



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HİPERKOLESTEROLEMİ VE ALZHEIMER ARASINDAKİ
İLİŞKİNİN MOLEKÜLER MEKANİZMASININ VE
VİTAMİN E’NİN ROLÜNÜN İNCELENMESİ**

NURGÜL AYTAN
DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nesrin KARTAL

İSTANBUL - 2007

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince göstermiş olduğu değerli katkı ve yönlendirmelerinden dolayı danışman hocam,

Prof. Dr. Nesrin KARTAL ÖZER’e

Tez çalışmam boyunca değerli katkı ve desteklerinden dolayı “Tez Önizleme Komitesi üyeleri”

Prof. Dr. Yavuz Taga ve Prof. Dr. Gülden Burçak’a

Tez çalışmamın bir kısmını gerçekleştirmek üzere DAAD (German Academic Exchange Service) bursu ile Heinrich-Heine Üniversitesi Moleküler Aging Araştırma laboratuvarında bulunduğum sürede sağladığı imkanlar ve desteklerinden dolayı

Prof. Dr. Tilman Grune başta olmak üzere tüm grup elemanlarına

Doktora eğitimim sırasındaki katkılarından dolayı Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri;

Prof. Dr. Kaya Emerk’e

Prof. Dr. A. Süha Yalçın’a

Prof. Dr. Serpil Bilsel’e

Prof. Dr. Goncagül Haklar’a

Prof. Dr. Önder Şirikçi’ye

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı’nda bulunan tüm çalışma arkadaşlarıma ve eğitimim süresince her türlü desteğini gösteren aileme teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığı’nın SAĞ-DKR-290506-0091 nolu projesi ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
KISALTMALAR	VI
RESİM, ŞEKİL VE TABLOLARIN LİSTESİ	VII
İ. ŞEKİLLERİN LİSTESİ	VII
İİ. RESİMLERİN LİSTESİ	VII
İİİ. TABLOLARIN LİSTESİ	VII
1.ÖZET	1
2.SUMMARY	2
3.GİRİŞ ve AMAÇ	3
4.GENEL BİLGİLER	5
4.1. Alzheimer Hastalığı	5
4.1.1. Kolesterol ve Amiloid Beta	6
4.1.2. Apo E	10
4.1.3. Alzheimer Hastalığı ve Oksidatif Stress	12
4.1.4. Tau Proteini	17
4.1.5. Proteozom	19
4.2. Vitamin E	20
4.3. Vitamin E ve Alzheimer Hastalığı	24

5. GEREÇ VE YÖNTEM	27
5.1. Gereçler	27
5.2. Yöntemler	28
5.2.1. Deney Planı	28
5.2.2. Tavşanlar ile İlgili Materyallerin Alınması ve Saklanması	28
5.2.3. Serum Kolesterol Düzeylerinin Ölçülmesi	29
5.2.4. Serum α -tokoferol Düzeylerinin Ölçülmesi	29
5.2.5. Serum Malondialdehit (MDA) Düzeylerinin Ölçülmesi	30
5.2.6. Serum Protein Karbonil Düzeylerinin Ölçülmesi	30
5.2.7. Işık Mikroskobu İncelemeleri	31
5.2.8. Sudan IV Boyama Yöntemi	32
5.2.9. Aterosklerotik İndeks Hesaplanması	32
5.2.10. Beyin Doku Homojenatının Hazırlanması	32
5.2.11. Beyin Dokusunda Protein Karbonilasyonu Ölçülmesi	32
5.2.12. Beyinde Protein Karbonilasyonunun İmmunhistokimya ile Değerlendirilmesi	33
5.2.13. Beyin Dokusunda Proteozom Miktarının Ölçülmesi	33
5.2.14. Beyin Proteozom Aktivitesinin Ölçülmesi	34
5.2.15. Beyinde 20S Proteozomun İmmunohistokimya ile Değerlendirilmesi	34
5.2.16. Beyin Dokusunda Tau Proteini ve PHF-1 Ölçülmesi	35

6. BULGULAR	36
6.1. Serum Kolesterol Düzeyleri	36
6.2. Serum Vitamin E Düzeyleri	37
6.3. Serum Vitamin E/ Kolesterol Oranları	38
6.4. Serum Malondialdehit (MDA) Düzeyleri	39
6.5. Serum Protein Karbonilasyonu (PKO) Düzeyleri	40
6.6. Serum MDA ve Kolesterol Düzeyleri Arasındaki İlişki	41
6.7. Serum Protein Karbonilasyonu ve Kolesterol Düzeyleri Arasındaki İlişki	42
6.8. Aortanın Işık Mikroskobu ile İncelenmesi	43
6.9. Aortaların Sudan IV Boyaması ve Atherosklerotik İndeks Hesaplanması	45
6.10. Tavşan Beyninin 4 Farklı Bölgesinde Ölçülen Protein Karbonilasyonu	48
6.11. Protein Karbonilasyonunun İmmünohistokimya ile Değerlendirilmesi	49
6.12. Tavşan Beyni 4 Farklı Bölgesinde Proteozom Proteini, Proteozom Aktivitesi	50
6.13. Proteozom Miktarının İmmünohistokimya ile Değerlendirilmesi	51
6.14. Tavşan Beyninin Farklı Bölgelerinde Tau Proteini ve PHF-1 (Paired Helical Filament) Miktarları	52
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	53
8. EKLER	63
EK-I Deney Hayvanları Etik Kurulu Proje Onay Formu	63
9. KAYNAKLAR	64

KISALTMALAR

APOE	Apolipoprotein E
APP	“Amyloid Precursor Protein”
A β	Amyloid Beta
BACE	“ β -site APP cleavage enzyme”
ERK	“Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase”
GSK3	“Glycogen synthase kinase-3”
HDL	“High Density Lipoprotein”
HNE	“4-hydroxy-2-nonenal”
JNK	“c-Jun aminoterminal kinase”
LRP	“Low Density Lipoprotein Reseptor-related Protein”
MAPK p38	“Mitogen Activated Protein Kinase p38”
MDA	“Malondialdehyde”
NFT	“Neurofibrillary tangles”
PHF	“Paired Helikal Filament”
PKC	Protein Kinaz C
PP2A	Protein Fosfotaz 2A
PS	Presenilin
PUFA	“Polyunsaturated fatty acid”
RAGE	“Receptor for Advanced Glycation Endproduct”
RAP	“Receptor-Related Protein”
suc-LLVY- MCA	suc-leu-leu-val-tyr-Methylcoumaryl Amide
VLDL	“Very Low Density Lipoprotein”
α - TTP	α - Tokoferol Transfer Protein

ŞEKİL, RESİM ve TABLOLARIN LİSTESİ

i) Şekillerin Listesi

- Şekil 1. APP'in α ve β sekratez enzimleri ile yıkımı
- Şekil 2. Lipit peroksidasyon ürünlerinden HNE'nin proteinlere Michael katılma reaksiyonu
- Şekil 3. Lipit peroksidasyon ürünlerinden HNE'nin proteinlere Schiff baz oluşumu ile katılımı
- Şekil 4. Tokoferol ve tokotrienol analoglarının kimyasal yapısı
- Şekil 5. Deney gruplarının başlangıç ve 4. hafta sonundaki MDA değerleri
- Şekil 6. Deney gruplarının başlangıç ve 4. hafta sonundaki protein karbonilasyonu (PKO) değerleri
- Şekil 7. Tavşanların dört haftalık deney süresi sonundaki serum MDA düzeyleri ile serum kolesterol düzeyleri arasındaki korelasyon
- Şekil 8. Tavşanların dört haftalık deney süresi sonundaki serum protein karbonilasyonu düzeyleri ile serum kolesterol düzeyleri arasındaki korelasyon
- Şekil 9. Aterosklerotik indeks (% olarak)

ii) Resimlerin Listesi

- Resim 1. Her deney grubunu temsil eden bir tavşan aortasının ışık mikroskopi fotoğrafları
- Resim 2. Sudan IV ile boyanmış tavşan aortalarının fotoğraflarında kırmızı ile boyanan bölgeler intimal lipit birikimini göstermektedir.
- Resim 3. Her deney grubunu temsil eden tavşan beyin dokusunun 4 farklı bölgesinin protein karbonilasyonu immünohistokimya fotoğrafları
- Resim 4. Her deney grubunu temsil eden tavşan beyin dokusunun 4 farklı bölgesinin proteozom miktarı ile ilgili immünohistokimya fotoğrafları

iii) Tabloların Listesi

- Tablo 1. Dört hafta süre ile vitamin E'den fakir yem ile beslenen tavşanlara kolesterol ve

vitamin E verilmesinin serum kolesterol düzeyine etkisi

Tablo 2. Dört hafta süre ile vitamin E'den fakir yem ile beslenen tavşanlara kolesterol ve vitamin E verilmesinin serum vitamin E düzeyine etkisi

Tablo 3. Serum vitamin E / kolesterol oranları

Tablo 4. Tavşan beyninin 4 farklı bölgesinde ölçülen protein karbonilasyonu (PKO) değerleri

Tablo 5. Tavşan beyin dokusunun 4 farklı bölgesinde ölçülen proteozom protein miktarları

Tablo 6. Tavşan beyin dokusunun 4 farklı bölgesinde ölçülen proteozom aktivitesi

Tablo 7. Tavşan beyninin 4 farklı bölgesinde ölçülen tau proteini miktarları

Tablo 8. Tavşan beyninin 4 farklı bölgesinde ölçülen PHF-1 (Paired Helical Filaments) sonuçları

1. ÖZET

Alzheimer hastalığı senil plaklarda A β peptit birikimleri, nörofibriller yumaklarda aşırı fosforile tau proteininin bölgesel birikimi sonucu oluşan protein yığılmaları ve oksidatif olarak hasarlı proteinlerin yıkımından sorumlu ubiquitin-proteozom sistemin fonksiyon bozukluğu ile karakterize edilmektedir. Beyinde proteinlerin oksidatif olarak değişimine ve aşırı lipit peroksidasyonuna neden olan serbest radikallerin artması ve Alzheimer hastalığının patolojisinde oksidatif stresin önemi ile uyumlu pekçok çalışma bulunmaktadır.

Son yıllardaki deneysel çalışmalar bir oksidatif stres kaynağının örneğin yüksek kolesterol gibi, A β oluşumunu başlatabileceğini ve kolesterolün kendisinin de Alzheimer hastalığında diğer bir güçlü oksidatif stres kaynağı olduğunu ileri sürmektedir. Vitamin E'nin oksidatif stresle bağlantılı olan nörodejeneratif hastalıkları geciktirebileceği veya önleyebileceği ileri sürülmektedir. Bu çalışmanın amacı Alzheimer hastalığı ve hiperkolesterolemi arasındaki ilişkinin in vivo moleküler mekanizmalarının ve vitamin E'nin rolünün incelenmesidir.

Hiperkolesterolemi ile indüklenen aterosklerotik tavşan modelinde beyinde 4 hafta süre sonunda % 2 kolesterol içeren diyetin Alzheimer hastalığında tespit edilen nörofibriller yumaklar, tau hiperfosforilasyonu, protein karbonilasyonu ve proteozom fonksiyonu üzerine etkisi ve bu süreçte vitamin E'nin etkisi incelenmiştir.

Çalışmamız hiperkolesteroleminin lipit peroksidasyonu ve protein karbonilasyonunu arttırdığını, bu artışın beyinde Alzheimer hastalığında görülen benzer değişimlere neden olabileceğini ve vitamin E'nin bu süreçte koruyucu etkisi olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Hiperkolesterolemi, Alzheimer hastalığı, Oksidatif stres, Vitamin E

2. SUMMARY

Molecular mechanisms of the relation between hypercholesterolemia and Alzheimer's disease and the role of vitamin E

Alzheimer's disease (AD) is characterized by the accumulation of amyloid- β (A β) peptides in senile plaques and protein aggregates with regional accumulation of hyperphosphorylated tau in neurofibrillary tangles and a dysfunction of the ubiquitin-proteasome system which degrades oxidatively damaged proteins. There is considerable evidence consistent with the importance of oxidative stress in the pathology of AD and the accumulation of free radicals, leading to excessive lipid peroxidation, oxidative modification of proteins in the brain.

Current experimental evidence suggests that an initial source of oxidative stress, such as high cholesterol, may initiate amyloid- β formation; which by itself is another potent source of oxidative stress in AD.

It has been suggested that vitamin E may prevent or delay neurodegenerative disease associated with oxidative stress. The aim of this work is to investigate *in vivo* molecular mechanisms of the relation between hypercholesterolemia and Alzheimer's disease and the role of vitamin E.

In the present study, we have examined the effect of 2 % cholesterol-enriched diet for 4 weeks on brain proteasome function and protein carbonylation, tau hyperphosphorylation, neurofibrillary tangle formation which are detected in AD brain in the hypercholesterolemic rabbit model of atherosclerosis and the role of vitamin E in these processes.

Our studies suggest that hypercholesterolemia increases lipid peroxidation and protein carbonylation and this might cause AD similar changes in the brain. Vitamin E may have a protective effect in this process.

Keywords: Hypercholesterolemia, Alzheimer's disease, Oxidative stress, Vitamin E

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Alzheimer hastalığı dünyada 15 milyondan fazla bireyi etkileyen nörodejeneratif demansın en yaygın türlerinden biridir. Alzheimer hastalığının temel patolojik özelliği “ β -amyloid (senile) plaque” olarak adlandırılan hücre dışı protein birikimleri ve tau proteinin aşırı fosforilasyonu sonucu oluşan “neurofibrillary tangle” nörofibriller yumaklardır. Potansiyel olarak toksik birikimler oluşturan yanlış katlanmış, yapısal bütünlüğü bozulmuş ve hasarlı proteinler proteozom sistemi tarafından etkili bir şekilde yıkılmaktadırlar. PHF-tau (Paired Helical Filament-tau), proteozom aktivitesinin azalmasına ve protein birikimlerinin oluşumuna katkıda bulunarak Alzheimer hastalığının patojenik sürecinde etkinlik gösteren nörotoksik bir ajan olarak kabul edilmektedir.

Alzheimer hastalığının patolojisinde tek bir etken tanımlanmamakla beraber son zamanlarda yapılan epidemiyolojik, klinik ve deneysel çalışmalarla hiperkolesteroleminin Alzheimer hastalığının patogenezinde önemli bir rol oynadığı belirtilmektedir. Yüksek kolesterolli diyetle beslenen hayvan modelleriyle yapılan *in vitro* çalışmalarda A β 'nin patolojik birikimi tespit edilmiştir. Son zamanlarda yapılan epidemiyolojik çalışmalar aterosklerozun patolojisinde tanımlanan risk faktörlerinden biri olan hiperkolesterolemi ile geç başlangıçlı Alzheimer hastalığının patolojisi arasındaki bağlantıya işaret etmektedir. Ancak kolesterol ve amiloidojenik süreç arasındaki ilişkinin moleküler mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Kolesterolün aterosklerozda tanımlanan mekanizmalardaki gibi serbest radikal oluşumu ile nöronlarda membran hasarına neden olduğu ileri sürülmektedir. Şu ana kadar yapılan çalışmalarda β -amiloid plaklar tarafından oluşturulan serbest radikallerin lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA oksidasyonuna yol açarak Alzheimer hastalığının patolojisine katkıda bulunduğu rapor edilmektedir.

Çalışmalar hiperkolesterolemi ile indüklenen ateroskleroz gelişiminde, vitamin E'nin koruyucu etkisini belirtmektedir. Benzer olarak hiperkolesterolemi ile bağlantısı ileri sürülen Alzheimer hastalığının patolojik sürecinde de vitamin E'nin koruyucu rolü üzerinde durulmaktadır.

Çalışmamızın amacı tavşanlarda diyet ile oluşturulan hiperkolesterolemi modelinde beyinde Alzheimer benzeri nöropatolojik değişiklikler olup olmadığının incelenmesi ve vitamin E'nin etkisinin araştırılmasıdır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı dünyada 15 milyondan fazla bireyi etkileyen nörodejeneratif demansın en yaygın türlerinden biridir. Alzheimer hastalığı hem ailesel hem de sporadik olarak görülme şekilleri ile heterojen bir hastalık olup beyinde spesifik yapısal değişimlerle birlikte ilerleyen hafıza kaybı, algıda azalma ve kişilik değişimleri ile karakterize edilen bir hastalıktır. Otozomal dominant olan ailesel Alzheimer hastalığı 65 yaşından önce başlamaktadır. Ailesel kaynaklı olarak ortaya çıkmasına neden olan mutasyonlar kromozom 21 üzerinde Amiloid Öncül Protein “Amyloid Precursor Protein” (APP)’i kodlayan gende veya APP’i yıkan enzimler olan presenilinlerde, kromozom 14 üzerinde presenilin 1 (PSEN1) ve kromozom 1 üzerinde presenilin 2 (PSEN2), tanımlanmıştır. Her iki mutasyonda A β metabolizması ile bağlantılıdır. Ailesel olarak hastalığı taşıyan diğer aileler de incelendiğinde birkaç APP mutasyonu daha bulunmuştur. Ailesel olan hastalığın tersine sporadik olarak görülen Alzheimer hastalığı çok yaygındır ve vakaların % 90-95’ini oluşturmaktadır. Ancak sporadik hastalığın nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte hem genetik hem de çevresel risk faktörlerinin kompleks etkileşimi ile birlikte yaşlanma süreciyle ortaya çıkabileceği görüşü ileri sürülmektedir. Genel popülasyonda sporadik Alzheimer hastalığında en önemli genetik risk faktörü APOE ϵ 4 aleli olarak rapor edilmektedir. APOE ϵ 4 alelinin A β birikiminde, fibril ve plak oluşumunda katkısı olduğunu ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır (1).

Alzheimer hastalığının temel patolojik özelliği “ β -amyloid (senile) plaque” olarak adlandırılan hücre dışı protein birikimleri ve tau proteinin aşırı fosforilasyonu sonucu oluşan “neurofibrillary tangle” (NFT) olarak isimlendirilen nörofibriller yumaklardır. Bu değişimlerle bağlantılı olarak A β birikimi, tau proteininin aşırı fosforilasyonu, inflamasyon süreci, oksidatif stres, hücre döngüsü ve nörovasküler bozukluklar gibi pekçok patojenik mekanizma üzerinde çalışmalar devam etmektedir (2).

4.1.1. Kolesterol ve Amiloid Beta

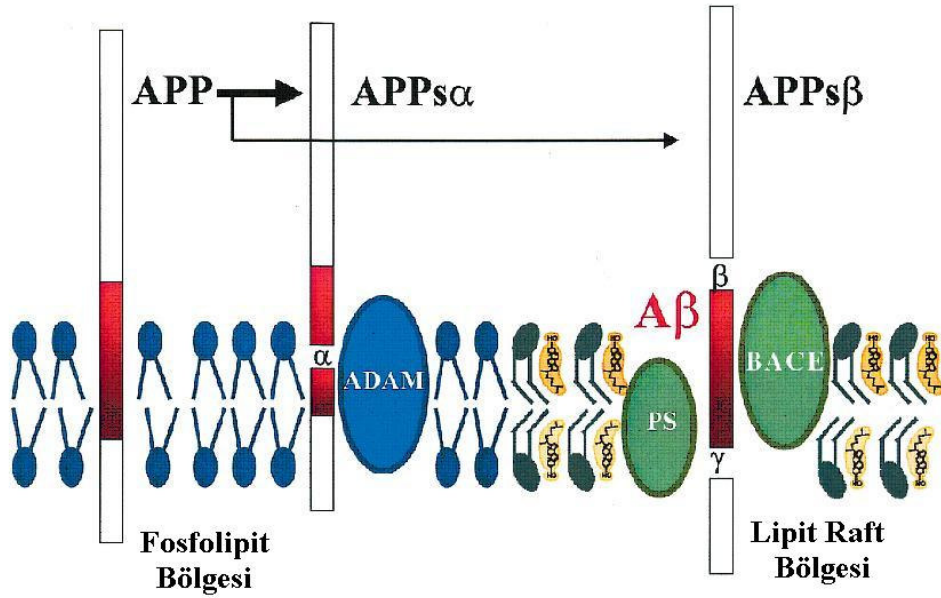
Alzheimer hastalığına sebep olan mekanizmaları açıklayan en geçerli hipotez APP'in proteolitik yıkımı sonucu oluşan amiloid- β 'nin rol oynadığı “amyloid cascade” hipotezidir. Beyinde amiloid- β birikiminin nöronal fonksiyon bozukluğu, nörodejenerasyon ve demansa yol açan olaylar zincirini başlattığı ileri sürülmektedir (3). Amiloid- β peptidin öncül proteini olan APP hücre dışı büyük bir N terminal domain (ectodomain), hücre zarını geçerek sitoplazmaya uzanan transmembran domain ve kısa sitoplazmik C terminal domainden oluşan integral tip 1 membran glikoproteindir. APP 695 ile 770 aminoasit arasında değişen birkaç farklı isoformda bulunabilmektedir. Periferik dokularda amino terminal domainlerinde Kunitz tip serine proteaz inhibitör (KPI) sekans içeren APP isoformları, nöronlarda ise KPI domaini eksik olan APP₆₉₅ isoformu eksprese edilir (4). APP'nin normal fonksiyonları tam olarak anlaşılamamıştır fakat elde edilen kanıtlar ile APP'nin hücre bağlantılarında, nöronların canlılığının, axon ve dentritlerin uzamasının düzenlenmesinde önemli rolleri olduğu ileri sürülmektedir. APP'nin hücre dışından sinyalleri alarak hücre içine ileten hücre yüzey reseptörü olarak fonksiyon gördüğüne dair görüşler olmakla birlikte APP'nin ligandları ve sinyal yolağındaki etkileşimleri tam olarak gösterilememiştir (5).

APP, “amiloidojenik” ve “amiloidojenik olmayan” olarak isimlendirilen iki alternatif yoldan biri ile sekretazlar tarafından proteolitik yıkımla metabolize edilebilmektedir. Amiloidojenik yol, APP'nin N terminal domaini üzerinde β ve γ -sekretazların ardışık olarak proteolitik yıkımı ile başlamaktadır (6).

İlk olarak β -sekretazın proteolitik yıkımı ile APP'nin kısa çözünebilir N terminal kısmı olan APPs β hücre yüzeyinden hücrelerarası boşluğa salınır. Membrana bağlı kalan 99 aminoasitlik β -C-terminal fragmenti (β -CTF) ise çoklu protein kompleksi γ -sekretazın etkisi ile yıkılarak A β peptidini oluşturmaktadır. Amiloidojenik olmayan yolda, α -sekretaz APP'i A β domaini içinden (Lys16 ve Lys17 arası) keserek esas olarak A β oluşumunu engellemektedir. APP'den ayrılan büyük çözünebilir N terminal kısmı APPs α hücreler arası boşluğa salınırken membrana bağlı kalan 83 aminoasitlik α -C-terminal kısmı (α -CTF) ise γ -sekretazın etkisi ile yıkılarak P3 peptide ve “APP intracellular domaini (AICD)”i oluşturmaktadır. APPs α 'nın nöronları koruyucu etkisi, hafıza ve

öğrenmeyi düzenlemedeki fizyolojik rolleri ile desteklenmektedir (7). β -sekretazlar temel nöronal transmembran aspartik proteazlardır ve BACE1 (β -site APP cleavage enzyme), ASP-2 (Aspartic protease) ve memapsin-2 olarak isimlendirilirler. BACE1 N-glikolizasyon, fosforilasyon, disülfid köprü oluşumları ve palmitol grupları takılması gibi post translasyonel değişimler içerir. α -Sekretaz aktivitesinin disintegrin ve metalloproteinaz (ADAM) ailesinin ADAM-9,10,17 üyeleri ile bağlantılı olduğu ileri sürülmektedir. Hücre ve hayvan modeli çalışmalarında, α -sekretazların spesifik Protein Kinaz C (PKC) aktivatörleri, kolesterol düşürücü ilaçlar, serotonin, glutamat, östrojen gibi çeşitli ajanlarla regüle edildiği gösterilmiştir. γ -Sekretazlar en az 4 protein içeren çoklu protein komplekslerdir. Bu proteinler presenilinler (PS), “nicastrin”, “anterior pharynx defective-1” (Aph-1) ve “presenilin enhancer-2” (Pen-2)’dir. PS’in aspartil proteaz aktivitesi γ -sekretazın aktif sitesi için gerekli iken diğer proteinler ise kofaktör olarak fonksiyon görürler (8).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda APP’nin β - ve γ -sekretazlarla gerçekleşen proteolitik yıkımı ile oluşan A β ’nın hücre membranı içerisinde bulunan ve “lipid raft” olarak isimlendirilen kolesterol ve sfingolipit içeriği zengin mikrodomanlerde gerçekleştiği ileri sürülmektedir (9,10). Rat nöroblastoma N2a hücreleri ile yapılan çalışmada BACE1’in aktivitesinin lipid raftlarının bütünlüğüne bağlı olduğu ve raftların dışında BACE1 aktivitesinin bulunmadığı rapor edilmektedir (10). Cordy ve beraberindekiler (11) insan nöroblastoma hücrelerinde yaptıkları çalışmalarında BACE (β -sekretaz) kompleksinin lipid raftlarda aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir. Diğer bir çalışmada γ -sekretaz kompleksinin lipid raftlarda yerleştiği ve aktivitesinin kolesterol değişiminden etkilendiği gösterilmektedir (12). β - ve γ -sekretazların tersine α -sekretaz enzimlerinin plazma membranının fosfolipitçe zengin domainlerinde yerleştiği ve hücrel kolesterol içeriği düştüğünde aktivitesinin arttığı ileri sürülmektedir (13).



Şekil 4.1. APP'in α ve β sekrataz enzimleri ile yıkımı

(9 No'lu kaynaktan alınmıştır)

Genetik, epidemiyolojik ve hücre biyolojisi çalışmaları APP'nin metabolizması ve kolesterol arasında önemli bir fonksiyonel ilişkinin varlığına işaret etmektedir. Ancak kolesterol ve amiloidojenik süreç arasındaki ilişkinin moleküler mekanizması tam olarak açıklanamamıştır (14). Son zamanlarda yapılan epidemiyolojik çalışmalar aterosklerozun patolojisinde tanımlanan risk faktörlerinden biri olan hiperkolesterolemi ile geç başlangıçlı Alzheimer hastalığının patolojisi arasındaki bağlantıya işaret etmektedir. Pappolla ve beraberindekiler (15) 40 yaşın üzerindeki hastaların otopsi sonuçlarından elde ettikleri veriler ile Alzheimer amiloid patolojisinin gelişiminde serum hiperkolesteroleminin başlangıç risk faktörü olabileceğini ileri sürmektedirler. Diğer bir epidemiyolojik çalışmada da orta yaş süresince yükselen kolesterol seviyesinin ileri yaşlarda başlayan Alzheimer hastalığının gelişmesinde bir risk faktörü olabileceği rapor edilmektedir (16). Whitmer ve beraberindekiler (17) retrospektif kohort çalışmalarını 1964'ten 1973'e kadar sağlık değerlendirmelerinden geçen ve bu yıllarda 40-44 yaşları arasındaki hipertansiyon, total kolesterol, diyabet ve sigara kullanımı gibi orta yaş kardiovasküler risk faktörlerini taşıyan 8.845 katılımcı ile yapmışlardır. Bu bireylerden

demans tanısı konulanlar Ocak 1994-Nisan 2003 tarihleri arasındaki hastane kayıtlarından belirlenmiştir. Elde edilen verilerle bu kardiovasküler risk faktörlerinin herbirinin demans geliştirme riskini % 20 ile 40 artırdığı sonucuna varılmaktadır. Sparks ve beraberindekiler (18) çalışmalarında koroner kalp hastalığından ölen fakat demans görülmeyen hastaların beyinlerinde tespit edilen amiloid plak oluşumlarının Alzheimer tanısı konan hastalardaki plak oluşumları ile aynı yoğunlukta olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmalarıyla koroner kalp hastalığı ve beyinde amiloid plak oluşumu arasında muhtemel bir bağlantı olduğu ileri sürülmüştür.

Yetmiş yaşında, demans tespit edilmeyen bireylerle başlanan ve 18 yıllık takip süresi sonunda elde edilen verileri içeren çalışmada ileri yaşlardaki yüksek total kolesterol seviyesi ve Alzheimer hastalığı riskinin azalması arasında bir bağlantı olduğu ileri sürülmektedir (19).

Serum kolesterol ve ileri yaşlarda başlayan Alzheimer hastalığı arasında bir bağlantı olmadığını ileri süren çalışmalar da yayınlanmaktadır. Li ve beraberindekiler (20) epidemiyolojik çalışmalarında demans başlangıcından önce 4-12 yıllık periyotlarda ölçtükleri total kolesterol veya yüksek yoğunluklu lipoproteinler “High Density Lipoprotein” (HDL) ile demans veya Alzheimer riski arasında önemli bir bağlantı olmadığını ileri sürmektedirler. Buna karşın plazma yüksek kolesterol seviyesinin ileri yaşlardaki bireylerde Alzheimer hastalığı başlama riskini azalttığına dair epidemiyolojik çalışmalarda bulunmaktadır.

Kolesterol ve β -amyloid arasındaki bağlantı birçok *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla da desteklenmiştir. Sparks ve beraberindekiler (21) yüksek kolesterolü diyetle 4 hafta süreyle beslenen tavşanlarda oluşturulan ateroskleroz modelinde tavşanların hipokampuslarında $A\beta$ üretimi ve birikimini tespit etmişlerdir. Aynı grup diğer bir çalışmada 8 hafta % 2 kolesterol diyetle besledikleri tavşan modelinde β -amiloidin nöronal birikimi ve 8 hafta kolesterolle beslenip daha sonra 2 hafta kontrol diyeti ile beslenen tavşanların beyinlerinde ise nöronal $A\beta$ birikiminde önemli bir azalma göstermişlerdir (22). Benzer bir çalışma da diyetle hiperkolesterolemi oluşturulan APP transgenik farelerde yapılmıştır. Bu hayvanların beyinlerinde $A\beta$ seviyesinde önemli bir yükselme tespit edilmiş ve hem plazma hem de merkezi sinir sistemi total kolesterol seviyesi ile $A\beta$ seviyesi arasında bir korelasyon olduğu bulunmuştur (23). Kolesterolle beslenen tavşanların hipokampuslarında yapılan diğer bir *in vivo* çalışmada β -sekretaz

(BACE) seviyesinin artışıyla A β oluşumunda bir artış olduğu rapor edilmiştir (24).

Hücre kültürü çalışmalarında da kolesterol seviyesinin aktif olarak A β üretimini indüklediği gösterilmiştir (25, 26). Simvastatin ve lovastatin gibi kolesterol düşürücü ilaçlar ile muamele edilen primer nöronlarda kolesterolün düşürülmesi ile A β salgılanmasının azaldığı, kolesterolün ilavesiyle ise A β salgılanmasının arttığı bildirilmiştir (27, 28).

Kolesterol ve A β üretimi üzerine statinlerin rolünün gösterildiği bu *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla birlikte statinlerin kullanımının gelişen demans veya Alzheimer hastalığı riskini azalttığını ileri süren epidemiyolojik çalışmalar da yayınlanmıştır. Ancak son zamanlarda yayınlanan prospektif kohort çalışmalarında statin kullananlar arasında demans veya Alzheimer hastalığı riskinde herhangi bir azalma kaydedilmediği rapor edilmektedir (29, 30).

4.1.2. Apo E

ApoE, plasma ve beyinde kolesterol taşıyan temel apolipoproteinlerden biridir. Bu proteinin mRNA'sı karaciğerden sonra ikinci olarak en fazla beyinde bulunmaktadır. ApoE beyinde primer olarak astrositler tarafından sentezlenmekte ve salgılanmaktadır ayrıca mikroglia ve nöronlarda da bulunmaktadır. İnsanlarda ApoE geninin ϵ 2, ϵ 3, ϵ 4 olarak isimlendirilen 3 aleli bulunmaktadır. Bu aleller tarafından üretilen protein izoformları 112 ve 158. pozisyonlardaki aminoasitlerde farklılık göstermektedir: E2 (Cys112, Cys158) , E3 (Cys112, Arg158) , E4 (Arg112, Arg158). ApoE aksonların miyelinizasyonu, membran onarımı ve çoğalması için gerekli olan lipidlerin hücrelere dağıtılması gibi önemli fonksiyonlara sahiptir (31, 32).

Çok sayıda epidemiyolojik, moleküler ve biyokimyasal çalışma ApoE ϵ 4 alelinin aterosklerozda olduğu gibi Alzheimer hastalığının patolojisinde de en temel risk faktörü olduğunu ortaya koymakla birlikte ApoE ϵ 4 ve Alzheimer hastalığı riski arasındaki mekanizma tam olarak açıklanamamıştır. Hofman ve beraberindekiler (33) Alzheimer hastalığı için risk faktörü olarak ApoE ϵ 4 alelinin tanımlanması ile hastalığın patogeneğinde kolesterolün direk rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir. ApoE genotipi, kolesterolemi ve Alzheimer riski arasındaki bağlantının incelendiği 206 Alzheimer vakası ve 276 kontrolden oluşan başka bir çalışma da bu parametreler arasında korelasyon

olduğunu bildirmektedir (34). Bennet ve beraberindekiler (35) epidemiyolojik çalışmalarında ApoE ε4 alelinin Alzheimer hastalığının klinik belirtileri ile bağlantısı olduğunu rapor etmişlerdir.

İnsan APP genini aşırı eksprese eden transgenik fare modelleriyle yapılan çalışmalarda, immunhistokimya sonuçlarında APOE^{+/+} olan farelerin hipokampus ve serebral kortekslerinde Aβ immunreaktivitesinin APOE^{-/-} olan farelerle karşılaştırıldığında daha fazla olduğu tespit edilmiş ve bu *in vivo* çalışmaların sonuçlarına dayanarak ApoE'nin Aβ birikimine katkısı olduğunu öne sürülmüştür (36). Diğer bir transgenik fare çalışmasında, APP^{V717F +/-} ApoE^{+/+} farelerin hipokampus kesitlerinde fibriller Aβ birikimleri içeren yoğun plak oluşumları sonucu nörotik distrofi gözlenirken APP^{V717F +/-} ApoE^{-/-} farelerde ise fibriller olmayan Aβ birikimi geliştiği ancak Aβ bağlantılı nörotik dejenerasyon tespit edilmediği rapor edilmiştir (37). APP^{V717F +/-} ApoE^{-/-} transgenik farelerde insan apoE3 ve apoE4 geninin ekspresyonunun Aβ birikimi üzerine etkisinin incelendiği çalışmada insan ApoE4 ve ApoE3'ün 9. ayda farelerin hipokampusunda APP^{V717F +/-} ApoE^{-/-} ApoE^{+/+} olan farelerin tersine Aβ birikimini yaşa bağlı olarak geciktirdiği gözlenmiştir. 15. aylarda hipokampuslarında fare ApoE^{+/+}'nin varlığında görülen Aβ fibrillerinin birikimi insan ApoE3 ve ApoE4 transgenik farelerde tespit edilen seviyede olduğu ve ApoE 4'ün Aβ birikimi üzerinde ApoE3'e göre çok daha fazla etkili olduğu tespit edilmiştir. Bu verilere dayanarak ApoE içeren lipoproteinlerin beyinde Aβ birikiminden önce Aβ'yı bağlayıp hücrel alınımları ve yıkımını kolaylaştırdığı veya beyinden sistemik dolaşıma uzaklaştırdığı sonucuna varılmaktadır. Bu *in vivo* sonuçlar Aβ'da ve ApoE'nin isoform spesifik konsantrasyonunda Aβ fibrillerinin beyinde depolanması için gerekli bir eşik değerine ulaşıldığını öne sürmektedir.

ApoE isoformlarının APP'nin işlenmesi ve Aβ oluşumu üzerine etkisinin kolesterol metabolizmasını veya direk sekretaz aktivitesini düzenleyerek mi olduğunun incelendiği çalışmalardan biri insan APP (APP695wt)'yi eksprese eden rat nöroblastoma B103 hücrelerinde yapılmıştır (38). ApoE3 ve ApoE4'ün Aβ oluşumunu arttırdığı ancak ApoE4'ün bu etkisinin ApoE3'ten çok daha etkili olduğu belirlenmiştir. ApoE3 ve ApoE4'ün α sekretaz aktivitesini değiştirmediği böylece ApoE'nin Aβ oluşumunu kolesterolün rol oynamadığı farklı bir mekanizma ile gerçekleştirdiği ileri sürülmektedir. Aβ oluşumu üzerine bu isoform spesifik etkinin düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör

bağlantılı protein “Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein” (LRP) aracılığı ile gerçekleştiği işaret edilmektedir. LRP aracılığı ile ligand bağlanmasını ve alınımını düşük konsantrasyonda inhibe eden “Receptor-Related Protein” (RAP)’ın ve LRP spesifik siRNA’ların kullanılması ile ApoE4 tarafından A β oluşumunun engellendiği gösterilmiştir. Bu çalışmada elde edilen diğer bir veride, ApoE4’ün bu etkisinin iki yapısal domaini arasındaki molekül içi etkileşimi ile bağlantılı olduğu ileri sürülmektedir. ApoE4 domain etkileşimini inhibe eden küçük moleküllü yapıların tasarlanması ile ApoE4’ün fonksiyonel aktivitesinin ve A β oluşumunun azaldığı rapor edilmiştir. Aynı zamanda bu biyofiziksel özelliğin “domain etkileşiminin” ApoE4’ü ApoE3’ten ayırdığı sonucuna varılmaktadır.

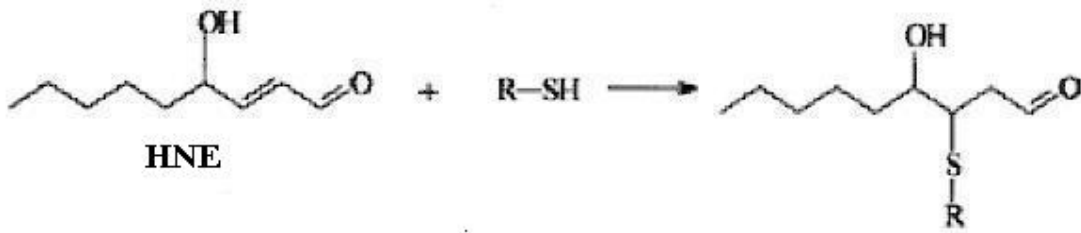
4.1.3. Alzheimer Hastalığı ve Oksidatif Stres

Alzheimer hastalığının patolojisinde oksidatif stresin önemli bir rol oynadığı ileri sürülmektedir. Serbest radikaller ya direkt olarak aminoasitlerin yan zincirlerini okside ederek, ya da lipid peroksidasyonu, glikasyon ürünleri gibi oksidasyon yan ürünlerinin proteinlere kovalent olarak bağlanması ile proteinlerde hasara neden olabilmektedirler. Beyinde oksidatif stres; artan protein oksidasyonu, lipid peroksidasyonu, DNA ve RNA oksidasyonu ile ifade edilmektedir. Oksidatif olarak değişikliğe uğrayan ve fonksiyonunu kaybetmiş çapraz bağlar oluşturan proteinler ya proteozomal yıkıma yönlendirilirler ya da nörodejeneratif hastalıklarda görülen protein birikimlerini oluşturarak hücrel hasarlara neden olurlar (39, 40). Çalışmalar β -amiloid plakların serbest radikaller aracılığı ile oksidatif stres oluşumuna ve Alzheimer hastalığının patolojisine katkıda bulunduğu ileri sürülmektedir (41, 42, 43).

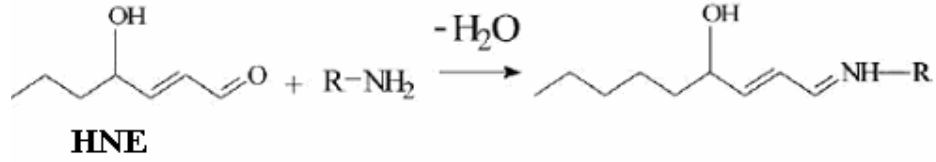
Alzheimer hastalığında oksidatif stresin rolü üzerinde duran en önemli cevaplanmamış konular arasında hasarın bu şeklinin amiloidogenezin sonucu veya nedeni olup olmadığıdır. Son zamanlardaki kanıtlar her iki önerisinde fonksiyonel olduğu yönünde olup, oksidatif stresin başlangıç kaynağı olarak örneğin yüksek kolesterolün amiloid oluşumunu başlatabileceğini ve kendisinin Alzheimer hastalığında diğer bir güçlü oksidatif stres kaynağı olduğunu ileri sürmektedir. Kolesterolün aterosklerozda tanımlanan mekanizmalarla paralel olarak nöronlarda serbest radikal aracılığı ile membran hasarına neden olabileceği düşünülmektedir (44). Sparks ve beraberindekiler

(22) yüksek kolesterolle beslenen tavşanların beyinlerinde A β konsatrasyonunun arttığı ve vasküler inflamasyonun kan beyin bariyerinde hasara neden olduğuna dair verileri rapor etmişlerdir. Tavşanlarda yapılan diğer bir çalışmada yüksek kolesterol içeren diyetin lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA)'i ve lökositlerin oksijen serbest radikal üretme aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (45).

Hidroksil radikali ($\bullet$ OH), alkoksil radikali ($\text{RO}\bullet$), peroksil radikali ($\text{ROO}\bullet$) gibi serbest radikaller hücre membranında bulunan doymamış yağ asitleri “Polyunsaturated fatty acid” (PUFA) ile etkileşerek lipid peroksidasyonuna sebep olmaktadır. Sonuçta lipid peroksidasyon ürünleri olan malondialdehit (MDA), acrolein ve 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) gibi kimyasal olarak reaktif aldehitler oluşmaktadır. Doymamış yağ asitlerinin lipid peroksidasyonu ile oluşan bu aldehitler kardiovasküler, nörodejeneratif hastalıklar gibi pekçok hastalığın başlangıcında ve ilerlemesinde rol oynamakta ve oksidatif stresin belirteci olarak plazmada ölçülmektedirler. Bu aldehitler serbest radikallerle karşılaştırıldığında uzun yarılanma ömürlerinden dolayı farklı reaktivite göstermekte ve oluştukları yerden daha uzak bölgelere gidebilmektedirler (46). Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan reaktif aldehitler MDA, 2-propenal (akrolein) ve HNE proteinlerin amino ve tiyol grupları ile özellikle sistein, histidin ve lizin aminoasitleri ile C=C bağlarında “Michael adducts” yaparlar ya da lizinin ϵ -amino grubu ile “Schiff-base” oluşturarak protein karbonilasyonuna neden olurlar (Şekil 4.2 ve 3) (47) .



Şekil 4.2. Lipid peroksidasyon ürünlerinin proteinlere Michael katılma reaksiyonu
(47 No’lu kaynaktan alınmıştır)



Şekil 4.3. Lipit peroksidasyon yan ürünlerinden HNE'in proteinlerle Schiff baz oluşumu ile katılımı (47 No'lu kaynaktan alınmıştır)

Aβ'nın lipit peroksidasyonunu indüklediği ve oluşan lipit peroksidasyon ürünlerinin Alzheimer hastalığının nörodejeneratif mekanizmalarında önemli rol oynadığı ortaya konulmuştur (48). Aβ'nın nöronlarla inkübasyonundan sonra oluşan bu reaktif aldehytlerin membran proteinlerinin konformasyonunu değiştirdiği ve nöronlarda toksik etki gösterdiği rapor edilmiştir. Alzheimer hastalarının beyinlerinde ve ventriküler serebrosipinal sıvılarında (CSF) kontrol gruplarına göre HNE seviyesinde artış tespit edilmiştir (49). Bourdel ve beraberindekiler (50) Alzheimer hastalarında plasma MDA konsantrasyonunun kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu ölçümleri ile rapor etmişlerdir. Orta düzeyde algılama bozukluğu görülen hastaların hipokampus ve alt parietal loblarında kontrol gruplarıyla kıyaslandığında protein bağlı HNE seviyesinin yükseldiği tespit edilmiş ve böylece lipit peroksidasyonunun Alzheimer hastalarının patolojisinde erken başlayan bir olay olarak görüldüğü ileri sürülmektedir (51). MDA'nın proteinlerin serbest amino grupları özellikle Lizinin amino grubu ile değişime uğrayan proteinler oluşturmaktadır. MDA ile proteinler arasındaki reaksiyonun klinik ilgisi aterosklerozda net olarak ortaya konulmuştur. MDA ve HNE ile bağlantılı Apolipoprotein B-100 Lys residuelleri yaygın olarak aterosklerotik lezyonlarda karakterize edilmektedir (52). MDA-LDL, oxLDL'ye ilaveten, çeşitli pro-inflamatuar ve pro-aterojenik süreçlere aracılık etmekte ve bunların sonucu olarak köpük hücre oluşumuna yol açmaktadır. Holvoet ve beraberindekiler (53) oxLDL ve MDA ile değişime uğrayan LDL'nin plasma seviyelerini koroner arter hastalarında normal bireylerle karşılaştırıldığında dikkate değer yüksek seviyede tespit etmişlerdir. MDA'nın

Parkinson hastalarının ve Alzheimer hastalarının beyinlerinde ayrıca amiotrofik lateral skleroz hastalarının plazmalarında artmış olduğu rapor edilmiştir (54).

Reaktif türevlerin doğrudan proteinler (primer modifikasyon reaksiyonları), şekerler ve lipitlerle reaksiyona girmesi sonucunda oluşan ürünler, tekrar proteinler ile reaksiyona girerek sekonder modifikasyon reaksiyonlarına yol açmaktadır. Reaktif türevler ya peptit bağları ile ya da amino asit yan zincirleri ile reaksiyona girer. Oksidatif modifikasyona uğramış proteinler ya düşük molekül ağırlıklı ürünlere ayrılır yada çapraz bağlı yüksek molekül ağırlıklı ürünleri oluşturur (55). Proteinlerdeki oksidatif modifikasyonların sınıflandırılmasında bu özellikler esas alınsa da, genel olarak kabul edilmiş bir sınıflandırma sistemi mevcut değildir (56). Proteinlerde değişimlere yol açan reaksiyonlar; oksidasyona ve peptit bağının kopmasına yol açan reaksiyonlar ve yan zincir değişimlerine yol açan reaksiyonlar olarak sınıflandırılabilir. Protein karbonil oluşumu protein oksidasyonunun önemli bir işaretidir. Protein karbonilleri α -amidasyon reaksiyonları, glutamil yan zincirlerinin oksidasyonu veya polipeptit zincirlerinin serbest radikal aracılı ayrılması gibi primer modifikasyon reaksiyonları sonucunda oluşabilmektedir. Lipit peroksidasyonu sırasında oluşan aldehytler, indirgen şekerler veya bu şekerlerin oksidasyon ürünlerinin proteinlerdeki lizin residuelleri ile reaksiyonu (glukasyon ve glukoksidasyon reaksiyonları) sonucu oluşan reaktif karbonil türevleri (ketoaminler, ketoaldehitler, deoksiozonlar) protein yapısına karbonil gruplarının katılmasına yol açan sekonder modifikasyon reaksiyonlarıdır. Bu karbonil oluşumları polipeptit zincirlerinin konformasyonunu değiştirebilir ve böylece pekçok proteinin total veya kısmi inaktivasyonunu belirleyebilmektedir. Protein karbonil oluşumları 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) ile reaksiyona girerek proteine bağlı hidrazon yapısını oluşturup bu yapı UV, floresan veya immunhistokimya metodları ile ölçülebilmektedir (57).

Protein karbonil düzeylerinin saptanması protein oksidasyonunu belirlemede genel bir yöntem olarak kabul görmüştür ve pekçok laboratuvar protein karbonilasyonu ölçümü için kendi protokollerini geliştirmektedir. Bazı yayınlarda belirli bir laboratuvar da kullanılan protokol net olarak belirlenemeyebilir. Bu noktada belirli dokularda protein karbonilasyonunun bazal seviyesi dikkate değer farklılıklar gösterdiği için karbonilasyon ölçümünün nasıl çalışıldığı önemlidir. Örneğin insan beyin korteksi için rapor edilen karbonil seviyesi 1.5 ile 6.4 nmol/mg protein aralığında belirlenirken

pek çok grubun insan plazmasında protein karbonilleri için 0.4–1.0 nmol/mg protein aralında olan geniş kıyaslanabilir değerleri kabul ettiği görülmektedir (58).

Protein karbonil seviyesi ve Alzheimer hastalarının patolojisi arasındaki bağlantıyı gösteren bazı çalışmalar bulunmaktadır. Aksenov ve beraberindekiler (59) Alzheimer hastalarının hipokampus ve temporal bölgelerinde aynı hastaların serebellumları ve kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında protein karbonil içeriğinin arttığını ve Alzheimer hastalarının patolojisi ile bir uyum bulunduğunu tespit etmişlerdir. Alzheimer hastalarının beyinlerinde spesifik protein karbonil seviyeleri β -aktin ve kreatin kinaz BB proteinlerinde tespit edilmiştir ve oksidatif stresin farklı hücre içi proteinlerin, yapısal proteinler ve anahtar rolü olan enzimler gibi, değişiminde rol oynayabileceği ileri sürülmektedir.

Protein karbonillerine ilave olarak diğer bir protein oksidasyonu ise güçlü bir oksidan olan peroksinitritin proteinlerde tirozin nitrasyonuna (3-nitrotyrozin) yol açmasıdır. Serbest radikallerin tirozin üzerine atakları sonucunda ayrıca tirozin dimerleri (3,3-ditironin) oluşabilmektedir. Ditirozin (diTry) dimerlerinin insan aorta aterosklerotik bölgelerinde arttığı ve erken yağ çizgilerinde en yüksek seviyede olduğu tespit edilmiştir (60). Bununla birlikte diTry miktarının her 3300 tirozin reziduesu için 1 rezidue olduğu, tersine karbonil miktarının ise yaşamın üçüncü kısmında etkili bir şekilde arttığı ve ortalama her üç protein molekülünden birinin karbonilasyonla modifiye olduğu bir seviyeye ulaştığı gözlenmektedir (56). Alzheimer hastalarının da kortikal ve hipokampus bölgelerinde hem diTyr hem de 3-NT seviyesinde artış rapor edilmiştir (61). Karbonil gruplarının oluşumuna neden olan oksidatif modifikasyonlar, etkilenen proteinlerde genel olarak yapısal ve katalitik fonksiyonların bozulmasına ayrıca birçok mekanizma ile protein-protein çapraz bağlarının oluşumuna neden olmaktadır. Yaşlanma süresince görülen oksidatif olarak modifiye proteinlerin seviyesinin ise hücre fonksiyonları üzerine ciddi hasar verici etkilere sahip olabileceği üzerinde durulmaktadır (62).

A β birikimlerinin membranlarla interaksiyonu hücre fonksiyonların bozulmasına, oksidatif strese ve serbest Ca iyonu konsantrasyonunun yükselmesine ve sonuç olarak hücre ölümüne yol açtığı ileri sürülmektedir. A β 'nın ileri glikasyon ürünlerinin reseptörü olan "receptor for advanced glycation endproducts (RAGE)" nöronal reseptörlerle etkileşime girerek apoptozu indüklediği ve serbest radikal

oluşumuna aracılık ettiği ortaya konulmuştur (63). Bu şekilde farklı reseptör-A β etkileşimlerinin farklı hücre ölüm sinyal yollarını aktive edebileceği düşünülmektedir. Tamagno ve beraberindekiler (64) A β ile inkübasyon sonucunda nöroblastoma hücrelerinde HNE ve H₂O₂ meydana geldiğini ve oksidatif stresle aktive olan c-Jun aminoterminal kinase (JNK) and mitogen activated protein kinase p38 (MAPK p38)'ın A β -indükli nöronal apoptozda rol oynadığını rapor etmişlerdir.

Bartov ve beraberindekiler (65) A β ile inkübe edilen primer nöron hücre kültürlerinde yaptıkları çalışmalarında hücre canlılığında azalma, protein karbonil ve HNE seviyesinde yükselme tespit etmişlerdir. Aynı zamanda A β 'nın toksik etkileri sonucu MAPK p38 ve Extracellular signal-regulated protein kinase (ERK1/2) gibi stresle aktive olan kinazların fosforilasyonunda artışı ölçülmüştür. Bu çalışma ile MAPK'ların artan aktivitesi ile tau fosforilasyonu arasında MAPK yolağının moleküler bir bağlantı oluşturduğu ileri sürülmektedir.

Alzheimer hastalarının hipokampuslarında görülen NFT oluşumunda oksidatif stresin rol oynadığı ve tau proteininin HNE ile modifikasyonu NFT'da tespit edilen temel konformasyonel değişimlere katkıda bulunduğu son çalışmalarda gösterilmiştir (66)

4.14. Tau Proteini

Tau proteini mikrotübüllere bağlanan ve temel olarak olgun ve gelişen nöronların aksonlarında bulunan bir proteindir. Tau proteinini kodlayan gen en az 16 ekzon içermekte ve 17. kromozom üzerinde bulunmaktadır. Tau geninin nükleer RNA'ya transkripsiyonundan sonra oluşan mRNA'dan alternatif olarak ekzonların birleştirilmesi mekanizması ile farklı tau izoformları meydana gelmektedir. Farklı sayıdaki ekzonları taşıyan farklı tau izoformlarının ekspresyonu beyin gelişimi süresince karakteristiktir. Beyin tau izoformları amino terminal domaini ve molekülün mikrotübül bağlanma domainini içeren karboksi terminal domaini olarak iki bölgeye ayrılmaktadır. Amino terminal domain proline zengin bölgeler içermektedir. Bu bölgenin SH3 domaini içeren ve plazma membranı ile bağlantılı proteinlerle tau proteinin bağlanmasında rol oynayabileceği ileri sürülmektedir. Mikrotübülle bağlanmayı sağlayan domain, 31 veya 32 aminoasitin üç veya dört kez tekrarından oluşan sekanslar içerir. Bu bölgeler mikrotübüllere bağlanmayı ve mikrotübüllerin düzenlenebilmesini sağlamaktadır.

Böylece tau mikrotübüllerin polimerizasyonunu sağlayarak mikrotübülleri stabilize etmekte ve ayrılmalarını baskılamaktadır. Tau'nun aynı zamanda neurit uzaması ve aksonal transportun düzenlenmesinde rol oynadığı ileri sürülmektedir. Tau proteinini için fosforilasyon, ubiquitinilasyon, glikozilasyon, nitrasyon, glikasyon, oksidasyon ve deaminasyon gibi pekçok post-translasyonel modifikasyon tanımlanmaktadır. Tau fosforilasyonu gelişimsel olarak düzenlenmektedir ve fetal nöronlarda fosforilasyon yüksekken gelişim süresince yaşla azalmaktadır. Tau molekülünün treonin, tirozin ve serin aminoasitleri potansiyel olarak fosforile edilmektedir. Tau proteininin aşırı fosforilasyonu “taupathies” olarak isimlendirilen nörodejeneratif hastalıklarla bağlantılıdır. Aşırı fosforile tau'nun mikrotübülle bağlantısı zayıfladığı için mikrotübül stabilizasyonu dağılmaktadır. Nöronlarda aşırı fosforile tau birikimlerinden oluşan PHF ve bunların oluşturduğu NFT Alzheimer hastalığının temel karakteristik özelliğidir (67, 68).

Glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3) ,p38, ERK, PKC gibi pekçok kinaz tau'yu fosforilleyebilmektedir. Oksidatif stres Alzheimer hastalarında aktive edilen GSK3 ve MAPK'lardan ise p38 MAPK, ERK ve JNK (Jun-N-terminal kinase)'ı aktive etmekte ve tau fosforilasyonu ve nörofilamentlerin oluşumuna neden olmaktadır. Bir kez fosforile olduğunda tau ve diğer hücre iskeleti proteinlerinin oksidatif stresin karbonil ürünleri ile modifikasyona daha duyarlı olduğu ileri sürülmektedir (69).

Liu ve beraberindekiler (66) Alzheimer hastalarının beyinlerinde oluşan nörofibriller yumaklarda (NFT) oksidatif stresin rol oynadığını ve lipid peroksidasyon ürünü HNE ile oluşan tau modifikasyonunun NFT'de tanımlanan konformasyonel değişimlerin meydana gelmesinde rol oynadığını göstermişlerdir.

Kolesterol ve aşırı tau fosforilasyonu arasındaki bağlantıyı göstermek için Rahman ve beraberindekiler (70) ApoE knockout farelerde yaptıkları çalışmalarında uzun süreli yüksek kolesterollü diyet alınımları sonucunda nöron içi aşırı fosforile tau birikimleri tespit etmişlerdir.

A β birikiminin tau'nun aşırı fosforilasyonunda rol oynadığını ileri süren çalışmalar bulunmaktadır (71, 72). Yüksek kolesterol içeren diyetle beslenen tavşanların hipokampuslarında A β birikimi ve PHF protein seviyesinde artış gösterilmiştir (24). Transgenik farelerle yapılan çalışmalardan insan mutant tau proteinini eksprese eden farelere A β enjeksiyonunun amygdala içinde NFT oluşumları gösterilmiştir (73). A β

fibrilleri ile inkübe edilen primer rat ve insan nöron hücre kültürlerinde yapılan çalışmada ise A β fibrillerinin tau fosforilasyonunda artışa ve mikrotübüllere bağlanma kapasitesinde azalmaya neden olduğu rapor edilmiştir (72).

4.1.5. Proteozom

Proteozom hem çekirdekte hem de sitoplazmada bulunan birçok katalitik aktivitesi olan büyük bir proteazdır. Katalitik aktivitenin bulunduğu 20S “core” çekirdek partikül ve regülatör bölgelerin bulunduğu 19S “regülatör” düzenleyici partiküller ile 26S proteozom kompleksini oluşturur. 20S partikül birbirine benzer dışta 2 α halkası ve içte 2 β halkasının üst üste diziliminden oluşan 4 halkalı silindir şeklinde bir yapıdır. Bu halkaların herbiri α_{1-7} β_{1-7} α_{1-7} genel yapısında 7 alt ünite içermektedir. Dış α alt üniteleri regülatör bağlanmadan sorumlu iken iç bölümdeki β alt üniteleri ise proteozomun proteolitik olarak aktif merkezleridir. 20S proteozomların proteolitik bölgeleri β alt üniteleri üzerinde yerleşmiştir ve kimotripsin, tripsin ve glutamil peptidazı içeren çoklu endopeptidaz aktivitelere sahiptir. Proteozomların en iyi karakterize edilen fonksiyonları ubikitin aracılığı ile hasarlı proteinleri yıkımlarıdır (74). Ubikitin proteini pekçok hücrel proteine çoklu ubikitin zincirleri oluşturacak şekilde lizin aminoasiti aracılığı ile bağlanarak proteinlerin 26S proteozom tarafından yıkımı için sinyal oluşturmaktadır. Ubikitin 76 aminoasitten oluşan primer yapısı yüksek oranda korunmuş küçük bir proteindir ve hücrel proteinlere 3 farklı enzim aracılığı ile ATP hidrolizi sonucunda bağlanmaktadır. E1 (ubiquitin activating enzyme) enzimi ATP bağımlı reaksiyonla ubikitin karboksil terminalini aktive eder ve yüksek enerjili E1-tiyolester-ubikitin arabileşği meydana gelir. Aktive olan ubikitin E2 (ubiquitin conjugating enzyme) enzimine aktarılır ve son basamakta E3 (ubiquitin ligase enzyme) enzimi ubikitini hedef proteinin lizin grubuna transfer eder. Ubikitin C terminalindeki glisin aminoasiti ile hedef proteinin amino grubundaki lizin kalıntısı izopeptit bağı ile bağlanır (75).

Proteozomal sistem; hücre çoğalması, farklılaşması, gelişim, immün cevabın düzenlenmesi gibi temel hücrel fonksiyonların pek çoğunda rol oynamakta ve yanlış katlanmış, okside olmuş proteinlerin yıkımında görev almaktadır. Pek çok çalışma okside proteinlerin yıkımında proteozomal sistemin rolünü göstermektedir (76). Serbest radikaller, MDA veya HNE gibi lipid peroksidasyon ürünleri ve karbohidratlar ile

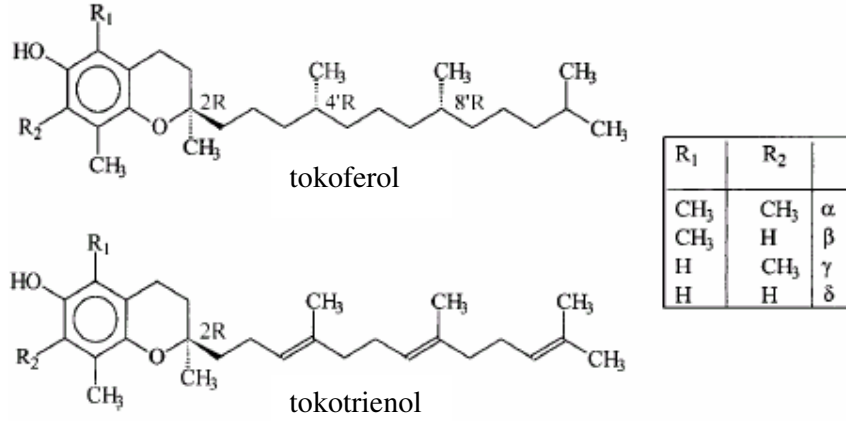
proteinler arasındaki çapraz bağ reaksiyonları proteinlerin yığılmasını başlatmaktadır. Proteozom inhibisyonu ve protein birikimleri arasındaki ilişki çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur. Yüksek düzeyde okside ve çapraz bağ oluşturmuş proteinlerin proteozomlar için zayıf substratlar olduğu ve bu birikimlerin büyük miktarlarının proteozomları inhibe ederek aktivitesini düşürdüğü bildirilmiştir (77, 78, 79). Shringarpure ve beraberindekiler (80) çalışmalarında HNE ile çapraz bağ oluşturan A β 'nın proteozom aktivitesini inhibe ettiğini göstermişlerdir. Alzheimer hastalarının beyinlerinde oksidatif olarak hasarlı proteinlerin nöron içi birikimleri bulunduğunda, proteozomal sistemdeki fonksiyon bozukluklarının protein birikimlerine ve böylece nörodejeneratif hastalıklara yol açtığı öne sürülmektedir.

Birçok çalışmada Alzheimer hastalarında azalan proteozom aktivitesi rapor edilmekte ancak bu proteozomal aktivitedeki azalmanın nedeni tam olarak bilinmemektedir (81, 82). Keck ve beraberindekiler (83) çalışmalarında Alzheimer hastalarında proteozom fonksiyon bozukluklarının PHF-tau birikimlerinin proteozomlara inhibitör bağlanması şeklinde bir etki göstererek gerçekleştirdiğini belirtmişlerdir. Alzheimer hastalarının beyinlerindeki proteozom aktivitesini analiz ettiklerinde kontrollere göre % 56 azalma kaydetmişlerdir. Bu aktivite kaybının proteozom proteinindeki azalma ile bağlantılı olmadığı çalışmalarının sonucunda rapor edilmektedir. Çalışmalarda proteozom aktivitesi kaybının proteozom ekspresyonundaki azalma ile bağlantılı olmadığı proteozomun post translasyonel değişimler sonucunda inhibe olabileceği ileri sürülmektedir (76). Proteozom aktivitesinin inhibisyonu sonucu yaşla bağlantılı olarak protein oksidasyonunda artışa ve merkezi sinir sisteminde nörodejenerasyona neden olabileceği sonucuna varılmaktadır.

4.2. Vitamin E

Vitamin E ilk kez 1922 yılında Evans ve Bishop tarafından keşfedilmiş ve dişi farelerin üremeleri için gerekli olan bir mikrobesein olarak tanımlanmıştır . Doğal vitamin E tokoferol ve tokotrienollerin (α , β , δ , γ tokoferoller ve α , β , δ , γ tokotrienoller) karışımıdır (Şekil 4.4). Her iki gruptaki maddeler 6-hidroksi kroman halkasına izoprenoit yan zincirlerinin katılması ile elde edilir. Tokoferoller, 16 karbon içeren doymuş bir izoprenoit yan zincir ve kroman halkasının 2', 4' ve 8' pozisyonlarda CH₃ (metil) grubu taşır. Tokotrienoller, 3',7',11' pozisyonlarında doymamış yan zincire sahiptir. Grup

içindeki üyeler aromatik halkaya bağlanan metil gruplarının pozisyon ve sayısına bağlı olarak α , β , δ , γ olarak adlandırılırlar.



Şekil 4.4. Tokoferol ve tokotrienol analoglarının doğal yapısı
(85 No'lu kaynaktan alınmıştır)

Doğal vitamin E kaynakları bitkisel yağlardır ve en zengin besinsel kaynakları; soya fasulyesi, ay çekirdeği, badem gibi yağlı bitkilerdir ve herbiri farklı miktarda vitamin E içermektedir (84, 85).

Vitamin E'nin absorpsiyonu, taşınması ve vücut içinde dağılımı diyet ile alınan yağlar ile birlikte olur (86). İnsanlarda vitamin E ince barsağın proksimal kısmından safra tuzları ve lipitler ile birlikte alınır ve trigliseritler, kolesterol, fosflipitler ve apolipoproteinlerle birlikte şilomikronlar içine toplanır ve lenfatik sisteme salınır. Vitamin E'nin bütün formlarının eşit oranda absorbe olması bu düzeyde bir özgülüğün olmadığını göstermektedir. Lenfatik yolağı geçtikten sonra, şilomikronlar sistemik dolaşıma ulaşır, ve hedef dokulardaki endoteliyal lipoprotein lipazın etkisiyle hidroliz olur (87). Bu süreç sırasında, vitamin E'nin bir kısmı plazmaya salınır ve hücreler tarafından alınır. A ve D vitaminlerinden farklı olarak vitamin E'nin herhangi bir taşıyıcı plazma proteini olmadığı düşünülmektedir. Plazma lipoproteinlerine bağlanarak dokulara özgül olmayan bir şekilde taşınır. Şilomikron kalıntıları karaciğerde başlıca LDL reseptörleri aracılığıyla alınır. Karaciğer tarafından bu şilomikron kalıntılarının alınmasını takiben, absorbe edilen vitamin E karaciğerden çok düşük yoğunluklu lipoprotein, "Very Low Density

Lipoprotein” (VLDL) partikülleri içinde salınarak periferel hücrelere gönderilir. Burada, farklı vitamin E formları arasında seçici bir alım meydana gelir. Farklı tokoferollerin farklı alınımlarından sorumlu olan protein karaciğer α -tokoferol transfer proteinidir (α -TTP) (6). α -Tokoferol karaciğerde α -TTP tarafından spesifik olarak tanınır. Vitamin E’nin diğer formları α -TTP’e etkili olarak bağlanamaz ve bu yüzden VLDL içine katılımları azalır. Tokoferollerin α -TTP’e olan göreceli affiniteleri sırasıyla, α -tokoferol % 100, β -tokoferol % 38, γ -tokoferol % 9 ve δ -tokoferol % 2 dir. Salınan VLDL’nin büyük bir kısmı lipoprotein lipaz tarafından hidroliz edilir ve LDL’e dönüşür. Kanda tokoferol, lipoprotein partikülleri arasında hızlı bir şekilde transfer edilir. Plazma fosfolipit transfer proteini LDL ve yüksek yoğunluklu lipoprotein, “High Density Lipoprotein” (HDL) arasındaki tokoferol değişimini sağlar. LDL ve HDL fraksiyonları insanlarda serumda bulunan vitamin E’nin % 90’ını içerir. α -TTP (32 kDa) hepatositlerde oldukça fazla eksprese edilir. α -TTP’in α -tokoferol plazma seviyesini yeterli düzeyde devam ettirmek için gerekli temel bir molekül olduğu düşünülmektedir. α -TTP geni mutasyona uğradığında serumda α -tokoferol konsantrasyonunun düşmesi, insanda α -TTP’nin α -tokoferolün plazma konsantrasyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını belirtmektedir (87). α -TTP’in düşük konsantrasyonlarda beyin, dalak, akciğer ve böbreklerde de bulunduğu tespit edilmiştir. Son zamanlarda tanımlanan protein grubu “tocopherol associated proteins” (TAP) olarak adlandırılmakta ve tokoferolün hücre içi taşınmasında spesifik olarak rol aldığı düşünülmektedir. Diğer bir tokoferol taşıyıcı protein “tocopherol binding protein (TBP)” öncelikli olarak α formuna bağlandığı ve ayrıca hücre içi dağılımından sorumlu olabileceği ileri sürülmektedir. Vitamin E vücuttan atılmadan önce metabolize edilir. α -Tokoferolün idrarda “Simon” metabolitleri olarak adlandırılan (tokoferonik asit ve tokoferonolakton) metabolitleri bulunmaktadır. Bu metabolitlerin yapısı incelendiğinde yan zincirlerinin kısaldığı ve kroman halkasının açıldığı tespit edilmiştir. Halka yapısının açılması α -tokoferoksil radikalinin oluşumu ile başladığı ve dolayısıyla bu metabolitlerin α -tokoferolün *in vivo* da bir antioksidan olarak fonksiyon gösterdiğini düşündürmüştür. Diğer metabolit kısalmış yan zinciri olan fakat açılmamış kroman halkasına sahip 2,5,7,8-tetrametil-2-(2’ karboksimetil)-6-hidroksikroman (α -CEHC)’dır. α -CEHC’nin bozulmamış kroman halkası antioksidan olarak tepkimeye girmeyen α -tokoferolden türediğini önermektedir.

Tokoferoller ve tokotrienollerin yan zincirlerinin metabolizması ω - ve β -oksidasyon yolağı ile meydana gelir. Yan zincir yıkımı, ω -metil grubunun hidroksilasyonu ile başlar ve bunu β -oksidasyon takip eder. ω -Hidroksilasyonu sitokrom P450 bağımlı bir hidroksilaz katalizler. CYP3A'nın vitamin E metabolizmasında rol oynadığı gösterilmiştir (88).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, vitamin E'nin hücrel sinyal ileti yollarında ve çeşitli genlerin ekspresyonunda antioksidan özelliğinden bağımsız spesifik etkileri tanımlanmıştır (89). Boscoboinik ve beraberindekiler (90), α -tokoferolün *in vitro* da düz kas hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini ancak benzer etkinin β -tokoferol ile meydana gelmediği, bununla beraber α -tokoferol, β -tokoferol ile birlikte eklendiğinde hücre büyümesinde inhibisyon olmadığını bildirmişlerdir. Her iki molekülün de hücre içine eşit miktarda taşındığı ve hücre içine alınımında birbirleri ile yarışmadıkları gösterilmiştir. Daha sonra bu gözlemler, α -tokoferolün sinyal ileti yolağında ve hücre siklusunda önemli bir enzim olan PKC nin aktivitesinin inhibe ettiğinin bulunmasıyla açıklanmıştır. PKC inhibisyonu düz kas hücre proliferasyonunun inhibisyonu ile bağlantılıdır ve bu etki α -tokoferole spesifiktir (91). Özer ve beraberindekiler (92) *in vivo* sistemde α -tokoferolün PKC aktivitesini baskıladığını, bir antioksidan olan probukolun ise PKC aktivitesini baskılamada etkili olmadığını göstermişler ve α -tokoferolün ateroskleroz gelişimine karşı koruyucu etkisinin antioksidan özelliğine bağlı olamayabileceğini bildirmişlerdir. α -Tokoferolün PKC ekspresyonunu baskılamadığı, PKC aktivitesinin inhibisyonun hücrel düzeyde bu enzimin defosforilasyonu ile meydana geldiği ve PKC'nin defosforilasyonu α -tokoferol tarafından aktive olan protein fosfataz 2A (PP2A) aracılığıyla meydana geldiği gösterilmiştir (93). Vitamin E'nin PKC ve fosfatidil inositol 3-kinazın (PI3K) yer aldığı iki önemli sinyal ileti yolağını düzenlediği bilinmektedir. Bu kinazların aktivitesindeki değişiklikler, hücre proliferasyonu, platelet agregasyonu ve NADPH-oksidaz aktivasyonu ile ilişkilidir (89).

NADPH-oksidaz enzim kompleksi membrana bağlı bir sitokrom (sitokrom b₅₅₈) ve sitozolik proteinleri (p47^{phox}, p67^{phox}, Rac1/2, ve p40^{phox}) içerir (94). Bir uyarı sonucu katalitik olarak aktif enzim sisteminin oluşabilmesi altünitelerin membrana translokasyonunu gerektirir. Alt ünitelerin bir araya toplanması için gereken faktörlerden bir tanesi p47^{phox} proteininin fosforilasyonudur. Enzim aktivasyonu sırasında PKC'nin

p47^{phox} proteinini fosforilleyerek NADPH-oksidadı aktive ettiği gösterilmiştir. Monositlerde  -tokoferolün PKC aktivitesini inhibe ederek NADPH-oksidad fonksiyonu için önemli olan, p47^{phox} fosforilasyonunu ve translokasyonunu önlediği ve bunun sonucunda süperoksit oluşunu indirgendiği ve inflamatuvar sürecin baskılandığı gösterilmiştir (95).

4.4.3. Vitamin E ve Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalarının beyinlerinde oksidatif stresin varlığı protein oksidasyonu, lipid peroksidasyonu, DNA oksidasyonu gibi oksidatif stres belirteçlerinin tespiti ile ortaya konulmuştur. İnsanlarda şiddetli vitamin E eksikliği spinocerebral ataksi ile karakterize n romuskular anormalliklere neden olmaktadır (96).  -TTP geninde meydana gelen mutasyonlar plazma  -tokoferol konsantrasyonunun düşmesine neden olarak, vitamin E eksikliğine bağlı ataksi (AVED, ‘ataxia with vitamin E deficiency’) gelişimine yol açmaktadır. Çeşitli çalışmalarda, vitamin E verilmesinin AVED’in yanı sıra özellikle ateroskleroz, iskemik kalp hastalığı ve çeşitli kanser tiplerinin gelişiminde koruyucu etki gösterdiği gösterilmiştir (97).

Orta şiddette algılama kaybı görülen 341 Alzheimer hastalarında 2 yıl süre  -tokoferol (200 IU/ gün) alan hastalarda hastalığın ilerlemesini yavaşlattığı rapor edilmiştir (98). Diğer bir çalışmada vitamin E ve vitamin C’nin birlikte kullanımının ileri yaştaki popülasyonda Alzheimer hastalarının insidansını düşürdüğü gösterilmiştir (99). Kontush ve beraberindekiler (100) Alzheimer hastalarına bir ay süre ile vitamin E (400 IU/gün) ile beraber vitamin C (1000 mg) verdiklerinde her iki vitamininde CSF ve plasmada yükseldiğini ve aynı zamanda CSF ve plasma lipoproteinlerinin oksidasyonunun önemli derecede azaldığını rapor etmişlerdir. Bourdel ve beraberindekiler (50) Alzheimer hastalarında plazma lipit peroksidasyon ürünü MDA konsantrasyonunu kontrol grubuna göre daha yüksek ve plazma  -tokoferol konsantrasyonunun ise daha düşük olduğunu tespit etmişlerdir.

Hiperkolesterolemi ile ateroskleroz oluşturulan tavşan modelinde de yüksek kolesterol alan grupta kan ve aortik dokuda MDA seviyesi ve lökositlerin oksijen serbest radikal üretme aktivitesi yüksek olduğu vitamin E alan grupta ise MDA düzeyinde azalma olduğu bildirilmiştir (45). Sung ve beraberindekiler (101) vitamin E’nin

transgenik farelerde A β seviyesini ve amiloid plak oluşumunu önemli derecede düşürdüğünü ve beyin lipid peroksidasyonunu baskıladığını ancak amiloid plak oluşumundan sonra vitamin E verilmesine başladığında ise beyinde oksidatif stresde azalma görülmesine rağmen bu hayvanların amiloidotik fenotipleri üzerinde önemli bir etki gözlenmediği rapor edilmiştir.

Vitamin E eksik diyetle beslenen sıçanların hipokampusunun “gene chip” teknolojisi ile incelendiği bir çalışmada vitamin E tarafından regüle edilen hormon ve sinir büyüme faktörleri, apoptoz, A β ve ileri glikozillenmiş son ürünlerin temizlenmesi ile bağlantılı olan önemli sayıda gen belirlendiği rapor edilmiştir (102).

Yatin ve beraberindekiler (103) embriyonik sıçan hipokampal nöronal hücre kültürü çalışmalarında A β (1-42)-indükli nöronal protein oksidasyonunun, reaktif oksijen türlerinin oluşumunun ve hücre ölümünün vitamin E tarafından inhibe edilerek önlendiğini göstermişlerdir. Çalışmalarında vitamin E’nin A β (1-42) fibril oluşumunu inhibe etmediği bildirilmiştir ve vitamin E’nin nöron koruyucu etkisini A β -aracılığı ile oluşan serbest radikallerin temizlenmesini sağlayarak gösterdiğini bildirmişlerdir. Sinaptosomal membranlardan izole edilen lipidlerin kompozisyonu ve yapısı üzerine A β (25-35)’nin gösterdiği hasarın vitamin E tarafından engellendiği diğer bir çalışmada rapor edilmiştir (104). Yetişkin sıçanlarda alınan mikroglialarda yapılan hücre kültürü çalışmasında vitamin E’nin reaktif oksijen türlerinin üretimini ve proinflamatuvar sitokinlerin miktarını düşürdüğü gösterilmiştir (105). Daha önceki çalışmalar makrofajlarda α tokoferolün serbest radikal üretimini azalttığı ve bunu PKC’nin ve NADPH-oksidadın inhibisyonu ile süperoksit üretimini azaltarak yaptığını göstermiştir (95). Vitamin E’nin p38 MAPK bağımlı sinyal yolağı ve ayrıca proinflamatuvar sinyal ile ilgili olan COX-2 yolağı ile etkileşimi de rapor edilmiştir (106).

Araşidonik asit metabolizmasının ürünleri olan Prostaglandin E₂ (PGE₂) ve tromboksan A₂ (TA₂) sentezi siklooksijenaz “Cyclooxygenase” (COX) enzimi tarafından katalizlenir. COX’ın COX-1 ve COX-2 olmak üzere 2 tane izoenzimi vardır ve COX-2 inflamasyonda rol oynayan prostoglandinlerin sentezinden sorumludur. Koroner arter hastalarının aterosklerotik lezyonlarının makrofajlarında COX-2’nin lokalize olduğu gösterilmiştir (107). Yapılan çalışmalarda PGE₂ üretiminin yaşa bağlı olarak arttığı, bunun da COX aktivitesinin artması sonucunda meydana geldiği gözlenmiştir (108, 109). Yaşlı farelerde α -tokoferolün COX aktivitesini baskılayarak PGE₂ üretimini azalttığı

bildirilmiştir. α -Tokoferolün COX'ın mRNA ve protein düzeyleri üzerinde etki göstermediği belirlenmiş ve posttranslasyonel bir regülasyon olabileceği düşünülmüştür. α -Tokoferolün etkisini COX-2 aktivitesinde rol oynadığı gösterilen peroksinitrit oluşumunu baskılayarak meydana getirdiği gösterilmiştir. Diğer tokoferollerin de COX aktivitesini baskılamada etkili olduğu fakat inhibisyon derecelerinin değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir (110).

İnsan tau proteinini aşırı eksprese eden transgenik farelerde oluşan oksidatif hasarın ve vitamin E'nin rolünün incelendiği çalışmada vitamin E diyet ile beslenen bu transgenik farelerde vitamin E'nin tau patoloji gelişimini geciktirdiği ve baskıladığı gösterilmiştir (111). Bu sonuçlarla oksidatif hasarın tau proteininin patolojik mekanizmasında rol oynadığı ve nörodejeneratif taupatilerin vitamin E ile önlenebileceği ileri sürülmektedir.

5. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

5.1. GEREÇLER

Deney ve kontrol grupları 1-2 aylık erkek albino tavşanlardan oluştu. Tavşan yemi M.Barbaros Denizeri Yem Sanayii'nden ve RRR- α - tokoferol (Evigen, i.m.) Aksu Farma Tıbbi Ürünler İlaç Sanayii'nden temin edildi. Çalışmalarda kullanılan tüm kimyasallar uygun kalite ve saflıkta idi.

Serum α -tokoferol düzeyleri C-18 Bondapak kolon, Waters UV dedektör ve integratör kullanılarak ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi “High Performance Liquid Chromatography” (HPLC) ile, serum kolesterol düzeyleri ise spektrofotometrik olarak (Hitachi Modüler P800, Roche, Boehringer Ingelheim, Almanya) ölçüldü. Dot Blot Sistem (Schleicher&Schuell, Almanya), ECL sistem (enhanced chemiluminescence detection system, Perkin Elmer, Almanya), fluorojenik proteozom substrat suc-leu-leu-val-tyr-methylcoumaryl amide (suc-LLVY- MCA, Bachem, Almanya). Olympus BX-60 transmission fluorescence microscope, ELISA Reader'da (Labsystem İEMS Reader MF).

Antikorlar: rabbit polyclonal anti-20 S proteasome antibody, Biomol, Almanya; anti-dinitrophenyl-rabbit-IgG-antiserum, Sigma, Almanya; mouse monoclonal Tau antibody, Zymed, Almanya; PHF-1 antikor (mouse monoclonal PHF1 antibody, Dr. Peter Davies tarafından hediye edilmiştir, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY, USA), anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated antibody, Amersham Biosciences, Almanya; secondary goat anti-rabbit IgG ‘Alexa Fluor 488’ antibody, Molecular Probes, Almanya.

İstatistiksel analizler Student's *t*- test ile değerlendirildi.

Çalışmada deney hayvanlarına uygulanan yöntemin etik kurallara uygunluğu “Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu” tarafından 09.03.2006 15.2006 mar. sayılı karar ile onaylanmıştır.

5.2. YÖNTEMLER

5.2.1. Deney Planı

Çalışmada yaşları 1-2 ay arasında değişen (anne sütünden kesildikten hemen sonra) 32 adet albino erkek tavşan kullanıldı. Tavşanlar her grupta 8 adet olacak şekilde aşağıdaki protokole göre gruplandırıldı.

Grup 1: Vitamin E den fakir yem ile beslendi.

Grup 2: % 2 kolesterol içeren yem ile beslendi.

Grup 3: % 2 kolesterol içeren yem ile beslendi ve vitamin E i.m. olarak 50 mg/kg/gün uygulandı.

Grup 4: Vitamin E den fakir yem ile beslendi ve vitamin E i.m. olarak 50 mg/kg/gün uygulandı. (Vitamin E'nin tek başına verilmesi ile oluşan etki incelendi)

İntramusküler enjeksiyonlar her iki bacağa günaşırı ve hem medyal, hem de lateral olarak uygulandı. Bütün tavşanlar ayrı kafeslerde barındırıldı ve günde 100 g yem ile 4 hafta süre ile beslendi. Kolesterol içeren yem, kolesterolün dietileter içinde çözündürülerek yeme karıştırılması ve daha sonra eterin tamamen uçurulması ile hazırlandı.

5.2.2. Tavşanlar ile İlgili Materyallerinin Alınması ve Saklanması

Dördüncü haftanın sonunda tavşanlara 12 saat açlık sonrası periton içine 50 mg/kg Ketamin HCl ve eter inhalasyonu uygulanarak anestezi sağlandı. Toraks disseksiyonunu takiben aortaları serbestleştirildi. Kalpten enjektörle kan alınarak serum ayrıldı, ependorf tüplere konularak üzerlerine azot gazı kondu ve ölçüm yapılana kadar -20 °C'de saklandı. Beyinin dört farklı bölgesinden (serebellum, hipokampus, temporal korteks ve frontal korteks) alınan dokular önce sıvı nitrojende hızla dondurulup -80 °C'de saklandı.

5.2.3. Serum Kolesterol Düzeylerinin Ölçülmesi

Serum kolesterol düzeyleri spektrofotometrik olarak ölçüldü. Bu yöntemde prensip olarak kolesterol, kolesterol esterase ile serbest kolesterole dönüşür ve kolesterol oksidaz ile reaksiyonu sonucu hidrojen peroksit oluşur. Hidrojen peroksitin peroksidaz enzimi varlığında 4-aminofenazol ve fenol ile reaksiyonu sonucu oluşan renkli kinonemin bileşiğinin absorbansı ölçülür. Kolesterol düzeyleri mg/dL olarak ifade edildi. İstatistiksel analizler Student's *t* test ile değerlendirildi, $p < 0.001$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

5.2.4. Serum α -Tokoferol Düzeylerinin Ölçülmesi

200 μ L tavşan serumu 200 μ L askorbatlı etanol (1 gr/L) ile muamele edilerek deproteinize edildi. 24 μ L asetonitril eklenerek 1 dakika vortekslendi. Bunun üzerine 500 μ L HPLC grade heksan eklenerek 2 dakika vortekslendi ardından 1 dakika 770x g'de santrifüjlendikten sonra en üstteki heksan fazı toplandı. Bu işlem 3 kez tekrar edildi. Bu şekilde serumdaki α -tokoferol yaklaşık 1500 μ L heksan içinde elde edildi. Bu çözeltinin 1250 μ L'si tüpe alındı ve 36 °C su banyosunda sıvı azotla heksan tamamen uçuruldu. Tüplerin ağzı sıkıca parafilmlenerek çalışmaya hazır hale getirildi. HPLC uygulaması için tüpteki kalıntının üzerine 20 μ L askorbatlı etanol (1 gr/L) eklendi ve vorteks ile çalkalandı. Ardından 400 μ L mobil faz (metanol : su ; 95:5) eklendi, 1 dakika vortekslendi ve 1 dakika sonikasyonla degaze edildi. Karışım 45 nm'lik filtrelerden süzüldü. Bu süzüntüden alınan 50 μ L örnek, akış hızı 1.5 mL/dk olacak şekilde HPLC C-18 Bondapak kolonuna injekte edildi ve absorbans değerleri Waters UV dedektör ile 294 nm'de okundu. α -Tokoferol tepeleri standart tepelerle karşılaştırılarak konsantrasyonlar hesaplandı ve μ g/mL olarak ifade edildi (112).

5.2.5. Serum Malondialdehit (MDA) Düzeylerinin Ölçülmesi

Yöntemin prensibinde, plasma lipoperoksidleri seyreltik fosforik asit ile hidroliz edilir. Bu hidroliz ürünlerinden biri olan MDA'nın TBA (Thiobarbituric acid) ile reaksiyonu sonucu oluşan MDA(TBA)₂ kompleksi plazma proteinlerinin metanol ile uzaklaştırılmasının ardından HPLC ile analiz edilmektedir.

50 µL serum üzerine 750 µL fosforik asit (440 mM), 450 µL dH₂O ve 250 µL TBA (42mM) solüsyonu eklendi ve 100 °C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra örnekler buz üzerinde soğutuldu ve örneklerden 500 µL alınıp üzerlerine 500 µL Methanol:NaOH (0.1 M) ilave edilerek 1:1 (v:v) seyreltildi. Örnekler 1500 rpm'de 2 dakika 4 °C'de santrifüj edildi. Üst faz alttaki pelet alınmadan yeni bir tüpe aktarıldı. Örneklerden 50 µL alınarak Supelco LC18, 12,5 x 4,6mm, 5 µm kolona 1 mL/min akış hızında enjekte edildi. Örnekler fosfat buffer (50 mM, pH 6.8)/ Methanol (% 40) karışımı ile HPLC'den ayrıldı. Oluşan TBA-MDA kompleksin ölçümleri floresans dedektör ile 525 nm eksitasyon ve 550 nm emisyon da yapıldı. MDA pikleri standart piklerle karşılaştırılarak konsantrasyonlar hesaplandı ve µmol/mL olarak ifade edildi (113).

5.2.6. Serum Protein Karbonil Düzeylerinin Ölçülmesi

Yöntemin prensibi, protein içeren örneklerin DNP (2,4-Dinitrophenylhydrazine) ile reaksiyonu sonucunda 96 kuyulu mikrotiplere spesifik olmayan bağlanmalarıdır. Bağlanmayan DNP ve protein olmayan maddeler uzaklaştırılmakta ve interferans azaltılmaktadır. Bağlanan proteinler anti-DNP antikoru takiben sekonder antikor ile işaretlenmektedir. O-Phenylenediamine/hidrojen peroksit solüsyonunun ilavesinden sonra gelişen renk reaksiyonu sülfirik asit ile durdurulup absorbans değerleri ölçülmektedir.

Serum örneklerinde protein konsantrasyonu Bradford yöntemi ile hesaplandı ve örnekler 1 mg/mL protein olacak şekilde seyreltildi. Örneklerden 15 µL alınıp yeni ependorfa aktarıldı ve üzerlerine 2 mg/mL DNP içeren 10 mM DNP solüsyonundan (6 M Guanidin hidroklorit, 0.5 M potasyum fosfat buffer, pH 2.5) 45 µL ilave edilerek vortekslendi. Oda sıcaklığında 55 dakika inkübasyondan sonra bu karışımdan 5 µL alınıp üzerlerine 1000 µL "Coating buffer"(10 mM sodyum fosfat buffer) ilave edildi. Buradan

alınan 200 µL Nunc Immuno Plate'lere kondu (her örnek 3 kuyuya uygulandı). Plateler parafilmle kapatılarak 4 °C'de 24 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyondan sonra platelerin içindeki solüsyon döküldü ve her kuyuya 250 µL % 0.1 indirgenmiş BSA (Bovine Serum Albumin) eklenerek 1.5 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra plateler tekrar döküldü ve her kuyuya "20 µL anti-DNP antikor (anti-dinitrophenyl-rabbit-IgG-antiserum) + 20 mL % 0.1 indirgenmiş BSA + 20 µL Tween 20" karışımından 200 µL ilave edilerek 1 saat 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında plateler döküldü ve 3 kez PBS (Fosfat tamponlu serum fizyolojik) ile yıkandıktan sonra, "2 µL sekonder antikor (monoklonal anti-rabbit-IgG-antibody peroxidase conjugated) + 20 mL % 0.1 indirgenmiş BSA + 20 µL Tween 20" karışımından yine her kuyuya 200 µL eklenerek 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra plateler döküldü ve yine 3 kez PBS ile yıkandı.

5 mL "developer solüsyonu" (50 mM Na₂HPO₄ , 24 mM sitrik asit) 1 tablet O-Phenylenediamine ile karıştırıldı ve bu karışımdan 3 mL alınıp üzerine 20 mL developer solüsyonu ve 8 µl H₂O₂ ilave edilerek hazırlanan solüsyondan her kuyuya 200 µL ilave edildi. Renk değişimi okside BSA standartlarından takip edilerek renk değişimi gözlenince her kuyuya 100 µL Sülfirik asit (H₂SO₄) ilave edildi ve reaksiyon durdurularak mikropate okuyucuda (Labsystem İEMS Reader MF.) 492 nm/ 690 nm'de okundu. Protein bağlı karboniller okside BSA (50 mg/ml) standartlarına göre hesaplandı ve nmol/mg olarak ifade edildi (114).

5.2.7. Işık Mikroskobu İncelemeleri

Örnekler, % 10 tamponlanmış formalin içinde 4 saat tespit edildikten sonra yükselen alkol serilerinden geçirilerek suları alındı. Daha sonra 30'ar dakika 2 kere ksilenle muamele edildikten sonra 1 gece 60 °C'de erimiş parafin içinde belketildi ve daha sonra parafine gömüldü. 5 µm kalınlığında alınan kesitler hemotoksilen eosin boyası ile boyandı ve ışık mikroskobu incelemeleri yapıldı.

5.2.8. Sudan IV Boyama Yöntemi

Aorta arkus hizasından karaciğere giden damar ayrımına kadar kesildi, adventisya tabakası temizlendi ve uzunlamasına açılarak endotel yüzeyi üst kısımda olacak şekilde düz bir zemin üzerinde sabitlendi. % 10 tamponlanmış formalin içinde 1 gece fikse edildi. % 70'lik alkolde 5 dakika tutulduktan sonra 2 saat boyunca % 70 etanol içinde hazırlanan % 2 Sudan IV boyasıyla muamele edildi. Boyama işleminden sonra % 80'lik alkolde 5 dakika tutuldu ve 1 saat boyunca musluk suyu altında yıkanarak fazla boyadan arındırıldı (115). Daha sonra damarlar PBS içine konarak fotoğrafı çekilene kadar buzdolabında saklandı.

5.2.9. Aterosklerotik İndeks Hesaplanması

Sudan IV ile boyanmış damarların fotoğrafı Nikon marka dijital fotoğraf makinesi ile çekildi. Aterosklerotik alanın hesaplanması Adobe Photoshop 7.0 programı kullanılarak yapıldı. Aterosklerotik indeks, aterosklerotik alanların piksel değerinin tüm damarın alanının piksel değerine bölünmesi ve 100 ile çarpılması ile hesaplandı ve sonuçlar yüzde olarak ifade edildi (116).

5.2.10. Beyin Doku Homojenatının Hazırlanması

Beynin 4 farklı bölgesinden alınan donmuş dokular PBS'te homojenize edildi. Homojenat 1400 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi ve süpernatant proteozom aktivitesi ve ELISA yöntemi ile protein karbonilasyon ölçümü için ayrıldı. Total protein konsantrasyonu Bradford protein tayini (BioRad Protein Assay) ile ölçüldü.

5.2.11. Beyin Dokusunda Protein Karbonilasyonu Ölçülmesi

Homojenize edilen beyin dokusundan alınan örnekler (1 mg protein/ml) nitroselüloz membrana Dot Blot Sistem (Schleicher&Schuell, Almanya)'de tatbik edildi ve sisteme vakum uygulandı. Nitroselüloz membran sistemden alınarak 2 mg/ml DNPH içeren 10 mM DNP solüsyonunda karanlıkta, oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.

İnkübasyondan sonra membran 10 dakika süreyle 3 kez PBS-Tween 20 ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra membran % 5 süt tozu içeren PBS-Tween 20 ile 1 saat blokladı. Bu sürenin sonunda PBS-Tween 20-süt tozu karışımında 1:1000 seyreltilen primer antikor (anti-dinitrophenyl-rabbit-IgG-antiserum, Sigma, Almanya) içeren solüsyonla 24 saat 4 °C’de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra nitroselüloz membran 10 dakika süreyle 3 kez PBS-Tween 20 ile yıkandı ve PBS-Tween 20-süt tozu ve 1:1000 dilüye edilen sekonder antikor (anti-rabbit IgG horseradish peroxidase-conjugated antibody, Amersham Biosciences, Almanya) ile hazırlanan solüsyonla 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tekrar 10 dakika süreyle 3 kez PBS-Tween 20 ile yıkanan membranda meydana gelen immunreaktivite ECL (enhanced chemiluminescence detection system, Perkin Elmer, Almanya) sistemi ile membran filme (Hyperfilm-ECL, Amersham, Almanya) geçirilerek analiz edildi.

5.2.12. Beyinde Protein Karbonilasyonunun İmmunhistokimya ile Değerlendirilmesi

Beynin 4 farklı bölgesinden alınan dondurulmuş örneklerden kryostat ile 10 µm kalınlığında kesitler alındı. Bu kesitler 100 ml etanol (>99%) ve 1.5 ml H₂SO₄ (95 %) içinde 300 mg DNPH (2,4-dinitrophenylhydrazine) çözülerek hazırlanan solüsyonla 24 saat 4 °C’de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kesitler PBS ile yıkandı ve 1% FBS (Fetal Bovine Serum) içeren PBS’le 30 dakika 4 °C’de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra PBS ile 1:200 seyreltilen DNP antikor (rabbit anti-dinitrophenyl (DNP) antibody, Sigma, Almanya) ile 2 saat 4 °C’de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kesitler PBS ile yıkandıktan sonra % 1 FBS ve PBS’le 1:800 seyreltilen sekonder antikor (secondary goat anti-rabbit IgG ‘Alexa Fluor 488’ antibody, Molecular Probes, Almanya) ile 1 saat 4 °C’de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kesitler 3 kez PBS ile yıkandı. İmmunhistokimya tamamlandıktan sonra kesitler floresans mikroskop (Olympus BX-60 transmission fluorescence microscope) ile analiz edildi (117) .

5.2.13. Beyin Dokusunda Proteozom Miktarının Ölçülmesi

Homojenize edilen beyin dokusundan alınan örnekler (1 mg protein/ml) nitroselüloz membrana Dot Blot Sistem’de yüklendi. Örnekler yüklendikten sonra

sisteme vakum uygulandı ve nitroselüloz membran sistemden alınarak % 5 süt tozu içeren PBS-Tween 20 solüsyonu ile 1 saat bloklandı. Daha sonra PBS-Tween 20-süt tozu karışımında 1:2000 seyreltilen primer antikor (rabbit polyclonal anti-20 S proteasome antibody, Biomol, Almanya) içeren solüsyonla 24 saat 4 °C’de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra nitroselüloz membran 10 dakika süreyle 3 kez PBS-Tween 20 ile yıkandı ve PBS-Tween 20-süt tozu ve 1:2000 seyreltilen sekonder antikor (anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated antibody, Amersham Biosciences, Almanya) ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu sürenin sonunda 10 dakika süreyle 3 kez PBS-Tween 20 ile yıkanan membranda meydana gelen immunreaktivite ECL sistem ile membran filme geçirilerek analiz edildi.

5.2.14. Beyin Proteozom Aktivitesinin Ölçülmesi

Beyin proteozom aktivitesinin ölçümünde, beyinin 4 farklı bölgesinden hazırlanan her bir örneğin süpernatantından 10 µL (24 µg protein) alındı ve 96 kuyuluk platelerde her örnek 3 paralel olarak buz üzerinde çalışıldı. Örneklerin üzerine 33.3 µL 3x 26S tampon çözeltisi [450 mM Tris(base), 90 mM KCl, 15 mM Mg-Acetate x 4 H₂O, 15 mM MgCl₂ x 6 H₂O], 0.2 µL DTT (0.5 M), 66.5 µL H₂O ve 10 µL 2 mM fluorojenik proteozom substrat “suc-leu-leu-val-tyr-methylcoumaryl amide” (suc-LLVY- MCA) ilave edildi ve karıştırıcıda 5 dakika karıştırıldı. Hazırlanan plateler 37 °C’de 30 dakika inkübasyondan sonra 390 nm eksitasyon ve 460 nm emisyonunda floresan florometrede ölçüldü.

5.2.15. Beyinde 20S Proteozomun İmmünohistokimya ile Değerlendirilmesi

Beyin dokusundan 10 µm kalınlığında alınan kesitler % 0.1 Triton X-100 içeren PBS ile 4 °C’de 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra PBS ile yıkanan kesitler % 1 FBS içeren PBS ile 1:100 seyreltilen primer tavşan poliklonal 20S proteozom α/β alt ünite antikor (primary rabbit polyclonal antibody 20S proteasome α/β subunits) solüsyonu ile 90 dakika 4 °C’de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra PBS ile yıkanan kesitler 1 % FBS ve PBS’le 1:800 seyreltilen sekonder antikor (secondary goat anti-rabbit IgG ‘Alexa Fluor 488’ antibody, Molecular Probes, Almanya) ile 4 °C’de 1 saat

inkübe edildi. İnkübasyon sonrası PBS ile 3 kez yıkanan doku kesitleri floresans mikroskobu ile analiz edildi.

5.2.16. Beyin Dokusunda Tau Proteini ve PHF-1 Ölçülmesi

Homojenize edilen beyin dokusundan alınan örnekler (1 mg protein/ml) nitroselüloz membrana Dot Blot Sistem’de yüklendi. Örnekler yüklendikten sonra sisteme vakum uygulandı ve nitroselüloz membran sistemden alınarak % 5 süt tozu içeren PBS-Tween 20 solüsyonu ile 1 saat bloklandı. Daha sonra PBS-Tween 20-süt tozu karışımında 1:500 seyreltilen tau proteinin tayininde kullanılan primer antikor (mouse monoklonal Tau antibody Zymed, Almanya) içeren solüsyonla 24 saat 4 °C’de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra nitroselüloz membran 10 dakika süreyle 3 kez PBS-Tween 20 ile yıkandı ve PBS-Tween 20-süt tozu ve 1:1000 seyreltilen sekonder antikor (anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated antibody, Amersham Biosciences, Almanya) ile hazırlanan solüsyonla 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tekrar 10 dakika süreyle 3 kez PBS-Tween 20 ile yıkanan membranda meydana gelen immunreaktivite ECL sistem ile membran filme geçirilerek analiz edildi. PHF-1 (tau’nun aşırı fosforile şekli) ölçümünde PHF-1 antikor (mouse monoklonal PHF1 antibody, Dr. Peter Davies, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY, USA) 1:250 ve sekonder antikor anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated antibody ise 1:1000 seyreltilip (Amersham Biosciences, Almanya) tau analiz yöntemi takip edilerek belirlenmiştir.

6. BULGULAR

6.1. Serum Kolesterol Düzeyleri

Kontrol, kolesterol, kolesterol + vitamin E ve vitamin E gruplarındaki tavşanların 0. haftada serum kolesterol düzeyleri sırasıyla 89.9 ± 27.4 mg/dL, 73.8 ± 33.3 mg/dL, 58.0 ± 24.3 mg/dL, 69.3 ± 4.7 olarak belirlendi. Dördüncü hafta sonunda tavşanların serum kolesterol düzeyleri, kontrol grubunda 60.6 ± 27.9 , kolesterol grubunda 2952.5 ± 1347 , kolesterol + vitamin E grubunda 2651.2 ± 943.7 , vitamin E grubunda 51.0 ± 0.7 olarak bulundu (Tablo 6.1). Kolesterol alan bütün grupların 4. hafta sonunda kolesterol düzeylerinin yaklaşık olarak 40 kat arttığı ve meydana gelen artışın kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p < 0.001$).

Tablo 6.1: Dört hafta süre ile vitamin E'den fakir yem ile beslenen tavşanlara kolesterol ve vitamin E verilmesinin serum kolesterol düzeyine etkisi

GRUPLAR	Serum kolesterol düzeyleri (mg/dL)	
	0. hafta	4. hafta
Kontrol	89.9 ± 27.4	60.6 ± 27.9
Kolesterol	73.8 ± 33.3	$2952.5 \pm 1347^{*†}$
Kolesterol + Vitamin E	58.0 ± 24.3	$2651.2 \pm 943.7^{*†}$
Vitamin E	69.3 ± 4.7	51.0 ± 0.7

0. hafta ile kıyaslandığında, $*p < 0.001$, 4. hafta kontrol grubu, kolesterol ve kolesterol + vitamin E grupları ile kıyaslandığında $^{\dagger}p < 0.001$, ortalama $\pm$ standart sapma, (n=8)

6.2. Serum Vitamin E Düzeyleri

0. hafta kontrol grubundaki tavşanların serum vitamin E düzeyi ortalaması 5.1 ± 2.1 µg/mL, kolesterol grubunda 3.8 ± 0.7 µg/mL, kolesterol + vitamin E grubunda 3.8 ± 1.0 µg/mL, vitamin E grubunda 3.8 ± 1.3 µg/mL olarak belirlendi. Dördüncü hafta sonunda kontrol grubunda serum vitamin E düzeyi ortalaması 3.6 ± 1.6 µg/mL kolesterol grubunda 26.3 ± 8.5 µg/mL kolesterol + vitamin E alan grupta 45.1 ± 12.2 µg/mL, vitamin E alan grupta 6.1 ± 3.3 µg/mL olarak ölçüldü (Tablo 6.2). Tavşanlara 4 hafta süre ile 50 mg/kg/gün vitamin E verilmesi ile vitamin E düzeyi başlangıç değerine göre yaklaşık 12 kat arttığı gözlemlendi. Dördüncü hafta kontrol grubu ile kolesterol grubu ve kolesterol + vitamin E grubu kıyaslandığında kolesterol + vitamin E grubundaki serum vitamin E düzeylerinin artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$).

Tablo 6.2: Dört hafta süre ile vitamin E'den fakir yem ile beslenen tavşanlara kolesterol ve vitamin E verilmesinin serum vitamin E düzeyine etkisi

GRUPLAR	Serum vitamin E düzeyleri (µg/mL)	
	0. hafta	4. hafta
Kontrol	5.1 ± 2.1	3.6 ± 1.6
Kolesterol	3.8 ± 0.7	$26.3 \pm 8.5^{*†}$
Kolesterol + Vitamin E	3.8 ± 1.0	$45.1 \pm 12.2^{*†}$
Vitamin E	3.8 ± 1.3	6.1 ± 3.3

0. hafta ile kıyaslandığında, $*p < 0.05$; 4. hafta kontrol grubu, kolesterol ve kolesterol + vitamin E grubu kıyaslandığında $^{\dagger}p < 0.05$, ortalama $\pm$ standart sapma, (n=8)

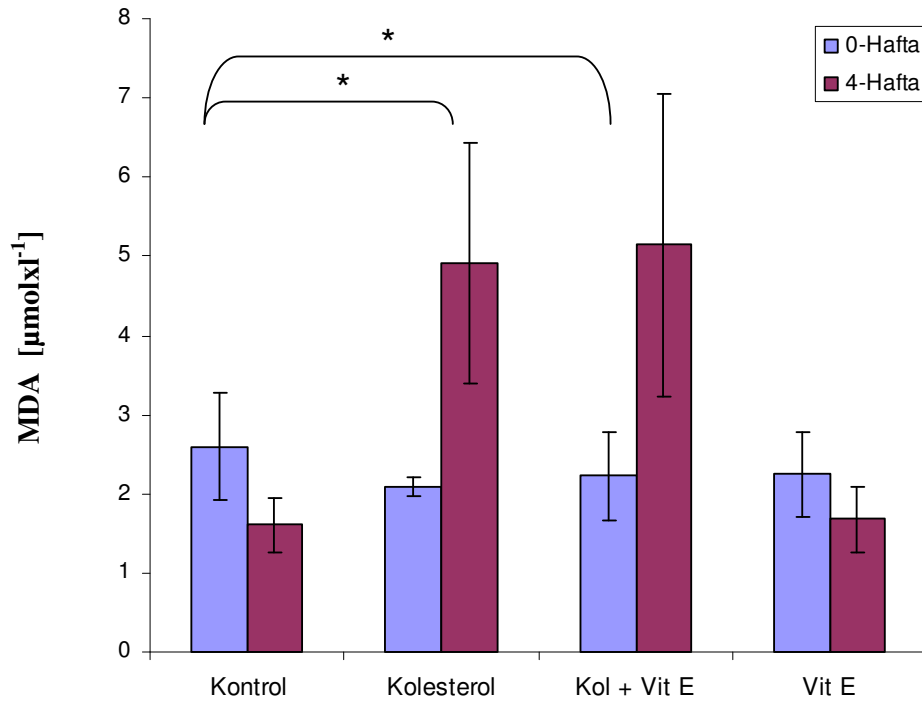
Tablo 6.3. Serum Vitamin E/Kolesterol Oranları

GRUPLAR	Kolesterol (mmol/l)	Vitamin E (μmol/l)	Vitamin E / Kolesterol Oranları
Kontrol	1.5 $\pm$ 0.7	8.3 $\pm$ 3.7	5.5
Kolesterol	76.7 $\pm$ 35	61 $\pm$ 19.7*	0.7
Kolesterol+ Vitamin E	68.9 $\pm$ 24.5	104.6 $\pm$ 28.3*	1.51
Vitamin E	1.3 $\pm$ 0.01	14.1 $\pm$ 7.6	10.8

Serum vitamin E konsantrasyonları kolesterolle beslenen tavşanlarda yüksek bulunmuştur ancak serum kolesterol değerlerine göre düzeltilmiş değerler benzer ondalık aralık içerisinde. $p^* < 0.01$

6.4. Serum MDA (Malondialdehit) Düzeyleri

0. hafta kontrol grubundaki tavşanların serum MDA düzeyi ortalaması 2.6 ± 0.7 $\mu\text{mol/L}$, kolesterol grubunda 2.7 ± 0.1 $\mu\text{mol/L}$, kolesterol + vitamin E grubunda 2.7 ± 0.6 $\mu\text{mol/L}$, vitamin E grubunda 2.7 ± 0.5 $\mu\text{mol/L}$ olarak belirlendi. Dördüncü hafta sonunda kontrol grubunda serum MDA düzeyi ortalaması 1.6 ± 0.3 $\mu\text{mol/L}$ kolesterol grubunda 4.9 ± 1.5 $\mu\text{mol/L}$, kolesterol + vitamin E alan grupta 5.1 ± 1.9 $\mu\text{mol/L}$, vitamin E alan grupta 1.7 ± 0.4 $\mu\text{mol/L}$ olarak ölçüldü. Dördüncü hafta kontrol grubu ile kolesterol grubu ve kolesterol + vitamin E grubu kıyaslandığında serum MDA düzeylerinin artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 6.5) ($p < 0.001$).



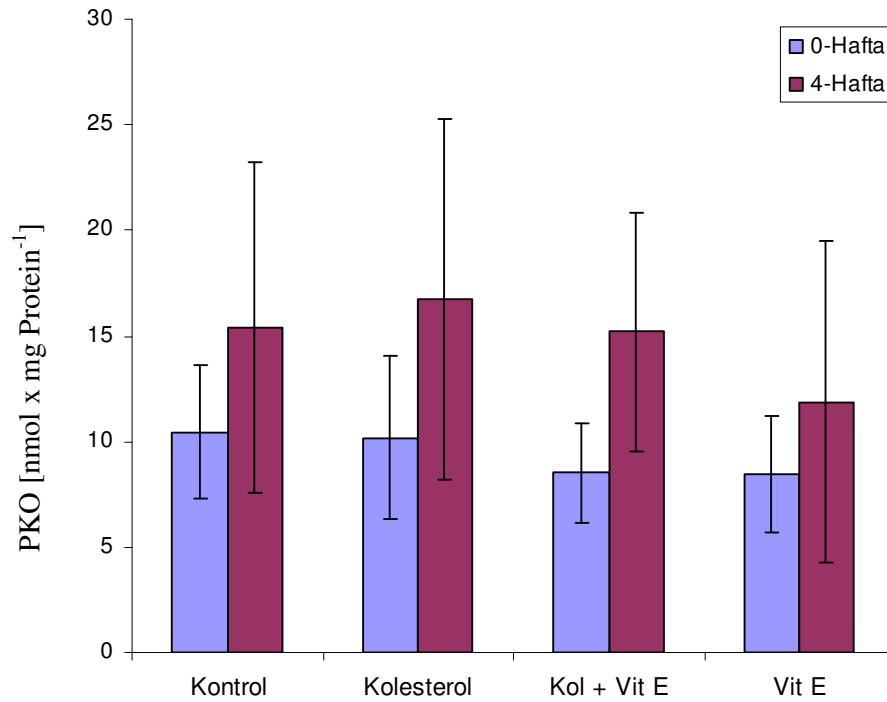
Şekil 6.5. Deney gruplarının başlangıç ve 4. hafta sonundaki MDA değerleri.

4. hafta kontrol grubu, kolesterol ve kolesterol + vitamin E grubu ile kıyaslandığında,

(* $p < 0.001$), ortalama $\pm$ standart sapma, ($n=8$)

6.5. Serum Protein Karbonilasyonu (PKO) Düzeyleri

Kontrol, kolesterol, kolesterol + vitamin E ve vitamin E gruplarındaki tavşanların 0. haftada serum PKO düzeyleri sırasıyla 10.4 ± 3.2 , 10.2 ± 3.9 , 8.5 ± 2.3 , 8.5 ± 2.7 nmol/mg olarak belirlendi. Dördüncü hafta sonunda tavşanların serum PKO düzeyleri, kontrol grubunda 15.4 ± 7.8 , kolesterol grubunda 16.7 ± 8.5 , kolesterol + vitamin E grubunda 15.2 ± 5.7 , vitamin E grubunda 11.9 ± 7.6 nmol/mg olarak bulundu (Şekil 6.6). Dördüncü hafta sonunda kontrol grubu ile kolesterol grubu ve kolesterol + vitamin E grubu kıyaslandığında serum PKO düzeylerinin artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı.

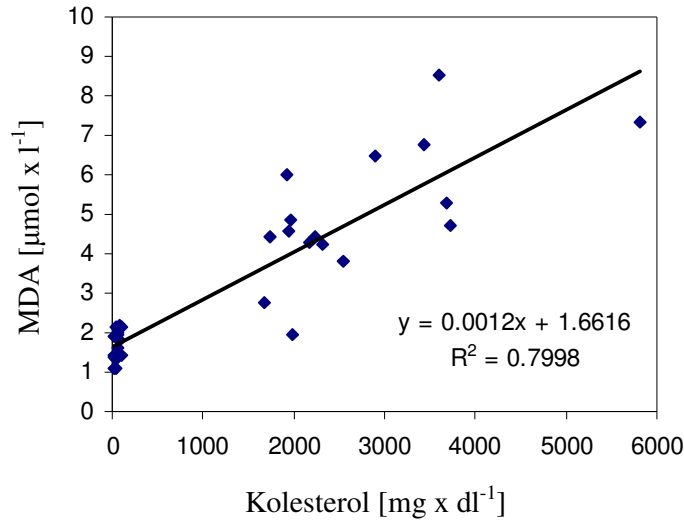


Şekil 6.6. Deney gruplarının başlangıç ve 4. hafta sonundaki protein karbonilasyonu (PKO) değerleri.

Ortalama $\pm$ Standart Sapma, (n=8)

6.6. Serum MDA ve Kolesterol Düzeyleri Arasındaki İlişki

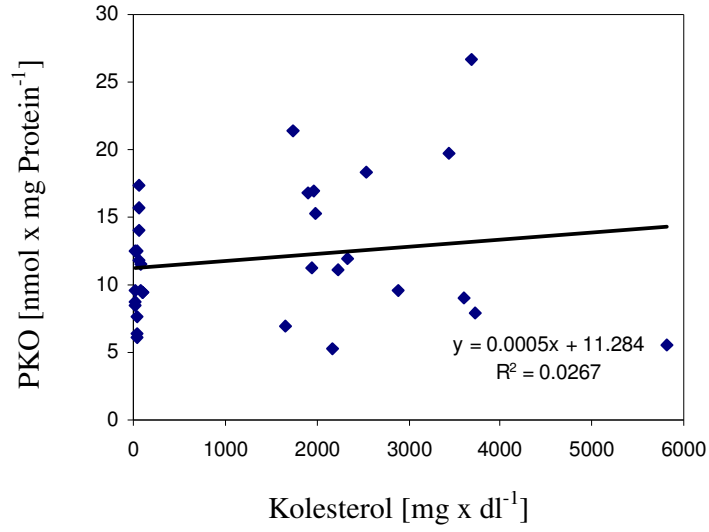
Bütün gruplardaki tavşanların dört haftalık deney sonundaki serum kolesterol düzeyleri ile lipid peroksidasyon ürünü MDA düzeyleri karşılaştırıldığında bu parametreler arasında güçlü ve istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir korelasyon olduğu görülmektedir ($r=0.75$ $p<0.001$).



Şekil 6. 7. Tavşanların dört haftalık deney süresi sonundaki serum MDA düzeyleri ve serum kolesterol düzeyleri arasındaki korelasyon.

6.7. Serum Protein Karbonilasyonu ve Kolesterol Düzeyleri Arasındaki İlişki

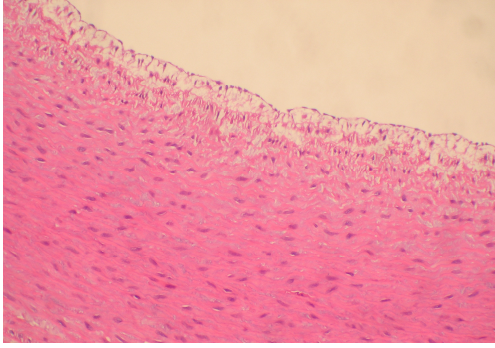
Bütün gruplardaki tavşanların dört haftalık deney sonundaki serum kolesterol düzeyleri ile protein karbonilasyon düzeyleri arasında önemli bir korelasyon bulunamamıştır (Şekil 6.8).



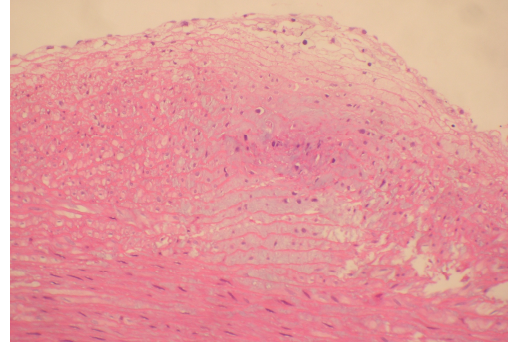
Şekil 6.8. Tavşanların dört haftalık deney süresi sonundaki serum protein karbonilasyonu (PKO) düzeyleri ve serum kolesterol düzeyleri arasındaki korelasyon.

6.8. Aortanın Işıık Mikroskobu ile İncelenmesi

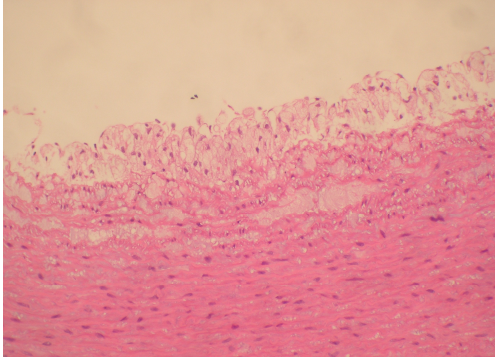
Kontrol grubundaki tavşanların aorta örneklerinde bütünlüğün bozulmamış endotel tabakası ve internal elastik lamina, normal bir intima ve media tabakasına sahip olan damar kesitleri görüldü (Resim 6.1 A). Kolesterolde zengin yem ile beslenen grupta endotel tabakasının bütünlüğünün bozulduğu ve intimada hücre tabakasında belirgin bir kalınlaşma olduğu gözlemlendi. İntimadaki hücrelerin sitoplazmalarında lipit vakuollerinin birikerek köpük hücreleri oluşturduğu, bazı alanlarda tüm sitoplazmanın bu vakuoller ile kaplandığı gözlemlendi. Elastik liflerin bozulmuş olduğu ve düz kas hücreleri arasında yer yer lipit damlacıklarının bulunduğu ayrıca media tabakasında mukopolisakkarit artışının olduğu gözlemlendi (Resim 6.1 B). Kolesterol+vitamin E verilen grupta, kolesterol grubuna kıyasla damar yapısında intimal kalınlaşmanın olmadığı veya minimal olduğu, intima veya mediada köpük hücrelerin çok düşük seviyede görüldüğü, media tabakasında elastik liflerin yapısının ise normal olduğu gözlemlendi (Resim 6.1 C). Vitamin E alan gruptaki tavşanların aorta örnekleri kontrol grubuyla benzerlik göstermektedir (Resim 6.1 D).



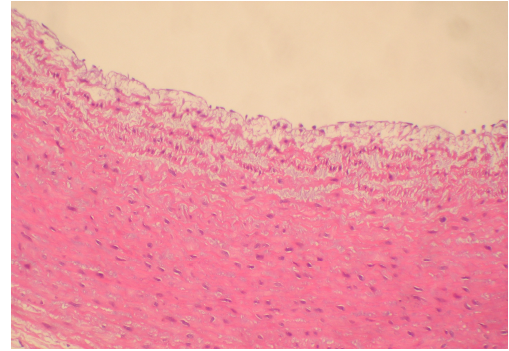
Resim 1 A



Resim 1 B



Resim 1 C



Resim 1 D

Resim 6.1. Her deney grubunu temsil eden bir tavşanın aortasının ışık mikroskopi fotoğrafları. A) Kontrol grubu (x20), B) Kolesterol grubu (x20), C) Kolesterol + vitamin E grubu (x20), D) Vitamin E grubu (x20)

6.9. Aortaların Sudan IV Boyanması ve Aterosklerotik İndeksin Hesaplanması

Resim 6.2’de her bir grubu temsil eden tavşan aortalarının Sudan IV ile boyanmış fotoğrafları görülmektedir. Bu fotoğraflardan aterosklerotik indeks hesaplanmış ve sonuçlar grafik halinde gösterilmiştir (Şekil 6.9). Bu analizden elde edilen sonuçlarda, % 2 kolesterol ile beslenen tavşan aorta yüzeyinin % 28’inde, kolesterol + vitamin E alan grubun %13’ünde lezyon bulunduğu belirlenmiştir. Kolesterol + vitamin E grubu kolesterol grubu ile kıyaslandığında, aterosklerotik lezyon gelişiminin yaklaşık olarak % 50 oranında azaldığı tespit edilmiştir.

A



B



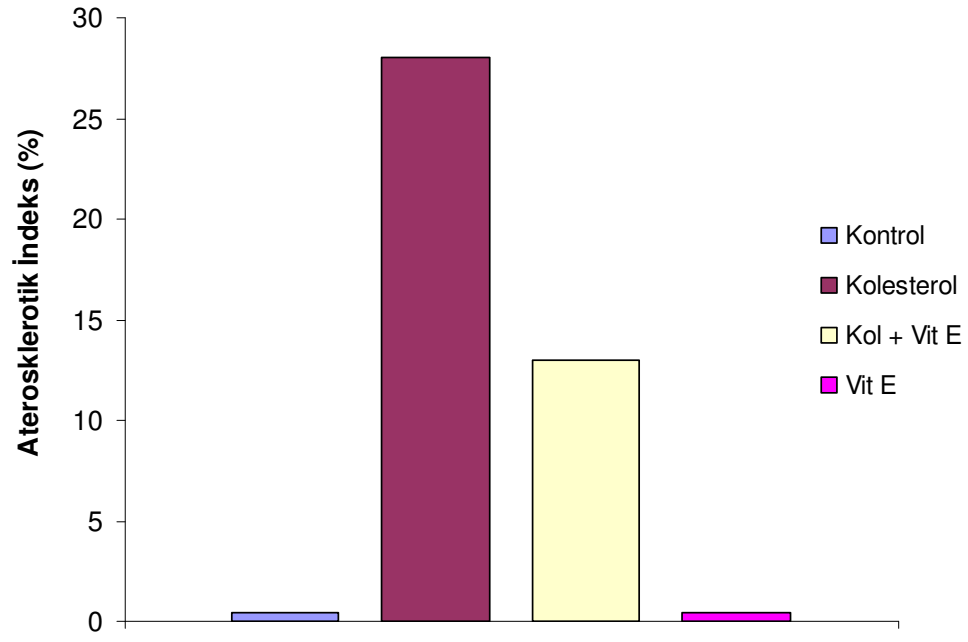
C



D



Resim 6.2. Sudan IV ile boyanmış tavşan aortalarının fotoğraflarında kırmızı ile boyanan bölgeler intimal lipit birikimini göstermektedir. A) Kontrol grubu, B) Kolesterol grubu, C) Kolesterol + vitamin E grubu, D) Vitamin E grubu



Şekil 6.9. Aterosklerotik indeks (% olarak)

6.10. Tavşan Beyninin 4 Farklı Bölgesinde Ölçülen Protein Karbonilasyonunu

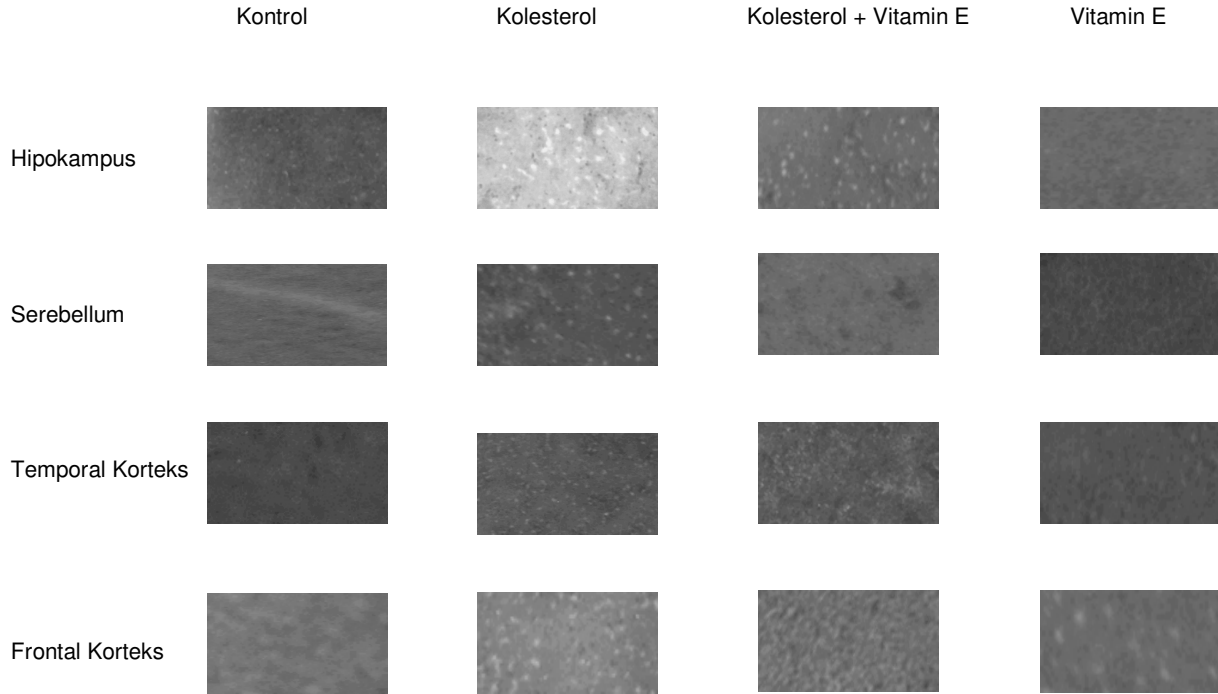
Beyin doku homojenatında protein karbonilasyonu oluşumu dot blot yöntemi ile incelendi. Dört hafta sonunda tavşanların beyin dokusunun dört farklı bölgesindeki protein karbonilasyonu kontrol grubuyla kıyaslandığında kolesterol, kolesterol + vitamin E ve vitamin E grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmedi (Tablo 6.4).

Tablo 6.4. Tavşan beyninin 4 farklı bölgesinde ölçülen protein karbonilasyonu (PKO) değerleri (n=8)

	PKO (mgxml ⁻¹)			
	Kontrol	Kolesterol	Kolesterol + Vitamin E	Vitamin E
Hipokampus	61.6 ± 72.2	40.2 ± 40.9	51.3 ± 37.6	12.7 ± 5.1
Serebellum	65.2 ± 65.7	85.8 ± 57.6	114.6 ± 39.5	75 ± 38.3
Temporal Korteks	88.5 ± 32.1	79.5 ± 19.1	76 ± 27.6	56.8 ± 23.4
Frontal Korteks	91.2 ± 26.2	95.2 ± 13.0	103.7± 10.6	91.6 ± 19.2

6.11. Protein Karbonilasyonunun İmmünohistokimya ile Değerlendirilmesi

Beynin 4 farklı bölgesinden alınan dondurulmuş örneklerden kriostat ile 10 µm kalınlığında kesitler alındı ve immünohistokimya yöntemi kullanılarak protein karbonilasyonu floresans mikroskop ile analiz edildi (Resim 6.3). Kontrol grubunda hipokampus, serebellum, temporal ve frontal korteks bölgelerinde protein karbonilasyonu immünreaktivitesi gözlenmemiştir. Kolesterolde zengin yem ile beslenen grupta ise beyin dokusunun 4 farklı bölgesinde özellikle hipokampus bölgesinde artmış protein karbonilasyonu tespit edildi. Kolesterol+Vitamin E verilen grupta, hipokampus, serebellum, temporal ve frontal kortekste protein karbonilasyonunda azalma tespit edildi. Vitamin E alan grupta ise bu bölgeler kontrol grubuyla benzer olarak gözlemlendi.



Resim 6.3. Her deney grubunu temsil eden tavşan beyin dokusunun 4 farklı bölgesinin protein karbonilasyonu immünohistokimya fotoğrafları.

6.12. Tavşan Beyni 4 Farklı Bölgesinde Proteozom Proteini, Proteozom Aktivitesi

Beyin dokusu homojenatında proteozom proteini miktarı dot blot yöntemi ile tespit edildi. Proteozom aktivitesi, homojenatın fluorojenik proteozom substrat suc-leu-leu-val-tyr-methylcoumaryl amide (suc-LLVY- MCA) ile inkübe edilmesinden sonra fluoroscanda ölçülmesi ile tespit edildi. Dört hafta sonunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında proteozom proteini miktarı ve aktivitesinde kolesterol, kolesterol + vitamin E ve vitamin E grupları arasında değişme gözlenmedi (Tablo 6.5 ve Tablo 6.6).

Tablo 6.5. Tavşan beyin dokusunun 4 farklı bölgesinde ölçülen proteozom protein miktarları

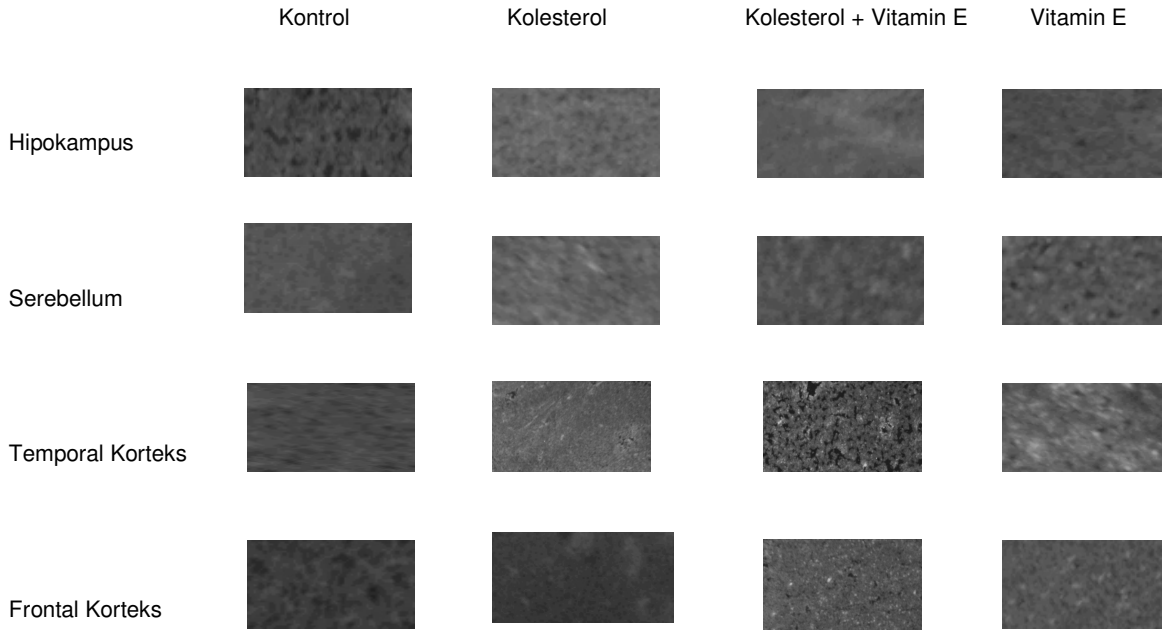
Proteozom Miktarı (mg x ml ⁻¹)				
	Kontrol	Kolesterol	Kolesterol + Vitamin E	Vitamin E
Hipokampus	53.8 ± 40.6	53.2 ± 22.0	75.5 ± 23.7	34.1 ± 17.0
Serebellum	57.3 ± 32.4	46.3 ± 26.2	60 ± 19.3	23.1 ± 7.9
Temporal Korteks	118.2 ± 22.6	112.2 ± 18.9	114 ± 13.4	62.3 ± 12.3
Frontal Korteks	115.3 ± 35.0	111 ± 29.0	128.8 ± 28.1	94.2 ± 11.0

Tablo 6.6. Tavşan beyin dokusunun 4 farklı bölgesinde ölçülen proteozom aktivitesi

Proteozom Aktivitesi [pmol x(mg x min) ⁻¹]				
	Kontrol	Kolesterol	Kolesterol + Vitamin E	Vitamin E
Hipokampus	84 ± 42	79 ± 24	71 ± 12	78.7 ± 32
Serebellum	78 ± 18	65 ± 16	59 ± 12	81.2 ± 34
Temporal Korteks	123.7 ± 34	101.2 ± 21	102.5 ± 23	104 ± 41
Frontal Korteks	125 ± 47	103 ± 25	104 ± 34	110 ± 37

6.13. Proteozom Miktarının İmmünohistokimya ile Değerlendirilmesi

Tavşan beyin dokusunun 4 farklı bölgesinden cryostat ile 10 µm kalınlığında kesitler alındı ve immünohistokimya yöntemi kullanılarak proteozom miktarı floresans mikroskop ile analiz edildi. Kontrol, kolesterol, kolesterol vitamin E ve vitamin E gruplarında proteozom miktarında kontrol grubuyla kıyaslandığında proteozom miktarında bir değişiklik tespit edilmedi (Resim 6.4).



Resim 6.4. Her bir deney grubunu temsil eden tavşan beyin dokusunun 4 farklı bölgesinin proteozom miktarı ile ilgili immünohistokimya fotoğrafları.

6.14. Tavşan Beyninin Farklı Bölgelerinde Tau Proteini ve PHF-1 (Paired Helical Filaments) Miktarları

Beyin doku homojenatında tau proteini ve PHF-1 (paired helical filaments) oluşumu dot blot yöntemi ile incelendi. Dört hafta sonunda kontrol grubuyla kıyaslandığında kolesterol grubunda tau proteinin fosforilasyonunda değişiklik ve PHF-1 oluşumu tespit edilmedi. Kolesterol + vitamin E ve vitamin E gruplarında da kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişme gözlenmedi.

Tablo 6.7. Tavşan beyninin 4 farklı bölgesinde ölçülen tau proteini miktarları

Tau Protein Miktarı (mg x ml ⁻¹)				
	Kontrol	Kolesterol	Kolesterol + Vitamin E	Vitamin E
Hipokampus	112.7 ± 7.2	92.6 ± 11.9	79.8 ± 7.6	105.3 ± 5.4
Serebellum	108.2 ± 18.3	121.3 ± 19.2	119.1 ± 20.3	87.5 ± 56.1
Temporal Korteks	90.6 ± 16.8	99.3 ± 15.1	115.2 ± 15.8	92.5 ± 19.2
Frontal Korteks	87.5 ± 18.1	50 ± 12.3	47.5 ± 10.8	65.3 ± 9.7

Tablo 6.8. Tavşan beyninin 4 farklı bölgesinde ölçülen PHF-1 (paired helical filaments) sonuçları

PHF-1 Miktarı (mg x ml ⁻¹)				
	Kontrol	Kolesterol	Kolesterol + VitaminE	Vitamin E
Hipocampus	60.8 ± 22.9	56.6 ± 33.8	43.7 ± 22.2	55.8 ± 35.9
Serebellum	35.2 ± 19.9	47.2 ± 25.2	33.5 ± 15.6	34.5 ± 25.3
Temporal Korteks	111.1 ± 28.5	112.3 ± 30.1	88.2 ± 31.5	112.2 ± 22.3
Frontal Korteks	108 ± 28.9	104.3 ± 40.8	104.1 ± 30.1	108 ± 28.9

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Oksidatif stres hidrojen peroksit, nitrik oksit, süperoksit ve reaktif hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türlerinin kontrolsüz olarak üretilmesi sonucu oluşmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin pek çok genin ekspresyonunu ve sinyal ileti yollarını etkilediği bilinmektedir (118,119). Düşük konsantrasyonlardaki peroksidin endotel hücre kültürüne eklendiğinde PKC'nin aktivasyonu ile sonuçlandığı rapor edilmiştir (120). Mikromolar konsantrasyondaki hidrojen peroksidin de MAP kinazların fosforilasyonunu düzenlediği gösterilmiştir (121). Hücre yüzey reseptörlerini, akut faz proteinlerini, sitokinleri kodlayan genleri düzenleyen transkripsiyon faktör NF-κB (Nuclear factor kappa B) de reaktif oksijen türleri tarafından aktive edilmektedir (122).

Serbest radikaller aminoasit reziduelarının yan zincirlerini okside ederek, lipid peroksidasyon sırasında oluşan reaktif aldehytler (HNE, MDA, acrolein), glikasyon ve glikoksidasyon sonucu oluşan reaktif karbonil türevleri (ketoaminler, ketoaldehitler, deoksiozonlar) protein yapısına karbonil gruplarının katılmasına yol açarak proteinlerde hasara neden olabilmektedirler (55). Protein karbonil oluşumu protein oksidasyonunun belirlenmesinde önemli bir belirteçtir ve protein karbonillerinin birikimi Alzheimer hastalığı, diyabet, sepsis, kronik böbrek yetmezliği, ateroskleroz gibi pekçok hastalıkta yüksek seviyede tespit edilmiştir. Oksidatif olarak değişikliğe uğrayan ve fonksiyonunu kaybetmiş çapraz bağlar oluşturan proteinler ya proteozomal yıkıma yönlendirilirler ya da nörodejeneratif hastalıklarda görülen protein birikimlerini oluşturarak hücrel hasarlara neden olurlar. Alzheimer hastalarının beyinleri oksidatif stresin yoğun olarak görüldüğü hiperfosforile tau ve amyloid beta birikimleri ile karakterize edilen nörodejeneratif bir hastalıktır. Alzheimer hastalarının beyinlerinde hem plaklar hem de nöronlarda p38 MAPK aktivasyonun arttığı aynı zamanda protein nitrasyonu da tespit edilmiştir (123). Alzheimer hastalarında oksidatif stresin rolü üzerinde duran en önemli cevaplanmamış konular arasında hasarın bu şeklinin amiloidojenezin sonucu veya nedeni olup olmadığıdır. Son zamanlardaki kanıtlar her iki önerisinde fonksiyonel olduğu yönünde olup, oksidatif stresin başlangıç kaynağı olarak örneğin yüksek kolesterolün amiloid oluşumunu başlatabileceğini ve kendisinin Alzheimer hastalarında diğer bir güçlü oksidatif stress kaynağı olduğunu ileri sürmektedir. Kolesterolün ateroskleroza paralel olarak nöronlarda hasara neden olabileceği düşünülmektedir. Ateroskleroz patogenezinde en önemli etken olan yüksek kolesterol ve yüksek LDL-kolesterol

düzeylerinin ve özellikle lipit peroksidasyon ürünü olan oxLDL'nin pro-inflamatuar ve pro-aterosklerotik sinyal ileti mekanizmalarının aktivasyonu ile aterosklerozun başlangıcında ve ilerlemesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir (124,125).

Hiperkolesterolemiye inflamasyon cevapta vasküler düz kas hücreleri, endotel hücreleri, monositler ve nötrofilleri içeren pekçok hücre tarafından süperoksit üretilmektedir. Özellikle lökositler ve endotel hücreleri süperoksit üretimini NADPH-oksidaz enzimini aracılığı ile gerçekleştirir. Lökositlerin NADPH-oksidaz enziminden süperoksit üretimi aynı enzime sahip diğer hücrelerden çok daha fazladır. Endotel hücrelerde diğer potansiyel reaktif oksijen kaynakları NO sentaz ve araşidonik asit metabolizmasında rol oynayan lipoksijenaz ve COX enzimleridir (126).

Tavşanlarda yapılan çalışmalarda yüksek kolesterol içeren diyetin lipit peroksidasyon ürünü olan MDA ve lökositlerin oksijen serbest radikal üretme aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (45). MDA proteinlerin serbest amino grupları özellikle lizin (Lys) aminoasiti ile kombine olarak, MDA-modifiye proteinler oluşturmaktadır. MDA ve HNE ile bağlantılı Apolipoprotein B-100 Lys residueları yaygın olarak aterosklerotik lezyonlarda bulunması bu duruma daha da açıklık getirmektedir (52). Holvoet ve beraberindekiler (53) koroner arter hastalarında oxLDL ve MDA-modifiye LDL'nin plasma seviyelerini normal bireylerden önemli derecede yüksek olarak tespit etmişlerdir. MDA'nın Parkinson hastalarının ve Alzheimer hastalarının beyinlerinde ayrıca ALS (amyotrophic lateral sclerosis) hastalarının plazmalarında artmış olduğu rapor edilmiştir (54).

Çalışmamızda, kolesterol ile indüklenen aterosklerotik tavşan modelinde ateroskleroz gelişiminde beyinde meydana gelebilecek değişikliklerin araştırılması ve vitamin E'nin etkisinin karşılaştırılması planlanmıştır. Tavşanlarda % 2 kolesterol içeren yemin 4 hafta süre verilmesi ile ateroskleroz oluşturulmuştur. Kullanılan kolesterol miktarının ve sürenin tavşanlarda aterosklerotik lezyon oluşturabilmekte yeterli olduğu bizim çalışmalarımızda ve diğer çalışmalarda gösterilmiştir (92, 127, 128, 129, 45). Tavşan aortalarında aterosklerotik lezyon oluşumu göstermek amacıyla aortalar Sudan IV ile boyanmış ve aterosklerotik indeks hesaplanmıştır. Kolesterol ile beslenen tavşan aortasında % 28 oranında lezyon gelişimi olduğu gözlenmiştir. Vitamin E ile beslenmede, aterosklerotik lezyon gelişimini % 50 engellediği gözlenmiştir. Bu çalışmada yüksek kolesterol diyetle beslenmenin tavşan serum kolesterol düzeylerini 40 kat arttırdığı

oluşan hiperkolesteroleminin damarlara zarar verdiği, aterosklerotik lezyonlar oluşturduğu ve vitamin E'nin koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir. Serum vitamin E konsantrasyonları kolesterolle beslenen tavşanlarda yüksek bulunmuştur ancak serum kolesterol değerlerine göre düzeltilmiş değerler incelendiğinde Kolesterol+vitamin E alan grupta vitamin E artışı Kolesterol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bulunmuştur. Oksidatif stresin belirteci olarak serum lipid peroksidasyon seviyesinin ölçümü sonucunda yüksek kolesterol diyetle paralel olarak serum MDA düzeyinin önemli derecede arttığı da sonuçlarımızda tespit edilmiştir. Bu sonuçlar ile serumda hiperkolesterolemi ile oksidatif stres arasındaki pozitif ilişki literatür ile uyumlu olarak rapor edilmektedir (45, 52).

Protein karbonilasyonu (PKO) *in vivo* protein oksidasyonunun derecesini gösteren en genel belirteç olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Protein karbonilasyonu protein karbonil gruplarının 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) ile reaksiyonu sonucu oluşan stabil dinitrophenyl (DNP) hydrazone yapısının spektrofotometrik, ELISA ve “iki yönlü elektroforez” “two-dimensional electrophoresis (2D)” gibi yöntemler kullanılarak ölçülmesiyle belirlenmektedir. Karbonil grupları aminoasit yan zincirlerinin modifikasyonu sonucu olduğu için karbonillerin varlığı proteinlerde aminoasit oksidasyonunun direk göstergesi değildir. Bu nedenle son zamanlarda dokularda ve vücut sıvılarında protein karbonilasyonunun yapısının ve hangi aminoasitlerin hasara uğradığının belirlenmesi önem kazanmıştır (58). Karbonilasyon derecesinin belirlenmesi, total karbonil miktarının belirlenmesinden çok daha bilgi verici olduğu düşünülmektedir. Sonuç olarak düşük karbonil içeriğine sahip fakat yüksek miktarda bulunan proteinler immünooblotta baskın olarak görülürken düşük miktarda bulunan fakat yüksek spesifik karbonil içeriği bulunan proteinler ise tespit edilemeyebilmektedir. Örneğin albumin plazmada yüksek miktarda bulunan bir proteindir ve western blot yöntemi ile karbonil içeriği baskın olarak tespit edilmektedir ve spesifik karbonil içeriği genellikle ≤ 0.05 mol karbonil /mol proteindir. Diğer taraftan karbonik anhidraz III karaciğerde nispeten yüksek miktarda bulunurken aynı şekilde yaklaşık 0.4 mol karbonil/ mol protein gibi yüksek spesifik karbonil içeriğine de sahiptir (130). Yüksek miktarda bulunan proteinlerin karbonil içeriklerinin belirlenmesi için en uygun olarak immunopresipitasyonla saflaştırılması gerekmektedir. Çalışmamızda tavşan serum protein karbonilasyonu dinitrophenyl (DNP) hydrazone yapısının ELISA yöntemi ile belirlenmiştir. Kolesterolle beslenen gruptaki tavşanların serumlarında 4 hafta sonunda

protein karbonilasyonunun artmaya başladığı ancak kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmadığını belirledik. Buna neden olarak bir aylık süre içinde istatistiksel olarak anlamlı fark oluşmadığı çalışmanın süresinin uzatılması ile bu artış istatistiksel olarak anlamlı değerlere ulaşabileceği düşünülmektedir. Ayrıca literatürde önerildiği gibi 2D elektroforezle protein karbonilasyonunda hangi proteinlerin etkilendiğinin ve karbonilasyonun kaynağının belirlenmesi önemli bilgiler verebilir (58,59)

Conrad ve beraberindekiler (131) Alzheimer hastalarının plazmalarında okside protein seviyesinin kontrol gruplarından % 23 daha yüksek olduğunu tespit etmişler. Çalışmalarında spesifik protein oksidasyon seviyesini Western Blot yöntemi ile belirlemişlerdir. Alzheimer hastalarının plazmalarında 78-kDa'lık tek bir protein bantı tespit edilmiş ve bu bantın oksidasyon seviyesinin kontrol gruplarına kıyasla 2.5 kat daha fazla olduğu ve oksidasyondaki bu artışın ise spesifik olduğu rapor edilmiştir.

Smith ve beraberindekiler (117) Alzheimer hastalarının hipokampuslarında karbonil immünreaktivitesini anti-DNP antikor ile immünokimyasal yöntemle tespit etmişlerdir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında protein karbonillerinin özellikle NFT'da biriktiği gösterilmiştir. Aksenov ve beraberindekiler (59) Alzheimer hastalarının beyinlerinde immünhistokimya ve 2D elektroforez yöntemlerini kullanarak protein karbonilasyon oluşumlarını incelemişlerdir. Bu hastaların beyinlerinin en fazla etkilendiği bölgeler olan hipokampus ve temporal kortekslerinde protein karbonilasyonunun arttığı tespit edilmiştir. NFT'lar ile çevrili nöronlarda da yüksek düzeyde protein karbonilasyonu immünreaktivitesi gösterilmiştir. Kontrol gruplarında görülen protein karbonilasyonunun normal beyin yaşlanması ile oluşan okside proteinleri yansıtabileceğinden ve Alzheimer hastalarında spesifik karbonil seviyesini belirlemek için 2D elektroforez yöntemini kullanmışlardır. Çalışma sonunda β -Aktin'de spesifik protein karbonil seviyesinin şimdiye kadar Alzheimer hastalığında protein oksidasyonunun hedefi olarak tanımlanan sitozolik kreatin kinaz BB'dan daha yüksek bulunmuştur. β -Tubulin'in ise protein karbonil içeriğinde kontrolle karşılaştırıldığında önemli bir artış olmadığı rapor edilmiştir. Yüksek seviyede okside tubulin'in özgün proteinazlarla uzaklaştırılırken diğer bazı okside olmuş proteinlerin ise hücreden uzaklaştırılmasının yetersiz olması Alzheimer hastalarında bu proteinlerin birikimine neden olabileceği ileri sürülmektedir. Kentucky Üniversitesinde yapılan bir çalışmada

otopsi sonucunda Alzheimer hastalarının hipokampuslarında ve alt paryetal loblarında protein oksidasyon seviyesinde önemli bir artış gözlemlendiği ve bu bölgelerin A β plaklarınca da zengin olduğu rapor edilmiştir (132). Liu ve beraberindekiler (66) Alzheimer hastalarının hipokampuslarında NFT immünreaktivitesini göstermişlerdir. Keck ve beraberindekiler (83) de Alzheimer hastalarının hipokampuslarında tau hiperfosforilasyonunu ve PHF oluşumlarını immünblot yöntemi ile tespit etmişlerdir. Ghribi ve beraberindekiler (24) ise 7 ay süre ile % 1 kolesterolle besledikleri tavşanların hipokampuslarında immünohistokimya yöntemi ile A β benzeri plak oluşumunu, westernblot yöntemi ile de PHF'deki artışı tespit etmişlerdir. Çalışmalarında yüksek kolesterol diyetle uzun süre beslenmeyi takiben tavşanların hipokampuslarında BACE (β -sekretaz) aktivitesinin artışı sonucu A β birikiminin oluştuğu ve sonuç olarak artan A β seviyesinin ise ERK'ları aktive ederek aşırı tau fosforilasyonuna neden olduğu rapor edilmiştir.

Hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda, Sparks ve beraberindekiler (22) % 2 kolesterolle 12 hafta süre ile beslenen tavşanların hipokampuslarında A β konsantrasyonu ve endotel hücrelerin inflamasyonun arttığını rapor etmişlerdir. Bu çalışma ile tavşanlarda yükselen kan kolesterolü ile oluşan serbest radikallerin endotel hücrelerinin inflamasyonunu başlattığı ve kan beyin bariyerinin bozulmasına neden olduğu ileri sürülmektedir. Hamdheydari ve beraberindekiler (133) rat beyin endotel hücre kültürü ile yaptıkları çalışmalarında ox LDL ile muamele edildiğinde beyin endotel hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin artması ve membran akıcılığının azalmasının Alzheimer hastalığında serebrovasküler bozulmalara katkıda bulunduğunu rapor etmişlerdir. Ateroskleroz ve Alzheimer hastalığı arasında bağlantıya işaret eden kanıtlar her iki hastalıktada ortak mekanizmaların çalıştığını ileri sürmektedir (14, 23).

Çalışmamızda beyin 4 farklı bölgesinde temporal, frontal korteks, serebellum ve hipokampusta protein karbonilasyonu ölçümü immünofloresan ve dot blot yöntemleri ile tespit edilmiştir. İmmünohistokimya sonuçlarında, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kolesterolle beslenen grupta bu 4 farklı bölgede özellikle hipokampus bölgesinde protein karbonilasyonunda önemli bir artış tespit edilmiştir. Kolesterol+vitamin E alan grupta vitamin E'nin protein karbonilasyonunu azaltıcı etkisi serebellum, temporal ve frontal korteks bölgelerinde çok net görülürken protein karbonilasyonundan en fazla etkilenen bölge olan hipokampusta da protein karbonilasyonunun azaldığı görülmektedir. Dört

hafta süre ile yüksek kolesterolle beslemenin tavşan beyinde oksidatif stresin parametresi olan protein karbonilasyonunu arttırdığı literatürle uyumlu olarak gösterilmiştir (59,117). Protein karbonilasyonunun miktarı dot blot yöntemi ile de bu 4 farklı beyin bölgesinde ölçülmüştür. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilememiştir. Sonuçlardaki bu farklılığın yöntemin hassasiyeti ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Literatürde 1D ve 2D elektroforez yöntemlerinin hücre ekstraktı, doku ve plazma homojenatı gibi kompleks karışımlarda proteinlerin oksidatif durumu hakkında spektrofotometrik, slot blot immunoblotting veya ELISA'dan daha iyi bilgi sağlayacağı rapor edilmektedir. Çok sayıda farklı protein oksidasyon ürünü meydana geldiği için oksidatif stresin türünü belirlemek amacıyla en uygun yöntemi kurmak gerekmektedir. Örneğin diTyr düzeyi insan aort'unun aterosklerotik bölgelerinde, erken yağ çizgilerinin bulunduğu alanda normal aorta dokusundaki ile karşılaştırıldığında 11 kat fazla bulunduğu rapor edilmiştir (60). DiTyr'in gerçek miktarı her 3300 Tyr için 1 dir ve bu düzeylerdeki diTyr'in saptanması oldukça duyarlı bir kantitatif metot olan izotop dilüsyon gaz kromatografisi-kütle spektrofotometrisi ve HPLC ile mümkün olabilmektedir. Aynı beyin bölgelerinde tau hiperfosforilasyonu ve PHF oluşumu dot blot yöntemi ile bakılmıştır fakat gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gösterilememiştir. Bu sonuçlarla hiperkolesteroleminin 4 haftalık süre sonunda beyinde protein karbonilasyonunu başlattığı ancak tau hiperfosforilasyonunu oluşturacak düzeye ulaşmadığı sonucuna varılmaktadır.

Oksidatif modifikasyona uğramış proteinler ya düşük molekül ağırlıklı ürünlere ayrılır yada çapraz bağlı yüksek molekül ağırlıklı ürünleri oluşturur. (53). Oksidatif olarak değişime uğramış proteinler hücresel ortamdan uzaklaştırılmazlarsa bu proteinler çapraz bağlar ve birikimler oluşturmaya yönelerek parçalanamayan protein yığılmalarına neden olurlar. Proteozomal sistem anormal, yanlış katlanmış ve okside olmuş proteinlerin yıkılmasından sorumludur. Hücre kültürü çalışmalarında yaşlanma süresince proteozom aktivitesinde azalma meydana geldiği aynı şekilde yaşlanmış hayvanların da dokularında proteozom aktivitesinde azalma görüldüğü rapor edilmiştir (77, 76). Alzheimer hastalarının beyinlerinde de proteozom aktivitesinde azalma kaydedilmiştir (81, 82),

Grune ve beraberindekiler (134) postmitotik fibroblast hücrelerde yaptıkları çalışmalarında okside ve çapraz bağlar oluşturan protein yığılmalarının proteozomları

inhibe ettiğini ayrıca protein birikimlerinde ve çapraz bağ oluşumlarında daha ileri düzeyde artışa neden olduğunu rapor etmişlerdir. Gregori ve beraberindekiler(135) Aβ'nın 20S proteozoma bağlanarak proteozom-Aβ kompleksi oluşturduğunu ve proteozom aktivitesini inhibe ettiğini göstermişlerdir. Aβ ile proteozom aktivitesinin azalmasının proteinin kendi spesifik etkisinden çok birikmiş protein yapılarından sonuçlandığı rapor edilmiştir (80). Daha önceki çalışmalarda (136) fizyolojik olduğu düşünülen konsantrasyonda bile PHF-tau'nun proteozom fonksiyonunu azaltma etkisi gösterdiği belirtilmiştir. Keck ve beraberindekiler (83) Alzheimer hastalarında yaptıkları çalışmalarında proteozom aktivitesindeki azalmanın proteozoma bağlı PHF-tau artışı ile gerçekleştiğini göstermişlerdir. Oksidatif stres koşullarında oluşan HNE gibi lipid peroksidasyon ürünlerinin proteozom aktivitesinin güçlü inhibitörleri olduğu gösterilmiştir (137). Bu çalışmalarda HNE'in kovalent olarak çapraz bağlı proteinler oluşturma kapasitesinden dolayı proteozom katalitik bölgesine protein substratlarının girmesini engelleyen protein birikimleri oluşturarak proteozom aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Oksidatif stresin yüksek seviyelerinin tersine orta düzeyde oksidatif hasarla karşılaşmanın proteozom aktivitesini düzenlediği gösterilmiştir. Proteozom aktivitesindeki bu artışın nasıl olduğu net olmamakla birlikte 20S proteozom kompleksteki konformasyonel değişimle gerçekleşebileceği üzerinde durulmaktadır. Heat shock proteinlerin (HSP) de oksidatif stresin düşük seviyelerini takiben proteozom aktivitesinin düzenlenmesinde ve devamında rol oynayabileceği düşünülmektedir (138).

Ding ve beraberindekiler (138) primer rat kortikal nöronlarda H₂O₂ ile oluşturulan oksidatif stres sonucunda zamana ve doza bağlı olarak protein oksidasyonunun arttığını düşük seviyedeki oksidatif stresin proteozom alt birimlerinin ekspresyonunu arttırdığını toksik dozda ise proteozom aktivitesinin inhibe olduğunu göstermişlerdir. Sitte ve beraberindekiler (77) post mitotik hücrelerde postglutamil peptidaz aktivitesinin öncelikli olarak azaldığını, mitotik hücrelerde ise proteozomun tripsin ve kimotripsin benzeri aktivitelerinin kaybının gerçekleştiğini göstermişlerdir. *In vitro* çalışmalara benzer olarak Conconi ve beraberindekiler (139) yaşlanmış sıçanların karaciğerlerinde proteozomal postglutamil peptidaz aktivitesinin % 50 azaldığını tripsin ve kimotripsin benzeri aktivitelerde önemli bir farklılık gözlenmediğini belirlemişlerdir.

Bu çalışmada hiperkolesterolemi ile oluşturulan oksidatif stresin 4 hafta süre sonunda beyinde kimotripsin benzeri proteozom aktivitesinde gruplar arasında

istatistiksel olarak anlamlı bir değişime neden olmadığı gösterilmiştir. Bu sonuç dot blot ile beyinde yapılan PKO ölçümleri ile uyum göstermiştir. Literatürle uyumlu olarak beyinde oksidatif stresin belirteci olan protein karbonilasyonunun başlaması ve artması, buna paralel olan proteozom aktivitesinin azalmasının 4 hafta içinde bir değişim göstermediği sonucuna varılmaktadır.

Oksidatif stres çeşitli nörodejeneratif hastalıkların patolojisinde rol oynamaktadır ve pekçok epidemiyolojik, klinik ve hücre kültürü çalışmaları vitamin E'nin bu hastalıklarda koruyucu etkisi üzerinde durmaktadır. Vitamin E'nin PKC ve PI3K yer aldığı iki önemli sinyal ileti yolağını ve bu kinazlara etkilerinden dolayı birçok genin ekspresyonunu düzenlediği bilinmektedir. Bu kinazların aktivitesindeki değişiklikler, hücre proliferasyonu, platelet yığılmaları, hücre adhezyon ve ekstraselüler matriks moleküllerinin ekspresyonu ve NADPH-oksidaz aktivasyonu ile ilişkilidir (89).

Artan oksidatif stresin Alzheimer hastalarının beyinlerinde ve serebrospinal sıvılarında (CSF) vitamin E seviyesinin düşmesi ile bağlantılı olduğunu destekleyen çalışmalar bulunmaktadır. Tohgi ve beraberindekiler (140) Alzheimer hastalarının CSF'da α - tokoferol seviyesinin % 46 azaldığını rapor etmişlerdir. Orta şiddette algılama kaybı görülen 341 Alzheimer hastalarında 2 yıl süre ile placebo kontrollü olarak yapılan bir çalışmada α -tokoferol (200 IU/ gün) alan hastalarda hastalığın ilerlemesinin yavaşladığı rapor edilmiştir (98). Son yıllarda yapılan çalışmalarda vitamin E ve vitamin C'nin birlikte kullanımının ileri yaştaki popülasyonda Alzheimer hastalığının insidansını düşürdüğü gösterilmiştir (99). Kontush ve beraberindekiler (100) 1 ay süre ile Alzheimer hastalarına vitamin E (400 IU/gün) ile beraber vitamin C (1000 mg) verdiklerinde her iki vitamininde CSF ve plasmada yükseldiğini ve aynı zamanda CSF ve plasma lipoproteinlerinin oksidasyonunun önemli derecede azaldığını rapor etmişlerdir. Bourdel ve beraberindekiler (50) Alzheimer hastalarında plasma lipit peroksidasyon ürünü MDA konsantrasyonunu kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu ve plasma α -tokoferol konsantrasyonunun ise daha düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Hiperkolesterolemi ile ateroskleroz oluşturulan tavşan modelinde de yüksek kolesterol alan grupta kan ve aortik dokuda MDA seviyesi ve lökositlerin oksijen serbest radikal üretme aktivitesi yüksek bulunmuş, vitamin E alan grupta ise MDA seviyesinde azalma görülmüştür (45).

Mikroglia hücre kültüründe vitamin E'nin proinflamatuvar sitokinlerin miktarını ve özellikle ROS üretimini düşürdüğü gösterilmiştir (105). Vitamin E tarafından ROS

üretimini azalması daha önce makrofajlarda PKC'nin inhibisyonu ile bağlantılı olarak gösterilmiştir. α -Tokoferolün PKC aktivitesini inhibe ederek NADPH-oksidadz fonksiyonu için önemli olan, $p47^{phox}$ fosforilasyonunu ve translokasyonunu önlediği ve bunun sonucunda süperoksit oluşumu indirgendiği ve inflamatuvar sürecin baskılandığı gösterilmiştir (141). Egger ve beraberindekiler (106) murine BV-2 mikroglia hücre kültürü ile yaptıkları çalışmalarında α -tokoferolün makrofajlardaki benzer mekanizma ile PKC aktivitesinin inhibisyonu sonucu sitozolik $p67^{phox}$ 'un plazma membranına yerleşmesini engelleyerek O_2 üretimini azalttığını göstermişlerdir. Lipopolisakkarit (LPS) ile muamele ettikleri murine microglial hücre kültürü çalışmalarında α -tokoferolün PP2A aktivitesini arttırdığını ve sonuç olarak PKC/ $p38MAK$ kinase/ $NF\kappa B$ sinyal yolunun inhibisyonunu ile COX-2'nin transkripsiyonu ve protein sentezini inhibe ettiğini rapor etmişlerdir. Bu çalışmaları ile α -tokoferolün mikrogliaların immunolojik aktivasyonunu engelleyerek spesifik nöron koruyucu özellik gösterdiği ileri sürülmüştür.

Numakawa ve beraberindekiler (142) H_2O_2 ile kortikal nöron hücre kültüründe oluşturdukları oksidatif stresin α -tokoferol tarafından MAPK ve PI3K sinyal ileti yolağı aktive edilerek engellediği gösterilmiştir. Bu kinazların anti-apoptotik Bcl-2 ekspresyonunu arttırarak nöron koruyucu etki gösterdiği rapor edilmiştir.

Sung ve beraberindekiler (101) vitamin E'nin transgenik farelerde A β seviyesini ve amiloid plak oluşumunu önemli derecede düşürdüğünü ve beyin lipit peroksidasyonunu baskıladığını ancak vitamin E verilmesine geç dönemlerde, amiloid plak oluşumundan sonra başladığında ise beyinde oksidatif strese azalma görülmesine rağmen bu hayvanların amiloidotik fenotipleri üzerinde önemli bir etki göstermediği rapor edilmiştir. Rota ve beraberindekiler (102) gen chip teknolojisini kullanılarak sıçan hippocampusunda vitamin E eksik ve vitamin E içeren diyetle beslenen gruplarda gen ekspresyonu çalışmaları yapmışlardır. Çalışmanın sonuçlarında vitamin E tarafından regüle edilen hormon ve hormon metabolizması, sinir büyüme faktörleri, apoptoz, A β ve ileri glikozillenmiş son ürünlerin temizlenmesi ile bağlantılı olan önemli sayıda gen belirlendiği rapor edilmiştir. Koppal ve beraberindekiler (104) çalışmalarında neokortikal sinaptosomal membranların lipit kompozisyonu ve yapısı üzerine A β (25-35)'in oluşturduğu lipit hasarı ve vitamin E'nin koruyucu etkisini göstermişlerdir. Bu çalışmada A β ile artan oksidatif stres altında araşidonik asitin maksimum artış gösterdiği ve fosfolipaz A_2 (PLA $_2$)'nin etkisi ile serbest yağ asitlerinin arttığı gösterilmiştir. Vitamin E

verilen membranlarda PLA₂'nin inhibisyonu ile araşidonik asit ve serbest yağ asitlerinin önemli seviyede azaldığı tespit edilmiştir.

Yetişkin sıçanlardan alınan mikrogiallarda proteozomal aktivitenin belirgin bir şekilde azaldığı, bu mikrogiallara vitamin E verilmesinin ise proteozomal aktiviteyi önemli derecede arttırdığı rapor edilmiştir (105).

İnsan tau proteinini aşırı eksprese eden transgenik farelerde oluşan oksidatif hasarın ve vitamin E'nin rolünün incelendiği bir çalışmada vitamin E ile beslenen bu transgenik farelerde vitamin E'nin tau patoloji gelişimini geçiktirdiği ve baskıladığı gösterilmiştir (111). Bu sonuçlarla oksidatif hasarın aşırı eksprese edilen tau tarafından oluşturulan nörodejenerasyonda rol oynadığı ve uzun süre α -tokoferol alınımının bu nörodejenerasyon üzerine koruyucu etki gösterdiği ileri sürülmektedir.

Çalışmamızda yüksek kolesterolli diyetle oluşturulan aterosklerotik tavşan modelinde 4 hafta sonunda beyinde meydana gelen patolojik değişimler incelenmiştir. Dört hafta sonunda aterosklerotik model açısından tavşanların aortaları incelendiğinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kolesterol alan gruptaki tavşanların aortlarında aterosklerotik lezyonlar gösterilmiştir. Kolesterol ile birlikte vitamin E alan grupta bu aterosklerotik değişimlerin kolesterol grubuyla karşılaştırıldığında çok daha düşük olduğu ve vitamin E'nin koruyucu etkisi gösterilmiştir. Serumda yüksek kolesterolli diyet ile lipid peroksidasyon ürünü olan MDA'nın artışı arasında pozitif bir korelasyon bulunmuştur. Beyinde ise oksidatif stresin belirteçlerinden olan protein karbonilasyonu hipokampus, serebellum, temporal ve frontal korteks bölgelerinde incelenmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında kolesterol alan grupta bu 4 farklı bölgede özellikle Alzheimer hastalarında en fazla etkilenen bölge olan hipokampusta protein karbonilasyonunun arttığı tespit edilmiştir. Kolesterolle ilaveten vitamin E verilen grupta bu bölgelerde protein karbonilasyonunun vitamin E ile korunduğu gösterilmiştir.

Bu sonuçlar ile Alzheimer hastalığının patolojisinde tanımlanan protein karbonilasyonunun oksidatif hasarın belirteci olarak yüksek kolesterolli diyet ile dört haftalık süre sonunda beyin dokusunda tespit edilebildiği ve bu oksidatif hasarda vitamin E'nin koruyucu etkisinin olabileceği gösterilmiştir. Bu süreçteki moleküler mekanizmaların aydınlatılmasının beyinde oluşabilecek nörodejeneratif hasara karşı tanı ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde önemli bilgiler vereceği düşünülmektedir.

8. EKLER

EK-I Deney Hayvanları Etik Krulu Proje Onay Formu



MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
DENEY HAYVANLARI ARAŞTIRMA ETİK KURULU
PROJE ONAY FORMU

PROJENİN ADI : Hiperkolesterolemi ve Alzheimer arasındaki ilişkinin moleküler mekanizmasının ve vitamin E nin rolünün incelenmesi
PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ: Prof.Dr. Nesrin Kartal ÖZER
PROJEDEKİ ARAŞTIRICILAR : Nurgül AYTAN- Yeşim NEĞİŞ- Faruk TAMTÜRK
PROJENİN YÜRÜTÜLECEĞİ LABORATUVAR : M.Ü Tıp Fakültesi Biyokimya ABD
ONAY TARİHİ VE ONAY SAYISI : 09.03.2006-15.2006.mar

Sayın : : Prof.Dr. Nesrin Kartal ÖZER

Deney Hayvanları Araştırma Etik Kurulu'na "Hiperkolesterolemi ve Alzheimer arasındaki ilişkinin moleküler mekanizmasının ve vitamin E nin rolünün incelenmesi" isimli proje ile yapmış olduğunuz başvurunuz, "Deney Hayvanları Araştırma Etik Kurulu" tarafından incelenerek onaylanmıştır.

Çalışmalarınızda başarılar dileriz.

Doç.Dr. Zafer GÖREN
Deney Hayvanları Araştırma Etik Kurulu
Genel Sekreteri

Fikir Belirtenler

Prof. Dr. Özdemir AKTAN
Prof. Dr. Berrak YEĞEN
Doç. Dr. Zafer GÖREN
Öğr. Gör. Gürkan SERT
Vet.Hek. Dilek ÖZBEYLİ

Not: Deneylerin yapılması sırasında ortaya çıkan zorluklar, deney protokolünde yapılması gereken değişiklikler, "Deney Hayvanları Araştırma Etik Kurulu'na" bildirilmelidir. Bütün yazışmalarda, proje onay tarihi ve onay sayısı belirtilmelidir.

9. KAYNAKLAR

1. Puglielli L, Tanzi R. E., Kovacs D. M.: Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nature*, 6: 345-351, 2003
2. Blennow K., Leon M.J, Zetterberg H.: Alzheimer's disease, *Lancet* 368:387–403, 2006.
3. Hardy J., Selkoe D.J.: The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science*, 297: 353-356, 2002.
4. Evin G., Weidemann A.: Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease A β amyloid peptides. *Peptides*, 23 :1285–1297, 2002.
5. Vetrivel K.S., Thinakaran G., Amyloidogenic processing of β -amyloid precursor protein in intracellular compartments, *Neurology* 66: 69–73, 2006.
6. Vardy E. R.L.C., Catto A.J., Hooper N. M. : Proteolytic mechanisms in amyloid- β metabolism: therapeutic implications for Alzheimer's disease. *Trends in Molecular Medicine*, 11: 464-472, 2005.
7. Mattson M.P.: Pathways towards and away from Alzheimer's disease, *Nature* 430: 631-639, 2004.
8. Golde T.E., Younkin G.S.: Presenilins as therapeutic targets for the treatment of Alzheimer's disease. *Trends in Molecular Medicine*, 7:264- 269, 2001.
9. Wolozin B.: A fluid connection: Cholesterol and A β . *Proceeding of the National Academy of Science*, 98: 5371–5373, 2001.
10. Ehehalt R., Keller P., Haass C., Thiele C., Simons K.: Amyloidogenic processing of the Alzheimer β -amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *The Journal of Cell Biology*, 160: 113-123, 2003.
11. Cordy J.M., Hussain I., Dingwall C., Hooper N.M., Turner A.J. : Exclusively targeting β -secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition up-regulates β -site processing of the amyloid precursor protein. *Proceeding of the National Academy of Science*, 30: 11735-11740, 2003.
12. Wahrle S., P. Das, A.C. Nyborg, C. McLendon, M. Shoji, T. Kawarabayashi, L.H. Younkin, S.G. Younkin, and T.E. Golde. Cholesterol-dependent gamma-secretase activity in buoyant cholesterol- rich membrane microdomains. *Neurobiology of Disease*, 9:11–23, 2002.

13. Kojro E., G. Gimpl, S. Lammich, W. Marz , F. Fahrenholz.: Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alphaacretase ADAM 10. *Proceeding of the National Academy of Science*, 98:5815–5820, 2001.
14. Casserly I., Topol E.:Convergence of atherosclerosis and Alzheimer's disease: inflammation, cholesterol, and misfolded proteins. *Lancet*, 363: 1139–46, 2004.
15. Pappolla M.A.,Bryant-Thomas T.K., Herbert D., Pacheco J., Garcia M.F., Manjon M., Girones X., Henry T.L., Matsubara E. , Zambon D., Wolozin B., Sano M., Cruz-Sanchez F.F, L.J. Thal, S.S. Petanceska, and Refolo L.M.: Mild hypercholesterolemia is an early risk factor for the development of Alzheimer amyloid pathology. *Neurology*, 61:199–205, 2003.
16. Kivipelto M., Helkala E. L., Hanninen T.,Laakso M. P., Hallikainen M., Alhainen K., Soininen H.,Tuomilehto J., Nissinen A. : Midlife vascular risk factors and late-life mild cognitive impairment: a population-based study. *Neurology*, 56:1683– 1689, 2001.
17. Whitmer R.A., Sidney S., Selby J., Johnston S.C., Yaffe K.: Midlife cardiovascular risk factors and risk of dementia in late life. *Neurology*, 64:277– 281, 2005.
18. Sparks D.L., Hunsaker J.C., Scheff S.W.: Cortical senile plaques in coronary artery disease, aging, and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 11:601-607, 1990.
19. Mielke M.M., Zandi P.P., Sjögren M., Gustafson D., S. Östling, B. Steen, Skoog I.: High total cholesterol levels in late life associated with a reduced risk of dementia. *Neurology*, 64:1689-1695, 2005.
20. Li G., Shofer J. B. , Kukull W. A., Peskind E. R., Tsuang D. W., Breitner J.C.S., McCormick W., Bowen J. D., Teri L., G. D. Schellenberg and Larson E. B.: Serum cholesterol and risk of Alzheimer disease: A community-based cohort study. *Neurology*, 65:1045-1050, 2005.
21. Sparks D.L., Scheff S. W., Hunsaker J. C., Liu H., Landers T., Gross D.R.: Induction of Alzheimer-like beta-amyloid immunoreactivity in the brains with dietary cholestrol. *Experimental Neurology*, 126:88-94, 1994.

22. Sparks D.L., Kuo Y. M., Roher A., Martin T., Lukas R.J.: Alteration of Alzheimer's disease in the cholesterol-fed rabbit, including vascular inflammation. Preliminary observations. ANNALS of the New York Academy of Sciences, 903:335-344, 2000.
23. Refolo L. M., Malester B., LaFrancois J., Bryant-Thomas T., Wang R., Tint G. S., Sambamurti K., Duff K., Pappolla M. A.: Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. Neurobiology of Disease, 7:321–331, 2000.
24. Ghribi O., Larsen B., Schrag M., Herman M.M.: High cholesterol content in neurons increases BACE, β -amyloid, and phosphorylated tau levels in rabbit hippocampus. Experimental Neurology, 200:460-467, 2006.
25. Bodovitz S., Klein W.L.: Cholesterol modulates alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein. Journal of Biological Chemistry, 271:4436-4440, 1996.
26. Frears, E. R.; Stephens, D. J.; Walters, C. E.; Davis, H.; Austen, B. M. The role of cholesterol in the biosynthesis of beta amyloid. Neuroreport, 10:1699–1705; 1999.
27. Fassbender K., Simons M., Bergmann C., Stroick M., Lütjohann D., Keller P., H. Runz, S. Köhl, T. Bertsch, K. von Bergmann, M. Hennerici, K. Beyreuther, and Hartmann T.: Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta-amyloid peptides A β 42 and A β 40 *in vitro* and *in vivo*. Proceeding of the National Academy of Science, 98, 5856-5861, 2001.
28. Simons M., Keller P., De Strooper B., Beyreuther K., Dotti C.G., Simons K.: Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. Proceeding of the National Academy of Science, 95:6460-6464, 1998.
29. Zandi P.P., Sparks D.L., Khachaturian A.S., Tschanz J., Norton M., Steinberg M., Welsh-Bohmer K.A., Breitner J.C.: Do statins reduce risk of incident dementia and Alzheimer disease? The Cache County Study. Archives of General Psychiatry, 62:217-224, 2005.
30. Rea T.D., Breitner JC, Psaty BM, Fitzpatrick AL, Lopez OL, Newman AB, Hazzard WR, Zandi PP, Burke GL, Lyketsos CG, Bernick C, Kuller LH. Statin

- use and the risk of incident dementia: the Cardiovascular Health Study. *Archives of. Neurology*, 62:1047-51, 2005.
31. Huang Y.: Apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Neurology*, 66:79-85, 2006
 32. Poirier J.: Apolipoprotein E, cholesterol transport and synthesis in sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 26: 355–361,2005.
 33. Hofman A.: Atherosclerosis, apolipoprotein E and prevalence of dementia and Alzheimer disease in the Rotterdam study. *Lancet*, 349:151-154, 1997.
 34. Jarvik, G. P.; Wijsman, E. M. genotype, total cholesterol level, age, and sex in prediction of Alzheimer's disease: a case-control study. *Neurology* 45:1092–1096,1995.
 35. Bennett D.A., Wilson R.S., Schneider J.A., Evans D.A., Aggarwal N.T., S.E. Arnold, E.J. Cochran, E. Berry-Kravis, Bienias J.L.: Apolipoprotein E ϵ 4 allele, AD pathology, and the clinical expression of Alzheimer's disease. *Neurology*, 60:246–252, 2003.
 36. Bales K.R., Verina T., Dodel R.C., Du Y., Altstiel L., Bender M., Hyslop P., Johnstone E.M., Little S.P., Cummins D.J., Piccardo P., Ghetti B., Paul S.M.: Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid β - peptide deposition. *Nature*, 17: 263-264, 1997.
 37. Holtzman D.M., Bales K.R., Tenkova T., Fagan A.M., Parsadanian M., Sartorius L.J., Mackey B., Olney J., McKeel D., Wozniak D., Paul S.M.: Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 97:2892-2897, 2000.
 38. Ye S., Huang Y., Müllendorff K., Dong L., Giedt G., Meng E.C., Cohen F.E., Kuntz I.D., Weisgraber K.H., and Mahley R.W.: Apolipoprotein (apo) E4 enhances amyloid β peptide production in cultured neuronal cells: ApoE structure as a potential therapeutic target. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 102: 18700-18705, 2005.
 39. Chauhan V., Chauhan A.: Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Pathophysiology*, 13: 195–208, 2006.
 40. Markesbery W.R.: Oxidative Stress Hypothesis in Alzheimer's Diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, 23: 134–147, 1997.

41. Hensley K., Carney J.M, Mattson M.P, Aksenova M, Harris M, Wu J.F.: A model for β -amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 91:1270–4, 1994.
42. Butterfield, D.A.: Amyloid beta-peptide (1–42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. *Free Radical Research* 36, 1307–1313, 2002.
43. Varadarajan, S., Yatin S., Aksenova M., Butterfield D.A. : Alzheimer's amyloid β -peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity. *Journal of Structural Biology*,130:184–208, 2000.
44. Pappolla M. A., Smith M. A., Thomas T. B., Bazan N., Petanceska S., Perry G., Thal L. J., Sano M., Refolo L. M.: Cholesterol, Oxidative Stress, And Alzheimer's Disease. Expanding the Horizons of Pathogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 33:173–181, 2002.
45. Prasad K., Kalra J.: Oxygen free radicals and hypercholesterolemic atherosclerosis: Effect of vitamin E. *American Heart Journal*, 125:958-973, 1993.
46. Montine T.J, Neely M.D, Quinn J.F, Beal M.F, Markesbery W.R, Roberts L.J, Morrow J.D.: Lipid peroxidation in aging brain and Alzheimer's Disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 33: 620–626, 2002
47. Carini M., Aldini G., Facino R. M.: Mass Spectrometry for detection of 4-hydroxy-trans-2-nonenal (HNE) adducts with peptides and proteins. *Mass Spectrometry Reviews*, 23:281– 305, 2004.
48. Butterfield D.A.,Castegna A., Lauderback C. M., Drake J.: Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contributes to neuronal death. *Neurobiology of Aging*, 23:655–664, 2002.
49. Markesbery W.R., Lovell M.A.: 4-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, is increased in the brain in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 19, 33–36, 1998.
50. Bourdel M.I., Beauvieux M.D., Peuchant E., Harston S., Decamps A., Reignier B., Emeriau J., Rainfray M.: Antioxidant defences and oxidative stress markers in erythrocytes and plasma from normally nourished elderly Alzheimer patients. *Age and Ageing*, 30:235-241, 2001.

51. Butterfield D.A, Reed T., Perluigi M., De Marco C, Coccia R, Cini C, Sultana R.: Elevated protein-bound levels of the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal, in brain from persons with mild cognitive impairment. *Neuroscience Letters*, 397: 170-173, 2006.
52. Stocker R., Keaney J.F.: Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. *Physiological Reviews*, 84: 1381–1478, 2004.
53. Holvoet P., Vanhaecke J., Janssens S, Van de Werf F, Collen D.: Oxidized LDL and Malondialdehyde-Modified LDL in Patients With Acute Coronary Syndromes and Stable Coronary Artery Disease. *Circulation*, 98:1487-1494,1998.
54. Barnham K.J, Masters C.L, Bush A.I.: Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3:205-214 , 2004.
55. Stadtman E.R., Levine R.L.: Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, 25: 207-218, 2003.
56. Stadtman E.R., Levine R.L.: Protein Oxidation. *ANNALS of the New York Academy of Sciences*, 899: 191- 208, 2000.
57. Butterfield D. A, Drake J, Pocernich C., Castegna A.: Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid β -peptide. *TRENDS in Molecular Medicine*, 7:548-554, 2001.
58. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R.: Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*, 329:23-38, 2003.
59. Aksenov M.Y, Aksenova M.V, Butterfield D.A, Geddes J.W., Markesbery W.R, Protein oksidation in the brain in Alzheimer's Disease. *Neuroscience*, 103: 373-383, 2001.
60. Leeuwenburgh C, Rasmussen JE, Hsu FF, Mueller DM, Pennathur S, Heinecke JW. Mass spectrometric quantification of markers for protein oxidation by tyrosyl radical, copper, and hydroxyl radical in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic plaques. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 3520-3526,1997.
61. Castegna A., Thongboonkerd V., Klein J.B., Lynn B., Markesbery W.R., Butterfield D.A.: Proteomic identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain. *Jornal of Neurochemistry.*, 85:1394–1401, 2003.

62. Yuan J., Yanker B.A.: Apoptosis in the nervous system. *Nature*, 407: 802-809, 2000.
63. Yan, S.D., Chen X., Fu J., Chen M., Zhu H., Roher A., Slattery T., Zhao L., Nagashima M.: RAGE and amyloid- β peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature*, 382:685–691,1996.
64. Tamagno E, Parola M, Guglielmotto M, Santoro G, Bardini P, Marra L, Tabaton M., Danni O: Multiple Signaling events in amyloid β -induced, oxidative stress-dependent neuronal apoptosis , *Free Radical Biology and Medicine*, 35: 45–58, 2003.
65. Bartov O, Sultana R , Butterfield D.A, Atlas D.: Low molecular weight thiol amides attenuate MAPK activity and protect primary neurons from A β (1–42) toxicity. *Brain Research*, 1069: 198-206, 2006.
66. Liu Q, Smith M.A, Avila J, DeBernardis J, Kansal M, Takeda A, Zhu X, Nunomura A, Honda K, Moreira P, Olivera C.R, Santo M.S, Shimohama S.: Alzheimer-specific epitopes of tau represent lipid peroxidation-induced conformations, *Free Radical Biology and Medicine*, 38:746–754, 2005.
67. Johnson G. V. W., Stoothoff W. H.: Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *Journal of Cell Science*,117: 5721-5729, 2004.
68. Avila J., Lucas J.J., Perez M., Hernandez F.: Role of Tau Protein in Both Physiological and Pathological Conditions. *Physiological Review*, 84: 361–384, 2004.
69. Lee H., Perry G., Moreira P.I., Garrett M.R.,Liu Q., Zhu X.,Takeda A., Nunomura A., Smith M.A.: Tau phosphorylation in Alzheimer's disease: pathogen or protector?. *TRENDS in Molecular Medicine*, 11:164-169, 2005.
70. Rahmana A., Akterina S., Flores-Moralesb A., Crisbya M., Kivipeltoc M., Schultzberga M., Cedazo-Mingueza A.: High cholesterol diet induces tau hyperphosphorylation in apolipoprotein E deficient mice. *FEBS Letters*, 579:6411–6416, 2005.
71. Liu T., Perry G., Chan H.W., Verdile G.,Martins R.N., Smith M.A., Atwood Craig S.: Amyloid- β -induced toxicity of primary neurons is dependent upon differentiation-associated increases in tau and cyclin-dependent kinase 5 expression. *Journal of Neurochemistry*, 88: 554–563, 2004.

72. Busciglio J., Lorenzo A., Yeh J., Yankner B. A.: β -Amyloid Fibrils Induce Tau Phosphorylation and Loss of Microtubule Binding. *Neuron*, 14: 879-888, 1995.
73. Gotz J., Chen F., Dorpe J., Nitsch R.M.: Formation of neurofibrillary tangles in P3011 tau transgenic mice induced by A β 42 fibrils. *Science*, 293:1491-1495, 2001.
74. Glickman M.H., Ciechanover A.: The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction. *Physiological Reviews*, 82: 373-428, 2002.
75. Ciechanover A., Brundin P.: The Ubiquitin Proteasome System in Review Neurodegenerative Diseases: Sometimes the Chicken, Sometimes the Egg. *Neuron*, 40:427-446, 2003.
76. Keller J.N., Gee J., Ding Q.: The proteasome in brain aging. *Ageing Research Reviews*, 1:279-293, 2002.
77. Sitte N., Merker K., von Zglinicki T., Davies K. J. and Grune T.: Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part II – aging of nondividing cells. *FASEB Journal*, 14:2503-2510, 2000.
78. Grune T., Reinheckel T., Davies K. J.: Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB Journal*, 11:526-534, 1997.
79. Grune T., Davies K.J.A.: The proteasomal system and HNE-modified proteins. *Molecular Aspects of Medicine*, 24:195-204, 2003.
80. Shringarpure R., Grune T., Sitte N., K. J. A. Davies J.A.: 4-Hydroxynonenal-modified amyloid- β peptide inhibits the proteasome: possible importance in Alzheimer's disease. *Cellular and Molecular Life Science*, 57:1802-1809, 2000.
81. Keller J.N., Hanni K.B., Markesbery W.R.: Impaired Proteasome Function in Alzheimer's Disease. *Journal of Neurochemistry*, 75: 436-439, 2000.
82. Lopez-Salon, M., Morelli, L., Castano, E.M., Soto, E.F., Pasquini, J.M.: Defective ubiquitination of cerebral proteins in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience Research*, 62:302-310, 2000.
83. Keck S., Nitsch R., Grune T., Ullrich O.: Proteasome inhibition by paired helical filament-tau in brains of patients with Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 85:115-122, 2003.

84. Wang X., Quinn P.J. Vitamin E and its function in membranes. *Progress in Lipid Research*, 38:309-36, 1999.
85. Rigotti A.: Absorption, transport, and tissue delivery of vitamin E. *Molecular Aspects of Medicine*, *baskıda*: 2007.
86. Kayden H.J., Traber M.G.: Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans. *Journal of Lipid Research*, 34: 343-58, 1993.
87. Rimbach G., Minihaue M.A., Majewicz J., Fischer A., Pallauf J., Virgli F., Weinberg D.P: Regulation of cell signalling by vitamin E. *Proceedings of the Nutrition Society*, 61:415-425, 2002.
88. Azzi A., Brigelius-Flohe R., Kelly F., Lodge J., K. Ozer N., Packer L., Sies H.: "On the opinion of the European Commission "Scientific Committee on Food" regarding the tolerable upper intake level of vitamin E." *European Journal of Nutrition*, 44:60-2, 2005.
89. Azzi A., Gysin R., Kempna P., Munteanu A., Negis Y., Villacorta L., Visarius T., Zingg J.M.: Vitamin E Mediates Cell Signaling and Regulation of Gene Expression. *ANNALS of the New York Academy of Sciences*, 1031:86-95, 2004.
90. Boscoboinik D., Szewczyk A., Hensey C., Azzi A.: Inhibition of cell proliferation by alpha-tocopherol. Role of protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry*, 266: 6188-94, 1991.
91. Ozer N.K., Palozza P., Boscoboinik D., Azzi A.: d-alpha-Tocopherol inhibits low density lipoprotein induced proliferation and protein kinase C activity in vascular smooth muscle cells. *FEBS Letters*, 322: 307-10, 1993.
92. Ozer N.K., Sirikci O., Taha S., San T., Moser U., Azzi A.: Effect of vitamin E and probucol on dietary cholesterol-induced atherosclerosis in rabbits. *Free Radical Biological Medicine*, 24: 226-33, 1998.
93. Ricciarelli R., Tasinato A., Clement S., Ozer N.K., Boscoboinik D., Azzi A.: alpha-Tocopherol specifically inactivates cellular protein kinase C alpha by changing its phosphorylation state. *Biochemical Journal*, 334:243-9, 1998.
94. Chanock S.J., el Benna J., Smith R.M., Babior B.M.: The respiratory burst oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 269:24519-22, 1994.

95. El Benna J., Faust R.P., Johnson J.L., Babior B.M.: Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p47phox as determined by two-dimensional phosphopeptide mapping. Phosphorylation by protein kinase C, protein kinase A, and a mitogen-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 6374-8, 1996.
96. Brigelius-Flohe R., Traber M.G. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB Journal*, 13:1145-55, 1999.
97. Mardones P., Rigotti A.: Cellular mechanisms of vitamin E uptake: relevance in alpha-tocopherol metabolism and potential implications for disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15:252-60, 2004.
98. Sano M., Ernesto C, Thomas RG, Klauber MR, Schafer K, Grundman M, Woodbury P, Growdon J, Cotman CW, Pfeiffer E, Schneider LS, Thal L.J.: A controlled trial of selegiline, α -tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine* 336:1216-1223, 1997.
99. Zandi P.P., Anthony J.C., Khachaturian A.S.: Reduced risk of Alzheimer disease in users of antioxidant vitamin supplements: the Cache County study. *Archives of Neurology*, 61: 82–88, 2004.
100. Kontush A, Mann U, Arlt A, Ujeiy A, Lührs C, Müller T., Beisiegel U.: Influence of vitamin E and C supplementation on lipoprotein oxidation in patients with Alzheimer's disease, *Free Radical Biology and Medicine*, 31:345–354, 2001.
101. Sung S., Yao Y., Uryu K., Yang H., Lee V., Trojanowski J. and Pratico D.: Early vitamin E supplementation in young but not aged mice reduces A β levels and amyloid deposition in a transgenic model of Alzheimer's disease. *FASEB Journal*, 18:323-325, 2004.
102. Rota C, Rimbach G, Minihane A.M, Stoecklin E., Barella L.: Dietary vitamin E modulates differential gene expression in the rat hippocampus: Potential implications for its neuroprotective properties, *Nutritional Neuroscience* 8:21-29, 2005.
103. Yatin S. M., Varadarajan S., Butterfield D.A.: Vitamin E Prevents Alzheimer's Amyloid β -Peptide (1-42)-Induced Neuronal Protein Oxidation and Reactive Oxygen Species Production, *Journal of Alzheimer's Disease*, 2:123-131, 2000.

104. Koppal T, Subramaniam R, Drake J, Prasad MR, Butterfield D.A.: Vitamin E protects against amyloid peptide (25-35)-induced changes in neocortical synaptosomal membrane lipid structure and composition. *Brain Research*, 786: 270-273, 1998.
105. Stolzing A, Widmer R, Jung T, Voss P, Grune T.: Tocopherol-mediated modulation of age-related changes in microglial cells: Turnover of extracellular oxidized protein material, *Free Radical Biology and Medicine*, 40:2126-2135, 2006.
106. Egger T., Schuligoi R., Wintersperger A., Amann R., Malle E., Sattler W.: Vitamin E (alpha-tocopherol) attenuates cyclo-oxygenase 2 transcription and synthesis in immortalized murine BV-2 microglia. *Biochemical Journal*, 370:459–467, 2003.
107. Baker C.S., Hall R.J., Evans T.J., Pomerance A., Macclouf J., Creminon C., Yacoub M.H., Polak J.M.: Cyclooxygenase-2 is widely expressed in atherosclerotic lesions affecting native and transplanted human coronary arteries and colocalizes with inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine particularly in macrophages. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 19: 646-55, 1999.
108. Hayek M.G., Mura C., Wu D., Beharka A.A., Han S.N., Paulson K.E., Hwang D., Meydani S.N.: Enhanced expression of inducible cyclooxygenase with age in murine macrophages. *Journal of Immunology*, 159:2445-51, 1997.
109. Kim H.J., Kim K.W., Yu B.P., Chung H.Y.: The effect of age on cyclooxygenase-2 gene expression: NF-kappaB activation and IkappaBalpha degradation. *Free Radical Biology and Medicine*, 28:683-92, 2000.
110. Wu D., Hayek M.G., Meydani S.: Vitamin E and macrophage cyclooxygenase regulation in the aged. *Journal of Nutrition*, 131:382-8, 2001.
111. Nakashima H., Ishihara T, Yokota O, Terada S, Trojanowski J, Lee V., Kuroda S.: Effects of tocopherol on animal model of tauopathies, *Free Radical Biology and Medicine*, 37:176–186, 2004.
112. Nierenberg D.W., Nann S.L.: A method for determining concentrations of retinol, tocopherol, and five carotenoids in human plasma and tissue samples *American Journal of Clinical Nutrition*, 56:417-26, 1992.

113. Wong SHJ, Knight JA, Hopfer SM, Zaharia O, Leach CN, Sunderman FW.: Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde–thiobarbituric acid adduct. *Clinical Chemistry*, 33:214–220, 1987.
114. Buss H., Chan T.P., Sluis K.B., Domigan N.M., Winterbourn C.C.: Protein carbonyl measurement by sensitive ELISA method, *Free Radical Biology and Medicine*, 23:361–366, 1997.
115. Clubb F.J., Cerny J.L., Deferrari D.A., Butler-Aucoin M.M., Willerson J.T., Buja L.M.: Development of atherosclerotic plaque with endothelial disruption in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit aortas. *Cardiovascular Pathology*, 10:1-11, 2001.
116. Lehr H.A., Sagban T.A., Ihling C., Zahringer U., Hungerer K.D., Blumrich M., Reifenberg K., Bhakdi S.: Immunopathogenesis of atherosclerosis: endotoxin accelerates atherosclerosis in rabbits on hypercholesterolemic diet. *Circulation*, 104:914-20, 2001.
117. Smith M. A., Sayre L. M., Anderson V. E., Harris P. L., Beal M. F., Kowall N., Perry G.: Cytochemical demonstration of oxidative damage in Alzheimer disease by immunochemical enhancement of the carbonyl reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 46:731-735, 1998.
118. Hensley K., Robinson K.A., Gabbita P., Salsman S., Floyd R.: Reactive oxygen species, cell signalling, and cell injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 28:1456–1462, 2000.
119. Allen R.G., Tresini M.: Oxidative stress and gene regulation. *Free Radical Biology and Medicine*, 28:463–499, 2000.
120. Abdala-Valencia, H.; Cook-Mills, J. M.: VCAM-1 signals activate endothelial cell protein kinase C{alpha} via oxidation. *Journal of Immunology*, 177:6379–6387, 2006.
121. Cantoni, O., Boscoboinik D., Fiorani M., Stauble B., Azzi A.: The phosphorylation state of MAP-kinases modulates the cytotoxic response of smooth muscle cells to hydrogen peroxide. *FEBS Letters*, 8:285–288, 1996.

122. Schreck R., Rieber P., Baeuerle P. A.: Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-k-B transcription factor and HIV-1. *EMBO Journal*, 10:2247–2258, 1991.
123. Hensley K., Floyd R. A., Zheng N.-Y., Nael R., Robinson K. A., Nguyen X., Pye Q. N., Stewart C. A., Geddes J., Markesbery W. R., Patel E., Johnson G. V. W., Bing G.: p38 kinase is activated in Alzheimer disease brain. *Journal of Neurochemistry*, 72:2053–2058, 1999.
124. Tegos T.J., Kalodiki E., Sabetai M.M., Nicolaides A.N.: The genesis of atherosclerosis and risk factors: a review. *Angiology*, 52: 89-98, 2001.
125. Singh U., Devaraj S., Jialal I.: Vitamin, Oxidative stress, and inflammation. *Annual Review of Nutrition*, 25:151–74, 2005.
126. Stokes K.Y., Cooper D., Tailor A., Granger D.N.: Hypercholesterolemia promotes inflammation and microvascular dysfunction role of nitric oxide and superoxide. *Free Radical Biology & Medicine*, 33:1026–1036, 2002.
127. Sirikci O., Ozer N.K., Azzi A.: Dietary cholesterol-induced changes of protein kinase C and the effect of vitamin E in rabbit aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 126: 253-63, 1996.
128. Ozer N.K., Negis Y., Aytan N., Villacorta L., Ricciarelli R., Zingg J.M., Azzi A. Vitamin E inhibits CD36 scavenger receptor expression in hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis*, 184:15-20, 2006.
129. Konneh M.K., Rutherford C., Li S.R., Anggard E.E., Ferns G.A.: Vitamin E inhibits the intimal response to balloon catheter injury in the carotid artery of the cholesterol-fed rat. *Atherosclerosis*, 113:29-39, 1995.
130. Cabiscol E., Levine R.L.: Carbonic anhydrase III. Oxidative modification in vivo and loss of phosphatase activity during aging. *Journal of Biological Chemistry*, 270:14742–14747, 1995.
131. Conrad C.C., Marshall P.L., Talent J.M., Malakowsky C.A., Choi J., Gracy R.W.: Oxidized Proteins in Alzheimer's Plasma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 275:678–681, 2000.
132. Hensley K., Hall N., Subramaniam R., Cole P., Harris M., Aksenova M. V., Aksenov M. Y., Gabbita S. P., Carney J. M., Lovell M., Markesbery W. R., Butterfield D. A.: Brain regional correspondence between Alzheimer's disease

- histopathology and biomarkers of protein oxidation. *Journal of Neurochemistry* 65:2146-2156, 1995.
133. Hamdheydari L., Christov A., Ottman T., Hensley K., Grammas P.: Oxidized LDLs affect nitric oxide and radical generation in brain endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 311:486–490, 2003.
 134. Grune T., Merker K., Jung T., Sitte N., Davies K.J.A.: Protein oxidation and degradation during postmitotic senescence *Free Radical Biology and Medicine* 39:1208–1215, 2005.
 135. Gregori L., Hainfel J.F., Simon M.N., Goldgaber D.: Binding of Amyloid β Protein to the 20 S Proteasome, *The Journal of Biological Chemistry*, 272:58-62, 1997
 136. Friedhoff P., Schneider A., Mandelkow E.-M., Mandelkow E.: Rapid assembly of Alzheimer-like paired helical filaments from microtubule-associated protein tau monitored by fluorescence in solution. *Biochemistry*, 37:10223–10230, 1998.
 137. Grune T., Davies K. J.A.: The proteasomal system and HNE-modified proteins. *Molecular Aspects of Medicine* 24:195–204, 2003.
 138. Ding Q. and Keller J. N.: Proteasome inhibition in oxidative stress neurotoxicity: implications for heat shock proteins. *Journal of Neurochemistry*, 77:1010-1017, 2001
 139. Conconi, M., Szweda, L.I., Levine, R.L., Stadtman, E.R., Friguet, B.: Age-related decline of rat liver multicatalytic proteinase activity and protection from oxidative inactivation by heat-shock protein 90. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 331:232–240, 1996.
 140. Tohgi H., Nakanishi A.M.: Concentrations of alpha-tocopherol and its quinone derivative in cerebrospinal fluid from patients with vascular dementia of the Binswanger type and Alzheimer type dementia. *Neuroscience Letters*, 174:73–76, 1994.
 141. Cachia O., Benna J. E., Pedruzzi E., Descomps B., Gougerot-Pocidallo M. A., Leger C. L.: Alpha-tocopherol inhibits the respiratory burst in human monocytes. Attenuation of p47(phox) membrane translocation and phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 273:32801–32805, 1998.

142. Numakawa Y., Numakawa T., Matsumoto T., Yagasaki Y., Kumamaru E., Kunugi H., Taguchi T. and Niki E.: Vitamin E protected cultured cortical neurons from oxidative stress-induced cell death through the activation of mitogenactivated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Journal of Neurochemistry*, 97:1191–1202, 2006.

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Nurgül Aytan
Doğum Tarihi ve Yeri : 06.05.1975 / Edirne
Eğitim Durumu

Doktora : Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Eylül 2002 / -
Marmara Üniversitesi, İstanbul
Yüksek Lisans : Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Temmuz 2002
Marmara Üniversitesi, İstanbul
Lisans : Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Haziran 1998
Hacettepe Üniversitesi, Ankara

Üye Olduğu Kuruluşlar

Türk Biyokimya Derneği
Society for Free Radical Research (Europe)

KATILINAN KURSLAR/KONGRELER

1. NATO-ASI Advanced Course "Free Radicals, Nitric Oxide, and Inflammation: Molecular, Biochemical, and Clinical Aspects". 23 Eylül –3 Ekim 2001, Antalya – Türkiye
2. 2nd International Meeting on Free Radicals in Health and Disease: The Role of Oxidants and Antioxidants in The Regulation of Chronic Disease. Mayıs 8 – 12, 2002, İstanbul-Türkiye
3. Free Radical School 2004: Free radicals and diseases: gene expression, cellular metabolism and pathophysiology. 21Eylül– 1 Ekim 2004, Spetses, Yunanistan
4. New Approaches and Developments in Molecular Mechanisms of Lipid Peroxidation Associated Disorders” Workshop of COST Action B35: LPO, İstanbul-Türkiye, Mayıs 18, 2007.

BURSLAR

1. Heinrich-Heine University, Research Institute for Environmental Medicine, Molecular Aging Research Department Dusseldorf, GERMANY, DAAD Fellowship, Temmuz – Ekim 2006.

YAYINLAR

1. Özer NK, Negis Y, **Aytan N**: Molecular mechanisms of cholesterol or homocysteine effect in the development of atherosclerosis: Role of vitamin E. BioFactors.19(1-2):63–70, 2003.
2. Özer NK, Negis Y, **Aytan N**, Role of cholesterol or homocysteine in the development of atherosclerosis: Effect of Vitamin E, in NATO ASI Series, In “ Free Radicals and Diseases:Gene Expression, Cellular Metabolism and Pathophysiology” (Ed. Grune T.) IOS Press, Amsterdam, Berlin, p: 153-160, 2005
3. Özer NK, Negis Y, **Aytan N**, Villacorta L, Ricciarelli R, Zingg JM, Azzi A: Vitamin E inhibits CD36 scavenger receptor expression in hypercholesterolemic rabbits. Atherosclerosis, 184:15-20, 2006.
4. Negis Y, **Aytan N**, Özer NK, Ogru E, Libinaki R, Gianello R, Azzi A, Zingg J-M.: The effect of tocopheryl phosphate on atherosclerosis progression in rabbits fed with a high cholesterol diet. Archives of Biochemistry and Biophysics, 450: 63-66, 2006.
5. Yat D, Negis Y, **Aytan N**, Binnetoglu L, Ozer NK: Role of vitamin E in homocysteine induced atherosclerosis. FEBS Journal, 273:299, 2006.

ULUSLARARASI KONGRELERDE SUNULAN POSTERLER VE SÖZLÜ BİLDİRİLER

1. **N Aytan**, Y Neğiş, D Yat, NK Özer, A Azzi. Vitamin E Inhibits CD36 Scavenger Reseptor Expression in Cholesterol-Fed Rabbits. 2nd International Meeting on Free Radicals in Health and Disease: The Role of Oxidants and Antioxidants in The Regulation of Chronic Disease, May 8 – 12, 2002, Istanbul-Turkey
2. Neğiş Y, **N Aytan**, D Yat, NK Özer. Homocysteine Enhances Arteriosclerosis-Like Alteration of The Rat Aorta. 2nd International Meeting on Free Radicals in

Health and Disease: The Role of Oxidants and Antioxidants in The Regulation of Chronic Disease, May 8 – 12, 2002, Istanbul-Turkey

3. Neğiş Y, D Yat, **N Aytan**, NK Özer. Effects of homocysteine on vascular smooth muscle cells and its relation with atherosclerosis, SFRR-Europe Meeting 2003 Free Radicals and Oxidative Stress: Chemistry, Biochemistry and Pathophysiological Implications, Ioannina, Greece, June 26-29 2003.
4. Neğiş Y, **N Aytan**, D Yat, NK Özer. Role of vitamin E on CD36 scavenger receptor expression in cholesterol-fed rabbits. FEBS Special Meeting 2003 on signal transduction, Brussels, Belgium, July 3-8, 2003.
5. Neğiş Y, Yat D, Binnetoğlu L, **Aytan N**, Kartal-Özer N, Homocysteine and atherosclerosis: Role of Vitamin E, SFRR's 12th Biennial Meeting, Buenos Aires Argentina, May 5-9, 2004.
6. Neğiş Y, Yat D, Binnetoğlu L, **Aytan N**, Kartal-Özer N, Homocysteine and atherosclerosis: Role of Vitamin E, 2nd meeting of the HNE-Club HNE and Lipid Peroxidation Products: from basic science to medicine, Berlin, Germany, July 6-9, 2004.
7. Neğiş Y, Yat D, Binnetoğlu L, **Aytan N**, Kartal-Özer N, Homocysteine and atherosclerosis: Role of Vitamin E, Summer Meeting SFRR-Europe 2004 "Reactive oxygen species and antioxidants" Lodz Poland, July 2-5, 2004.
8. Negis Y, **Aytan N**, Binnetoglu L, Marc-Zing J, Azzi A, Kartal-Özer N Vitamin E supplementation prevents foam cell formation and development of atherosclerosis in rabbits. 2nd SFRRAsia/3rd International Symposium on Natural Antioxidants-Molecular Mechanisms and Health Effects, Shanghai, China, June 24-29, 2005.
9. Kartal-Özer N, Negis Y, **Aytan N**, Binnetoglu L, Marc-Zing J, Azzi A. Vitamin E supplementation prevents foam cell formation and development of atherosclerosis in rabbits. SFRR-Europe "Free Radicals and Disease Process", West Midlands, UK, July 8-11, 2005
10. **Aytan N**, Binnetoglu L, Negis Y, Kartal-Özer N. Role of vitamin E in the development and regression of atherosclerosis. 6th COSTAM/SFRR (MALAYSIA/ASEAN) INTERNATIONAL WORKSHOP, "Micronutrients, Oxidative Stress and the Environment", Kuching, Sarawak, Malaysia, June 29-July 2, 2006.
11. **Aytan N**, Tamtürk F, Grune T, Kartal-Özer N. Hypercholesterolemia-induced oxidative stress in the brain: the role of vitamin E. II. Congress of Molecular Medicine, Istanbul-Turkey, March 24-26, 2007
12. Tamtürk F, **Aytan N**, Erçelen N, Kartal-Özer N. CD36 gene polymorphism and its association with atherogenic lipid profile. II. Congress of Molecular Medicine, Istanbul-Turkey, March 24-26, 2007.

13. **Aytan N**, Tamtürk, Jung T, Voss P, Grune T, Kartal-Özer N. Hypercholesterolemia related changes in the brain of rabbits. Role of vitamin E. “New Approaches and Developments in Molecular Mechanisms of Lipid Peroxidation Associated Disorders” Workshop of COST Action B35: LPO, Istanbul-Turkey, May 18, 2007.



Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;

Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı** çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Doktora tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 05. / 10. / 2007

Tez Danışmanı : Prof.Dr.Nesrin KARTAL ÖZER
Üniversitesi : Marmara

İMZA

Üye : Prof.Dr.A.Süha YALÇIN
Üniversitesi : Marmara

Üye : Prof.Dr.Yavuz TAGA
Üniversitesi : Marmara

Üye : Prof.Dr.Kaya EMERK
Üniversitesi : Marmara

Üye : Prof.Dr.Gülden BURÇAK
Üniversitesi : İstanbul

ONAY

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun ...18/ 10/ 2007 tarih ve ...14 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof.Dr.Sevim ROLLAS
Müdür