

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**İNSAN EMBRİYONİK BÖBREK 293 (HEK293) HÜCRELERİNDE AMİLOİD
BETA TOKSİSİTESİNE KARŞI ISI ŞOKU PROTEİNİ 70 (Hsp70)'İN ROLÜ**

Sema YILDIZ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA

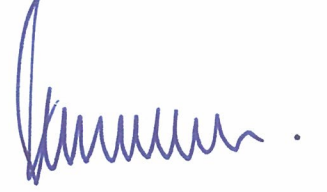
2018

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Sema YILDIZ tarafından hazırlanan “İnsan Embriyonik Böbrek 293 (HEK293) Hücrelerinde Amiloid Beta Toksisitesine Karşı Isı Şoku Proteini 70 (Hsp70)’in Rolü” adlı tez çalışması 11/01/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Nesrin ÖZSOY ERDAŞ
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı



Jüri Üyeleri:

Başkan : Doç. Dr. Suna CEBESÖY
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı



Üye : Doç. Dr. Fatma Gökçe APAYDIN
Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü



Üye : Prof. Dr. Nesrin ÖZSOY ERDAŞ
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı



Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Atila YETİŞEMİYEN
Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

11/01/2018



Sema YILDIZ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

İNSAN EMBRİYONİK BÖBREK 293 (HEK293) HÜCRELERİNDE AMİLOİD BETA TOKSİSİTESİNE KARŞI ISI ŞOKU PROTEİNİ 70 (Hsp70)'İN ROLÜ

Sema YILDIZ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nesrin ÖZSOY ERDAŞ

Bu çalışmada insan embriyonik böbrek hücre hattında (HEK 293) amiloid beta ile indüklenen sitotoksosite üzerine Hsp70 şaperonunun koruyucu rolünün incelenmesi amaçlanmıştır. Toksisite oluşturmak için HEK 293 hücrelerine 24 saat süreyle 5-10 mikromolar konsantrasyonlarında amiloid beta uygulanmıştır. Hem normal hem de amiloid beta ile muamele edilmiş HEK 293 hücrelerine 2 saat süreyle 2 mikrogram/ml konsantrasyonunda Hsp70 uygulanmıştır. Amiloid betanın hücre canlılığına etkisi MTT yöntemi ile ölçülmüştür. Oksidatif hasar, lipid hidroperoksidasyon (LPO) düzeyleri ölçülerek belirlenmiştir. Ayrıca Hsp70'in koruyucu etkisinin araştırılması için glutatyon (GSH) düzeyleri, katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktiviteleri kolorimetrik ELISA (enzim bağlı immün assay) kitleri aracılığıyla ölçülmüştür. Sonuçlar istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Deney sonuçlarına göre çalışmada amiloid beta uygulamasının lipid peroksidasyonuna yol açarak hücre toksisitesini indüklediği gözlenmiştir. Bu gruplarda SOD, CAT enzim aktivitelerinde azalma olduğu belirlenmiştir. Glutatyon düzeylerinde azalma olmadığı dikkati çekmiştir. Hsp70'in sitotoksositeye karşı etkisi değerlendirildiğinde amiloid betanın sebep olduğu lipid peroksidasyonunu azaltmadığı ancak uygulanan amiloid dozuna bağlı olarak SOD ve CAT enzim aktivitelerinde ve GSH düzeylerinde artışa sebep olduğu gözlenmiştir. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Elde edilen verilere göre; ekzojen Hsp70 uygulamasının HEK 293 hücrelerinde amiloid betanın sebep olduğu sitotoksosite üzerine kısmen koruyucu etkisinin olduğu ifade edilebilir.

Ocak 2018, 45 sayfa

Anahtar Kelimeler: Hsp70, HEK 293, amiloid beta, sitotoksosite, oksidatif hasar

ABSTRACT

Master Thesis

THE ROLE OF HEAT SHOCK PROTEIN 70 (Hsp70) IN TOXICITY OF BETA AMYLOID IN HUMAN EMBRYONIC KIDNEY 293 (HEK293) CELLS

Sema YILDIZ

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Nesrin ÖZSOY ERDAŞ

The aim of this study is to investigate the protective effects of Hsp70 chaperone on the amyloid beta induced toxicity in the human embryonic kidney cell line (HEK 293) cells. In order to induce toxicity in the HEK 293 cell line, 5-10 micromolar concentration of amyloid beta was applied for 24 hours. Afterwards, both normal and amyloid beta treated cells were treated with 2 microgram/ml concentration of Hsp70 for 2 hours. The effect of amyloid beta on cell viability was evaluated by MTT assay. Oxidative damage was assessed by measuring lipid hydroperoxide (LPO) levels. Furthermore, glutathione (GSH) levels, catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) enzyme activities were measured by colorimetric ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) kits, in order to understand the protective effect of Hsp70. The results were analyzed using statistical methods. The experimental results of this study indicate that amyloid beta application causes lipid peroxidation and induces cell toxicity. In these groups, there was a reduction of SOD and CAT enzyme activities. However, no reduction in glutathione levels were found. Evaluating of the effects of Hsp70 against cytotoxicity, it was observed that Hsp70 could not reduce the lipid peroxidation induced by amyloid beta. Hsp70 caused an increase in SOD and CAT enzyme activities and GSH levels depending on the dose of amyloid beta, however, no significant statistical difference could be found. Experimental results suggest that exogenous Hsp70 application to HEK 293 cells has a partial protective effect against the amyloid beta induced cytotoxicity in the HEK 293 cells.

January 2018, 45 pages

Key Words: Hsp70, HEK 293, amyloid beta, cytotoxicity, oxidative damage

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve sabrını benden esirgemeyen, tez çalışmamda beni yönlendiren ve bana yardımcı olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Nesrin ÖZSOY ERDAŞ'a (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı) en içten dileklerle teşekkür ederim.

Çalışmamda bana yardımcı olan, araştırma aşamalarında bilgi ve desteklerini esirgemeyen Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü öğretim üyelerinden Doç. Dr. Erkan YILMAZ'a ve Arş. Gör. Gülizar AYDOĞDU'ya teşekkür ederim.

Yine lisansüstü eğitimim boyunca maddi ve manevi olarak her zaman yanımda olan, birçok fedakarlık göstererek bana destek olan sevgili annem Yıldız YILDIZ'a ve tüm aileme sonsuz teşekkür ederim.

Sema YILDIZ

Ankara, Ocak 2018

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGE DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1 İnsan Embriyonik Böbrek Hücresi (Human Embryonic Kidney 293 Cell, HEK 293)	3
2.2 Amiloid Beta ve Toksisite	3
2.3 Amiloid fibril oluşumu ve proteopati	5
2.4 Amiloidosis ve Böbreklerdeki Etkisi	7
2.5 Isı Şoku Proteinleri	8
2.6 Hsp70.....	10
2.7 Hsp70 ve Amiloid Proteostasisi.....	11
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	14
3.1 Deney Gruplarının Hazırlanması	14
3.2 Hücre İnkübasyonu ve Lizatların Hazırlanması.....	15
3.2.1 Glutathione Assay Kit II (Cat. No. 354103).....	15
3.2.2 Catalase Assay Kit (Cat. No. 219265).....	16
3.2.3 Superoxide Dismutase Assay Kit II (Cat. No. 574601)	16
3.2.4 Lipid Hydroperoxide Assay Kit (Cat. No. 437639)	16
3.3 MTT Ölçümü.....	17
3.4 Bradford Yöntemi ile Protein Tayini	17
3.4.1 Reaktiflerin hazırlanması.....	17
3.4.1.1 1x Boya Reaktifi	17
3.4.1.2 BSA (Bovine Serum Albumin) Standard, 2 mg/ml	17
3.4.1.3 Bovine Gama-Globulin Standard, 2 mg/ml	17
3.4.1.4 Bovine Serum Albumin Standard Set	18
3.4.1.5 Bovine Gama-Globulin Standard Set	18

3.5 Lipid Hidroperoksidasyonu Ölçümü	19
3.5.1 Reaktiflerin hazırlanması.....	19
3.5.1.1 Ekstrakt R.....	19
3.5.1.2 Trifenilfosfin	19
3.5.1.3 Kromojen	19
3.5.1.4 Kloroform	19
3.5.1.5 Metanol	19
3.5.1.6 Kloroform-metanol karışımı	20
3.5.1.7 Lipid hidroperoksit standartları.....	20
3.6 Süperoksit Dismutaz Miktarı Tayini.....	21
3.6.1 Reaktiflerin hazırlanması.....	21
3.6.1.1 Deney tamponu (10X)	21
3.6.1.2 Örnek tampon (10X)	21
3.6.1.3 Radikal dedektör	21
3.6.1.4 SOD (Standart).....	21
3.6.1.5 Ksantin oksidaz	22
3.7 Glutasyon Tayini	23
3.7.1 Reaktiflerin hazırlanması.....	23
3.7.1.1 MES (2-(N-morfolino)etansülfonik asit) tampon 2X	23
3.7.1.2 GSSG (glutasyon disülfid) standardı.....	23
3.7.1.3 Kofaktör karışımı.....	23
3.7.1.4 Enzim karışımı	23
3.7.1.5 DTNB (5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoik asit)).....	23
3.8 Katalaz Miktarı Tayini.....	25
3.8.1 Reaktiflerin hazırlanması.....	25
3.8.1.1 1X deney tamponu	25
3.8.1.2 1X örnek tamponu	25
3.8.1.3 Formaldehit standardı.....	25
3.8.1.4 Katalaz (kontrol)	25
3.8.1.5 Potasyum hidroksit	26
3.8.1.6 Hidrojen peroksit	26
3.8.1.7 Katalaz purpald.....	26
3.8.1.8 Potasyum periyodat	26
3.8.1.9 Formaldehit standartlarının hazırlanması	26
3.8.1.10 Formaldehit standart kuyucukları	27
3.8.1.11 Pozitif kontrol kuyucukları (Bovin karaciğer CAT).....	27

3.8.1.12 Örnek kuyucukları.....	27
3.9 İstatistiksel Analiz	28
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	29
4.1 Amiloid Betanın HEK 293 Hücreleri Üzerindeki <i>in vitro</i> Sitotoksik Etkisinin MTT Canlılık Testi ile Ölçümü	30
4.2 HEK 293 Hücre Kültürlerinde LPO, SOD, GSH ve CAT Düzeyleri.....	31
4.2.1 Lipid peroksidasyonu ölçümü.....	31
4.2.2 SOD aktivite tayini.....	32
4.2.3 GSH miktarı tayini.....	33
4.2.4 Katalaz aktivite tayini.....	34
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	35
KAYNAKLAR	40
ÖZGEÇMİŞ.....	45

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
g	Yerçekimi ivmesi
H ₂ O	Su
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Potasyum Fosfat
l	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
nmol	Nanomol
O ₂	Oksijen
U	Enzim Birimi

Kısaltmalar

ADP	Adenozin Difosfat
AL	Amiloid Hafif Zincir
APP	Amiloid Öncü Protein
ATP	Adenozin Trifosfat
Aβ	Amiloid Beta
BSA	Bovin Serum Albümin
CAT	Katalaz
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DTNB	5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoik Asit)
DTPA	Dietilen Triamin Penta Asetik Asit
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetik Asit

EGTA	Bis-glikoleter N, N0,N1,N2 Tetraasetikasit
ELISA	Enzim Bağlı İmmün Assay
EMA	Avrupa İlaç Ajansı
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GSH	Glutasyon
GSSG	Glutasyon disülfıt
HEK 293	İnsan Embriyonik Böbrek Hücresi
HEPES	2-[4-(2-hidroksietil) piperazin-1-il] Etansülfonik Asit
HPLC	Yüksek Dereceli Sıvı Kromatografisi
HSE	Isı Şoku Elementi
HSF1	Isı Şoku Faktörü 1
Hsp	Isı Şoku Proteini
Hsp70	Isı Şoku Proteini 70
Hsp90	Isı Şoku Proteini 90
IRI	İskemi Reperfüzyon Hasarı
LPO	Lipid Hidroperoksit
MAPK	Mitojenle-Aktif Protein Kinaz
MES	2-(N-morfolino)Etansülfonik Asit
MHC	Majör Histokompatibilite Kompleksi
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-Difeniltetrazolyum Bromid
N2a hücresi	Nöro2a hücresi
NADP ⁺	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NK	Doğal Öldürücü Hücre
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
SEM	Standart Hata Ortalaması
SOD	Süperoksit Dismutaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1 Deney grupları.	15
Şekil 3.2 Bradford total protein standart grafiği.	18
Şekil 3.3 LPO standart grafiği.	20
Şekil 3.4 SOD standart grafiği	22
Şekil 3.5 GSH standart grafiği.	24
Şekil 3.6 Katalaz standart grafiği.	28
Şekil 4.1 Hücre yaşayabilirliğini gösteren grafik ($\pm$ SEM).	30
Şekil 4.2 LPO miktarını gösteren grafik ($\pm$ SEM)	31
Şekil 4.3 SOD aktivitesini gösteren grafik ($\pm$ SEM).	32
Şekil 4.4 GSH miktarını gösteren grafik ($\pm$ SEM).	33
Şekil 4.5 Katalaz aktivitesini gösteren grafik ($\pm$ SEM).	34

ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 4.1 Deney sonuçları (Ortalama $\pm$ SEM)	29
--	----



1. GİRİŞ

Amiloid β (A β) proteini ilk olarak Alzheimer hastalarının ve Down sendromlu bireylerin beyinlerindeki plaklardan izole edilmiştir (Murphy ve LeVine 2010). Alzheimer hastalığı sırasında oluşan bu senil plakların en önemli bileşeni olarak bilinmektedir (Domingues vd. 2007).

Amiloid birikiminin en yaygın olduğu bölgelerden birisi de böbrektir. Amiloid fibril oluşumu amiloidojenik öncül proteininin hatalı katlanmasıyla başlar. Hatalı katlanan varyantlar düzenli bir şekilde aynı yerde toplanarak protofilamentleri ve bunlar da kendi aralarında etkileşime girerek fibrilleri oluştururlar (Dember 2006). Bütün amiloid hastalıklarının karakteristiği antiparalel β -kıvrımlı tabaka konformasyonundaki protein depositlerinin oluşmasıdır (Schubert vd. 1995). Bu yapıların hücrelerin apoptozuna neden olduğu düşünülmektedir (Taşkiran ve Yılmaz 2007).

Amiloid fibril oluşumunun, dokularda birikiminin ve doku hasarlayıcı mekanizmalarının anlaşılması yeni terapötik yaklaşımların oluşturulabilmesi bakımından önem taşımaktadır. Amiloid beta birikiminin önlenmesinde amiloid proteinlerinin miktarının azaltılması, öncül proteinin kararlılığının sağlanması, beta tabakasının oluşumunun ve fibril uzamasının engellenmesi ve immün tedavi gibi basamaklar hedeflenmiştir (Taşkiran ve Yılmaz 2007).

Hsp'ler (ısı şoku proteinleri) genel olarak ısı stresi sırasında sentezlenmesinin yanı sıra diğer çevresel stres faktörlerine ve farmakolojik ajanlara karşı da sentezlenebilmektedirler. Bu nedenle stres proteini olarak da adlandırılırlar. Bu proteinlerin moleküler ağırlıkları 7-110 kDa arasındadır. İntraselüler, ekstraselüler ve hücre membranı yerleşimli olabilirler. İntraselüler yerleşimli olanlar, hemen hemen her hücrenin sitoplazma, mitokondri ve çekirdeğinde bulunabilirler. Isı şoku proteinleri fizyolojik rollerinin yanı sıra otoimmün hastalıklar, enfeksiyöz hastalıklar, kalp hastalıkları gibi pek çok patolojik durumda da rol oynamaktadır (Öncel 2012).

Hsp'ler molekül ağırlıklarına göre dört ana gruba ayrılırlar: Hsp90 ailesi, Hsp70 ailesi, Hsp60 ailesi ve küçük Hsp'ler (Öztürk vd. 2009). Hsp70, moleküler şaperon olarak bilinmektedir. Bu molekül temel olarak yeni sentezlenen proteinlerin katlanması, agregasyona uğrayan veya yanlış katlanan proteinlerin yeniden katlanmasını sağlar (Mayer ve Bukau 2005). Sitoplazma, çekirdek, endoplazmik retikulum ve mitokondride protein taşınmasına katılır (Karaca vd. 2011). Oligomerizasyon özelliği sayesinde ekstraselüler alanlardaki protein agregatlarını çözer (Danzer vd. 2011). ATP'ye bağlanır ve ATPaz aktivitesi gösterir (Evans vd. 2010). 70 kDa'luk Hsp70, stressiz hücrelerde çok düşük miktarlarda bulunurken stres durumunda miktarı hızla yükseldiği için en sık çalışılan Hsp'dir. Dokularda Hsp70'in immünoreaktivitesinin artması, çeşitli sebeplerle oluşan toksik etkinin Hsp sentezini tetiklediğini gösterir (Karaca vd. 2011). Hsp 70'in sitotoksositeye karşı savunmada önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir (Danzer vd. 2011). Ancak Hsp70 sekresyonunun fizyolojik stimülasyonu tam olarak bilinmemektedir.

Bu çalışma, Hsp70'in, amiloid beta toksisitesi oluşturulan HEK 293 (insan embriyonik böbrek hücresi) hücre kültürlerindeki koruyucu rolünün belirlenmesi için planlanmıştır. Çalışmada, 5-10 μ M dozlarında amiloid beta içeren HEK 293 hücre kültürlerine 2 μ g/ml olmak üzere tek doz Hsp70 uygulanarak, amiloid betanın oluşturduğu toksik etki üzerindeki koruyucu rolü incelenmiştir. Hsp70'in hücre canlılığına olan etkisi MTT yöntemi ile, oksidatif hasar lipid hidroperoksidasyonu (LPO) düzeyi ölçümü ile, koruyucu etkisi de süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) enzim aktiviteleri ve glutatyon (GSH) düzeyi ölçümü aracılığıyla değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular doğrultusunda, böbrek hücrelerinde meydana gelen amiloid fibril birikimine karşı umut verici terapötik yaklaşımlar geliştirilebilecektir.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 İnsan Embriyonik Böbrek Hücresi (Human Embryonic Kidney 293 Cell, HEK 293)

HEK 293, biyoterapötik proteinlerin oluşturulmasında sıklıkla kullanılan bir hücre hattıdır. HEK 293 hücreleri serumsuz süspansiyon kültürde kolayca olgunlaşabilir ve çoğalabilir. Aynı zamanda çeşitli nakil metotları için uygundur ve protein üretiminde oldukça etkindir. HEK 293 hücreleri uzun yıllardır protein araştırmalarında kullanılmaktadır. Günümüzde buna ek olarak HEK 293 hücrelerinde çeşitli terapötik ajanlar üretilmiş ve bu ajanlar FDA (U.S. Food and Drug Administration, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) ile EMA (European Medicines Agency, Avrupa İlaç Ajansı) tarafından onaylanmıştır (Dumont vd. 2016).

2.2 Amiloid Beta ve Toksisite

Amiloid beta, 39-43 aminoasitten oluşan küçük bir proteindir. Çözünür A β ₄₀ (amiloid beta 40) ve çözünmez A β ₄₂ (amiloid beta 42) olarak iki önemli izoformu vardır (Sun vd. 2015). Bunlar gama sekretaz ve beta sekretaz tarafından üretilen iki dominant peptittir (Sengupta vd. 2016). A β ₄₂ agregasyona yatkın olan formdur. Normal koşullarda amiloid betanın %90'ı A β ₄₀ formundayken %5'ten azı A β ₄₂ formundadır (Sun vd. 2015). *In vitro* olarak A β ₁₋₄₀ daha stabildir ve fibril oluşturmada monomer formunu uzun süre koruyabilmektedir. Araştırmacılar aynı zamanda A β ₁₋₄₂'nin fibril oluşturmada monomer, trimer ve tetramer formların karışımı olarak bulunduğunu gözlemlemiştir. Bu iki peptit kültüre uygulandığında en çok toksik etki gösteren peptitlerdir. Ayrıca bu iki peptitin bulundukları ortamdaki oranları da toksisite açısından önemlidir (Sengupta vd. 2016).

Amiloid beta hücre içinde genelde sitosolde bulunur. Bunun yanı sıra endoplazmik retikulumda, golgi cisimciğinin orta kısmında ve mitokondride de bulunmaktadır. Ayrıca endositik endozom/lizozom gibi otofajik vakuollerde de vardır (Sun vd. 2015).

Amiloid betanın fizyolojik rolü hala kesin olarak bilinmemektedir. Olası rollerinden biri gama sekretaz enzimini inhibe etmesidir. Amiloid beta agregasyonu aynı zamanda reaktif oksidatif tür oluşumuna neden olur. Protein oksidasyonu hücre membranında hasara ve enzimlerde fonksiyon bozukluklarına yol açar (Sun vd. 2015).

Amiloid beta, miktara bağlı toksisite oluşturabildiği gibi yapıya bağlı toksisite de oluşturabilir. Uzunluk, moleküler ağırlık ve mikroskobik özelliklerine göre kısa oligomerler, amiloid betadan türemiş dağılabilir ligandlar veya protofibriller şeklinde düzenlenebilir. Olgunlaşan amiloid fibriller protofibrillerden oluşmaktadır. Bu yapıların agregasyonu ile nörotoksisite ortaya çıkmaktadır (Sadigh-Eteghad vd. 2015).

Amiloid beta peptitinin hem teorik hem de deneysel olarak çalışılmış çeşitli toksisite mekanizmaları mevcuttur. Bu mekanizmalar membranla direkt etkileşim sonucu inflamatuvar etki oluşumu, metal-amiloid beta kompleksi oluşumu nedeniyle oksidatif stresin artışı, membranla etkileşim sonucu membran reseptörlerinin fonksiyonunda bozulma veya membran porlarının yapısının ve iyonik homeostasisin zarar görmesi olarak açıklanmıştır. Biriken amiloid beta peptitleri toksik oligomerler oluşturarak serbest radikal sürecini tetikleyebilir. Oksidatif strese makrotofaji ve lizozomal apoptozun da eşlik etmesiyle ilave hasar meydana gelir (Zhao vd. 2012). Membran bozukluğu ve iyon disregülasyonu da A β toksisitesinin bileşenlerindendir. Çalışmalar A β oligomerlerinin direkt olarak membran porlarıyla etkileşimde bulunarak membran permeabilitesini olumsuz etkilediğini göstermiştir. Bu nedenle de iyon dengesi bozulabilmektedir (Sengupta vd. 2016).

Amiloid betaya karşı denenmiş bazı terapötik yaklaşımlar genelde gama sekretaz ve beta sekretaz enzimlerinin inhibisyonunu sağlayarak amiloid beta oluşumunu azaltmaya yöneliktir. Bu yaklaşımlardan istenilen sonuçlar elde edilememiştir. Son olarak amiloid betaya karşı iki monoklonal antikorla immünoterapi denenmiştir. Ancak bu iki yol ilerlemiş hastalıklarda başarısızlıkla sonuçlandığı için yeterli görülmemiştir. İmmünoterapiyle birlikte denenebilecek yeni yaklaşımların arayışı sürmektedir. Daha

başarılı hayvan modelleri ve daha spesifik biomarkerlar yardımıyla amiloid beta kaynaklı hastalıkların patogenesisi aydınlatılacaktır (Sun vd. 2015).

2.3 Amiloid fibril oluşumu ve proteopati

Amiloid fibriller tipik olarak 5-15 nm genişliğinde, dallanmamış uzunluğu yaklaşık 1 mikron ve bazen de birkaç mikron olan bir yapıdadır. Fibril düğümlerinin X-ray fiber kırınımı ile ölçümü sonucu çapraz-beta yapılar içerdiği görülmüştür. Tek bir amiloid fibril her alt ünite de iki veya daha fazla beta- kıvrımlı tabakayla birlikte pek çok çapraz-beta alt ünitesi içerebilir (Tycko 2015).

Amiloid fibril formasyonu bazen geri dönüşümsüz bir süreç olarak kabul edilse de bu görüş çoğunluk tarafından kabul görmemektedir. Fibril yoğunluğu en yüksek seviyeye erişse bile beraberinde az miktarda çözünebilir protein mevcuttur. Eğer fibriller yeterli miktarda çözünebilir proteine erişim sağlayabilecekleri bir çözeltiye konulursa büyürler. Eğer fibriller yetersiz miktarda çözünebilir proteinin olduğu çözeltiye konulursa çözünebilir protein miktarını dengelemek amacıyla küçülecektir (Tycko 2015).

Yapılan laboratuvar deneyleri sonucu amiloid fibrillerin her zaman toksik olmadığı, toksisitenin fibrillerin birbirleriyle olan ilişkisiyle ve uzunluğuyla alakalı olduğu düşünülmektedir. Sonikasyona uğramış (yüksek frekanslı ses dalgalarıyla parçalanmış) fibrillerin düğüm oluşturan uzun fibrillerden daha toksik olduğu görülmüştür. Moleküler yapı ve sitotoksosite arasındaki ilişki henüz tam olarak aydınlatılmamıştır (Tycko 2015).

Proteopatilerde, yapısal anomali göstermeye başlayan belirli proteinler hücre ve dokularda kümelenerek fonksiyon bozukluklarına yol açar. Anormal veya hatalı katlanmış proteinler sitoplazmik, nüklear ve ekstraselüler alanlarda biriktiğinde organel hasarlarına ve sinir sisteminde sinaptik fonksiyon bozukluğuna yol açar (Ghavami vd. 2014).

Amiloid ilişkili hastalıklarda amiloid fibriller dokularda birikerek çözünemez yapılar oluşturur ve hatta bazen hücrelerin yerini alırlar. Örneğin, lizozim amiloidosiste böbreğin büyük kısmı amiloid depositleriyle yer değiştirebilir. Bunun yanı sıra, APP (amiloid öncü protein) veya peptitler aracılığıyla düzenlenme sırasında bazı küçük oligomerik ara formlar toksik etki yaratarak hücre ölümüne neden olabilir. Diğer yandan günümüzde yapılan çalışmalar sonucu amiloid yapıların doğal sistemde sıkça bulunduğu ve bu fonksiyonel amiloid yapıların güçlerine göre destek, iskelet ve koruma görevi sağladığı görülmektedir. Bu veriler doğrultusunda aynı beta-kıvrımlı yapıya sahip olmalarına rağmen neden bazı amiloid fibrillerin toksik etki oluştururken bazılarının oluşturmadığı merak konusu olmuştur (Marshall vd. 2014).

Değişik toksik potansiyel bulunduran amiloid birlikleri yapısal katılık, stabilite ve yüzey koruması açısından birçok çeşitliliğe sahiptir. Bazı kısa amiloidojenik peptitler algoritmalar ve kristallografi ile tanımlandığında bu peptitlerin amiloid fibril oluşturmaya en elverişli formlar olduğu görülmüştür. Bu peptitler kendi kendilerine düzenlenebilen, iyi organize olmuş ve katı fibriller oluşturabilen ve hatta bazen kristal yapıda kümeler oluşturabilen yapıdadırlar. Hücrelere toksik etki yaptığı çok iyi bilinen amiloid beta aynı zamanda oldukça çeşitli tür ve fibril polimorfları oluşturma potansiyeline sahiptir (Marshall vd. 2014).

Amiloid fibrillerin stabilitesi göz önüne alındığında, amiloid fibrillerin kümelenme sürecinin geri dönüşümlü bir süreç olduğu görülmektedir. Termodinamik veya kinetik olarak daha stabil olan fibriller daha geç çözünür ve dolayısıyla bu esnada fibril uçlarından potansiyel sitotoksik ürünler daha yavaş ve az miktarda salınır (Marshall vd. 2014).

Amiloid fibrillerin yüzey yapıları da toksik potansiyellerinde etkili olabilir. Küçük oligomerik türler ve fibriller parçalar lipid membranları bozabilir. Fibril-fibril etkileşimini destekleyen yüzey yapısı veya protofilamentler arasındaki bağlantılar amiloid fibrillerin, depositlerin veya plakların stabilitesini etkiler. Bu da

depolimerizasyon yolu ile potansiyel toksik türlerin üretimine yansiyabilir (Marshall vd. 2014).

2.4 Amiloidosis ve Böbreklerdeki Etkisi

Amiloidosis, protein katlanmasında meydana gelen düzensizlik sonucu normalde çözünebilir olan protein fragmanlarının bir araya gelerek anormal bir şekilde çözünemez fibriller oluşturarak doku yapısını bozup hastalığa yol açması tablosudur. İnsanlarda 30 farklı amiloid tipi bulunur. Amiloid fibrillerin temel özelliği antiparalel-beta kıvrımlı tabakalara sahip olmalarıdır (Scarpioni vd. 2016).

Amiloidosis, çeşitli doku ve organlardaki hücre dışı alanlarda biriken değişik formlarda oluşmuş çözünemez antiparalel beta-kıvrımlı protein fibrillerini kapsamaktadır. İnsanlarda amiloid hafif zincir, beta amiloid, transtiretin gibi yaklaşık 60 protein türü olası amiloidosis sebebi olarak gösterilmektedir. Farklı proteinler ve farklı organlar söz konusu olsa da amiloidosis vakalarının ortak özelliği proteinlerin kaynak, fonksiyon ve yapı ayrımı olmadan çapraz beta kıvrımlı yapılara dönüşmesidir (Di Crescenzo vd. 2013).

Böbrekler her kalp atışında kanın 1/5'ini toksinlerden arındırmasıyla yaşam için son derece önemli organlardır. Eğer fonksiyonlarını yerine getiremezlerse insan sadece birkaç gün hayatta kalabilir. Ne yazık ki böbrekler ilaç, besinlerdeki toksik maddeler ve çevresel kirleticiler gibi ekzojenöz kimyasallar için büyük bir hedeftir. Bu kimyasallar nedeniyle meydana gelen nefrotoksisite vakaları tıpta büyük önem taşımaktadır (Davies 2015).

Nefrotoksisite hücre membranlarında veya hücre-hücre bağlantılarında hasar, oksidatif stres ve serbest radikallerin oluşumu, yangı hasarı ya da vasküler sistemin olumsuz etkilenmesi şeklinde sonuçlar doğurabilir (Davies 2015). Nefrotoksisite büyük oranla proksimal tübülde gerçekleşmektedir. Bunun bir nedeni buradaki hücrelerin metabolik olarak oldukça aktif olması ve bu şekilde oksidatif stres unsurlarına daha çok maruz

kalmalarıdır. Diğer bir nedeni ise vücut sıvıları ve idrar boşluğu arasındaki küçük çözünen madde geçişleri esnasında hücrelerdeki toksinlerin yoğunlaşmasıdır. Ayrıca proksimal tübüller idrarla ilk karşılaşan hücreler olduğu için burada toksin miktarı diğer kısımlara göre daha fazladır (Davies 2015).

Böbrek hastalıkları, amiloidosis hastalarında sıklıkla görülen ve morbiditeye sebep olan bir durumdur. Böbreklerde amiloid depositleri glomerüller, tübüller, doku aralıkları ve damarlar gibi pek çok yerde bulunabilir. Vakaların % 97'sinde glomerüler depositler görülmektedir. Renal amiloidosisin en yaygın tipi plazma hücrelerinin dengesiz dağılımı ile ilişkilidir ve immünoglobülinlerin bileşenlerinin birleşiminden oluşur. 1971 yılında monoklonal hafif zincir kimyasal olarak tanımlanan ilk amiloid proteini olmuştur. En sık görülen amiloidosis monoklonal hafif zincir (AL) kaynaklı olandır (Khalighi vd. 2014). İmmünoglobülin hafif zincir ile oluşan amiloidosis hastaların % 85'ini etkilemektedir. Temel hedefi kalp ve böbreklerdir (Picken 2015).

Amiloidosisin teşhisi iki aşamadan oluşur. Bunlardan birincisi amiloidosisin genel teşhisi, ikincisi ise amiloidin türünün belirlenmesidir. Renal patolojiyle amiloidin belirlenmesi sadece doku depositleri üzerinden yapılır ve tam anlamıyla olmasa bile %85 oranda başarı göstermektedir (Picken 2015).

2.5 Isı Şoku Proteinleri

Isı şoku proteinleri, ilk kez Ferruccio Ritossa (1962) tarafından ısı şokuna maruz kalan hücrelerde tanımlanmıştır (Öncel 2012). Sadece ısı ile değil, açlık ve toksisite gibi diğer fizyolojik stres durumlarında da artar. Moleküler ağırlıklarına göre sınıflandırılırlar. İki önemli memeli şaperon sistemi 70 kDa ve 90 kDa ağırlığında olan Hsp70 ve Hsp90 ailesidir (Jones vd. 2014).

Isı şoku proteinleri, proteinlerin katlanması, açılması ve yeniden katlanması ile ilgilenen moleküler şaperon grubudur. Protein translasyonu sırasında veya sonrasında polipeptit zincirleri bu şaperonlar sayesinde aminoasit dizileri tarafından belirlenen fonksiyonel yapılarına ulaşırlar. Bu süreçte proteinlerin hatalı katlanması sık karşılaşılan bir durumdur ancak bu şekilde oluşan zararlı veya gereksiz ürünler genelde moleküler şaperonlar ve diğer kontrol mekanizmaları tarafından ortadan kaldırılır. Stres koşullarında liziz gibi kontrol mekanizmaları görevini yerine getiremediğinde Hsp'ler ve koşaperonları devreye girerek yanlış katlanmaların önlenmesine yardımcı olur. Ancak yine de hatalı katlanan proteinler patojen hale gelebilir (Jones vd. 2014).

Stres koşulları altında proteinlerin açılması, hatalı katlanması veya kümelenmesi stres cevabını tetikler. Bu durum proteinlerin gen transkripsiyonunu artırır. Hsp gen transkripsiyonu HSP gen sunucu (promoter) bölgelerinde HSF1 (ısı şoku faktörü 1) ve HSE'lerin (ısı şoku elementi) etkileşimi ile yönetilir. Normal koşullarda HSF1 hücre sitoplazmasında gizli monomerik bir molekül olarak bulunur. Stres koşullarında ise MAPK (mitojenle-aktif protein kinaz) alt aileleri tarafından (ERK1, JNK/SAPK, p38 protein kinaz) hiperfosforile edilir. Daha sonra DNA bağlama kapasitesi olan fosforile edilmiş trimerlere dönüşerek çekirdeğe taşınır. HSF trimerlerinin down regülasyonu Hsp'ler ve çekirdekte bulunan "ısı şoku bağlayıcı protein 1" tarafından yapılır (Dubey vd. 2015).

Hsp'lerin sentezi bitki, hayvan ve insanlarda sıklıkla çalışılan bir konudur. Çünkü Hsp'ler oksidanlar, toksinler, ağır metaller, serbest radikaller, virüsler gibi strese yol açan faktörler karşısında çoğalmaktadır (Mahmood vd. 2014). Farklı Hsp aileleri üyelerinin kendilerine özgü rolleri vardır. Hsp27, Hsp60 ve Hsp70 protein agregasyonunu engeller ve proteinlerin katlanmasına yardımcı olur. Hsp100 agregatlardan proteinleri kurtarır. Hsp90 proteinlerin olgunlaşması ve aktifleşmesinde önemli rol oynar (Lu vd. 2014). Günümüzde yapılan çeşitli çalışmalarda Hsp60 ve Hsp70 aynı zamanda toksisite seviyelerini araştırmada biomarker olarak kullanılmaktadır (Mahmood vd. 2014).

2.6 Hsp70

Hsp70, hücre koruyucu özelliği, potansiyel anti-inflamatuar etkisi, geniş doku dağılımı ve diğer moleküllerle etkileşim yeteneği sayesinde uygun bir terapötik hedef olması sayesinde en çok çalışılan Hsp'lerden biridir (O'Neill vd. 2014). Hsp70 ailesi üyeleri C-terminal bölgesinde denatüre veya yabancı proteinlerin hidrofobik kısımlarının bağlanması için bir alan içerir. N-terminal bölgesinde ise ATP'nin (adenozin trifosfat) ADP'ye (adenozin difosfat) hidrolizini kolaylaştıran ATPaz alanı bulundurulur. N-terminalinde gerçekleşen bu hidroliz ile C-terminalindeki konformasyon kolaylaşır ve böylece bağlanmış denatüre protein stabilize edilir. Bu şekilde denatüre proteinin yeniden katlandığı kabul edilir (Jones vd. 2014).

İnsanlardaki Hsp70 ailesinden endoplazmik retikulumda bulunan Hsp70-5 ve sitosolik Hsp70-8 zorunlu gardiyan (housekeeping) genleridir. Mitokondriyal Hsp70-9 protein homeostasisiyle ilgili olaylarda rol oynar. Hsp70-1 ve Hsp70-2 çeşitli kanser hücrelerinde çeşitli fonksiyonlara sahiptir. Hsp70-1 malignan tümörlerin başlangıcıyla ilişkilidir ve "kansere hayatta kalma proteini" olabilir (Yu vd. 2015).

Hsp70 ailesi üyelerinin görevleri hücredeki konumlarına göre farklılık göstermektedir. Fizyolojik koşullar altında Hsp70'ler moleküler şaperon olarak davranır. Hücre içinde bulunan Hsp70'ler stres tarafından indüklenen ölümcül hasara karşı koruma sağlar. Aynı zamanda bu Hsp70'ler çoklu-protein komplekslerinin düzenlenmesini, yeni sentezlenen polipeptitlerin veya anormal proteinlerin katlanmasını ve taşınmasını destekler. Hsp70'ler güçlü anti-apoptotik proteinlerdir ve apoptozu çeşitli şekillerde önleyebilirler (Radons 2016).

Hücre içi Hsp70'ler proteomik homeostastik kilit rol oynarken hücre dışı Hsp70'ler immünomodulator fonksiyonlara sahiptir. Bu rolü MHC (majör histokompatibilite kompleksi) antijenleri aracılığıyla immünojenik peptitlerin çapraz sunucusu olarak veya NK (doğal öldürücü) hücreleri tarafından oluşturulan immün cevabı stimüle ederek

yerine getirirler. Bunların yanı sıra Hsp'ler pro-inflamatuar sinyal oluşturmada ve anti-inflamatuar etki göstermede de etkilidir (Radons 2016).

Hsp70'ler, hücrenin hayatta kalması ve proteostasis üzerindeki fonksiyonları ile şaperon ağının önemli elemanlarından. Birçok çalışma, Hsp70'lerdeki değişimlerin sağlıklı veya hastalıklı profillerle ilişkisi olduğunu desteklemektedir. Bu nedenle de Hsp70'ler değişik fizyolojik ve patolojik şartlar altında potansiyel biomarker olarak veya geniş bir hastalık yelpazesinde ilaç hedefi olarak görülmektedir (Radons 2016).

2.7 Hsp70 ve Amiloid Proteostasisi

Denatüre proteinleri yeniden katlama yetenekleri göz önünde bulundurulduğunda, Hsp'ler denatüre proteinlerin neden olduğu hastalıkların tedavisinde bir basamak olarak görülmektedir. Çeşitli toksisite çalışmalarının sonucunda özellikle Hsp70'in hücre toksisitesinde potansiyel terapötik tamamlayıcı olduğu düşünülmektedir (Jones vd. 2014).

Hsp70 amiloid beta homeostasisine müdahale ederek amiloid betanın toksik etkisine karşı koruyucu etki gösterir. Hem enzim aracılığıyla amiloid beta degradasyonu sağlayarak hem de mikroglia ve astrositleri fagositoza teşvik ederek toksik etkiyi ortadan kaldırır. Birçok hayvan modeli üzerinde yapılan araştırmalar sonucu Hsp70'in merkezi sinir sisteminde nörodejenerasyona karşı koruyucu rolü olduğu kanıtlanmıştır. Alzheimer hastalığının ortaya çıkmasında Hsp70'in düzgün fonksiyon gösterememesi büyük rol oynamaktadır. Amiloid betanın hücre içinde yumaklar oluşturması ve hücre dışında birikmesi bu fonksiyon bozukluğuyla doğru orantılı ilerler (Wang vd. 2014).

Hsp70 Alzheimer hastalığında hücre koruyucu rolünü birçok şekilde yerine getirebilir. Bunlardan biri amiloid beta oligomerizasyonunu önlemesidir. Yapılan çalışmalarda Hsp70'in oligomerleri tanıyarak konformasyonlarını değiştirdiği gösterilmiştir. Açıktaki hidrofobik kısımlar Hsp70'in oligomeri tanınması ve yeniden düzenlemesi için "etiket" görevi görmektedir. Bunun yanı sıra Hsp70 amiloid betanın ortamdan temizlenmesini

sağlar. Amiloid beta beyinden fagositoz, enzim yollu degradasyon veya lenf nodlarına ve kana taşınarak temizlenebilir. Hsp70 bu yolları uyarmakla görevlidir (Lu vd. 2014).

Hoshino vd. (2011), kontrol grubuyla kıyaslandığında, Alzheimer hastalıklı fare modelinde yüksek Hsp70 seviyesinin amiloid plaklarını azalttığını gözlemişlerdir. Bunun yanı sıra artan Hsp70 miktarı ile mikrogial hücrelerdeki amiloid beta peptitlerinin degradasyonunun da arttığı görülmüştür. Evans vd. (2006) monomerik amiloid beta ile yaptıkları çalışmalarda da Hsp70'in hatalı katlanan proteinleri yeniden katlayarak oligomerizasyonu azalttığını göstermişlerdir. Bu iki çalışma Hsp70 ve amiloid beta arasındaki etkileşimi ortaya koymaktadır (Repalli ve Meruleo 2015).

Hsp70 ekspresyonu böbrek gelişimi esnasında dokular arasındaki osmolalitede meydana gelen değişimlerle yakından ilgilidir. Ayrıca Henle kulpunun çıkan kolunun korunmasını sağlar. Hsp70'in az olarak eksprese edilmesi böbrek hastalıklarıyla yakından ilişkilidir. Hsp70 indüksiyonu tıkalı nefropatide meydana gelen böbrek tübüllerindeki epitel hücrelerinin apoptozunu ve fibrozisini düzenler. Bunun sonucunda renal epitelyal hücreler Hsp'ler sayesinde apoptotik hücre ölümünden kurtulabilir. Aynı zamanda Hsp70 sayesinde oksidatif hasara bağlı zararlar ve yangı da önlenir (Mazzei vd. 2015).

Renal iskemi reperfüzyon hasarında (IRI), apoptoz, mikrovasküler disfonksiyon ve immünolojik aktivasyon gibi sorunlar oluşur. Bu durumda renal Hsp70 geninde 43 kat fazla ekspresyon gözlenmiştir. Hsp70'in böbrekte koruyucu ve anti-inflamatuar rolü tam olarak anlaşıldığında hastaların tedavi imkanlarında da önemli gelişmeler kaydedilmesi beklenmektedir (Rao 2016).

Bu çalışma, amiloid beta toksisitesi sonucu böbreklerde oluşan depositlerin yok edilmesine ve toksik etkinin kaldırılmasına yönelik olup, böbrek dokusunda meydana gelebilecek hasarın giderilmesinde kullanılabilecek potansiyel terapötik yöntemlere ışık tutması amacıyla tasarlanmıştır. Bu sayede, oluşan çeşitli böbrek hastalıklarının ve bu hastalıkların oluşturduğu hasarların önüne geçilebileceği düşünülmüştür. Bu nedenle bu

Çalışmada insan embriyonik böbrek hücre hattında amiloid beta ile indüklenen sitotoksisite zerine Hsp70 şaperonunun koruyucu rolünün incelenmesi amaçlanmıştır.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

HEK 293 hücre hattı Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'nden elde edildi. Amiloid beta (Sigma, USA), 5-10 μ M konsantrasyonlarında kültürler eklendi. Koruyucu rolü araştırılan Hsp70, Enzo (USA)'dan temin edildi. Hsp70, 2 μ g/ml olmak üzere tek doz kullanıldı. Hücre canlılığı MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) yöntemi ile tayin edildi. Oksidatif stres parametreleri Glutathione (GSH) Assay Kit II (Calbiochem, CA), Catalase Assay Kit (Calbiochem, CA), Lipid Hydroperoxide (LPO) Assay Kit (Calbiochem, CA), Superoxide Dismutase (SOD) Assay Kit II (Calbiochem, CA) kullanılarak kolorimetrik olarak ölçüldü.

3.1 Deney Gruplarının Hazırlanması

G1: Kontrol grubu (Dimetil sülfoksit, DMSO)

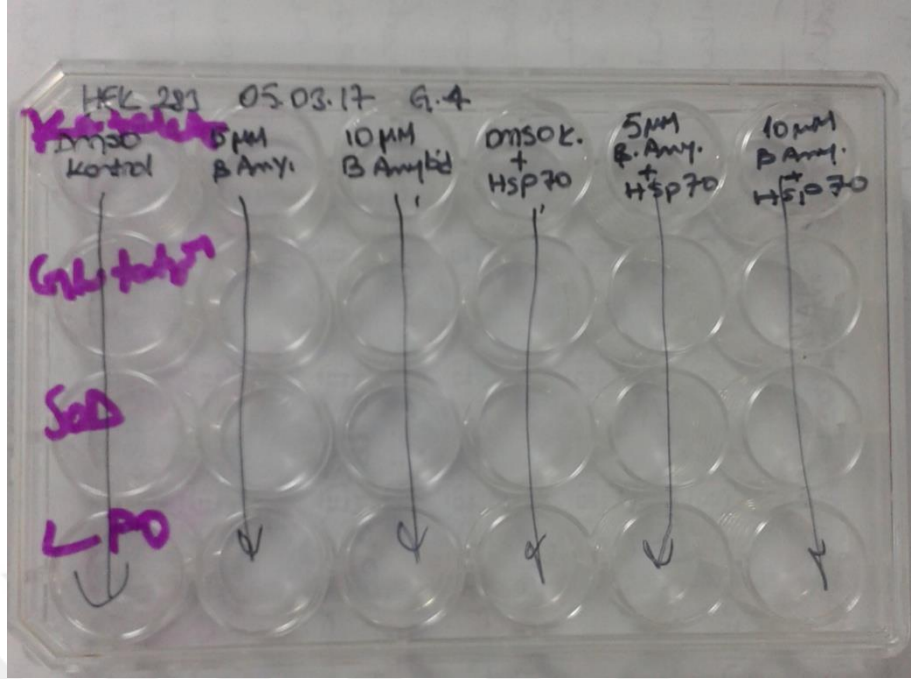
G2: 5 μ M amiloid beta

G3: 10 μ M amiloid beta

G4: DMSO + 2 μ g/ml Hsp70

G5: 5 μ M amiloid beta + 2 μ g/ml Hsp70

G6: 10 μ M amiloid beta + 2 μ g/ml Hsp70



Şekil 3.1 Deney grupları

3.2 Hücre İnkübasyonu ve Lizatların Hazırlanması

HEK 293 hücreleri kuyucuk başına 0.2×10^6 hücre olacak şekilde 24'lü kuyucuk plakasına ekildi ve ertesi gün amiloid beta uygulaması yapılacak kuyucuklara 5 μ M ve 10 μ M amiloid beta içerecek şekilde amiloid betalı besiyeri eklendi. DMSO kontrol kuyucuklarına, eklenen amiloid beta miktarı kadar DMSO eklendi ve hücreler 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Bir sonraki aşamada, hem normal hem de amiloid beta uygulaması yapılan HEK 293 hücrelerine 2 μ g/ml Hsp70 eklenerek 2 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Uygulamanın sonunda, hücreler ılık PBS (fosfat tamponlu tuz çözeltisi) ile yıkandı ve yapılacak her enzim deneyi için uygun çözeltide hücre lizatları hazırlandı.

3.2.1 Glutathione Assay Kit II (Cat. No. 354103)

Hücreler buz üzerinde 200 μ l soğuk tampon (1 mM EDTA (etilendiamin tetraasetik asit) içeren 50 mM KH_2PO_4 (potasyum fosfat) çözeltisi, pH 7.0) içerisinde hücre

kazıyıcısı ile kazındı ve sonike edildi. Ardından 10.000 x g'de 15 dakika + 4 °C'de santrifüj edildi. Süpernatant temiz tüpe aktarıldı.

3.2.2 Catalase Assay Kit (Cat. No. 219265)

Hücreler buz üzerinde 100 µl soğuk tampon (1 mM EDTA içeren 50 mM KH₂PO₄ tampon, pH 7.0) içerisinde kazındı ve sonike edildi. 10.000 x g'de 15 dakika + 4 °C'de santrifüj edildi. Süpernatant temiz tüpe aktarıldı.

3.2.3 Superoxide Dismutase Assay Kit II (Cat. No. 574601)

Hücreler 150 µl soğuk tampon (1 mM EGTA (bis-glikoleter N,N0,N1,N2 tetraasetikasit), 210 mM mannitol ve 70 mM süktroz içeren 20 mM HEPES (2-[4-(2-hidroksietil) piperazin-1-il]etansülfonik asit), pH 7.2) içerisinde kazındı ve sonike edildi. 1500 x g'de 15 dakika + 4 °C'de santrifüj edildi. Deney için süpernatant toplandı.

3.2.4 Lipid Hydroperoxide Assay Kit (Cat. No. 437639)

Hücreler 150 µl HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi) dereceli su içerisinde kazındı. 200 µl Ekstrakt R-doyurulmuş metanol eklendi ve vortekslendi. Ardından 400 µl soğuk deoksijene kloroform eklendi ve vortekslendi. 1500 x g'de 5 dakika 0 °C'de santrifüj edildi. Alt tabakadaki kloroform pastör pipeti ile dikkatlice temiz bir tüpe aktarıldı.

Tüm testler için hücre lizatları hazırlandıktan sonra kitlerin deney protokolleri kullanılarak testler yapıldı.

3.3 MTT Ölçümü

Metabolik aktivite ölçümü ile yapılan hücre proliferasyon testi olarak MTT yöntemi kullanıldı (Mosmann 1983). Ölçüm 24. saatte yapıldı. 24. saatin sonunda hücrelerin üzerine 10 µl MTT çalışma solüsyonu eklendi. 2 saatlik inkübasyondan sonra mikroskopik inceleme yapıldı ve ardından 100 µl liziz solüsyonu ilave edildi. Işığa duyarlı bir yöntem olduğundan çalışmalar karanlık ortamda gerçekleştirildi. Plakalar, mikropilaka okuyucuda 630 nm dalga boyunda okundu. Hücre canlılığı yüzdesi, deney grubunun kontrol grubuna oranlanması ve sonucun 100 ile çarpılmasıyla hesaplandı.

3.4 Bradford Yöntemi ile Protein Tayini

3.4.1 Reaktiflerin hazırlanması

3.4.1.1 1x boya reaktifi

1 l boya solüsyonu metanol ve fosforik asit içerir.

3.4.1.2 BSA (Bovin Serum Albümin) Standard, 2 mg/ml

2 ml tüpler içerisindeydi.

3.4.1.3 Bovin Gama-Globülin Standard, 2 mg/ml

2 ml tüpler içerisindeydi.

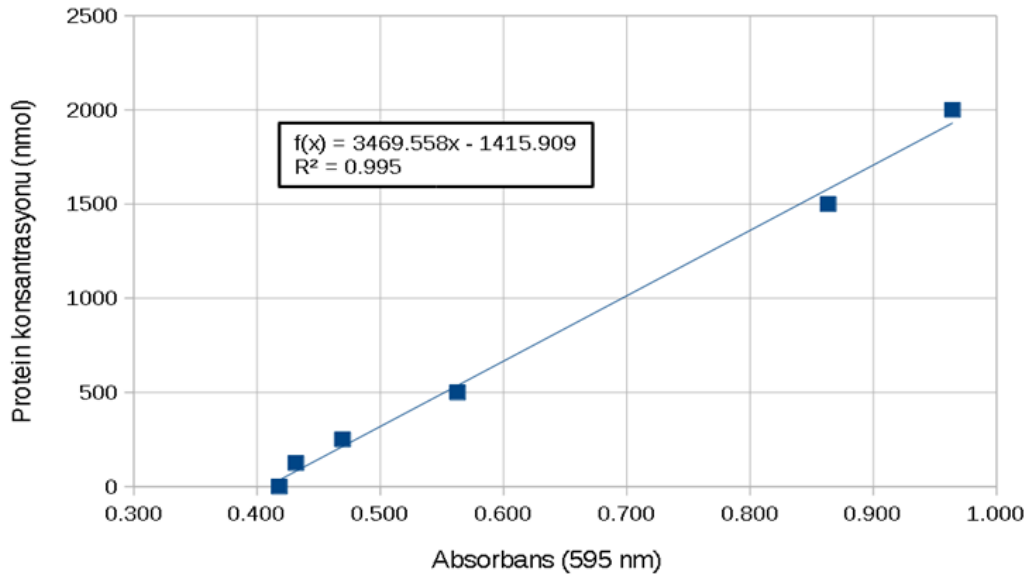
3.4.1.4 Bovin Serum Albumin Standard Set

2 ml tüplerde 7 ayrı konsantrasyonda (2, 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.25, 0.125 mg/ml) BSA halindeydi.

3.4.1.5 Bovin Gama-Globülin Standard Set

2 ml tüplerde 7 ayrı konsantrasyonda (2, 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.25, 0.125 mg/ml) gama-globülin halindeydi.

Protein standartı örnekler ile aynı tampon kullanılarak dilüe edildi. Standartlar ve deney karışımları kuyucuklara yüklendi. Her kuyucuğa 1x boya reaktifi eklendi ve plaka karıştırıcıda karıştırıldı. Oda sıcaklığında inkübe edildi. Total protein miktarı Bradford (1976) yöntemine göre belirlendi. Spektrofotometrik olarak 595 nm’de okutuldu.



Şekil 3.2 Bradford total protein standart grafiği

3.5 Lipid Hidroperoksidasyonu Ölçümü

3.5.1 Reaktiflerin hazırlanması

3.5.1.1 Ekstrakt R

100 mg Ekstrakt R ile 15 ml metanol karıştırıldı, 2 dakika vortekslendi. Metanol bulutsu bir görünüm aldı ve katının büyük kısmı çözünmeden kaldı.

3.5.1.2 Trifenilfosfin

2.6 mg trifenilfosfil 1 ml kloroform-metanol karışımında çözülerek 10 mM çözelti hazırlandı.

3.5.1.3 Kromojen

Kitin içindeki FTS Reaktif 1 ve FTS Reaktif 2 eşit miktarda karıştırılarak vortekslendi. Kullanılacak her bir tüp için 50 µl kromojen hazırlandı.

3.5.1.4 Kloroform

100 ml kloroform nitrojen yardımı ile 30 dakika deoksijene edildi.

3.5.1.5 Metanol

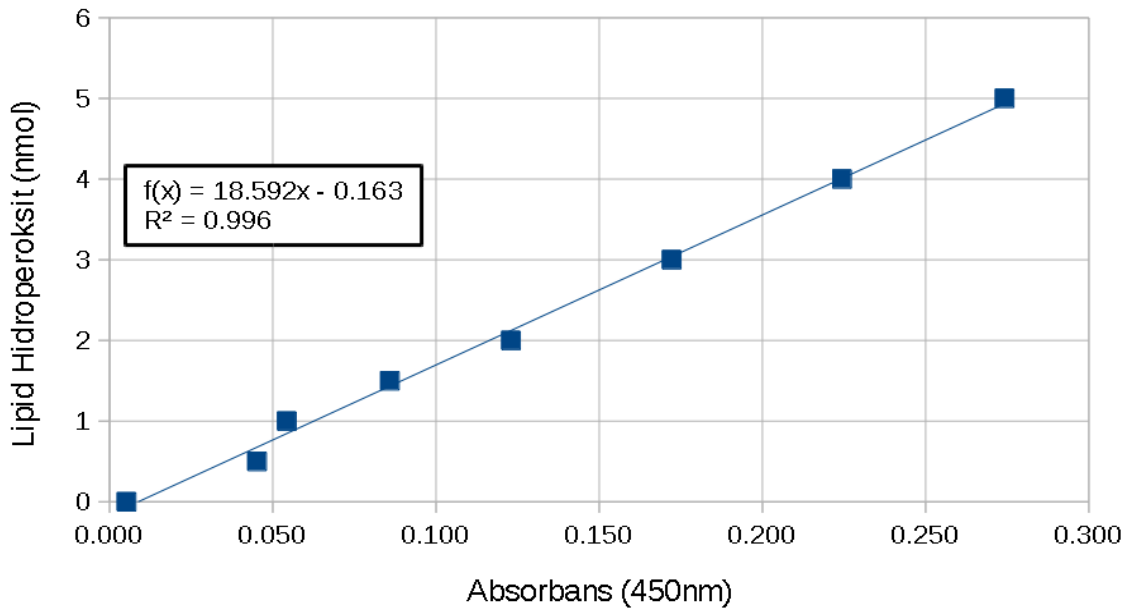
100 ml metanol nitrojen yardımı ile 30 dakika deoksijene edildi.

3.5.1.6 Kloroform-metanol karışımı

2 ölçü deoksijene kloroform ile 1 ölçü deoksijene metanol karıştırıldı. Her bir deney tüpü için yaklaşık 1 ml karışım eklendi.

3.5.1.7 Lipid hidroperoksit standartları

24 temiz test tüpü hazırlandı ve A-H olarak üç kez etiketlendi. Her test tüpüne 500 µl kloroform eklendi. Tüplere 450 µl kloroform-metanol karışımı eklendi. Ardından 50 µl kromojen eklendi ve vortekslendi. Tüplerin ağzı polipropilen kapaklarla iyice kapatıldı. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Lipid hidroperoksasyonu Morrow ve Roberts (1997) metoduna göre ölçüldü. Spektrofotometrik olarak 450 nm’de okutuldu.



Şekil 3.3 LPO standart grafiği

3.6 Süperoksit Dismutaz Miktarı Tayini

3.6.1 Reaktiflerin hazırlanması

3.6.1.1 Deney tamponu (10X)

3 ml 10X deney tamponu 27 ml HPLC dereceli su içerisinde 1X'e dilüe edildi. Son deney tampon içeriği 50 mM Tris-HCl (pH 8) 0.1 mM DTPA (dietilen triamin penta asetik asit) ve 0.1 mM hipoksantin şeklindeydi. Radikal dedektörün dilüsyonunda kullanıldı.

3.6.1.2 Örnek tampon (10X)

2 ml 10X örnek tampon 18 ml HPLC dereceli su ile 1X'e dilüe edildi. Son örnek tampon 50 mM Tris-HCl (pH 8) şeklindeydi. SOD standartlarının hazırlanmasında, ksantin oksidazın ve örneklerin dilüsyonunda kullanıldı.

3.6.1.3 Radikal dedektör

Tetrazolyum tuzunun solüsyonunu içerir. İlk kullanımda 50 µl alınıp bir tüpte 19.95 ml deney tamponu ile dilüe edildi. Etrafı alüminyum folyo ile sarıldı.

3.6.1.4 SOD (Standart)

Bovin eritrosit SOD (bakır/çinko) içerir. Enzim buzun üzerinde çözülerek kullanıma hazırlandı.

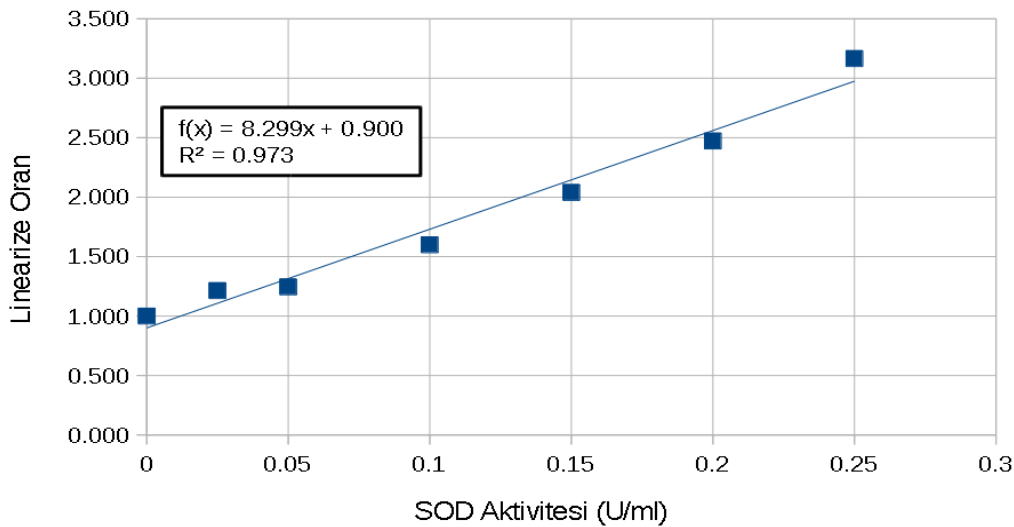
3.6.1.5 Ksantin oksidaz

Ksantin oksidaz solüsyonunu içerir. İlk kullanımda bir şişesi çözöldü ve 50 µl bir şişeye aktarılıp 1950 µl örnek tampon ile dilüe edildi.

SOD standart çözeltileri hazırlandı. 20 µl SOD standartları 1980 µl örnek tampon ile dilüe edildi. SOD stok solüsyonu oluşturuldu. 7 adet temiz cam tüp alındı ve A-G arası isimlendirildi. A-G standartları hazırlandı. SOD standart kuyucuklarına 200 µl dilüe radikal dedektör ve 10 µl standartlar (A-G) eklendi. Örnek kuyucuklarına 200 µl dilüe radikal dedektör ve 10 µl örnekler yüklendi. Kuyucuklara 20 µl dilüe ksantin oksidaz eklendi. Biraz karışması için 96 kuyucuk dikkatlice çalkalandı. Ağzı örtöldü. Plaka 20 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. SOD aktivitesi Maier ve Chan (2002) yöntemine göre ölçöldü. Spektrofotometrik olarak 450 nm’de okutuldu.

Tüm standartların ve örneklerin absorbanslarının ortalamaları hesaplandı.

Merck 574601 Süperoksit Dismutaz Deney Kiti prosedürüne göre standart eğri çizildi. Standart eğriden regresyon denklemi kullanılarak örneklerin SOD aktivitesi hesaplandı (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 SOD standart grafiğı

3.7 Glutasyon Tayini

3.7.1 Reaktiflerin hazırlanması

3.7.1.1 MES (2-(N-morfolino)etansülfonik asit) tampon 2X

Bu tampon 0.4 M MES, 0.1 M fosfat ve 2 mM EDTA (pH 6.0) içerir. Kullanmadan önce tampon eşit hacimde su ile dilüe edildi.

3.7.1.2 GSSG (glutasyon disülfid) standartı

1 şişe MES içerisinde 25 µM GSSG içerir. Standartlar kullanıma hazırды.

3.7.1.3 Kofaktör karışımı

Liyofilize halde NADP⁺ (nikotinamid adenin dinükleotid fosfat) ve glukoz 6-fosfat içerir. Şişenin içeriği 0.5 ml su ile çözündü ve iyice karıştırıldı.

3.7.1.4 Enzim karışımı

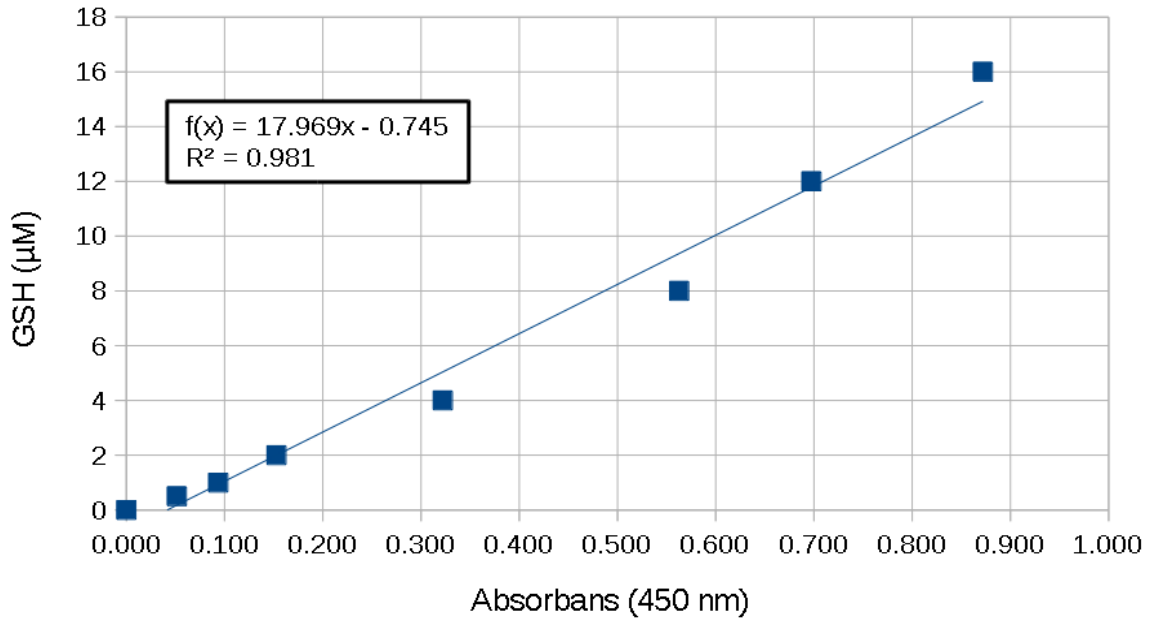
Şişe glutasyon redüktaz ve glukoz 6-fosfat dehidrojenaz içeren 0.2 ml tampon içerir. Şişe 2 ml MES tampon ile dilüe edildi ve iyice karıştırıldı.

3.7.1.5 DTNB (5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoik asit))

Her şişe liyofilize DTNB içerir. Her şişe 0.5 ml su ile iyice karıştırıldı.

Standartın hazırlanması için 8 adet temiz tüp alındı. A-H' ye kadar tüpler hazırlandı. Standart kuyucuklarına 50'şer µl standartlar (A-H) eklendi. Örnek kuyucuklarına 50'şer µl örnekler eklendi. Plakanın üstü kapağı ile kapatıldı. Deney karışımı 20 ml'lik şişe içerisinde sırasıyla MES tampon (11.25 ml), sulandırılmış kofaktör karışımı (0.45 ml) enzim karışımı (2.1 ml), su (2.3 ml) ve sulandırılmış DTNB (0.45 ml) içerir. Plaka kapağı uzaklaştırıldı ve taze hazırlanmış deney karışımı her kuyucuğa 150'şer µl ilave edildi. Kapağı yeniden kapatıldı. Karanlıkta orbital karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. GSH düzeyi Foyer vd. (1994) yöntemine göre ölçüldü. Spektrofotometrik olarak 450 nm'de 30 dakika içerisinde 5 dakikada bir olmak üzere 6 ölçüm yapıldı.

25. dakikada her standart ve örneğin absorbansının ortalaması alındı. Merck 354103 Glutatyon Deney Kiti prosedürüne göre standart eğri çizildi. Standart eğriden tüm örnekler için total GSH değerleri hesaplandı (Şekil 3.5).



Şekil 3.5 GSH standart grafiği

3.8 Katalaz Miktarı Tayini

3.8.1 Reaktiflerin hazırlanması

3.8.1.1 1X deney tamponu

Bu deney tamponu (100 mM potasyum fosfat, pH 7.0), 2 ml 10X deney tamponunun 18 ml HPLC dereceli su ile dilüe edilmesiyle oluşturuldu.

3.8.1.2 1X örnek tamponu

Bu deney tamponu (25 mM potasyum fosfat, pH 7.5, 1 mM EDTA ve 0.1% BSA içerir), 5 ml 10X deney tamponunun 45 ml HPLC dereceli su ile dilüe edilmesiyle oluşturuldu. Formaldehit standartlarını, katalazı (kontrol) ve örnekleri deney öncesi dilüe etmek için kullanıldı.

3.8.1.3 Formaldehit standardı

4.25 M formaldehit içerir. Kullanıma hazırdır.

3.8.1.4 Katalaz (kontrol)

Bovine karaciğer katalaz (bovine liver catalase) liyofilize haldedir. 2 ml 1X örnek tampon eklendi ve iyice vortekslendi. Enzim ana stoğundan 100 µl alındı ve 1.9 ml 1X örnek tampon ile dilüe edildi. Her kuyucuğa 20 µl dağıtıldı.

3.8.1.5 Potasyum hidroksit

4 ml soğuk HPLC dereceli suda çözüldü ve vortekslendi.

3.8.1.6 Hidrojen peroksit

8.82 M stok solüsyondur. 40 µl hidrojen peroksit 9.96 ml HPLC dereceli suda dilüe edildi.

3.8.1.7 Katalaz purpald

0.5 M hidroklorik asit içerisinde kullanıma hazırды.

3.8.1.8 Potasyum periyodat

0.5 M potasyum hidroksit içerisinde kullanıma hazırды.

Deneyin final hacmi her kuyucuk için 240 µl' dir. Tüm reaktifler deney başlamadan önce oda sıcaklığına getirildi. Deneyde 1X deney tamponu kullanıldı.

3.8.1.9 Formaldehit standartlarının hazırlanması

10 µl formaldehit standartı 9.99 ml 1X örnek tampon içerisinde dilüe edildi. 4.25 mM formaldehit stok solüsyonu oluştu. A'dan G'ye 7 adet standart tüpü hazırlandı.

3.8.1.10 Formaldehit standart kuyucukları

20 µl formaldehit standartları (A-G), 100 µl 1X deney tamponu ve 30 µl metanol kuyucuklara eklendi.

3.8.1.11 Pozitif kontrol kuyucukları (Bovin karaciğer CAT)

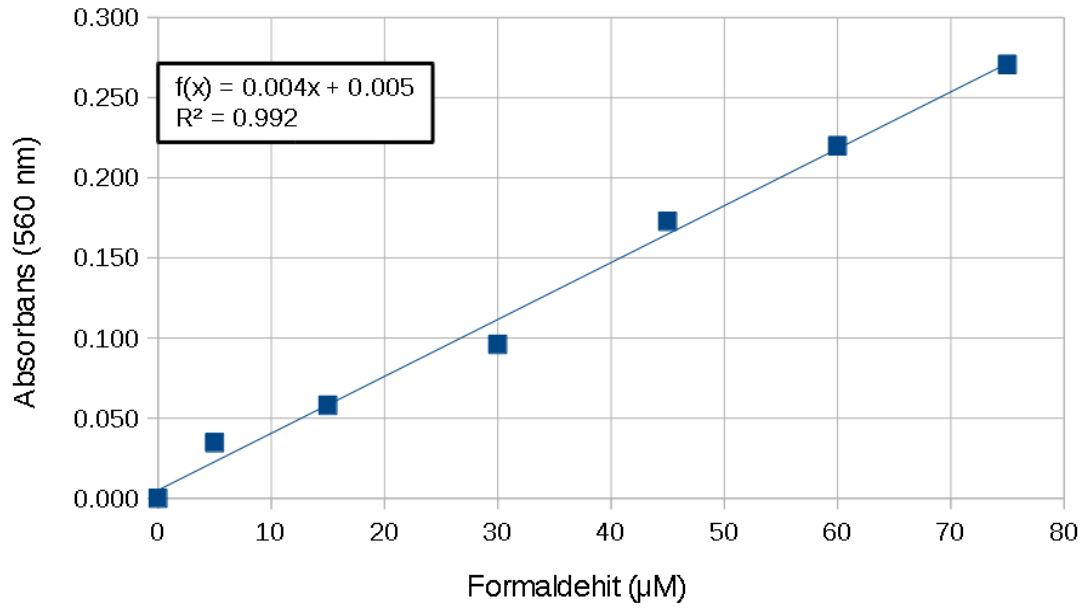
100 µl 1X deney tamponu, 30 µl metanol ve 20 µl dilüe CAT kontrol kuyucuklara eklendi.

3.8.1.12 Örnek kuyucukları

100 µl 1X deney tamponu, 30 µl metanol ve 20 µl örnek her kuyucuğa dağıtıldı.

Reaksiyonu başlatmak için her kuyucuğa 20 µl dilüe hidrojen peroksit eklendi. Bu işlem hızlıca yapıldı ve işleme başlama saati not edildi. Plakanın üzeri örtüldü. Oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 20 dakika inkübe edildi. Reaksiyonu sonlandırmak için her kuyucuğa 30 µl potasyum hidroksit ve ardından 30 µl katalaz purpald eklendi. Plakanın üstü örtüldü ve çalkalayıcı üzerinde 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Her kuyucuğa 10 µl potasyum periyodat eklendi, üzeri örtüldü ve 5 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Katalaz aktivitesi Wheeler vd. (1990) yöntemine göre ölçüldü. Spektrofotometrik olarak 560 nm’de okutuldu.

Merck 219265 Katalaz Deney Kiti prosedürüne göre standart eğri çizildi ve deney sonuçlarına göre katalaz aktivitesi hesaplandı (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 Katalaz standart grafiği

3.9 İstatistiksel Analiz

Kontrol grubu ile uygulama grupları arasındaki farklılıkların istatistiksel önemi SPSS 15.0 programı kullanılarak değerlendirildi. Bu farklılıklar ve önem seviyeleri tek yönlü varyans analizi (one way ANOVA) ile belirlendi. $p < 0.05$ seviyesindeki sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Çoklu karşılaştırmalarda Bonferroni, Dunnett ve Tukey testleri uygulandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

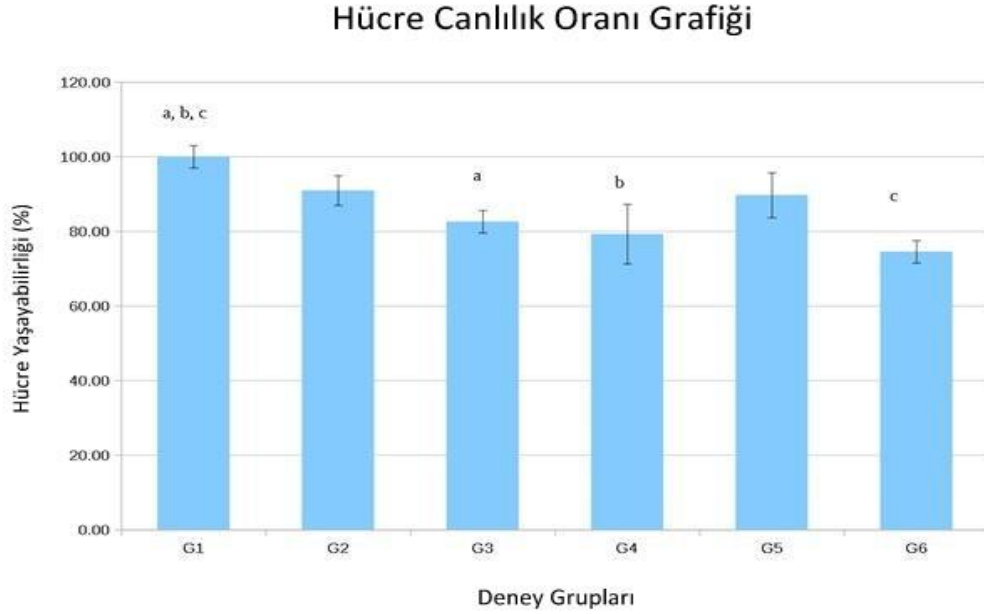
Deney sonuçlarından elde edilen veriler ortalama $\pm$ standart hata (SEM) olarak hesaplandı.

Çizelge 4.1 Deney sonuçları (Ortalama $\pm$ SEM)

Deney Grupları	G1	G2	G3	G4	G5	G6
MTT(%)	100.00 $\pm$ 3 ^{a, b, c}	90.92 $\pm$ 4	82.58 $\pm$ 3 ^a	79.27 $\pm$ 8 ^b	89.70 $\pm$ 6	74.52 $\pm$ 3 ^c
LPO(nmol)	2.067 $\pm$ 0.03 ^{a, b, c, d, e}	3.123 $\pm$ 0.05 ^{a, f}	3.471 $\pm$ 0.12 ^b	3.510 $\pm$ 0.16 ^c	3.697 $\pm$ 0.03 ^{d, f}	3.561 $\pm$ 0.12 ^e
CAT (U/ μ g protein)	0.860 $\pm$ 0.02	0.111 $\pm$ 0.00	0.218 $\pm$ 0.12	1.258 $\pm$ 0.13	0.185 $\pm$ 0.00	1.197 $\pm$ 0.00
SOD (U/ μ g protein)	4.79 $\pm$ 0.96 ^{a, b, c}	3.69 $\pm$ 0.30 ^a	3.36 $\pm$ 0.10 ^b	3.90 $\pm$ 0.12	3.85 $\pm$ 0.05	3.58 $\pm$ 0.29 ^c
GSH (μ mol/ μ g protein)	0.565 $\pm$ 0.01 ^{a, f}	1.717 $\pm$ 0.08 ^{a, b, c, d, e}	0.670 $\pm$ 0.00 ^b	0.685 $\pm$ 0.00 ^c	0.726 $\pm$ 0.02 ^d	0.847 $\pm$ 0.03 ^{e, f}

Değişik küçük harfler, ortalamalar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları ifade etmektedir (p<0.05)

4.1 Amiloid Betanın HEK 293 Hücreleri Üzerindeki *in vitro* Sitotoksik Etkisinin MTT Canlılık Testi ile Ölçümü



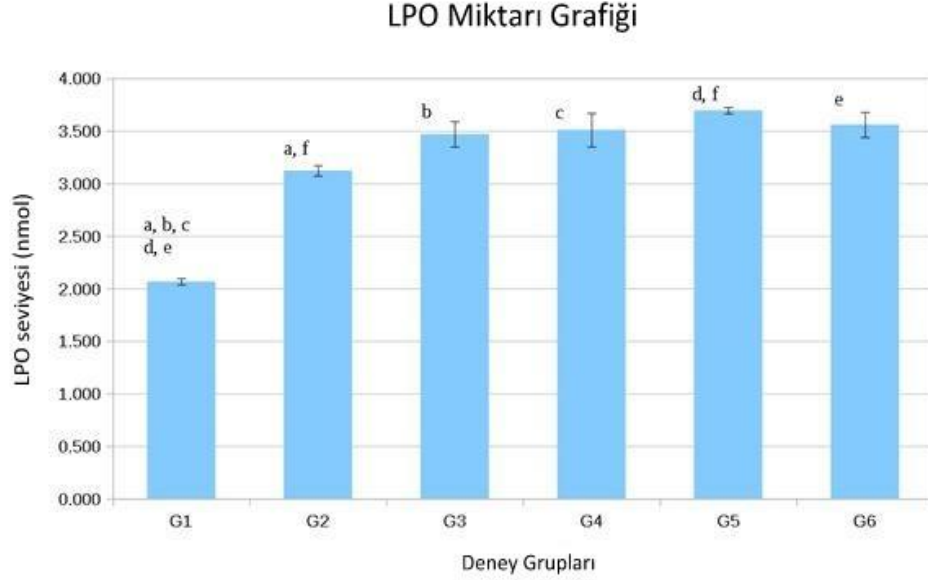
Şekil 4.1 Hücre yaşayabilirliğini gösteren grafik ($\pm$ SEM)

Veriler kontrol grubu G1'in % değeri üzerinden ifade edilmiştir. Değişik küçük harfler ortalamalar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları ifade etmektedir ($p < 0.05$).

MTT deney sonuçlarına tek yönlü varyans analizi (one way ANOVA) uygulandığında p değeri 0.005 olarak tespit edilmiştir. Bu nedenle uygulama yapılan gruplardan en az ikisi arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık vardır. Bu farklılığın hangi gruplar arasında olduğunu analiz etmek için çoklu karşılaştırma (Post-Hoc) test türlerinden Bonferroni ve Dunnett testleri kullanılmıştır. Dunnett testine göre G1 ile G3, G1 ile G4 ve G1 ile G6 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır.

4.2 HEK 293 Hücre Kültürlerinde LPO, SOD, GSH ve CAT Düzeyleri

4.2.1 Lipid peroksidasyonu ölçümü

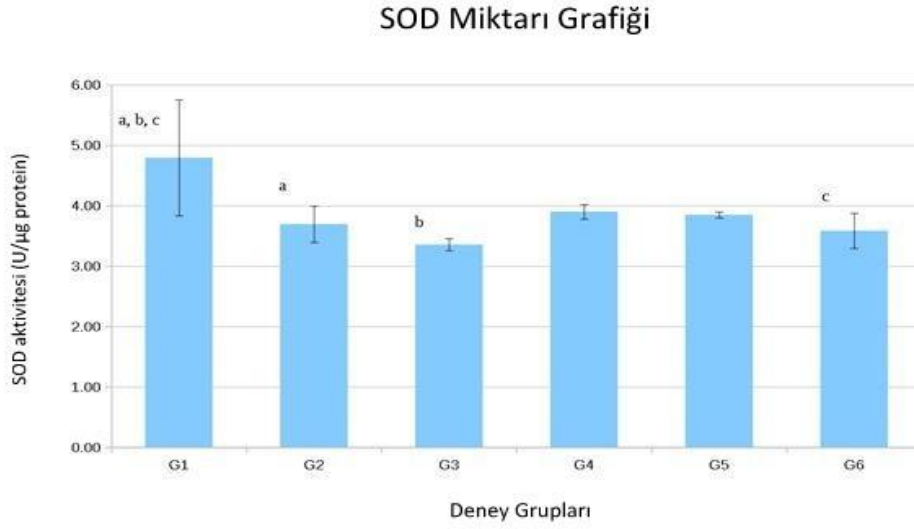


Şekil 4.2 LPO miktarını gösteren grafik ($\pm$ SEM)

Değişik küçük harfler ortalamalar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları ifade etmektedir ($p < 0.05$).

LPO deney sonuçlarına tek yönlü varyans analizi uygulandığında p değeri 0.000 olarak tespit edilmiştir. Bu nedenle uygulama yapılan gruplardan en az ikisi arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık vardır. Bu farklılığın hangi gruplar arasında olduğunu analiz etmek için çoklu karşılaştırma testlerinden Tukey ve Dunnett testleri kullanılmıştır. Bu testlerin sonuçlarına bakıldığında G1 ile tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır. Ayrıca G2 ile G5 arasında da anlamlı bir farklılık olduğu gözlenmektedir.

4.2.2 SOD aktivite tayini

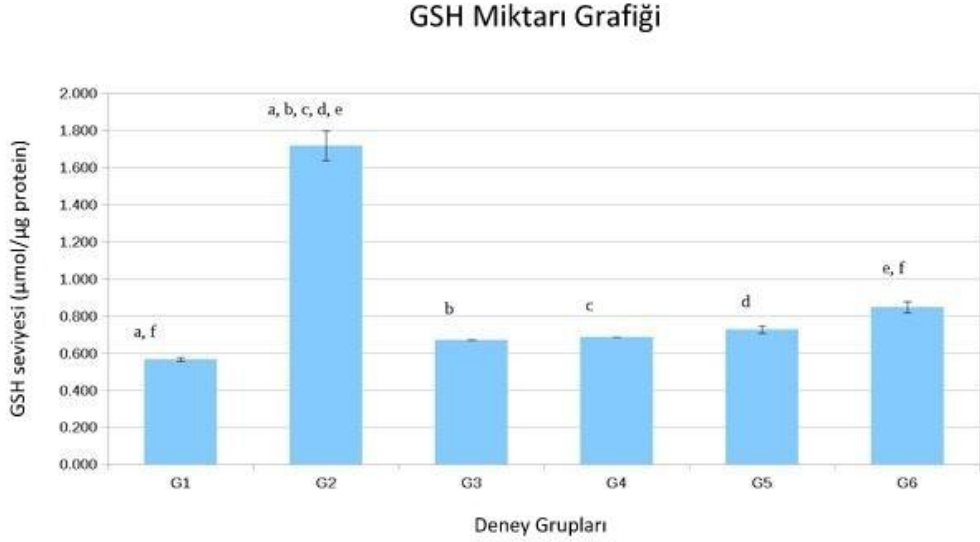


Şekil 4.3 SOD aktivitesini gösteren grafik ($\pm$ SEM)

Değişik küçük harfler ortalamalar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları ifade etmektedir ($p < 0.05$).

SOD aktivitesi deney sonuçlarına tek yönlü varyans analizi uygulandığında p değeri 0.025 olarak tespit edilmiştir. Bu nedenle uygulama yapılan gruplardan en az ikisi arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık vardır. Bu farklılığın hangi gruplar arasında olduğunu analiz etmek için çoklu karşılaştırma testlerinden Tukey ve Dunnett testleri kullanılmıştır. Bu testlerin sonuçlarına bakıldığında G1 ile G2, G1 ile G3 ve G1 ile G6 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır.

4.2.3 GSH miktarı tayini

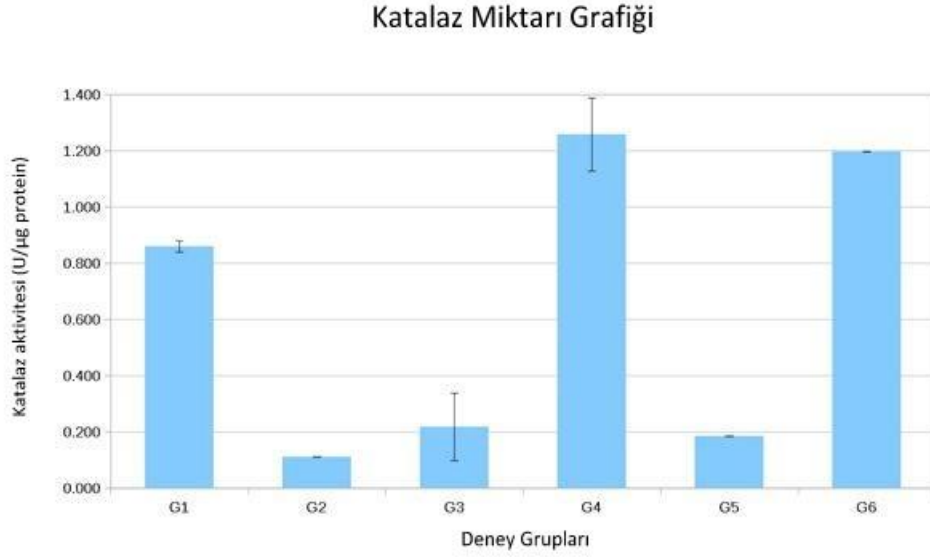


Şekil 4.4 GSH miktarını gösteren grafik ($\pm$ SEM)

Değişik küçük harfler ortalamalar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları ifade etmektedir ($p < 0.05$).

GSH deney sonuçlarına tek yönlü varyans analizi uygulandığında p değeri 0.000 olarak tespit edilmiştir. Bu nedenle uygulama yapılan gruplardan en az ikisi arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık vardır. Bu farklılığın hangi gruplar arasında olduğunu analiz etmek için çoklu karşılaştırma testlerinden Tukey ve Dunnett testleri kullanılmıştır. Bu testlerin sonuçlarına bakıldığında G1 ile G2 ve G1 ile G6 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır. Ayrıca G2 ile tüm gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmektedir.

4.2.4 Katalaz aktivite tayini



Şekil 4.5 Katalaz aktivitesini gösteren grafik ($\pm$ SEM)

Katalaz aktivitesi deney sonuçlarına tek yönlü varyans analizi uygulandığında p değeri 0.192 olarak tespit edilmiştir. Bu nedenle uygulama yapılan gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık yoktur.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Amiloid beta proteini, çeşitli dokularda amiloid birikimine yol açan proteinlerin küçük bir grubudur. Amiloid hastalıklarında bu proteinlerin antiparalel β -kıvrımlı tabaka konformasyonunda deposit oluşturduğu görülmüştür. Özellikle bu antiparalel- β kıvrımlı yapının oksidatif hasara neden olduğu ve toksik mekanizma oluşturduğu bilinmektedir (Schubert vd. 1995).

Amiloid fibril oluşumunun hasar mekanizmalarının araştırılmasının terapötik yaklaşımlar oluşturulabilmesi bakımından önemli olduğu ifade edilmektedir (Taşkiran ve Yılmaz 2007). Amiloidosis ve böbrek hastalıkları arasındaki ilişki araştırılmış, böbrek biyopsileri incelenerek depositlerin nasıl hasarlar oluşturduğu ortaya konulmuş ve tedavi stratejileri düşünülmüştür (Dember 2006). Böbrek, amiloid birikiminin en yaygın görüldüğü bölgelerden biridir (Scarpioni vd. 2016).

Yapılan araştırmalarda, amiloid beta toksisitesi ile ilgili mekanizmalar ileri sürülmesine rağmen bu mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır. Amiloid betanın büyük kısmı hücre dışı ortama salındığı için toksisitenin hücre dışı ortamda başladığı, daha sonra hücre içi ortama ilerleyerek temel hücresel süreci bozduğu ve hücre ölümüne sebep olduğu ileri sürülmüştür (Rivera vd. 2017). Dember (2006), amiloidosisle ilişkili böbrek hastalıklarında hücreler arasında suda erimeyen fibril oluşumunun organda fonksiyon bozukluğuna sebep olduğunu ifade etmiştir. Fonfria vd. (2005), amiloid beta toksisitesinin hücre ölümünü indüklediğini ortaya koymuşlardır. Kadowaki vd. (2005), amiloid birikiminin hücrelerde apoptoza yol açan sinyal yolağını tetiklediğini göstermişlerdir. Amiloid depositlerinin mitokondride fonksiyon bozukluğuna yol açarak reaktif oksijen türlerinin üretimine sebep olduğunu ve hücreleri bu yolla apoptoza götürdüğünü ileri sürmüşlerdir. Taşkiran ve Yılmaz (2007), amiloid birikiminin moleküler temeli ve yeni tedavi yaklaşımları konulu derleme makalelerinde vücudun pek çok doku ve organında hücreler arasında depolanan ve çözünmeyen protein agregatlarının hücreleri ölüme götürdüğünü ve pek çok hastalıkta amiloid gelişiminin görüldüğünü ifade etmişlerdir. Yapılan araştırmaların sonuçlarına göre amiloid beta

birikiminin hücre sağkalımını azalttığı ve hücreleri ölüme götürdüğü ortaya konmuştur. Çalışmamızda uygulanan amiloid beta dozuna bağlı olarak hücre sağkalımının etkilendiği, özellikle 10 µM dozunda amiloid beta uygulanan gruplarda hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlenmiştir.

Hücrelerde süperoksit radikalleri ve hidrojen peroksit (H_2O_2) birikimi toksisite oluşumunu tetiklemektedir. Amiloid beta, özellikle H_2O_2 birikimini arttırarak toksisiteye yol açmaktadır. H_2O_2 , amiloid beta toksisitesinin önemli bir mediyatörü olarak bilinmektedir (Behl 1997). Behl vd. (1994), amiloid betanın hücrelerde H_2O_2 birikimini arttırdığını ve lipid peroksidasyonuna yol açarak hücreyi ölüme götürdüğünü ileri sürmüşlerdir. Bu çalışmada da araştıracının bulgularına uygun olarak amiloid betanın lipid peroksidasyonuna yol açarak hücre toksisitesini indüklediği gözlenmiştir. Hem 5 µM hem de 10 µM konsantrasyonlarında amiloid beta uygulanan gruplarda lipid peroksidasyonunun arttığı ve bu artışın da istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir.

SOD enzimi süperoksit moleküllerinin H_2O_2 ve oksijene (O_2) dönüşümünü sağlar (Broxton ve Culotta 2016). CAT enzimi ise katalitik aktivite göstererek H_2O_2 'nin suya (H_2O) ve O_2 'ye çevrilmesinde rol oynar (Aebi, 1984). GSH, düşük moleküler ağırlıklı bir antioksidan olup H_2O_2 'nin H_2O 'ya indirgenmesinde görev alır (Kalinina vd. 2014). Amiloid betanın hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak oksidatif strese sebep olduğu gösterilmiştir (Tabner vd. 2005). Vinothkumar vd. (2017), kognitif fonksiyon bozukluğu olan kronik böbrek hastalarında, amiloid β_{42} ekspresyonu ve oksidatif stres ile ilgili araştırmalarında, hastaların plazma amiloid beta ve LPO düzeylerinin arttığını, SOD, CAT ve GSH düzeylerinin azaldığını tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde, amiloid beta uygulanan gruplarda LPO düzeylerinin arttığı, SOD ve CAT enzim aktivitelerinde azalma olduğu belirlenmiştir. SOD enzim aktivitesindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Araştıracıların bulgularından farklı olarak, glutatyon düzeylerinde ise azalma olmadığı dikkati çekmiştir. HEK 293 hücrelerine 5 µM amiloid beta dozu uygulandığında GSH düzeylerinde anlamlı bir artış olduğu da tespit edilmiştir. Bu durum toksik maddeye karşı glutatyonun cevabı olarak

değerlendirilmiştir. Ancak toksik maddenin dozu arttıkça GSH düzeyindeki artışın da azaldığı belirlenmiştir.

Son yıllarda ısı şoku proteinlerinin hücre koruyucu özellikleri sebebiyle terapötik potansiyelleri önemli araştırma konuları arasında yer almaktadır ve pek çok hastalıkta yeni tedavi stratejilerinin belirlenmesi konusunda umut vaad etmektedir. Evans vd. (2010), Hsp70'in yeni yeni keşfedilen bir ilaç hedefi olabileceğini vurgulamışlardır. Bobkova vd. (2014), fare modellerinde yaptıkları araştırmalar sonucu ekzojenöz Hsp70'in çeşitli nörodejeneratif hastalıklara ve taupatiye karşı potansiyel farmakolojik ajan olabileceğini düşünmüşlerdir.

Hsp70, stressiz hücrelerde çok düşük miktarlarda bulunurken stres durumunda miktarı hızla yükseldiği için en sık çalışılan Hsp'dir. Dokularda Hsp70'in immünoreaktivitesinin artması, çeşitli sebeplerle oluşan toksik etkinin Hsp sentezini tetiklediğini göstermektedir (Karaca vd. 2011).

Hsp70'in oligomerizasyon özelliği ile sitotoksositeye karşı savunmada önemli rol oynadığı ileri sürülmüştür (Danzer vd. 2011). Hsp70, Hsp sentezinin up regülasyonunun amiloid birikimi ile ilişkili olduğu bilinen çeşitli hastalıklarda önemli etki gösteren anti-apoptotik proteinlerden biridir (Santos vd. 2008). Özellikle Hsp70'in hücre dışı ortama aktif olarak taşındığını gösteren birçok kanıta göre, patolojik tablolarda amiloid beta ve Hsp70 aynı ortamı paylaşmaktadırlar. Buradan yola çıkılarak Hsp70'in amiloid beta birleşme sürecini etkilediği ve *in vitro* olarak oligomer oluşumunu engellediği gözlenmiştir. Ayrıca Hsp70'in varlığının N2a (nöro2a) hücre kültürlerindeki amiloid beta peptit kaynaklı toksisiteyi azalttığı görülmüştür. Bu sonuçlar amiloid beta peptitin zararlı etkilerine karşı potansiyel bir mekanizma olduğunu düşündürmüştür (Rivera vd. 2017).

Wang vd. (2011), fare modelleri üzerinde indüklenmiş Hsp70'in iskemik akut böbrek hasarına etkilerini araştırmışlardır. Yaptıkları *in vitro* çalışmalar sonucu Hsp70'in antiapoptotik mediyatör olarak görev yaptığını, *in vivo* çalışmalar ile de Hsp70'in stres

sonrası renal epitelyal hücre sağkalımı için çok önemli olduğunu gözlemişlerdir. Aynı zamanda memeli hücrelerinde indüklenen Hsp70'in apoptozu sınırlayarak organ yapısını ve fonksiyonunu koruması da iskemik akut böbrek hasarlarında potansiyel tedavi yöntemleri için yol gösterici olabilecektir.

Barišić vd. (2002), kronik bir böbrek hastalığı olan endemik nefropatinin olası etiyolojik ajanı olan okratoksin-a üzerine Hsp70'in etkilerini gözlemlemişlerdir. Domuz ve köpek böbrek hücre kültürleri üzerinde, sırasıyla 2.5 µg/ml ve 1.5 µg/ml okratoksin-a kullanılarak 6, 12, 24 ve 36 saatte yapılan ölçümler sonucu her iki hücre hattında da ısı şokuna uğradıktan sonra Hsp70 indüklenmesi görülmüştür. Ancak ısı şokuna uğramadan önce okratoksin-a ile muamele edilen kültürlerde bu olay gözlenmemiştir. Bunun sonucunda da okratoksin-a'nın Hsp70'i indüklediği gözlenmiştir. Bu çalışma sonucu Hsp70'in koruyucu etkisinin hücre ve dokulardaki eksikliğinin de okratoksin-a'nın zararlı etkileri ve insanlardaki endemik nefropatinin sessiz başlangıcını açıklayabildiği görülmüştür. Mazzei vd. (2015), derleme makalelerinde, obstrüktif nefropatide Hsp70'in hücre koruyucu etkisini değerlendirmiş ve ilaçlarda kullanılma potansiyeli olduğunu vurgulamışlardır.

Xia vd. (2015), ördek böbreklerinde molibden ve kadmiyumun antioksidanlar ve Hsp'lere olan etkilerini gözlemlemiştir. 30, 60, 90 ve 120 günde topladıkları böbreklerde, mitokondrilerdeki antioksidan aktiviteleri ve Hsp ekspresyonlarını belirlemişlerdir. Yapılan deneyler sonucu lipid peroksidasyonu artışı ve antioksidan enzim aktivitelerinde inhibisyon sonucu oksidatif stres olduğu, aralarında Hsp70'in de bulunduğu Hsp'lerde artış olduğu gözlenmiştir. Bu artışın da ördek böbrek dokusunu stresten koruyabileceği düşünülmüştür.

Lipid peroksidasyonu oksidatif stresin sebep olduğu hasar sürecinin genelde sonraki aşamalarında meydana gelen bir durumdur (Halliwell ve Chirico 1993). Bizim çalışmamızda Hsp70'in toksisiteye karşı etkisi değerlendirildiğinde, amiloid betanın sebep olduğu lipid peroksidasyonunu down regüle edemediği ancak uygulanan amiloid

dozuna bağlı olarak SOD, CAT enzim aktivitelerinde ve GSH düzeylerinde artışa sebep olduğu gözlenmiştir. Fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Son yıllarda yapılan bir araştırmada Hsp70 uygulamasının çok geniş bir konsantrasyon aralığında zararlı etkiler oluşturmadığı ifade edilmiştir (Andreeva vd. 2016). Dolayısıyla eğer ileriye yönelik güvenli bir terapötik ajan olarak tam anlamıyla kullanılabilirse doz aşımına bağlı olarak kolay kolay yan etki oluşmayacağı görülmektedir. Bu son derece önemli bir aşama olarak kabul edilebilir. Bu nedenle bu yöndeki araştırmaların önemi daha da artmaktadır.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre Hsp70'in hücre sağkalımı ve oksidatif parametreler üzerine farklı sonuçlar göstermesinin uygulanan doz ve s reye bağlı olduğu düşünülmüştür. Hsp70'in koruyucu rolünün tam olarak anlaşılabilmesi için ileriye yönelik farklı doz ve süre uygulamalarının yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Amiloid beta ile ilgili hastalıkların tedavisi için yeni terapötik yöntemlerin geliştirilmesi mümkündür. Bu süreç ileride yapılacak olan *in vivo* ve *in vitro*  alışmalar ile daha iyi anlaşılabilecektir.

KAYNAKLAR

- Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro*. Methods in Enzymology, 105, 121-126.
- Andreeva, N.V., Zatsepina, O.G., Garbuz, D.G., Evgen'ev, M.B. and Belyavski, A.V. 2016. Recombinant HSP70 and mild heat shock stimulate growth of aged mesenchymal stem cells. Cell Stress and Chaperones, 21, 727-733. doi:10.1007/s12192-016-0691-7
- Barišić, K., Petrik, J., Rumora, L., Čepelak, I. and Grubišić, T.Ž. 2002. Expression of Hsp70 in kidney cells exposed to ochratoxin A. Arch Toxicol, 76(4), 218-226. doi: 10.1007/s00204-002-0335-9
- Behl, C., Davis, J.B., Lesley, R. and Schubert, D. 1994. Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. Cell, 77(6), 817-27.
- Behl, C. 1997. Amyloid beta-protein toxicity and oxidative stress in Alzheimer's disease. Cell Tissue Res, 290(3), 471-480.
- Bobkova, N.V., Garbuz, D.G., Nesterova, I., Medvinskaya, N., Samokhin, A., Alexandrova, I., Yashin, V., Karpov, V., Kukharsky, M.S., Ninkina, N.N., Smirnov, A.A., Nudler, E. and Evgen'ev, M. 2014. Therapeutic effect of exogenous hsp70 in Mouse models of Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis, 38(2), 425-435. doi: 10.3233/JAD-130779
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72, 248-254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Broxton, C.N. and Culotta, V.C. 2016. SOD Enzymes and Microbial Pathogens: Surviving the Oxidative Storm of Infection. PLoS Pathog, 12(1), e1005295. doi: 10.1371/journal.ppat.1005295
- Danzer, K.M., Ruf, W.P., Putcha, P., Joyner, D., Hashimoto, T., Glabe, C., Hyman, B.T. and McLean, P.J. 2011. Heat-shock Protein 70 Modulates Toxic Extracellular A-synuclein Oligomers and Rescues Trans-synaptic Toxicity. The FASEB Journal, 25, 326-336.
- Davies, J.A. 2015. Self-organized Kidney Rudiments: Prospects for Better *in vitro* Nephrotoxicity Assays. Biomarker Insights, 10(1), 117-123.
- Dember, L.M. 2006. Amyloidosis-Associated Kidney Disease. J Am Soc Nephrol, 17, 3458-3471.
- Di Crescenzo, V., Garzi, A., Petruzzello, F., Cinelli, M., Catalano, L., Zeppa, P. and Vitale, M. 2013. Nodular goiter with amyloid deposition in an elderly patient: fine-needle cytology diagnosis and review of the literature. BMC Surgery, 13(2), 43.

- Domingues, A., Almeida, S., da Cruz e Silva, E.F., Oliveira C.R. and Rego, A.C. 2007. Toxicity of Beta-amyloid in HEK293 Cells Expressing NR1/NR2A or NR1/NR2B N-methyl-D-aspartate Receptor Subunits. *Neurochemistry International*, 50(6), 872-880.
- Dubey, A., Prajapati, K.S., Swamy, M. and Pachauri, V. 2015. Heat shock proteins: a therapeutic target worth to consider. *Veterinary World*, 8(1), 46-51. doi: 10.14202/vetworld.2015.46-51.
- Dumont, J., Euwart, D., Mei, B., Estes, S. and Kshirsagar, R. 2016. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Crit Rev Biotechnol*, 36(6), 1110–1122. doi: 10.3109/07388551.2015.1084266
- Evans, C.G., Wisen, S. and Gestwicki, J.E. 2006. Heat shock proteins 70 and 90 inhibit early stages of amyloid beta-(1–42) aggregation *in vitro*. *J Biol Chem*, 281(44), 33182–33191.
- Evans, C.G., Chang, L., Gestwicki, J.E. 2010. Heat Shock Protein (Hsp 70) as an Emerging Drug Target. *J Med Chem*, 53, 4585-4602.
- Fonfria, E., Marshall, I.C.B., Boyfield, I., Skaper, S.D., Hughes, J.P., Owen, D.E., Zhang, W., Miller, B.A., Benham, C.D. and McNulty, S. 2005. Amyloid β -peptide(1–42) and hydrogen peroxide-induced toxicity are mediated by TRPM2 in rat primary striatal cultures. *Journal of Neurochemistry*, 95(3), 715–723. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03396.x
- Foyer, C.H., Lelandais, M. and Kunert, K.J. 1994. Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum*, 92, 696-717. doi: 10.1111/j.1399-3054.1994.tb03042.x
- Ghavami, S., Shojaei, S., Yeganeh, B., Ande, S.R., Jangamreddy, J.R., Mehrpour, M., Christoffersson, J., Chaabane, W., Moghadam, A.R., Kashani, H.H., Hashemi, M. and Łos, M.J. 2014. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Progress in Neurobiology*, 112, 24–49.
- Halliwell, B. and Chirico, S. 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 57(5), 715-724.
- Hoshino, T., Murao, N., Namba, T., Takehara, M., Adachi, H., Katsuno, M., Sobue, G., Matsushima, T., Suzuki, T. and Mizushima, T. 2011. Suppression of Alzheimer's disease-related phenotypes by expression of heat shock protein 70 in mice. *J Neurosci*, 31(14), 5225–5234.
- Jones, D.R., Moussaud, S. and McLean, P. 2014. Targeting heat shock proteins to modulate α -synuclein toxicity. *Ther Adv Neurol Disord*, 7(1) 33–51. doi: 10.1177/1756285613493469

- Kadowaki, H., Nishitoh, H., Urano, F., Sadamitsu, C., Matsuzawa, A., Takeda, K., Masutani, H., Yodoi, J., Urano, Y., Nagano, T. and Ichijo, H. 2005. Amyloid beta induces neuronal cell death through ROS-mediated ASK1 activation. *Cell Death & Differentiation*, 12(1), 19–24. doi:10.1038/sj.cdd.4401528
- Kalinina, E.V., Chernov, N.N. and Novichkova, M.D. 2014. Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes. *Biochemistry (Mosc)*, 79(13), 1562-1583. doi: 10.1134/S0006297914130082
- Karaca, Ö., Pekmez, H., Kuş, M.A., Akpolat, N., Ögetürk, M. ve Kuş, İ. 2011. Deneyisel Karbon Tetraklorür Toksisitesi Sonucu Karaciğerdeki IŞP70 İmmunoreaksiyon Artışı Üzerine Melatonin Hormonunun Etkisi. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi*, 25(2), 73-76.
- Khalighi, M.A., Wallace, W.D. and Palma-Diaz, M.F. 2014. Amyloid nephropathy. *Clin Kidney J*, 7, 97–106. doi: 10.1093/ckj/sfu021
- Lu, R.C., Tan, M.S., Wang, H., Xie, A.M., Yu, J.T. and Tan, L. 2014. Heat Shock Protein 70 in Alzheimer's Disease. *BioMed Research International*, 2014, 435203. doi: 10.1155/2014/435203
- Mahmood, K., Jadoon, S., Mahmood, Q., Irshad, M. and Hussain, J. 2014. Synergistic Effects of Toxic Elements on Heat Shock Proteins. *BioMed Research International*, 2014, 564136. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/564136>
- Maier, C.M. and Chan, P.H. 2002. Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *The Neuroscientist*, 8(4), 323-334. doi: 10.1177/107385840200800408
- Marshall, K.E., Marchante, R., Xue, W.F. and Serpell, L.C. 2014. The relationship between amyloid structure and cytotoxicity. *Prion*, 8(2), 192–196.
- Mayer, M.P. and Bukau, B. 2005. Hsp70 Chaperones: Cellular Functions and Molecular Mechanism. *Cell Mol Life Sci*, 62(6), 670–684.
- Mazzei, L., Docherty, N.G. and Manucha, N. 2015. Mediators and mechanisms of heat shock protein 70 based cytoprotection in obstructive nephropathy. *Cell Stress and Chaperones*, 20, 893–906. doi: 10.1007/s12192-015-0622-z
- Morrow, J.D. and Roberts, L.J. 1997. The isoprostanes: unique bioactive products of lipid peroxidation. *Progress in Lipid Research*, 36(1), 1-21. doi: 10.1016/S0163-7827(97)00001-5
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4

- Murphy, M.P. and LeVine, H., III. 2010. Alzheimer's Disease and the β -Amyloid Peptide. *J Alzheimers Dis*, 19(1), 311-323. doi: 10.3233/JAD-2010-1221
- O'Neill, S., Harrison, E.M., Ross, J.A., Wigmore, S.J. and Hughes, J. 2014. Heat-Shock Proteins and Acute Ischaemic Kidney Injury. *Nephron Exp Nephrol*, 126, 167–174. doi: 10.1159/000363323
- Öncel, M. 2012. Isı Şok Proteinleri ve Kanser. *Eur J Basic Med Sci*, 2(1), 16-23.
- Öztürk, E., Kahveci, N., Özlük, K. ve Yılmazlar, T. 2009. Isı Şok Proteinleri. *Ulusal Cerrahi Dergisi*, 25(4), 131-136.
- Picken, M.M. 2015. Proteomics and mass spectrometry in the diagnosis of renal amyloidosis. *Clinical Kidney Journal*, 8(6), 665–672. doi: 10.1093/ckj/sfv087
- Radons, J. 2016. The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? *Cell Stress and Chaperones*, 21, 379–404. doi: 10.1007/s12192-016-0676-6
- Rao, S.N. 2016. The role of heat shock proteins in kidney disease. *J Transl Intern Med*, 4, 114-117.
- Repalli, J. and Meruelo, D. 2015. Screening strategies to identify HSP70 modulators to treat Alzheimer's disease. *Drug Design, Development and Therapy*, 9, 321–331.
- Rivera, Í., Capone, R., Cauvi, D.M., Arispe, N. and De Maio, A. 2017. Modulation of Alzheimer's amyloid β peptide oligomerization and toxicity by extracellular Hsp70. *Cell Stress and Chaperones*, 1-11. doi: 10.1007/s12192-017-0839-0
- Sadigh-Eteghad, S., Sabermarouf, B., Majdi, A., Talebi, M., Farhoudi, M. and Mahmoudi, J. 2015. Amyloid-Beta: A Crucial Factor in Alzheimer's Disease. *Med Princ Pract*, 24, 1–10. doi: 10.1159/000369101
- Santos, S.D., Magalhães, J. and Saraiva, M.J. 2008. Activation of the heat shock response in familial amyloidotic polyneuropathy. *J Neuropathol Exp Neurol*, 67(5), 449-55. doi: 10.1097/NEN.0b013e31816fd648
- Scarpioni, R., Ricardi, M. and Albertazzi, V. 2016. Secondary amyloidosis in autoinflammatory diseases and the role of inflammation in renal damage. *World J Nephrol*, 5(1), 66-75. doi: 10.5527/wjn.v5.i1.66
- Schubert, D., Behl, C., Lesley, R., Brack, A., Dargusch, R., Sagara, Y. and Kimura, H. 1995. Amyloid peptides are toxic via a common oxidative mechanism. *Proc Natl Acad Sci*, 92, 1989-1993.
- Sengupta, U., Nilson, A.N. and Kayed, R. 2016. The Role of Amyloid- β Oligomers in Toxicity, Propagation, and Immunotherapy. *EBioMedicine*, 6, 42–49.

- Sun, X., Chen, W.D. and Wang, Y.D. 2015. β -Amyloid: the key peptide in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Front Pharmacol*, 6, 221. doi: 10.3389/fphar.2015.00221
- Tabner, B.J., El-Agnaf, O.M.A., Turnbull, S., German, M.J., Paleologou, K.E., Hayashi, Y., Cooper, L.J., Fullwood, N.J. and Allsop, D. 2005. Hydrogen peroxide is generated during the very early stages of aggregation of the amyloid peptides implicated in Alzheimer disease and familial British dementia. *J Biol Chem*, 280(43), 35789-92.
- Taşkıran, Z.E. ve Yılmaz, E. 2007. Amiloid Birikiminin Moleküler Temeli ve Yeni Tedavi Yaklaşımları. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 38, 20-25.
- Tycko, R. 2015. Amyloid Polymorphism: Structural Basis and Neurobiological Relevance. *Neuron*. 86(3), 632–645. doi: 10.1016/j.neuron.2015.03.017
- Vinothkumar, G., Kedharnath, C., Krishnakumar, S., Sreedhar, S., Preethikrishnan, K., Dinesh, S., Sundaram, A., Balakrishnan, D., Shivashekar, G., Sureshkumar and Venkataraman, P. 2017. Abnormal amyloid β 42 expression and increased oxidative stress in plasma of CKD patients with cognitive dysfunction: A small scale case control study comparison with Alzheimer's disease. *BBA Clinical*, 23(8), 20-27. doi: 10.1016/j.bbacli.2017.06.001
- Wang, H., Tan, M.S., Lu, R.C., Yu, J.T. and Tan, L. 2014. Heat Shock Proteins at the Crossroads between Cancer and Alzheimer's Disease. *BioMed Research International*, 2014, 239164. doi: 10.1155/2014/239164
- Wang, Z., Gall, J.M., Bonegio, R.G., Havasi, A., Hunt, C.R., Sherman, M.Y., Schwartz, J.H. and Borkan, S.C. 2011. Induction of heat shock protein 70 inhibits ischemic renal injury. *Kidney Int*, 79(8), 861-870. doi: 10.1038/ki.2010.527
- Wheeler, C.R., Salzman, J.A., Elsayed, N.M., Omaye, S.T. and Korte, D.W., Jr. 1990. Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity. *Analytical Biochemistry*, 184(2), 193-199. doi: 10.1016/0003-2697(90)90668-Y
- Xia, B., Cao, H., Luo, J., Liu, P., Guo, X., Hu, G. and Zhang, C. 2015. The Co-induced Effects of Molybdenum and Cadmium on Antioxidants and Heat Shock Proteins in Duck Kidneys. *Biol Trace Elem Res*, 168(1), 261-268. doi: 10.1007/s12011-015-0348-x
- Yu, A., Li, P., Tang, T., Wang, J., Chen, Y. and Liu, L. 2015. Roles of Hsp70s in Stress Responses of Microorganisms, Plants, and Animals. *BioMed Research International*, 2015, 510319. doi: 10.1155/2015/510319
- Zhao, L.N., Long, H.W., Mu, Y. and Chew, L.C. 2012. The Toxicity of Amyloid Oligomers. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 7303-7327. doi: 10.3390/ijms13067303

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sema YILDIZ

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 14.08.1992

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Kalaba Anadolu Lisesi (2010)

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2014)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim
Dalı (Eylül 2014 – Şubat 2018)

Uluslararası Kongre Sunum

Yıldız, S., Özsoy Erdaş, N., Aydoğdu, G. ve Yılmaz, E. 2017. *In Vitro* Investigation of the Effects of Hsp70 Chaperone on Cell Proliferation and Oxidative Stress Against Amyloid Beta Nephrotoxicity, International Congress on Advances in Veterinary Sciences & Technics (ICAVST-2), 4-8 October, p. 154, Skopje, Macedonia.