazer konfokal mikroskop ile incelendi.





Resim 4.7. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde intrasellüler JC-1 ve DCFH-DA düzeyleri üzerinde ACA ve GSH tedavi sonrası konfokal mikroskopta etkilerinin görüntüleri



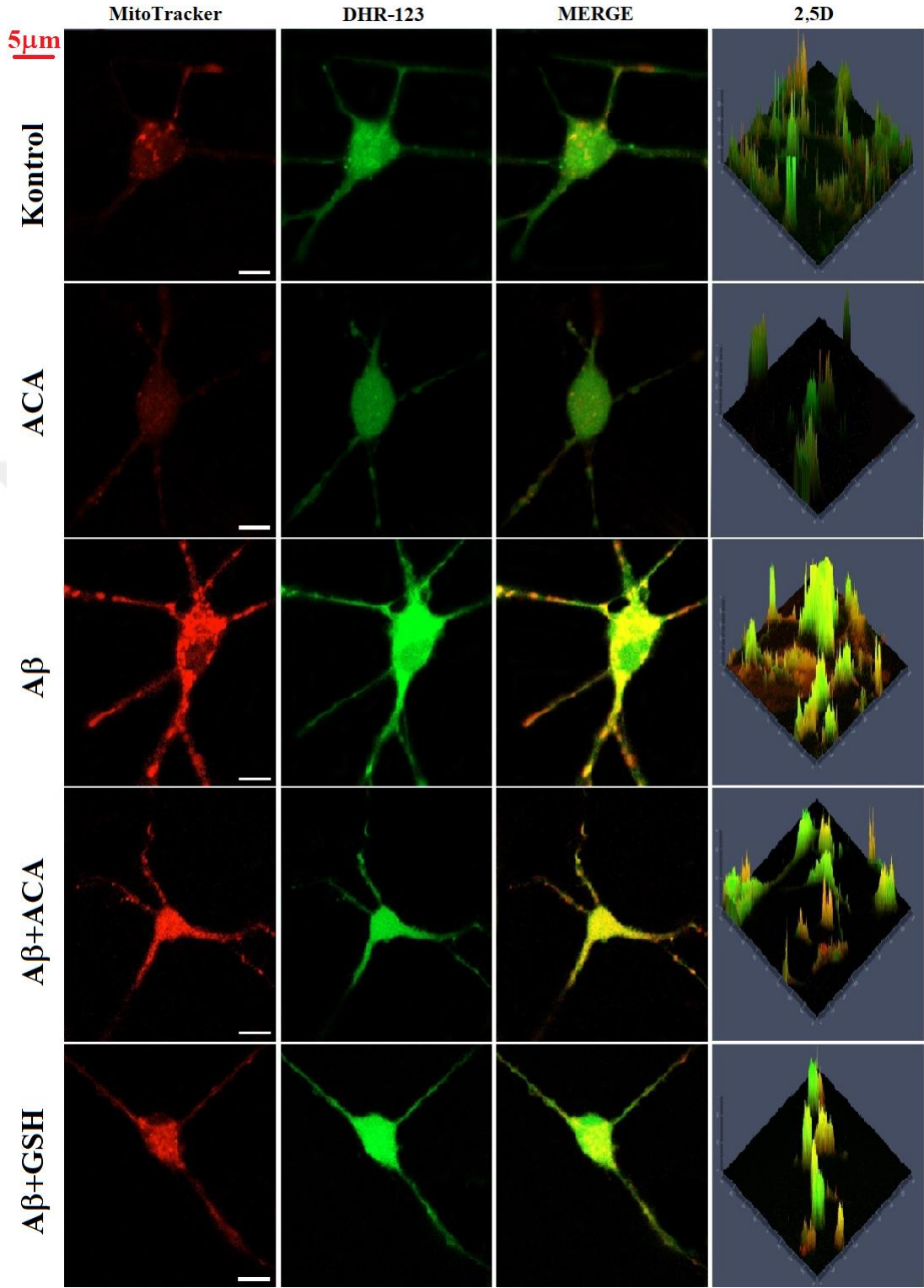
Şekil 4.21. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde intrasellüler JC-1 ve DCFH-DA düzeyleri üzerinde ACA ve GSH tedavi sonrası konfokal mikroskopta etkilerinin floresan yoğunluğunun belirlenmesi. (Ortalama $\pm$ STD ve n=6). (^ap<0,05 ve kontrol ile ACA gruplarına kıyasla. ^bp<0,05 ve A β grubuna kıyasla).

Gruplar arası DCFH-DA ve JC-1 floresan yoğunluğunun sonuçları Resim 4.7 ve Şekil 4.21’de gösterildi. Bu sonuçlar analiz edildiğinde, kontrol ve ACA gruplarına kıyasla, A β grubunda DCFH-DA ve JC-1 floresan yoğunluklarının istatistiksel olarak önemli anlamda arttığı gözlemlenirken, bu değerlerin ACA ve GSH tedavisi ardından A β +ACA ve A β +GSH gruplarında istatistiksel anlamda önemli düzeyde düştüğü gözlemlendi (p<0,05). DCFH-DA ve JC-1 floresan yoğunluğunun A β +ACA ile A β +GSH grupları arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi (p>0.05).

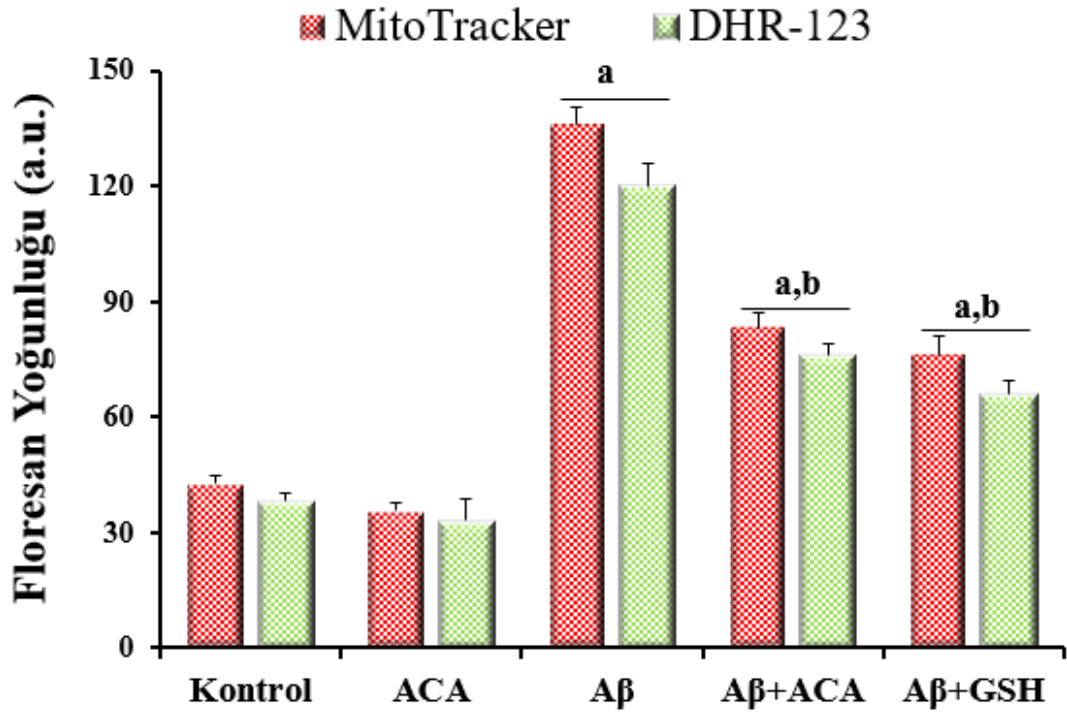
4.8.5. İntrasellüler ROT ve Mitokondriyal ROT Yoğunluğunun Lazer Konfokal Mikroskop Analiz sonuçları

Mitokondriyal ROT ve intrasellüler ROT yoğunluğunu incelemek üzere gruplara MitoTracker Red CM-H2ros ve ROT (DHR-123) boyaları uygulanarak lazer konfokal mikroskopta incelendi.





Resim 4.8. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde intrasellüler MitoTracker ve DHR-123 düzeyleri üzerinde ACA ve GSH tedavi sonrası konfokal mikroskopta etkilerinin görüntüleri



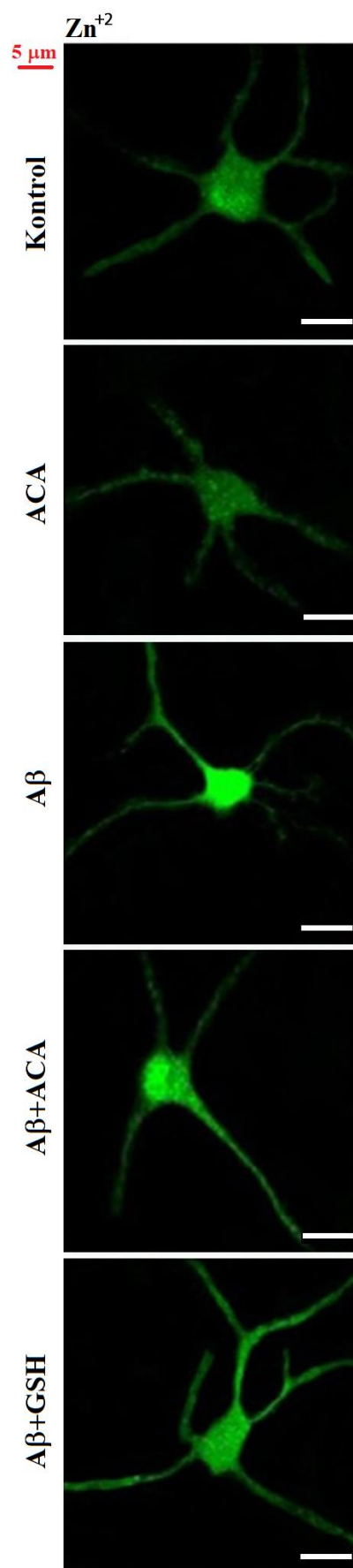
Şekil 4.22. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde intrasellüler MitoTracker ve DHR-123 düzeyleri üzerinde ACA ve GSH tedavi sonrası konfokal mikroskopta etkilerinin floresan yoğunluğunun belirtilmesi. (Ortalama $\pm$ STD ve n=6). (^ap<0,05 ve kontrol ile ACA gruplarına kıyasla. ^bp<0,05 ve A β grubuna kıyasla).

Gruplar arası intrasellüler MitoTracker ve DHR-123 floresan yoğunluğunun sonuçları Resim 4.8 ve Şekil 4.22’de gösterildi. Bu sonuçlar analiz edildiğinde, kontrol ve ACA gruplarına kıyasla, A β grubunda floresan yoğunlukları istatistiksel olarak önemli anlamda arttığı müşahade edilirken, bu değerler ACA ve GSH tedavisi ardından A β +ACA ve A β +GSH gruplarında istatistiksel anlamda önemli düzeyde düştüğü gözlemlendi (p<0,05). MitoTracker ve DHR-123 floresan yoğunluğundaki azalma A β +ACA ile A β +GSH grupları arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi (p>0.05).

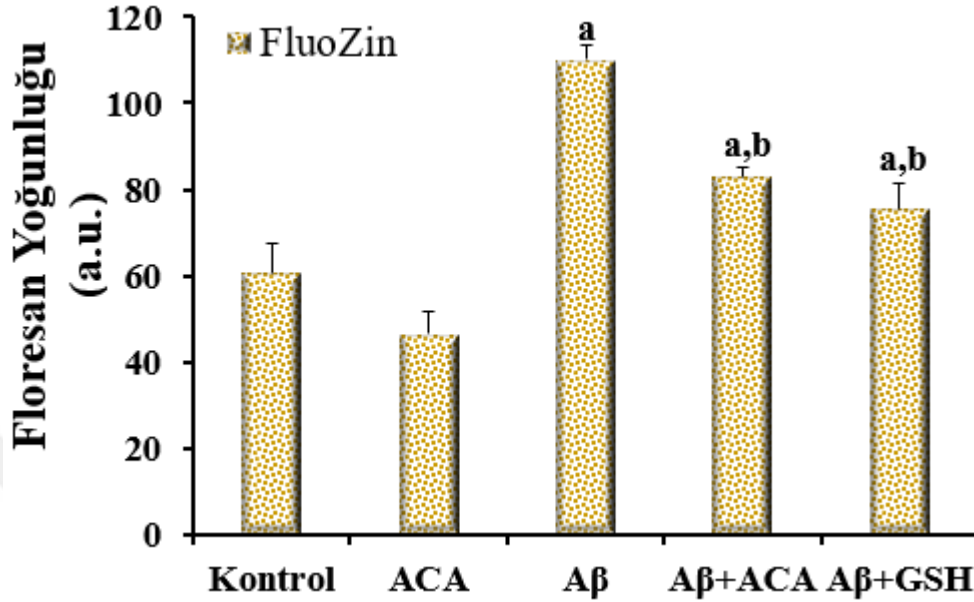
4.8.6. İntrasellüler Zn^{+2} Yoğunluğunun Lazer Konfokal Mikroskop Analiz Sonuçları

İntrasellüler Zn^{+2} yoğunluğunu ölçmek üzere FlouZin indikatör boyası uygulanarak gruplar arası farkı lazer mikroskobu ile incelendi.





Resim 4.9. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde intrasellüler Zn⁺² düzeyi üzerinde ACA ve GSH tedavi sonrası konfokal mikroskopta etkilerinin görüntüleri



Şekil 4.23. Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde intrasellüler Zn⁺² düzeyi üzerinde ACA ve GSH tedavi sonrası konfokal mikroskopta etkilerinin floresan yoğunluğunun belirtilmesi. (Ortalama $\pm$ STD ve n=6). (^ap<0,05 ve kontrol ile ACA gruplarına kıyasla. ^bp<0,05 ve A β grubuna kıyasla).

Gruplar arası intrasellüler Flouzin floresan yoğunluğunun sonuçları Resim 4.9 ve Şekil 4.23'te gösterildi. Bu sonuçlar analiz edildiğinde, kontrol ve ACA gruplarına kıyasla, A β grubunda intrasellüler Zn⁺² yoğunluk düzeyi istatistiksel olarak önemli anlamda bir artış olduğu gözlemlenirken, bu elde edilen değerler ACA ve GSH tedavisi sonrası A β +ACA ve A β +GSH gruplarında istatistiksel anlamda önemli düzeyde azalma gözlemlendi (p<0,05). Bu intrasellüler Zn⁺² floresan yoğunluğundaki azalma A β +ACA ile A β +GSH grupları arasında önemli anlamda bir fark gözlemlenmedi (p>0.05).

5. TARTIŞMA

Alzheimer Hastalığı 1907 yılında ilk olarak Alois Alzheimer tarafından keşfedildi. Yıllardır süren çalışmalar Alzheimer hastalığının özelliklerini, semptomlarını ve moleküler belirtilerini tanımlamış olmasına rağmen, hala kesin bir tanı yöntemi ve tedavisi yoktur. Ayrıca Alzheimer hastalığının ilerlemesine ve gelişmesine neden olan semptomların kesin nedenleri hala bir neticeye ulaşmamıştır. Alzheimer hastalığı ile ilişkili biyobelirteçler'in saptanması için beyin omurilik sıvısı, diğer vücut sıvılarında yapılan tanı ve PET görüntüleri ile saptanmaktadır. Farmakolojik ilaçlar, sadece hastalığın ilerlemesini yavaşlatmak ve semptomları bastırmakla sınırlıdır (173). Ancak hastanın iyileşmesini sağlamaz. Alzheimer hastalığının patolojisinde senil plaklar, A β peptid ve nörofibriler yumakların birikmesiyle karakterizedir (54). Alzheimer hastalığı, demans ve progresif bir bilişsel düşüş hafıza kaybı, unutkanlık ve davranış bozuklukları ile ortaya çıkmaktadır (174, 175). Alzheimer hastalığında oksidatif stresin senil plakların oluşumu ve nörodejenerasyon süreçlerine katkı yaptığı iyi bilinmektedir.

Merkezi sinir sistemi, doymamış yağ asidini fazla miktarda kullanması ve dokularda fazla miktarda oksijen ihtiyacı sebebiyle oksidatif ürünlerin artışına ve dolayısıyla hasara açıktır. Nöronların enerji ve oksijene fazla miktarda ihtiyaç duyması lipid peroksidasyona uğramaya elverişlidir. Antioksidan/oksidan dengesinin değişmesi fazla miktarda ROT üretimine sebep olur. Bilindiği gibi oksidatif stresin Alzheimer hastalığının etiyolojisi ve patogenezindeki rolünü araştıran çalışmalar son zamanlarda git gide artmaktadır. Hücresel ROT üretimindeki artış ile Alzheimer hastalığının patogenezi arasındaki ilişkiyi belirten çalışmalar oldukça az düzeydedir (11, 176, 177). Çalışmalarda, A β uygulamasının, ROT ve RNT yükselmesine neden olduğu belirtilmiştir.

Ca⁺² geçirgen kanalların ROT'a duyarlı aktivasyonu ile hücre membranından sitozole Ca⁺² akışını direkt tetiklemektedir. Bu sebeple, sitozolik Ca⁺² yoğunluğunun artmasının hücreyi apoptotik yolağa sürüklediği düşünülmektedir (122). En fazla Ca⁺² seviyelerinin yaşlı nöronlarda olduğu bildirilmiştir (180). Alzheimer hastalığında hücresel Ca⁺² konsatrasyonunun artmasının, nöronal kayıptan sorumlu olduğunu ifade eden çalışmalar da bulunmaktadır. Bu çalışmalarda, Alzheimer

hastalığı için hücresel Ca^{+2} düzensizliğinden yola çıkarak gelecekte terapötik hedeflerin olabileceği öngörülmektedir (16, 181, 182). Biyolojik olarak Ca^{+2} metabolik olarak birçok sistemde (örneğin; Hücre bölünmesi, fertilizasyonda yumurtanın yüzey yapısının değişiminde, hücresel apoptozise, sinaptik transmisyonunda, kas kasılmasında, intrasellüler sekonder haberci molekül) birçok rolü olan önemli bir katyondur (19, 183). İntrasellüler Ca^{+2} konsantrasyonu ($[\text{Ca}^{+2}]_i$, 50-100 nM), ekstrasellüler Ca^{+2} konsantrasyonuna ($[\text{Ca}^{+2}]_e$, 1-3 mM) göre yaklaşık 10-20 bin kat daha az olduğundan dolayı intrasellüler faaliyetlerin sürdürülmesi için bir denge gözetildiği apaçık ortadadır. Nöronların kompleks yapılarında ve çok yönlü fonksiyonlarında Ca^{+2} iyonlarının farklı görevler üstlendiği bilinmektedir. Nöronal yapılarda Ca^{+2} iyon dengesizliğinin (intrasellüler Ca^{+2} konsantrasyonun aşırı artışı) nörodejenarasyona yol açabileceği hakkındaki kayıtlar çok eskilere dayanmaktadır (184). İntrasellüler Ca^{+2} iyonun artması Alzheimer hastalığında nöronların apoptozise doğru yol aldığını belirten çalışma literatürde mevcuttur (185).

Sekiz alt üyeye sahip olan TRPM alt ailesinin bir üyesi TRPM2 kanalıdır (25). TRPM2 kanalı ADPR pirofosfataz enzimi aktivasyonu sonucu açılmaktadır. ADP pirofosfataz enzimi ADPR ve/veya oksidatif stres ile uyarılmaktadır (185). Bunu yanı sıra NAD^+ ve nitrik oksit gibi başka TRPM2 kanal aktivatörleri de vardır (27, 186). Nöronal hücrelerde TRPM2 aktivasyonunun ekstrasellüler ortamdan sitozole Ca^{+2} akışını artırarak hücrenin apoptozisine neden olduğu bildirilmiştir (187). TRPM2 katyon kanalını aktive eden kimyasallar olduğu gibi inhibe eden ACA ve 2-APB (188) kimyasallar da bulunur. Doğrudan TRPM2 kanalını bloke eden ve klinikte toksik etkisi olmadan yararlanabilecek bloker sayısı sınırlıdır.

Yukarıda da bahsedildiği gibi, Ca^{+2} iyonun miktarı ekstrasellüler intrasellüler oranla 10-20 bin (hücre çeşidine bağlı olarak) daha fazladır. İntrasellüler ortama Ca^{+2} iyonu kimyasal kapılar ve voltaja duyarlı Ca^{+2} kanalları aracılığı ile girmektedir. Yukarıda saydığımız katyon kanallar haricinde son 15-20 yıl içerisinde TRP kanalları ortaya çıkmıştır. TRP katyon kanallarının aktivasyon ve inhibisyon mekanizmaları diğer katyon kanallarından oldukça farklıdır. Diğer bir deyişle TRP katyon kanalların büyük çoğunun aktivasyonu nörotransmitterle olur, bu aktivasyonda kimyasal ve voltaj değişiklikleri etkisizdir. Mesela acı biberde çokça bulunan kapsaisin TRPV1 kanalını, hardal özütü TRPA1 kanalını, mentol ise

TRPM8 katyon kanalını aktive etmektedir. Son zamanlarda mevcut bulunan kimyasal ve voltaja duyarlı Ca^{+2} katyon kanal blokerlerinin hiçbirisi TRP katyon kanalını bloke edememektedir. Bu, günümüzdeki birçok Alzheimer ilacının Alzheimer hastalığına tedavi sunamamasının bir nedeni olabilir.

Son zamanlarda TRP kanalının nörolojik hastalıkların etiyolojisinde rol oynadığı düşünülmektedir (189, 190, 191). Özellikle bunlar içerisinde oksidatif stres ile aktive oluşu, inflamasyon ve radikal artışına duyarlılığı sebebiyle TRPM2 katyon kanalları dikkat çekmektedir. Bu kanallar, oksidatif stres ve/veya oksidatif stres redoks sistemlerinde meydana gelen oksidasyon ürünleri (Ör; ADPR) ile aktive olmaktadır. Oksidatif stres ürünlerinin yanında hipokampus hasarının da Alzheimer hastalığının etiyolojisinde rol oynadığı iyi bilinmektedir. Daha önceki çalışmada hastalığın belirtilerinin azaltılabileceği gösterilmiştir (41). Beyinde olduğu gibi hipokampal nöronlarda da TRPM2 katyon kanallarının eksprese edildiği bilinmektedir (45, 101, 192).

Bu tez çalışmasında hipokampal nöronlarda $A\beta$ ile oluşturulan in vitro Alzheimer hastalığı modelinde farklı araştırma metotları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Serbest radikal miktarının artması sonucu, intrasellüler mekanizmalarını anlamaya çalışılmıştır. Alzheimer hastalığında intrasellüler Ca^{+2} konsantrasyon artışının TRPM2 katyon kanalları aracılığı ile gerçekleşebileceğini konfokal görüntüleme yöntemini kullanarak gösterilmiştir. ADPR hücre zarını geçemediğinden, bazı analizlerde (konfokal mikroskop), PARP-1 inhibitörleri (DPQ ve PJ34) kullanılarak TRPM2 kanal aktivasyonundaki değişiklikler dolaylı yoldan test edilmiştir. Literatür taramasında, TRPM2 katyon kanalının Alzheimer hastalığı etiyolojisindeki rolü primer hipokampus kültüründe ilk kez araştırıldı.

Mitokondri; proteini, karbonhidratı ve yağları hücre içerisinde değerlendirerek ATP üretilmesinde rolü oldukça önemli intrasellüler bir organeldir. Örneğin; Araçtaki hareket için gereken enerji benzin, mazot veya gazın kullanımı sonucu elde dilmekte ve bu üretim sonucu atık ürünler oluşmakta ve bu atık egzoz yoluyla atılmaktaysa, mitokondride de benzer biçimde ATP üretimi esnasında atıklar meydana gelmektedir. Bu atıklardan bir tanesi intrasellüler ROT'tur. $[Ca^{+2}]_i$ düzeyi aşırı olduğu zaman, mitokondriyal membran olduğundan fazla depolarize olmaktadır.

Bunun sonucunda daha fazla intrasellüler ROT üretimi gözlenmektedir. İlâveten, Alzheimer hastalığında sitozolik Ca^{+2} artışına bağlı olarak mitokondriyal membran depolarizasyon oluşumunda yükselme olduğu da bildirilmiştir (170, 194). Ancak bu depolarizasyonun TRPM2 katyon kanal vasıtası ile gerçekleşip gerçekleşmediği konusunda bilgi yoktur. Bu sebeple tez çalışmamız, mitokondriyal membran depolarizasyon analizi yapıp bu halkadaki zinciri tamamlayarak moleküler mekanizmaların gün yüzüne çıkmasına katkı sağlayacaktır. Mitokondriyal membran depolarizasyonu ve intrasellüler ROT üretiminin tayininde kullanılan en mühim kimyasallar floresan boyalardır. Mitokondriyal membran depolarizasyonun kümeleşmesini gösteren boya JC-1 boyasıdır. İntrasellüler ROT üretimini ise en güzel şekilde gösteren floresan boya DHR-123'tür. Alzheimer hastalığında intrasellüler serbest $[Ca^{+2}]_i$ artışını gözlemleyerek, mitokondriyal membran depolarizasyonunu ve intrasellüler ROT üretimini araştırmayı amaçladık.

Çalışmamızın sonucunda, A β inkübe edilen grupta kontrol grubuna kıyasla intrasellüler ROT üretimi ve mitokondriyal membran depolarizasyon düzeylerinin oldukça yüksek olduğunu gözlemlendi. Bununla birlikte, ACA ve GSH tedavisi sonrası bu değerlerin, A β +ACA ve A β +GSH gruplarında, bariz bir biçimde azaldığını gözlemlendi. TRPM2 katyon kanal veya diğer Ca^{+2} katyon kanallarının engellenmesi ile intrasellüler Ca^{+2} girişinin azalması sonucu intrasellüler ROT üretimi ve mitokondriyal membran depolarizasyon seviyelerini azaldığı gayet iyi bilinmektedir. ACA ve GSH tedavisi sonucu intrasellüler ROT üretimi ve mitokondriyal membran depolarizasyon düzeylerin azalması, intrasellüler Ca^{+2} girişinin azalmasına bağlanmıştır. Bu sonucun Alzheimer dışında diğer nörodejenaratif hastalıklarda yapılan çalışmalar ile uyumlu olduğu bildirilmiştir (195, 196, 197)

Bilindiği gibi daha önceki çalışmalarda hücre membranının üzerinde bulunan Ca^{+2} kanallarının aktivasyonun normal düzeyin üzerine çıkması ile mitokondriyal membran depolarizasyonun artması sonucu oksidatif stres üretimini ve apoptotik yolağı aktive ettiği vurgulanmıştır (198). Zhao ve ark., yaptıkları çalışmada A β indüklenmesi ile nöronların sinaptik yapı ve fonksiyonlarında mitokondriyal disfonksiyonunun önemli bir rol oynadığını belirtmişlerdir (199). Zafeer ve ark., SH-SY5Y hücre hattında A β indüklenmesinin ardından yaptıkları analizlerde

mitokondriyal disfonksiyonun meydana geldiğini, hücrelere zarar verdiğini ifade etmişlerdir (200). SH-SY5Y hücre hattıyla yapılan bir başka çalışmada, SH-SY5Y hücrelerine A β indüklenmesinin ardından intrasellüler Ca⁺² ve ROT seviyesinin arttığını vurgulanmıştır (201). Çalışmamıza baktığımızda gruplar arasında apoptozis ve MTT seviyelerinde (Şekil 4.2 ve 4.3), A β grubunun apoptozis düzeylerinde (kontrol ve ACA grubuna kıyasla) anlamlı bir şekilde artış gözlemlendi. Buna ilaveten A β grubunda diğer 4 gruba kıyasla en düşük MTT düzeyi olduğu gözlemlendi. A β +ACA ve A β +GSH gruplarında ise A β grubu ile kıyaslandığında apoptozis düzeyin anlamlı bir seviyede azaldığı, MTT düzeyin ise anlamlı düzeyde yükseldiği gözlemlendi.

Çalışmamızda, TRPM2 katyon kanalının, A β ile indüklenen hipokampal nöron hücrelerinde ROT üretimi ve intrasellüler serbest Zn⁺² birikimi incelendi. GSH harcamasına bağlı olarak artan ROT vasıtasıyla hipokampal nöron hücrelerinde [Ca⁺²]_i akışının oksidatif zarara sebep olduğu ve TRPM2 katyon kanalının patolojik bir rol oynadığı teyit edildi. Yapılan bir çalışmada A β tarafından NADPH oksidazın aktivasyonu yoluyla fazla miktarda ROT üretildiğinden bahsedilmiştir (202). Yukarıda bahsedilen bilgiye ilave olarak TRPM2 katyon kanal aktivasyonu yoluyla fazla miktarda [Ca⁺²]_i artması ile nöronların mitokondrilerinde aşırı miktarda ROT üretimiyle sonuçlanabileceğini ifade edilmiştir (203). Başka bir çalışmada, Alzheimer hastalığında nöronal hücrelerde GSH yoksunluğunda yukardaki bahsettiğimiz şekilde bir düzenleyici olarak gözlemlenmiştir (204). Oksidatif stresin verdiği hasarın artmasına ilave olarak ROT, ayrıca apoptozis ve nöron ölümü için önemli olan TRPM2 katyon kanallarını aktive ederek ikincil bir haberci rolünü üstlendiği belirtilmiştir (205, 206). Aynı biçimde yapılan çalışmalarda, GSH tedavisi sonrası sıçanların hipokampal nöronlar ve dorsal kök gangliyonlarında CASP/3, CASP/9, JC-1, ROT ve apoptozis düzeylerinde ACA tedavisine bağlı, düzeylerindeki artışların azaldığı bildirilmiştir (207, 208). Bizim çalışma sonuçlarımız bu bilgiyi destekler boyuttadır.

Bilindiği gibi oksidatif stresin artmasına bağlı olarak TRPM2 katyon kanalının hücre membranında aktivasyonu ve ekspresyonunun artmaktadır (150). Bu katyon kanal aktivasyonunda büyük önem sahibi olan çekirdekteki DNA hasarı ve

PARP-1 enzim aktivasyonu yoluyla üretilen ADPR sahiplenir. ADPR ise TRPM2 katyon kanalının yapısında bulunan enzimatik nüdx alanına bağlanarak kanal açılır ve $[Ca^{+2}]_i$ yoğunluğunda artış gözlenir (13, 41, 209, 210). ADPR etkisinin anlamak için yapılan çalışmalarda TRPM2 katyon kanallının aktivasyonu üzerinde etkisi kanal blokeri olan (ACA ve 2-APB) kullanılarak kanıtlanmıştır (32, 132, 211). Voltaja duyarlı kalsiyum kanalı ve diğer kanalların rolü, hipokampus de $[Ca^{+2}]_i$ akışının sebep olduğu belirtilmiştir (212). Buna ek olarak, TRPM2 katyon kanal kaynaklı hipokampal nöronlarda Ca^{+2} girişinin sebep olduğu apoptozis mekanizmaları üzerinde araştırmalar sürmekle beraber, fazla miktarda TRPM2 katyon kanal aktivasyonuna bağlı olarak $[Ca^{+2}]_i$ yoğunluğundaki artışı hipokampus de apoptozise sebep olduğunu söyleyen çalışmalarda literatürde vardır (212, 213).

Çalışmamızda; $[Ca^{+2}]_i$ analizleri sonuçlarında A β inkübasyonun hipokampal nöron hücrelerinde TRPM2 katyon kanalı vasıtasıyla $[Ca^{+2}]_i$ düzeylerinin nasıl değiştiği araştırıldı. Grupların her birinde Fura-2-AM kullanarak $[Ca^{+2}]_i$ düzeylerin nasıl değiştiğini baktığımızda (Şekil 4.1), Mitokondriyal kompleks I inhibitörü olan ve Alzheimer hastalığından meydana gelen A β inkübasyonun ardında oluşturduğumuz gruplar arasında anlamlı bir fark meydana geldiği gözlemlendi. İlâveten intrasellüler GSH eksikliğinin $[Ca^{+2}]_i$ yoğunluğunun artmasına ekstradan destek olduğu tespit edildi. $[Ca^{+2}]_i$ yoğunluğunu ölçmek için kullandığımız kalsiyum sinyali cihazında TRPM2 katyon kanal agonisti (CpX) ve blokörü (ACA) kullanarak kanalın aktivasyonu ile birlikte $[Ca^{+2}]_i$ yoğunluğunun artışı ve azalışındaki TRPM2 katyon kanalının öneminin ne kadar olduğu gösterildi. İlâveten lazer konfokal mikroskopunda hipokampal nöron hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ yoğunluğun fotoğraflandı (Şekil 4.19). Ca^{+2} göstergesi olan Fluo-3-AM ile hipokampal nöron hücrelerinde yapılan görüntüleme sonuçları, Plate reader cihazında elde ettiğimiz sonuçlarımızı doğrulamıştır. Bununla beraber çalışmamızda sitozol de TRPM2 katyon kanalının açılmasına sebep olan ADPR nasıl arttığını görüntülemek için ADPR üretim yolağında önemli olduğu bilinen PARP-1 enzimi için; hücrelerde bulunan PARP-1 enzim inhibitörü olarak bilinen DPQ ve PJ34 kullanıldı. TRPM2 katyon kanal aktivasyonun ayarlamasının neticesinde $[Ca^{+2}]_i$ yoğunluğundaki artışı ayarlanabileceği gösterildi (Şekil 4.20). Bu sonuçlarımız; A β inkübasyonun sonucu

hipokampal nöron hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ yoğunluğunun artışında TRPM2 katyon kanal aktivasyonunun rol oynadığı kanıtlandı.

Çalışmamızda A β inkübasyon yapılan hipokampal nöron hücrelerinde apoptozis düzeylerinde bir artış gözlemlenmenin ardında TRPM2 ve PARP-1 western blot yöntemi ile kanal ekspresyon düzeylerini inceledik. Western blot analizlerinde elde ettiğimiz veriler A β inkübasyon edilen gruplarda TRPM2 katyon kanal aktivasyonu aracılığı ile $[Ca^{+2}]_i$ yoğunluğundaki, TRPM2 katyon kanal ve PARP-1 ekspresyon düzeylerinde artışın olduğunu gözlemledik. Ca^{+2} göstergesi olan Fluo-3-AM ve Fura-2-AM kullanılarak çalışmamızın sonuçlarında gruplarda TRPM2 katyon kanal antagonisti (ACA ve 2-APB) ve PARP-1 blokleri (DPQ ve PJ34) kullanıldı ve $[Ca^{+2}]_i$ yoğunluğunu düşürdüğünü gördük. Bu sebepten dolayı yapılan üç analiz sonuçları, hipokampal nöronlarda $[Ca^{+2}]_i$ yoğunluğundaki artışında TRPM2 katyon kanal rolünün olduğunu onayladı. İlâveten Zn^{+2} 'nin bazı antioksidan enzimlerin bir bileşenidir, fakat artan intrasellüler Zn^{+2} 'nin JC-1 aktivasyonu aracılığı ile oksidan rolünün olduğu literatürde ifade edilmiştir (12, 214). İntrasellüler Zn^{+2} yoğunluğu ile nöronal apoptozis ve ölümdaki TRPM2 katyon kanal potansiyeli arasında doğru bir orantı vardır. İntrasellüler Zn^{+2} aracılığı ile tetiklenen oksidatif stresin birtakım hücrelerde GSH tedavisi ile azaldığı ifade edilmiştir (215). Çalışmamızda; Kontrol grubu ve ACA ve GSH eklenen gruplar dışında diğer grupların intrasellüler FluoZin floresan yoğunluğunda bariz bir artışın olduğu gözlemlendi (Şekil 4.23B). İlâveten A β grubu öteki gruplara kıyaslandığında intrasellüler Zn^{+2} floresan yoğunluk düzeyi en yüksek olduğu gözlemlenir iken ACA ve GSH ile inkübe edilen gruplarda ise A β grubuna kıyasla önemli seviyede intrasellüler FluoZin floresan yoğunluğunun düştüğü gözlemlendi. Yapılan bir çalışmada, hipokampal nöron hücrelerinde intrasellüler Zn^{+2} yoğunluğunun artmasıyla intrasellüler PKC aracılığı MEK/ERK yollarını indükleyerek intrasellüler ROT artışı ile birlikte çekirdekte ADPR üretiminin arttığı ve artan ADPR da TRPM2 katyon kanal aktivasyonunu artırarak $[Ca^{+2}]_i$ yoğunluğunu artırdığı ve böylece hipokampal nöron hücrelerinde apoptozise sebep olduğu ifade edilmiştir (216).

Çalışmamızda A β ile indüklenen hipokampal nöron hücrelerinde mitokondriyal depolarizasyon, ROT, intrasellüler Ca^{+2} ve Zn^{+2} birikmesi ve netice olarak hipokampal nöron hücrelerinin apoptozise gitmesine sebep TRPM2 katyon

kanalının ciddi bir rolü oynadığı görüldü. Bir de gruplarda PARP-1 inhibitörü (PJ34 ve DPQ) ve TRPM2 katyon kanal antagonisti (ACA ve 2-APB) kullanılması hipokampal nöron hücrelerinde ROT, mitokondriyal membran depolarizasyonu ve intrasellüler Ca^{+2} konsantrasyonunu normal değerlere getirerek hücreleri üzerinde koruyucu olduğu gözlemlendi. Bu bulgular Alzheimer hastalığının patolojisinde ve GSH eksikliğine bağlı olarak hipokampal nöron hücrelerinde oluşabilecek oksidatif toksisitede TRPM2 katyon kanalının çok ciddi bir rolünün olduğunu gösterdi.

Apoptozis, organizmada dokuların dengesi ve normal şekilde gelişimi için kaygı veren öneme sahip ve hücre ölümünde rol alan genlerin düzenlendiği olgudur. Genelde iki apoptotik yolak bilinirken son zamanlarda bu iki yola ek olarak başka bir apoptotik yolağın da bahsedilmektedir. Bu yolağın 1- Hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörü (Ekstrinsik yol), 2- mitokondri ile ilişkili hücre ölümü (intrinsik yol) 3- endoplazmik retikulum üzerinde çalışan yolak tespit edilmiştir (217). Bu 3'cü yolak temeli sitozol de azalan serbest Ca^{+2} konsantrasyonunun endoplazmik retikulumu tetikleyici etkisi ile gerçekleştiği şeklinde karşımıza çıkmaktadır (218). Apoptotik yolağın en büyük öğeleri, kaspazlar olarak isimlendirilen ve çok sayıda protein substratlarını yıkım yeteneğine sahip protein ailesidir. Hücrenin yapısı ve fonksiyonun bozulması kaspaz aktivitesi ile ilişkili ve kaspaz aktivitesi sonucu hücre ölümü meydana gelmektedir (219). Apoptozis zamanında indükleyici olarak kaspaz 8, 9 ve 10 rol alan kaspaz aile üyeleri olarak bilinirken, sürecin devam etmesinde sorumlu kaspaz üyeleri ise kaspaz 3, 6 ve 7 enzimlerdir (220). Hücre yapısının bozulmasında sorumlu kaspaz 3, hücrenin bazı temel proteinlerinin parçalanmasına ve DNA zincirindeki hasarın oluşmasına sebep olmaktadır (221). Oksidatif stresin oluşmasına sebep olan aşırı ROT üretimi, hücre hasarı ve apoptozisin başlatılmasında etkin bir faktördür (222). Yukarıda da bahsedildiği gibi nörodejenaratif hastalıklarda sitozole aşırı Ca^{+2} artışı mitokondriyal membran depolarizasyonun artışına sebep olarak üç yolağı uyarmaktadır. Bu yolağın; 1) Kaspaz aktivitesi ile oluşan apoptozis, 2) intrasellüler ROT üretiminin artışı 3) Mitokondride aşırı meydana gelen oksidatif stres ürünleri ile aktive olan kanalların çok fazla açılması. Stabil molekül olan H_2O_2 hücrelerde üretilen ROT 'un hücre zarından geçebilen bir şeklidir. Bu sebeple oksidatif stres modellemesinde H_2O_2 maruziyeti kanal açıcı olarak uygulanabilir (163, 223, 224). Nörodejenaratif hastalıklar ile H_2O_2 üretimi arasında etiyolojik ait

sayıda çalışma bulunmaktadır (225, 226). Oksidatif stres ve H₂O₂ maruz kalan kültür nöronlarında [Ca⁺²]_i artışı, mitokondriyal disfonksiyonu ve PARP-1 enzim aktivasyonuna sebep olarak, apoptozis gibi gecikmeli nöron ölümü ve nekrozu başlattığı bildirilmiştir (227, 228). Bu çalışmamızda da aynı şekilde Alzheimer hastalıklı hipokampal nöronlarda oksidatif stres artmasına bağlı olarak kaspaz-3 ve kaspaz-9 ekspresyon düzeyinde artışın olduğu gözlemlendi. Aynı şekilde kuyucuk okuyucu cihazında yapılan analizde kaspaz-3 ve kaspaz-9 enzim aktivitesinde de artış olduğu gözlemlendi. Elde edilen bu sonuçlar, kontrol ve ACA grubuna kıyasla, A β grubunda kaspaz-3 ve kaspaz-9 enzim aktivasyonları arttığı gözlemlenirken (p<0,05), bu değerler ACA ve GSH tedavisi sonrası A β +ACA ve A β +GSH gruplarında azaldığı gözlemlendi (p<0,05). Bu elde edilen sonuçlar, intrasellüler mitokondriyal ROT üretimi azalması ve apoptotik yolların baskılanmasına sebep olmuştur.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan Alzheimer hastalığı modelinde, giriş bölümündeki amaç doğrultusunda yukarıda belirtilen hedefler, yapılan analizler neticesinde aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır.

> A β ile oluşturulan Alzheimer hastalığı modelinde $[Ca^{+2}]_i$ aşırı miktarda artırmaktadır. Bu artan $[Ca^{+2}]_i$ miktarındaki değişikliği gruplar arası farklılığı incelemek için TRPM2 katyon kanal agonist/antagonisti kullanıldı. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, hipokampal nöronlarda $[Ca^{+2}]_i$ artmasında TRPM2 katyon kanalının önemli bir rol oynadığı belirlendi.

> Hipokampal nöronlarda $[Ca^{+2}]_i$ ve intrasellüler Zn^{+2} aşırı artması mitokondriyal membran depolarizasyonu, kaspaz-3 ve kaspaz-9 enzim aktivasyonuna sebep olduğunu görüldü. Bundan dolayı hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan Alzheimer hastalığı modelinde apoptozis düzeylerinin arttırdığı ve hücre canlılık oranını azalttığı görüldü.

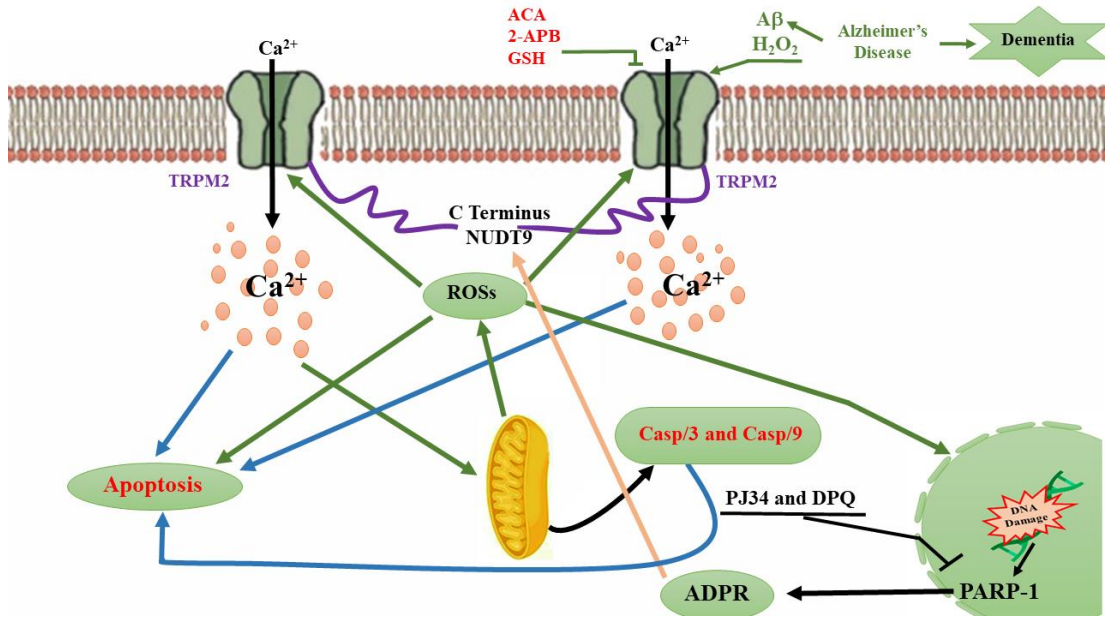
> A β ile oluşturulan Alzheimer hastalığı modelinde intrasellüler GSH miktarını azalttığına neden olduğu bilinmekle birlikte, çalışmamızda oksidan ve antioksidan analizlerinde elde ettiğimiz sonuçlar hipokampal nöron hücrelerinin A β maruziyetin ardından oksidatif stres düzeylerini arttırırken, antioksidan düzeyini düşüğü görüldü.

> Hipokampal nöronlarda A β ile oluşturulan Alzheimer hastalığı modelinde nöron hücre membranındaki TRPM2 katyon kanal ekspresyonunun atması öncü olmakla birlikte TRPM2 aktivasyonunda önemli olan ADPR'in önde gelen birleşigi PARP-1 ekspresyon düzeyi de artığı görüldü.

> A β uygulanması ile GSH eksikliğinde oluşan hasarın azaltmak için GSH kullanımı oksidan/antioksidan dengesinin ayarlanması veya TRPM2 katyon kanal antagonistleri kullanarak hipokampal nöron hücrelerinde hasarı azalttığı gözlemlendi.

Sonuç olarak, Alzheimer hastalığını oluşumunda oksidatif stresin zararlı etkilerinin TRPM2 katyon kanal aktivasyonu ve ekspresyon düzeylerini artırırken,

elde edilen değerler üzerinde TRPM2 katyon kanal antagonistleri ve GSH uygulamasını olumlu sonuçları TRPM2 katyon kanal düzenlemesini yanı sıra TRPM2 katyon kanal aşırı miktarda aktivasyonu ile sitozole aşırı Ca^{2+} girmesini engelleyerek bu hücrelerin apoptozis düzeylerini azaltmada ciddi rol oynayabileceği gösterildi. Alzheimer hastalığında TRPM2 kanalının rolü, bu katyon kanal inhibisyonu ve GSH tedavisi Alzheimer hastalığında tedavi olarak kullanılabilirliği konusunda literatürde deneysel bir çalışmanın olmaması tez çalışma sonuçlarımız bu konudaki boşluğu doldurmuştur. Elde etmiş olduğumuz sonuçlarımız TRPM2 aktivasyonu ile gelişen nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde TRPM2 kanal blokerleri ve antioksidanlar (GSH) potansiyel ilaç olarak kullanılabilirliğini gerçeğini de meydana getirmiştir. Bu elde edilen sonuçlar insan klinik çalışmalar ile doğrulanması, TRPM2 katyon kanal inhibisyonunun Alzheimer hastalığı ve benzer hastalıkların tedavisinde kullanmak üzere önemli kaynak oluşturulacaktır.



Şekil 6.1. Hipokampal nöron hücrelerinde Aβ ile oluşturulan alzheimer hastalık modelinde, oksidatif stres ve apoptozis yolları üzerindeki TRPM2 katyon kanal antagonistlerinin muhtemel koruyucu etkisi. ACA, 2-APB ve GSH tedavilerinin TRPM2 katyon kanal aktivasyonunu inhibe ederken, H₂O₂ ve DNA hasarı sonucu oluşan PARP-1'in aktivasyonunun sebep olduğu ADPR TRPM2 katyon kanalını uyarmaktadır. TRPM2 katyon kanal stimülasyonu ile artan sitozolik serbest Ca^{2+} miktarı, mitokondriyal membran

depolarizasyonunun artmasına sebep olur. Buna cevap olarak, membran depolarizasyonunun artması, sitozolik ROT ve mitokondriyal ROT'la birlikte oksidatif stres daha fazla ve sitozolik GSH ve GSH-Px düzeylerinin azalmasına sebep olur. A β ve TRPM2 katyon kanal aktivasyonun aracılık ettiği daha fazla Ca⁺² akışı, hipokampal nöronlarında kaspaz yollarının aktiveleri ile apoptozise ve hücre ölümüne sebep olur. A β , oksidan ve apoptotik yolka üzerine etkileri, TRPM2 antagonistlerinin (ACA ve 2-APB), PARP-1 inhibitörleri (PJ34 ve DPQ) ve GSH tedavileri ile bu sonuçlar değiştirip düzeltilebilir.



7.KAYNAKLAR

1. Heemels M-T. Neurodegenerative diseases. Nature 2016; 539:179.
2. Taylor JP, Hardy J, Fischbeck KH. Toxic proteins in neurodegenerative disease. Science 2002; 296:1991–1995.
3. Caselli RJ. Current issues in the diagnosis and management of dementia. Semin Neurol 2003; 23:231–240.
4. Knopman DS, Boeve BF, Petersen RC. Essentials of the proper diagnoses of mild cognitive impairment, dementia, and major subtypes of dementia. Mayo Clin Proc 2003; 78:1290–1308.
5. Scheltens P, Blennow K, Breteler MMB, de Strooper B, Frisoni GB, Salloway S et al. Alzheimer's disease. Lancet 2016; 388:505-517.
6. Hooijmans CR, Kiliaan AJ. Fatty acids, lipid metabolism and Alzheimer pathology. Eur J Pharmacol 2008; 585:176-196.
7. Lambert MA, Bickel H, Prince M, et al. Estimating the burden of early onset dementia; systematic review of disease prevalence. Eur J Neurol 2014; 21:563-569.
8. Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease. Eur J Neurol. 2018; 25(1):59-70.
9. Martins RN, Villemagne V, Sohrabi HR, Chatterjee P, Shah TM, Verdile G, Fraser P, Taddei K, Gupta VB, ve ark. Alzheimer's Disease: A Journey from Amyloid Peptides and Oxidative Stress, to Biomarker Technologies and Disease Prevention Strategies-Gains from AIBL and DIAN Cohort Studies. Journal of Alzheimer's Disease, 2018; 62 (3): 965-992.
10. Nelson PT, Braak H, and Markesbery WR. Neuropathology and cognitive impairment in Alzheimer disease: a complex but coherent relationship. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology, 2009; 68 (1): 1-14.

11. Butterfield DA, and Halliwell B. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. *Nature Reviews: Neuroscience*, 2019; 20 (3): 148-160.
12. Cheignon C, Tomas M, Bonnefont-Rousselot D, Faller P, Hureau C, and Collin F. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biol*, 2018; 14 450-464
13. Sajjad N, Wani A, Sharma A, Ali R, Hassan S, Hamid R, Habib H, and Ganai BA. *Artemisia amygdalina* Upregulates Nrf2 and Protects Neurons Against Oxidative Stress in Alzheimer Disease. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2019.
14. Hecquet CM, and Malik AB. Role of H₂O₂-activated TRPM2 calcium channel in oxidant-induced endothelial injury. *Thrombosis and Haemostasis*, 2009; 101 (4): 619-625.
15. Kirischuk S. and Verkhratsky A. Calcium homeostasis in aged neurones. *Life Sciences*, 1996; 59 (5-6): 451-459.
16. Alzheimer's Association Calcium Hypothesis W. Calcium Hypothesis of Alzheimer's disease and brain aging: A framework for integrating new evidence into a comprehensive theory of pathogenesis. *Alzheimers Dement*, 2017; 13 (2): 178-182 e117.
17. Huang WJ, Zhang X, and Chen WW. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomed Rep*, 2016; 4(5): 519-522.
18. Popugaeva E, Pchitskaya E, and Bezprozvanny I. Dysregulation of neuronal calcium homeostasis in Alzheimer's disease - A therapeutic opportunity? *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017; 483 (4): 998-1004
19. Fliniaux I, Germain E, Farfariello V, and Prevarskaya N. TRPs and Ca(2+) in cell death and survival. *Cell Calcium*, 2018; 69 4-18.
20. Verkhratsky A, Trebak M, Perocchi F, Khananshvili D, and Sekler I. Crosslink between calcium and sodium signalling. *Experimental Physiology*, 2018; 103 (2): 157-169.

21. Khachaturian ZS. Hypothesis on the regulation of cytosol calcium concentration and the aging brain. *Neurobiology of Aging*, 1987; 8(4): 345-346.
22. Lim D, Rodriguez-Arellano JJ, Parpura V, Zorec R, Zeidan-Chulia F, Genazzani AA, and Verkhatsky A. Calcium signalling toolkits in astrocytes and spatio-temporal progression of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*, 2016; 13 (4): 359-369.
23. Popugaeva E, Pchitskaya E, and Bezprozvanny I. Dysregulation of neuronal calcium homeostasis in Alzheimer's disease - A therapeutic opportunity? *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017; 483 (4): 998-1004.
24. Nazıroğlu M. TRPM2 cation channels, oxidative stress and neurological diseases: where are we now? *Neurochem Res*. 2011; 36(3):355-66.
25. Hantute-Ghesquier A, Haustrate A, Prevarskaya N, and Lehen'kyi V. TRPM Family Channels in Cancer. *Pharmaceuticals* (Basel, Switzerland), 2018; 11 (2).
26. Perraud AL, Fleig A, Dunn CA, Bagley LA, Launay P, Schmitz C, Stokes AJ, Zhu Q, Bessman MJ, Penner R, Kinet JP, Scharenberg AM. ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature*. 2001; 411(6837):595-9.
27. Kolisek M, Beck A, Fleig A, Penner R. Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels. *Mol Cell*. 2005; 18(1):61-9.
28. Aarts MM, and Tymianski M. TRPMs and neuronal cell death. *Pflügers Archiv. European Journal of Physiology*, 2005; 451 (1): 243-249.
29. Sita G, Hrelia P, Graziosi A, Ravegnini G, and Morroni F. TRPM2 in the Brain: Role in Health and Disease. *Cells*, 2018; 7 (7).
30. Hill K, Benham CD, McNulty S, Randall AD. Flufenamic acid is a pH-dependent antagonist of TRPM2 channels. *Neuropharmacology* 2004b; 47(3):450-460.

31. Harteneck C, Frenzel H, and Kraft R. N-(p-amylocinnamoyl)anthranilic acid (ACA): a phospholipase A(2) inhibitor and TRP channel blocker. *Cardiovascular Drug Reviews*, 2007; 25 (1): 61-75.
32. Togashi K, Inada H, Tominaga M. Inhibition of the transient receptor potential cation channel TRPM2 by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). *Br J Pharmacol*. 2008; 153(6):1324-30.
33. Nazıroğlu M, Lückhoff A, Jüngling E. Antagonist effect of flufenamic acid on TRPM2 cation channels activated by hydrogen peroxide. *Cell Biochem Funct*. 2007;25(4):383-387.
34. Wang X, Wang W, Li L, Perry G, Lee HG, and Zhu X. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014; 1842 (8): 1240-1247.
35. Yan MH, Wang X, and Zhu X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 2013; 62 90-101
36. Ali T, Kim T, Rehman SU, Khan MS, Amin FU, Khan M, Ikram M, and Kim MO. Natural Dietary Supplementation of Anthocyanins via PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 Pathways Mitigate Oxidative Stress, Neurodegeneration, and Memory Impairment in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology*, 2018; 55 (7): 6076-6093.
37. Martire S, Mosca L, and d'Erme M. PARP-1 involvement in neurodegeneration: A focus on Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2015; 146-148 53-64.
38. Turunc Bayrakdar E, Uyanikgil Y, Kanit L, Koylu E, and Yalcin A. Nicotinamide treatment reduces the levels of oxidative stress, apoptosis, and PARP-1 activity in Abeta(1-42)-induced rat model of Alzheimer's disease. *Free Radical Research*, 2014; 48 (2): 146-158
39. Nazıroğlu M. New molecular mechanisms on the activation of TRPM2 channels by oxidative stress and ADP-ribose. *Neurochemical Research*, 2007; 32 (11): 1990-2001.

40. Övey İS, Nazıroğlu M. Effects of homocysteine and memantine on oxidative stress related TRP cation channels in in-vitro model of Alzheimer's disease. *J Recept Signal Transduct Res.* 2020; 1-11.
41. Balaban H, Nazıroğlu M, Demirci K, Övey İS. The Protective Role of Selenium on Scopolamine-Induced Memory Impairment, Oxidative Stress, and Apoptosis in Aged Rats: The Involvement of TRPM2 and TRPV1 Channels. *Mol Neurobiol.* 2017; 54(4):2852-2868.
42. Nazıroğlu M, Demirdaş A. Psychiatric Disorders and TRP Channels: Focus on Psychotropic Drugs. *Curr Neuropharmacol.* 2015; 13(2):248-57.
43. Takada Y, Numata T, and Mori Y. Targeting TRPs in neurodegenerative disorders. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2013; 13 (3): 322-334.
44. Yamamoto S, Wajima T, Hara Y, Nishida M, and Mori Y. Transient receptor potential channels in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007; 1772 (8): 958-967.
45. Olah ME, Jackson MF, Li H, Perez Y, Sun HS, Kiyonaka S, Mori Y, Tymianski M, and MacDonald JF. Ca²⁺-dependent induction of TRPM2 currents in hippocampal neurons. *Journal of Physiology*, 2009; 587 (Pt 5): 965-979
46. Angelova PR, Abramov AY. Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration. *FEBS Lett.* 2018; 592(5):692-702.
47. Abramov, Andrey Y. and Angelova, Plamena R. "Mitochondrial dysfunction and energy deprivation in the mechanism of neurodegeneration" *Turkish Journal of Biochemistry*, vol. 44, no. 6, 2019, pp. 723-729.
48. Abramov AY. Different faces of neurodegeneration. *FEBS J.* 2018; 285(19):3544-3546.
49. Angelova PR, Abramov AY. Alpha-synuclein and beta-amyloid - different targets, same players: calcium, free radicals and mitochondria in the mechanism of neurodegeneration. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017; 483(4):1110-1115.

50. Angelova PR, Esteras N, Abramov AY. Mitochondria and lipid peroxidation in the mechanism of neurodegeneration: Finding ways for prevention. *Med Res Rev.* 2021; 41(2):770-784.
51. Bondi, M. W., Edmonds, E. C., & Salmon, D. P. Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future. *J Int Neuropsychol Soc*, 2017; 23(9-10), 818-831.
52. Masters, C. L., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C. C., Sperling, R. A., & Cummings, J. L. Alzheimer's disease. *Nat Rev Dis Primers*, 2015; 1, 15056.
53. Blennow, K., de Leon, M. J., & Zetterberg, H. Alzheimer's disease. *Lancet*, 2006; 368(9533), 387-403.
54. Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. Alzheimer's disease. *Lancet.* 2011; 377(9770):1019-31.
55. Alzheimer's Association. 2015 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 2015; 11(3):332-84.
56. Association, A. s. 2019 Alzheimer's Disease Facts and Figures. *Alzheimer's and Dementia*, 2019; 15(3).
57. Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 2020 Mar 10.
58. Fjell AM, McEvoy L, Holland D, Dale AM, Walhovd KB; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. What is normal in normal aging? Effects of aging, amyloid and Alzheimer's disease on the cerebral cortex and the hippocampus. *Prog Neurobiol.* 2014; 117:20-40
59. Jaroudi W, Garami J, Garrido S, Hornberger M, Keri S, Moustafa AA. Factors underlying cognitive decline in old age and Alzheimer's disease: the role of the hippocampus. *Rev Neurosci.* 2017; 28(7):705-714.
60. Sun XC, Li L, Zhang M, Li WB, Li QJ, Zhao L. [Division of CA1, CA3 and DG regions of the hippocampus of Wistar rat]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi.* 2012; 28(2):189-92.
61. Opitz B. Memory function and the hippocampus. *Front Neurol Neurosci.* 2014; 34:51-9.
62. Dalvi, A. Alzheimer's disease. *Dis Mon*, 2012; 58(12), 666-677.

63. Mandelkow E. Alzheimer's disease. The tangled tale of tau. *Nature*. 1999; 402(6762):588-9.
64. Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1991; 349(6311):704-6.
65. Snyder HM, Bain LJ, Brickman AM, Carrillo MC, Esbensen AJ, Espinosa JM, Fernandez F, Fortea J, Hartley SL, Head E, Hendrix J, Kishnani PS, Lai F, Lao P, Lemere C, Mobley W, Mufson EJ, Potter H, Zaman SH, Granholm AC, Rosas HD, Strydom A, Whitten MS, Rafii MS. Further understanding the connection between Alzheimer's disease and Down syndrome. *Alzheimers Dement*. 2020; 16(7):1065-1077.
66. Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Müller-Hill B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*. 1987; 325(6106):733-6.
67. Serrano-Pozo A, Das S, Hyman BT. APOE and Alzheimer's disease: advances in genetics, pathophysiology, and therapeutic approaches. *Lancet Neurol*. 2021; 20(1):68-80.
68. Cacace R, Sleegers K, Van Broeckhoven C. Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. *Alzheimers Dement*. 2016; 12(6):733-48.
69. O'Brien RJ, Wong PC. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci*. 2011; 34:185-204.
70. Reiss AB, Arain HA, Stecker MM, Siegart NM, Kasselmann LJ. Amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *Rev Neurosci*. 2018; 29(6):613-627.
71. Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev*. 2004; 84(2):361-84.
72. Naseri NN, Wang H, Guo J, Sharma M, Luo W. The complexity of tau in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2019; 705:183-194.

73. Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron*. 1989; 3(4):519-26.
74. Kametani F, Hasegawa M. Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci*. 2018; 12:25.
75. Arnsten AFT, Datta D, Del Tredici K, Braak H. Hypothesis: Tau pathology is an initiating factor in sporadic Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2021; 17(1):115-124.
76. Bakota L, Brandt R. Tau Biology and Tau-Directed Therapies for Alzheimer's Disease. *Drugs*. 2016; 76(3):301-13.
77. Montell, C., and G.M. Rubin. Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: A putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*, 1989; 2(4): 1313–1323.
78. Clapham DE, Runnels LW, Strübing C. The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci*. 2001; 2(6):387-96.
79. Liedtke WB. TRP ion channel function in sensory transduction and cellular signaling cascades: CRC Press; 2006.
80. Moran MM. TRP Channels as Potential Drug Targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2018; 58:309-330.
81. Caterina, M., Schumacher, M., Tominaga, M. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816–824 (1997).
82. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997 Oct 23; 389(6653):816-24.
83. Nazıroğlu M. TRPV1 Channel: A Potential Drug Target for Treating Epilepsy. *Curr Neuropharmacol*. 2015; 13(2):239-47.

84. Chen J, Kang D, Xu J, Lake M, Hogan JO, Sun C, Walter K, Yao B, Kim D. Species differences and molecular determinant of TRPA1 cold sensitivity. *Nat Commun.* 2013; 4:2501.
85. Meseguer V, Alpizar YA, Luis E, Tajada S, Denlinger B, Fajardo O, Manenschijn JA, Fernández-Peña C, Talavera A, Kichko T, Navia B, Sánchez A, Señarís R, Reeh P, Pérez-García MT, López-López JR, Voets T, Belmonte C, Talavera K, Viana F. TRPA1 channels mediate acute neurogenic inflammation and pain produced by bacterial endotoxins. *Nat Commun.* 2014; 5:3125.
86. Nazıroğlu M, Dikici DM, Dursun Ş. Role of oxidative stress and Ca²⁺ signaling on molecular pathways of neuropathic pain in diabetes: focus on TRP channels. *Neurochem Res.* 2012; 37(10):2065-75.
87. Sun L, Yau H-Y, Wong W-Y, Li RA, Huang Y, Yao X. Role of TRPM2 in H₂O₂-induced cell apoptosis in endothelial cells. *PLoS One.* 2012; 7(8):e43186.
88. Prevarskaya N, Zhang L, Barritt G. TRP channels in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1772(8):937-46.
89. Öz A, Cihangir A. Migren patogenezinde oksidatif strese duyarlı TRP kanallarının rolleri. *Med J SDU/SDÜ Tıp Fak Derg.* 2015; 22(4):144-50.
90. Yamamoto S, Wajima T, Hara Y, Nishida M, Mori Y. Transient receptor potential channels in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1772(8):958-67.
91. Samanta A, Hughes TET, Moiseenkova-Bell VY. Transient Receptor Potential (TRP) Channels. *Subcell Biochem.* 2018; 87:141-165.
92. Li H. TRP Channel Classification. *Adv Exp Med Biol.* 2017; 976:1-8.
93. Guinamard R, Sallé L, Simard C. The non-selective monovalent cationic channels TRPM4 and TRPM5. *Transient Receptor Potential Channels:* Springer; 2011; 704: 147-171.
94. Clapham DE. Mammalian TRP channels. *Cell.* 2007; 129(1): 220.

95. Nazıroğlu M, Özgül C. Effects of antagonists and heat on TRPM8 channel currents in dorsal root ganglion neuron activated by nociceptive cold stress and menthol. *Neurochem Res.* 2012; 37(2): 314-320.
96. McQuillin A, Bass NJ, Kalsi G, Lawrence J, Puri V, Choudhury K, Detera-Wadleigh SD, Curtis D, Gurling HM. Fine mapping of a susceptibility locus for bipolar and genetically related unipolar affective disorders, to a region containing the C21ORF29 and TRPM2 genes on chromosome 21q22.3. *Mol Psychiatry.* 2006; 11(2):134-42.
97. Lange I, Yamamoto S, Partida-Sanchez S, Mori Y, Fleig A, Penner R. TRPM2 functions as a lysosomal Ca^{2+} -release channel in beta cells. *Sci Signal.* 2009; 2:ra23.
98. Nilius B. Transient receptor potential (TRP) cation channels: rewarding unique proteins. *Bull Mem Acad R Med Belg.* 2006; 162(3-4): 244-253.
99. Fliegert R, Gasser A, Guse A. Regulation of calcium signalling by adenine-based second messengers. *Biochem Soc Trans.* 2007; 35(1): 109-114.
100. Fonfria E, Murdock PR, Cusdin FS, Benham CD, Kelsell RE, McNulty S. Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family. *J Recept Signal Transduct Res.* 2006; 26(3):159-78.
101. Bai JZ, Lipski J. Differential expression of TRPM2 and TRPV4 channels and their potential role in oxidative stress-induced cell death in organotypic hippocampal culture. *Neurotoxicology.* 2010; 31(2):204-14.
102. Chung KK, Freestone PS, Lipski J. Expression and functional properties of TRPM2 channels in dopaminergic neurons of the substantia nigra of the rat. *J Neurophysiol.* 2011; 106(6):2865-75.
103. Alim I, Teves L, Li R, Mori Y, Tymianski M. Modulation of NMDAR subunit expression by TRPM2 channels regulates neuronal vulnerability to ischemic cell death. *J Neurosci.* 2013; 33(44):17264-77.
104. Belrose JC, Xie YF, Gierszewski LJ, MacDonald JF, Jackson MF. Loss of glutathione homeostasis associated with neuronal senescence facilitates TRPM2

channel activation in cultured hippocampal pyramidal neurons. *Mol Brain* 2012; 5: 11

105. Kaneko S, Kawakami S, Hara Y, Wakamori M, Itoh E, Minami T, et al. A critical role of TRPM2 in neuronal cell death by hydrogen peroxide. *J Pharmacol Sci* 2006; 101: 66–76.
106. Roedding AS, Tong SY, Au-Yeung W, Li PP, Warsh JJ. Chronic oxidative stress modulates TRPC3 and TRPM2 channel expression and function in rat primary cortical neurons: relevance to the pathophysiology of bipolar disorder. *Brain Res* 2013; 1517: 16–27.
107. Fonfria E, Mattei C, Hill K, Brown JT, Randall A, Benham CD, et al. TRPM2 is elevated in the tMCAO stroke model, transcriptionally regulated, and functionally expressed in C13 microglia. *J Recept Signal Transduct Res* 2006; 26: 179–98.
108. Jeong H, Kim YH, Lee Y, Jung SJ, Oh SB. TRPM2 contributes to LPC-induced intracellular Ca^{2+} influx and microglial activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 485: 301–6.
109. Mortadza SS, Sim JA, Stacey M, Jiang LH. Signalling mechanisms mediating Zn^{2+} -induced TRPM2 channel activation and cell death in microglial cells. *Sci Rep* 2017; 7: 45032.
110. Miyake T, Shirakawa H, Kusano A, Sakimoto S, Konno M, Nakagawa T, et al. TRPM2 contributes to LPS/IFN γ -induced production of nitric oxide via the p38/JNK pathway in microglia. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 444: 212–7.
111. Kraft R, Grimm C, Grosse K, Hoffmann A, Sauerbruch S, Kettenmann H, et al. Hydrogen peroxide and ADP-ribose induce TRPM2-mediated calcium influx and cation currents in microglia. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 286: C129–37.
112. Gelderblom M, Melzer N, Schattling B, Gob E, Hicking G, Arunachalam P, et al. Transient receptor potential melastatin subfamily member 2 cation channel

regulates detrimental immune cell invasion in ischemic stroke. *Stroke* 2014; 45: 3395–402.

113. Lee M, Cho T, Jantaratnotai N, Wang YT, McGeer E, McGeer PL . Depletion of GSH in glial cells induces neurotoxicity: relevance to aging and degenerative neurological diseases. *FASEB J* 2010; 24: 2533–45.
114. Di A, Kiya T, Gong H, Gao X, Malik AB. Role of the phagosomal redox-sensitive TRP channel TRPM2 in regulating bactericidal activity of macrophages. *J Cell Sci* 2017; 130: 735–44.
115. Zou J, Ainscough JF, Yang W, Sedo A, Yu SP, Mei ZZ, et al. A differential role of macrophage TRPM2 channels in Ca^{2+} signaling and cell death in early responses to H_2O_2 . *Am J Physiol Cell Physiol* 2013; 305: C61–9.
116. Lange I, Penner R, Fleig A, Beck A. Synergistic regulation of endogenous TRPM2 channels by adenine dinucleotides in primary human neutrophils. *Cell Calcium* 2008; 44: 604–15.
117. Heiner I, Eisfeld J, Warnstedt M, Radukina N, Jungling E, Luckhoff A . Endogenous ADP-ribose enables calcium-regulated cation currents through TRPM2 channels in neutrophil granulocytes. *Biochem J* 2006; 398: 225–32.
118. Wang G, Cao L, Liu X, Sieracki NA, Di A, Wen X, et al. Oxidant sensing by TRPM2 inhibits neutrophil migration and mitigates inflammation. *Dev Cell* 2016; 38: 453–62.
119. Sumoza-Toledo A, Lange I, Cortado H, Bhagat H, Mori Y, Fleig A, et al. Dendritic cell maturation and chemotaxis is regulated by TRPM2-mediated lysosomal Ca^{2+} release. *FASEB J* 2011; 25: 3529–42.
120. Naziroglu M. TRPM2 channel membrane currents in primary rat megakaryocytes were activated by the agonist ADP-ribose but not oxidative stress. *J Membr Biol* 2011; 241: 51–7.
121. Hecquet CM, Ahmmed GU, Malik AB. TRPM2 channel regulates endothelial barrier function. *Adv Exp Med Biol* 2010; 661: 155–67.

122. Hecquet CM, Ahmmed GU, Vogel SM, Malik AB. Role of TRPM2 channel in mediating H₂O₂-induced Ca²⁺ entry and endothelial hyperpermeability. *Circ Res* 2008; 102: 347–55.
123. Hecquet CM, Malik AB. Role of H₂O₂-activated TRPM2 calcium channel in oxidant-induced endothelial injury. *Thromb Haemost* 2009; 101: 619–25.
124. Hecquet CM, Zhang M, Mittal M, Vogel SM, Di A, Gao X, et al. Cooperative interaction of trp melastatin channel transient receptor potential (TRPM2) with its splice variant TRPM2 short variant is essential for endothelial cell apoptosis. *Circ Res* 2014; 114: 469–79.
125. Yang KT, Chang WL, Yang PC, Chien CL, Lai MS, Su MJ, et al. Activation of the transient receptor potential M2 channel and poly(ADP-ribose) polymerase is involved in oxidative stress-induced cardiomyocyte death. *Cell Death Differ* 2006; 13: 1815–26.
126. Ishii M, Shimizu S, Hara Y, Hagiwara T, Miyazaki A, Mori Y, et al. Intracellular-produced hydroxyl radical mediates H₂O₂-induced Ca²⁺ influx and cell death in rat beta-cell line RIN-5F. *Cell Calcium* 2006; 39: 487–94.
127. Togashi K, Hara Y, Tominaga T, Higashi T, Konishi Y, Mori Y, et al. TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. *EMBO J* 2006; 25: 1804–15.
128. Kühn FJ, Heiner I, Lückhoff A. TRPM2: a calcium influx pathway regulated by oxidative stress and the novel second messenger ADP-ribose. *Pflugers Arch*. 2005; 451(1): 212-219.
129. Kheradpezhoh E, Barritt GJ, Rychkov GY. Curcumin inhibits activation of TRPM2 channels in rat hepatocytes. *Redox Biol*. 2016; 7:1-7.
130. Kahya MC, Nazıroğlu M, Övey İS. Modulation of Diabetes-Induced Oxidative Stress, Apoptosis, and Ca²⁺ Entry Through TRPM2 and TRPV1 Channels in Dorsal Root Ganglion and Hippocampus of Diabetic Rats by Melatonin and Selenium. *Mol Neurobiol*. 2017; 54(3):2345-2360.
131. Yamamoto S, Shimizu S, Kiyonaka S, Takahashi N, Wajima T, Hara Y, Negoro T, Hiroi T, Kiuchi Y, Okada T, Kaneko S, Lange I, Fleig A, Penner R, Nishi M,

- Takeshima H, Mori Y. TRPM2-mediated Ca^{2+} influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. *Nat Med*. 2008; 14(7):738-47.
132. Kraft R, Grimm C, Frenzel H, Harteneck C. Inhibition of TRPM2 cation channels by N-(p-aminocinnamoyl)anthranilic acid. *Br J Pharmacol*. 2006; 148(3):264-73.
 133. Angelova PR, Abramov AY. Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration. *FEBS Lett*. 2018; 592(5):692–702.
 134. Hemmati-Dinarvand M, Saedi S, Valilo M, Kalantary-Charvadeh A, Alizadeh Sani M, Kargar R, et al. Oxidative stress and Parkinson's disease: conflict of oxidant-antioxidant systems. *Neurosci Lett*. 2019; 709(134296):1–6.
 135. Hemmati-Dinarvand M, Taher-Aghdam AA, Mota A, Zununi Vahed S, Samadi N. Dysregulation of serum NADPH oxidase1 and ferritin levels provides insights into diagnosis of Parkinson's disease. *Clin Biochem*. 2017; 50(18):1087–92.
 136. Hettiarachchi NT, Parker A, Dallas ML, Pennington K, Hung CC, Pearson HA, et al. α -Synuclein modulation of Ca^{2+} signaling in human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells. *J Neurochem*. 2009; 111(5):1192–201.
 137. Soto C. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*. 2003; 4(1):49–60.
 138. Williams AJ, Paulson HL. Polyglutamine neurodegeneration: protein misfolding revisited. *Trends Neurosci*. 2008; 31(10):521–8.
 139. Chang KH, Chen CM. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Antioxidants*. 2020; 9(7):1–32.
 140. Coskuner-Weber O, Uversky VN. Insights into the molecular mechanisms of alzheimer's and parkinson's diseases with molecular simulations: Understanding the roles of artificial and pathological missense mutations in intrinsically disordered proteins related to pathology. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(336):1–65.

141. Hasegawa M. Molecular mechanisms in the pathogenesis of alzheimer's disease and Tauopathies-Prion-Like seeded aggregation and phosphorylation. *Biomolecules*. 2016; 6(24):1–12.
142. Nicolson GL. Mitochondrial dysfunction and chronic disease: Treatment with natural supplements. *Integr Med*. 2014; 13(4):35–43.
143. Esposito E, Di Matteo V, Di Giovanni G. Death in the substantia nigra: A motor tragedy. *Expert Rev Neurother*. 2007; 7(6):677–97.
144. Knierim JJ. The hippocampus. *Curr Biol*. 2015; 25(23):R1116-21.
145. Moodley KK, Chan D. The hippocampus in neurodegenerative disease. *Front Neurol Neurosci*. 2014; 34:95-108.
146. Faouzi M, Penner R. TRPM2. *Handb Exp Pharmacol*. 2014; 222:403-26.
147. Olah ME, Jackson MF, Li H, Perez Y, Sun HS, Kiyonaka S, Mori Y, Tymianski M, MacDonald JF. Ca²⁺-dependent induction of TRPM2 currents in hippocampal neurons. *J Physiol*. 2009; 587(Pt 5):965-79.
148. Gerace E, Masi A, Resta F, Felici R, Landucci E, Mello T, Pellegrini-Giampietro DE, Mannaioni G, Moroni F. PARP-1 activation causes neuronal death in the hippocampal CA1 region by increasing the expression of Ca(2+)-permeable AMPA receptors. *Neurobiol Dis*. 2014; 70:43-52.
149. Chen X, Zhang S, Huang J, Dong W, Xiao H, Shao H, Cheng J, Wu H, Qi Y. Hyper-SUMOylation of K⁺ Channels in Sudden Unexplained Death in Epilepsy: Isolation and Primary Culture of Dissociated Hippocampal Neurons from Newborn Mice for Subcellular Localization. *Methods Mol Biol*. 2018; 1684:63-71.
150. Osmanlioğlu HÖ, Yıldırım MK, Akyuva Y, Yıldızhan K, Nazıroğlu M. Morphine Induces Apoptosis, Inflammation, and Mitochondrial Oxidative Stress via Activation of TRPM2 Channel and Nitric Oxide Signaling Pathways in the Hippocampus. *Mol Neurobiol*. 2020; 57(8):3376-3389.
151. Akpınar O, Özşimşek A, Güzel M, Nazıroğlu M. Clostridium botulinum neurotoxin A induces apoptosis and mitochondrial oxidative stress via

- activation of TRPM2 channel signaling pathway in neuroblastoma and glioblastoma tumor cells. *J Recept Signal Transduct Res*. 2020; 40(6):620-632.
152. Abe K, Misawa M. Amyloid beta protein enhances the clearance of extracellular L-glutamate by cultured rat cortical astrocytes. *Neurosci Res*. 2003; 45(1):25-31.
 153. Nazıroğlu M, Özgül C, Çiğ B, Doğan S, Uğuz AC. Glutathione modulates Ca(2+) influx and oxidative toxicity through TRPM2 channel in rat dorsal root ganglion neurons. *J Membr Biol*. 2011; 242(3):109-18.
 154. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 1985; 260(6):3440-50.
 155. Uğuz AC, Nazıroğlu M, Espino J, Bejarano I, González D, Rodríguez AB, et al. Selenium modulates oxidative stress-induced cell apoptosis in human myeloid HL-60 cells through regulation of calcium release and caspase-3 and-9 activities. *J Memb Biol*. 2009; 232(1-3): 15-23
 156. Uğuz AC, Nazıroğlu M. Effects of selenium on calcium signaling and apoptosis in rat dorsal root ganglion neurons induced by oxidative stress. *Neurochem Res*. 2012; 37(8): 1631-1638.
 157. Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med*. 1999; 27(5): 612-616.
 158. Güzel M, Nazıroğlu M, Akpınar O, Çınar R. Interferon Gamma-Mediated Oxidative Stress Induces Apoptosis, Neuroinflammation, Zinc Ion Influx, and TRPM2 Channel Activation in Neuronal Cell Line: Modulator Role of Curcumin. *Inflammation*. 2021; 44(5):1878-1894.
 159. Akyuva Y, Nazıroğlu M, Yıldızhan K. Selenium prevents interferon-gamma induced activation of TRPM2 channel and inhibits inflammation, mitochondrial oxidative stress, and apoptosis in microglia. *Metab Brain Dis*. 2021; 36(2):285-298.
 160. Yıldızhan K, Nazıroğlu M. Glutathione Depletion and Parkinsonian Neurotoxin MPP⁺-Induced TRPM2 Channel Activation Play Central Roles in Oxidative Cytotoxicity and Inflammation in Microglia. *Mol Neurobiol*. 2020; 57(8):3508-3525.

161. Ertilav K, Naziroğlu M, Ataizi ZS, Yıldızhan K. Melatonin and Selenium Suppress Docetaxel-Induced TRPV1 Activation, Neuropathic Pain and Oxidative Neurotoxicity in Mice. *Biol Trace Elem Res*. 2021; 199(4):1469-1487.
162. Guzman JN, Ilijic E, Yang B, Sanchez-Padilla J, Wokosin D, Galtieri D, Kondapalli J, Schumacker PT, Surmeier DJ. Systemic isradipine treatment diminishes calcium-dependent mitochondrial oxidant stress. *J Clin Invest*. 2018; 128(6): 2266-2280.
163. Hara Y, Wakamori M, Ishii M, Maeno E, Nishida M, Yoshida T, Yamada H, Shimizu S, Mori E, Kudoh J, Shimizu N, Kurose H, Okada Y, Imoto K, Mori Y. LTRPC2 Ca²⁺-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol Cell*. 2002; 9(1): 163-73.
164. Naziroglu M, Luckhoff A. Effects of antioxidants on calcium influx through TRPM2 channels in transfected cells activated by hydrogen peroxide. *J Neurol Sci*. 2008; 270(1-2): 152-8.
165. Naziroglu M. Molecular role of catalase on oxidative stress-induced Ca(2+) signaling and TRP cation channel activation in nervous system. *J Recept Signal Transduct Res*. 2012; 32(3): 134-41.
166. Joshi DC, Bakowska JC. SPG20 protein spartin associates with cardiolipin via its plant-related senescence domain and regulates mitochondrial Ca²⁺ homeostasis. *PLoS One*. 2011; 6(4): e19290.
167. Li X, Jiang LH. Multiple molecular mechanisms form a positive feedback loop driving amyloid beta42 peptide-induced neurotoxicity via activation of the TRPM2 channel in hippocampal neurons. *Cell Death Dis*. 2018; 9(2): 195.
168. Lawrence, R.A., Burk, R.F. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 1976; 71; 952-958.
169. Sedlak, J., Lindsay, R.H.C. Estimation of total, protein bound and non-protein sulfhydryl groups in tissue with Ellmann's reagent. *Anal Biochem*. 1968; 25:192-205.

170. Kutluhan S, Nazıroğlu M, Celik O, Yilmaz M. Effects of selenium and topiramate on lipid peroxidation and antioxidant vitamin levels in blood of pentylentetrazol-induced epileptic rats. *Biol Trace Elem Res.* 2009; 129:181-189.
171. Placer, Z.A., Cushman, L., Johnson, B.C. Estimation of products of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biological fluids. *Anal Biochem.* 1966; 16:359-364.
172. Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004; 5(11): 897-907.
173. Weller J, Budson A. Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. *F1000Res.* 2018; 7:F1000 Faculty Rev-1161.
174. Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ, Castellani RJ, Crain BJ, Davies P, Del Tredici K, Duyckaerts C, Frosch MP, Haroutunian V, Hof PR, Hulette CM, Hyman BT, Iwatsubo T, Jellinger KA, Jicha GA, Kövari E, Kukull WA, Leverenz JB, Love S, Mackenzie IR, Mann DM, Masliah E, McKee AC, Montine TJ, Morris JC, Schneider JA, Sonnen JA, Thal DR, Trojanowski JQ, Troncoso JC, Wisniewski T, Woltjer RL, Beach TG. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2012; 71(5):362-81.
175. Guillozet AL, Weintraub S, Mash DC, Mesulam MM. Neurofibrillary tangles, amyloid, and memory in aging and mild cognitive impairment. *Arch Neurol.* 2003; 60(5):729-36.
176. Tönnies E, Trushina E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2017; 57(4):1105-1121.
177. Chen Z, Zhong C. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurosci Bull.* 2014; 30(2):271-81.
178. Kirischuk S, Voitenko N, Kostyuk P, Verkhatsky A. Age-associated changes of cytoplasmic calcium homeostasis in cerebellar granule neurons in situ: investigation on thin cerebellar slices. *Exp Gerontol.* 1996; 31(4):475-87.

179. Butterfield DA. Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Radic Res.* 2002; 36(12):1307-13.
180. Zhang H, Wu L, Pchitskaya E, Zakharova O, Saito T, Saido T, Bezprozvanny I. Neuronal Store-Operated Calcium Entry and Mushroom Spine Loss in Amyloid Precursor Protein Knock-In Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Neurosci.* 2015; 35(39):13275-86.
181. Verkhratsky A, Rodríguez JJ, Parpura V. Calcium signalling in astroglia. *Mol Cell Endocrinol.* 2012; 353(1-2):45-56.
182. Yamaguchi M. Role of regucalcin in brain calcium signaling: involvement in aging. *Integr Biol (Camb).* 2012; 4(8):825-37.
183. Verkhratsky A. Astroglial Calcium Signaling in Aging and Alzheimer's Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2019; 11(7):a035188.
184. Tong BC, Wu AJ, Li M, Cheung KH. Calcium signaling in Alzheimer's disease & therapies. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2018; 1865(11 Pt B):1745-1760.
185. Nazıroğlu M. TRPM2 channel membrane currents in primary rat megakaryocytes were activated by the agonist ADP-ribose but not oxidative stress. *J Membr Biol.* 2011; 241(2):51-7.
186. Yu P, Cai X, Liang Y, Wang M, Yang W. Roles of NAD⁺ and Its Metabolites Regulated Calcium Channels in Cancer. *Molecules.* 2020; 25(20):4826.
187. Wang J, Jackson MF, Xie YF. Glia and TRPM2 Channels in Plasticity of Central Nervous System and Alzheimer's Diseases. *Neural Plast.* 2016; 2016:1680905.
188. Starkus J, Beck A, Fleig A, Penner R. Regulation of TRPM2 by extra- and intracellular calcium. *J Gen Physiol.* 2007; 130(4):427-40.
189. Wang R, Tu S, Zhang J, Shao A. Roles of TRP Channels in Neurological Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2020; 2020:7289194.

190. Wang ZJ, Heinbockel T. Essential Oils and Their Constituents Targeting the GABAergic System and Sodium Channels as Treatment of Neurological Diseases. *Molecules*. 2018; 23(5):1061.
191. Nazıroğlu M, Öz A, Yıldızhan K. Selenium and Neurological Diseases: Focus on Peripheral Pain and TRP Channels. *Curr Neuropharmacol*. 2020; 18(6):501-517.
192. Hong C, Jeong B, Park HJ, Chung JY, Lee JE, Kim J, Shin YC, So I. TRP Channels as Emerging Therapeutic Targets for Neurodegenerative Diseases. *Front Physiol*. 2020; 11:238.
193. Bai JZ, Lipski J. Differential expression of TRPM2 and TRPV4 channels and their potential role in oxidative stress-induced cell death in organotypic hippocampal culture. *Neurotoxicology*. 2010; 31(2):204-14.
194. Kovács R, Kardos J, Heinemann U, Kann O. Mitochondrial calcium ion and membrane potential transients follow the pattern of epileptiform discharges in hippocampal slice cultures. *J Neurosci*. 2005; 25(17):4260-4269.
195. Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*. 2006; 443(7113):787-95.
196. Singh A, Kukreti R, Saso L, Kukreti S. Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. *Molecules*. 2019; 24(8):1583.
197. Gibson GE, Huang HM. Mitochondrial enzymes and endoplasmic reticulum calcium stores as targets of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *J Bioenerg Biomembr*. 2004; 36(4):335-40.
198. Esteras N, Abramov AY. Mitochondrial Calcium Deregulation in the Mechanism of Beta-Amyloid and Tau Pathology. *Cells*. 2020; 9(9):2135.
199. Zhao C, Su P, Lv C, Guo L, Cao G, Qin C, Zhang W. Berberine Alleviates Amyloid β -Induced Mitochondrial Dysfunction and Synaptic Loss. *Oxid Med Cell Longev*. 2019; 2019:7593608.
200. Zafeer MF, Firdaus F, Ahmad F, Ullah R, Anis E, Waseem M, Ali A, Hossain MM. Perillyl alcohol alleviates amyloid- β peptides-induced mitochondrial

- dysfunction and cytotoxicity in SH-SY5Y cells. *Int J Biol Macromol*. 2018; 109:1029-1038.
201. Meng L, Xin G, Li B, Li D, Sun X, Yan T, Li L, Shi L, Cao S, Meng X. Anthocyanins Extracted from *Aronia melanocarpa* Protect SH-SY5Y Cells against Amyloid-beta (1-42)-Induced Apoptosis by Regulating Ca²⁺ Homeostasis and Inhibiting Mitochondrial Dysfunction. *J Agric Food Chem*. 2018; 66(49):12967-12977.
 202. Hwang S, Kim JK. Effects of NADPH Oxidase Inhibitors and Mitochondria-Targeted Antioxidants on Amyloid β 1-42-Induced Neuronal Deaths in Mouse Mixed Cortical Cultures. *Chonnam Med J*. 2018; 54(3):159-166.
 203. Guzman JN, Ilijic E, Yang B, Sanchez-Padilla J, Wokosin D, Galtieri D, Kondapalli J, Schumacker PT, Surmeier DJ. Systemic isradipine treatment diminishes calcium-dependent mitochondrial oxidant stress. *J Clin Invest*. 2018; 128(6): 2266-2280
 204. Ghosh D, LeVault KR, Brewer GJ. Dual-energy precursor and nuclear erythroid-related factor 2 activator treatment additively improve redox glutathione levels and neuron survival in aging and Alzheimer mouse neurons upstream of reactive oxygen species. *Neurobiol Aging*. 2014; 35(1):179-90.
 205. An X, Fu Z, Mai C, Wang W, Wei L, Li D, Li C, Jiang LH. Increasing the TRPM2 Channel Expression in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells Augments the Susceptibility to ROS-Induced Cell Death. *Cells*. 2019; 8(1).
 206. Ye M, Yang W, Ainscough JF, Hu XP, Li X, Sedo A, Zhang XH, Zhang X, Chen Z, Li XM, Beech DJ, Sivaprasadarao A, Luo JH, Jiang LH. TRPM2 channel deficiency prevents delayed cytosolic Zn²⁺ accumulation and CA1 pyramidal neuronal death after transient global ischemia. *Cell Death Dis*. 2014 Nov 27; 5(11):e1541.
 207. Ovey IS, Naziroglu M. Homocysteine and cytosolic GSH depletion induce apoptosis and oxidative toxicity through cytosolic calcium overload in the hippocampus of aged mice: involvement of TRPM2 and TRPV1 channels. *Neuroscience*. 2015; 284: 225-233.

208. Demirdağ A, Nazıroğlu M, Övey IS. Short-Term Ketamine Treatment Decreases Oxidative Stress Without Influencing TRPM2 and TRPV1 Channel Gating in the Hippocampus and Dorsal Root Ganglion of Rats. *Cell Mol Neurobiol*. 2017; 37(1):133-144.
209. Nazıroğlu M. Molecular role of catalase on oxidative stress-induced Ca^{2+} signaling and TRP cation channel activation in nervous system. *J Recept Signal Transduct Res*. 2012; 32(3): 134-41.
210. Buelow B, Song Y, Scharenberg AM. The Poly(ADP-ribose) polymerase PARP-1 is required for oxidative stress-induced TRPM2 activation in lymphocytes. *J Biol Chem*. 2008; 283(36):24571-83.
211. Thapak P, Khare P, Bishnoi M, Sharma SS. Neuroprotective Effect of 2-Aminoethoxydiphenyl Borate (2-APB) in Amyloid β -Induced Memory Dysfunction: A Mechanistic Study. *Cell Mol Neurobiol*. 2020 Nov 21.
212. Meacham CA, White LD, Barone S Jr, Shafer TJ. Ontogeny of voltage-sensitive calcium channel $\alpha(1A)$ and $\alpha(1E)$ subunit expression and synaptic function in rat central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res*. 2003; 142(1):47-65.
213. Simic G, Lucassen PJ, Krsnik Z, Kruslin B, Kostovic I, Winblad B, Bogdanovi. nNOS expression in reactive astrocytes correlates with increased cell death related DNA damage in the hippocampus and entorhinal cortex in Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 2000; 165(1):12-26.
214. Maret W. The redox biology of redox-inert zinc ions. *Free Radic Biol Med*. 2019; 134: 311-326.
215. Szutowicz A, Bielarczyk H, Zyśk M, Dyś A, Ronowska A, Gul-Hinc S, Klimaszewska-Łata J. Early and Late Pathomechanisms in Alzheimer's Disease: From Zinc to Amyloid- β Neurotoxicity. *Neurochem Res*. 2017; 42(3):891-904.
216. Li X, Yang W, Jiang LH. Alteration in Intracellular Zn^{2+} Homeostasis as a Result of TRPM2 Channel Activation Contributes to ROS-Induced Hippocampal Neuronal Death. *Front Mol Neurosci*. 2017; 10:414.

217. Fadeel B, Orrenius S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med.* 2005; 258(6):479-517.
218. Groenendyk J, Michalak M. Endoplasmic reticulum quality control and apoptosis. *Acta Biochim Pol.* 2005; 52(2):381-95.
219. Stennicke HR, Salvesen GS. Biochemical characteristics of caspases-3, -6, -7, and -8. *J Biol Chem.* 1997; 272(41):25719-23.
220. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 1999; 68:383-424.
221. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature.* 1998; 391(6662):43-50.
222. Carrasco C, Nazıroğlu M, Rodríguez AB, Pariente JA. Neuropathic Pain: Delving into the oxidative origin and the possible implication of transient receptor potential channels. *Front Physiol.* 2018; 9:95.
223. Wehage E, Eisfeld J, Heiner I, Jüngling E, Zitt C, Lückhoff A. Activation of the cation channel long transient receptor potential channel 2 (LTRPC2) by hydrogen peroxide, A splice variant reveals a mode of activation independent of ADP- ribose, *J Biol Chem,* 2002; 277:23150-23156.
224. Kühn FJ, Kühn C, Naziroglu M, Lückhoff A. Role of an N-terminal splice segment in the activation of the cation channel TRPM2 by ADP-ribose and hydrogen peroxide. *Neurochem Res.* 2009; 34(2):227-233.
225. Pacifico S, Piccolella S, Marciano S, Galasso S, Nocera P, Piscopo V, Fiorentino A, Monaco P. LC-MS/MS profiling of a mastic leaf phenol enriched extract and its effects on H₂O₂ and A β (25-35) oxidative injury in SK-B-NE(C)-2 cells. *J Agric Food Chem.* 2014; 62(49):11957-66.
226. Liu Y, Zeng X, Hui Y, Zhu C, Wu J, Taylor DH, Ji J, Fan W, Huang Z, and Hu J. Activation of α 7 nicotinic acetylcholine receptors protects astrocytes against oxidative stress-induced apoptosis: Implications for Parkinson's disease. *Neuropharmacology.* 2015; 91:87-96.

227. Jangra A, Datusalia AK, Khandwe S, Sharma SS. Amelioration of diabetes-induced neurobehavioral and neurochemical changes by melatonin and nicotinamide: implication of oxidative stress-PARP pathway. *Pharmacol Biochem Behav.* 2013; 114-115:43-51.
228. Myers SA, Andres KR, Hagg T, Whittemore SR. CD36 deletion improves recovery from spinal cord injury. *Exp Neurol.* 2014; 256:25-38.



EKLER

BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı

TOPLANTI TARİHİ	TOPLANTI SAYISI	KARAR SAYISI
18.12.2019	72	594

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 18 ARALIK 2019 tarihinde Saat 10.30'da toplanarak aşağıdaki kararları almıştır:

Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU'nun yürütücü ve Doktor Öğrencisi Ramazan ÇINAR'ın yardımcı araştırmacı olarak görev aldığı **"Alzheimer Hastalığı Nörobiyolojisinde TRPM2 Kanalinin Rolünün Fare Hipokampus Kültüründe Moleküler Teknikler ile Araştırılması"** başlıklı çalışma,

Denei Hayvanın	Türü	Cinsiyeti	Sayısı	Yaşı
	Wild Type Fare (C57BL/6j- TRPM2-KO)	D+E	140	1-3 günlük/1-2 gr

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından oy birliği ile UYGUN görülmüştür.

Prof.Dr. Özlem ÖZMEN BAŞKAN	Prof.Dr. Tülay BÜYÜKOĞLU BAŞKAN VEKİLİ	Prof.Dr. Asım KART ÜYE
Prof.Dr. Dilek ÖZTÜRK ÜYE	Prof.Dr. Deniz İNNAL ÜYE	Dr.Öğr.Üyesi Yusuf Sinan ŞİRİN ÜYE
Dr.Öğr.Üyesi Savaş Volkan GENÇ ÜYE	Dr.Öğr.Üyesi Mürmin POLAT ÜYE	Murat YARAR ÜYE
Ömer ONGUN ÜYE	Vet. Hek. Sinige GÜRLÜ ÜYE	

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Ramazan Çınar

Eğitim Durumu

Lisans Öğrenimi : Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı (2010-2014)

Yüksek Lisans Öğrenimi : Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Mühendisliği (2015-2017)

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce: iyi

İş Deneyimi

1. BSN Sağlık Analiz ARGE Dan. Org. Tarım San. Ve Tic. Ltd Şti. (<https://www.bsnsaglik.com.tr/>) (Haziran-Ağustos 2017)

Bilimsel Yayınlar ve Çalışmalar

A) SCI, SSCI ve AHCI tarafından taranan dergilerde yayımlanan teknik not, editöre mektup, tartışma, vaka takdimi ve özet türünden yayınlar dışındaki makale

1- Güzel M, Nazıroğlu M, Akpınar O, Çınar R. Interferon Gamma-Mediated Oxidative Stress Induces Apoptosis, Neuroinflammation, Zinc Ion Influx, and TRPM2 Channel Activation in Neuronal Cell Line: Modulator Role of Curcumin.

Inflammation. 2021 Apr 17. doi: 10.1007/s10753-021-01465-4. Epub ahead of print. PMID: 33866462.

B) Uluslararası toplantıda poster, sözlü sunum ve gösterimleri

- 1- Öz A, **Çınar R**, Çelik Ö, Uğuz AC, Nazıroğlu M. Effects of N-acetylcysteine treatment on CoCl₂-induced apoptosis and oxidative stress levels in SH-SY5Y neuroblastoma cells. 6th World Congress of Oxidative Stress, Calcium Signaling and TRP Channels, 24-27 May 2016, Isparta, Turkey. (Poster)
- 2- Çiğ B, Nazıroğlu M, **Çınar R**. Effects of 17 Beta Estradiol on In-vitro Chemical Hypoxia Induced TRPV1 Channel Aktivity, 9-11 Şubat 2017, India. (Poster)
- 3- Yıldızhan K, **Çınar R**, Nazıroğlu M. Resveratrol modulates MPP⁺ -induced TRPM2 channel activity in hippocampal neurons of mice. 5th International Brain Research School, 16-22 November 2020, Isparta, Turkey. (Sözlü)
- 4- **Çınar R**, Nazıroğlu M. Involvement of TRPM2 in the etiology of Alzheimer's disease: A literature review. 6th International Brain Research School, 21-27 June 2021, Isparta, Turkey. (Sözlü)

C) Uluslararası sempozyum, kongre, kurs (workshop) düzenlenmesi gibi etkinliklerde görev almak

- 1- 1st International Brain Research School, 24 August-4 September 2015, Isparta, Turkey. (<http://www.cmos.org.tr/brs2015/en/>)(Düzenleme Kurulu Üyesi)
- 2- 6th Oxidative Stress, Calcium Signaling and TRP Channels World Congress.24-27 May 2016, Isparta, Turkey. (<http://www.cmos.org.tr/2016>) (Düzenleme Kurulu Üyesi)
- 3- 2nd International Brain Research School, 6-12 November 2017, Isparta, Turkey. (<http://www.cmos.org.tr/brs2017/en/>) (Düzenleme Kurulu Üyesi)
- 4- 3rd International Brain Research School, 25 June-1 July 2018, Isparta, Turkey. (<http://2018.brs.org.tr/index.php/home-page/>) (Düzenleme Kurulu Üyesi)
- 5- 7th Oxidative Stress, Calcium Signaling and TRP Channels World Congress. 20-23 April 2018, Alanya, Antalya, Turkey. (<http://2018.cmos.org.tr/homepage/>) (Düzenleme Kurulu Üyesi)

- 6- 4th International Brain Research School, 24-30 June 2019, Isparta, Turkey. (<http://2019.brs.org.tr/>) (Düzenleme Kurulu Üyesi)
- 7- 5th International Brain Research School, 16-22 November 2020, Isparta, Turkey. (<http://2020.brs.org.tr/>) (Düzenleme Kurulu Üyesi)
- 8- 6th International Brain Research School, 21-27 June 2021, Isparta, Turkey. (<https://2021.brs.org.tr/>) (Düzenleme Kurulu Üyesi)

D) Ulusal ve Uluslararası sempozyum, kongre, kurs (workshop) gibi etkinliklerde katılma

- 1- 5th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels, 9-12 September 2014, Isparta, Turkey. (www.cmos.org.tr/2014)
- 2- 9th Cellular Neuroscience Meeting (9. Hücresel Sinirbilim Günleri) 29-30 Mart 2015, İstanbul Medipol Üniversitesi, İstanbul Turkey.
- 3- YÖK 100/2000 Doktora Bursiyerleri için Tübitak Araştırma projesi Yazma Eğitimi, 20-21 Mart 2019, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, Turkey.
- 4- 18th International Molecular Biology and Genetics Winter School, 26-28 Mart 2021, İstanbul Üniversitesi Genetik Klup (IUGEN), İstanbul Turkey. (<https://iugenetics.wixsite.com/iugenetics>)
- 5- Akademik düzeyde Ulusal ve Uluslararası Bilimsel Araştırma Projeleri Hazırlama ve Yürütme Eğitimi Etkinliği, 29-31 Temmuz 2021, İnönü Üniversitesi, Malatya Turkey. (<https://www.tubitak2237malatya.com/>)