



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ALZHEIMER HASTALIĞI MODELİ UYGULANMIŞ
HT22 HÜCRELERİNDE UZUN SÜRELİ AÇLIĞIN, ENERJİ
METABOLİZMASI VE MİTOKONDRIYAL
FONKSİYONLARA ETKİSİ**

AYŞE AYDANUR KULAÇ ERSEN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Fehime AKSUNGAR

İSTANBUL-2024



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ALZHEIMER HASTALIĞI MODELİ UYGULANMIŞ
HT22 HÜCRELERİNDE UZUN SÜRELİ AÇLIĞIN, ENERJİ
METABOLİZMASI VE MİTOKONDRIYAL
FONKSİYONLARA ETKİSİ**

AYŞE AYDANUR KULAÇ ERSEN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Fehime AKSUNGAR

İSTANBUL-2024

BEYAN

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

Tarih: 29.05.2024

Ayşe Aydanur KULAÇ ERSEN

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim hayatım boyunca desteği ve motivasyonu her zaman yanımda olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Fehime Aksungar'a, bölüm başkanımız kıymetli Prof. Dr. Aysel Özpınar'a, bölümdeki diğer kıymetli hocalarıma ve tüm yardımları için Dr. Öğr. Üyesi Elif Nedret Keskinöz'e

Motivasyonları ve sonsuz destekleri için sevgili grup arkadaşlarım Meltem Pak, Nilay Topal, Bulut Yurtsever ve Tuğba Ateş'e,

Her zaman yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen kıymetli arkadaşlarım Gizem Gençay, Havva Beyten'e ve bölümdeki kıymetli arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca arkamda olan, sonsuz sevgi ve desteğini gösteren sevgili annem, melek babam ve kardeşime,

Her zaman yanımda olan, beni hiç yalnız bırakmayan ve yorulduğumda tekrardan ayağa kaldıran en büyük destekçim sevgili eşim Enver Ersen'e,

Her şey için çok teşekkür ederim.

Destekleri için Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi ve ABAPKO'ya teşekkür ederim. Bu tez, ABAPKO, 125 numaralı, 'Alzheimer hastalığı modeli uygulanmış HT22 hücrelerinde uzun süreli açlığın, enerji metabolizması ve mitokondriyal fonksiyonlara etkisi' isimli projesi ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	v
KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
TABLolar LİSTESİ.....	x
ÖZET.....	1
ABSTRACT	2
1 GİRİŞ VE AMAÇ	3
2 GENEL BİLGİLER.....	5
2.1 Hücre Enerji Metabolizması	5
2.1.1 Glikoliz.....	5
2.1.2 Trikarboksilik asit döngüsü (Krebs döngüsü).....	6
2.1.3 Oksidatif fosforilasyon	8
2.1.4 Nöron hücresi enerji metabolizması.....	9
2.2 Hücre Açlık Metabolizması, Keton Üretimi ve Eksojen Keton Uygulamaları.....	11
2.2.1 Uzun süreli açlıkta vücutta keton üretimi	11
2.2.2 Uzun süreli açlıkta beyin metabolizması	13
2.2.3 Eksojen keton uygulamaları	15
2.3 Alzheimer Hastalığı.....	16
2.3.1 Alzheimer hastalığı, mitokondriyal fonksiyonlar ve keton ilişkisi	18
2.4 HT22 Hücre Hattı.....	19
3 GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1 HT22 Hücre Kültürü	21
3.1.1 Hücre ekimi	21
3.1.2 Hücre pasajlama	21
3.1.3 Hücre dondurma	21
3.2 Deney Gruplarının Oluşturulması.....	22
3.3 A β ₁₋₄₂ ile β OHB Keton Hazırlanması ve Hücrelere Uygulanışı.....	23
3.3.1 A β ₁₋₄₂ stok solüsyon hazırlanışı	23
3.3.2 β OHB stok solüsyon hazırlanışı	24
3.4 MTT Optimizasyonları.....	24
3.5 MTT Deneyi.....	25
3.6 İmmunofloresan ve Konfokal Mikroskop Deneyi.....	26
3.7 Sitrat Sentaz Ölçüm Deneyi.....	27
3.8 Metabolik Parametre Analizleri.....	29

3.8.1 Hücre besiyerlerinden keton ölçümleri.....	29
3.8.2 Laktat, laktat dehidrogenaz, glukoz ve aminoasit ölçümleri	29
3.9 Biyoinformatik Analizleri.....	30
4 BULGULAR.....	31
4.1 Hücre Canlılığının İncelenmesi.....	31
4.2 A β ₁₋₄₂ Lokalizasyonunun İncelenmesi	32
4.3 Mitokondriyal Fonksiyon Analizlerinin İncelenmesi.....	34
4.4 Metabolik Parametre Analizlerinin Değerlendirilmesi	36
4.5 Deney Gruplarının Morfolojik İncelenmesi	43
5 TARTIŞMA	45
6 SONUÇ.....	53
7 KAYNAKLAR.....	54
8 ÖZGEÇMİŞ.....	57

KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ

AH	Alzheimer hastalığı
ADP	Adenozin difosfat
APP	Amiloid öncü proteini
ATP	Adenozin trifosfat
BBB	Kan beyin bariyeri
βOHB	Betahidroksibütirat
ETZ	Elektron transfer zinciri
FAD	Flavin adenin dinükleotit
FBS	Fetal sıgır serumu
GLUT	Glukoz taşıyıcı tip
GSK-3	Glikojen sentaz kinaz 3
GTP	Guanozin trifosfat
HMG KoA	3-Hidroksi-3-Metilglutaril KoA
IF	Aralıklı oruç
KoA	Koenzim A
MCFA	Orta zincirli yağ asitleri
MCT	Orta zincirli trigliseridler
MCT	Monokarboksilat taşıyıcılar
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür)
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotit
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotit + H
ROS	Reaktif oksijen türleri
TCA	Trikarboksilik asit zinciri
T3D	Tip 3 diyabet

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Hücre enerji metabolizması..	5
Şekil 2. Glikoliz zinciri..	6
Şekil 3. TCA döngüsü..	8
Şekil 4. ETZ ve oksidatif fosforilasyon..	9
Şekil 5. Nöron hücresi enerji metabolizması..	10
Şekil 6. Açlık sırasında glukoneogenez ve keton cisimleri.....	11
Şekil 7. Karaciğer hücresinde keton üretimi ve ekstrahepatik hücrelerde keton kullanımı	12
Şekil 8. Nöronlara keton iletimi ve ketoliz.	13
Şekil 9. HT22 hücresi.....	20
Şekil 10. MTT optimizasyon plate planı.....	25
Şekil 11. Sitrat sentaz aktivite ölçüm deneyi plate planı.	29
Şekil 12. A β ₁₋₄₂ lokalizasyonu konfokal mikroskop görüntüleri.	33
Şekil 13. Standartların absorbens değerleri.....	34
Şekil 14. Sitrat sentaz aktivite grafiği.	35
Şekil 15. Besiyerindeki aminoasit miktarlarının ısı haritası	41
Şekil 16. Hücre homejenatı aminoasit miktarlarının ısı haritası	43
Şekil 17. Deney gruplarının mikroskop görüntüleri..	44

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1. Fizyolojik koşullarda değişen keton miktarları	15
Tablo 2. Hücre canlılığı (MTT) deneyi sonuçları.	31
Tablo 3. Deney sonrası grupların metabolik içerikleri.....	36
Tablo 4. Gibco DMEM 41966029 içerik tablosu	39
Tablo 5. Gibco EBSS 24010043 içerik tablosu	39
Tablo 6. Deney sonrası besiyerindeki aminoasit miktarları.....	40
Tablo 7. Deney sonrası hücre homojenatlarındaki aminoasit miktarları	42

ÖZET

Alzheimer Hastalığı Modeli Uygulanmış HT22 Hücrelerinde Uzun Süreli Açlığın, Enerji Metabolizması ve Mitokondriyal Fonksiyonlara Etkisi

Alzheimer hastalığı (AH), amiloid beta peptit plakları ve nörofibril yumakların neden olduğu nörodejenerasyon ile karakterize olan nörodejeneratif bir hastalıktır. Alzheimer hastalığında mitokondriyal disfonksiyonun nörodejenerasyona neden olan önemli faktörlerden biri olduğu bilinmektedir. AH'de anormal mitokondriyal morfoloji, değişen mitokondriyal membran potansiyeli, azalan mitokondri sayıları gibi birçok patoloji görülmektedir. Alzheimer hastalığında glukoz metabolizması bozulurken keton metabolizmasında değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Keton cisimleri, uzun süreli açlıkta karaciğerde üretilen glukozu alternatif enerji kaynaklarını oluşturmaktadır. Bu sebeple ketonlar Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda görülen bozulmuş glukoz metabolizmasına alternatif tedavi yaklaşımlarını oluşturabilmektedir. Bu projede, nöronlar ve mitokondri fonksiyonları üzerinde uzun süreli açlığın etkileri patafizyolojik olarak incelenmiştir. Uzun süreli açlık modelinde miktarları değişen ara metabolizma ürünleri ve mitokondriyal fonksiyonlarına etkileri gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında eksojen uygulanan beta hidroksi bütirat (β OHB)'ın deney gruplarının canlılığı üzerinde olumlu etkisi olduğu gösterilmiş olup bununla birlikte hücrelere uygulanan $A\beta_{1-42}$ 'nin HT22 hücreleri üzerinde toksik etki oluşturduğu ve β OHB uygulamasının bu etkiyi azalttığı görülmüştür. β OHB eklenmiş medyumlarda inkübe edilen hücrelerin enerji metabolizması sırasında glukoz kullanımının yanı sıra keton da kullandıkları ve keton kullanımı sırasında mitokondrilerinin aktivitelerinin arttığı tespit edilmiştir. Bu bulgular amiloid betanın verdiği hasarın keton eklenmesi ile gerilediği ancak tamamıyla iyileşmediğini düşündürmektedir. Bu tez çalışmasında elde edilen bulguların birçok nörodejeneratif hastalıkta ve sağlıklı yaşlanma çalışmalarında nöron fonksiyonlarının korunmasını sağlayacak alternatif uygulamalara ışık tutacağını düşünmekteyiz.

Anahtar Sözcükler: Uzun süreli açlık, Keton cisimleri, Alzheimer hastalığı, HT22 hücre hattı, Mitokondriyal fonksiyonlar.

ABSTRACT

The Effects of Prolonged Fasting on Energy Metabolism and Mitochondrial Functions in HT22 Cells Treated with Alzheimer's Disease Model

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative condition characterized by neurodegeneration caused by amyloid beta peptide plaques and neurofibril tangles. Mitochondrial dysfunction is known to be a significant factor contributing to neurodegeneration in AD. Various mitochondrial functions, such as abnormal mitochondrial morphology, altered mitochondrial membrane potential, and decreased mitochondrial numbers, are affected in AD. However, while glucose metabolism is impaired in Alzheimer's disease, no changes are observed in ketone metabolism. Ketone bodies serve as alternative energy sources for glucose during prolonged fasting. Therefore, ketones may present alternative therapeutic approaches for neurodegenerative diseases like Alzheimer's, which exhibit impaired glucose metabolism. In this project, the effects of prolonged fasting on neurons and mitochondrial functions were investigated pathophysiologically. The impacts of varying levels of intermediate metabolites and mitochondrial functions were demonstrated in a prolonged fasting model. This thesis demonstrates that exogenous β OHB positively influences the viability of experimental groups, while $A\beta_{1-42}$ applied to cells exhibits toxic effects on HT22 cells, which are mitigated by β OHB application. It was observed that cells incubated in medium supplemented with β OHB utilize both glucose and ketones during energy metabolism, leading to increased mitochondrial activity during ketone utilization. These findings suggest that while the damage caused by amyloid beta is attenuated by the addition of ketones, complete recovery is not achieved. The findings obtained in this thesis may encourage the development of alternative interventions to preserve neuron function in many neurodegenerative diseases and healthy aging studies.

Keywords: Prolonged fasting, Ketone bodies, Alzheimer's disease, HT22 cell line, Mitochondrial functions

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Bu tez çalışmasının amacı, Alzheimer hastalığı, kronik nörolojik hastalıklar ve sağlıklı yaşlanma için uzun süreli açlık sırasında gelişen metabolik değişikliklerin hücre düzeyinde tespit edilmesi ve nöron fonksiyonlarının korunmasının sağlanabilirliğinin ortaya konulmasıdır. Bu şekilde patolojik koşullarda uzun süreli açlık modelinin etkileri ve ara metabolizma ürünlerindeki değişiklikler keşfedilirse sağlıklı yaşlanma ve nörodejeneratif hastalıklarda yeni tedavi hedefleri ortaya konulabilir.

Alzheimer hastalığı nörodejenerasyonla karakterize olan bir hastalıktır ve bu hastalıkta mitokondriyal disfonksiyon nörodejenerasyonu tetikleyen önemli bir faktördür. AH, anormal mitokondriyal morfoloji, değişen mitokondriyal membran potansiyeli, azalan mitokondri sayıları gibi birçok mitokondriyal fonksiyon değişmesine neden olur. Buna rağmen Alzheimer hastalığında bozulan glukoz metabolizmasına karşın keton metabolizmasında hiçbir değişiklik olmadığı bilinmektedir. Ketonlar uzun süreli açlıkta karaciğerde üretilen glukozu alternatif enerji kaynaklarıdır. Uzun süreli açlıkta ketojenez ve keton kullanımı desteklenerek nöronlar için ATP ihtiyacı karşılanmış olur. Böylece açlık koşullarında nöron hücrelerinin hayatta kalma yeteneği artar. Uzun süreli açlık modelinin faydaları gösterilmekle birlikte etkilerinin hangi mekanizma ile olduğu henüz araştırılmakta ve bulunacak bir molekül ve etki mekanizmasının, farmakolojik olarak uygulandığında söz konusu etkileri taklit edip etmeyeceği ortaya konulmamıştır.

Bu projede Alzheimer hastalık modeli uygulanmış HT22 hipokampal nöron hücrelerine uzun süreli açık ve eksojen keton uygulamaları yapılarak hücrelerdeki metabolik değişiklikler, mitokondri fonksiyonların değişimi ve olası ara metabolitler araştırılacaktır. Böylece bu çalışmada, başta Alzheimer hastalığı, nörodejeneratif hastalıklar ve sağlıklı yaşlanma için uzun süreli açlık ile eksojen keton uygulamalarında gelişen metabolik değişikliklerin ve mitokondriyal fonksiyon değişimlerinin hücre düzeyinde tespit edilerek nöron işlevlerinin korunması amaçlanmıştır. Bu şekilde patolojik koşullarda uzun süreli açlık modelinin etkilediği

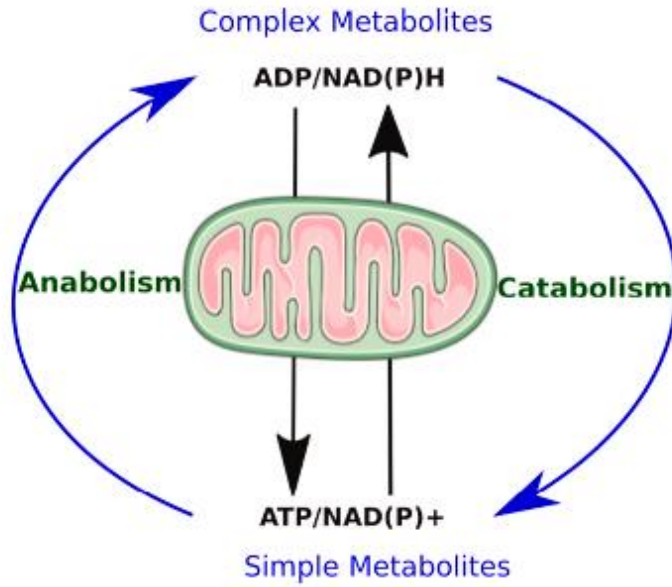
ara metabolizma ürünlerindeki değişiklikler keşfedilirse sağlıklı yaşlanma ve nörodejeneratif hastalıklarda yeni tedavi hedefleri ortaya konulabilir.



2 GENEL BİLGİLER

2.1 Hücre Enerji Metabolizması

Hücredeki ana kimyasal enerji birimi ATP'dir. Anabolik yollar biyosentez için gereken ATP'yi kullanırken, mitokondriyal oksidatif fosforilasyon gibi katabolik yollar, ADP + Pi' den ATP üreterek NAD⁺' da NADH'i oksitler. Bu nedenle hücre enerji metabolizması, NADH döngüsüne bağlı ATP sentezini içeren metabolik yolları ifade eder (Şekil 1). ATP sentezi iki şekilde gerçekleşir: Çoğu hücrede, ATP'nin büyük kısmı oksidatif fosforilasyondan gelirken buna ek olarak glikoliz ve Krebs döngüsündeki substrate seviyesinde fosforilasyon ile de ATP sağlanır (1,2).

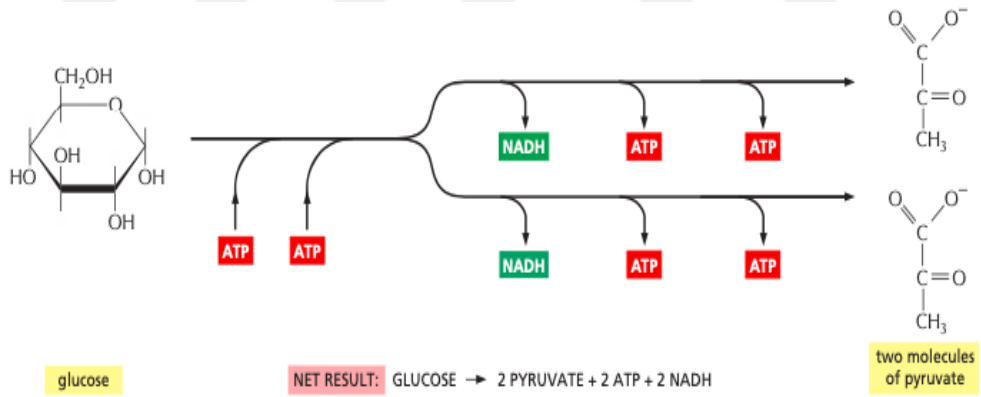


Şekil 1. Hücre enerji metabolizması. Biyosentez için gerekli anabolik yollar ATP tüketip NADH üretirken mitokondriyal oksidatif fosforilasyon gibi katabolik yollar, ADP + Pi'den ATP üretip ve NAD⁺'daki NADH'yi oksitleyecektir (2).

2.1.1 Glikoliz

Glikoliz, altı karbonlu glukoz molekülünün oksidatif olarak parçalanarak iki adet üç karbonlu bulunan pirüvat molekülüne dönüşümünü sağlayan reaksiyon zinciridir. Anaerobik organizmalarda ve oksijen yokluğunda glikoliz birincil ATP kaynağıdır.

Glikoliz sitozolde gerçekleşir. Sonucunda her bir glukoz molekülünden net 2 ATP, 2 NADH ve 2 pirüvat üretilir (Şekil 2). Glikoliz için oksijene ihtiyaç yoktur. Aerobik ve anaerobik tüm canlılarda gerçekleşir. Glikoliz 10 basamaklı bir glikolitik yoldan oluşur. İlk beş basamağında enerji harcanırken son beş basamağında enerji üretilir. Glukozun parçalanmasıyla açığa çıkan enerjinin çoğu, ADP ve Pi'den ATP sentezlemek için kullanılır. Glikolizde 7. ve 10. basamaklarda sentezlenen ATP, bir fosfat grubunun doğrudan bir substrat molekülünden ADP'ye aktarılması sonucunda substrat düzeyinde fosforilasyonla elde edilir. Glikoliz sırasında salınan enerjinin geri kalanı, altıncı basamakta bir oksidasyon reaksiyonu ile üretilen NADH molekülündeki elektronlarda depolanır. Bir glukoz başına iki NADH üretilir. Aerobik organizmalarda, NADH molekülleri, elektronlarını mitokondride elektron taşıma zincirine verir. Elektron taşıma zincirinden geçen elektronlar en sonunda O₂'ye geçerek su oluşturur. Elektronsuz kalan NADH, tekrar glikolizde kullanılmak üzere NAD⁺ a dönüşür. Oksijen yokluğunda NADH diğer bir enerji veren reaksiyon türü olan fermentasyona girer (1, 3).



Şekil 2. Glikoliz zinciri. Bir döngüde net 2 pirüvat, 2 ATP ve 2 NADH elde edilir (1).

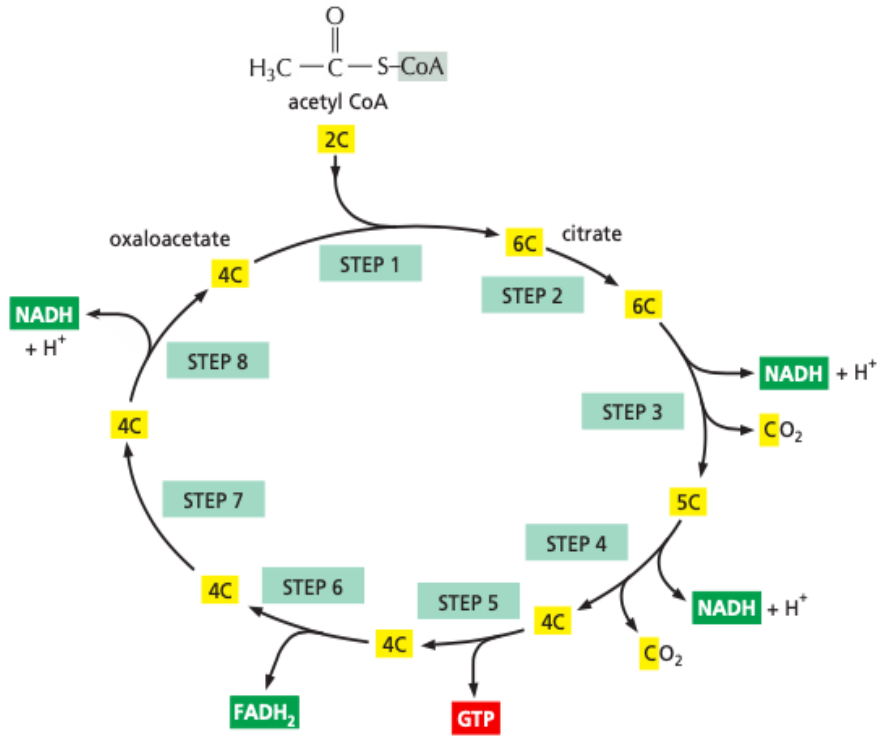
2.1.2 Trikarboksilik asit döngüsü (Krebs döngüsü)

Ökaryotik hücrelerin aerobik metabolizmasında, glikoliz tarafından üretilen pirüvat mitokondriyal matrise gönderilir. Burada üç enzimden oluşan pirüvat dehidrogenaz enzim kompleksi tarafından dekarboksile edilir. Sonucunda NADH, CO₂ ve asetil CoA oluşur (1)

Glikolizde parçalanmış şekerlere ek olarak, yağdan türetilen yağ asitleri de mitokondriyal matriste asetil CoA'ya dönüştürülür. Piruvat ve yağ asitlerine ek olarak, bazı amino asitler de sitozolden mitokondriyal matriste taşınarak burada asetil CoA'ya veya sitrik asit döngüsünün diğer ara maddelerinden birine dönüştürülür. Ökaryotik hücrelerde mitokondri, ister şekerle, isterse yağ veya proteinle başlasın, enerji veren tüm katabolik süreçlerin yöneldiği merkezdir (1,3).

Katabolizma asetil CoA üretimi ile sonlanmaz. Asetil CoA'ya dönüştürme sürecinde, depolanan enerjilerin sadece küçük bir kısmı ATP, NADH veya FADH₂'ye dönüştürülür. Bu enerjinin çoğu hala asetil CoA'dadır. Hücre solunumundaki bir sonraki aşama, asetil CoA'daki asetil grubunun mitokondriyal matriste CO₂ ve H₂O'ya oksitlendiği sitrik asit döngüsüdür. Trikarboksilik asit veya Krebs döngüsü olarak da bilinir (3)

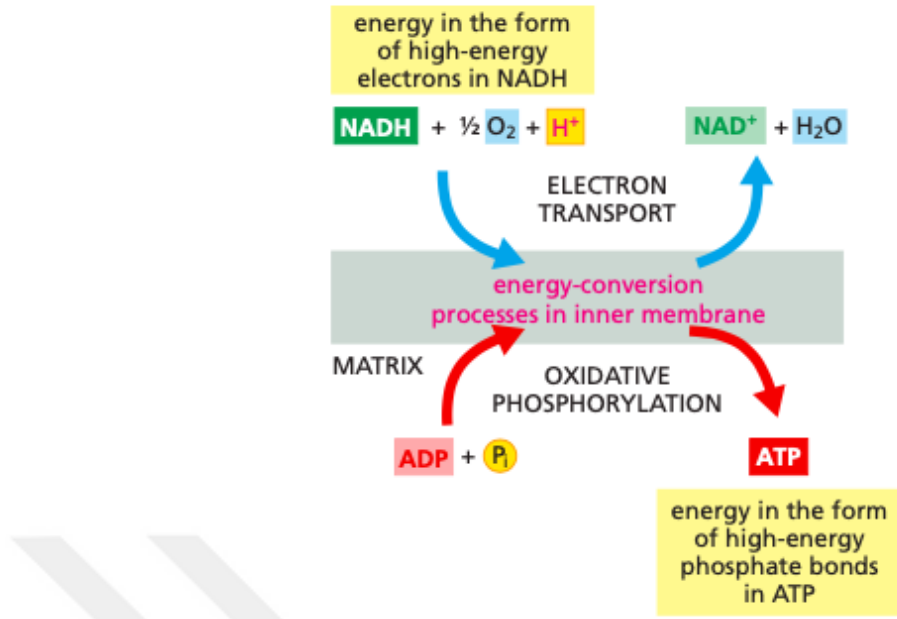
Glikoliz ve sitrik asit döngüsü gibi katabolik reaksiyonlar, hem hücre için enerjiye destek olur hem de diğer birçok organik molekül için yapı taşları üretir. Anabolik yollar, sitrik asit döngüsünden ara ürünleri çekerek enzim katalizli reaksiyonlarla amino asitlere, nükleotitlere ve lipitlere dönüştürülür. Sitrik asit döngüsü sekiz basamaktan oluşan bir döngüdür. Asetil CoA oksaloasetatla birleşerek altı karbonlu sitrik asiti (sitrata) oluşturur. İlk ürün olan sitrik asitle döngü başlar ve ardışık sekiz reaksiyon sonucunda tekrar oksaloasetat oluşur. Sitrik asit döngüsü, asetil CoA'daki asetil gruplarının oksidasyonunu katalize ederek onları CO₂'ye dönüştürür. Bir döngü sonucunda 3 NADH, 1 FADH₂, 1 GTP ve 2 molekül CO₂ üretilir (1,3) (Şekil 3).



Şekil 3. TCA döngüsü. Bir döngüde 3 NADH, 1 GTP, 1 FADH_2 , 2 CO_2 oluşur (1).

2.1.3 Oksidatif fosforilasyon

Oksidatif fosforilasyon, glikoliz ve sitrik asit döngüsü sırasında üretilen NADH ve FADH_2 gibi aktif taşıyıcılar tarafından yakalanan kimyasal enerjinin ATP üretmek için kullanıldığı aşamadır (Şekil 4). Oksidatif fosforilasyon sırasında, NADH ve FADH_2 yüksek enerjili elektronlarını iç mitokondri zarında bulunan elektron taşıma zincirine aktarır. Zincirde salınan enerji, H^+ protonlarını mitokondriyal matriksten zarlar arası boşluğa göndermek için kullanılır. Bu hareket iç zar boyunca bir proton gradyanı oluşturur. Bu proton gradyanı kullanılarak mitokondriyal matrikste ADP fosforilasyonundan ATP oluşturulur. Transfer zincirinin sonunda elektronları en son O_2 teslim alır ve indirgenmiş O_2 , H^+ protonlarla birleşerek suyu oluşturur. Sonuçta, bir glukoz molekülünün H_2O ve CO_2 'ye tamamen oksidasyonu gerçekleşir ve toplamda yaklaşık 30 ATP molekülü üretilebilir. Buna karşılık, yalnızca glikoliz ile bir glukoz molekülü başına sadece iki ATP molekülü üretilir. Oksidatif fosforilasyon hem ökaryotik hücrelerde hem de aerobik bakterilerde meydana gelir (1,3).



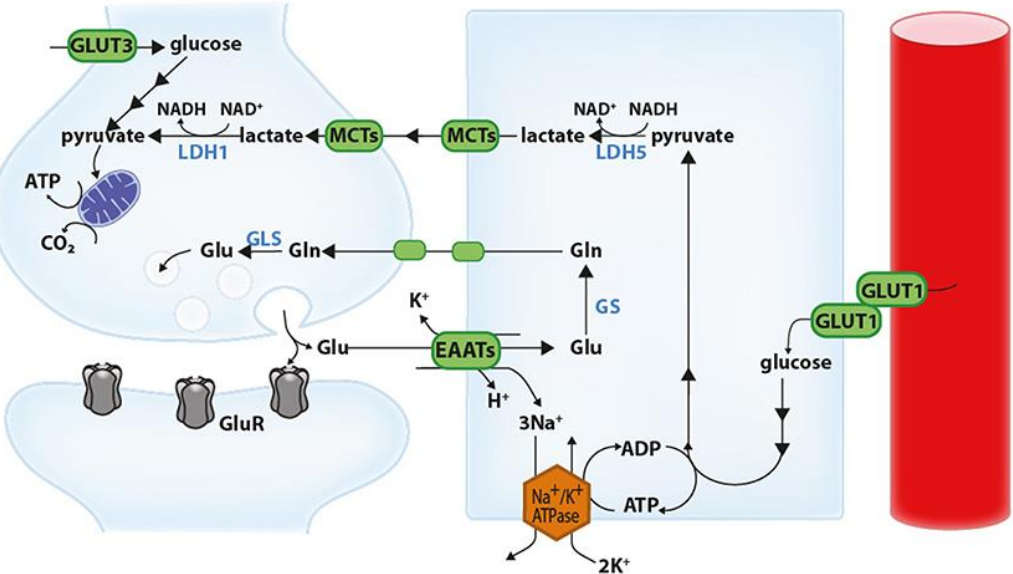
Şekil 4. ETZ ve oksidatif fosforilasyon (1).

2.1.4 Nöron hücresi enerji metabolizması

İnsan beyni vücudun toplam enerji ihtiyacının %20'sini oluşturur. Beyin, enerji ihtiyacının en yüksek olduğu organdır ve ATP formunda sürekli bir enerji kaynağına ihtiyaç duyar. ATP, her hücrede olduğu gibi beyin enerji metabolizmasının da ana enerji kaynağını oluşturur. Çoğu ATP, nöronal sinyalleşme sırasında iyon gradyanlarını sıfırlayan hücre zarı pompaları olan Na⁺/K⁺ATPase ve Ca²⁺ATPase tarafından kullanılır. Uyarıcı (glutamaterjik) nöronlar, beyin ATP'sinin %80-85'ini tüketir, geri kalanını ise inhibitör nöronlar ve diğer hücreler kullanır. Aksonal transport, hücre iskeletinin korunması, proton sızıntısı, mikrogial hareketlilik, DNA onarımı, RNA translasyonu ve fosfolipid remodelleme gibi hücresel süreçler, nörotransmisyonundan daha az enerji tüketse de bu süreçlerin enerji gereksinimleri henüz tam açıklanamamaktadır (4).

Glukoz metabolizması beyindeki ATP üretiminin %95'inden daha fazlasını sağlar. Beyinde glukoz alımı, nörovasküler birim olarak bilinen çeşitli beyin kapiler endotel hücreler, perisitler, astrositler, oligodendrositler, mikrogia ve nöronlar

astrositler ve kılcal endotel üzerindeki monokarboksilat taşıyıcıları ile ilgili olarak ihtiyaç duyulur. Ketonlar ve laktat, glukozu karşı ana alternatif enerji kaynağı olarak astrositler ve kılcal endotel üzerindeki monokarboksilat taşıyıcıları aracılığıyla (4, 5).

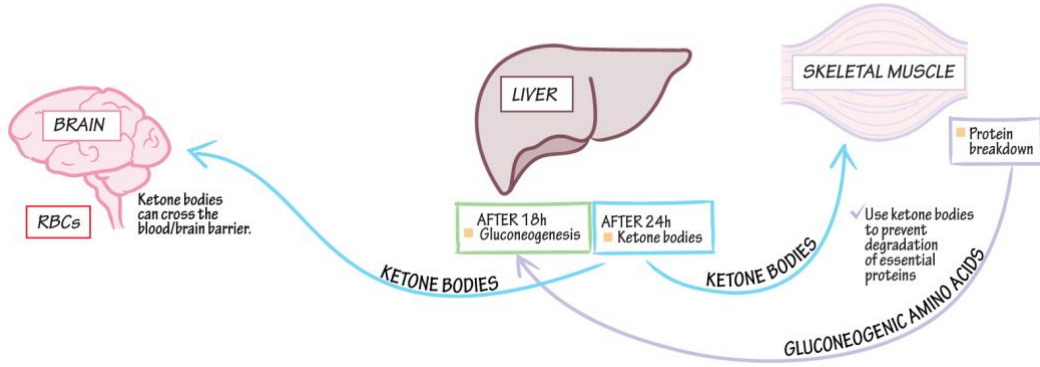


Şekil 5. Nöron hücresi enerji metabolizması. GLUT3 ile nöronlara glukoz transportu yapılırken astrositler tarafından da MCT'ler aracılığıyla nöron hücrelerine laktat sağlanır (6).

2.2 Hücre Açlık Metabolizması, Keton Üretimi ve Eksojen Keton Uygulamaları

2.2.1 Uzun süreli açlıkta vücutta keton üretimi

Açlık, yemeğin sindirimi sonrası başlayan ve tekrar yemek alımına kadar geçen bir süreçtir. Açlıkta kan glukoz konsantrasyonu düşer ve insülin hormonu azalırken pankreas glukagon hormonu salgılamaya başlar. Glukagon hormonu salgılanmasıyla glikojen sentetaz enzimi inhibe edilerek glikojenez durdurulur. Karaciğerde glikojen fosforilaz enziminin aktifleşmesiyle glikojenoliz başlar. Oluşan glukoz beyin ve eritrositler tarafından kullanılır. Dokulara ve beyne glukoz sağlayan bir diğer yol ise glukoneogenezdır. Glikojen depolarının tükenmesiyle karaciğerde glukoneogenez başlar (Şekil 6). Glukoneogenezin başlıca substratları; pirüvat-alanin döngüsünden gelen alanin, kaslar ve eritrositlerden gelen laktat, yağ asitleri katabolizmasından gelen gliserol ve aminoasitlerdir. Bu substratların glukoneogeneze girmesi sonucu glukoz elde edilip beyne ve dokulara gönderilir. Uzayan açlıkta ise glikojen depoları ve glukoneogenez yeterli gelmez ve keton üretilmeye başlanır (3, 7).

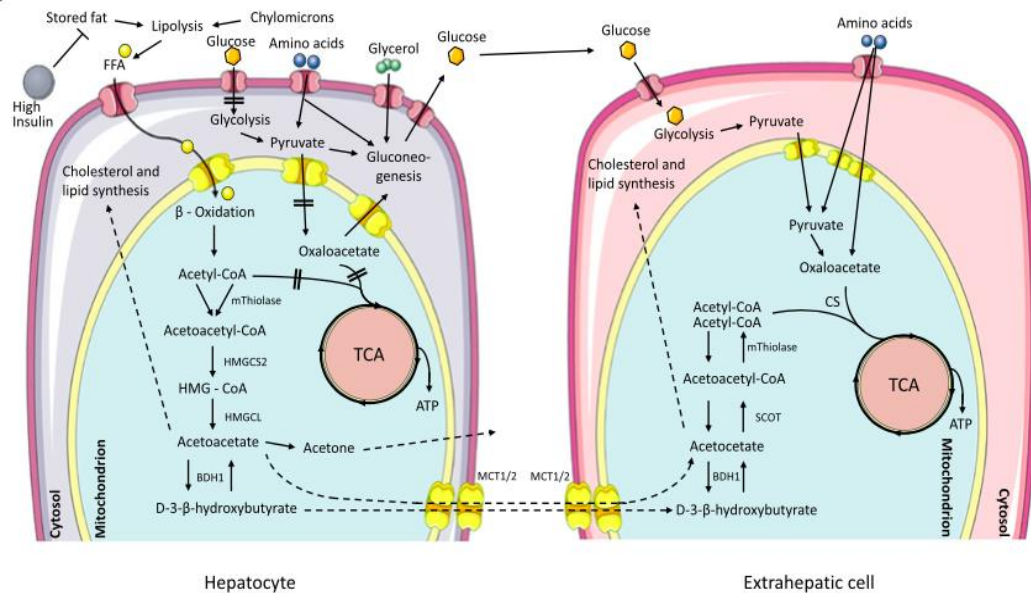


Şekil 6. Açlık sırasında glukoneogenez ve keton cisimleri. Uzayan açlık sonrasında glukoneogenez ve ketojenez başlarken beyin, enerji kaynağı olarak keton cisimlerini kullanmaya başlar (8).

Keton cisimleri uzun süreli açlıkta karaciğerde üretilen glukozla alternatif enerji kaynaklarıdır. İki ana keton cismi asetoasetat ve betahidroksibütirattır. Aseton ise vücutta en az bulunan üçüncü keton cismidir. Uzun süreli açlıkta insülin seviyelerinin düşüp glukagonun artmasıyla birlikte lipoliz desteklenir ve ana enerji kaynağı olacak

yağlar parçalanmaya başlar (9,10). Vücutta açlık sırasında β OHB'ın asetoasetata göre 6 kat daha fazla bulunduğu tespit edilmiş olup, özellikle açlık sırasında kanda dominant olan keton cisminin β OHB olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle deneysel çalışmalarda β OHB, asetoasetata göre daha fazla tercih edilmektedir (11).

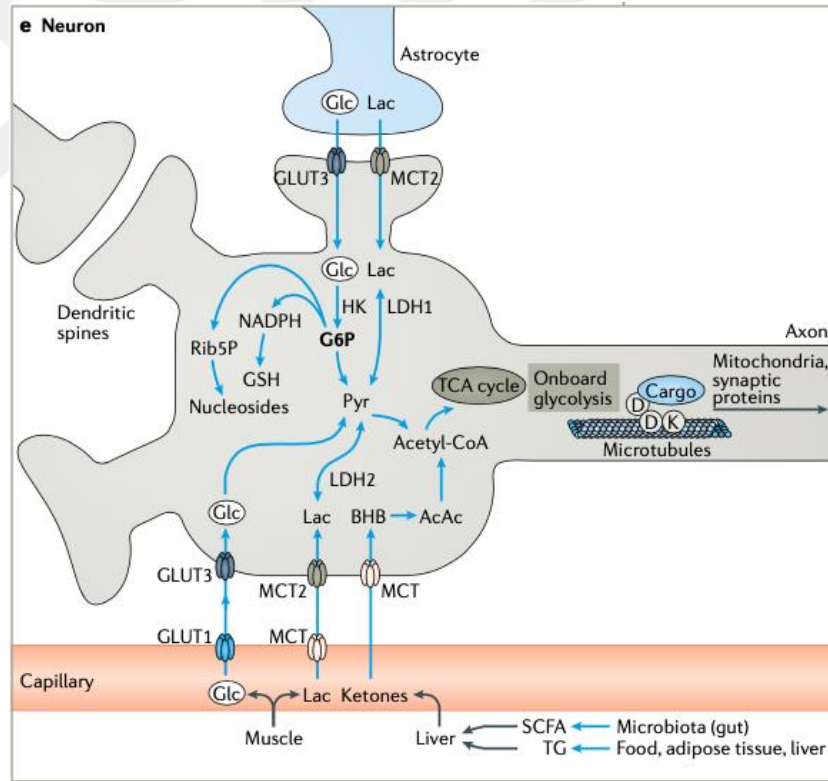
Beta oksidasyon ile yağ asitlerinin parçalanması sonucunda ATP ve asetil CoA oluşur (Şekil 7). Yeterli glukoz türevi oksaloasetat bulunmadığında ya da bulunan oksaloasetatın glukoneogenez için tüketilmesinden dolayı hepatositler çok az sayıda asetil CoA'yı TCA döngüsüne sokar. Bunun yerine asetil CoA birikir ve asetoasetil CoA'ya dönüşür. Asetoasetil CoA, HMG-CoA sentaz tarafından HMG-CoA'ya dönüşür. HMG-CoA, HMG-CoA liyaz tarafından asetoasetat ve asetil CoA'ya dönüştürülür. Asetoasetattan dekarboksilasyonla aseton ve β OHB dehidrogenazla β OHB oluşur. Bu üç keton venöz dolaşıma salgılanır, ekstrahepatik dokular tarafından alınırken fazla olanlar böbrek yoluyla atılır. Aseton ise akciğer yoluyla atılır. β OHB ve asetoasetat, venöz kandan monokarboksilat taşıyıcılar (MCT) tarafından nöronlara alınır. Ketonlar burada mitokondride asetil CoA'ya dönüşerek TCA döngüsüne girer. Böylece beyin hücrelerine ATP sağlanmış olur (9).



Şekil 7. Karaciğer hücresinde keton üretimi ve ekstrahepatik hücrelerde keton kullanımı (9).

2.2.2 Uzun süreli açlıkta beyin metabolizması

Beynin birincil enerji kaynağı glukozdur. İlk (erken) açlıkta da glukozu enerji kaynağı olarak kullanmaya devam eder. Glukoz tükendiğinde keton ve laktat beyin için alternatif yakıtlardır. Bununla birlikte, bebeklerde ketonlar yalnızca önemli bir enerji kaynağı değil, aynı zamanda beyin lipid sentezi için ana substratı oluşturur. Asetoasetat ve betahidroksibütirat kanda denge halindedir. Betahidroksi butirat hücre içine alındığında asetoasetata dönüşür ve bu şekilde asetil CoA'ya dönüşerek TCA döngüsüne girer ve ATP oluşumunu destekler. Bir gece açlıkta plazma keton konsatrasyonları 0.1-0.2 mM'dir ve beyin enerji ihtiyacının %3-5'ini oluşturur. Üç dört günlük açlıktaysa plazma keton seviyesi 5 mM'ye kadar çıkar ve beyin enerji ihtiyacının %50'sini ya da daha fazlasını sağlamaktadır (4).



Şekil 8. Nöronlara keton iletimi ve ketoliz. Uzun süreli açlıkta ketonlar MCT'ler aracılığıyla nöron hücresine girer. Burada asetil CoA'ya dönüşerek TCA döngüsüne girer (4).

Keton cisimlerinin enerji üretimi için kullanımı, eritrosit ve malign hücre tipleri hariç beyin de dahil olmak üzere çoğu ekstrahepatik dokuda meydana gelir. Böylece açlık dönemlerinde hücrelerin ve dokuların hayatta kalma yeteneği artar. Ketojenezin yokluğunda, beyin hücreleri uzun süreli açlık sırasında tamamen hepatik ve renal glukoneogeneze bağlı olur. Vücutta glukoz sentezi için sınırlı substratlar vardır. Bunlar glukojenik amino asitler, trigliseritlerden gelen gliserol, geri dönüştürülmüş laktat ve Cori döngüsü yoluyla piruvattır. Yetişkin beyninin tek başına glukoneogenez ile 2-3 hafta hayatta kalabileceği, ancak yağ depolarından elde edilen keton cisimcikleri ek bir enerji kaynağı olarak kullanılıyorsa en az 2 ay boyunca işlevsel kalabileceği hesaplanmıştır (9). Birkaç haftalık açlıktan sonra beyin ihtiyaç duyduğu enerjinin üçte ikisi β OHB ve asetoasetat tarafından sağlanır. Ayrıca insan beyni doğum sonrası erken evrede keton cisimlerine ihtiyaç duyar. Kolostrumun düşük laktoz içeriği nedeniyle yeni doğanların metabolizması ketotiktir. Yeni doğan insan beyninin tükettiği enerjinin yaklaşık yarısı β OHB'dendir. Emzirmeden birkaç gün sonra laktoz içeriği artar ve ketozis kaybolur. Asetoasetat ve β OHB'nin iskelet kasındaki ATP üretimine katkısı da büyük ölçüde değişiklik gösterir. Bir gece açlıktan sonra, keton cisimleri enerji sağlanmasına %10-20 katkıda bulunur ve bu, birkaç günlük açlıktan sonra %50'ye yükselir. Aerobik egzersiz sırasında iskelet kasına keton cisimlerinin atılması, beslenme durumuna ve egzersiz yoğunluğuna bağlı olarak beş kata kadar artabilir, bunu egzersiz sonrası ketozis (0.3-2.0 mmol/L) takip eder (9, 10).

Karaciğer, lipit katabolizması sırasında sürekli olarak düşük seviyelerde keton cisimleri üretir. Keton cisimleri, yağ asitlerinin parçalanmış ürünlerini TCA döngüsüne kanalizasyon için diyetten türetilen glukoz/piruvat oranının azalmasına yanıt olarak hızlı bir şekilde artar. Asetoasetat ve β OHB'nin enerji üretiminde kan glukozunun yerini alma yeteneği, özellikle beyin fonksiyonu açısından uzun süreli açlık sırasında hayatta kalmak için gereklidir (9).

Tablo 1. Fizyolojik koşullarda değişen keton miktarları (9)

Fiziksel Koşullar	Plazma β- Hidroksibütirat (mmol/L)
Normal sirkadiyen değişim	0.1-0.4
Uzayan egzersiz sonrası	0.3-2
1-2 gün açlıkta	1-2
2-3 hafta açlıkta	5-7
1-3 hafta ketojenik diyetle	0.5-5
Diyabetik ketoasidoz sırasında	3-25

2.2.3 Eksojen keton uygulamaları

Nroketoteraptikler terimi yakın zamanda ortaya atılan sinir sistemi hastalıklarının iyileştirilmesinde ketozis kullanımını destekleyen bir yaklaşımdır. Keton tedavisi, kan keton seviyesini yükseltmeyi amaçlayan ve bunları farklı patolojilere karşı koruyucu moleküller olarak kullanan stratejileri ifade eder. Keton oluşumu, yağ dokusunda lipoliz ile lipit depolarının kullanımını destekleyerek ve karaciğerde ketojenez yoluyla endojen olarak elde edilmektedir. Endojen keton üretimini teşvik eden ketojenik diyet, kalori kısıtlama, aralıklı oruç ve orta zincirli trigliserit alımı gibi çeşitli yaklaşımlar vardır. Kan ketonları intravenöz, enteral ve keton tuzlarının oral alımıyla da eksojen olarak arttırılabilmektedir. Bu müdahalelerle keton kan seviyeleri yükseltilerek hayvanlarda ve insanlarda beyinde enerji yakıtı olarak kullanılmaları desteklenmektedir (10).

Keton kan konsantrasyonlarının hedef aralığı 0.2 ile 5-8 mM arasındadır. Bu da güvenli ve yararlı olduğu bilinen orta dereceli ketoz aralığındadır. Endojen ketozis, ketojenez uyarılmadan ve olumlu bir sonuç gözlemlenmeden önce 3 günden fazla, haftalar veya aylara kadar kronik tedaviler gerektirir. Buna karşın eksojen keton cisimleri veya keton türevlerinin uygulanması, plazma ketonlarında hızlı yükselmeye

(0.5-6 saat) neden olurken ketozisi sürdürmek için tekrarlanan dozlara ihtiyaç duyulur (10).

Son zamanlarda, keton esterinin (KE) kullanımı, endojen ketoz indüksiyonuna bir alternatif olarak önerilmiştir. Çalışmalar, KE'nin ağızdan alımının tekrarlanan dozlarda hafif ketozis sağlayabildiğini, toksisite göstermediğini ve kolesterol seviyelerini normal aralıkta tuttuğunu göstermiştir. Keton öncülü olan orta zincirli trigliseritler (MCT'ler), hızla oksitlendikleri ve depolanmadıkları için eksojen olarak uygulandıklarında ketojenezi indükleyen bir alternatif yoldur. MCT'lerin oral alımı, insanlarda 0.15'ten 0.68 mM'ye kadar keton yükselmelerine neden olur ve toplam beyin yakıt enerjisinin yaklaşık %20'sine katkıda bulunmaktadır. MCT'ler, hiçbir yan etki, toksisite veya ketoasidoz göstermeyen farklı yollarla uygulanabilir. MCT'lerin akut infüzyonu veya oral alımı, glukoz metabolizmasını bozmadan (yaklaşık 30 dakika içinde) akut ketozu teşvik eder. Bu nedenle, MCT'ler tarafından ketojenezi tetiklemek için insülin seviyelerinin düşürülmesine gerek yoktur. Orta zincirli yağ asitlerinin (MCFA) yüksek mitokondriyal membran geçirgenliği, MCFA ketojenez indüksiyonu için önemli bir avantajdır (10).

Kalori kısıtlama günlük kalori alımındaki azalmayı içermektedir. Aynı öğün sıklığını koruyarak toplam enerji gereksinimlerinin (%20-%40) altında alım yapılır. Aralıklı oruç (IF) ise toplam enerji gereksinimlerine yetecek miktarda kaloringin, yalnızca önceden belirlenmiş beslenme aralıklarında, uzun süreli çok az besin alımı veya hiç yiyecek alınmaması durumuna karşılık gelmektedir. Tüm bu koşullarda, glukagon, katekolaminler ve kortizol tarafından hipoglisemiye karşı hormonal düzenleyici yanıt verilmektedir. Glisemi düzeltilir ve insülin salınımı, lipolizden ketojeneze izin verecek kadar düşük seviyelere düşmektedir (10, 12).

2.3 Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı (AH), hipokampus ve serebral kortekste hafıza kaybı ve nörodejenerasyon ile karakterize olan ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır. Alzheimer hastalığı hafıza kaybı, dil, düşünme ve problem çözme becerilerinde

zorluklara sebep olmaktadır. AH'nin başlıca göstergeleri amiloid beta peptidi (A β 42) oluşturan nevroitik plaklar ve hiperfosforile tau'dan oluşan nörofibriler yumaklar (NFTler)'dir. Bu proteinler sinir hücreleri arasındaki bağlantıların kopmasına ve sonunda da beyin hücrelerinin ve dokusunun kaybına neden olmaktadır (13).

AH yaygın olarak yaşlı bireylerde görünmektedir. Erken aşamada hasta amnestik hafif bilişsel bozukluk kriterlerini taşımaktadır. Durum ilerledikçe bilişsel zorluklar günlük yaşam aktivitelerini engelleyecek kadar derinleşir ve yaygınlaşır. Bu aşamada hastaya AH demans tanısı konulur. Hastalığın ilerleyen dönemlerinde davranış değişiklikleri, hareket bozuklukları, halüsinasyonlar ve nöbetler ortaya çıkmaktadır. Demans görülme sıklığı yaşla birlikte artar, 65 yaş üzerinin yaklaşık %5-%8'i bu hastalıktan etkilenmektedir. Yaşın 85'in üzerine çıkmasıyla bu oran %25-50'ye çıkmaktadır. Erkeklerde AH prevalansı kadınlara göre %19-29 daha düşüktür (13).

Amiloid plaklar, APP metabolizmasının iki yan ürünü olan 40 veya 42 amino asitten oluşan A β (A β 40 ve A β 42) ile anormal şekilde katlanmış hücre dışı birikimlerdir. A β plağı, amiloid öncü proteininin (APP) sekretazlar (α , β ve γ) yoluyla enzimatik bölünmesiyle elde edilen A β peptitlerinden oluşur. A β 42, daha yüksek fibrilizasyon oranı ve çözünmezliği nedeniyle A β 40'tan daha fazla bulunur. Nörofibriler yumaklar ise, hiperfosforile tau'dan oluşan eşlenmiş sarmal filamentlerden oluşur. A β 40 ve A β 42 plakları beyin tarafından yabancı madde olarak algılanıp mikrogiaları aktive eder. Sitokinlerin salınmasıyla immün yanıtı başlar ve sonuçta hücre ölümüne, dolayısıyla nörodejenerasyona neden olur (13,14). Alzheimer hastalığı toplumda çok fazla kişiyi etkilemekle birlikte tam olarak tedavisi bulunmamaktadır. Bu sebeple tüm dünyada hastalığın tedavi çalışmaları için büyük bütçeler ayrılmaktadır. Bu dezavantajlarına karşın daha düşük bütçeli yaklaşımlar geliştirilmesi için çalışılmaktadır. Bununla birlikte keton uygulamaları gibi daha düşük bütçeli yaklaşımlar geliştirilmesi için de çalışılmaktadır.

2.3.1 Alzheimer hastalığı, mitokondriyal fonksiyonlar ve keton ilişkisi

Mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres ve azalan antioksidan savunma da AH patojenezinin özelliklerindendir. Sitokrom c oksidaz seviyesinin azalması mitokondri fonksiyon bozukluğuna neden olurken oksidatif strese bağlı olarak glikojen sentaz kinazın (GSK-3) aşırı uyarılması, mitokondrinin geçirgenliğini değiştirmektedir (13). Bu da ROS'un aşırı üretimine yol açabilir. Aynı zamanda metal iyonlar çinko ve bakır da A β plaklarına bağlanarak ROS üretimine neden olur. Presenilin 1 proteinler, oksidatif stres, tau nörofibriler düğümler gibi faktörler otofajik vakuollerin işlev bozukluğuna neden olarak AH patojenezine katkıda bulunmaktadır (13).

Alzheimer hastalarında glukoz metabolizması incelendiğinde glukoz alımında %25-30'luk bir azalma gözlemlenmiştir. Bu durum GLUT1 ve GLUT3 glukoz taşıyıcılarının aşağı regülasyonu ile ilişkilendirilmektedir. Yapılan son araştırmalarda sporadik AH'de nörodejenerasyonun altında yatan önemli bir faktörün mitokondriyal disfonksiyon olduğu gösterilmiştir (15). AH'de anormal mitokondriyal morfoloji, azalan mitokondriyal kompleks IV ve ATP sentaz aktivitesi, değişen mitokondriyal membran potansiyeli, azalan mitokondri sayıları ve azalan kalsiyum tamponlama gibi birçok mitokondriyal fonksiyon değişmektedir. Aynı zamanda değişen mitokondriyal biyogenez, mitokondriyal dinamikler ve mitokondriyal transferler de Alzheimer hastalığı ile ilişkilendirilmiştir (15).

Alzheimer hastalığı ile yüksek kan şekeri düzeyleri arasında güçlü bir ilişki vardır. Bu ilişki o kadar güçlü ki bazıları Alzheimer'ı beyin diyabeti veya tip 3 diyabet (T3D) olarak adlandırmaktadır (16). Tip 2 diyabet gibi yüksek kan şekeri seviyesine sahip kişilerin, A β proteininde çarpıcı bir artış olduğu gösterilmiştir. Yine diyabetli kişilerin hipokampal boyutlarının diyabetli olmayan kişilere göre daha küçük olduğu bulunmuştur. Ayrıca hipokampal boyuttaki azalmaların HbA1c kan seviyeleriyle ilişkili olduğunu keşfettiler. Bu da HbA1c'nin hipokampal fonksiyonu ve hafıza kaybının başlangıcını belirtmek için bir biomarker olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (17).

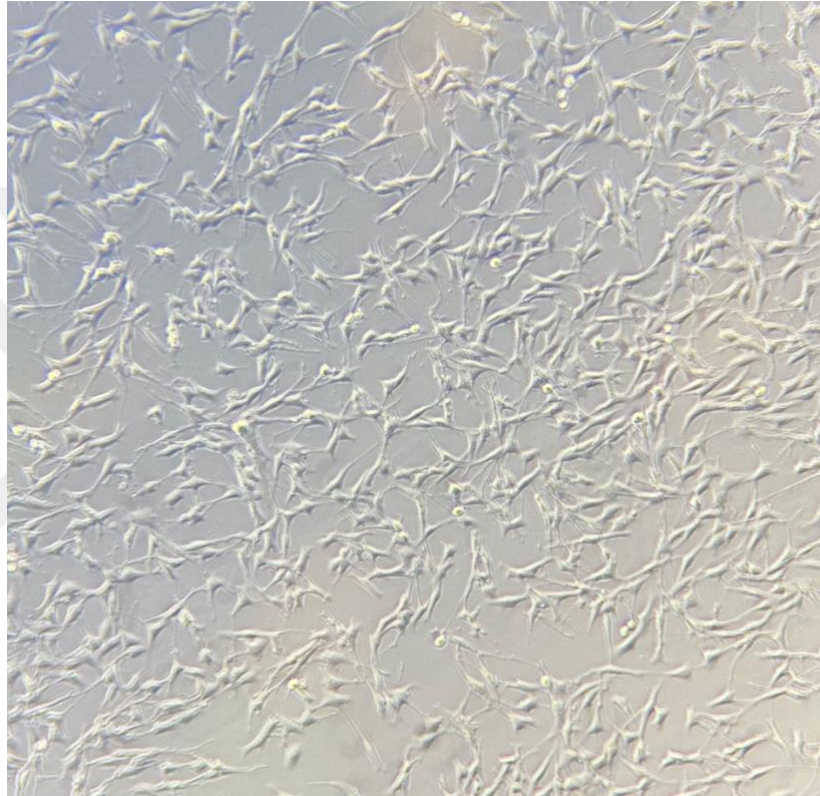
Amiloid öncü protein geninin Alzheimer'ın en önemli nedenlerinden olduğu bilinmektedir. Bu gen aynı zamanda insülin yolunu da etkilemektedir. İnsülin yolunun bozulması diyabetin ayırt edici özelliğidir. Beyinde yüksek düzeyde insülin direnci ve glukoz kullanma yeteneğinin azaldığı gösterilmiştir. Tip 2 diyabetli bireylerde özellikle yürütücü işlevlerde ve bilgi işleme hızında hızlı bilişsel gerileme görülmektedir. Tip 1 diyabetli kişilerin demans riskinin, diyabeti olmayan kişilere göre %93 daha yüksek olduğu düşünülmektedir (17).

Alzheimer hastalığında glukoz metabolizması bozulmaya uğrarken keton alımı ve metabolizması değişmemektedir (10). Son yıllarda yapılan çalışmalarda yaşlı ve AH transgenik dişi farelerde kan beyin bariyeri (BBB) yoluyla keton geçirgenliğini destekleyen MCT'nin yukarı regülasyona uğradığı gösterilmiştir. Keton türevlerinin uygulanmasının TCA ara maddelerini artırdığını, oksidatif stresi inhibe ettiğini ve NAD⁺/NADH oranının ise ΔG_{ATP} hidrolizini artırarak daha da azaldığını göstermektedir (10). Bu bulguların ışığında son çalışmalar, Alzheimer hastalığı için ketonların faydalı olabileceğini öngörmekle birlikte etki mekanizmaları henüz ortaya konulamamıştır.

2.4 HT22 Hücre Hattı

HT22 hücre hattı, immortal fare hipokampal nöron hücresidir (Şekil 7). HT22, fare nöron dokularının sıcaklığa duyarlı SV40 T-antijeni ile immortalize edilmesinden türeyen HT-4 hücre hattının alt klonudur. Çoğunlukla hipokampal kolinerjik nöronların bilişsel işlevlerdeki rolünü araştırmak için in vitro model olarak tercih edilir. HT22 hücreleri nöronal bir fenotip gösterir. Öğrenme ve hafıza gibi kritik beyin fonksiyonlarında rol oynayan önemli bir uyarıcı olan nörotransmitter glutamata karşı oldukça duyarlıdır. Bununla birlikte, yüksek glutamat seviyeleri, glutamat toksisitesine ve sinir hücrelerinin aşırı uyarılmasına yol açarak oksidatif stres ve apoptoz yoluyla hücre hasarına ya da ölüme neden olabilir. Bu nedenle nöronal hücrelerde glutamatın neden olduğu toksisiteyi incelemek için de kullanılan bir in vitro modelidir. Glutamat sitotoksitesinin neden olduğu Alzheimer hastalığı, Huntington hastalığı ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif bozuklukların araştırıldığı

Çalışmalarda en çok tercih edilen sekonder hücre hattıdır. AH patojenezi ve nrotoksisitenin incelenmesi için önemli bir deneysel modeldir. Alzheimer hastalığının neden olduğu mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, oksidatif stres, endoplazmik retikulum (ER) stresi ve apoptotik hücre ölümü analiz çalışmaları aynı zamanda gen ve sinyal proteini analizleri için kullanılan bir hücre modelidir. Bu nedenle, bu tez çalışmasında da HT22 hücre hattı kullanılmıştır (18, 19, 20).



Şekil 9. HT22 hücre si. Çalışmamız sırasında Zeiss Primo Vert mikroskop ile 10X objektifte çekilmiştir.

3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 HT22 Hücre Kültürü

Bu çalışmada fare hipokampal hücre hattı olan HT22 hücreleri kullanılmıştır. HT22 hücreleri İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesinden temin edilmiştir. Besiyeri olarak %10 fetal sığır serumu (FBS), %1 Penisilin-Streptomisin içeren DMEM kullanılıp hücreler, %5 CO₂ ve 37°C’de inkübe edildi.

3.1.1 Hücre ekimi

Sıvı azottan çıkarılan hücreler, 9 mL besiyerinin bulunduğu santrifüj tüpüne alındı. 500g’de 5 dk santrifüj edildi. Supernatant atılıp pellet 1mL besiyerinde çözöldü. Tripan mavisi ve thoma lamı yardımıyla hücre sayımı yapıp toplam 500.000 hücre T75 flaska ekildi.

3.1.2 Hücre pasajlama

Flaskın içindeki tüm besiyeri çekildi. Flaska 3 mL Trypsin-EDTA eklenip 2 dk inkübatörde bekletildi. Mikroskopta hücrelerin kalktığı gözlemlendikten sonra flaska 7 mL besiyeri eklenip trypsin-EDTA aktivitesi engellendi. Daha sonrasında tüm sıvı çekilip santrifüj tüpte toplanıp 500 g’de 5 dk santrifüj edildi. Hücre sayımı yapıp istenilen sayıda hücre T75 flaska ekildi. Geri kalan hücreler donduruldu.

3.1.3 Hücre dondurma

Her hücre pasajlamasında dondurma işlemi yapılarak hücrelerin uzun süre saklanması sağlandı. %80 DMEM, %20 FBS ve %10 DMSO olacak şekilde dondurma besiyeri hazırlandı. Besiyeri çekilen flaska 3 ml Tripsin-EDTA eklenip hücreler kalktıktan sonra 7 mL besiyeriyle tüm hücreler toplandı. 500g’de 5 dk santrifüj edildi. Hücre sayımı işlemi sonrası her kriotüpe 1x10⁶ hücreli 1ml dondurma besiyeri

konuldu. Önce -20°C’de 2 saat tutulduktan sonra -80°C’de 24 saat bekletilip sıvı azota kaldırıldı.

3.2 Deney Gruplarının Oluşturulması

HT22 hücrelerine A β ₁₋₄₂ uygulanarak patolojik Alzheimer hastalık modeli in vitro koşullarda taklit edilmiştir. In vitro Alzheimer modeli için tüm hücrelere 10 μ M A β ₁₋₄₂ uygulanmıştır. Literatürde 10 μ M A β ’nın bu çalışma için uygun olduğu gösterilmiştir (21, 22). Ancak çalışmadan önce en uygun A β ₁₋₄₂ miktarını belirlemek için 5 ve 10 μ M olacak şekilde A β ₁₋₄₂ optimizasyon çalışması yapılmıştır (23). Grubumuzun daha önceki çalışması referans alınarak hücre kültürlerine beta-OH bütirat (β OHB) 5mM olacak şekilde eklenmiştir (24, 25).

Hücre kültürleri, kontrol ve Alzheimer hastalık modeli olarak 2 ana gruba ve her grup 4 alt gruba ayrılmıştır:

Kontrol Grubu

1. Standart beslenme (450mg/L Glukoz+ %10 FBS) (N),
2. Açlık Medyumu (100mg/L Glukoz + %2 FBS) (F),
3. Açlık Medyumu + eksojen β OHB eklenen hücreler (FK),
4. Standart beslenme +eksojen β OHB eklenen hücreler (NK).

Alzheimer Hastalık Modeli Grubu

1. Standart beslenme (450mg/L Glukoz+ %10 FBS) (NA),
2. Açlık Medyumu (100mg/L Glukoz + %2 FBS) (FA),
3. Açlık Medyumu + eksojen β OHB eklenen hücreler (FKA),
4. Standart beslenme +eksojen β OHB eklenen hücreler (NKA).

Kontrol grubunda, standart beslenme grubu 450 mg/dL glukoz içeren Dulbecco’s Modified Eagle Medyumu (DMEM) (Gibco-41966029), %10 FBS ve %1 Penisilin/Streptomisin’den oluşmaktadır. Bu grup için ‘N’ kısaltması kullanılacaktır. Fizyolojik koşullarda açlık sırasında in vivo olarak hücreler düşük glukozun yanısıra

endojen keton cisimlerine de maruz kalmaktadır. FK medyumunu bu durumun deneysel modeli olarak tasarlanmıştır. Hücre kültürlerinde açlık ortamı, açlık medyumunu (starvation medium) ile sağlanacaktır. Açlık medyumunu olarak düşük glukoz ve düşük serum içeren medyum Earl's Balanced salt solution (EBSS) (Gibco-24010043, 100 mg/dL glukoz) kullanılacaktır. Hayvan ve insanlarda uzun süreli açlıkta, serumda bulunan besinler ve glukoz tamamen azalmadığı için bu oranlar seçilmiştir. EBSS, açlıkla tetiklenen otofajinin hücresel çalışmalarında kabul gören bir açlık medyumudur (26).

Açlık medyumunu grubu 100mg/dL Glukoz içeren EBSS, %2 FBS ve %1 Penisilin/Streptomisin'den oluşmaktadır. Bu grup için 'F' kısaltması kullanılacaktır. Açlık medyumunu + eksojen β OHB eklenen hücreler grubu 100mg/dL Glukoz içeren EBSS, %2 FBS, %1 Penisilin/Streptomisin'den ve 5 mM beta-OH bütirat (β OHB)'dan oluşmaktadır. Bu grup için 'FK' kısaltması kullanılacaktır. Standart beslenme + eksojen β OHB eklenen hücreler grubu 450 mg/dL glukoz içeren DMEM, %10 FBS, %1 Penisilin/Streptomisin ve 5 mM β OHB'dan oluşmaktadır. Bu grup için 'NK' kısaltması kullanılacaktır.

Alzheimer hastalık modeli grubu, kontrol grubunun 10 μ M $A\beta_{1-42}$ 'a maruz bırakılmasıyla oluşturulmuştur. Grup ve medyum içerikleri kontrol grubuyla aynı olup 10 μ M $A\beta_{1-42}$ uygulanmış halidir. 10 μ M $A\beta_{1-42}$ standart beslenme grubu 'NA', açlık medyumunu 'FA', açlık medyumunu + eksojen β OHB eklenen hücreler grubu 'FKA', standart beslenme + eksojen β OHB eklenen hücreler grubu 'NKA' kısaltmasıyla bahsedilecektir.

3.3 $A\beta_{1-42}$ ile β OHB Keton Hazırlanması ve Hücrelere Uygulanışı

3.3.1 $A\beta_{1-42}$ stok solüsyon hazırlanışı

Molekül ağırlığı 4514.1 g/mol olan 1 mg liyofilize $A\beta_{1-42}$ (Bachem, 4014447.1000), için çözücü olarak 0.1% NH_4OH kullanılmıştır. 1 mg liyofilize $A\beta_{1-}$

42, 1500 µL 0.1% NH₄OH ile karıştırılarak 147.6854 µM stok Aβ₁₋₄₂ elde edilmiştir. 0.22 µm filtre ile steril hale getirilmiştir. Deneyler için bu stok kullanılıp uygun miktar medyum ile karıştırılarak 10 µM Aβ₁₋₄₂ elde edilmiştir.

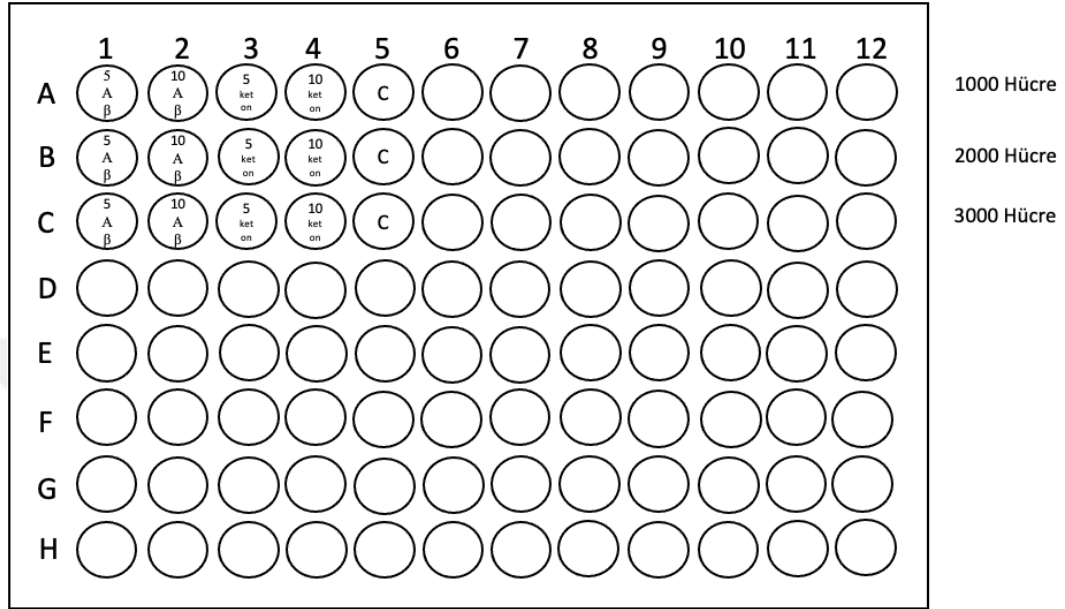
3.3.2 βOHB stok solüsyon hazırlanışı

Molekül ağırlığı 126.1 g/mol olan 1 g beta-OH bütirat sodyum tuzu (C₄H₇NaO₃) (Adipogen, CDX-H0080-G001) için çözücü olarak PBS (Phosphate Buffered Saline) kullanılmıştır. 1 g βOHB ve 50 ml PBS karıştırılarak 0.22 µm filtre ile filtrelenmiştir. 50 ml ve 158.60 mM keton ana stok oluşturulmuştur. Ana stok dörde bölünerek -20°C’de saklanmıştır. Ana stoktan 3150 µL alınıp 6850 µL PBS ile karıştırılarak 10 mL ve 50 mM yeni bir stok oluşturulmuştur. Deneylere bu stoktan devam edilip uygun miktar medyum ile karıştırılarak 5 mM βOHB elde edilmiştir.

3.4 MTT Optimizasyonları

MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür) deneyi hücre canlılığını değerlendirmek için kullanılan bir sitotoksosite testidir. Canlı ve sağlıklı hücreler MTT boyasını mor formazana dönüştürür ve optik yoğunlukla renk konsantrasyonu ölçülerek hücre canlılığı belirlenir. Molekül ağırlığı 414.33 g/mol olan 1 g MTT (neoFroxx, 1334GR001) için çözücü olarak önerilen 5 mg/mL PBS kullanılmıştır. 100 mg MTT tartılıp 20 ml PBS ile çözülmüştür. Alikotlandıktan sonra -20°C’de saklanmıştır. Optimizasyon için 1000, 2000 ve 5000 hücre sayısı ile deneme yapılmış. Aβ₁₋₄₂ optimizasyonu için 5 µM ve 10 µM konsantrasyonları seçilmiştir. βOHB keton optimizasyonu için ise 5 mM ve 10 mM konsantrasyonları kullanılmıştır. 96 kuyucuklu plate’in A1-5 sırasına 1000 hücre, B1-5 sırasına 2000 hücre ve C1-5 sırasına 3000 hücre ekilmiştir. Hücrelerin 24 saat büyümeleri beklenmiştir. 24 saat sonrasında 2000 hücre ekilen sıranın yeterli yoğunluğa ulaştığı görülmüştür. Sonrasında sırasıyla A1-5, B1-5 ve C1-5 sıralarına 5 µM Aβ₁₋₄₂, 10 µM Aβ₁₋₄₂, 5 mM keton, 10 mM keton ve kontrol olarak uygulama yapılmıştır. Şekil 10’da plate planı gösterilmiştir. Aβ₁₋₄₂ ve keton uygulamaları 24 saat bekletilmiştir. 24 saat sonunda platein absorbans değerleri ölçülüp değerlere bakıldığında uygun canlılıktaki

hücrelerin 2000 hücreli sırada 10 μM $\text{A}\beta_{1-42}$ ve 5 mM keton uygulanan kuyucuklarda olduğu görülmüştür. Bundan sonraki deneyler hem literatür hem de optimizasyon çalışmalarına dayanarak 10 μM $\text{A}\beta_{1-42}$ ve 5 mM keton üzerinden yapılmıştır.



Şekil 10. MTT optimizasyon plate planı. A1-5, 1000 hücre; B1-5, 2000 hücre; C1-5, 3000 hücre ekilmiştir. A1, B1, C1 kuyucuklarına 5 μM $\text{A}\beta_{1-42}$; A2, B2, C2 kuyucuklarına 10 μM $\text{A}\beta_{1-42}$; A3, B3, C3 kuyucuklarına 5 mM βOHB ; A4, B4, C4 kuyucuklarına 10 mM βOHB ve A5, B5, C5 kuyucuklarına kontrol medyum eklenmiştir.

3.5 MTT Deneyi

96 kuyucuklu plate'e 2000 hücre ekilmiştir. A1-9'a; N, NK, F, FK, NA, NKA, FA, FKA olacak şekilde plate planı yapılmıştır. Aynı grupların 2 paraleli B1-9 ve C1-9'a da uygulanmıştır. 24 saat sonrasında sırasıyla medyumlar çekildi. Gruplara uygun şekilde 100 μL medyumda 10 μM $\text{A}\beta_{1-42}$ ve 5 mM βOHB olacak şekilde hazırlanan medyumlar uygun kuyucuklara eklendi. Literatüre uygun olarak 24 saat bekletildi. Sonrasında her kuyucuğa 10 μL MTT eklendi. 4 saat inkübatörde bekletildi. Sonrasında medyum çekilip 100 μL DMSO eklendi. Shakerda en yüksek hızda 10 dakika çalkalandı. Sonrasında plate readerda 570 nm'de absorbans değerleri ölçüldü.

3.6 İmmunofloresan ve Konfokal Mikroskop Deneyi

Hücrede A β oluşumunu ve lokalizasyonunu gözlemlemek için immunofloresan tekniğiyle A β antikoru ve DAPI boya kullanarak konfokal mikroskopta A β fibrilleri gözlemlenmiştir. Böylece hücreye A β ₁₋₄₂ indükleyerek A β ₁₋₄₂ fibrillerinin oluşması sağlanıp A β ₁₋₄₂ toksisitesi oluşturularak Alzheimer hastalık modeli taklit edilmiş olunacaktır.

Ibidi μ -slide 8 well high glass bottom (80807) kullanılarak kuyucuklara 1500 hücre ekilmiştir. Kontrol, NA, NKA, FA, FKA olacak şekilde plate planı yapıp gruplardan 3 paralel olacak şekilde uygulama yapılmıştır. Hücreler %80 yoğunluğa ulaştığında medyumlar çekildi. Gruplara uygun şekilde 300 μ L medyumda 10 μ M A β ₁₋₄₂ ve 5 mM β OHB olacak şekilde hazırlanan yeni medyumlar uygun kuyucuklara eklendi. 24 saat beklendi. Sonrasında sırasıyla immunofloresan protokolünün fiksasyon, permibiliti, bloklama, primer antikor ve sekonder antikor ekleme bölümlerine başlandı. Fiksasyon aşamasında medyumlar çekildi. 3 kez PBS ile yıkandı. Kuyucuklara 300 μ L paraformaldehit eklenerek 15 dk beklendi. Paraformaldehit çekilerek kuyucuklar tekrar 3 kez PBS ile yıkandı. Böylece hücreler flaska sabitlenmiş oldu. Sonrasında 300 μ L PBST (%0.1 Tween 20'li PBS) eklenerek 5 dk beklendi. Böylece hücrelerde geçirgenlik oluşturuldu. PBST çekildikten sonra 300 μ L %1 BSA eklenip hafif çalkaladıktan sonra 1 saat bekletildi. Cell Signaling Technology β -Amyloid (D54D2) XP Rabbit mAb primer antikor, insertte tavsiye edildiği üzere 1XPBS, %0.3 TritonX-100 ve %1 BSA'dan oluşan antikor dilüsyon buffer hazırlandı. Antikor bu buffer ile 1:1400 oranında seyretildi. Seyreltilen antikordan 300 μ L tüm kuyucuklara eklendi ve 4°C'de shaker üzerinde hafif çalkalanarak over night bekletildi. Ertesi gün primer antikorlar aspire edildi. 3 kez PBS ile her seferinde 5 dk beklenerek yıkandı. Cell Signaling Technology Anti-rabbit IgG (H+L), F(ab')₂ Fragment (Alexa Fluor 488 Conjugate) sekonder antikor insertte uygun olarak 1:1000 oranında %1 BSA ile seyreltildi. 300 μ L tüm kuyucuklara eklendi. Karanlıkta ve oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Antikor aspire edildi ve 3 kez PBS ile her seferinde 5 dk bekleyerek yıkama yapıldı. Sonrasında DAPI/mounting medium

solüsyonundan 1 damla tüm kuyucuklara damlatıldı. Konfokal mikroskopta 63X objektif ile inceleme yapıp görüntüler çekildi.

3.7 Sitrat Sentaz Ölçüm Deneyi

Sitrat, mitokondri matrisinde gerçekleşen TCA (trikarboksilik asit) döngüsünün ilk ürünüdür. Sitrat oluşumunu sağlayan enzim ise sitrat sentaz enzimidir. Literatüre göre hücre ekstratlarından yapılacak olan sitrat sentaz ölçümü mitokondri aktivitesi ve sayısının bir göstergesi olarak kabul görüldüğünden (27) sitraz sentaz enzim ölçümleri yapılarak mitokondri fonksiyonları analiz edilecektir.

Bu deney için Abcam sitrat sentaz ölçüm kiti (ab239712) kullanılmıştır. 6 kuyucuklu plate'e N, NK, F, FK, NA, NKA, FA, FKA olacak şekilde plate planı yapıp gruplardan 3 paralel hücre ekimi yapılmıştır. Hücreler %80 yoğunluğa ulaştığında gruplara uygun şekilde 1000 μ L medyumda 10 μ M A β ₁₋₄₂ ve 5 mM β OHB olacak şekilde hazırlanan yeni medyumlar kuyucuklara eklenerek 24 saat bekletildi. Kit içinde bulunan assay buffer VII, CS substrate mix, DTNB, GSH standartları ve CS pozitif kontrol kit protokolüne göre kullanıma hazır hale getirildi. 500 μ L tripsin/EDTA ile hücreler kaldırıldı ve 500 g'de 5 dk santrifüj edildi. Supernatant aspire edildi. Sonrasında sitrat sentaz kit protokolüne göre deney gerçekleştirildi. Kit içinde bulunan assay buffer VII, CS substrate mix, DTNB, GSH standartları ve CS pozitif kontrol kit protokolüne göre kullanıma hazır hale getirildi. 1×10^6 hücreye 100 μ L soğuk assay buffer VII denk gelecek şekilde hücreler çözülüp 10 dk buzda bekletildi. 10000 g'de 5 dk santrifüj edildi. Supernatant ayrı ependorflara toplandı. Sonrasında her gruptan eş zamanlı optimizasyon çalışması için 20 ve 50'şer μ L örnek 96 kuyucuk plate'in uygun kuyucuklarına eklendi. 20 μ L örnek optimizasyon için tercih edilmiştir. Sonuçlar 50 μ L örnek üzerinden değerlendirilmiştir. Protokole uygun şekilde standartlar hazırlandı. 20 mM GSH standart 90 μ L assay buffer ile karıştırılarak 2 mM GSH standart elde edildi. 2 mM GSH standarttan 0, 4, 8, 12, 16, 20 μ L alınarak sırasıyla 50, 46, 42, 38, 34, 30 μ L assay bufferla karıştırıldı. Böylece sırasıyla 0, 8, 16, 24, 32, 40 nmol 6 adet standart elde edildi. Standartla uygun kuyucuklara eklendi. Tüm örnek ve standartlar başına 43 μ L assay buffer VII, 5 μ L

DTNB ve 2 μL CS substrate mix'den oluşan bir reaksiyon karışımı hazırlandı. Bu karışımdan 50 μL tüm örnek pozitif kontrol ve standart kuyucuklarına eklendi. Son olarak bir kuyucuk için 45 μL assay buffer ve 5 μL DTNB'den oluşan background mix hazırlanıp kuyucuğa eklendi. BioTek PowerWave XS2 plate readerda kinetik mod ve 412 OD'de absorbans değerleri ölçüldü. Plate planı Şekil 9'de gösterilmiştir.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0 nmol	N 20	N 50	NA 20	NA 50							
B	8 nmol	NK 20	NK 50	NK A 20	NK A 50							
C	16 nmol	F 20	F 50	FA 20	FA 50							
D	24 nmol	FK 20	FK 50	FK A 20	FK A 50							
E	32 nmol											
F	40 nmol											
G	PC											
H	BC											

Şekil 11. Sitrat sentaz aktivite ölçüm deneyi plate planı. A1-F1 arası kuyucuklarda sırasıyla 0 nmol, 8 nmol, 16 nmol, 24 nmol, 32 nmol, 40 nmol GSH standartları bulunmaktadır. G1, pozitif kontrol; H1, background kontrolü içermektedir. A2-A3, 20 μL ve 50 μL N grubu; A4-A5, 20 μL ve 50 μL NA grubu; B2-B3, 20 μL ve 50 μL NK grubu; B4-B5, 20 μL ve 50 μL NKA grubu; C2-C3, 20 μL ve 50 μL F grubu; C4-C5, 20 μL ve 50 μL FA grubu; D2-D3, 20 μL ve 50 μL FK grubu; D4-D5, 20 μL ve 50 μL FKA grubu örnek içermektedir.

3.8 Metabolik Parametre Analizleri

3.8.1 Hücre besiyerlerinden keton ölçümleri

Deney sonrası her grubun besiyerlerinden örnek alınarak keton miktarları ölçüldü. Abbott Freestyle Optimum Neo H keton ve şeker ölçüm cihazı kullanılarak keton probuna 5 µL medyum damlatıldı. Tüm gruplar teker teker denendikten sonra cihazın verdiği sonuçlar β OHB keton değerleri olarak esas alındı.

3.8.2 Laktat, laktat dehidrogenaz, glukoz ve aminoasit ölçümleri

Deney sonrası her grubun besiyerlerinden laktat ve laktat dehidrogenaz ölçümü yapılırken hücre lizatlarından da aminoasit ölçümleri yapılmıştır. Advia 1800 Siemens biyokimya otoanalizörü kullanılarak LDH, laktat ve glukoz değerleri ölçülmüştür.

Glukoz ölçüm protokolü Siemens GLUH-3 (Glukoz heksokinaz 3) kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kit protokolü, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz ve heksokinaz enzimlerinin kullanıldığı aynı zamanda heksokinaz yöntemi olarak da bilinen Slein metoduna dayanır. Burada glikolizin ilk basamağı olan glukozun heksokinaz tarafından glukoz-6-fosfata dönüştürülmesiyle oluşan glukoz-6-fosfat, glukoz-6-fosfat dehidrogenazın varlığında oksitlenerek aynı zamanda NAD^+ 'ın NADH 'a indirgenmesine neden olur. Son olarak, NADH 'ın 340/410 nm'de absorbens değeri ölçülür.

Laktat dehidrogenaz enzim ölçümü Siemens Laktat Dehidrogenaz L-P (LDLP) kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kit protokolü Tris tamponu kullanımına dayanır. Laktat dehidrogenaz, NAD^+ 'ı okside ederek laktatın pirüvata dönüşümünü ve NADH oluşumunu sağlar. Oluşan NADH 'ın, 340/700 nm'de absorbens ölçülür. Laktat dehidrogenazın enzim aktivitesi NADH absorbensıyla orantılıdır.

Laktat miktarı ölçümleri Siemens Laktat (LAC) kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kit, enzim kolorimetrik metoduna dayanarak laktat ölçümü yapmaktadır. Laktat oksidaz, laktatı pirüvat ve hidrojen peroksida katalize eder.

Oluşan hidrojen peroksit boyayla reaksiyona girerek renk oluşumu gösterir. 545/694 nm’de absorbans değerleri ölçülür. Absorbans değerleri laktat konsantrasyonları ile doğru orantılıdır.

Aminoasit ölçümleri hem hücre lizatlarından hem de hücre besiyerlerinden akış enjeksiyon analizi (FIA) tekniği ile, Shimadzu LCMS-8040 Sıvı Kromatograf Üçlü Dört Kutuplu Kütle Spektrometresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde HPLC kolonu kullanılmayarak iyon çokluğu, bileşiğin sinyal yoğunluğunun internal standardına oranı hesaplanarak ölçüldü. Mobil faz olarak asetonitril:su (80:20 v/v), akış hızı 0.1 ml/dk, enjeksiyon hacmi 10 µl, analiz süresi 3 dakika, iyonizasyon modu ESI (+) ve prob voltajı +4.5 kV, nebulizasyon gazı akışı 3.0 L/dk, kurutma gazı akışı, 20.0 L/dk, DL sıcaklığı 300°C ve blok ısıtıcı sıcaklığı 500°C olacak şekilde analizler yapılmıştır. Toplanan tüm veriler, Shimadzu LabSolutions LCMS Sürüm 5.60 SP2 kullanılarak çoklu reaksiyon monitörleme yöntemiyle değerlendirildi (28).

3.9 Biyoinformatik Analizleri

Biyoinformatik analizler için nonparametrik t-testi alternatifi olan Mann Whitney U Testi kullanılmıştır. Kontrol ve hastalık grubundaki her alt grup birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Sonuçlar bu test ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Testin güvenilirliği ise %90’dır. İstatistiksel analizler ve veri görselleştirme GraphPad Prism 9.5.1 programı kullanılarak yapılmıştır.

4 BULGULAR

4.1 Hücre Canlılığının İncelenmesi

Hücre canlılığını gözlemlemek ve A β 'nın HT22 hücreleri üzerindeki etkisini görmek amacıyla MTT deneyi gerçekleştirildi. Deney sonrası elde edilen değerler Tablo 2'de gösterilmiştir. Amiloid beta içeren NA, NKA, FA ve FKA grupları N grubu ile karşılaştırıldığında absorbans değerlerinin daha düşük olduğu görülmüştür. Böylece Tablo 2'ye göre A β 'nın HT22 hücreleri üzerinde toksisite etkisi olduğu görülmüştür. F, FA, FK ve FKA açlık gruplarının DMEM ile beslenen kontrol grubuyla karşılaştırıldığında absorbans ve canlılık yüzdelерinin daha düşük olduğu görülmüştür. NA-NKA, F-FK ve FA-FKA grupları incelendiğinde 5mM β OHB keton içeren grupların (NKA, FK, FKA) absorbans değerlerinin sırasıyla keton içermeyen NA, F ve FA gruplarına göre artış gösterdiği görülmüştür. Sonuç olarak MTT deneyi ile birlikte eksojen uygulanan 5 mM β OHB ketonun deney gruplarının canlılığı üzerinde olumlu etkisi olduğu gösterilmiş olup bununla birlikte hücrelere uygulanan 10 μ M A β ₁₋₄₂'nin HT22 hücreleri üzerinde toksik etki oluşturduğu ve 5 mM β OHB uygulamasının bu etkiyi azalttığı görülmüştür.

Tablo 2. Hücre canlılığı (MTT) deneyi sonuçları.

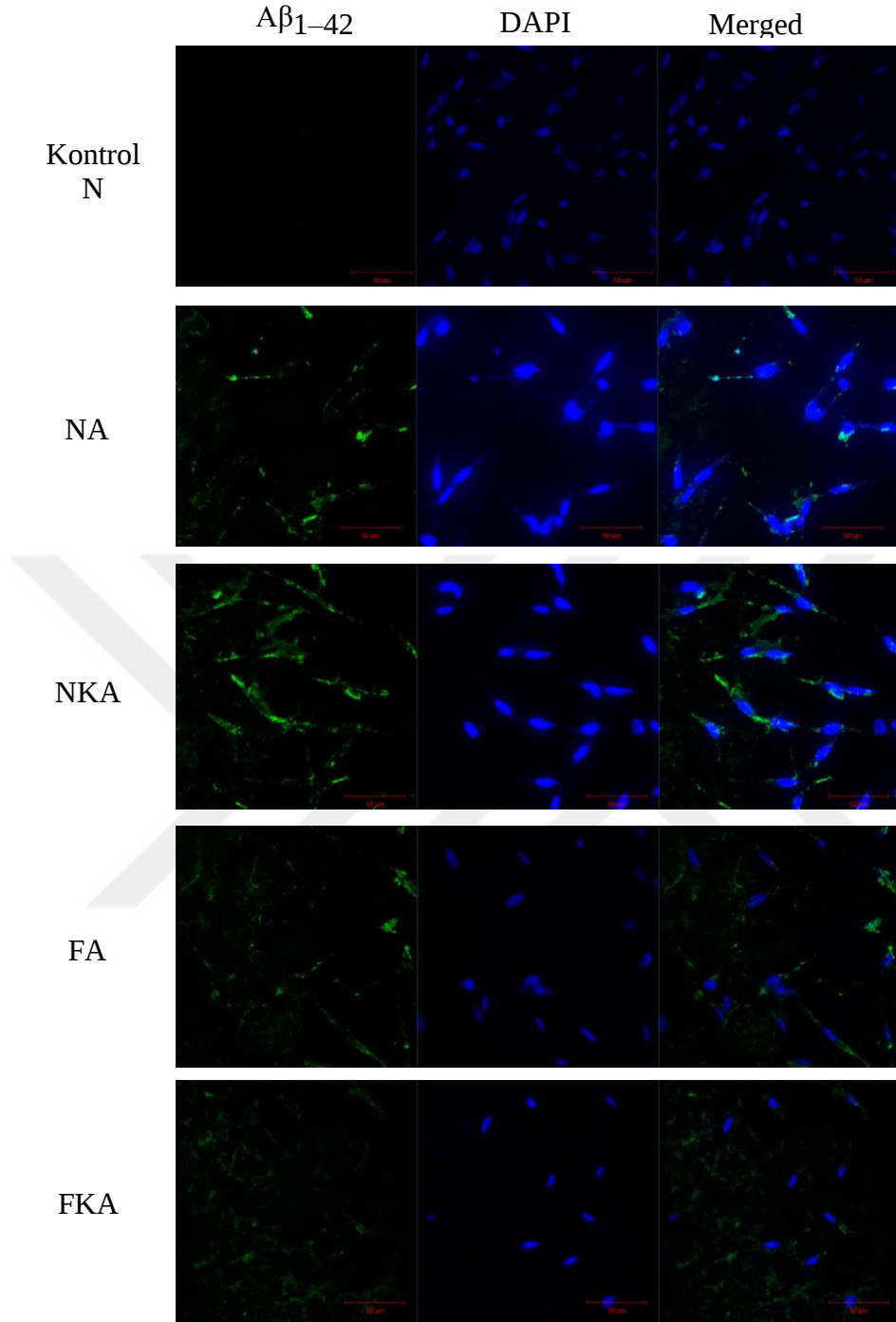
Grup	N	NK	F	FK	NA	NKA	FA	FKA
Abs.	0.295	0.286	0.225	0.259	0.187	0.216	0.146	0.189
Medyum kontrol abs. (Blank)	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044
(Abs)-(Kontrol Abs.)	0.251	0.242	0.181	0.215	0.143	0.172	0.102	0.145
Canlılık	%100	%96	%72	%86	%57	%69	%41	%58

N, DMEM medyumu içeren kontrol grubu; NK, DMEM + 5mM β OHB; NA, DMEM + 10 μ M $A\beta_{1-42}$; NKA, DMEM + 5mM β OHB +10 μ M $A\beta_{1-42}$, F, EBSS medyumu içeren kontrol grubu; FK, EBSS + 5mM β OHB; FA, EBSS + 10 μ M $A\beta_{1-42}$; FKA, EBSS + 5mM β OHB +10 μ M $A\beta_{1-42}$. Deneyler 3 kez tekrar edilmiş olup elde edilen data analiz edilmiş ve istatistiksel olarak fark olmadığı tespit edilmiştir. Tablo 2’de ilk deneyin sonuçları gösterilmektedir.

4.2 $A\beta_{1-42}$ Lokalizasyonunun İncelenmesi

Hücrede $A\beta$ oluşumunu ve lokalizasyonunu gözlemlemek için immunofloresan metoduna dayalı $A\beta$ antikor ve DAPI boya kullanarak konfokal mikroskopta $A\beta$ fibrilleri gözlemlenmiştir. Hücreye dışarıdan $A\beta_{1-42}$ indükleyerek $A\beta_{1-42}$ fibrillerinin oluşumu taklit edilmiştir. Böylece in vitro koşullarda $A\beta_{1-42}$ toksisitesi sağlanarak Alzheimer hastalık modeli oluşturulmuştur. $A\beta_{1-42}$ fibrillerine karşı $A\beta$ antikor, nükleus için ise DAPI ile boyama yapılmıştır. Görüntüler, Zeiss LSM700 konfokal mikroskopta 63X oil objektif ile çekilmiştir. HT22 hücrelerinde her deney grubunun $A\beta_{1-42}$ protein lokalizasyonu Şekil 12’de gösterilmiştir.

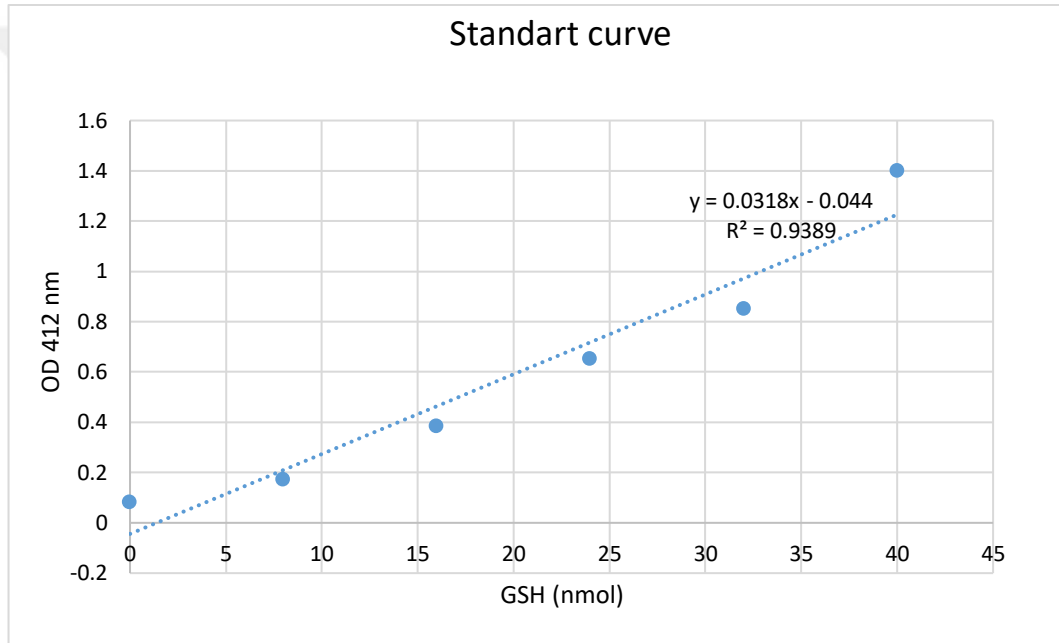
Kontrol grubu hariç tüm deney gruplarında $A\beta_{1-42}$ proteini gözlemlenmiştir. Böylece $A\beta_{1-42}$ toksisitesi sağlanarak Alzheimer hastalık modelinin oluşturulduğu kanıtlanmıştır. Şekil 12’ye bakıldığında $A\beta_{1-42}$ proteinlerinin tüm deney gruplarında hücrenin periferel bölgelerinde ve hücre dışında olduğu görülmüştür. NA, NKA, FA ve FKA deney grupları karşılaştırıldığında hücrelerin periferel bölgelerinde ve hücre dışında benzer oranda $A\beta_{1-42}$ proteinlerine rastlandığı görülmüştür. NA ve NKA ile FA ve FKA grupları karşılaştırıldığında NKA ve FKA gruplarının $A\beta_{1-42}$ protein oranlarında azalma görülmemiştir. Böylece eksojen β OHB uygulamasının $A\beta$ toksisitesine olumlu bir etkisinin olup olmadığı net bir şekilde gösterilememiştir. Sonuç olarak N, NA, NKA, FA ve FKA deney grupları incelendiğinde birbirleriyle uyumlu ve anlamlı $A\beta_{1-42}$ protein lokalizasyonu gözlenmemiştir.



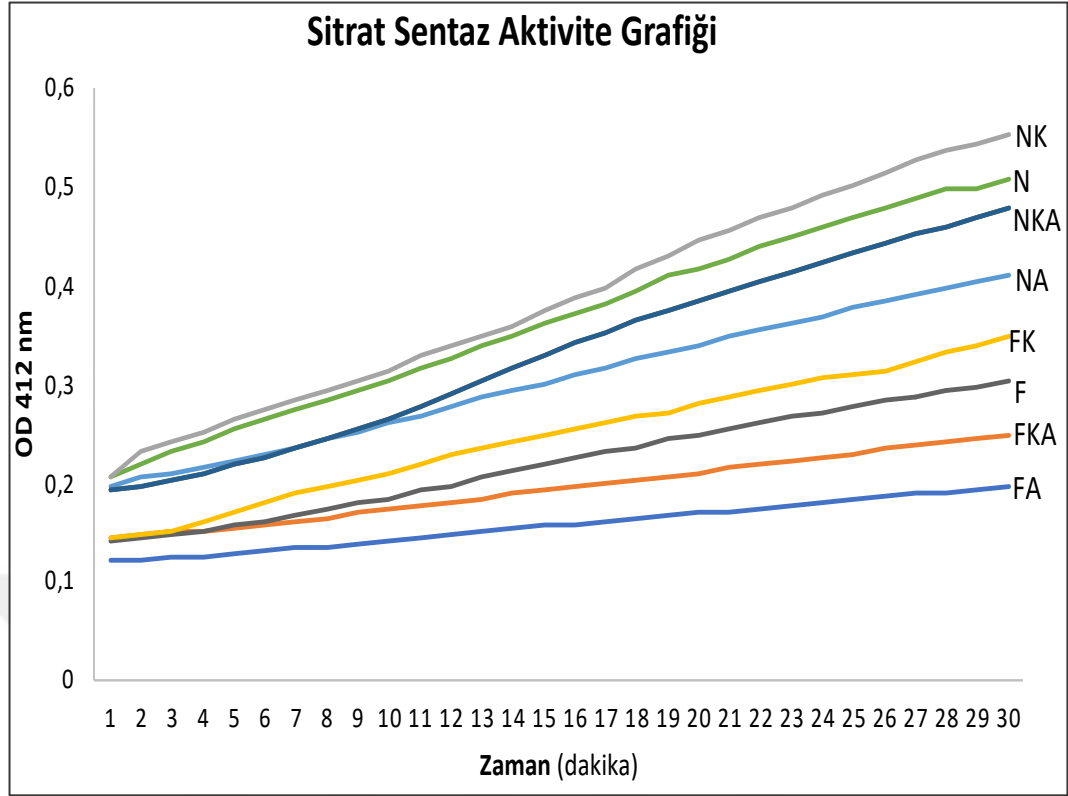
Şekil 12. $A\beta_{1-42}$ lokalizasyonu konfokal mikroskop görüntüleri. N, DMEM medyumunu içeren kontrol grubu; NK, DMEM + 5mM β OHB; NA, DMEM + 10 μ M $A\beta_{1-42}$; NKA, DMEM + 5mM β OHB +10 μ M $A\beta_{1-42}$, F, EBSS medyumunu içeren kontrol grubu; FK, EBSS + 5mM BOHB; FA, EBSS + 10 μ M $A\beta_{1-42}$; FKA, EBSS + 5mM β OHB +10 μ M $A\beta_{1-42}$. Görüntüler, Zeiss LSM700 konfokal mikroskopta 63X oil objektif ile çekilmiştir.

4.3 Mitokondriyal Fonksiyon Analizlerinin İncelenmesi

Mitokondri matrisinde gerçekleşen TCA döngüsünün ilk ürünü olan sitrat oluşumunu kataliz eden sitrat sentaz enzimi ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Sitraz sentaz enzim ölçüm değerleri mitokondri aktivitesinin bir göstergesi olarak kabul görmektedir. Sitrat sentaz aktivite ölçüm kiti kullanılarak deney gerçekleştirilmiştir. Kit standartlarının absorbans değerleri ve kalibrasyon eğrisi Şekil 13’de verilmiştir. Deney gruplarının plate okuyucuda 412 nm’de 30 dakika boyunca absorbans değerleri ölçülmüştür. Elde edilen değerler Şekil 14’de gösterilmiştir.



Şekil 13. Standartların absorbans değerleri. Abcam sitrat sentaz assay kiti 0, 8, 16, 24, 32 ve 40 nmol’den oluşan altı adet GSH standartlarının absorbans değerleri verilmiştir.



Şekil 14. Sitrat sentaz aktivite grafiği. Deney gruplarının ilk 30 dakikadaki absorbans değerleridir. N, DMEM medyumunu içeren kontrol grubu; NK, DMEM + 5mM β OHB; NA, DMEM + 10 μ M $A\beta_{1-42}$; NKA, DMEM + 5mM β OHB + 10 μ M $A\beta_{1-42}$, F, EBSS medyumunu içeren kontrol grubu; FK, EBSS + 5mM β OHB; FA, EBSS + 10 μ M $A\beta_{1-42}$; FKA, EBSS + 5mM β OHB + $A\beta_{1-42}$. Deneyler 3 kez tekrar edilmiş olup elde edilen data analiz edilmiş ve istatistiksel olarak fark olmadığı tespit edilmiştir. Şekil 14'te ilk deneyin sonuçları gösterilmektedir.

Şekil 14'e bakıldığında normal besiyeri eklenmiş gruplar içinde NK grubunun enzim aktivitesinin en yüksek olduğu görülürken açlık medyumuyla beslenen gruplar arasında ise FK grubunun enzim aktivitesinin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Dolayısıyla keton eklenmiş kontrol grubu (NK) ve keton eklenmiş açlık (FK) gruplarında enzim aktivitesinin daha yüksek olduğu görülmektedir. $A\beta_{1-42}$ eklenen hastalık modeli gruplarında ise yalnızca $A\beta_{1-42}$ eklenen FA ve NA gruplarının daha düşük sitrat sentaz enzim aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Ancak $A\beta_{1-42}$ 'e ek olarak β OHB eklenen NKA ve FKA gruplarının NA ve FA gruplarına göre enzim aktivitesinde artış olduğu görülmektedir.

4.4 Metabolik Parametre Analizlerinin Değerlendirilmesi

Deneylerin sonunda medyumlar ve hücre lizatları ayrı ayrı toplandı ve metabolik içerikleri analiz edildi. Tablo 3'te deney sonrası analiz edilen medyumların metabolik içerikleri verilmiştir. Normal gruplarda kullanılan medyum (Gibco DMEM, 41966029) içeriğinde 450 mg/dL glukoz (Tablo 4). Açlık deneylerinin yapıldığı medyum EBSS (Gibco EBSS-24010043) içeriğinde 100 mg/dL glukoz bulunmaktadır (Tablo 5). Keton içeren grupların medyumlarında ise 5 mM β OHB bulunmaktadır. Ek olarak laktat dehidrogenaz (LDH) her iki medyum içeriklerinde de bulunmamaktadır. Bu bilgiler eşliğinde deney sonrası medyumların glukoz, keton, laktat ve LDH içerikleri analiz edilmiş olup Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3. Deney sonrası grupların metabolik içerikleri.

Grup	Glukoz (mg/dL)	Keton (mmol/L)	Laktat (mg/dL)	LDH (U/L)
N	392±6.2	0	45.6±4.8	36±2.4
NK	348±5.1*	4.2±0.41	33.2± 2.9*	28±1.8*
NA	358±7.8*	0	48.9±3.1*	42±4.4*
NKA	320±6.5*	3.5±0.13	36.2± 3.6	37±1.3
F	96±2.6	0	17.2±1.8	45±3.1
FK	87±3.1**	3.7±0.25	15.6±2.6**	30±2.1**
FA	92±3.5	0	18.6±1.7	47±3.6
FKA	83±2.9**	2.2±0.21	16.3±1.4**	26±1.5**

N, DMEM medyumunu içeren kontrol grubu; NK, DMEM + 5mM β OHB; NA, DMEM + 10 μ M $A\beta_{1-42}$; NKA, DMEM + 5mM β OHB +10 μ M $A\beta_{1-42}$, F, EBSS medyumunu içeren kontrol grubu; FK, EBSS + 5mM β OHB; FA, EBSS + 10 μ M $A\beta_{1-42}$; FKA, EBSS + 5mM β OHB +10 μ M $A\beta_{1-42}$ 'yi ifade etmektedir. Deneyler 3 kez tekrar edilmiş ve sonuçlar 3 deneyin ortalaması $\pm$ standart sapma (SD) olarak

verilmiştir. Normal (N) medyum ile karşılaştırıldığında, * $p < 0.5$, açlık medyum (F) ile karşılaştırıldığında ** $p < 0.5$ ile ifade edilir.

Tablo 3'e bakıldığında, tüm grupların glukoz kullandığı ve aynı zamanda keton içeren grupların eş zamanlı olarak β OHB kullandığı görülmüştür. $A\beta_{1-42}$ uygulanmış ve keton eklenmiş normal medyumlu gruplar (NKA), NA grupları ile karşılaştırıldığında glukoz ve keton kullanımında artış görülmektedir. Açlık modeli uygulanmış keton içeren $A\beta_{1-42}$ uygulanan medyumların (FKA) glukoz ve keton kullanımının en fazla olduğu görülmektedir. En düşük laktat miktarları da açlık medyum uygulanmış gruplarda görülmüştür.

Tablo 4. Gibco DMEM 41966029 içerik tablosu (29)

Gibco DMEM 41966-029 İçerik Tablosu			
Bileşikler	Molekül ağırlığı	Konsantrasyon (mg/L)	mM
Aminoasitler			
Glycine	75.0	30.0	0.4
L-Arginine hydrochloride	211.0	84.0	0.39810428
L-Cystine 2HCl	313.0	63.0	0.20127796
L-Glutamine	146.0	580.0	3.972
L-Histidine hydrochloride-H2O	210.0	42.0	0.2
L-Isoleucine	131.0	105.0	0.8015267
L-Leucine	131.0	105.0	0.8015267
L-Lysine hydrochloride	183.0	146.0	0.7978142
L-Methionine	149.0	30.0	0.20134228
L-Phenylalanine	165.0	66.0	0.4
L-Serine	105.0	42.0	0.4
L-Threonine	119.0	95.0	0.79831934
L-Tryptophan	204.0	16.0	0.078431375
L-Tyrosine	181.0	72.0	0.39779004
L-Valine	117.0	94.0	0.8034188
Vitaminler			
Choline chloride	140.0	4.0	0.028571429
D-Calcium pantothenate	477.0	4.0	0.008385744
Folic Acid	441.0	4.0	0.009070295
Niacinamide	122.0	4.0	0.032786883
Pyridoxine hydrochloride	206.0	4.0	0.019417476
Riboflavin	376.0	0.4	0.0010638298
Thiamine hydrochloride	337.0	4.0	0.011869436
i-Inositol	180.0	7.2	0.04
İnorganik Tuzlar			
Calcium Chloride (CaCl ₂) (anhyd.)	147.0	264.0	1.7959183
Ferric Nitrate (Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)	404.0	0.1	2.4752476E-4
Magnesium Sulfate (MgSO ₄) (anhyd.)	246.0	200.0	0.8130081
Potassium Chloride (KCl)	75.0	400.0	5.3333335
Sodium Bicarbonate (NaHCO ₃)	84.0	3700.0	44.04762
Sodium Chloride (NaCl)	58.0	6400.0	110.344826
Sodium Phosphate monobasic (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	154.0	141.0	0.91558444
Diğer Bileşikler			
D-Glucose (Dextrose)	180.0	4500.0	25.0
Phenol Red	376.4	15.0	0.039851222
Sodium Pyruvate	110.0	110.0	1.0

Tablo 5. Gibco EBSS 24010043 içerik tablosu (30)

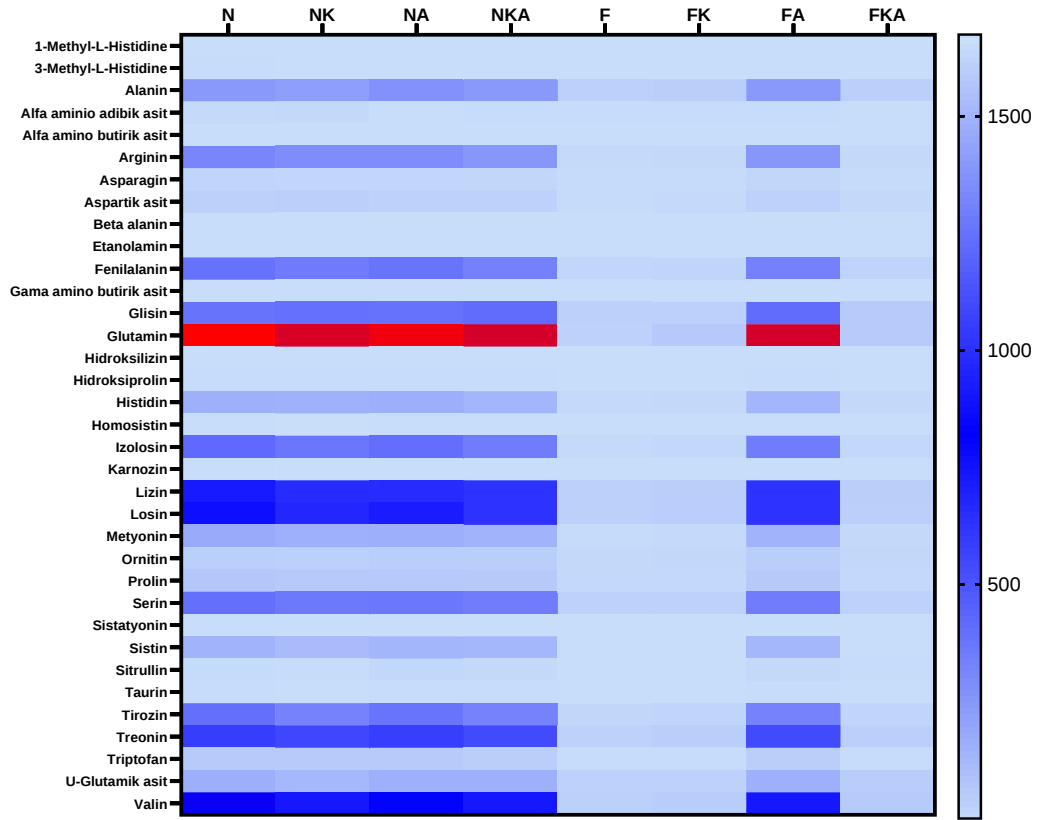
Gibco EBSS 24010043 İçerik Tablosu			
Bileşikler	Moleküler ağırlığı	Konsantrasyon (mg/L)	mM
İnorganik Tuzlar			
Calcium Chloride (CaCl ₂) (anhyd.)	111.0	200.0	1.8018018
Magnesium Sulfate (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	246.0	200.0	0.8130081
Potassium Chloride (KCl)	75.0	400.0	5.3333335
Sodium Bicarbonate (NaHCO ₃)	84.0	2200.0	26.190475
Sodium Chloride (NaCl)	58.0	6800.0	117.24138
Sodium Phosphate monobasic (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	138.0	140.0	1.0144928
Diğer Bileşikler			
D-Glucose (Dextrose)	180.0	1000.0	5.5555553
Phenol Red	398.0	10.0	0.025125628

Aynı zamanda hem hücre lizatlarında hem de hücre besiyerlerinde aminoasit profil çalışması yapılmıştır. Aminoasit miktarları ölçümü Shimadzu LCMS-8040 Sıvı Kromatograf Üçlü Dört Kutuplu Kütle Spektrometresi kullanılarak akış enjeksiyon analizi (FIA) tekniği ile gerçekleştirilmiştir. Deney sonrası besiyeri aminoasit miktarları Tablo 6’da hücre homojenatı aminoasit miktarları Tablo 7’de gösterilmiştir. Aynı zamanda aminoasit sonuçlarının ısı haritaları Şekil 15 ve Şekil 16’da gösterilmiştir. Tablo 6’ya bakıldığında tüm deney gruplarında en yüksek aminoasitin glutamin olduğu görülmektedir. En yüksek miktarda bulunan diğer aminoasitler ise sırasıyla valin lösin ve lisin olmuştur. Normal medyumlu gruplar ve açlık medyumlu gruplar karşılaştırıldığında açlık medyumlu grupların aminoasit miktarlarının daha düşük olduğu görülmüştür.

Tablo 6. Deney sonrası besiyerindeki aminoasit miktarları

BESİYERİ	GRUPLAR								BİRİM
AMİNOASİTLER	N	NK	NA	NKA	F	FK	FA	FKA	
1-Methyl-L-Histidine	1,4993	1,1580	1,7759	1,2597	0,5473	0,2804	1,2597	0,3994	µmol/L
3-Methyl-L-Histidine	4,3765	3,6898	3,2452	3,3016	1,0289	1,0276	3,3016	0,8433	µmol/L
Alanin	263,2688	238,8329	288,4673	262,1995	52,4417	57,7773	262,1995	55,7206	µmol/L
Alfa aminio adibik asit	12,0261	16,1820	2,6571	5,744	4,3696	5,7193	5,744	2,67	µmol/L
Alfa amino butirik asit	3,6845	1,3801	3,5966	2,9462	0,3226	0,5473	2,9462	0,4351	µmol/L
Arginin	333,3716	306,1190	307,4306	270,6873	13,8888	16,5336	270,6873	16,7428	µmol/L
Asparagin	32,8642	28,2898	29,7363	26,0473	10,8266	9,5545	26,0473	10,1745	µmol/L
Aspartik asit	48,8868	54,9635	43,2541	43,7708	10,5697	12,7803	43,7708	18,5203	µmol/L
Beta alanin	0,5522	0,2781	0,4713	0,2822	0,4128	0,2139	0,2822	0,1095	µmol/L
Etanolamin	0,4865	0,3561	0,4927	0,2995	0,3038	0,3222	0,2995	0,2817	µmol/L
Fenilalanin	408,4640	369,5335	396,8889	351,2375	26,6812	31,8564	351,2375	37,6129	µmol/L
Gama amino butirik asit	1,1045	0,9596	1,0348	0,8465	0,2486	0,2929	0,8465	0,2608	µmol/L
Glisin	401,5974	411,7310	408,8766	427,3992	46,4012	51,7375	427,3992	68,7767	µmol/L
Glutamin	1674,1832	1548,8825	1631,341	1534,5418	44,6695	79,0764	1534,5418	69,6719	µmol/L
Hidroksilizin	0,7298	1,5280	2,7093	2,6476	1,5551	2,9011	2,6476	1,4489	µmol/L
Hidroksiprolin	4,8289	4,4114	5,3712	4,3531	0,9161	1,0488	4,3531	0,9529	µmol/L
Histidin	170,6320	169,2804	177,1546	148,9417	12,9886	16,5279	148,9417	20,6395	µmol/L
Homosistin	0,0337	0,0073	0,0191	0,0082	0,0099	0,2069	0,0082	0,0111	µmol/L
Izolosin	438,0229	389,7500	418,849	369,3406	14,6479	22,4562	369,3406	24,6162	µmol/L
Karnozin	1,9506	0,8783	1,7439	1,694	0,3761	0,7152	1,694	1,1482	µmol/L
Lizin	739,1229	670,2923	672,604	645,1732	46,8398	58,3848	645,1732	57,6583	µmol/L
Losin	782,6499	687,4245	727,8927	645,3336	46,1231	58,8639	645,3336	54,088	µmol/L
Metyonin	194,1598	173,1307	179,5895	161,6762	9,6758	12,3976	161,6762	15,6583	µmol/L
Ornitin	54,6377	50,9273	59,1936	56,7863	17,9071	22,7419	56,7863	24,4783	µmol/L
Prolin	84,0626	75,9941	78,6855	75,1192	18,8983	20,238	75,1192	19,924	µmol/L
Serin	415,9992	379,8220	388,2332	365,9252	42,843	45,6163	365,9252	44,7565	µmol/L
Sistatyonin	0,3910	0,3884	0,3221	0,2238	0,2032	0,0158	0,2238	0,1315	µmol/L
Sistin	159,9720	128,5128	153,5472	143,9262	1,1819	1,1832	143,9262	2,186	µmol/L
Sitrullin	10,3300	7,0094	21,4235	15,2052	2,9572	2,0193	15,2052	4,798	µmol/L
Taurin	4,7683	2,9913	5,9136	6,9829	2,0039	2,5984	6,9829	3,1383	µmol/L
Tirozin	418,2513	345,3120	397,6579	343,7567	25,6974	30,4846	343,7567	32,3325	µmol/L
Treonin	603,5796	570,6844	601,5238	557,0856	43,8443	58,2929	557,0856	54,6616	µmol/L
Triptofan	68,6714	68,2412	70,1237	58,5968	4,6327	5,7072	58,5968	5,2579	µmol/L
U-Glutamik asit	178,0401	143,1796	173,2069	175,7669	43,9684	45,527	175,7669	62,6231	µmol/L
Valin	866,8586	750,3209	828,4068	749,9436	48,3463	61,814	749,9436	69,5417	µmol/L

N, DMEM medyumunu içeren kontrol grubu; NK, DMEM + 5mM β OHB; NA, DMEM + 10 μ M $A\beta_{1-42}$; NKA, DMEM + 5mM β OHB +10 μ M $A\beta_{1-42}$, F, EBSS medyumunu içeren kontrol grubu; FK, EBSS + 5mM BOHB; FA, EBSS + 10 μ M $A\beta_{1-42}$; FKA, EBSS + 5mM β OHB +10 μ M $A\beta_{1-42}$ 'yi ifade etmektedir.

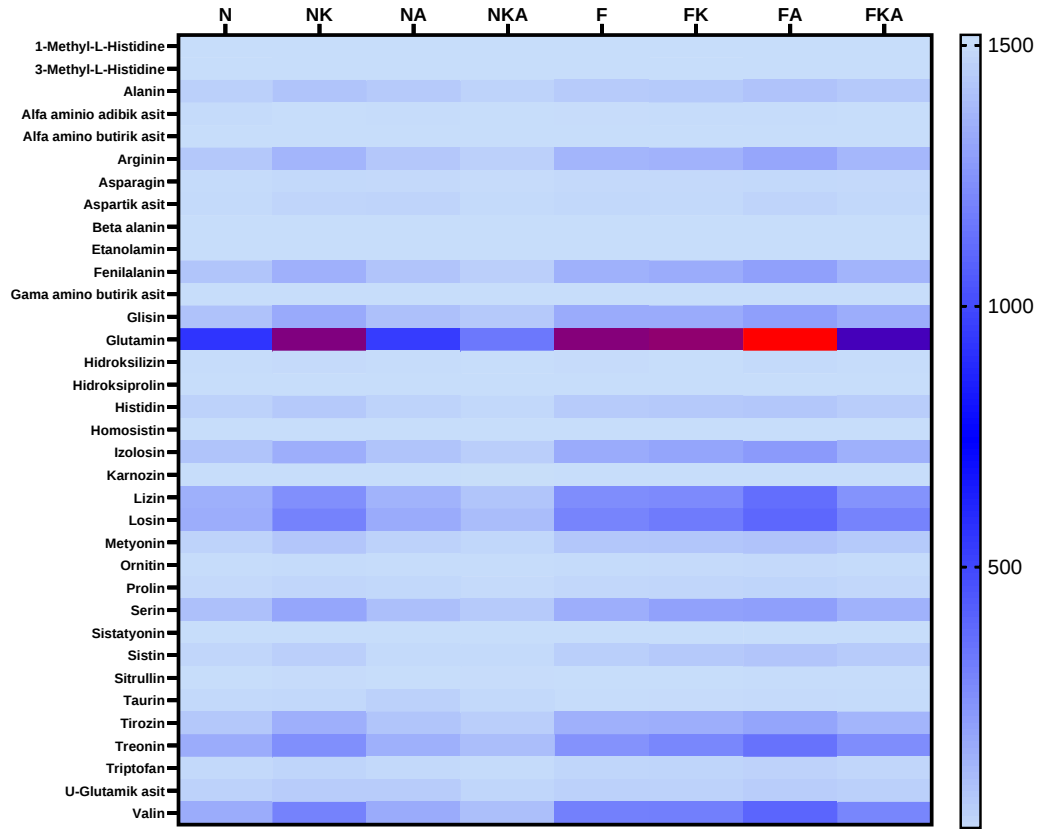


Şekil 15. Besiyerindeki aminoasit miktarlarının ısı haritası. N, DMEM medyumunu içeren kontrol grubu; NK, DMEM + 5mM β OHB; NA, DMEM + 10 μ M $A\beta_{1-42}$; NKA, DMEM + 5mM β OHB +10 μ M $A\beta_{1-42}$, F, EBSS medyumunu içeren kontrol grubu; FK, EBSS + 5mM BOHB; FA, EBSS + 10 μ M $A\beta_{1-42}$; FKA, EBSS + 5mM β OHB +10 μ M $A\beta_{1-42}$ 'yi ifade etmektedir. Birimi μ mol/L'dir.

Tablo 7. Deney sonrası hücre homojenatlarındaki aminoasit miktarları

Hücre Homojenatı	GRUPLAR								BİRİM
AMİNOASİTLER	N	NK	NA	NKA	F	FK	FA	FKA	
1-Methyl-L-Histidine	0,2274	0,3853	0,2310	0,1438	0,6473	1,0981	0,6275	0,0723	μmol/L
3-Methyl-L-Histidine	0,8456	1,4153	0,8696	0,5355	1,4170	1,4270	1,9248	1,0809	μmol/L
Alanin	47,8735	89,0066	66,7681	36,1054	63,6975	68,4130	90,5455	69,9342	μmol/L
Alfa amino adibik asit	8,3381	2,7744	6,3579	3,0152	3,5159	4,0039	4,5774	1,5945	μmol/L
Alfa amino butirik asit	0,2761	0,2076	0,9486	0,2885	0,2946	0,5692	0,1339	1,0900	μmol/L
Arginin	73,8396	138,8441	75,5859	45,3577	137,8565	147,2142	189,4005	131,0683	μmol/L
Asparagin	9,1405	16,4370	13,8509	7,3757	14,3239	14,5253	16,1463	13,8021	μmol/L
Aspartik asit	12,8955	27,4954	32,2211	12,6785	19,0559	16,0344	33,4005	20,3572	μmol/L
Beta alanin	0,4877	0,5368	1,0672	0,8863	0,3345	0,4407	0,2597	0,5734	μmol/L
Etanolamin	0,1740	0,3058	0,2581	0,1607	0,2920	0,2812	0,3120	0,2056	μmol/L
Fenilalanin	85,3751	155,3722	86,1416	48,7714	152,5016	170,1304	210,3274	141,6520	μmol/L
Gama amino butirik asit	0,3306	0,5162	0,4536	0,1671	0,4714	0,4254	0,5238	0,3275	μmol/L
Glisin	92,8520	176,8875	101,8199	70,9364	172,4563	171,2625	214,1027	165,8187	μmol/L
Glutamin	579,4076	1141,1760	554,1519	348,9505	1153,8102	1186,5143	1519,8234	963,0887	μmol/L
Hidroksilizin	3,8530	11,0148	6,8182	1,1033	7,1153	2,7848	12,9864	5,3263	μmol/L
Hidroksiprolin	0,7260	1,4755	0,8672	0,4152	1,4135	1,5055	2,0748	1,2090	μmol/L
Histidin	38,2477	70,8473	37,4315	20,2402	64,2435	68,9398	78,1317	56,6467	μmol/L
Homosistin	0,0427	0,0700	0,0619	0,0200	0,0803	0,0337	0,0413	0,0331	μmol/L
İzolosin	88,6785	162,1879	88,4665	51,9700	173,1180	194,5506	231,1867	156,4911	μmol/L
Karnozin	0,1946	0,1267	0,0867	0,0094	0,1288	0,2145	0,1104	0,0571	μmol/L
Lizin	157,3210	268,9194	146,4428	85,2182	276,3442	284,8401	381,4907	256,2281	μmol/L
Losin	164,5616	313,0449	173,9518	111,3485	307,5459	335,8681	405,5711	310,1715	μmol/L
Metionin	35,8091	79,5354	38,8028	23,3591	77,7453	80,6259	89,7135	68,4603	μmol/L
Ornitin	5,2997	9,6304	4,4897	4,7045	9,5160	10,7457	14,7752	10,2267	μmol/L
Prolin	14,2524	25,6236	19,9656	10,9692	22,6167	24,3941	30,7881	21,4510	μmol/L
Serin	99,9334	190,0526	104,4099	66,4027	161,9941	207,5566	214,2849	149,5665	μmol/L
Sistatyonin	0,0420	0,1773	0,0105	0,0874	0,3747	0,1916	0,4458	0,2728	μmol/L
Sistin	26,3453	49,2718	12,5325	13,2509	50,6862	68,7931	82,7328	64,3177	μmol/L
Sitrullin	2,6791	6,9895	2,4628	3,6051	1,9196	1,8208	4,7822	4,7159	μmol/L
Taurin	16,1253	19,4069	41,8531	16,5403	6,2975	7,2227	10,4032	8,6571	μmol/L
Tirozin	74,2992	159,0093	85,2466	52,6611	154,9771	161,0839	194,5417	138,0771	μmol/L
Treonin	168,0859	270,0354	156,8990	108,6841	257,2249	297,3134	367,2360	276,7495	μmol/L
Triptofan	15,7313	30,8009	16,9024	9,9642	27,3208	30,7926	37,8369	25,3089	μmol/L
U-Glutamik asit	41,0045	59,6996	59,3274	26,7124	43,5048	39,5640	56,2687	46,1300	μmol/L
Valin	170,0997	313,6825	173,9024	104,6780	320,2026	324,3987	412,1651	301,0439	μmol/L

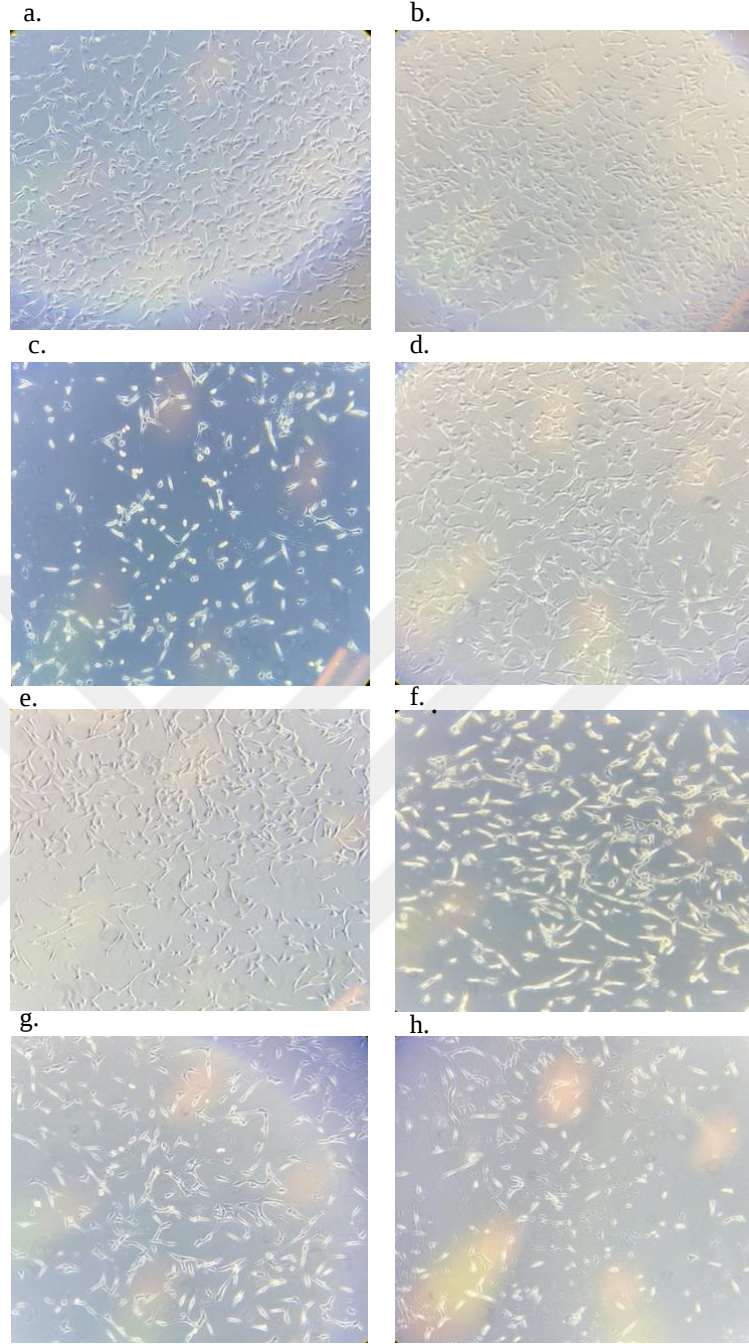
N, DMEM medyumı içeren kontrol grubu; NK, DMEM + 5mM βOHB; NA, DMEM + 10 μM Aβ₁₋₄₂; NKA, DMEM + 5mM βOHB +10 μM Aβ₁₋₄₂, F, EBSS medyumı içeren kontrol grubu; FK, EBSS + 5mM BOHB; FA, EBSS + 10 μM Aβ₁₋₄₂; FKA, EBSS + 5mM βOHB +10 μM Aβ₁₋₄₂'yi ifade etmektedir.



Şekil 16. Hücre homejenatı aminoasit miktarlarının ısı haritası. N, DMEM medyumunu içeren kontrol grubu; NK, DMEM + 5mM β OHB; NA, DMEM + 10 μ M $A\beta_{1-42}$; NKA, DMEM + 5mM β OHB +10 μ M $A\beta_{1-42}$, F, EBSS medyumunu içeren kontrol grubu; FK, EBSS + 5mM BOHB; FA, EBSS + 10 μ M $A\beta_{1-42}$; FKA, EBSS + 5mM β OHB +10 μ M $A\beta_{1-42}$ 'yi ifade etmektedir. Birimi μ mol/L'dir.

4.5 Deney Gruplarının Morfolojik İncelenmesi

Deney grupları N, NK, NA, NKA, F, FK, FA ve FKA grupları Zeiss Primo Verte mikroskopta 10X objektifte görüntülenerek morfolojik olarak incelenmiştir. Şekil 17'de mikroskop görüntüleri verilmiştir.



Şekil 17. Deney gruplarının mikroskop görüntüleri. a. DMEM medyumunu içeren kontrol hücre grubu (**N**), b. DMEM + 5mM βOHB içeren hücre grubu (**NK**), c. DMEM + 10 μM Aβ₁₋₄₂ içeren hücre grubu (**NA**), d. DMEM + 5mM βOHB +10 μM Aβ₁₋₄₂ içeren hücre grubu (**NKA**), e. EBSS medyumunu içeren kontrol grubu (**F**), f. EBSS + 5mM BOHB içeren hücre grubu (**FK**), g. EBSS + 10 μM Aβ₁₋₄₂ içeren hücre grubu (**FA**), h. EBSS + 5mM βOHB +10 μM Aβ₁₋₄₂ içeren hücre grubu (**FKA**).

5 TARTIşMA

Alzheimer hastalığı, amiloid beta peptit plakların veya nörofibriler yumakların neden olduğu nörodejenerasyon ile karakterize bir nörodejeneratif hastalıktır. AH'de nörodejenerasyona neden olan önemli faktörlerden birinin mitokondriyal disfonksiyon olduğu bilinmektedir, anormal mitokondriyal morfoloji, değişen membran potansiyeli, azalan mitokondri sayıları gibi birçok mitokondriyal fonksiyon değişikliğinden bahsedilmektedir. Alzheimer hastalığında glukoz metabolizması bozulmaya uğrarken keton metabolizmasında değişim olmadığı gösterilmiştir. Keton cisimleri uzun süreli açlıkta karaciğerde üretilen glukozu alternatif enerji kaynaklarıdır. Uzun süreli açlıkta lipoliz desteklenir ve yağlar parçalanmaya başlar. Sonrasında ketojenez ile birlikte ketonlar oluşturulur. Oluşan β OHB ve asetoasetat, monokarboksilat taşıyıcılar tarafından nöronlara alınır. Burada ketonlar asetil CoA'ya dönüşerek TCA döngüsüne girer. Böylece beyin hücrelerine ATP sağlanmış olur. Ketojenez ve keton cisimlerinin enerji üretimi ile açlık dönemlerinde hücrelerin ve dokuların hayatta kalma yeteneği artar. Bu nedenle son zamanlarda Alzheimer hastalığı için keton uygulamaları düşünülmektedir. Keton türevlerinin uygulanmasının TCA ara maddelerini artırdığını, mitokondriyal biyogenezi desteklediği ve oksidatif stresi inhibe ettiği düşünülmektedir ancak etki mekanizmaları hala net değildir. Günümüzde net olarak bilinen, açlık modelinin sağlıklı bireylerde uygulanmasının bir çok kronik hastalığa olumlu etkisi olduğudur.

Endojen keton üretiminin sağlandığı koşullardan biri karbonhidrat kısıtlanması bir diğeri de uzun süreli açlıktır. Uzun süreli açlıkta bol miktarda keton üretimi yapılmaktadır. Buradan yola çıkarak bu tez çalışmasında, Alzheimer hastalığı, nörodejeneratif hastalıklar ve sağlıklı yaşlanma için uzun süreli açlık ve eksojen keton müdahalesi sırasında HT22 hücresinde gelişen metabolik değişikliklerin hücre düzeyinde tespit edilmesi ve nöron fonksiyonlarının korunması hedeflenmiştir. Bu şekilde patolojik koşullarda uzun süreli açlık modelinin etkileri ve ara metabolizma ürünlerindeki değişiklikler keşfedilirse sağlıklı yaşlanma ve nörodejeneratif hastalıklarda yeni tedavi hedefleri ortaya konulabilir. Bu projede Alzheimer hastalık modeli uygulanmış HT22 hipokampal nöron hücrelerine uzun süreli açık ve eksojen

keton uygulamaları yapılarak hücrelerdeki metabolik değişiklikler, mitokondri fonksiyonlarının değişimi ve olası ara metabolitler araştırılmıştır.

Bu tez çalışmasında kontrol ve Alzheimer hastalık modeli olarak iki ana grup oluşturulmuştur. Bu iki ana grup, N, NK, F, FK ve NA, NKA, FA, FKA olacak şekilde 8 alt gruptan oluşmaktadır. Alzheimer hastalık modeli gruplarına (NA, NKA, FA, FKA) 10 μ M A β ₁₋₄₂ uygulaması yapılmıştır. Açlık gruplarında (F, FK, FA, FKA), açlık medyum, EBSS medyum ve %2 FBS ile sağlanmıştır. Keton gruplarına (NK, FK, NKA, FKA) ise 5 mM β OHB uygulaması yapılmıştır. Hücre canlılığını gözlemlemek için MTT deneyi gerçekleştirilmiştir. A β antikor ve DAPI boya kullanarak konfokal mikroskopta A β proteini gözlemlenmiştir. Hücre medyum ve lizatlarından metabolik parametre ölçümleri; keton cisimleri (beta hidroksibutirat), glukoz, laktat, laktat dehidrogenaz ve amino asit profili ölçüm çalışmaları yapılmıştır. Mitokondri fonksiyonlarının analizleri, sitrat sentaz enzim aktivitesi analizleri ile gerçekleştirilmiştir. Sitrat sentaz enzim aktivite kiti kullanılarak deney gerçekleştirilmiş ve 412 nm’de 30 dk boyunca ölçüm yapılmıştır.

Çalışmada ilk olarak MTT deneyi gerçekleştirilmiştir. Hücre canlılığı ve A β ’nın HT22 hücreleri üzerindeki etkisi gözlemlenmiştir. Deney sonrası elde edilen bulgular Tablo 2’de verilmiştir. Hücre canlılığı deneylerine bakıldığında A β ₁₋₄₂ eklenmiş NA, NKA, FA ve FKA hücrelerinin canlılıklarının N ve F’ye göre düşük olduğu görülmüştür. Böylece Tablo 2’ye göre A β ’nın HT22 hücreleri üzerinde toksisite etkisi gösterdiği kanıtlanmıştır. F, FA, FK ve FKA açlık gruplarının DMEM ile beslenen kontrol grupları ile karşılaştırıldığında canlılık yüzdelerinin daha düşük olduğu görülmüştür. Dolayısıyla kullanılan EBSS açlık besiyeriyle F, FA, FK ve FKA deney gruplarında açlık koşullarının sağlandığı gösterilmiştir. Açlık medyumunda inkübe edilen F ve FA gruplarına 5mM β OHB eklendiğinde (FK, FKA) canlılığın arttığı tespit edilmiştir. Yine keton eklenmiş A β ₁₋₄₂ gruplarında canlılığın arttığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak MTT deneyi ile birlikte eksojen uygulanan 5 mM β OHB ketonun deney gruplarının canlılığı üzerinde olumlu etkisi olduğu aynı zamanda hücrelere indüklenen 10 μ M A β ₁₋₄₂’nin HT22 hücreleri üzerinde toksik etki oluşturduğu ve 5 mM β OHB uygulamasının bu toksik etkiyi nispeten iyileştirdiği gözlemlenmiştir.

HT22 hipokampal nöron hücrelerinde A β peptit oluşumunu ve lokalizasyonunu kanıtlamak amacıyla immunofloresan deneyiyle A β antikoru ve DAPI boya kullanarak konfokal mikroskopta A β fibrilleri gözlemlenmiştir. Hücreye dışarıdan A β_{1-42} uygulaması yapılarak A β_{1-42} fibrillerinin oluşumu taklit edilmiştir. Bu şekilde Alzheimer hastalık modeli in vitro koşullarda A β_{1-42} toksisitesi sağlanarak oluşturulmuştur. A β_{1-42} için A β antikoru, çekirdek için DAPI ile boyama yapılarak konfokal mikroskopta görüntü alınmıştır.

Kontrol grubu hariç tüm deney gruplarında A β_{1-42} proteini gözlemlenmiş olup A β_{1-42} toksisitesi sağlanarak Alzheimer hastalık modelinin oluşturulduğu kanıtlanmıştır. Tüm deney grupları morfolojik olarak karşılaştırıldığında hücrelerin periferel bölgelerinde ve hücre dışında benzer oranda A β_{1-42} proteinlerine rastlandığı görülmüştür. Hipoteze göre NKA ve FKA gruplarının A β_{1-42} protein oranlarında beklenen azalma görülmemiştir. Böylece eksojen β OHB uygulamasının ve uzun süreli açlığın A β toksisitesine olumlu bir etkisinin olup olmadığı bu deneyle net bir şekilde açıklanamamıştır. NA, NKA, FA ve FKA deney grupları incelendiğinde birbirleriyle uyumlu ve anlamlı A β_{1-42} protein lokalizasyonu gözlenmemiştir. Aynı zamanda görüntülerin MTT sonuçlarıyla uyumlu çıktığı da söylenemez. A β_{1-42} proteini ekstraselüler ortamda birikerek toksisite göstermektedir. Hücre içine giren β OHB'nin hücre enerji fonksiyonlarının düzelmesine destek olduğu halde hücre dışı birikimlere etkisi olmadığı düşünülmüştür.

Sitrat sentaz enzim aktivitesi ölçüm deneyi ile sitrat oluşumunu kataliz eden sitrat sentaz enzimi ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Deney gruplarının plate okuyucuda 412 nm'de 30 dakika boyunca absorbans değerleri ölçülerek elde edilen değerler Şekil 14'te gösterilmiştir. Şekil 14'e bakıldığında sitrat sentaz enzim aktivitesi deneylerinde keton eklenmiş kontrol grubu olan NK ve keton eklenmiş açlık grubu olan FK'nın enzim aktivitesi daha yüksek bulunmuştur. Bu bulgu Tablo 3'teki metabolik parametre sonuçları ile uyumludur. β OHB eklenmiş medyumlarda inkübe edilen hücrelerin enerji metabolizması sırasında glukoz kullanımının yanı sıra keton da kullandıkları ve keton kullanımı sırasında mitokondrilerinin aktivitelerinin arttığı tespit edilmiştir. Bu bulgu

çalışmamızın ana bulgularındandır. A β ₁₋₄₂ eklenmiş hücrelerin sitrat sentaz enzim aktivitelerine bakıldığında, medyumda sadece A β ₁₋₄₂ bulunan hücrelerin mitokondri aktivitesinin oldukça düşük olduğu ancak A β ₁₋₄₂ ile birlikte β OHB eklenmiş hücrelerde bu düşüklüğün göreceli olarak yükseldiği görülmüştür. Bununla birlikte A β ₁₋₄₂ eklenmemiş N ve F grubunun enzim aktivitelerine ulaşamadıkları görülmektedir. Bu bulgular amiloid betanın verdiği hasarın keton eklenmesi ile gerilediği ancak tamamıyla iyileşmediğini düşündürmektedir.

Deneylerin sonunda grupların medyum ve hücre lizatları toplanarak metabolik içerikler analiz edilmiştir. Deney sonrası medyumların glukoz, keton, laktat ve LDH içerikleri analiz edilip Tablo 3'te gösterilmiştir. Tablo 3'e bakıldığında, deney medyumları 24 saat süresince %80 konfluent HT22 hücre kültürlerine uygulandığında, NK hücre grubunun β OHB ve glukozu eş zamanlı kullandığı görülmüştür. İlginç bir bulgu olarak bu gruptaki hücrelerin kontrol N grubuna göre daha fazla glukoz kullandığı tespit edilmiştir. Yine aynı grupta laktat miktarı kontrol grubuna göre daha azdır, bu durum bize keton varlığında hücrelerin mitokondrilerini daha aktif kullanabildiğini düşündürmektedir. Bulgularımız sitrat sentaz aktivite ölçümleri ile uyumludur. LDH sonuçları ise yine NK grubunda hücre hasarının daha az olduğuna işaret etmektedir. A β ₁₋₄₂ ve keton eklenmiş normal medyumlu grubu NKA, NA grubu ile karşılaştırıldığında glukoz ve keton kullanımında artış görülmektedir. LDH sonuçlarına bakıldığında ise amiloidin verdiği hücre hasarının keton içeren medyumda büyüyen hücrelerde daha az olduğu görülmektedir. Açlık modeli uygulanmış hücre medyumlarında en az hücre hasarının keton içeren ve A β ₁₋₄₂ uygulanan gruplarda olduğu görülmektedir (FKA). Yine glukoz ve keton kullanımı en fazla bu grupta görülmektedir. Bu bulgular ışığında, uzun süreli açlık modeli uygulanan hücrelerin keton varlığında, mitokondri enerji üretiminin korunduğu ve laktat üretimlerinin azaldığı düşünülmüştür. Tüm açlık gruplarında LDH sonuçları değerlendirildiğinde, keton içermeyen amiloid betalı (FA) açlık medyumunda inkübe edilen hücrelerde en fazla hasarın olduğu, ancak keton içeren medyumda tutulan hücrelerde bu hasarın gerilediği görülmüştür (Tablo 3).

Hem hücre lizatlarından hem de hücre besiyerlerinden aminoasit profil çalışması yapılmıştır. Sonuçlar Tablo 6 ve Tablo 7’de gösterilmiştir. Aynı zamanda Şekil 15 ve Şekil 16’da ısı haritaları verilmiştir. Tablo 6’ya bakıldığında glutaminin tüm deney gruplarında en yüksek aminoasit seviyelerine sahip olduğu görülmektedir. Glutaminin yüksek miktarda görülmesinin sebebinin DMEM besiyerinin içerisinde yüksek miktarda glutamin bulunmasından dolayı olduğu düşünülmektedir. Yüksek miktarda bulunan diğer aminoasitler ise sırasıyla valin, lösin ve lisin olmuştur. Besiyerindeki N, NA, NK ve NKA gruplarındaki valin ve lösin değerleri karşılaştırıldığında amiloid betalı gruplardaki valin ve lösin değerlerinin daha düşük olduğu görülmüştür. Şekil 15’e göre normal medyumlu gruplar ve açlık medyumlu gruplar karşılaştırıldığında açlık medyumlu grupların aminoasit miktarlarının daha düşük olduğu görülmüştür. Bu grupların medyum içeriklerinin besin değerleri daha düşük olduğu için besiyeri aminoasit ölçümlerinin daha düşük görülmesi beklenen bir sonuçtur. Şekil 16’ya göre normal medyumlu gruplar ve açlık medyumlu gruplar karşılaştırıldığında açlık medyumlu grupların aminoasit miktarlarının daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu da düşük besinli medyumları olsa dahi hücrelerin çoğu aminoasitleri hücre içine aldıklarını göstermektedir. Chen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada glutaminin aynı zamanda insan kanında da en çok bulunan aminoasitlerden olduğu gösterilmiştir (31). Alzheimer hastalığının neden olduğu A β birikimi, kronik inflamasyon ve oksidatif stress gibi patolojik faktörlerin glutamin sentetaz aktivitesini doğrudan azaltabildiği dolayısıyla Alzheimer hastalığı olan hastalarda glutamin metabolizmasının tehlikeye girdiği yapılan bu çalışmada belirtilmiştir. Bu nedenle düşük glutamin ve glutamat miktarlarının Alzheimer için biomarker olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (31). Aynı zamanda Fu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada dallı zincirli aminoasitlerin (örn. valin lösin ve izolösin) de demans ve Alzheimer riskinin önemli ölçüde ilişkili olduğu söylenmektedir (32). Yapılan çalışmalarda daha düşük dallı zincirli aminoasit seviyelerinin artan demans ve Alzheimer riskiyle ilişkilendirildiği gösterilmiştir. Bu sebeple bu aminoasitlerin de Alzheimer için biomarker olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (32). Şekil 15 ve 16’daki N, NA ve NKA gruplarının valin lösin ve izolösin miktarları incelendiğinde NA ve NKA gruplarında N grubuna göre bu seviyelerde azalma olduğu görülmüştür. Bu, Fu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Ancak söz konusu çalışmaların insan kanından yapılan

alışmalar olduğu bu tezdeki aminoasit çalışmalarının ise HT22 medium ve hücre homejanatlarından gerçekleştirildiği unutulmamalıdır. Fakat söz konusu aminoasit profil çalışmaları ileride yapılacak olan hayvan ve insan deneyleri için temel niteliğinde bir çalışma olmuştur.

Wu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda bizim sonuçlarımız ile paralel olarak amiloid beta indüklenmiş HT22 hücrelerinde β OHB uygulamasının mitokondriyal fonksiyonlarında iyileştirme oluşturduğu ve amiloid beta toksisitesini azalttığı görülmüştür (33). Bu çalışmada benzer hücre canlılığı sonuçlarıyla karşılaşılmıştır. amiloid beta uygulanmış HT22 hücrelerine β OHB uygulandığında yalnızca amiloid beta uygulanan β OHB eklenmeyen hücrelere kıyasla hücrelerin canlılığının arttığı görülmüştür. Yine aynı projede kontrol hücrelerine β OHB eklendiğinde hücre canlılıklarının arttığı gözlemlemiştir. Alternatif bir enerji kaynağı olarak β OHB'ın hücre canlılığını koruyabilmesinin yanında $A\beta$ toksisitesinin neden olduğu oksidatif stres hasarını azaltabildiği gösterilmiştir (33). Ayrıca mitokondriyal aerobik solunum fonksiyonu incelendiğinde de $A\beta$ uygulamasının, HT22 hücresindeki oksijen tkretim oranı (OCR) açısından maksimum solunumu ve solunum kapasitesini azalttığını ve β OHB'ın, maksimum solunumda $A\beta$ tarafından indüklenen OCR'deki azalmayı engellediğini ve solunum kapasitesini kurtardığını göstermektedir. Bu sonuçlar, β OHB'ın mitokondriyal solunum fonksiyonunu iyileştirdiğini ve hipokampal nöronlarda ATP üretimini arttırdığını, bunun da nöronların $A\beta$ toksisitesinden ve ROS hasarının iyileşmesine katkıda bulunduğunu gösterdi. Aynı zamanda β OHB tedavisinin mikrogliaların aşırı aktivasyonunu sınırladığını ve inflamatuvar sitokinlerin üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu tez çalışmasındaki bulgular, Wu ve arkadaşlarının çalışmasındaki bahsedilen bulgularla tutarlılık göstermektedir (33).

Shippy ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da benzer bulgulara rastlanmıştır. AH'nin patojenezini oluşturan bozulan insülin sinyalleşmesi ve insülin direncine karşı ketonların insülin direncini azaltmada ve glukoz homeostazını dengelemede dolayısıyla metabolik bozulmayı iyileştirmede etkisi olduğu gösterilmiştir. Hücrelere $A\beta_{1-42}$ indüklenmesiyle hücre ölümünün arttığı alternatif bir mitokondriyal substrat sağlayan β OHB'ın eklenmesiyle kurtarıldığı gösterilmiştir (34).

Jensen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da bu tez çalışmasıyla uyumlu bulgular elde edilmiştir. Söz konusu çalışmada hücrelerin ketonla birlikte glukoz da kullanıldığı gösterilmiştir. Keton cisimlerinin ROS dengesini doğrudan ve dolaylı olarak düzenleyebildiği ve antioksidanlar olarak işlev görebildiğini, mitokondriyal ROS üretimini baskıladığını ve antioksidan savunmanın teşvik edildiği çalışmalarla desteklenmektedir. Ayrıca A β protein agregasyonunda azalma olduğu, mitokondriyal bozukluklarda iyileşme görüldüğü, oksidatif stres ve nöroinflamasyonu azalttığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar da tez çalışmasının bulgularını desteklemektedir (35).

Yüksek kan şekeri seviyeleri ile Alzheimer hastalığı arasında güçlü bir ilişki bulunmaktadır. Hatta Alzheimer hastalığı beyin diyabeti veya tip 3 diyabet (T3D) olarak adlandırmaktadır (16). Tip 2 diyabet gibi yüksek kan şekeri seviyesine sahip bireylerin, A β proteininde bir artış olduğu gösterilmiştir. Diyabetli kişilerin hipokampal boyutlarının sağlıklı kişilere göre daha küçük olduğu bulunmuştur. Bu hipokampal boyuttaki azalmanın HbA1c kan seviyeleriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu da HbA1c'nin hipokampal fonksiyonu ve hafıza kaybının başlangıcını belirtmek için bir biomarker olabileceği düşünülmektedir (17). Amiloid öncü protein geni (APP) insülin yolunu da etkilemektedir. İnsülin yolunun bozulması diyabetin ayırt edici özelliğidir. Aynı zamanda beyinde yüksek düzeyde insülin direnci ve glukoz kullanımının azaldığı gösterilmiştir. Tip 2 diyabetli kişilerin demans riskinin, diyabeti olmayan kişilere göre %93 daha yüksek olduğu düşünülmektedir (17).

Bu çalışmada, deneysel olarak amiloid beta hasarı oluşturulmuş ve özellikle ketonlardan β OHB uygulanarak bu hasarın geri dönüşüm mekanizmaları incelenmiştir. Çalışmadan elde edilen tüm sonuçlara bakıldığında açlık modeli uygulanan amiloid beta hasarında β OHB eklenmiş medyumlarda inkübe edilen FKA hücre grubunda mitokondriyal aktivite ve metabolik parametrelerde olumlu bulgular elde edilmiştir. Çalışmada elde edilen pozitif bulgular değerlendirilirken sonuçların sekonder bir hücre hattından ve fare hipokampal hücrelerinden elde edildiği akılda tutulmalıdır. Dolayısı ile çalışmadan elde edilen sonuçların primer hücre kültürleri ve hayvan deneyleri ile konfirme edilmesi gerekmektedir. Çalışmamızın bundan sonraki

hedefi bu deneydeki sonuçların ileri moleküler çalışmalar, primer hücre kültürleri ve hayvan deneyleri ile desteklenmesi olacaktır. Bütün bunlarla birlikte literatür tarandığında bu tez çalışmasına benzer bir çalışma bulunmamaktadır.

6 SONUÇ

Bu tez çalışmasında Alzheimer hastalığı, nörodejeneratif hastalıklar ve sağlıklı yaşlanma için hipokampal nöronlara (HT22) uygulanan uzun süreli açlık ve eksojen keton müdahalelerinin hücre metabolitlerine ve mitokondri fonksiyonlarına etkisinin araştırılarak nöron fonksiyonlarının korunması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda Alzheimer hastalık modeli oluşturularak HT22 hipokampal nöron hücrelerine uzun süreli açlık ve eksojen keton uygulamaları yapılmıştır. Deney sonucunda hücre canlılık testleri gerçekleştirilmiş, immunofloresan metoduyla A β lokalizasyonu görülüp metabolik parametre ölçümleriyle ara metabolizma ürünlerindeki değişimler tespit edilip sitrat sentaz aktivite ölçüm testiyle mitokondri fonksiyonlarındaki değişimler gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında eksojen uygulanan β OHB'nin deney gruplarının canlılığını olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir. Ayrıca A β ₁₋₄₂'nin HT22 hücreleri üzerinde toksik etkiye bulunduğu ve bu etkinin β OHB uygulamasıyla azaldığı belirlenmiştir. β OHB eklenmiş besiyerlerinde büyütülen hücrelerin enerji metabolizması sırasında glukozun yanında ketonu da kullandığı ve keton kullanımı sırasında mitokondri aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Bununla birlikte A β ₁₋₄₂ eklenmiş hücrelerin sitrat sentaz enzim aktivite ölçümleri incelendiğinde, hücrelerin mitokondri aktivitesinin düşük olduğu ancak A β ₁₋₄₂ ile birlikte β OHB eklenmiş hücrelerde bu düşüklüğün nispeten yükseldiği görülmektedir. Bu bulgular, amiloid beta tarafından oluşturulan hasarın keton eklenmesiyle azaldığını ancak tamamen düzelmediğini öne sürmektedir. Metabolik parametreler incelendiğinde, uzun süreli açlık modeli uygulanan hücrelerin keton varlığında, mitokondri enerji üretiminin korunduğu ve laktat üretiminin azaldığı gözlemlenmiştir.

Deney sonucunda elde edilen bulgular ile literatüre katkıda bulunulup daha ileri çalışmalar için rehber olabilecek sonuçlar elde edilmiştir. Bu bulgular ışığında gerçekleştirilecek daha ileri çalışmalarda Alzheimer hastalığı, nörodejeneratif hastalıklar ve sağlıklı yaşlanma için yeni tedavi yaklaşımları ortaya konulabilir.

7 KAYNAKLAR

1. Alberts B, Bray D, Karen H, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Essential Cell Biology. 4th ed. New York: Garland Science, 2014: 420-485
2. Rigoulet M, Bouchez CL, Paumard P, Ransac S, Cuvellier S, Duvezin-Caubet S, et al. Cell energy metabolism: An update. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2020;1861(11):148276.
3. Nelson DL, Cox MM, Lehninger Principles of Biochemistry. 7th ed. Texas: Sapling Learning, 2017: 480-700
4. Cunnane SC, Trushina E, Morland C, Prigione A, Casadesus G, Andrews ZB, et al. Brain energy rescue: an emerging therapeutic concept for neurodegenerative disorders of ageing. *Nat Rev Drug Discov.* 2020;19(9):609-33.
5. Watts ME, Pocock R, Claudianos C. Brain Energy and Oxygen Metabolism: Emerging Role in Normal Function and Disease. *Front Mol Neurosci.* 2018;11:216.
6. Allaman I, Belanger M, Magistretti PJ. Methylglyoxal, the dark side of glycolysis. *Front Neurosci.* 2015;9:23.
7. Owen, OE. Ketone bodies as a fuel for the brain during starvation. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 2005; 33: 246-251. <https://doi.org/10.1002/bmb.2005.49403304246>
8. Active learning for the Medical Sciences [Internet]. [cited 2024 May 25]. Available from: <https://ditki.com/search?q=during-an-extended-fast-why-does-the-body-produce-ketone-bodies-instead-of-relying-on-gluconeogenesis>
9. Kolb H, Kempf K, Rohling M, Lenzen-Schulte M, Schloot NC, Martin S. Ketone bodies: from enemy to friend and guardian angel. *BMC Med.* 2021;19(1):313.
10. Camberos-Luna, L., Massieu, L., Therapeutic strategies for ketosis induction and their potential efficacy for the treatment of acute brain injury and neurodegenerative diseases, *Neurochemistry International* (2019), doi: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.104614>.
11. Bouteldja N, Andersen LT, Moller N, Gormsen LC. Using positron emission tomography to study human ketone body metabolism: a review. *Metabolism.* 2014;63(11):1375-84.
12. Yao A, Li Z, Lyu J, Yu L, Wei S, Xue L, et al. On the nutritional and therapeutic effects of ketone body D-beta-hydroxybutyrate. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2021;105(16-17):6229-43.
13. Khan S, Barve KH, Kumar MS. Recent Advancements in Pathogenesis, Diagnostics and Treatment of Alzheimer's Disease. *Curr Neuropharmacol.* 2020;18(11):1106-25.
14. Falkenhain K, Islam H, Little JP. Exogenous ketone supplementation: An emerging tool for physiologists with potential as a metabolic therapy. *Experimental Physiology.* 2022 Dec 19;108(2):177–87. doi:10.1113/ep090430
15. Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease. *European Journal of Neurology.* 2017 Oct 19;25(1):59–70. doi:10.1111/ene.13439
16. Nguyen TT, Ta QTH, Nguyen TKO, Nguyen TTD, Giau VV. Type 3 Diabetes and Its Role Implications in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 2020;21(9).

17. Alzheimer's Association. Diabetes and Cognitive Decline. Available from: <https://www.alz.org/media/documents/alzheimers-dementia-diabetes-cognitive-decline-ts.pdf>
18. Lim J, Bang Y, Kim K-M, Choi HJ. Differentiated HT22 cells as a novel model for in vitro screening of serotonin reuptake inhibitors. *Frontiers in Pharmacology*. 2023 Jan 10;13. doi:10.3389/fphar.2022.1062650
19. HT-22 mouse hippocampal neuronal cell line Millipore [Internet]. [cited 2024 May 25]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/mm/scc129>
20. Prasansuklab A, Sukjamnong S, Theerasri A, Hu VW, Sarachana T, Tencomnao T. Transcriptomic analysis of glutamate-induced HT22 neurotoxicity as a model for screening anti-alzheimer's drugs. *Scientific Reports*. 2023 May 4;13(1). doi:10.1038/s41598-023-34183-y
21. Chen X, Li H, Yang Q, Lan X, Wang J, Cao Z, et al. Ginsenoside compound K ameliorates Alzheimer's disease in HT22 cells by adjusting energy metabolism. *Mol Biol Rep*. 2019;46(5):5323-32.
22. Du S, Zhang Y, Yang J, Liu X, Wang Y, Xu B, et al. Curcumin Alleviates beta Amyloid-Induced Neurotoxicity in HT22 Cells via Upregulating SOD2. *J Mol Neurosci*. 2019;67(4):540-9.
23. Li J, Wang P, Hou MJ, Zhu BT. Attenuation of amyloid-beta-induced mitochondrial dysfunction by active components of anthocyanins in HT22 neuronal cells. *MedComm*. 2023;4(4):e301.
24. Jeong JH, Yu KS, Bak DH, Lee JH, Lee NS, Jeong YG, et al. Intermittent fasting is neuroprotective in focal cerebral ischemia by minimizing autophagic flux disturbance and inhibiting apoptosis. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2016 Oct 31;12(5):3021–8. doi:10.3892/etm.2016.3852
25. Pak M, Bozkurt S, Pinarbasi A, Oz Arslan D, Aksungar FB. Effects of Prolonged Intermittent Fasting Model on Energy Metabolism and Mitochondrial Functions in Neurons. *Ann Neurosci*. 2022;29(1):21-31.
26. Arslan, D. Ö, Korkmaz, G, Gözüaık, D. 2011. Otofaji: Bir Hücresel Stres Yanıtı ve Ölüm Mekanizması, *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2 (4), 184-194.
27. Chhimpa N, Singh N, Puri N, Kayath HP. The Novel Role of Mitochondrial Citrate Synthase and Citrate in the Pathophysiology of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2023;94(s1):S453-S72.
28. Beken S, Abali S, Yildirim Saral N, Guner B, Dinc T, Albayrak E, et al. Early Postnatal Metabolic Profile in Neonates With Different Birth Weight Status: A Pilot Study. *Front Pediatr*. 2021;9:646860.
29. 41965 - DMEM, high glucose [Internet]. [cited 2024 May 25]. Available from: <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/technical-resources/media-formulation.170.html>
30. 24010 - EBSS, calcium, magnesium, phenol red [Internet]. [cited 2024 May 25]. Available from: <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/technical-resources/media-formulation.305.html>
31. Chen J, Herrup K. Glutamine as a Potential Neuroprotectant in Alzheimer's Disease. *Diet and Nutrition in Dementia and Cognitive Decline*. 2015;761–771. doi:10.1016/b978-0-12-407824-6.00070-7
32. Fu Y, Wang Y, Ren H, Guo X, Han L. Branched-chain amino acids and the risks of dementia, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease. *Front. Aging Neurosci*. 2024;16:1369493.

33. Wu Y, Gong Y, Luan Y, Li Y, Liu J, Yue Z, et al. BHBA treatment improves cognitive function by targeting pleiotropic mechanisms in transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J.* 2020;34(1):1412-29.
34. Shippy DC, Wilhelm C, Viharkumar PA, Raife TJ, Ulland TK. beta-Hydroxybutyrate inhibits inflammasome activation to attenuate Alzheimer's disease pathology. *J Neuroinflammation.* 2020;17(1):280.
35. Jensen NJ, Wodschow HZ, Nilsson M, Rungby J. Effects of Ketone Bodies on Brain Metabolism and Function in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22).



8 ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı		Soyadı	
Doğum Yeri		Doğum Tarihi	
Uyruğu		Telefon	
E-mail			

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans		
Lise		

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			
2.			
3.			

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*

* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

YABANCI DİL NOTU									
K PDS	Ü DS	I ELTS	T OEF IBT	T OEF P BT	T OEF C BT	F CE	C AE	C PE	Dİ ĞER

- ☐ Başarılmış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır
- ☐ KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; ÜDS: Üniversitelerarası Kurul Yabancı Dil Sınavı; IELTS: International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-Internet-Based Test TOEFL PBT: Test of English as a Foreign Language-Paper-Based Test; TOEFL CBT: Test of English as a Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English; CAE: Certificate in Advanced English; CPE: Certificate of Proficiency in English

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Programları	
Graphpad	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifikaları

