



**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**A β (1-42) İLE İNDÜKLENEN SH-SY5Y HÜCRELERİNDE
AMİNOPEPTİDAZ A İNHİBİSYONUNUN OLASI ROLÜ**

**TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Ecz. Gözde TUNÇER

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Funda F. Bölükbaşı Hatip

**Ağustos 2019
DENİZLİ**

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**A β (1-42) İLE İNDÜKLENEN SH-SY5Y HÜCRELERİNDE
AMİNOPEPTİDAZ A İNHİBİSYONUNUN OLASI ROLÜ**

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. Güzde TUNÇER

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Funda F. Bölükbaşı Hatip

Ağustos, 2019
DENİZLİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU

Gözde Tunçer tarafından Prof. Dr. Funda Fatma Bölükbaşı Hatipyönetiminde hazırlanan '**Aβ(1-42) ile İndüklenen SH-SY5Y Hücrelerinde Aminopeptidaz A İnhibisyonunun Olası Rolü**' başlıklı tez tarafımızdan okunmuş kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr.Funda F. Bölükbaşı HATİP
Pamukkale Üniversitesi

Danışman: Prof. Dr. Funda F. Bölükbaşı HATİP
Pamukkale Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. İzzettin HATİP
Pamukkale Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Turhan DOST
Adnan Menderes Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Osman ÇİFTÇİ
Pamukkale Üniversitesi

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Muhammet Fatih DOĞAN
Pamukkale Üniversitesi

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
.../.../..... tarih vesayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hakan AKÇA

Müdür

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci adı ve soyadı: Gözde TUNÇER

İmza:

ÖZET

AB(1-42) İLE İNDÜKLENEN SH-SY5Y HÜCRELERİNDE AMİNOPEPTİDAZ A İNHİBİSYONUNUN OLASI ROLÜ

Gözde TUNÇER

Yüksek Lisans Tezi Tıbbi Farmakoloji AD.

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Funda F. Bölükbaşı HATİP

Ağustos 2019, 44 Sayfa

Alzheimer dünya çapında yaygınlık gösteren nörodejeneratif bir hastalıktır. Bu hastalıkta temel patojenik özellikler ekstrasellüler beta amiloid birikimleri, intrasellüler nörofibriler tangıllar, nöronal ölüm, sinaps kaybı ile birlikte olan kognitif işlevlerde ilerleyici bir bozulmadır. Alzheimer hastalığı (AH) için şu anda mevcut olan tedavi seçenekleri sınırlı etkinliğe sahiptir. Anjiyotensin 1-7 (Ang 1-7), Renin Anjiyotensin Sistem (RAS)'inin biyolojik olarak aktif üyesidir. Anjiyotensin II (Ang II)'den anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE2)'nin etkisiyle sentezlenir ve G proteinine bağlı Mas reseptörleriyle ve Mas ile ilgili G protein bağlantılı reseptör ile kendi ACE2 / Ang 1-7 / Mas eksenini oluşturur. Bu eksen Ang II'nin vazokonstriksiyon, inflamasyon ve proliferasyon gibi birçok aktivitesine zıt etkilere sahiptir. Aminopeptidaz A (APA), RAS metabolizmasında Anjiyotensin I (Ang 1) ve Anjiyotensin II (Ang II) yolağında rol oynamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda APA inhibitörlerinin etkisiyle kronik serebral hipoperfüzyon yapılan ratlarda, Ang 1-7'nin nöroprotektif olabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmada laboratuvar ortamında SH-SY5Y hücrelerine literatür verileri ışığında 10 µM konsantrasyonda amiloid-β 1-42 (Aβ 1-42) uygulanarak Alzheimer modeli oluşturulmuştur. Bu modele, anjiyotensin peptidlerin metabolizmasında rol oynayan APA enzimini inhibe eden, Amastatin 10 µM konsantrasyonda uygulanarak Western Blot (WB) görüntüleme tekniği ile Ang 1-7 ligandı olan Mas1 reseptör ekspresyonuna etkisi araştırılmıştır. Sonuç olarak, APA inhibitörü olan Amastatin Ang 1-7 seviyelerini artırmakla birlikte MasR'ü üzerine olan etkisi çalışılan konsantrasyonda gözlenmemiştir.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer hastalığı, anjiyotensin 1-7, Mas reseptörü, Aminopeptidaz A inhibitörü

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2017SABE010).

ABSTRACT

POSSIBLE ROLE OF AMINOPEPTIDASE A INHIBITION IN SH-SY5Y CELLS INDUCED WITH 1 AB (1-42)

Gözde TUNÇER

Postgraduate MSc. Thesis, Department of Medical Pharmacology

Thesis Advisor: Prof. Dr. Funda F. Bölükbaşı HATİP

August 2019, 44 Pages

Alzheimer's is a worldwide neurodegenerative disease. The main pathogenic features of this disease are progressive impairment of cognitive functions associated with extracellular beta amyloid deposits, intracellular neurofibrillary tangles, neuronal death, and synapse loss. Treatment options currently available for Alzheimer's disease (AD) have limited efficacy. Angiotensin 1-7 (Ang 1-7) is a biologically active member of the Renin Angiotensin System (RAS). It is synthesized from angiotensin II (Ang II) by the action of angiotensin converting enzyme (ACE2) and forms its ACE2 / Ang 1-7 / Mas axis with the G protein-bound Mas receptors and the G protein-linked receptor. This axis has many opposite effects of Ang II's activities such as vasoconstriction, inflammation and proliferation. Aminopeptidase A (APA) plays an important role in the metabolism of RAS, plays a role in the metabolism of Angiotensin I (Ang 1) and Ang II. In this study, in the light of literature data SH-SY5Y cells amyloid- β 1-42 (A β 1-42) was applied in 10 μ M concentration to create Alzheimer model. In this model, the effect of Amastatin on the expression of Mas1 receptor, Ang 1-7 ligand by Western Blot (WB) technique, was applied at 10 μ M concentration which inhibited APA enzyme which is involved in the metabolism of angiotensin peptides. As a result although APA inhibitor Amastatin increased Ang 1-7 levels, its effect on MasR was not observed at the studied concentration.

Key words: Alzheimer Disease, angiotensin 1-7, Mas receptor, Aminopeptidase A inhibitor

This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project No: 2017SABE010).

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans öğrenimim ve tez çalışmam süresince akademik açıdan yetişmemde katkısı olan değerli hocalarım, danışman hocam Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Funda F. Bölükbaşı HATİP'e, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanımız, Sn. Prof. Dr. İzzettin HATİP'e teşekkür ederim.

Tezimin laboratuvar çalışmaları sırasında içten desteği ve özverili yardımlarından dolayı Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan Arş. Gör. Dr. Levent ELMAS'a, Tezimin uygulama aşamasında sabır ve azmiyle yanımda olan Uzm. Psikolog Zeynep Mine ALTUNAY'a, bu zorlu ve çetin süreçte manevi desteğini esirgemeyen Sevgili TUNÇER ailesine teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜRLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLOLAR DİZİNİ	xi
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1.GİRİŞ	1
1.1. Amaç	2
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI	3
2.1. Alzheimer Hastalığı	3
2.1.1. Alzheimer Hastalığının Epidemiyolojisi.....	4
2.1.2. Alzheimer Hastalığının Etiyopatogenezi.....	4
2.2. Beyin Renin Anjiyotensin Sistemi.....	6
2.3. Anjiyotensin 1-7 ve MasR İlişkisi.....	8
2.4. Alzheimer Hastalığının Beyin Renin Anjiyotensin Sistemi İle İlişkisi.....	11
2.5. Aminopeptidaz A İnhibitörü Amastatin.....	12
2.6. Amastatin'in Alzheimer Hastalığındaki Olası Rolü.....	12
2.7. HİPOTEZ	13
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	14
3.1. Deney Protokolü.....	14
3.2. Kullanılan Kimyasallar.....	14
3.3. SH-SY5Y Hücre Kültürü Hazırlanması.....	15
3.4. SH-SY5Y Hücrelerinin Dondurulması.....	16
3.5. SH-SY5Y Canlı Hücrelerin Sayımı.....	17
3.6. A β 1-42 Dozunun Belirlenmesi.....	18
3.7. WST-1 ile Sitotoksosite Testi.....	19
3.8. Amastatin ve A β 1-42 Uygulanması Sonucu SH-SY5Y Hücre Kültürlerinden Protein Eldesi.....	19
3.9. Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Analizi.....	20
3.10. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) ve Western Blot Yöntemi.....	21

3.11. Enzyme-Linked Immuno- Sorbent- Assay (ELİSA).....	23
3.11.1. Ang 1-7 ELİSA.....	23
3.11.2. ACE2 ELİSA.....	24
3.11.3. Neprisilin ELİSA Deneyi.....	24
3.12 İstatistiksel Analiz.....	25
4. BULGULAR.....	26
4.1. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi.....	26
4.2. Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Analizi.....	26
4.3. Western Blot Sonuçları	28
4.4. Elisa Sonuçları.....	29
4.4.1. Ang 1-7 ELİSA	29
4.4.2. ACE2 ELİSA.....	30
4.4.3. NEPRİSİLİN ELİSA.....	32
5. TARTIŞMA.....	33
6. SONUÇLAR.....	36
7. KAYNAKLAR.....	37
8. ÖZGEÇMİŞ.....	44

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. RAS Yolağı.....	6
Şekil 2.2. Ang 1-7 mekanizmasının aktivitesi.....	9
Şekil 3.1. Mikroskop altındaki adherent SH-SY5Y hücreleri.....	18
Şekil 4.1. BCA-Kalibrasyon Eğrisi ve Eğimi.....	27
Şekil 4.2. Kontrol grubu, tek başına sırasıyla Aβ 1-42 , Amastatin ve Aβ 1-42+Amastatin verilerek hazırlanan hücre kültüründen elde edilen lizatlarda primer Mas1 antikoruna ait elde edilen görüntüler ve grafikler.....	28
Şekil 4.3. Ang 1-7 ELİSA 4-PL Grafiği.....	29
Şekil 4.4. ELİSA kit aracılığı ile ölçülen Ang 1-7'nin deney gruplarından elde edilen konsantrasyon grafiği (pg/mL).....	30
Şekil 4.5. ACE2 ELİSA 4-PL Grafiği.....	31
Şekil 4.6. ELİSA kit aracılığı ile ölçülen ACE2'nin deney gruplarından elde edilen konsantrasyon grafiği (ng/mL).....	31

TABLolar DİZİNİ

Tablo 3.1. Stacking jel ve Seperating jel hazırlanışı.....	22
Tablo 4.2. Protein örneklerinin 562 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ve BCA standartlarına göre oluşturulan Şekil 4.1.deki eğime göre karşılık gelen protein konsantrasyonları.....	27

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

A β	Amiloid beta
ACE.....	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
ACE2.....	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim İnhibitörü
AH.....	Alzheimer Hastalığı
Ang (1-7).....	Anjiyotensin 1-7
Ang (1-9).....	Anjiyotensin 1-9
Ang I.....	Anjiyotensin I
Ang II.....	Anjiyotensin II
Ang III.....	Anjiyotensin III
ApoE.....	Apolipoprotein E
APP.....	Amiloid Prekürsör Protein
AT1R.....	Anjiyotensin II Tip 1 Reseptörü
BCA.....	Bicinchoninic Asit
BOS.....	Beyin Omurilik Sıvısı
BSA.....	Bovine Serum Albumine
DMEM/F-12	Dulbecco Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
Elisa.....	Enzim Bağlı İmmunosorbent Deneyi
GFAP.....	Glial Fibril Asidik Protein
GPCR.....	G protein bağlı reseptör
KBB.....	Kan Beyin Bariyeri
MasR.....	Mas reseptörü
NFT.....	Nörofibriler Tengil
NE.....	Norepinefrin
NEP.....	Neprisinil
NO.....	Nitrik Oksit
NP.....	Nöropsikolojik
NPFF.....	Nöro Peptid FF
PKC.....	Protein Kinaz C
RAS.....	Renin Anjiyotensin Sistemi
RIPA.....	Radio İmmuno Precipitation Assay buffer
TBS.....	Tris Buffered Saline
TBS-T.....	Tris Buffered Saline tween 20
WB.....	Western Blot

1. GİRİŞ

.Alzheimer Hastalığı (AH) en sık görülen demans nedeni olup ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır. Hastalığın karakteristik patolojik bulguları; intrasellüler nörofibriller yumaklar, beyinde ekstrasellüler senil plaklar, sinaps kaybı, nöron kaybı, granülovakuolar dejenerasyon, Meynert'in bazal nukleusunda kolinerjik hücre kaybı ve arterosklerotik değişiklikleri içermektedir (Selekler K., 2009).

A.H'ndan etkilenen dünya çapında 35 milyon insan tahmin edilmektedir ve insidansının gelecek 10 yılda yaşlanan nüfusun artmasına bağlı olarak halk sağlığı ve sağlık kaynaklarının tahsisinde önemli zorluklara neden olabileceği öngörülmektedir (Ballard C vd, 2011). AH ile ilişkili olarak öne sürülen risk faktörleri ve koruyucu faktörlerden bir kısmı halen tartışmalıdır. Kesin olarak kabul edilen risk faktörleri *yaş, aile hikayesi ve apolipoprotein E (ApoE) ε4 allelinin varlığıdır*. AH'nın bugün tedavisi halen yoktur. Yeni geliştirilen ilaçlar hastalığın semptomlarını iyileştirmek, progresyonunu yavaşlatmak, hastanın günlük yaşamdaki aktivitelerini düzeltmeyi hedeflemektedir (Selekler K, 2009).

Anjiyotensin 1-7 (Ang 1-7), Mas reseptör (MasR) agonisti olup, beyin renin anjiyotensin sistemi (RAS)'nin ana ürünlerinden biridir (Santos vd, 2008). Ang 1-7'nin bellek ve öğrenme fonksiyonlarında önemli olduğu, hipokampal long term potansiyalizasyonları (LTP) güçlendirdiği gösterilmiştir (Hellner vd., 2005). Aminopeptidazlar tipik olarak protein sindiren bir grup enzimdir. Beyin gibi dokularda hücre zarı içerisinde yaygın şekilde bağlanmış olarak bulunurlar. Fakat bu enzimler endositoza uğrayabilir, stoplazmada da bulunabilir. Serbest enzimler ayrıca kanda da bulunabilir. Bu enzimler Aminopeptidaz A, N, B (APA, APN, APB) olup; beyin RAS'ının sentezi, etkileri ve metabolizmasıyla yakından ilişkilidir (Gard vd, 2017).

Amastatin, bir APA inhibitörü olup beyin RAS yolağında farklı aşamalarda etkilidir. Amastatin APA yolağını inhibe ederek, ACE2 yolağı üzerinden nöroprotektif

olduğu ileri sürülen Ang 1-7 oluşumunu indükleyerek AH'de etkili olabilir. AH'de amastatin'in etkisine ait bir çalışma literatürlerde mevcut değildir.

1.1. Amaç

Bu çalışmada SH-SY5Y hücrelerinde (Zheng L. vd 2013) in vitro olarak A β 1-42 verilerek indüklenen AH modelinde bir APA inhibitörü olan Amastatin'in kognitif fonksiyonlarda düzelme sağladığı ileri sürülen Ang 1-7 oluşumuna katkısı, Ang 1-7'nin bağlandığı spesifik Mas 1 reseptör protein ekspresyonuna ve Ang 1-7 seviyelerine etkisinin Western blot (WB) ve ELİSA çalışmaları ile gösterilmesi amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Alzheimer Hastalığı

2.1.1. Alzheimer Hastalığının Epidemiyolojisi

AH, demansın en yaygın nedenlerinden olup yaşlı popülasyonunda morbidite ve mortalite ile ilişkilidir. Son 20 yılda AH ile birçok epidemiyolojik çalışma yapılmış olmasına rağmen patolojik sürecin gecikmesini kuvvetlendiren faktörlerin kesin olarak tanımlanması hala yetersizdir. Nüfus temelli çalışmalarda majör tanılardan biri vasküler faktörler olup, yaşamsal alışkanlıklar (depresyon, diyet alışkanlıkları, fiziksel, sosyal ya da entelektüel aktiviteler v.b.), cinsiyet, kafa travması, eğitim düzeyi, genetik özellikler, antioksidanlar, statinler, antiinflamatuvar ilaçlar hastalığın seyrinde önemli etkenlerdir (Yazıcı ve Şahin, 2010).

Hızla yaşlanan nüfusla birlikte vaka sayısı 2050'ye kadar üç katına çıkması beklenmektedir. Temel belirti bilişsel gerilemedir. Bilişsel işlev bozukluğunu değerlendirmek için bellek, dikkat, yürütücü işlevleri etkileyen nöropsikojik (NP) testler yaygın olarak kullanılmakla birlikte (Elias vd, 2000), AH'itemelinde çok farklı etkenler olduğu için deneysel çalışmalar büyük oranda başarısız olmuştur (Au R vd, 2015).

AH'ın etiyolojisi tam olarak belirgin değildir (Khanahmadi M vd, 2015). AH'nin prevalansı 65 yaş üzerinde %10, 85 yaş üzerinde %50 arasındadır (Turner RC, 2006). Prevalansın değerlendirilmesinde tanı kriterleri arasında araştırılan popülasyonun yaşının dışında coğrafya ve etnik köken de rol alır (Hy LX ve Keller DM 2000, Hendrie HC vd, 2001). Bilinenin aksine batı toplumlarında prevalansın ve artışın, yakın dönemdeki bireylerin geçmiş yüzyılda yaşamış bireylere göre daha düşük bir risk altında bulunduğu dair kohort çalışmaları vardır (Reitz ve Mayeux, 2014).

2.1.2. Alzheimer Hastalığının Etiyopatogenezi

Hastalığın bilinen belirleyici bir faktörü yoktur. AH, hücresel düzeyde özellikle yüksek bilişsel fonksiyona aracılık eden piramidal hücrelerde kortikal nöronların kaybı ile karakterizedir (Mann DM 1996, Norfray JF ve Provenzale JM 2004).

AH'nın patogenezi; yapılan patolojik, genetik, in vivo ve in vitro deney çalışmalarının sonucunda ulaşılmıştır. Patogenezi A β ve tau proteinleri agregatlar oluşturarak hatta daha büyük olasılıkla oligomer yapılar halinde nörodejenerasyona yol açmaktadır (Saka, 2010).

Nörofibriler tangillar (NFT) hücre içindeki anormal hiperfosforile edilmiş tau protein agregatları olup; gerek mikrotübüllerin stabilitesini ve fonksiyonunu bozarak gerekse apoptozu indükleyerek, A β 'ya benzer bir şekilde nörodejenerasyon ve bellek bozukluğuna neden olabilir (Haass C, 2007). NFT, nöronal fonksiyonların oluşması, hayatta kalması (sinaptik veziküllerdeki nörotransmitterler, mitokondri ve nörotrofik faktörler) ve sonunda ölmesine neden olan gerekli bileşenlerin aksonal taşınımına müdahale eder (Querfurth HW, ve LaFerla FM 2010, Norfray JF ve Provenzale JM 2004). AH tanısının kesinleşmesinde serebral korteksin özgün bölgelerinde senil plak ve NFT yapılarının bulunması önemlidir. Bu oluşum hastalığın klinik başlangıcından önceki 10-20 yıllık süreci kapsar (Holtzman DM vd 2011). Normal yaşlı bireylerin beyinlerinde daha az yoğunlukta olmakla birlikte, NFT oluşumları hem entorinal kortekste, hem de hipokampüste mevcuttur; neokortekste ise sadece eser miktarda NFT görülür (Tolnay M ve Probst A, 2003). Son çalışmalar amiloid plaklarının görünümünün neokortekste ilk önce meydana gelebileceği ve NFT'nin ilk oluşumunun medyal temporal lob yerine beyin sapında meydana gelebileceğini göstermektedir (Braak H vd, 2011).

Yapılan çalışmalarda hastaların beyinlerindeki nörodejeneratif süreçlerle ilgili amiloid plaklarında ve nöronal tangillarda anormal şekilde katlanmış A β ve tau proteinlerinin birikimi olduğu gösterilmiştir (Karran E vd, 2011). Parenkimal lezyonların yanı sıra serebral amiloid anjiyopati hastalık patolojisine eşlik edebilmektedir. Nöron ve sinaps kaybı hastalığın diğer vazgeçilmez patolojik bulgularıdır (Meraz-Rios MA 2010, Haass C 2007).

İnsan A β 'sı, monomerler, dimerler, trimerler, tetramerler, dodekamerler, diğer oligomerler, protofibriller ve maturfibriller gibi farklı formlarda bulunabilmektedir.

Amiloid plakların yapısında ise matur fibriller bulunmaktadır. Yapılan post mortem çalışmalarda amiloid plaklar olmazsa olmaz patolojik bulgulardır ve A β oluşumunun hastalığın patogenezini başlattığı düşünülmektedir (Haass C, 2007). Amiloid beta peptidleri öncelikle hücre içi birikim ve sonrasında hücre dışı plaklarda birikerek çöker. Hücre dışı agregat dikkate değer AH'na neden olurken, hücre içi amiloid beta birikimi nöron dejenerasyonuna neden olur (Wirz K vd, 2013).

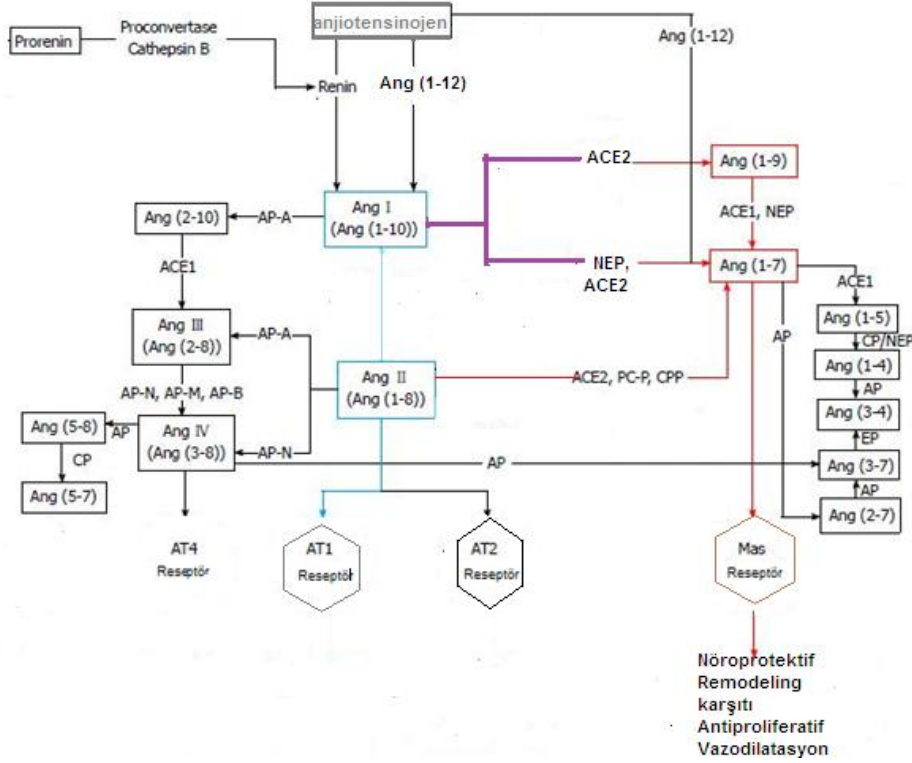
Çözünabilen amiloid agregatları amiloid toksisitesinin akut etkisinde açıklanabilirken; nöron kaybı, nöronal yapıların değişimi ya da plakların varlığını içine alan AH'nın kronik değişimini açıklamaya yetmez. Plaklardaki A β fibrilleri kompleks lipid ve karbonhidrattan oluşmuş lizozomal gangliositler tarafından oluşmuştur (Su Y 2001).

A β peptidler, amiloid prekürsör protein (APP)'in beta(β) sekretaz ve gama(γ) sekretaz kompleksi olarak da bilinen iki enzim tarafından ardışık kesilmesiyle elde edilir. Senil plak, hücre dışında amiloid proteinlerinin oluşması ve çözünemeyen A β birikimidir. Normalde hücreler, hücre yüzeyi reseptörü APP'nin ayrılmasından sonra çözünen A β 'yi salgırlar. APP'nin anormal bölünmesini içeren AH, senil plakların oluşmasına ve yoğun beta tabakalarındaki (β sheet) A β 'nin çökmesiyle oluşur. Migroglia ve astrositlerin amiloid agregatlarını temizlemek için inflamatuvar bir tepki oluşturduğuna ve bu amiloid agregatlarının bitişik nöronların ve bunların nöritlerini (akson ve dendritler) tahrip ettiğine inanılmaktadır (Querfurth HW ve LaFerla FM 2010, Norfray JF 2004).

AH ile ilgili dejenerasyon özellikle hipokampüsteki entorinal kortekste ve medyal temporal lobda başlar (Jack JR,1997). Dejenerasyon daha sonra pariyetal alanlara ve temporal birleşme korteksine yayılır. Hastalık ilerledikçe dejenerasyon frontal kortekte ve çoğunlukla neokortekste gözlemlenmiş olup bu şekilde limbik sistemin bir çok bileşeninde belirgin hasara neden olur (Holtzman DM vd 2011, . Bozoki AC vd 2012).

2.2. Beyin Renin Anjiyotensin Sistemi

Genetik, klinik ve epidemiyolojik verilerin yanı sıra deneysel hücre ve hayvan çalışmalarının tümü, AH'nın patogeneğinde beyin RAS'nin rolünü desteklemektedir (Kehoe vd, 2016).



Şekil 2.1. RAS Yolağı. Anjiyotensinojenin, anjiyotensin I ve II'ye fragmanlarla dönüşümünü özetlemektedir. Biyolojik olarak aktif formlar arasında anjiyotensin II (Ang II), Ang III, Ang IV ve Ang (1-7) bulunur. Ana enzimatik yollara, renin ve anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) veya anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri (ACE2), AP-N ve AP-A aracılık eder. Anjiyotensinlerin ana beyin etkilerine AT1, AT2, AT4, prorenin ve Mas reseptörleri aracılık eder. Her reseptörle ilişkili fonksiyonlar belirtilmiştir (Al-Khatib I. Vd 2018, Holappa vd 2015).

RAS komponentlerini Ang II, Ang III, Ang IV, Ang 1-7 ve Ang 3-7 gibi değişik biyolojik aktiviteleri olan angiotensin peptitler oluşturur (Ciobica vd 2009, Goessler vd 2015).

RAS temel olarak ;

1. Geleneksel RAS olarak da anılan Ang II / ACE / AT1R'den oluşan yolak

2. Ang 1-7 / Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2) / Mas reseptörü konvansiyonel olmayan yolak olarak iki bileşene ayrılır.

Geleneksel RAS, vasküler tonusu, kan akışını, elektrolit homeostasisini düzenleyen hormonal bir sistemdir (Sparks MA vd, 2014). Primer efektör peptid olan Ang II, kanda üretilir ve böbrek, böbreküstü bezleri, sempatik sinir sistemi ve baroreseptör refleksleri üzerinde bir dizi etki gösterir (Reid IA 1992, Dasgupta ve Zhang, 2011). Yapılan bir çok çalışma; beyin de dahil bir çok dokuda lokal RAS'ın varlığını göstermiştir. Santral sinir sisteminde anjiyotensinojen astrositler tarafından sentezlenip, beyin omulik sıvısına (BOS) ve interstisyel boşluğa salınır. Bu anjiyotensinojen beyindeki Ang II için substrat kaynağıdır (Deschepper C.F. vd, 1986). Anjiyotensinojenin BOS'ta en yoğun bulunan protein olduğu ve prekürsör proteininin glial kaynaklı olduğu bildirilmektedir (Diz D.I, 2006). Antisensin anjiyotensinojenin gerisindeki glial-fibrial asidik protein (GFAP) promotörüne aşırı ekspresyonu; BOS'taki anjiyotensinojenin %90 kaybıyla sonuçlanır. Lokal beyin RAS'ının kan beyin bariyeri (KBB)'ini korumada fonksiyonel rol oynadığı düşünülmektedir. Hipokampusün granüler tabaka hücrelerinde yoğunluğunun azalması, Ang eksikliği görülen farelerde KBB'nin bozulmasına neden olur ancak renin eksikliği olan fareler bu fenotipi göstermez (Yanai K vd, 2000). Çalışmalar nakavt farelerde de benzer sonuçları vermiştir. Nakavt farelerde soğuk zedelenmeye ve sonucunda bozulmuş KBB tam olarak sulandırılmamasına cevaben laminin üretimi ve GFAP ekspresyonu azalmıştır (Kakinuma Y vd, 1998).

Anjiyotensin ligandları reseptörleri olan AT1R, AT2R, AT4R ve MasR ile etkileşime girerek çeşitli beyin fonksiyonlarını kontrol eder (Premier C vd, 2013). Bu reseptörler beyinin birkaç yerinde farklı şekilde eksprese edilmiştir (Braga VA, 2011). Bizim ilgilendiğimiz MasR ekspresyonudur. MasR, esas olarak hipokampus, amigdala, anterodorsal talamik çekirdek, korteks ve hipoglossal çekirdeğe yerleşmiştir (Lazaroni TL vd, 2012, Freund M vd 2012). MasR ayrıca beyindeki RAS'ın farklı etkilerine katkıda bulunur (Jackson L vd, 2018). Reseptörün Ang 1-7 ile aktivasyonu bellekte yer alan alanlarda sinapsları güçlendirdiği bulunmuştur (Hellner K vd 2005, Uekawa K vd, 2016).

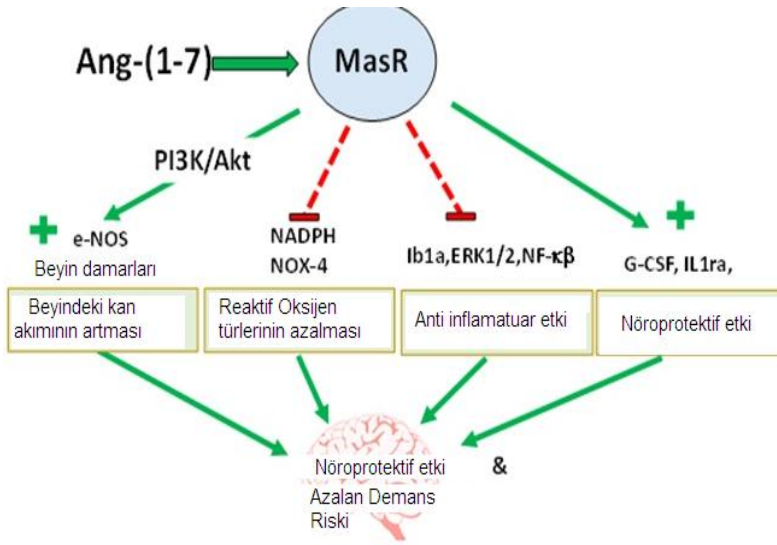
Beyin RAS'ı genellikle öğrenme, bellek, anksiyete, depresyon, bilişsel ve duygusal stres gibi merkezi faaliyetlerin düzenlenmesini içerir (Paul M vd 2006, de Gasparo M vd 2013). Ayrıca periferik RAS'ın fonksiyonlarını da tamamlar (McKinley MJ vd, 2003). AH'nda nörodejeneratif bozuklukların gelişimine katkısını gösteren artan

deliller vardır (Takane K vd, 2017). Ancak hala RAS'ın AH'nin gelişmesini ve ilerlemesini nasıl etkilediği tam olarak bilinmemektedir. Bazı çalışmalarda RAS ile toksik A β peptidlerinin birikimi, tau fosforilasyonu, oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon, nöroinflamasyon ve kolinerjik disfonksiyon arasında bir bağlantı gösterildiği halde RAS sistemine etki eden ilaçların AH'ını nasıl etkilediği tam anlaşılamamıştır (Murphy MP ve Le Vine H 2010, Gouras GK vd 2015).

2.3. Anjiyotensin 1-7 ve MasR İlişkisi

RAS sistemindeki karmaşıklığa ek olarak Ang 1-7 ve Ang 1-9 sentezlemek için Ang I ve Ang II'ye sırasıyla etki edebilen enzim yeni bileşen olarak tanımlanmıştır. ACE2 olarak da bilinen bu enzim Ang II'nin Ang 1-7'e dönüşmesinde Ang I'in Ang 1-9'a dönüştürülmesinden 500 kat daha fazla yüksek katalitik etki gösterir (Vickers C. vd, 2002). ACE2, ACE ile %42 nükleotid sekans homolojisi paylaşır ve aktif kalıntıların korunmasında önemli bir özelliktir (Donoghue M vd, 2000). Yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda insan beyinde ACE2 mRNA'sının düşük seviyelerde olduğu gösterilmiştir (Gallagher P.E. vd, 2006). ACE2 primer kültürde glial hücrelerde ve nöronlarda eksprese edilmiştir.

Beynin endojen bir bileşeni olan Ang 1-7 ise, hipotalamus, medulla oblongata, amigdala ve ayrıca normotansif sıçanların plazma ve adrenal bezlerinde mevcut olduğu gösterilmiştir (Chappel M.C., 1989). ACE2 hücre dışında bulunan katalitik bölgesiyle trans membran proteini olduğu için Ang 1-7 sentezinin de hücre dışında gerçekleşmesi muhtemeldir (Guy J.L, 2005). Ang II, AT1 ve AT2 reseptör alt tiplerine bağlanırken; Ang 1-7, Mas protoonkogeninden kodlanan G-protein kenetli reseptöre bağlanarak etkisini gösterir (Ciobica vd 2009). Ang 1-7, Ang II'nin hidroliziyle üretilen aktif bir amino asit peptididir (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro). Ang 1-7 eylemini MasR aracılığıyla yürüttüğünü ve ayrıca AT2R üzerinden hareket ettiğini bildirmiştir (Patel vd, 2014). Ang 1-7'nin vazodilatör, mediatör nitrik oksit(NO), prostoglandin E2 ve bradikininleri serbest bırakarak Ang II'nin çeşitli zararlı etkileri tersine çevirdiği söylenir (Sharma vd, 2018).



Şekil 2.2. Ang 1-7 mekanizmasının aktivitesi (ProNeurogen internet sitesi, 2018)

Mas reseptörü hipokampus ve dentat girusta yüksek konsantrasyonlarda tanımlanmıştır (Freund vd, 2012). Mas proto-onkojen Mas tarafından kodlanan bir G protein bağlı reseptördür (GPCR). N ve C terminal uçları hidrofilik olan 7 hidrofobik transmembran alana sahiptir. Hormon reseptör proteinlerinin GPCR alt ailesiyle güçlü benzer dizilimi vardır (Probst W.C., 1992). Mas, nöropeptidleri bağlayan ve temel fizyolojik fonksiyonlara sahip olan çoğunlukla yetim GPCR'lerden oluşan Mas ile ilgili GPCR alt ailesi için prototiptir. İnsan Mas reseptörü (MasR) şu anda, A sınıfı bir yetim GPCR olarak sınıflandırılmıştır. Beyinde eksprese edilen MasR'nün mRNA'sı hipokampusta, dentat girusta, priform korteks ve amigdalada lokalizedir (Bunnemann B vd, 1990). Yapılan araştırmalarda beyinde ve testislerde yüksek oranda MasR transkriptleri bulunmuştur. Bu oran kalp ve böbrek gibi organlarda daha düşük seviyededir. MasR'nin öngörülen moleküler ağırlığı (Ma) yaklaşık 37 kDa'dır. MasR fonksiyonel ve farmakolojik olarak ang 1-7 ile ilişkilendirilmiştir. Bu heptapeptid, endojen olarak üretilen RAS hormonu olup, ACE2'nin Ang II üzerindeki ayrıştırma etkisiyle ortaya çıkar.

Mas'ın etkisine, varsayılan endojen peptid ligand olan Ang 1-7'nin aracılık ettiği düşünülmektedir. Ang 1-7, Mas ile transfekte edilmiş CHO ve COS hücrelerinde ve Mas eksprese eden insan mezangial hücrelerinde araşidonik asit üretimini uyardığı gözlenmiştir. Anjiyotensin peptid metabolitleri (Ang III ve IV)'nin COS hücrelerinde

benzer araziidonik asit salma deneylerinde Mas'ı aktive ettiği de bildirilmiştir (Tirupula vd, 2014). Ang II farmakolojik etkilerinin çoğuna aracılık eden AT1 reseptörü üzerinden oksidatif stres ve nöroenflamasyonu arttırır, serebral kan akımını azaltır ve bu etkileri ile kognitif fonksiyonların bozulmasına katkıda bulunur (Mawuenyega vd, 2010). Ang 1-7'nin ise Ang II'nin etkilerini inhibe ettiği ve AT1 reseptörünün fizyolojik antagonisti gibi olduğu gösterilmiştir (Ciobica vd, 2009). Bir başka yayında da anjiyotensin II tip 2 reseptörü (AT2R), Ang 1-7, Ang 1-9 ve alamandin gibi diğer bileşenler umut verici fikirler sunmak için ayrıntılı tartışılmaktadır (Sharma vd, 2019).

Ang1-7 / ACE2 / Mas eksenini RAS'ın düzenleyici kollarından birisidir. Ang 1-7 nitrik oksit salımını uyarır, baroreseptör refleksi duyarlılığını geliştirir, hipotalamik nöradrenerjik nörotransmiyonda nöromodulator inhibitördür. ACE2, Ang I'i Ang 1-9 olmak üzere parçalamaktadır ve diğer peptidaz ve ACE, Ang 1-7 üretimine katkıda bulunur. ACE2 aynı zamanda Ang II'nin Ang 1-7'ye dönüşümünde proteolitik parçalayıcıdır ve Ang 1-7 de Mas reseptörü için bir ligandır (Nakagawa, 2017).

ACE2 / Ang- (1-7) eksenini, özellikle ACE, Ang II ve AT1R'nin oluşturduğu klasik RAS ekseninin uygunsuz aşırı etkisinin zararlı etkilerine karşı çıkararak, birçok sistem ve organdaki birçok fizyolojik ve patofizyolojik süreçte yer alır.

MasR, RAS'nin ACE2-Ang 1-7 koruyucu eksenine aracılık etmek için bir aday reseptör olarak önerilmiş olsa da, Ang II tip 2 reseptörünün (AT2R) katılımı hakkında raporlar vardır. Ang1-7 eylemlerinin yanı sıra, nöropeptid FF (NPFF) , Ang III, Ang IV ve anjiyoprotektin gibi MasR için doğal ligandların tanımlamalarının yanı sıra AT1R, ang 1-7'nin eylemlerinde görev alır.

Ticari olarak temin edilebilen MasR antikorumları, MasR dağılımını belirleme, ve diğer moleküller ile etkileşimi analiz etme eğilimindeki araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Dikkat çekici bir şekilde, birçok GPCR'ye yönelik antikorumların özgüllüğu birçok raporda sorgulanmıştır. Bu, α 1- ve β -adrenoseptörlerin, muskarinik, dopamin, galanin ve glukagon benzeri peptid-1'in çeşitli alt tiplerine karşı yönlendirilen antikorumları içerir. Çoğu durumda, çoklu antikorumlar kullanılmış ve hiğ birinin seçici olmadığı bulunmuştur. Bu, ne yazık ki, GPCR antikorumları için özgüllük eksikliğinin sık olduğunu göstermiştir. Daha spesifik olarak, son yayınlar ticari olarak temin edilebilen AT1R ve AT2R antikorumlarının özgüllüğu olmadığını ve RAS reseptörleri ekspresyonunu tanımlamakta ortaya çıkan zorlukları bildirmiştir (Krishtal J vd, 2017).

Ang II'nin AT1 reseptörüne bağlanması, protein kinaz C (PKC) ve Ca^{+2} / kalmodulin bağımlı protein kinaz II'nin (CaMKII) aktivasyonundan önce hücre içi Ca^{+2} 'yı arttıran Gq aracılı fosfoinositid hidrolizinin aktivasyonu ile sonuçlanır. Bu sinyal proteinleri, K^{+} akımlarının inhibe edilmesinden ve Ca^{+2} akımlarının aktivasyonundan sorumludur ve sonuçta artan sempatik çıkışlara yol açabilecek nöronal ateşlemeye neden olur.

Ek olarak, Ang II AT1R'e bağlanarak MapK kinazı, p38'i ve Erk 1/2 yi aktive eder ve bu etki Ang 1-7 ile MasR'nün aktivasyonu zayıflatabilir. Stat 3 hem Ang II'yi hem de Ang 1-7'yi stimüle edebilir. Mas reseptörüyle aktive edilmesinin ardından protein tirozin fosfataz -1 (SHP-1) Map kinazın aktivitesini inhibe eder. Kinazlar ve fosfatazlar birbirleri üzerinde mutual inhibitör etkileri vardır. Santral sinir sistemindeki kinaz aktivitesi nöronal ateşlemeyi, norepinefrin (NE) salınımını ve sempatik çıkışı belirler. AT1R aktivasyonu ile NADPH oksidaz liderliğinde peroksinitritten (ONOO-) nitrik oksit (NO) ile süper oksit oluşumuna liderlik eder (Xu vd, 2011). NO salımı Mas reseptörlerinin aktivasyonundan kaynaklanabilir.

2.4. Alzheimer Hastalığının Beyin Renin Anjiyotensin Sistemi ile ilişkisi

İn vitro çalışmalar, ACE'nin A β plaklarının gelişimini durdurarak A β peptidlerinin degradasyonunda rol oynadığını göstermiştir (Oba R vd, 2005). ACE'nin N parçası, N terminal pozisyondaki A β peptidlerinin hidrolizinden sorumlu bulunmuştur. ACE nörotoksik peptidleri (A β 42, A β 43) hidrolize ederek bunların senil plak formuna ve agregatlara dönüşmesini engeller. Ayrıca A β 42'nin oligomerizasyonu ve birikimini azaltarak A β 'leri metabolize eder (Kim J vd 2007, Murray MM vd 2009).

Kognitif fonksiyonlardaki artışın, Ang II düzeylerinin azalmasıyla ve bunun yanında Ang 1-7 düzeylerinin artmasıyla ilişkili olabileceği hipotezi ortaya atılmıştır (Mogi vd, 2012). AH patogeneğinde beyin RAS'ının klasik eksenini olan bu AH'ların post mortem çalışmalarında beyin hipokampus ve frontal korteks bölümünde Ang II metabolik enzimi olan ACE aktivitesi ve salınımını belirgin şekilde değiştiği gözlenmiştir. Aynı anda Alzheimer nöropatolojisiyle ilgili olarak Ang II seviyeleri şiddetlenmiştir (Uekawaa K, 2016). Ayrıca yapılan diğer çalışmalarda böbrek homojenatlarındaki anjiyotensin metaboizmasının değerlendirilmesinin ardından,

farelerde ve insanlarda neprisilin (NEP)'in önemli bir Ang 1-7 kaynağı olduğu belirlenmiştir. NEP'in farmakolojik inhibisyonu murin böbreklerinde Ang 1-7 seviyelerinde kuvvetlice azalmaya neden olmuştur (Domenig vd, 2016).

2.5. Aminopeptidaz A (APA) İnhibitörü Amastatin

APA, polipeptitlerin N-terminalinden glutamatik ve aspartatik amino asit kalıntılarının ayrılmasını katalize eden 109 kDa'lık bir homodimerik çinko-metalloproeptidazdır ve glutamil amino peptidaz (gp160) olarak da bilinir (Giulia C, 2011). APA in vivo ortamda N terminal amino asitleri kolesistokinin ve Ang II gibi peptid substratlarından ayırıcı rolde, çinko metallopeptidaz ile kaplı homodimerik zardır (Zini S vd 1996, Migaud M vd 1996). Çeşitli gruplar tarafından gösterilen raporlarda; APA'nın sentetik substratlara karşı enzimatk aktivitesinde Ca^{+2} 'un düzenleyici olduğu gözlemlenmiştir (Danielsen E vd 1996, Vazeux vd 1998). Diğer bir membrana bağlı çinko metalloproteaz olan aminopeptidaz N, ang III'ü ang IV'e metabolize eder (Boitard vd, 2018).

Yüksek oranda seçici APA inhibitörleri kullanılarak beyin RAS'ında bu enzimin önemli rollerinin olduğu açıklanmıştır (Reaux A vd, 1999). Buna göre APA, RAS metabolizmasında, gerek Ang III açığa çıkışında gerek angiotensin (2-10) ve angiotensin (3-10) açığa çıkışında rol oynamaktadır.

2.6. Amastatin'in Alzheimer Hastalığındaki Olası Rolü

Bir tetra peptid olan Amastatin güçlü bir APA, APN, tripeptidil ve tetrapeptidil aminopeptidaz inhibitörü olup bazı biyoaktif peptidlerin aktivitesini güçlendirmek için kullanılır ve aminopeptidazlara karşı selektif inhibitördür. Diğer taraftan amastatinin anjiyotensin yolağı aracılığıyla sıçan beynindeki sinirsel aktivitede etkili olduğu bulunmuştur (Ashmun vd, 1989).

Amastatin anjiyotensin metabolizmasında etkili bir blokerdir. Çünkü bunlar Ang II'nin yarı ömrünü uzatarak APA'yı inhibe eder. APA, Ang III üretmek için Ang II'nin N-terminal aspartatını hidrolize eder (Giulia C, 2011).

AH'da, ACE aktivitesinde artış olduğu ve RAS komponentlerinin düzeylerinin değiştiği gösterilmiştir (Marr ve Hafez, 2014).

2.7. Hipotez:

İn vitro ortamda A β 1-42 ile İndüklenen nöroblastoma SH-SY5Y hücrelerinde Aminopeptidaz A İnhibitörü olan Amastatin'in Ang 1-7, ACE2 seviyelerine olumlu etkisinin olabileceği, MasR protein ekspresyonlarını artırabileceği ve A β 1-42'nin ölçülen parametreler üzerindeki etkilerini zıt yönde etkileyebileceği çalışma başlangıcında hipotez olarak öne sürülmüştür.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Deney Protokolü

Araştırma Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı moleküler farmakoloji laboratuvarlarında yürütülmüştür. Çalışmamızda, SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattı kullanılmıştır. Çalışmamızda, A β 1-42 ile indüklenen SH-SY5Y hücre hatlarında aminopeptidaz A inhibisyonunun olası rolünü araştırmak için Mas 1 reseptör ekspresyonu, ve Ang 1-7 seviyelerine bakılmıştır.

3.2. Kullanılan Kimyasallar

- Beta-Amyloid peptid (1-42) (human) (RP10017) GenScript firmasından alınmıştır ve peptid 1 mg/ mL oranda distile su içinde çözünerek çözelti hazırlanmıştır.
- Ang 1-7 (A9202-SIGMA) (Lot # SLBF 1264V) Sigma - Alderich firmasından alınmıştır.
- Anti-beta Actin (ab8227) Abcam firmasından alınmıştır ve 1/1000 oranında dilüe edilerek WB yönteminde kullanılmıştır.
- RIPA Liziz Buffer System (sc-24948) (Lot # A2414) Santa Cruz Bioteknoloji firmasından alınmıştır.
- Ang 1-7 ELISA kit (E-EL-H5518) Elabscience (ABD) firmasından alınmıştır.
- ACE2 ELISA kit (E-EL-H0281) Elabscience (ABD) firmasından alınmıştır.
- Human Nprilysin (NEP) ELISA kit (Cat# YLA2053HU)
- Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) (P04-36500) PanBiotech

- Dulbecco's Modified Eagle Medium/F12 (DMEM/F12) (DF-041-13) Specialthymedia firmasından alınmıştır.
- Penisilin/Streptomisin (15140) GIBCO firmasından alınmıştır.
- Trypsin/EDTA (15400) GIBCO firmasından alınmıştır.
- WST-1 (ab65473) ABCAM firmasından alınmıştır.
- Dimetil sülfoksit (DMSO) (A3672-0250) Appllichem firmasından alınmıştır
- Fetal Bovie Serum (FBS) (P04-36500) PanBiotech firmasından alınmıştır.

3.3. SH-SY5Y Hücre Kültürü Hazırlanması

Çalışmalarımızda, insan nöroblastoma SH-SY5Y hücre hattı kullanılmıştır. Morfolojik olarak hücreler yapışkan (adherent) karakterde olup, iğ şeklinde tek tabaka halinde üremektedirler.

SH-SY5Y hücre hattı DMEM/F-12 (Dulbecco Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) ile birlikte %10 fetal sığır serumu (FBS), %1 Penisilin-streptomisin içeren besiyerinde, %5 CO₂ içeren 37°C'ye ayarlı karbondioksit inkübatöründe nemli atmosfer altında kültüre alınmıştır. FBS ve penisilin-streptomisin eklenen DMEM/F-12 besiyeri, 0.22 µm'lik mikro filtreden (MILLIPORE) geçirilerek steril edilmiştir.

SH-SY5Y hücre kültürü aşağıdaki protokole göre hazırlanmıştır.

-80°C'de %10 DMSO ile dondurulmuş SH-SY5Y kriyotüpler içindeki hücreler, çözünmesi için 37°C'de su banyosuna konulmuştur. Hücreler çözüldükten sonra üzerine 3-4 ml taze DMEM/F12 besiyeri eklenerek, hemen 15 ml'lik santrifüj tüpüne alınmıştır. Tüpler, 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant kısım atılarak hücre pelletinin üzerine, 1 ml besiyeri eklenmiş ve pipetaj yapılarak hücrelerin medium içerisinde homojen olarak dağılması sağlanmıştır.

Steril T25 flasklara toplam 8 ml DMEM/F-12 besiyeri eklenerek homojen haldeki hücrelerden eşit hacimde 3 ayrı flaska ekim yapılmıştır. Ekim yapılan flasklar, 37 °C, %95 nem ve %5 CO₂ olacak şekilde karbondioksit inkübatörüne konulmuştur. Gün

aşırı, invert mikroskop altında hücreler yoğunlukları ve morfolojileri bakımından değerlendirilmiş ve gerektiğinde eski besiyeri ortamı 8 ml taze besiyeri ile değiştirilmiştir. Hücreler, %70-80 yoğunluğa ulaştıklarında pasajlanmıştır.

SH-SY5Y hücrelerinin pasajlama işlemi;

Hücrelerin bulunduğu flasklardaki besiyeri, hücrelere dikkat edilerek serolojik pipet yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Hücreler üzerine, 4 ml PBS eklenmiş ve hücrelere zarar vermeyecek şekilde yıkılmıştır. 1-2 dk sonra PBS ortamdan uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin üzerine flask yüzeyinden ayrılmasını sağlamak için 1 ml %0,05 tripsin-EDTA solüsyonu eklenmiştir. Tripsinin etkisini gösterebilmesi için 37°C'ye ayarlı karbondioksit inkübatörüne konulan flaskta hücrelerin zeminden kalktığından emin oluncaya dek (~1-2 dk) beklenmiştir. Daha sonra tripsinin etkisini inhibe etmek amacıyla flaskta 4 mL besiyeri eklenmiştir. Pipet yardımıyla, flask tabanından kaldırılan hücreler 15 ml'lik santrifüj tüpüne toplanmış ve tüp, 1500 rpm'de 5 dk. süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonunda süpernatant atılarak hücre peleti üzerine 1 ml besiyeri eklenmiş ve pipetaj yapılarak hücrelerin medium içerisinde homojen olarak dağılması sağlanmıştır. Flaskların içerisine toplam 8 ml besiyeri eklenmiş ve 3 ayrı flaskta bir önceki basamaktaki hücre süspansiyonundan ekim yapılmıştır. Ekim yapılan flasklar, %95 nem ve %5 CO₂ olacak şekilde 37 °C'ye ayarlı, karbondioksit inkübatörüne konulmuştur.

3.4. SH-SY5Y Hücrelerinin Dondurulması

PBS ile yıkama sonrası yapılan tripsinizasyon işleminden sonra hücrelere 4 ml besiyeri eklenerek 15 ml'lik santrifüj tüp içerisine alınmış ve tüpler 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.

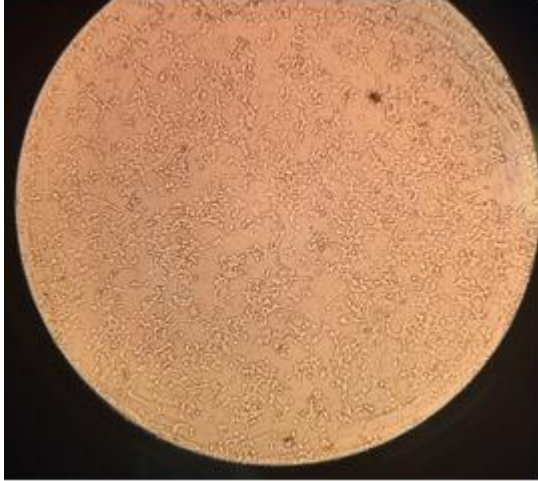
Santrifüj işlemi sonunda, süpernatant kısım uzaklaştırılmış ve kalan peletin yoğunluk durumuna göre peletin üzerine 9:1 oranında (%10'luk) Besiyeri: DMS" karışımı hazırlanarak eklenmiştir. Pipetaj yardımıyla hücreler homojen hale getirilmiştir. Homojen haldeki hücre süspansiyonu pipet yardımıyla 1,5 ml'lik kriyotüpler içerisine aktarılmış önce ön dondurma işlemi için -20C'de 4-6 saat bekletildikten sonra hücrelerin bulunduğu kriyotüpler -80°C'ye kaldırılmıştır.

3.5. SH-SY5Y Canlı Hücrelerin Sayımı

Tripan mavisi dışlama yöntemine göre SH-SY5Y hücrelerinin sayım işlemi yapılmıştır. Tripan mavisi boyasının çalışma prensibi, canlı hücrelerin membranından geçememesi ve sadece ölü hücrelerin membranlarından geçebilmesidir. Sonuç olarak, ölü hücreler bu boya ile mavi boyanmaktadır. Tripan mavisi ile karıştırılmış hücre süspansiyonu Neubauer sayım lamına aktarılarak, ışık mikroskobu altında sayım işlemi gerçekleştirilmektedir. Çalışmamızda, hücre sayım işlemi aşağıdaki gibi yapılmıştır.

Pasajlama işleminde anlatıldığı gibi tripsinizasyon işlemi sonrası hücrelere besiyeri eklenerek, 15 mL'lik santrifüj tüp içerisine alınmış ve 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre peletinin üzerine pelet miktarına göre (~2-5 ml) besiyeri eklenerek pipetaj işlemi ile homojenizasyon elde edilmiştir.

Hazırlanmış hücre süspansiyonundan 50 µl ve tripan mavisi boyasından 50 µl alınarak pipetaj yoluyla karışım hazırlanmıştır. Bu karışımdan, 10 µL alınıp Neubauer Lamına konularak ışık mikroskobu altında hücre sayıma gerçekleştirilmiştir. Bu veriler eşliğinde, bu alandaki tüm hücreler sayıldığında , 1 ml'deki yani 1mm³'deki hücre sayısı $N \times DF \times 10^4$ formülünden bulunmuş olmaktadır (DF: Dilüsyon faktörü,N: 1 mL deki hücre sayısı).



Şekil 3.1. Mikroskop altındaki adherent SH-SY5Y hücreleri

3.6. A β 1-42 Dozunun Belirlenmesi

A β 1-42'nin SH-SY5Y hücre hattındaki dozunun belirlenmesi için dört grup oluşturulmuştur. Bu dört grup için steril 96 kuyucuklu plaka hazırlanmıştır. Her grup için üç tekrar olacak şekilde toplamda 12'şer kuyucuk oluşturulmuştur.

- Grup A: Kontrol
 Grup B: A β 1-42 (1 μ M)
 Grup C: A β 1-42 (3 μ M)
 Grup D: A β 1-42 (10 μ M)

96 kuyucuklu plakaya her kuyucuk başına 5×10^3 hücre olacak şekilde SH-SY5Y hücreleri ekilmiştir. Hücrelerin kuyucuk tabanlarına tutunabilmeleri için 24 saat boyunca karbondioksit inkübatöründe inkübasyona bırakılmıştır. Her plakadaki, her bir grup için üçerli olacak şekilde çalışılmıştır. 24 saat sonra kuyucuklar içerisindeki besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Her bir kuyucukta 100 μ L total hacimde A β 1-42'nin finalkonsantrasyonu 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M olacak şekilde hücrelerin üzerine eklenmiştir. Dozların uygulandığı 96 kuyucuklu plakalar 37 °C, %95 nem ve %5 CO₂ olacak şekilde karbondioksit inkübatörüne konularak, 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

3.7. WST-1 İle Sitotoksisite Testi

WST-1 testi, suda çözülebilir bir bileşik olan {4-[3-(4-Iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonat} maddesinin, canlı hücreler tarafından formazan bileşinine indirilmesi prensibine dayanmaktadır. Çalışmamızda, sitotoksisite yöntemi için kolorimetrik bir yöntem olan WST-1 sitotoksisite testi kullanılmıştır. WST-1 sitotoksisite testi kitin temin edildiği firmanın belirlediği protokole göre gerçekleştirilmiştir.

İnkübasyona bırakılan plakalara 24 saatlik bekleme süresine göre WST-1 hücre proliferasyon kiti uygulanmıştır. İlgili inkübasyon sürelerinin sonunda, her bir kuyucuğa 10 µL WST-1 solüsyonundan eklenmiştir. Orbital çalkalayıcıda 96-kuyucuklu plakalar düşük hızda karıştırılmış ve karbondioksit inkübatöründe 4 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin bitiminde, mikropilaya okuyucuda 450 nm dalga boyunda ve 630 nm referans dalga boylarında okuma işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücre canlılığı yüzdesi her bir kuyucukta ölçülen optik dansite değerinin kontrol optik dansite değerine bölünmesi ve yüz ile çarpılması ile aşağıdaki formüle uygun olarak hesaplanmıştır.

Hücre Canlılık Yüzdesi = $\left[\frac{\text{Doz grubu Absorbansı}_{450-630}}{\text{Kontrol Grubu Absorbansı}_{450-630}} \right] \times 100$

WST-1 analizinden sonra, yukarıda belirtilen dozlar uygulanarak, inkübasyon süresi sonunda süpernatantlar elde edilmiş, BCA protein analizi ve western blot deneyleri için -80°C'ye kaldırılmıştır.

3.8. Amastatin ve Aβ 1-42'nin Uygulanması Sonucu SH-SY5Y Hücrelerinden Protein Eldesi

WST-1 ile Aβ 1-42'nin etkin dozu belirlendikten sonra literatür çalışmaları da baz alınarak 10 µM dozunda Amastatin uygulanmıştır (Kopf P. ve Campbell W. 2013). 6 kuyucuklu plakalara, kuyucuk başına 75×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır.

Ekim sonucu hücrelerin tutunması amacıyla plakalar karbondioksit inkübatöründe 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda aşağıdaki gruplar oluşturularak A β 1-42 ve Amastatin'in tekli ve kombine dozları SH-SY5Y hücrelerine uygulanmıştır.

- Grup A: Kontrol
Grup B: A β 1-42 (10 μ M)
Grup C: Amastatin (10 μ M)
Grup D: A β 1-42 (10 μ M) + Amastatin(10 μ M)

A β 1-42 ve Amastatin'in sırasıyla 10 μ M'lık tekli ve kombine dozları 6-kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna son hacim 2 ml olacak şekilde uygulanmıştır. Doz uygulanan 6-kuyucuklu plakalar 37 °C, %95 nem ve %5 CO² olacak şekilde karbondioksit inkübatöründe 24 saatlik inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki besiyerleri çekilerek atılmıştır. Her bir gruptaki hücrelerin üzerine 2 ml soğukdulbecco fosfat buffer salin (DPBS) eklenerek, 2-3 dk boyunca DPBS içerisinde bekletilmiştir. Bu basamak iki kez tekrarlanmıştır. Sürenin sonunda, DPBS'i uzaklaştırılan plakalar buz üzerine alınmış ve her bir kuyucuğa 500 μ L Ripa Liziz Tamponu eklenerek 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun sonunda her bir kuyucuktaki ripa solüsyonu içerisindeki hücreler ayrı ayrı hücre kazıyıcı ile kazınarak toplanmış ve 1.7 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne mikropipet yardımıyla aktarılmıştır. Tüpler buz içerisinde yarım saat bekletilmiş ve bu süre boyunca 10'ar dakikalık aralıklarla en az 15-20 kez pipetajlanmıştır. Yarım saatlik süre sonunda, tüpler 14000 rpm'de 15 dk boyunca +4°C'ye ayarlanmış soğutmalı santrifüjde santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Santrifüj işleminin sonunda süpernatantlar yeni mikrosantrifüj tüplerine aktarılmış ve -80°C'ye kaldırılmıştır.

3.9. Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Analizi

BCA protein analizi, temin etmiş olduğumuz ticari kitin firma tarafından belirtilmiş olan protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. BCA standartları, kitte belirtilen şekilde dH₂O ile dilüe edilerek 8 farklı konsantrasyon tüpü hazırlanmıştır.

İlk olarak BCA working reagent kitte belirtilen şekilde, BCA working reagent A ve B 50:1 oranında karıştırılarak hazırlanmıştır. Karışımın sonucunda yeşil renkte bir solüsyon elde edilmiştir. Steril, temiz, düz zeminli bir 96-kuyucuklu plakanın kuyucuklarına 25'er µL BCA standardı ve protein örneklerimizden konulmuştur. Standart ve örneklerin konulmasını takiben ilgili kuyucuklara 200 µL BCA working reagent eklenerek 30 sn boyunca orbital karıştırıcıda karıştırılmıştır. Ardından, 96-kuyucuklu plaka ışık görmeyecek şekilde kaplanmış ve 37°C'de 30 dk boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, plaka oda sıcaklığında soğuması bekletilmiştir. Bekleme süresinin ardından mikropilaka okuyucuda 562 nm absorbans değerinde ölçüm işlemi gerçekleştirilmiştir. Ölçüm işlemi sonucunda standartların absorbans değerlerinden kalibrasyon eğrisi grafiği çizilmiş ve örneklerimizdeki protein konsantrasyonları $y=ax+b$ denklemi baz alınarak hesaplanmıştır (y =absorbans değeri, x =konsantrasyon).

3.10. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) ve Western Blot Yöntemi

WB yöntemi öncesi; hazırlanan bu karışımlardan sonra ilk olarak Seperating jel ardından Stacking jel hazırlanmıştır. Jel hazırlanmadan önce Cleaver Scientific firmasının western blot sistemindeki jelin döküleceği camlar temizlenerek aparatına yerleştirilmiştir. 2 jel için Stacking ve Seperating jeller Tablo 3.1'de belirtildiği gibi hazırlanmıştır.

Tablo 3.1. Stacking jel ve Seperating jel hazırlanışı.

JEL İÇERİĞİ	SEPERATING JEL (%10)	STACKING JEL (%4)
Jel Çözeltisi	5 MI	0,75 mL
dH2O	6,5 mL	2,5 mL
Seperating Tamponu	3,75 mL	-
Stacking Tamponu	-	1,25 mL
%10 SDS	150 µL	0,1 mL
APS	150 µL	25 µL
Temed	15 µL	5 µL

Seperating jel karışımı hazırlandıktan sonra hızlı bir şekilde camlar arasına tek seferde serolojik pipet yardımıyla dökülmüş ve hava kabarcığının oluşmamasına dikkat edilmiştir. Seperating jelin üst kısmının düz olması ve havayla temasının kesilerek daha iyi polimerize olması için izopropanol eklenmiştir. Yaklaşık 1 saat içinde Seperating jelin polimerleştiğinden emin olduktan sonra izopropanol dökülerek uzaklaştırılmıştır. Üstte kalan miktar kurutma kâğıt yardımıyla alınmıştır. Stacking jel, serolojik pipetle cam üzerinde belirli olan sınır çizgisine kadar dökülmüştür. Kuyucuk oluşturmak için kullanılan tarak da bu çizgiye göre hizalanmıştır. Yaklaşık 45 dk sonra jelin donduğundan emin olununca tarak çıkarılmıştır. Oluşan kuyucuklar running tampon ile iyice yıkanmıştır.

Protein örneklerimiz ilgili kuyucuklara 7,5 µg olacak şekilde yüklenmiştir. Proteinleri yüklemede önce denatüre etmek amacıyla Laemmli Tamponu ile muamele edilerek 100°C'de 4 dakika kaynatılmıştır. Jelin ilk ve son kuyucuğuna marker, aradaki kuyucuklara da örnekler yüklenmiştir. Proteinler, 120 Volt, 20 mA'da 90 dk olarak yürütülmüştür.

Jeller çıkarıldıktan sonra stacking jel kısmı kesilerek atılmıştır. Kalan kısma uygun olarak PVDF membran kesilmiştir. Membran kullanılmadan önce %100 methanol içerisinde 5 dk bekletilerek aktifleşmesi sağlanmıştır. Transfer işleminde kullanılacak olan filtre kağıtları da transfer tamponu ile yıkanmıştır. Transfer tamponu soğuk olarak kullanılmıştır. Jel ve membranlar filtre kağıtları arasına yerleştirilmiş ve

yarı-ıslak transfer sisteminde 20 Volt, 600 mA olacak şekilde 80 dk boyunca transfer işlemi gerçekleştirilmiştir.

Transfer işleminden sonra membranlar dikkatlice alınarak kullanılacak olan antikorun özelliğine göre %3'lük BSA TBS-T/PBS-T çözeltisi içerisinde oda sıcaklığında 90 dk bloklama yapılmıştır. Bloklamanın ardından, "Mas1 ve β -aktin" primer antikorları kullanılarak 16 saat boyunca +4°C'de işaretlenmiştir. İşaretleme sonrası membranlar, PBS-T ile 6 dakikalık periyotta 3 kez yıkanmıştır. Membranlar, HRP-bağlı sekonder antikorda 90 dk boyunca işaretleme yapıldıktan sonra 6 dakikalık periyotta 3 kez PBS-T ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra membranın üzerini kaplayacak şekilde, ışıktan korunarak Enhanced Chemiluminescence (ECL) substrat uygulanmıştır. Protein bantları, membranların Licor görüntüleme sistemine yerleştirilmesiyle bilgisayar ortamında analiz edilmiştir.

3.11.Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELİSA)

Çalışmamızda Ang 1-7 ve Neprisilin düzeyleri ELİSA kitler aracılığı ile değerlendirilmiştir.

3.11.1.Ang 1-7 ELİSA

Elabscience (ABD) firmasından ticari kit elde edilmiş ve üretici firmanın belirttiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

Kitin içerisinden çıkan 1000 pg/ml'lik standarttan Standart & Örnek Dilüsyon tamponu kullanılarak seri dilüsyon ile 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63 pg/ml'lik standart konsantrasyonları hazırlanmıştır. Ayrıca, sadece tampon içeren 0 pg/ml'lik bir tüp de hazırlanmıştır. Tüm işlemler yukarıda verilen A β 1-42 ELİSA kitte uygulandığı şekilde protokol çerçevesinde belirtilen oranlarda standart solüsyonlar ve örnek kullanılarak yapılmıştır.

3.11.2.ACE2 ELİSA

ACE2 ELİSA deneyi için Elabscience (ABD) firmasından ticari kit elde edilmiş ve üretici firmanın belirttiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

Kitin içerisinde çıkan 25 ng/ml'lik standarttan Standart & Örnek Dilüsyon Tamponu kullanılarak seri dilüsyon ile 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.57, 0.79, 0.39 ng/ml'lik standart konsantrasyonları hazırlanmıştır. Tüm işlemler yukarıda verilen Aβ 1-42 ELİSA kitte uygulandığı şekilde protokol çerçevesinde belirtilen oranlarda standart solüsyonlar ve örnek kullanılarak yapılmıştır.

3.11.3. Neprisilin ELİSA

Enzim Bağlı İmmunosorbent Analizi (ELİSA) Çalışmamızda Neprisilin düzeyleri ELİSA yöntemi ile bakılmıştır. Neprisilin ELİSA için YL Biont (Çin) firmasından ticari kit elde edilmiş ve üretici firmanın belirttiği protokole göre işlem yapılmıştır. Kitin protokolü aşağıda özetlenmiştir.

Kitin içerisinde çıkan 2400 ng/L'lik standarttan, Standart & Örnek Dilüsyon tamponu kullanılarak seri dilüsyon ile 1200, 600, 300, 150, 75 ng/L'lik standart konsantrasyonları hazırlanmıştır. Ayrıca, sadece tampon içeren 0 pg/mL'lik bir tüp de hazırlanmıştır. Standart konsantrasyonlarda 50 µl alınarak kitin içerisinde çıkan striplerin ilgili kuyucuklarına, RİPA tamponu içerisinde bulunan örneklerimizden 40 µL alınmış stripte belirlenen kuyucuklara aktarılmış ve üzerine 10 µL Anti-neprisilin antikoru eklenmiştir. Standart ve örneklerin bulunduğu kuyucukların hepsine 50 µl Streptavidin-HRP solüsyonu eklenmiştir. Ardından, ELİSA plakası şeffaf, yapışkanlı etiket ile kapatılarak kısa bir süre orbital çalkalayıcıda bekletildikten sonra 37°C'de 60 dk inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda şeffaf, yapışkanlı etiket açılarak kuyucukların içinde bulunduğu sıvılar uzaklaştırılmış ve 30X konsantrasyondan 1X'e dilüe edilen yıkama tamponu kuyucuklara 350 µL olarak eklenmiştir. 1-2 dk'lık beklemenin ardından yıkama tamponu uzaklaştırılmıştır. Bu işlem 5 kez tekrarlanmıştır.

Yıkama işleminin ardından kuyucuklara kitin içerisinde bulunan Kromojen A solüsyonundan 50 µl eklenmiş, hemen ardından yine kitin içerisinde bulunan Kromojen

B solüsyonundan eklenerek, ışıktan uzak tutulacak şekilde mikrolaka 37°C'de 10 dk inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyonun ardından kuyucuklara 50 µL Stop Solution eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Vakit kaybetmeden mikrolaka okuyucuda (BioTek, ABD), ELİSA plaka 450 nm'de okutularak, standart ve örneklerin absorbans değerleri elde edilmiştir.

Okuma işleminin ardından Excel (Microsoft, ABD) programı yardımıyla cihazın absorbans değerleri 0 ng/L'deki absorbans değerlerinden çıkartılarak normalizasyon yapılmış ve standartların absorbans değerlerinden lineer regresyon eğrisi çizilerek örneklerimizin konsantrasyonları hesaplanmıştır.

3.12. İstatistiksel Analiz

Değerler ortalama \pm standart deviasyon olarak gösterilmiştir. Tüm analizlerde SPSS 10.0 kullanılarak istatistiksel analiz hesaplama yapıldı. İstatistiksel analiz sonucu $p < 0.05$ olan sonuçlar anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1.Hücre Canlılığı Değerlendirmesi

A β 1-42'nin 1 μ M, 3 μ M ve 10 μ M üç farklı dozunun 24 saatteki etkinliği araştırılmıştır. İnkübasyona bırakılan 96-kuyucuklu plakalara 24, 72, 96 saat bekleme sonrası elde edilen sonuçlara göre 24 saatlik sonuçlar esas alınmış ve WST-1 cell proliferasyon kiti uygulanmıştır.

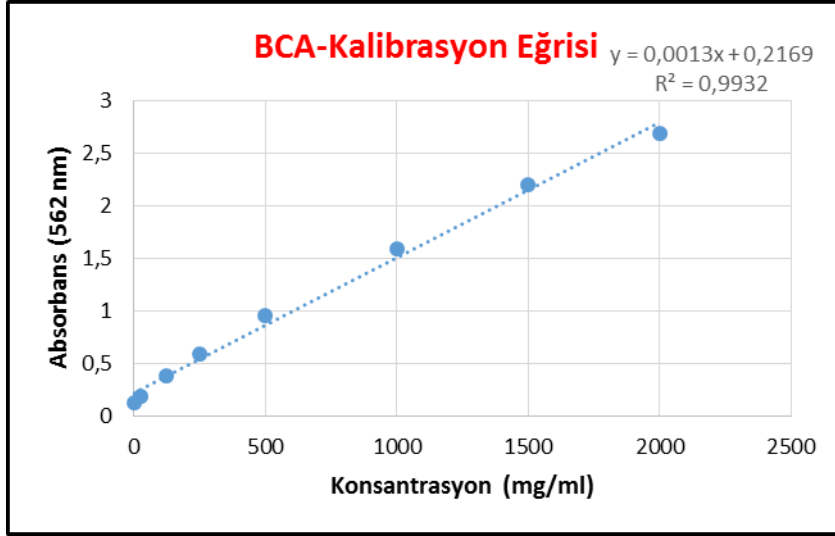
İnkübasyon süresinin bitiminde, mikropilaka okuyucuda 450 nm dalga boyundave 630 nm referans dalga boylarında okuma işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücre canlılığı yüzdesi her bir kuyucukta ölçülen optik dansite değerinin kontrol optik dansite değerine bölünmesi ve yüz ile çarpılması ile aşağıdaki formüle uygun olarak hesaplanmıştır.

SH-SY5Y hücre hattında A β 1-42 için 24 saatteki verileri 10 μ M dozu için anlamlı çıktığından bu doz ve süre esas alınarak çalışma gruplarına uygulanmıştır.

4.2.Bicinchoninic Acid (BCA) protein Analizi

BCA protein analizi temin etmiş olduğumuz ticari kitin firma tarafından belirtilmiş olan protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. BCA standartlarının 562 nm dalga boyundaki absorbans değerlerinin ortalaması alınarak BCA kalibrasyon eğrisi (Şekil 4.1) çizilmiştir. Eğim grafiğine göre örneklerimizdeki protein konsantrasyonları $y=ax+b$

denklemleri baz alınarak hesaplanarak protein konsantrasyonları belirlenmiştir. (Tablo 4.2)



Şekil 4.1. BCA-Kalibrasyon eğrisi ve eğimi

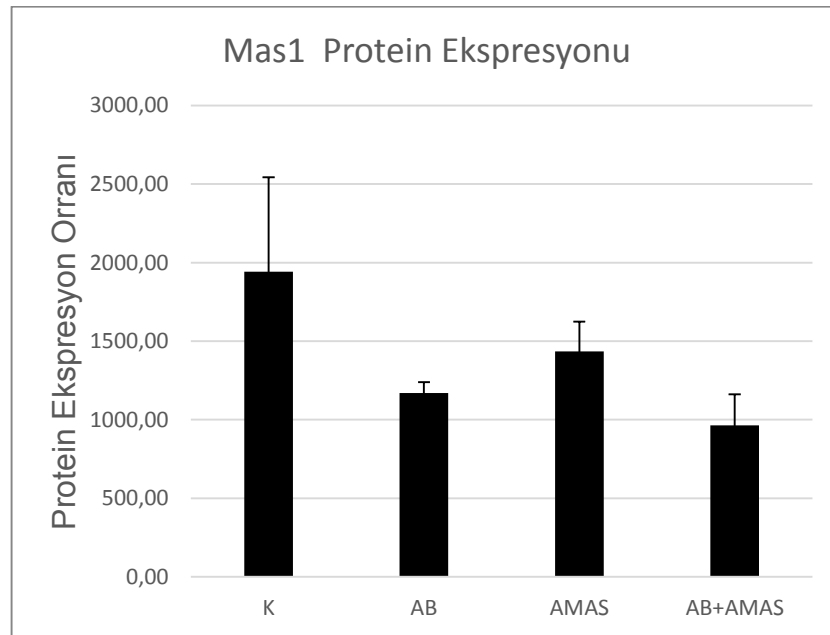
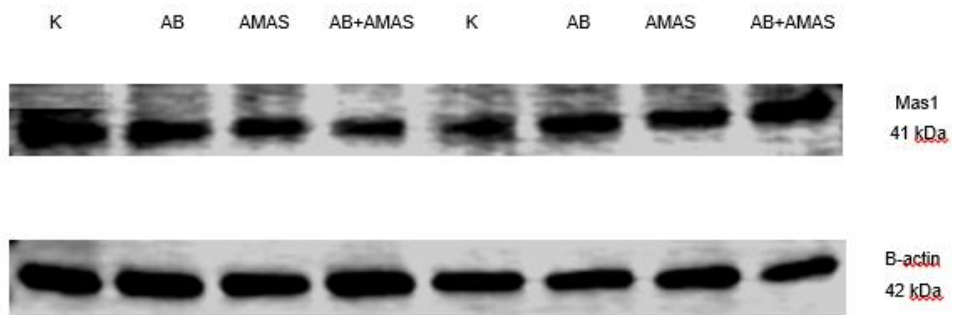
Tablo4. 2. Protein örneklerinin 562 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ve BCA standartlarına göre oluşturulan Şekil 4.1.deki eğime göre karşılık gelen protein konsantrasyonları

	ÖRNEKLER	Protein Konsantrasyonu (mg/mL)
1	KONTROL	515,7179487
2	Aβ 1-42	503,4102564
3	Amastatin	384,6923077
4	Aβ 1-42 + Amastatin	529,5641026

BCA analizi sonucu örneklerimizde yeterli protein saptanmış ve WB analizlerinde protein örneklerimiz kuyucuklara 7,5 µg olacak şekilde yukarıda verilen protein konsantrasyonları baz alınarak ve hesaplama yapılarak yüklenmiştir.

4.3. Western Blot Sonuçları

SH-SY5Y hücre kültürlerimizden elde edilen AH modelinde MasR antikorunu olarak Mas1, sekonder antikor olarak β -actin antikorları çalışılmıştır. Tüm çalışmalarda elde edilen piksel dansite oranları β -actin'e göre normalize edilerek hesaplanmıştır.



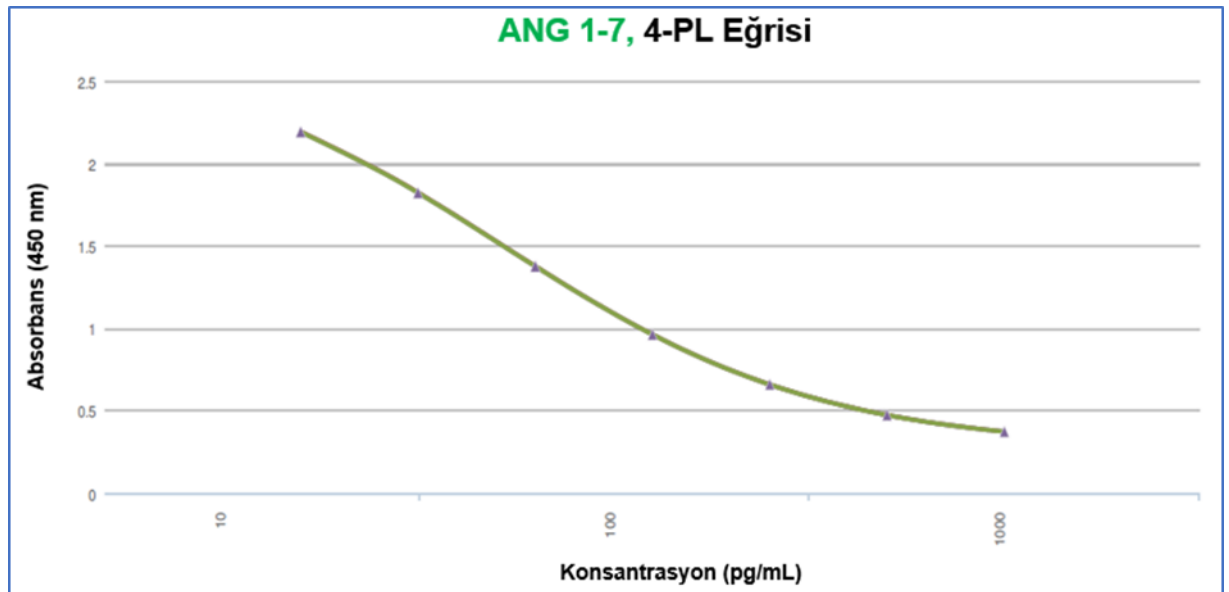
Şekil 4.2. Kontrol grubu, tek başına sırasıyla A β 1-42, Amastatin ve A β 1-42+Amastatin verilerek hazırlanan hücre kültüründen elde edilen lizatlarda primer Mas1 antikoruna ait elde edilen görüntüler ve grafikler.

SHSY5Y hücre kültürlerinden elde edilen hücre lizatlarında, amastatin verilen hücrelerde Mas 1 reseptör ekspresyonu kontrole göre yalnızca %7.45 oranında bir azalma göstermiştir. A β 1-42 uygulanan hücrelerde ise Mas 1 reseptör ekspresyonu kontrole göre %18 oranında azalmıştır. Amastatin + A β 1-42 birlikte verildiğinde ise Mas 1 reseptör ekspresyonu kontrole göre %43 oranında azalmakta olup, bu grupta en fazla azalma gözlenmiştir.

4.4. ELİSA Sonuçları

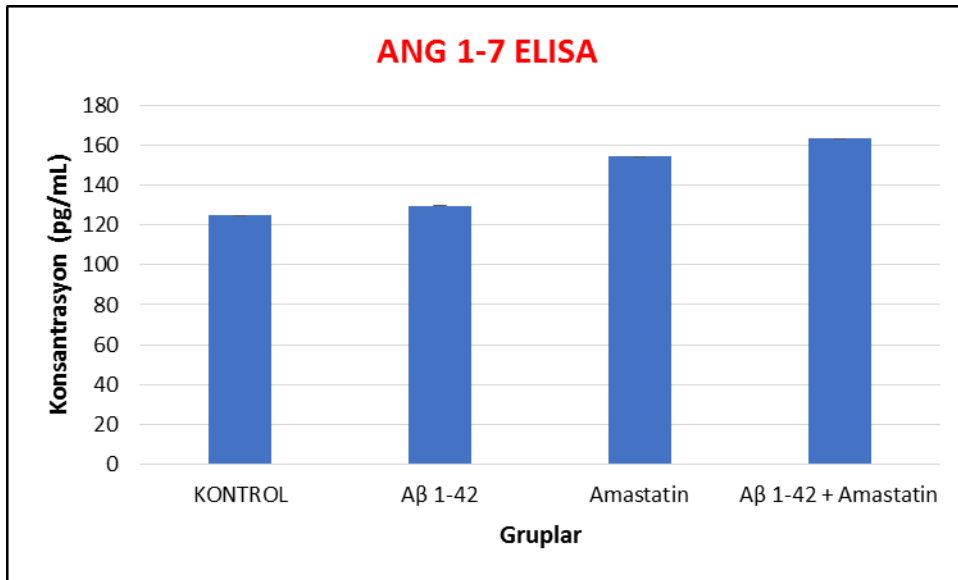
4.4.1. Ang 1-7 ELİSA

Kontrol grubunda Ang 1-7 düzeyi 124pg/mL olarak saptandı. Bu düzey A β 1-42 ile belirgin şekilde değişmedi (129pg/mL). Ancak yalnızca Amastatin verildiğinde Ang 1-7 seviyelerinin belirgin şekilde arttığı gözlemlenmiştir (154 pg/mL). Amastatinin bu etkisi A β 1-42 ile değiştirilmemiştir (163 pg/mL)



Şekil 4.3. Ang 1-7 ELISA 4-PL Grafiği

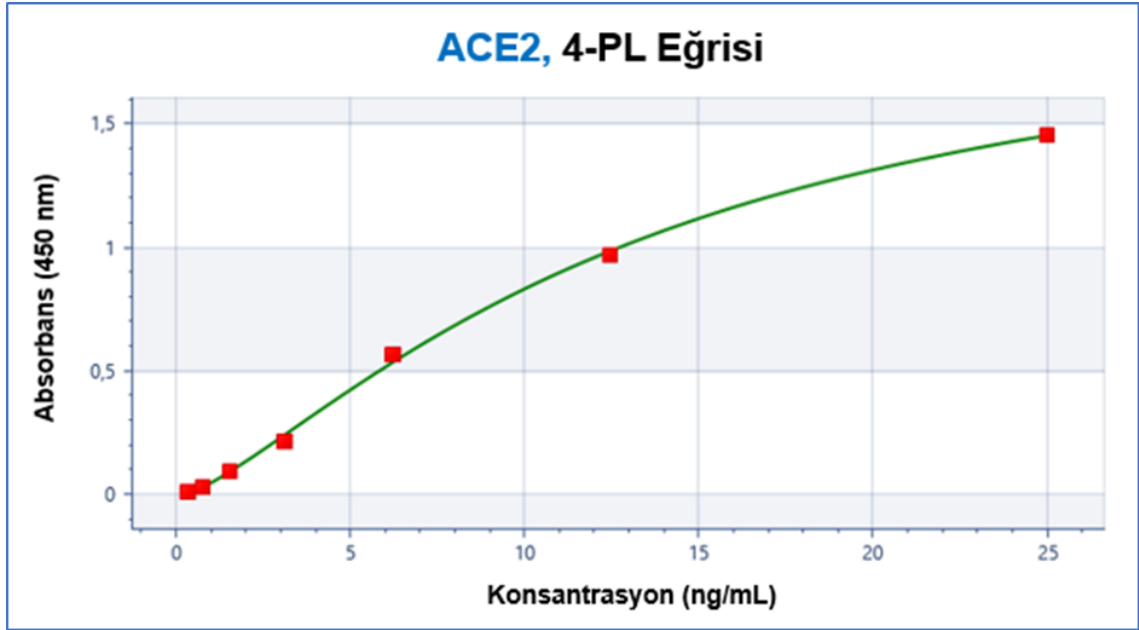
GRUPLAR	KONSANTRASYON	KONS. x DF (5)
Kontrol	24,955	124,775
A β 1-42	25,909	129,545
Amastatin	30,847	154,235
A β 1-42 + Amastatin	32,667	163,335



Şekil 4.4. ELISA kit aracılığı ile ölçülen Ang 1-7'nin deney gruplarından elde edilen konsantrasyon grafiği (pg/mL)

4.4.2. ACE2 ELİSA

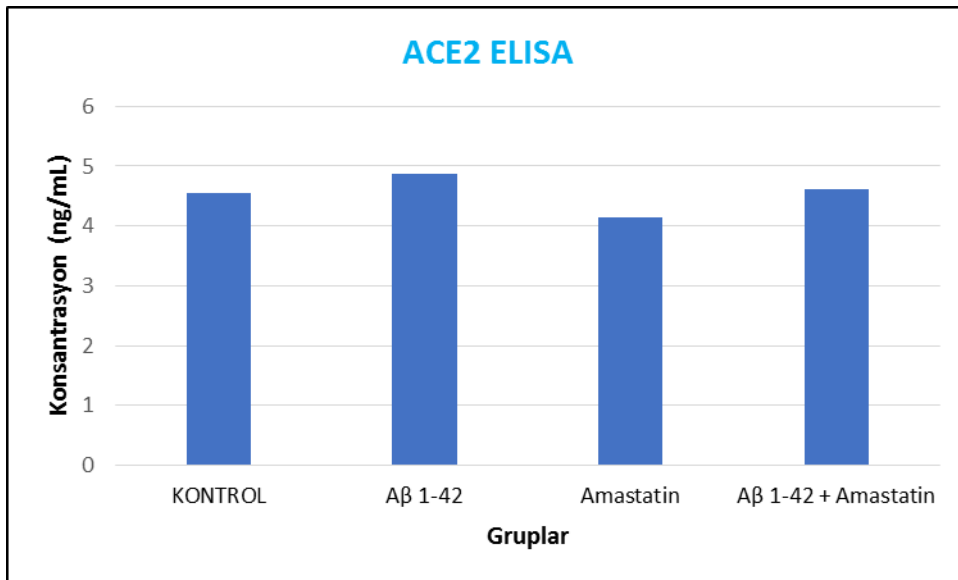
Kontrol grubunda ACE2 düzeyi 4.54ng/mL düzeyinde iken, A β 1-42 uygulaması ile ACE2 düzeyi %7 oranında artmıştır (4.86ng/mL). Amastatin verildiğinde ise ACE2 düzeyi kontrol düzeyinin altına düşmüş ve %9 oranında azalmıştır. Amastatin ve A β 1-42 birlikte uygulandığında kontrole göre %1 lik bir azalma söz konusudur.



$$y = 2,06448 + ((-0,0112551 - 2,06448) / (1 + (x/13,1775)^{1,36846}))$$

R²: 0,999

Şekil 4.5. ACE2 ELISA 4-PL Grafiği



Şekil 4.6. ELISA kit aracılığı ile ölçülen ACE2'nin deney gruplarından elde edilen konsantrasyon grafiği (ng/mL)

4.4.3. Neprisilin ELISA

Neprisilin ELISA kiti kullanılarak yapılan çalışmalarda, kullandığımız kitin analoğu 5ng/L-2000 ng/L arasında olduğundan, örneklerimizden elde edilen sonuçların bu değerler arasında olmamasından dolayı veri elde edilememiştir.

5. TARTIŞMA

Human neuroblastoma (SH-SY5Y) hücreleri sinaptik yapılar, fonksiyonel aksonal vezikül transportu, nükleer protein, nöron spesifik β -tubulin ve sinaptik protein Sv2 gibi nörospesifik proteinler eksprese etmesi nedeni ile in vitro AH modeli olarak kullanılmaktadır (Carolindah MN vd, 2013). Bu hücre hattı AH ilerlemesini ve altta yatan mekanizmaların anlaşılması için kullanılmakta olup, amiloid peptidlerinin in vitro toksik etkileri en yaygın olarak SH-SY5Y hücre hattından türetilmiş insan nöroblastomu kullanılarak incelendiği (Krishtal J vd, 2017), toksik A β uygulandığında nörodejenerasyon göstermekte olduğu gösterilmiştir (Zhang L. vd. 2010).

AH'da A β peptid varyantları içerisinde en yaygın kullanılan A β 42 monomerleri kolayca nörotoksik oligomer formları oluşturur (Jarrett JT vd, 1993). A β 40, A β 'nin %90'ını oluşturan ve beyin omurilik sıvısında en fazla bulunan izoform olmasına rağmen özellikle beyinde baskın, çözünmeyen amiloid izoformu A β 42'dir (Iwatsubo T vd, 1994). Bu peptid yapısal olarak öncül APP'nin proteoliziyle üretilir ve yayılır. 39-43 kalıntıdan oluşan bu peptid N ve C terminal ucunun heterojenliği ve toksisitesiyle ünlüdür. Böylece APP metabolizmasındaki bozuklukların ciddi patofizyolojik sonuçları olabilir. AH ve diğer nörodejeneratif hastalıklarda hücre içi Ca⁺² homeostazı bozulmuştur ve hücre içindeki Ca⁺² seviyelerinin artışı metabolik kaskadları tetikleyerek sinaptik disfonksiyona ve hücre ölümüne liderlik eder (Mattson MP 2007, Berridge MJ vd 1998). Bu zararlı etkinin esas olarak çözünebilir A β peptidleri tarafından indüklendiği tespit edilmiştir (McLean CA vd 1999, Wang ,J vd 1999).

ACE2/ Ang 1-7/ Mas ekseni RAS'ın az bilinen enzimatik yolağıdır (Santos RA. vd, 2000). Beyindeki nöron, mikroglia ve vasküler endotel hücrelerde MasR eksprese edilmiştir (Regenhardt RW vd, 2014). Mas1, Ang 1-7 için reseptörünü kodlar. Son çalışmalarda, MasR ekspresyonu göstermeyen farelerde, Ang 1-7 ve MasR'nün normal

cisim tanıma işlevi için gerekli olduğu ve hipokampusta Mas reseptör blokajının cisim tanıma işlevini bozduğu (Lazaroni 2012), Ang 1-7'nin CA1 hücrelerinde LTP'leri güçlendirdiği ve bu etkinin Mas antagonizması yolu ile gerçekleştiği bildirilmiştir (Hellner K. vd, 2005). Mas reseptör aktivasyonu ve ligandı olan Ang 1-7'nin bellek ve bilişsel işlevlerde yararlı olabileceği beyin dokusunda nöroprotektif etki, beyindeki kan akışının hızlanması, inflamatuvar etki ve serbest radikallerin azalmasından yola çıkarak öne sürülmüştür (Hay M. vd, 2017, Chen JL. vd 2017). Ang 1-7'nin PI3K/Akt yolağı ile hipotalamusta MasR aktivasyonunu sağlayarak nöroprotektif olduğu bildirilmiştir (Gironacci MM. Vd, 2014). Yeni çalışmalarda dolaşımdaki RAS'tan kaynaklanan kronik rahatsızlıklardaki inflamatuvar belirteçler ile bilişsel bozulma arasında anlamlı bir ilişki öne sürülmüş olup (Athilingam P vd, 2013) ; Ang 1-7'nin inflamatuvar olaylar üzerindeki olumlu etkisi sınırlı sayıda çalışmada yer almaktadır (Açıkalin Ö vd, 2016).

Deneysel çalışmamızda güçlü A β agregat inhibitör aktivitesi gösteren metabolik streptomycetes ekstraktından hazırlanmış bir aminopeptidaz olan Amastatin kullanılmıştır. Aminopeptidaz A inhibitörleri A β 'nin N terminalini parçalamaktadır ve A β agregasyonunun N terminal rolünde görevli aminopeptidaz A bağlı bir membran olan çinko metolloproteaz A β 'nin N terminali ve starosporin ile uyarılmış kaspaz 3 aktivitesini değiştirmektedir (Sevalle J vd, 2009). EC33 ve p1302 adlı iki ayrı APA inhibitörünün Sevalle ve arkadaşları (2009) tarafından yapılan çalışmada serbest A β yeniden kazanımını sağladığı ancak APA'nın aşırı ekspresyonu durumunda serbest A β üretimini azalttığı, ancak A β suprafizyolojik dozlar üzerinde olduğunda inhibitörlerin biyolojik olarak inert kaldığı belirtilmiştir. Yine aynı çalışma kapsamında APA inhibisyonu yolu ile açığa çıkan serbest A β 'ların nöroprotektif olabileceği söylenmiştir.

Amastatin RAS yolağında APA inhibitör etkisi ile Ang I ve Ang II metabolizmasında yer alan yolakları inhibe eder. Beyin RAS'ının anahtar enzimlerinden biri olan APA, N terminal ucundaki aspartat kalıntısını parçalayarak Ang II'yi Ang III'e dönüştürür (Li L vd, 1997). Ang III'den ise oluşan Ang IV yine nöronal gelişim için gereklidir. Ancak APA inhibisyonu yolu ile Ang I ve Ang II metabolizması ACE2 yolağına kayabilir. ACE2 etkisi ile Ang1-7 oluşmaktadır ki literatürde Ang 1-7'nin nöroprotektif olduğunu gösteren sınırlı da olsa yayınlar mevcuttur (Chen JL. vd 2017, Farag E. vd 2017).

Çalışmamızda bir APA inhibitörü olan Amastatin'in Ang 1-7 düzeylerine olan etkisi incelendiğinde, en fazla Amastatin verilen grupta Ang 1-7 seviyesinde artış saptanmıştır. Amastatin'in etkisi A β 1-42 ile birlikte verildiğinde değişmemiştir. A β üretimi fazla olduğunda APA inhibitörlerinin etkisi azalabilir ya da A β 'ler çok yüksek konsantrasyonlara çıktığında farklı etkiler gösterebilir (Sevalle J vd, 2009). Amastatin, Ang 1-7 düzeylerinde belirgin artışa neden olmasına karşın, MasR'leri üzerindeki etkisi kontrolden farklı değildir. Dolayısı ile Amastatin, Ang1-7 düzeylerinde artışa neden olmakla birlikte MasR'lerinde herhangi bir değişiklik yapmamaktadır. Ortaya çıkan Ang 1-7'nin etkisinin APA inhibisyonundan bağımsız olarak PI3K/Akt yoluyla ile MasR aktivasyonunu sağlaması olabilir (Gironacci MM. vd 2014).

A β 1-42'nin Ang 1-7 ve ACE2 düzeyleri üzerine belirgin bir etkisi olmamasına rağmen MasR ekspresyonunu % 18 oranında azaltması, A β 1-42'nin daha çok MasR düzeyinde etki gösterdiğini ortaya koyabilir. İlginç olarak Amastatin varlığında A β 1-42'nin etkisi %43 oranında MasR ekspresyonunu azaltma yönündedir. Bu farklılık Amastatin ya da uygulanan A β 1-42 konsantrasyonlarından kaynaklanabilir.

Her ne kadar ACE2 aktivitesinin yaşa bağlı olarak azaldığını gösteren ve ACE1/ACE2 oranının AH anlamlı olarak yükseldiğini belirten çalışmalar olsa da (Kehoe P vd, 2016) bu çalışmada A β 1-42'nin SHSY5Y hücrelerinde ACE2'yi azaltmadığını hatta %7 oranında arttırdığını saptadık. Ancak çalışmamızda ACE1 düzeyleri ölçülmemiştir.

6.SONUÇ

Çalışmamızda bir APA inhibitörü olan Amastatin'in etkisi A β 1-42 verilerek in vitro AH modeli oluşturulan SHSY5Y hücre hattında araştırıldı.

In vitro AH modeli oluşturulan SHSY5Y hücrelerinde Amastatin, Ang 1-7 seviyelerinde artışa neden olmaktadır. In vitro AH modeli oluşturulan SHSY5Y hücrelerinde Amastatin, MasR protein ekspresyonunu etkilememektedir.

In vitro AH modeli oluşturulan SHSY5Y hücrelerinde Amastatin, ACE2 düzeylerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamakla birlikte ACE2 seviyelerinde %9'luk bir azalmaya neden olmaktadır.

MasR protein ekspresyonunu A β 1-42 belirgin olarak azaltmakla birlikte, bu etki Amastatin varlığında daha da artmaktadır. A β 1-42 'nin Ang1-7 seviyeleri üzerine direkt bir etkisi yoktur. Amastatin'in Ang 1-7 düzeylerine olan etkisi A β 1-42 varlığında değişmemektedir. SHSY5Y hücrelerine A β 1-42 verilmesi ACE2 seviyelerini belirgin olarak değiştirmemekle birlikte %7 oranında artırmaktadır.

Sonuç olarak, APA inhibitörü olan Amastatin Ang 1-7 seviyelerini artırmakla birlikte MasR'ü üzerine olan etkisi çalışılan konsantrasyonda (10 μ M) gözlenmemiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre gerek Amastatin ve gerekse A β 1-42'nin beyin RAS yolağı ile etkileştiği ve ayrıca APA inhibisyonunun A β 1-42 üzerinde modifiye edici etkisi olduğu sonucuna varılmıştır. Bu nedenle AH fizyopatolojisinin aydınlatılabilmesi için beyin RAS alanında çalışmalar yapılmasına ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

Açıkalin Ö, Bölükbaşı Hatip FF, Tan RF, Hatip-Al-Khatib I” Effect of Angiotensin-(1-7) on Aortic Response, TNF- α , IL-1 β and Receptor for Advanced Glycation Endproduct in Rat's Adjuvant-Induced Arthritis”. **Pharmacology**, 2016; 97(5-6):207-217.

Al-Khatib İ., Hatip F. ve Matsunaga Y. The Protective Tributary Angiotensin Members of Renin-Angiotensin System Display Beneficial Effects in the Central Nervous System Disorders. **Remedy Publications LLC**. 2018.

Ashmun, R.A.; Shapiro, L.H.; Stephen C. Peiper, S.C. J. **Clin. Invest.** 1989, 83, 1299.

Atilingam P, Daoust RF, Miller L, Chen L. Cognitive profile in persons with systolic and diastolic heart failure. **Congest Heart Fail.** 2013 Jan-Feb;19(1):44-50.

Au R., Piers R.J., Lancashire L. Back to the future: Alzheimer's disease heterogeneity revisited. **Alzheimers Dement.** 2015;1:368

Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. *Alzheimer's Disease*. **Lancet** .2011;377(9770):1019-31.

Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P. Calcium—a life and death signal. **Nature**. 1998;395:645–648.

Boitard, S, Marc, Y, Keck M, Mougnot N, Agbulut O, Balavoine F, Llorens-Cortes C. Brain renin-angiotensin system blockade with orally active aminopeptidase A inhibitor prevents cardiac dysfunction after myocardial infarction in mice. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology** 2019 ;127: 215-222.

Bozoki AC, Korolev IO, Davis NC, Hoisington LA, Berger KL. Disruption of limbic white matter pathways in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a DTI/FDG-PET study. **Hum Brain Mapp** 2012; 33.

Braak H, Thal DR, Ghebremedhin E, Del Tredici K. Stages of the pathologic process in Alzheimer disease: age categories from 1 to 100 years. **J Neuropathol Exp Neurol** 2011; 70: 9609.

Braga VA. Differential brain angiotensin-II type I receptor expression in hypertensive rats. **J Vet Sci**. 2011 Sep; 12(3):291-3.

Bunnemann B., Fuxe K., Metzger R., “Autoradiographic localization of mas proto-oncogene mRNA in adult rat brain using in situ hybridization,” **Neuroscience Letters**, vol. 114, no. 2, pp. 147–153, 1990.

Carolindah MN, Rosli R, Adam A, Nordin N. An Overview Of In Vitro Research Models For Alzheimer's Disease (AD). **Regenerative Research** 2(2) 2013 8-13.

Chappell M. C., Brosnihan K. B., Diz D. I. , ve Ferrario C. M., "Identification of angiotensin-(1-7) in rat brain. Evidence for differential processing of angiotensin peptides," **Journal of Biological Chemistry**, 1989; vol. 264, no. 28, pp. 16518–16523.

Chen JL, Zhang DL, Sun Y, Zhao YX, Zhao KX, Pu D, Xiao Q. Angiotensin-(1-7) administration attenuates Alzheimer's disease-like neuropathology in rats with streptozotocin-induced diabetes via Mas receptor activation. **Neuroscience**. 2017 Mar 27;346:267-277.

Ciobica A, Bild W, Hritcu L, Haulica I. Brain renin-angiotensin system in cognitive function: Pre-clinical findings and implications for prevention and treatment of dementia. **Acta neurologica Belgica**. 2009; 109(3):171-80.

Danielsen, E. M., Noren, O., Sjostrom, H., Ingram, J., and Kenny, A. J. **Biochem. J.** 1980; 189, 591–603.

Dasgupta C, Zhang L. Angiotensin II receptors and drug discovery in cardiovascular disease. **Drug Discov Today**. 2011 Jan; 16(1-2):22-34.

Deschepper C. F., Bouhnik J., ve Ganong W.F. "Colocalization of angiotensinogen and glial fibrillary acidic protein in astrocytes in rat brain," **Brain Research**, vol. 374, no. 1, pp. 195–198, 1986.

Diz D. I., "Approaches to establishing angiotensin II as a neurotransmitter revisited," **Hypertension**, vol. 47, no. 3, pp. 334–336, 2006.

Domenig O, Manzel A, Grobe N, Königshausen E, Kaltenecker C, Kovarik J, Stegbauer J, Gurley S, Oyen D, Antlanger M, Bader M, Santos D, Santos R, Elased K, Saemann M, Linker R, Poglitsch M. Nephilysin is a Mediator of Alternative Renin-Angiotensin-System Activation in the Murine and Human. Kidney. **Scientific Reports**; 6.2016.

Donoghue M., Hsieh F., Baronas E. "A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9," **Circulation Research**, vol. 87, no. 5, pp. E1–9, 2000.

Elias M.F., Beiser A., Wolf P.A., Au R., White R.F., D'agostino R.B. The preclinical phase of Alzheimer disease: a 22-year prospective study of the Framingham Cohort. **Arch Neurol**. 2000;57:808–813.

Farag E, Sessler D, Ebrahim Z, Kurz A, Morgan J, Ahuja S, Maheshwari K, Doyle D. The renin angiotensin system and the brain: New developments. **Journal of Clinical Neuroscience**.2017;s:1-8.

Freund M, Walther T, von Bohlen und Halbach O. Immunohistochemical localization of the angiotensin-(1-7) receptor Mas in the murine forebrain. **Cell Tissue Res**. 2012 Apr;348(1):29-35.

Gard P, Fidalgoa S ,Lotterb I , Richardsonc C , Farinad N , Rustede J, Tabetd N. Changes of renin-angiotensin system-related aminopeptidases in early stage Alzheimer's disease. **Experimental Gerontology**; 2017:1-7.

de Gasparo M, Speth RC, Baltatu OC, Vanderheyden P. Brain RAS: Hypertension and Beyond. **Int J Hypertens**. 2013; 2013():157180.

Giulia Chiabotto. Aminopeptidase A. *Flipper e nuvola*.2011.

Gironacci MM, Cerniello FM, Longo Carbajosa NA, Goldstein J, Cerrato BD. Protective axis of the renin-angiotensin system in the brain. **Clin Sci** (Lond);2014 127:295–306.

Goessler K, Cornelissen V, Polito M. Effect of exercise training on the renin-angiotensin-aldosterone system in healthy individuals: A systematic review and meta-analysis. *Hypertension Research* (2015), 1–8.

Gouras GK, Olsson TT, Hansson O. β -Amyloid peptides and amyloid plaques in Alzheimer's disease. **Neurotherapeutics**. 2015 Jan; 12(1):3-11.

Guy J. L., Lambert D. W., Warner F. J., Hooper N. M. Ve Turner A. J., “Membrane-associated zinc peptidase families: comparing ACE and ACE2,” **Biochimica et Biophysica Acta**, vol. 1751, no. 1, pp. 2–8, 2005.

Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide .**Nature reviews** 2007; 8:101-12.

Hay M, Vanderah TW, Samareh-Jahani F, Constantopoulos E, Uprety AR, Barnes CA, Konhilas J. Cognitive impairment in heart failure: A protective role for angiotensin-(1-7). *Behav Neurosci*. 2017 Feb;131(1):99-114.

Hellner K, Walther T, Schubert M, Albrecht D, Angiotensin-(1–7) enhances LTP in the hippocampus through the G-protein-coupled receptor Mas. **Molecular and Cellular Neuroscience** 2005;s: 427-435.

Hendrie HC, Ogunniyi A, Hall KS. (2001). Incidence of dementia and Alzheimer disease in 2 communities: **Yoruba residing in Ibadan, Nigeria, and African Americans residing in Indianapolis**, Indiana. *JAMA*, 285: 739–47.

Holappa M., Vapaatalo H., Vaajanen A. Many Faces of Renin-angiotensin System - Focus on Eye. *The Open Ophthalmology Journal*. 2017. 122-142 ; Volume 11.

Holtzman DM, Morris JC, Goate AM. Alzheimer's disease: the challenge of the second century. **Sci Transl Med** 2011; 3: 77sr1.

Hy LX, Keller DM. (2000). Prevalence of AD among whites: a summary by levels of severity. **Neurology**, 55: 198–204.

Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y. Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). **Neuron**. 1994 Jul; 13(1):45-53.

Jack CR, Petersen RC, Xu YC, Waring SC, O'Brien PC, Tangalos EG, et al. Medial temporal atrophy on MRI in normal aging and very mild Alzheimer's disease. **Neurology** 1997; 49: 78694.

Jackson L, Eldahshan W, Fagan SC, Ergul A. Within the Brain: The Renin Angiotensin System. **Int J Mol Sci**. 2018 Mar 15; 19(3).

Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT Jr. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry*. 1993 May 11; 32(18):4693-7.

Kakinuma Y., H. Hama, F. Sugiyama., "Impaired blood-brain barrier function in angiotensinogen-deficient mice," *Nature Medicine*, vol. 4, no. 9, pp. 1078–1080, 1998.

Karran E, Mercken M, De Strooper B. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2011; 10: 698–712.

Kehoe P., Wong S., Mulhim N., Palmer L, Miners J. Angiotensin-converting enzyme 2 is reduced in Alzheimer's disease in association with increasing amyloid- β and tau pathology. *Alzheimer's Research & Therapy*. 2016, 8:50.

Khanahmadi M, Farhud D ve Malmırm. Genetic of Alzheimer's Disease: A Narrative Review Article. *Iran J Public Health*. 2015 Jul; 44(7): 892–901.

Kim J, Onstead L, Randle S, Price R, Smithson L, Zwizinski C, Dickson DW, Golde T, McGowan E. Abeta40 inhibits amyloid deposition in vivo. *J Neurosci*. 2007 Jan 17; 27(3):627-33.

Kopf P, Campbell W. Endothelial Metabolism of Angiotensin II to Angiotensin III, not Angiotensin (1–7), Augments the Vasorelaxation Response in Adrenal Cortical Arteries. *Endocrinology*, Volume 154, Issue 12, 1 December 2013, Pages 4768–4776.

Krishtal J, Bragina O, Metsla K, Palumaa P, Tõugu V (2017) In situ fibrillizing amyloid-beta 1-42 induces neurite degeneration and apoptosis of differentiated SH-SY5Y cells. *PLoS ONE* 12(10)

Lazaroni TL, Raslan AC, Fontes WR, de Oliveira ML, Bader M, Alenina N, Moraes MF, Dos Santos RA, Pereira GS. Angiotensin-(1-7)/Mas axis integrity is required for the expression of object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem*. 2012 Jan; 97(1):113-23.

L Li, Q Wu, B L Barnoski, M D Cooper. High-resolution genetic map of the human glutamyl aminopeptidase gene (ENPEP). *Genomics*, 43(3), 1997-8-1.

Mann DM. Pyramidal nerve cell loss in Alzheimer's disease. *Neurodegeneration* 1996; 5: 4237.

Marr R, Hafez D. Amyloid-beta and Alzheimer's disease: the role of neprilysin-2 in amyloid-beta clearance. *Front Aging Neurosci*. 2014; 6: 187

Mattson MP. Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell*. 2007;6:337–350.

Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, Munsell L, Kasten T, Morris JC, Yarasheski KE, Bateman RJ. Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science*. 2010 Dec 24; 330(6012): 1774.

McKinley MJ, Albiston AL, Allen AM, Mathai ML, May CN, McAllen RM, Oldfield BJ, Mendelsohn FA, Chai SY. The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003 Jun; 35(6):901-18.

McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI, Masters CL. Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1999;46:860–866.

Meraz-Rios MA, Lira-De Leon KI, Campos-Pena V, De Anda-Hernandez MA, Mena-Lopez R. Tau oligomers and aggregation in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2010;112:1353-67.

Migaud, M., Durieux, C., Viereck, J., Soroca-Lucas, E., Fournie-Zaluski, M. C., and Roques, B. P. (1996) *Peptides (N. Y.)* 17, 601–607.

Mogi M, Iwanami J, Horiuchi M. Roles of Brain Angiotensin II in Cognitive Function and Dementia. *International Journal of Hypertension*.2012; s:7.

Murphy MP, LeVine H 3rd. Alzheimer's disease and the amyloid-beta peptide. *J Alzheimers Dis*. 2010; 19(1):311-23.

Murray MM, Bernstein SL, Nyugen V, Condron MM, Teplow DB, Bowers MT. Amyloid beta protein: Abeta40 inhibits Abeta42 oligomerization. *J Am Chem Soc*. 2009 May 13; 131(18):6316-7.

Nakagawa P, Sigmund C, How Is the Brain Renin–Angiotensin System Regulated?. *Hypertension* 2017;70:10-18.

Norfray JF, Provenzale JM. Alzheimer's disease: neuropathologic findings and recent advances in imaging. *AJR Am J Roentgenol* 2004; 182: 313.

Oba R, Igarashi A, Kamata M, Nagata K, Takano S, Nakagawa H. The N-terminal active centre of human angiotensin-converting enzyme degrades Alzheimer amyloid beta-peptide. *Eur J Neurosci*. 2005 Feb; 21(3):733-40.

Patel VB, Clarke N, Wang Z, Fan D, Parajuli N, Basu R, Putko B, Kassiri Z, Turner AJ, Oudit GY. Angiotensin II induced proteolytic cleavage of myocardial ACE2 is mediated by TACE/ADAM-17: a positive feedback mechanism in the RAS. *J Mol Cell Cardiol*. 2014 Jan;66:167-76.

Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev*. 2006 Jul; 86(3):747-803.

Premer C, Lamondin C, Mitzey A, Speth RC, Brownfield MS. Immunohistochemical Localization of AT1a, AT1b, and AT2 Angiotensin II Receptor Subtypes in the Rat Adrenal, Pituitary, and Brain with a Perspective Commentary. *Int J Hypertens*. 2013; 2013():175428.

Probst W. C., Snyder L. A., Schuster D. I., Brosius J. ve Sealfon S. C., "Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily," *DNA and Cell Biology*, vol. 11, no. 1, pp. 1–20, 1992.

ProNeurogen internet sitesi (<http://www.proneurogen.com/angiotensin-17-peptides>). 2018.

Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2010; 362: 32944.

Reaux, A., Fournie-Zaluski, M. C., David, C., Zini, S., Roques, B., Corvol, P., and Llorens-Cortes, C. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 13415–13420.

Regenhardt RW, Mecca AP, Desland F, Ritucci-Chinni PF, Ludin JA, Greenstein D, Banuelos C, Bizon JL, Reinhard MK, Sumners C. Centrally administered angiotensin-(1-7) increases the survival of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Exp Physiol.* 2014 Feb; 99(2):442-53.

Reid IA. Interactions between ANG II, sympathetic nervous system, and baroreceptor reflexes in regulation of blood pressure. *Am J Physiol.* 1992 Jun; 262(6 Pt 1):E763-78.

Reitz C, Mayeux R: Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol.* 2014 15;88(4):640-51.

Saka E, ALZHEİMER HASTALIĞI PATOFİZYOLOJİSİ: DENEYSEL VE GENETİK BULGULAR. *Geriatri dergisi*;2010s:21-26.

Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Andrade SP. Angiotensin-1-7: *Regul Pept.* 2000 Jul 28; 91(1-3):45-62.

Selekler K. Alzheimer Hastalığı: Patoloji, Risk Faktörleri, Koruyucu Etkenler, Klinik, Tanı ve Ayırıcı Tanı. Nörolojide Yeni Ufuklar, Alzheimer ve Diğer Demanslar içinde. Selekler K, Ed. *Güneş Tıp Kitabevleri Yayınları*, 2009, pp 1-27.

Sevalle J, Amoyei A, Robert P, Fournie´-Zaluski MC, Roques B et al (2009) Aminopeptidase A contributes to the N-terminal truncation of amyloid beta-peptide. *J Neurochem* 109:248–256.

Sharma N, Anders H, Gaikwad A, Fiend and friend in the renin angiotensin system: An insight on acute kidney injury. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2019;764-774.

Sparks MA, Crowley SD, Gurley SB, Mirotsoy M, Coffman TM. Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology. *Compr Physiol.* 2014 Jul; 4(3):1201-28.

Su Y, Chang PT. Acidic pH promotes the formation of toxic fibrils from beta-amyloid peptide. *Brain Res.* 2001;893(1-2):287-91.

Takane K, Hasegawa Y, Lin B, Koibuchi N, Cao C, Yokoo T, Kim-Mitsuyama S. Detrimental Effects of Centrally Administered Angiotensin II are Enhanced in a Mouse Model of Alzheimer Disease Independently of Blood Pressure. *J Am Heart Assoc.* 2017 Apr 20; 6(4).

Tirupula K, Desnoyer R, Speth R, Sadashiva S, Karnik S. Atypical Signaling and Functional Desensitization Response of MAS Receptor to Peptide Ligands. *PLoS ONE.* 2014; 9(7).

Tolnay M, Probst A. The neuropathological spectrum of neurodegenerative tauopathies. *IUBMB Life* 2003;55(6):299-305.

Turner RC. (2006). Alzheimer's disease. *Seminars in Neurol*, 26: 499–506.

Uekawa K, Hasegawa Y, Senju S, Nakagata N, Ma M, Nakagawa T, Koibuchi N, Kim-Mitsuyama S. Intracerebroventricular Infusion of Angiotensin-(1-7) Ameliorates

Cognitive Impairment and Memory Dysfunction in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. **J Alzheimers Dis.** 2016 Apr 23;53(1):127-33.

Vazeux, G., Wilk, S., Wilk, E., Corvol, P., and Llorens-Cortes, C. (1998) **Eur. J. Biochem.** 254, 671–678.

Vickers C., Hales P., Kaushik V., “Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase,” **Journal of Biological Chemistry**, vol. 277, no. 17, pp. 14838–14843, 2002.

Wang J, Dickson DW, Trojanowski JQ, Lee VM. The levels of soluble versus insoluble brain Aβ distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. **Exp Neurol.** 1999;158:328–337.

Wirz K, Bossers K, Stargardt A, Kamphuis W, Swaab D, Hol E, Verhaagen J. Cortical beta amyloid protein triggers an immune response, but no synaptic changes in the APP^{swe}/PS1^{dE9} Alzheimer's disease mouse model. **Neurobiology of Aging.** 2013, Pages 1328-1342.

Xu P, Sriramula S, Lazartiques E. ACE2/ANG-(1–7)/Mas pathway in the brain: the axis of good. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 2011 Apr; 300(4): R804–R817.

Yanai K., Saito T., Kakinuma Y, “Renin-dependent cardiovascular functions and renin-independent blood-brain barrier functions revealed by renin-deficient mice,” **Journal of Biological Chemistry**, vol. 275, no. 1, pp. 5–8, 2000.

Yazıcı T, Şahin H, Alzheimer hastalığı. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı, **Klinik Gelişim Dergisi** 23(1) 48-50, 2010.

Zhang L, Yu H, Zhao X, Lin X, Tan C, Cao G, et al. Neuroprotective effects of salidroside against beta-amyloid-induced oxidative stress in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. **Neurochem Int.** 2010; 57(5):547–55.

Zheng L, Calvo-Garrido J, Hallbeck M, Hultenby K, Marcusson J, Cedazo-Minguez A, Terman A. Intracellular localization of amyloid-β peptide in SH-SY5Y neuroblastoma cells. **J Alzheimers Dis.** 2013;37(4):713-33.

Zini, S., Fournie-Zaluski M. C., Chauvel, E., Roques, B. P., Corvol, P., and Llorens-Cortes, C. (1996) **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 93, 11968–11973.

8. ÖZGEÇMİŞ

3 Ağustos 1987 tarihinde Afyonun Dinar ilçesinde doğmuştur. İlk ve Ortaokulu Dinar'da tamamlamıştır. 2005 yılında Denizli Anadolu Lisesi'nden, 2011 yılında da Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesinden mezun oldum. 2011-2017 yılları arasında Denizli Devlet Hastanesinde çalışmıştır. 2018'den beri serbest eczane eczacılığı yapmaktadır.