

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

DOKTORA TEZİ

**VİTAMİN D’NİN NÖRON YAŞAMI VE
NÖRODEJENERASYON ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DUYGU GEZEN-AK

**DANIŞMAN
PROF.DR. SELMA YILMAZER**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2009

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

202 / 03 / 2010



Prof. Dr. Tamer DEMİRALP
Enstitü Müdürü (vekil)

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Tıbbi Biyoloji
Programın seviyesi : Yüksek Lisans ☐ Doktora ☒
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyoloji
Tez Sahibi : Duygu Gezen-Ak
Tez Başlığı : Vitamin D nin Nöron Yaşamı ve Nörodejenerasyon Üzerine Etkilerinin Araştırılması
Sınav Yeri : Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D
Sınav Tarihi : 22 / 07 / 2009

Tez Sınav Jürisi

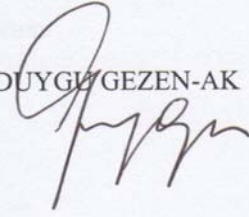
Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

1. Prof. Dr. Selma Yilmazer (Tez danışmanı, tez izleme komitesi) i.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji AD.
2. Prof. Dr. Melek Öztürk (Tez izleme komitesi) i.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji AD.
3. Prof. Dr. Seniha Hacıhanefioğlu i.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji A
4. Doç. Dr. Arzu Kanbay Korkmaz (Tez izleme komitesi) İTÜ Fen Fak. M066A
5. Doç. Dr. Hakan Gürvit i.Ü. İstanbul Tıp Fak. Nöroloji AD.
Davranış Nörolojisi ve Hareket Bozuklukları Birimi

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez 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.

DUYGU GEZEN-AK



İTHAF

Anneme, babama, kardeşime ve eşime ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve bu çalışmanın her aşamasında, bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren, hiçbir zaman desteğini benden esirgemeyen, tüm zorluklar karşısında beni yüreklendiren, karşıma çıkan her türlü sorunda çözüm yolu gösteren ve birlikte çalışmaktan her zaman mutluluk duyacağım değerli danışmanım Sn. Prof. Dr. Selma YILMAZER'e, gerek eğitimim gerekse tezimde bana her türlü konuda yardım eden Sn. Prof. Dr. Melek ÖZTÜRK'e, çalışmamda desteğini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Sn. Prof. Dr. Turgut ULUTİN'e, katkıları ve bilimsel destekleri ile Sn. Doç. Dr. Arzu KARABAY-KORKMAZ'a, her zaman yanımda olan, beni her durumda motive eden, çalışmam boyunca desteğini benden esirgemeyen, dostluğu ve yardım severliği ile bulunmaz bir çalışma arkadaşı olan Sn. MSc.Erdinç DURSUN'a, tezimde kullandığım tekniklerin çoğunu öğrenmemi sağlayan ve bilimsel fikirleriyle önümde yeni ufuklar açan Sn.Prof.Dr. Sylvia CHRISTAKOS ve Sn.Doç.Dr. Stella ELKABES'e, çalışmamın önemli bir kısmını gerçekleştirmemde desteklerini esirgemeyen Sn.Prof.Dr. Uğur ÖZBEK'e, Sn. Dr. Müge AYDIN'a ve Sn.MSc. Özden HATIRNAZ'a, çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen Sn. Dr. Matem TUNÇDEMİR'e, desteğini hep yanımda hissettiğim Sn. Dr.Fatma DAĞISTANLI'ya, dostluğunu esirgemeyen Sn. MSc. Gonca Emel KARAHAN'a ve Sn. MSc. Onur BAYKARA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman manevi ve maddi olarak bana destek olan, her türlü zorluğa karşı beni koruyup kollayan, sevgilerini tüm kalbimle hissettiğim sevgili annem Neslinur KARACASU'ya ve sevgili babam Cumhuriyet GEZEN'e, en sıkıntılı anlarımda yanımda olan ve beni güldürmeyi başaran sevgili kardeşim Yiğit Rasim GEZEN'e, uzun yıllar boyunca beni destekleyen, her türlü konuda bana yardımcı olan ve yalnız bırakmayan sevgili eşim Burçin AK'a ve ailesi sevgili annem Maide AK'a ve sevgili babam Prof.Dr. Coşkun AK'a çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-942 / 06102006

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
BEYAN.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
İTHAF.....	iii
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	XI
ŞEKİLLER LİSTESİ	XVI
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XX
ÖZET	XXiii
ABSTRACT.....	XXiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Vitamin D (1,25 dihidroksivitamin-D3)	4
2.1.1. Vitamin D metabolizması	4
2.1.2. Vitamin D reseptörü.....	6
2.1.3. Vitamin D'nin genomik olmayan fonksiyonlarına aracılık eden membran reseptörü.....	8
2.1.4. Vitamin D ve Beyin	8
2.1.4.1. Beyinde vitamin D sentezi ve indirgenmesi.....	9
2.1.4.2. Vitamin D'nin nöronlar üzerindeki koruyucu etkileri	9
2.1.5. Vitamin D eksikliği.....	12
2.2. Nörodejenerasyon	13
2.2.1. Nörodejenerasyon nedir?	13
2.2.2. Nörodejeneratif hastalıklar.....	13
2.2.2.1. Nörodejeneratif hastalıklarda protein birikimi	15
2.2.2.2. Alzheimer Hastalığı'nın genel özellikleri	17
2.2.2.3. Parkinson Hastalığı'nın genel özellikleri	17
2.2.2.4. Huntington Hastalığı'nın genel özellikleri.....	18
2.2.2.5. Amiyotrofik Lateral Skleroz'un genel özellikleri	19
2.2.2.6. Prion Hastalığı'nın genel özellikleri	19

2.3. Sinir Dokusunun Hücresel Bileşenleri	19
2.3.1. Nöronlar	19
2.3.2. Nöroglia	28
2.4. Sinir Sistemi	29
2.4.1. Merkezi Sinir Sistemi	29
2.4.2. Beynin işlevsel alanları	31
2.4.2.1. Serebral korteks	32
2.4.2.2. Limbik Sistem	35
2.5. Voltaj Kapılı İyon Kanalları	39
2.5.1. Voltaj Kapılı Potasyum Kanalları	41
2.5.2. Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları	41
2.5.3. Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanalları	42
2.5.3.1. Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanallarının Yapısı ve Fonksiyonları	43
2.5.3.2. Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanallarının Hücre İçi Dağılımı ve Düzenlenmesi	45
2.5.3.3. Kalsiyum kanallarının sinapslara hedeflenmesi	47
2.5.3.4. Kalsiyum kanallarının sitoplazmaya geri alınımı	47
2.6. Kalsiyum Metabolizması	49
2.6.1. Kalsiyum dengesi	49
2.6.2. Yaşlanmada kalsiyum dengesi	52
2.6.2.1. Yaşlanma ile kalsiyum kanallarındaki değişiklikler	52
2.6.2.2. Yaşlanma ile birlikte nöron plazma membranlarında bulunan kalsiyum pompalarındaki değişiklikler	53
2.6.2.3. Yaşlanma ile birlikte beyin kalsiyum tamponlama sistemindeki değişiklikler	54
2.6.2.4. Yaşlanma ile birlikte beyindeki kalsiyum birikiminin hücresel mekanizması	54
2.6.3. Nörodejenerasyon ve Kalsiyum Metabolizması	55
2.7. Nörotrofik Faktörler	58
2.7.1. Sinir Büyüme Faktörü (NGF)	61
2.8. Küçük RNA'lar	65
2.8.1. mikroRNA'lar	66
2.8.1.1. miRNA genomik yapısı ve biogenezi	66
2.8.1.2. miRISC'in anahtar bileşenleri olan Argonaute proteinleri	69

2.8.2. Küçük müdahaleci RNA'lar (siRNA).....	71
2.8.3. Kültürdeki memeli hücrelerine siRNA gönderilmesi	73
2.8.3.1. Kimyasal ajanlarla siRNA aktarımı	73
2.8.3.2. siRNA ekspresyonu yapan vektörlerin aktarımı	74
2.8.3.3. siRNA eksprese eden kasetlerin aktarımı için viral metodların kullanılması	74
2.9. Primer Nöron Kültürü	74
2.9.1. Primer Nöron Kültürünün Hazırlanması.....	76
2.9.1.1. Primer nöron kültürü için kullanılan canlı türleri	76
2.9.1.2. Primer nöron kültürünün hazırlanacağı canlı türünün yaşı	76
2.9.1.3. Disseksiyon	77
2.9.1.4. Dokunun hücrelere ayrılması	77
2.9.1.5. Özel hücre popülasyonlarının eldesi	77
2.9.1.6. Hücre sayımı ve canlı hücrelerin gösterilmesi	78
2.9.1.7. Nöronların beslenmesi ve yaşatılması.....	78
2.10. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR).....	80
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	81
3.1. Primer Nöron Kültürü Deneyleri	81
3.1.1. Embriyonik Günlerin Belirlenmesi ve Embriyoların Eldesi.....	81
3.1.2. Kültür petrilерinin hazırlanması	84
3.1.3. Leibovitz 15 + (L-15+) kültür medyumunun hazırlanması	84
3.1.4. Nörobazal + (NBM+) kültür medyumunun hazırlanması.....	85
3.1.5. Serebral Korteks ve Hippokampus Disseksiyonu	85
3.1.6. Primer hippokampal ve kortikal nöron kültürlerinin hazırlanması.....	86
3.1.7. Hemasitometri ile hücre sayımının yapılması.....	87
3.1.8. Ekimi yapılan nöronların olgunlaşması	88
3.1.9. Kültürdeki hücrelerin nöron/glia ayrımının yapılması.....	89
3.2. Primer Hippokampal Ve Kortikal Nöron Kültüründe Gerçekleştirilen Uygulamalar	91
3.2.1. Vitamin D Uygulamaları.....	91
3.2.2. siRNA Uygulamaları.....	92
3.2.2.1. Kullanılan siRNA'ların dizileri:.....	92
3.2.2.2. Transfeksiyon medyumunun hazırlanması ve siRNA uygulanması:	93

3.2.3. Primer kortikal nöron kültürü deney grupları	93
3.2.4. Primer hippokampal nöron kültürü deney grupları	94
3.3. Primer Nöron Kültürlerinden Total RNA İzolasyonu	95
3.3.1. Örneklerin RNA miktarlarının ve saflığının ölçülmesi	96
3.3.2. 1. Normalizasyon	96
3.3.3. cDNA Sentezi	96
3.3.4. cDNA'ların sulandırılması	98
3.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)	98
3.4.1. qRT-PCR yönteminin standardizasyonu	98
3.4.2. 2. Normalizasyon	98
3.4.3. Deneylerde kullanılan qRT- PCR Primerleri ve Taqman Probları	98
3.4.4. Deneylerde kullanılan primerlerin sulandırılması	100
3.4.4.1. GAPDH ve ACTB primerlerinin hazırlanması	100
3.4.4.2. HPRT, LVSCC A1C, VDR ve Siklofilin B primerlerinin hazırlanması	100
3.4.5. qRT- PCR reaksiyon karışımının hazırlanması	100
3.4.5.1. qRT-PCR Sıcaklık Döngüsü	102
3.5. NGF Miktarının Ölçümü	102
3.6. Sitotoksosite Ölçümü	103
3.7. İstatistik	104
3.7.1. Sitotoksosite ve NGF Ölçümlerinin Analizi	104
3.7.2. qRT-PCR Deneylerinin Analizi	104
3.8. Deneylerde Kullanılan Stok Solusyonların Hazırlanması	105
3.8.1. %3,7 Paraformaldehid solüsyonunun hazırlanması	105
3.8.2. 1,25 α -dihidroksivitamin D ₃ stok solüsyonunun hazırlanması	105
3.8.3. Stok siRNA'ların hazırlanması	106
3.8.4. RNA izolasyon kiti içeriği (High Pure RNA Isolation Kiti Roche 11 828 665 001)	107
3.8.5. Lightcycler 480 Probe Master Kiti (Roche 04707494 001) İçeriği	108
4. BULGULAR	109
4.1. Floresan Mikroskopik Değerlendirme	109
4.2. Sitotoksosite Ölçüm Sonuçları	113
4.2.1. Primer kortikal nöron kültürü sitotoksosite ölçüm sonuçları	113
4.2.2. Primer hippokampal nöron kültüründe sitotoksosite ölçüm sonuçları	115

4.3. siRNA Uygulaması (Post Transkripsiyonel Gen Susturulması-PTGS Yöntemi) Sonuçları	115
4.3.1. Primer kortikal nöron kültürü sonuçları	115
4.3.1.1. VDR mRNA seviyelerindeki değişimler	115
4.3.1.2. Siklofilin B mRNA seviyelerindeki değişimler	124
4.3.1.3. L-tipi voltaj duyarlı kalsiyum kanalı A1C (LVSCC A1C) mRNA seviyelerindeki değişimler	132
4.3.2. Primer hippocampal nöron kültürü sonuçları	141
4.3.2.1. Primer hippocampal nöron kültürüne 12 saat süreyle yapılan siRNA uygulamaları sonucunda 24. saatteki VDR mRNA seviyelerindeki değişimler	141
4.3.2.2. Primer hippocampal nöron kültürüne 12 saat süreyle yapılan siRNA uygulamaları sonucunda 24. saatteki Siklofilin B mRNA seviyelerindeki değişimler	143
4.3.2.3. Primer hippocampal nöron kültürüne 12 saat süreyle yapılan siRNA uygulamaları sonucunda 24. saatteki LVSCC A1C mRNA seviyelerindeki değişimler	145
4.4. NGF Ölçüm Sonuçları	147
4.4.1. Primer kortikal nöron kültürü	147
5. TARTIŞMA	150
KAYNAKLAR	158
ETİK KURUL KARARI	165
ÖZGEÇMİŞ	166

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Bazı genlerin ekspresyonunda rol alan VDRE tipleri ve dizileri (10).	7
Tablo 2-2: Vitamin D'nin sinir sistemi üzerindeki moleküler ve hücresel etkileri (1, 3).	11
Tablo 2-3: L-tipi voltaj duyarlı kalsiyum kanallarının bulunduğu yerler ve fonksiyonları	45
Tablo 2-4: Küçük RNA'ların sınıflandırılması ve görevleri (92).	65
Tablo 3-1: Kullanılan kalıp RNA ve primer karışımının içeriği	96
Tablo 3-2: RT reaksiyonunda kullanılan maddelerin konsantrasyonları.....	97
Tablo 3-3: HPRT prob ve primerlerinin özellikleri	99
Tablo 3-4: L-VSCC A1C prob ve primerlerinin özellikleri	99
Tablo 3-5: VDR prob ve primerlerinin özellikleri.....	99
Tablo 3-6: Siklofilin B prob ve primerlerinin özellikleri	100
Tablo 3-7: qRT- PCR reaksiyon karışımı	101
Tablo 3-8: qRT-PCR sıcaklık döngüsü.....	102
Tablo 3-9: siRNA stok solüsyonun hazırlanması	106
Tablo 3-10: RNA izolasyon kiti içeriği	107
Tablo 3-11: RNA izolasyon kiti solüsyonlarının hazırlanışı	108
Tablo 3-12: LightCycler 480 Probe Master karışımının içeriği	108
Tablo 4-1: 6 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun VDR mRNA ekspresyon seviyelerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması.	116
Tablo 4-2: 6 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun VDR mRNA ekspresyon seviyelerinin transfeksiyon ajanı uygulanmış kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	117
Tablo 4-3: 6 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun VDR mRNA ekspresyon seviyelerinin hedefi olmayan siRNA uygulanmış negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	117
Tablo 4-4: 6 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun VDR mRNA ekspresyon seviyelerinin Siklofilin B siRNA uygulanmış pozitif kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	117

Tablo 4-5: 12 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun VDR mRNA ekspresyon seviyelerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması.	119
Tablo 4-6: 12 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun VDR mRNA ekspresyon seviyelerinin transfeksiyon ajanı uygulanmış kontrol grubu ile karşılaştırılması.	120
Tablo 4-7: 12 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun VDR mRNA ekspresyon seviyelerinin hedefi olmayan siRNA uygulanmış negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması.	120
Tablo 4-8: 12 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun VDR mRNA ekspresyon seviyelerinin Siklofilin B siRNA uygulanmış pozitif kontrol grubu ile karşılaştırılması.	120
Tablo 4-9: 12 saat süreyle VDR siRNA + 10^{-7} M Vitamin D uygulanmış deney grubunun VDR mRNA ekspresyon seviyelerinin VDR siRNA uygulanmış grup ile karşılaştırılması.	121
Tablo 4-10: 24 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun VDR mRNA ekspresyon seviyelerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması.	122
Tablo 4-11: 24 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun VDR mRNA ekspresyon seviyelerinin transfeksiyon ajanı uygulanmış kontrol grubu ile karşılaştırılması.	123
Tablo 4-12: 24 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun VDR mRNA ekspresyon seviyelerinin hedefi olmayan siRNA uygulanmış negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması.	123
Tablo 4-13: 24 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun VDR mRNA ekspresyon seviyelerinin Siklofilin B siRNA uygulanmış pozitif kontrol grubu ile karşılaştırılması.	123
Tablo 4-14: 6 saat süreyle Siklofilin B siRNA uygulanmış deney grubunun Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyelerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması.	125
Tablo 4-15: 6 saat süreyle Siklofilin B siRNA uygulanmış deney grubunun Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyelerinin transfeksiyon ajanı uygulanmış kontrol grubu ile karşılaştırılması.	126
Tablo 4-16: 6 saat süreyle Siklofilin B siRNA uygulanmış deney grubunun Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyelerinin hedefi olmayan siRNA uygulanmış negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması.	126

Tablo 4-17: 6 saat süreyle Siklofilin B siRNA uygulanmış deney grubunun Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyelerinin VDR siRNA uygulanmış deney grubu ile karşılaştırılması.....	126
Tablo 4-18: 12 saat süreyle Siklofilin B siRNA uygulanmış deney grubunun Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyelerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması.	128
Tablo 4-19: 12 saat süreyle Siklofilin B siRNA uygulanmış deney grubunun Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyelerinin transfeksiyon ajanı uygulanmış kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	128
Tablo 4-20: 12 saat süreyle Siklofilin B siRNA uygulanmış deney grubunun Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyelerinin hedefi olmayan siRNA uygulanmış negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	128
Tablo 4-21: 12 saat süreyle Siklofilin B siRNA uygulanmış deney grubunun Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyelerinin VDR siRNA uygulanmış deney grubu ile karşılaştırılması.....	129
Tablo 4-22: 12 saat süreyle Siklofilin B siRNA uygulanmış deney grubunun Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyelerinin VDR siRNA+ 10^{-7} M Vitamin D uygulanmış deney grubu ile karşılaştırılması.....	129
Tablo 4-23: 24 saat süreyle Siklofilin B siRNA uygulanmış deney grubunun Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyelerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması.	130
Tablo 4-24: 24 saat süreyle Siklofilin B siRNA uygulanmış deney grubunun Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyelerinin transfeksiyon ajanı uygulanmış kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	131
Tablo 4-25: 24 saat süreyle Siklofilin B siRNA uygulanmış deney grubunun Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyelerinin hedefi olmayan siRNA uygulanmış negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	131
Tablo 4-26: 24 saat süreyle Siklofilin B siRNA uygulanmış deney grubunun Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyelerinin VDR siRNA uygulanmış deney grubu ile karşılaştırılması.....	131
Tablo 4-27: 6 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyelerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	133
Tablo 4-28: 6 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyelerinin transfeksiyon ajanı uygulanmış kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	134

Tablo 4-29: 6 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyelerinin hedefi olmayan siRNA uygulanmış negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	134
Tablo 4-30: 6 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyelerinin Siklofilin B siRNA uygulanmış deney grubu ile karşılaştırılması.....	134
Tablo 4-31: 12 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyelerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	136
Tablo 4-32: 12 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyelerinin transfeksiyon ajanı uygulanmış kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	137
Tablo 4-33: 12 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyelerinin hedefi olmayan siRNA uygulanmış negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	137
Tablo 4-34: 12 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyelerinin Siklofilin B siRNA uygulanmış deney grubu ile karşılaştırılması.....	137
Tablo 4-35: 12 saat süreyle VDR siRNA + 10^{-7} M Vitamin D uygulanmış deney grubunun LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyelerinin VDR siRNA uygulanmış grup ile karşılaştırılması.....	138
Tablo 4-36: 24 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyelerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	139
Tablo 4-37: 24 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyelerinin transfeksiyon ajanı uygulanmış kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	140
Tablo 4-38: 24 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyelerinin hedefi olmayan siRNA uygulanmış negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	140
Tablo 4-39: 12 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyelerinin Siklofilin B siRNA uygulanmış deney grubu ile karşılaştırılması.....	140
Tablo 4-40: 12 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun VDR mRNA ekspresyon seviyelerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	142

Tablo 4-41: 12 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun VDR mRNA ekspresyon seviyelerinin hedefi olmayan siRNA uygulanmış negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	142
Tablo 4-42: 12 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun VDR mRNA ekspresyon seviyelerinin Siklofilin B siRNA uygulanmış pozitif kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	142
Tablo 4-43: 12 saat süreyle Siklofilin B siRNA uygulanmış deney grubunun Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyelerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	144
Tablo 4-44: 12 saat süreyle Siklofilin B siRNA uygulanmış deney grubunun Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyelerinin hedefi olmayan siRNA uygulanmış negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	144
Tablo 4-45: 12 saat süreyle Siklofilin B siRNA uygulanmış deney grubunun Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyelerinin VDR siRNA uygulanmış deney grubu ile karşılaştırılması.....	144
Tablo 4-46: 12 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyelerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	146
Tablo 4-47: 12 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyelerinin hedefi olmayan siRNA uygulanmış negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	146
Tablo 4-48: 12 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyelerinin Siklofilin B siRNA uygulanmış deney grubu ile karşılaştırılması.....	146
Tablo 4-49: 24 saat süreyle siRNA uygulanmış primer kortikal nöron kültürüne ait grupların 24. saatteki NGF miktarlarının gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırılması.....	149

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Vitamin D metabolizması (14).....	6
Şekil 2-2: Beyinde vitamin D metabolizması (3)	9
Şekil 2-3: Beyindeki olası Vitamin D sinyal yolağı (3).....	10
Şekil 2-4: Farklı nörodejeneratif hastalıklarda görülen protein birikimleri (39).....	15
Şekil 2-5: Hücre içi ve hücreler arası alanda protein birikimlerinin oluşumu (39).	16
Şekil 2-6: Dendritik dikenler (51).....	21
Şekil 2-7: Nöronun genel yapısı (49).....	24
Şekil 2-8: Nöronların morfolojilerine göre sınıflandırılması (51).	26
Şekil 2-9 Merkezi sinir sisteminin 7 ana bölgesi (52).	31
Şekil 2-10: Serebral korteksin anatomik yapısı (56).	33
Şekil 2-11: Serebral korteksin işlevsel alanları (56).....	35
Şekil 2-12: Hippokampusun anatomik yapısı (56).	37
Şekil 2-13: Çeşitli voltaj kapılı iyon kanallarının yapısal özellikleri (57).....	40
Şekil 2-14: Prokaryotik ve ökaryotik organizmalarda voltaj kapılı iyon kanallarının filogenisi (57).....	41
Şekil 2-15: Kalsiyum kanalı $\alpha 1$ alt üniteleri dizi benzerlikleri (61)	43
Şekil 2-16: Voltaj Kapılı kalsiyum kanalı (61).....	44
Şekil 2-17: Voltaj kapılı kalsiyum kanalları yardımcı alt üniteleri (62).....	44
Şekil 2-18: Voltaj kapılı kalsiyum kanallarının RGK ailesi ile ilişkili proteinler tarafından düzenlenmesi (62).....	46
Şekil 2-19: Voltaj kapılı kalsiyum kanallarının adaptör proteinler ile düzenlenmesi (62).	47
Şekil 2-20: Voltaj kapılı kalsiyum kanallarının G proteini ilişkili reseptörler ile düzenlenmesi (74).....	48
Şekil 2-21: Voltaj kapılı kalsiyum kanallarının ORL1 ile lizozomlara yönlendirilmesi (62).....	48
Şekil 2-22: Voltaj kapılı kalsiyum kanallarının GABA β ile endozoma alınması ve saklanması (62).	49
Şekil 2-23: Hücre içi kalsiyum dengesini sağlayan kanallar ve pompalar (80).	50
Şekil 2-24: Kalsiyum ile tetiklenen apoptoz (81).	51
Şekil 2-25: Kalsiyum ile tetiklenen nekroz (82).....	51

Şekil 2-26: Bozulan kalsiyum dengesinin nörodejeneratif hastalıklar üzerine etkisi (84).	55
Şekil 2-27: Alzheimer hastalığında APP işlenmesindeki değişikliklerin nöron kalsiyum dengesine üzerine etkisi (84).	57
Şekil 2-28: Farklı nörotrofik faktörlerle uyarılan nöronlar (87).	58
Şekil 2-29: Nöronların nörotrofik faktörlerle bağlı olarak farklılaşması (87).	59
Şekil 2-30: Nörotrofik faktörler ve reseptörleri (87).	60
Şekil 2-31: Nörotrofik faktör hipotezi (87).	62
Şekil 2-32: NGF'ye bağlı hücre sağkalımı ve apoptoz (87).	63
Şekil 2-33: NGF gen terapisinde transgenik hücrelerin hastaya transplantasyonu (90).	64
Şekil 2-34: Metazoa miRNA örnekleri (91).	67
Şekil 2-35: miRNA işlenmesi (94).	68
Şekil 2-36: miRNA ve siRNA'ların biogenezi (91).	69
Şekil 2-37: Ago proteinin yapısı (93).	69
Şekil 2-38: Ago proteininin miRNA ve siRNA'ların biogenezindeki rolü (94).	70
Şekil 2-39: Ago 2 taşıyan miRNP ile hedef RNA'nın kesilmesi (94).	70
Şekil 3-1: Vajinal yayma preparatında sıçan sperminin görüntüsü.	82
Şekil 3-2: Hamile sıçanlardan sezaryen yöntemiyle embriyoların eldesi.	82
Şekil 3-3: Sıçan embriyolarının amniyon kesesinden çıkartılması.	83
Şekil 3-4: 16 günlük sıçan embriyolarının görüntüsü.	83
Şekil 3-5: 18 günlük sıçan embriyoları görüntüsü.	83
Şekil 3-6: Embriyodan elde edilen beyin görüntüsü.	86
Şekil 3-7: Embriyodan elde edilen total beynin (A) ve hippocampusun (B) stereo mikroskop altındaki görüntüsü.	86
Şekil 3-8: Hemositometreye yüklenen hücrelerin invert mikroskop altındaki görüntüsü	88
Şekil 3-9: 3 günlük primer hippocampal (A) ve kortikal (B) nöronların faz-kontrast mikroskobu ile görünüşü, büyütme 20x	88
Şekil 3-10: 7 günlük primer hippocampal (A) ve kortikal (B) nöronların faz-kontrast mikroskobu ile görünüşü. Büyütme 20x	88
Şekil 4-1: 7 günlük primer hippocampal nöron kültüründe nöronlar ve glia hücreleri görülmektedir.	110

Şekil 4-2: 7 günlük primer kortikal nöron kültüründe nöronlar ve glia hücreleri görülmektedir.....	111
Şekil 4-3: 14 günlük primer hippocampal nöron kültürü görülmektedir.....	112
Şekil 4-4: 6 saat süreyle siRNA uygulanmış primer kortikal nöron kültürüne ait tüm grupların 24. saatteki LDH miktarları.....	113
Şekil 4-5: 12 saat süreyle siRNA uygulanmış primer kortikal nöron kültürüne ait tüm grupların 24. saatteki LDH miktarları.....	114
Şekil 4-6: 24 saat süreyle siRNA uygulanmış primer kortikal nöron kültürüne ait tüm grupların 24. saatteki LDH miktarları.....	114
Şekil 4-7: 12 saat süreyle siRNA uygulanmış primer hippocampal nöron kültürüne ait tüm grupların 24. saatteki LDH miktarları.	115
Şekil 4-8: 6 saat süreyle siRNA uygulanmış primer kortikal nöron kültürüne ait grupların 24. saatteki VDR mRNA seviyeleri.	116
Şekil 4-9: 12 saat süreyle siRNA uygulanmış primer kortikal nöron kültürüne ait grupların 24. saatteki VDR mRNA ekspresyon seviyeleri.	119
Şekil 4-10: 24 saat süreyle siRNA uygulanmış primer kortikal nöron kültürüne ait grupların 24. saatteki VDR mRNA ekspresyon seviyeleri.	122
Şekil 4-11: 12 ve 24 saat süreyle siRNA uygulanmış primer kortikal nöron kültürüne ait grupların 24. saat VDR mRNA ekspresyon seviyelerindeki değişimler.	124
Şekil 4-12: 6 saat süreyle siRNA uygulanmış primer kortikal nöron kültürüne ait grupların 24. saatteki Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyeleri.....	125
Şekil 4-13: 12 saat süreyle siRNA uygulanmış primer kortikal nöron kültürüne ait grupların 24. saatteki Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyeleri.....	127
Şekil 4-14: 24 saat süreyle siRNA uygulanmış primer kortikal nöron kültürüne ait grupların 24. saatteki Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyeleri.....	130
Şekil 4-15: 6, 12 ve 24 saat süreyle siRNA uygulanmış primer kortikal nöron kültürüne ait grupların 24. saat Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyelerindeki değişimler.	132
Şekil 4-16: 6 saat süreyle siRNA uygulanmış primer kortikal nöron kültürüne ait grupların 24. saat LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyeleri.	133
Şekil 4-17: 12 saat süreyle siRNA uygulanmış primer kortikal nöron kültürüne ait grupların 24. saat LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyeleri.	136
Şekil 4-18: 24 saat süreyle siRNA uygulanmış primer kortikal nöron kültürüne ait grupların 24. saat LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyeleri.	139

Şekil 4-19: 12 saat süreyle siRNA uygulanmış primer hippocampal nöron kültürüne ait grupların 24. saatteki VDR mRNA ekspresyon seviyeleri.	141
Şekil 4-20: 12 saat süreyle siRNA uygulanmış primer hippocampal nöron kültürüne ait grupların 24. saat Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyeleri.	143
Şekil 4-21: 12 saat süreyle siRNA uygulanmış primer hippocampal nöron kültürüne ait grupların 24. saat LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyeleri.	145
Şekil 4-22: 12 saat süreyle siRNA uygulanmış primer kortikal nöron kültürüne ait grupların 24. saatteki NGF miktarları.	147
Şekil 4-23: 24 saat süreyle siRNA uygulanmış primer kortikal nöron kültürüne ait grupların 24. saatteki NGF miktarları.	148

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

1,25(OH ₂)D ₃	Vitamin D, 1,25-dihidroksivitamin-D ₃ , Vitamin D ₃ , kalsitriol, 1 α -25 dihidroksi D ₃
25-OHD	25-hidroksivitamin D ₃
25-OHD-1 α -hidroksilaz	25-hidroksivitamin D ₃ -1 alfa-hidroksilaz
Ago	Argonaute proteini
AH	Alzheimer Hastalığı
ALS	Amiyotrofik lateral sikloroz
APP	Amiloid prekürsör proteini
AR-JP	Otozomal resesif juvenil parkinsonizm
ATF	cAMP-bağımlı transkripsiyon faktörü
A β	Beta Amiloid peptidi
CHOP	CIEBP homolog protein
CICR	Kalsiyum ile uyarılan kalsiyum salınımı
COX-2	Siklooksigenaz-2
Cu	Bakır
CYP27	Sterol – 27 – hidroksilaz, vitamin D ₃ -25-hidroksilaz
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole
DEAD-box helicase	Ölüm-kutusu helikazı
DER	Düz yüzlü endoplazmik retikulum
DLB	Lewy cisimleri ile görülen demans
DRPLA	Dentatorubral-Pallidoluysian atrofi
ds	Çift zincirli
dsRBP	dsRNA bağlayan protein
Fe	Demir
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FLD	Frontal lob demansı
FRDA	Friedreich ataxia
FTDP-17	Frontotemporal demans ve kromozom 17 ilişkili parkinsonizm

GABA	Gama aminobütirik asit
GDNF	Glial kökenli nörotrofik faktör
GER	Granüllü endoplazmik retikulum
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker sendrom
Guam ALS/PDC	Guam amiyotrofik lateral skleroz / parkinsonizm-demans kompleksi
HH	Huntington Hastalığı
HNE	4-hidroksi-2,3-nonenal
IL	İnterlökin
iNOS	İndüklenabilir nitrik oksit sentaz
LVSCC	L-tipi voltaj duyarlı kalsiyum kanalı
LVSCC A1C	L-tipi voltaj duyarlı kalsiyum kanalı alfa 1 C alt ünitesi
MAP	Mikrotubul ilişkili protein
M-CSF	Makrofaj koloni-uyarıcı faktör
MEM	Minimum esansiyel medyum
miRISC	miRNA ile indüklenen susturma kompleksi
miRNA	Mikro RNA
MoMLV	Moloney murine lösemi virüsü
MSCV	Fare kök hücre virüsü
MSS	Merkezi sinir sistemi
NBM	Nörobazal medyum
NFT	Nörofibriller yumaklar
NGF	Sinir büyüme faktörü
NO	Nitrik oksit
NT3	Nörotrofin 3
NT4	Nörotrofin 4
PACT	İnterferon ile indüklenen protein kinazın protein aktivatörü
PERK	eIF2a kinaz
PH	Parkinson Hastalığı
piRNA	Piwi ilişkili RNA
PKC	protein kinaz C

PS-1	Presenilin-1
PS-2	Presenilin-2
PSS	Periferal sinir sistemi
PTGS	Post-transkripsiyonel gen susuturulması
rasiRNA	Repeat associated siRNA
ROS	Reaktif oksijen ara ürünleri
RxR	Retinoik asit reseptörü
SCA	Spinocerebellar ataxia
scnRNA	Küçük tarayıcı RNA
siRNA	Küçük müdahaleci/çakışan RNA
SOD1	Süperoksit dismutaz 1
tasiRNA	Trans-acting siRNA
TNF- α	Tümör nekroz faktör alfa
TR	Texas Red
TRBP	Transaktivasyon-cevap element RNA-bağlayan protein
Ub	Ubikutin
UPS	Ubikutin-proteozom sistemi
VDR	Vitamin D reseptörü
VDRE	Vitamin D cevap elementi
α -syn	Alfa sinüklein

ÖZET

Gezen-Ak D. Vitamin D'nin Nöron Yaşamı ve Nörodejenerasyon Üzerine Etkilerinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2009.

Uzun yıllardır esas fonksiyonunun kalsiyum ve fosfat dengesini, kemik yapısını korumak olduğu düşünülen vitamin D'nin, yapılan son çalışmalarla birlikte beyinde de önemli rollerinin olduğu gösterilmiştir. Beyinde vitamin D'nin biyosentezi ve yıkımının gerçekleştiği ve vitamin D'nin işlevini gerçekleştirmesi için gerekli olan vitamin D reseptörünün (VDR) ekspresyonunun beyin çeşitli bölgelerinde bulunduğu saptanmıştır. Ayrıca bir çok çalışmada vitamin D'nin sinir sistemi üzerinde koruyucu bir etkisinin olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda, vitamin D ve vitamin D tarafından tetiklenen hücre içi yolaklarda görev alan ve nöronun sağkalımında rol oynayan anahtar proteinlerdeki değişiklikleri saptamayı ve vitamin D eksikliğinin nöron yaşamı ve nörodejenerasyon üzerindeki etkisini araştırmayı amaçladık. Bu amaçla hippocampus ve serebral korteksten hazırlanan primer nöron kültürlerinde post transkripsiyonel gen susturulması yöntemi ile VDR geni susturuldu. Daha sonra gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile VDR, Siklofin B, LVSCC A1C genlerinin mRNA seviyelerindeki değişiklikler saptandı. Ayrıca primer kortikal nöron kültüründe NGF proteinindeki değişimler ELISA yöntemi ile belirlendi. Tüm gruplara sitotoksikite testi uygulandı.

Primer hippocampal ve kortikal nöronlarda LVSCC A1C mRNA miktarlarının VDR baskılanmasına ve kısa süreli vitamin D eksikliğine cevaben oldukça hızlı bir şekilde yükseldiği ve kortikal nöronlarda NGF miktarlarının azaldığı saptandı. Bu sonuçlar serebral kortekse ve hippocampusa ait nöronlarda oluşturulan vitamin D eksikliği modelinin, yaşlanmanın ve nörodejenerasyonun oluşum mekanizmaları için in vitro deneysel bir model oluşturabileceğini ve sürekli vitamin D eksikliği durumunda nöronların yaşlanmaya ve nörodejenerasyona karşı korumasız hale gelebileceğini düşündürmektedir. Sonuçlarımız vitamin D'nin beyin için vazgeçilmez bir molekül olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler : Vitamin D, VDR, nörodejenerasyon, siRNA, kalsiyum kanalları

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-942 / 06102006

ABSTRACT

Gezen-Ak D. The effects of vitamin D on neuronal survival and neurodegeneration. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Medical Biology. Ph.D. Thesis. İstanbul. 2009.

The recent studies have demonstrated that 1,25-(OH)₂ D₃ can act on cells of the nervous system by modulating the synthesis of neurotrophins, calcium channels and calcium binding proteins. The aim of this study is to silence the expression of vitamin D receptor (VDR) mRNA and determine the differences of the expression levels of L-type voltage sensitive calcium channels A1C (LVSCC A1C) in hippocampal and cortical neurons and NGF protein in cortical neurons.

In our study VDR downregulation by small interfering RNA has been used to establish a vitamin D deficiency model in rat hippocampal and cortical neurons. The levels of VDR, Cyclophilin B and LVSCC A1C expressions were determined by qRT-PCR. NGF levels of cortical neurons were determined by ELISA method. Cytotoxicity assay was performed in all groups.

The expression levels of LVSCC A1C mRNA increased rapidly in hippocampal and cortical neurons whereas NGF protein levels decreased in cortical neurons in response to VDR down-regulation. LDH levels were not changed in all groups. These results showed that calcium metabolism could be disrupted and the neurons could be vulnerable against aging and neurodegeneration by the vitamin D deficiency. When the physiological role of Vitamin D in Ca²⁺ and phosphate metabolism was considered, vitamin D can be an indispensable molecule for brain.

Key Words: Vitamin D, VDR, neurodegeneration, siRNA, calcium channels

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. T-942 / 06102006

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Uzun yıllardır esas fonksiyonunun kalsiyum ve fosfat dengesini, kemik yapısını korumak olduğu düşünölen vitamin D'nin, yapılan son çalışmalarla birlikte immün sistemin ve renin-anjiotensin sisteminin düzenlenmesinde, kardivasköler hastalıkların gelişiminde ve beyinde önemli rollerinin olduğu gösterilmiştir. Bir kolesterol omurgası taşıyan ve tüm vücutta steroid benzeri etkileri olan vitamin D, nüklear bir steroid reseptörü olan vitamin D reseptörü (VDR) ile 1.000'in üzerinde genin anlatımını düzenler. Beyinde vitamin D biyosentez ve yıkımının gerçekleştiğı ve vitamin D'nin etkisini gösterebilmesi için gerekli olan VDR anlatımının beynin çeşitli bölgelerinde bulunduğu saptanmıştır. Ayrıca bir çok çalışmada vitamin D'nin sinir sistemi üzerinde koruyucu etkilerinin olduğu gösterilmiştir (1-6).

Vitamin D'nin sinir sistemi üzerindeki etkileri 4 başlık altında toplanabilir (1, 3, 7):

1. Oksidatif stresin önlenmesi: Vitamin D, γ glutamil transpeptidaz aktivitesini düzenleyerek beyinde detoksifikasyon işlemini kontrol eden bir antioksidandır.

2. Nörotrofik faktörlerin düzenlenmesi: Vitamin D nöron kaderinin belirlenmesinde rol oynayan sinir büyüme faktörü (NGF), nörotrofin-3 (NT-3), nörotrofin-4 (NT-4) ve glial hücre kökenli nörotrofik faktörlerin (GDNF) ekspresyonunu düzenler.

3. Ca^{+2} dengesi: Vitamin D hücre içi kalsiyum dengesinin sağlanmasında önemli rol oynayan L-tipi voltaj duyarlı kalsiyum kanallarının ve kalsiyum bağlayan proteinlerin ekspresyonunu düzenler.

4. İmmün sistemin düzenlenmesi: Vitamin D otoimmün ve hücrel immün cevapta rol oynar.

Vücuttaki vitamin D miktarları ve vitamin D alınması ile ilgili problemler, nörotrofik faktör üretimini, hücre içi kalsiyum dengesini, oksidatif stres mekanizmalarını ve immün sistemi etkileyeceğinden nörodejeneratif hastalıklardaki nöron hasarı ile ilişkilendirilebilir. Tüm bu bulgulara ek olarak daha önce yapmış olduğumuz çalışmalarda vitamin D reseptör geni polimorfizmleri ile geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı arasında ilişki bulunduğu literatürde ilk kez olarak ortaya konulmuştur (3, 8).

Özellikle son yıllarda Alzheimer hastalığının tedavisinde NGF gibi nörotrofik faktörlerin kullanılması ile ilgili olarak yapılan deneysel çalışmalar, bu faktörlerin kognitif (bilişsel) sistem hücrelerinin yaşam sürelerinin uzatılması ve hatta nöron rejenerasyonu üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Ayrıca Parkinson Hastalığı modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda vitamin D'nin tedavi edici etkisi gösterilmiştir. Buna göre vitamin D'nin ve ekspresyonu vitamin D tarafından kontrol edilen proteinlerin rolünün nörodejeneratif hastalıkların tedavisi açısından önemli olabileceği düşünülebilir (3).

Son çalışmalar gelişmiş ülkelerde yaşayan bireylerde, vitamin D eksikliğinin gençler de dahil olmak üzere oldukça yaygın olduğunu göstermektedir. Yaşlılarda ise vitamin D eksikliği görülme oranı % 87'ye kadar ulaşmaktadır. Yakın zamanlara kadar sadece basit bir vitamin olarak görünmesi, bu biyoaktif maddenin aslında sekosteroid bir hormon olduğu ve eksikliğinin yaşlılarda ciddi problemlerin ortaya çıkmasına sebep olabileceği gerçeğini saklamış olabilir. Beyindeki ilk bulgular 25 yıl öncesine uzanmasına rağmen elde edilen bilgiler halen oldukça yetersizdir. Bu kısıtlı bilgiler bile vitamin D'nin beyin gelişiminden, immün sistemin düzenlenmesine kadar bir çok yolda rol oynadığına dair veriler sunmaktadır. En önemli görevlerinden biri olan kalsiyum metabolizmasının düzenlenmesi nörodejenerasyonun anlaşılması için kilit bir mekanizma olabilir. Nörodejenerasyonun biyolojik belirteçlerinin başında gelen kalsiyum metabolizmasına ait bir çok protein vücutta vitamin D tarafından düzenlenir (1, 3). Fakat bu proteinlerin beyindeki etkinliğine ait yeterli bilgi bulunmamaktadır. Vitamin D'nin sinir sistemi üzerindeki etkisine katılan intraselüler yollar göz önüne alındığında, vitamin D eksikliğinin nörodejeneratif hastalıkların oluşumunda rol oynayabileceği düşünülebilir ve böylece nörodejenerasyonun moleküler mekanizmalarının açıklanmasına yeni bir bakış açısı getirebilir.

Mevcut biyolojik veriler ve daha önceki çalışmalarımızdan elde ettiğimiz genetik sonuçlar ışığında bu çalışmada vitamin D'nin nöronlar üzerindeki etkisini özellikle kalsiyum metabolizması ve nörotrofik faktör üretimi açısından araştırmayı planladık. Bu amaçla sıçan primer hippokampal ve kortikal nöron kültüründe post-transkripsiyonal gen susturulması (PTGS) yöntemini kullanarak vitamin D etkisine aracılık eden VDR genini etkisiz hale getirdik. Oluşturduğumuz bu deneysel modelde, vitamin D ve vitamin D tarafından tetiklenen hücre içi yollarda görev alan L-tipi

voltaj duyarlı kalsiyum kanalı A1C (LVSCC A1C) mRNA'sındaki değişiklikleri kantitatif gerçek zamanlı PCR ve nöronun hayatta kalmasında önemli görevlere sahip olan NGF proteinindeki değişiklikleri ELISA yöntemiyle saptayarak, vitamin D reseptörünün ve dolayısıyla vitamin D'nin beyindeki işlevini ve vitamin D eksikliğinin nöron yaşamı ve nörodejenerasyon üzerindeki etkisini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Vitamin D (1,25 dihidroksivitamin-D₃)

Vitamin D'nin (1,25-dihidroksivitamin-D₃, Vitamin D₃, kalsitriol, 1 α -25 dihidroksi D₃) fotosentezinin dünya üzerinde 750 milyon yıldan fazla süredir meydana geldiği kanıtlanmıştır. Vitamin D'nin biyolojik fonksiyonu ilkel canlılarda iyi bilinmemektedir, bununla beraber omurgalılarda vitamin D'nin kalsiyum metabolizmasının düzenlenmesi ve kalsifiye olmuş bir iskelet oluşturmak üzere geliştiği tahmin edilmektedir (4, 9).

Bir kolesterol omurgası taşıyan vitamin D, sekosteroid (kolesterol omurgasında kırık bir zincir taşıyan steroid) bir hormondur ve yapılan son çalışmalar vitamin D'nin kalsiyum metabolizması dışında bir çok önemli fizyolojik olayda görev aldığını göstermektedir (1).

2.1.1. Vitamin D metabolizması

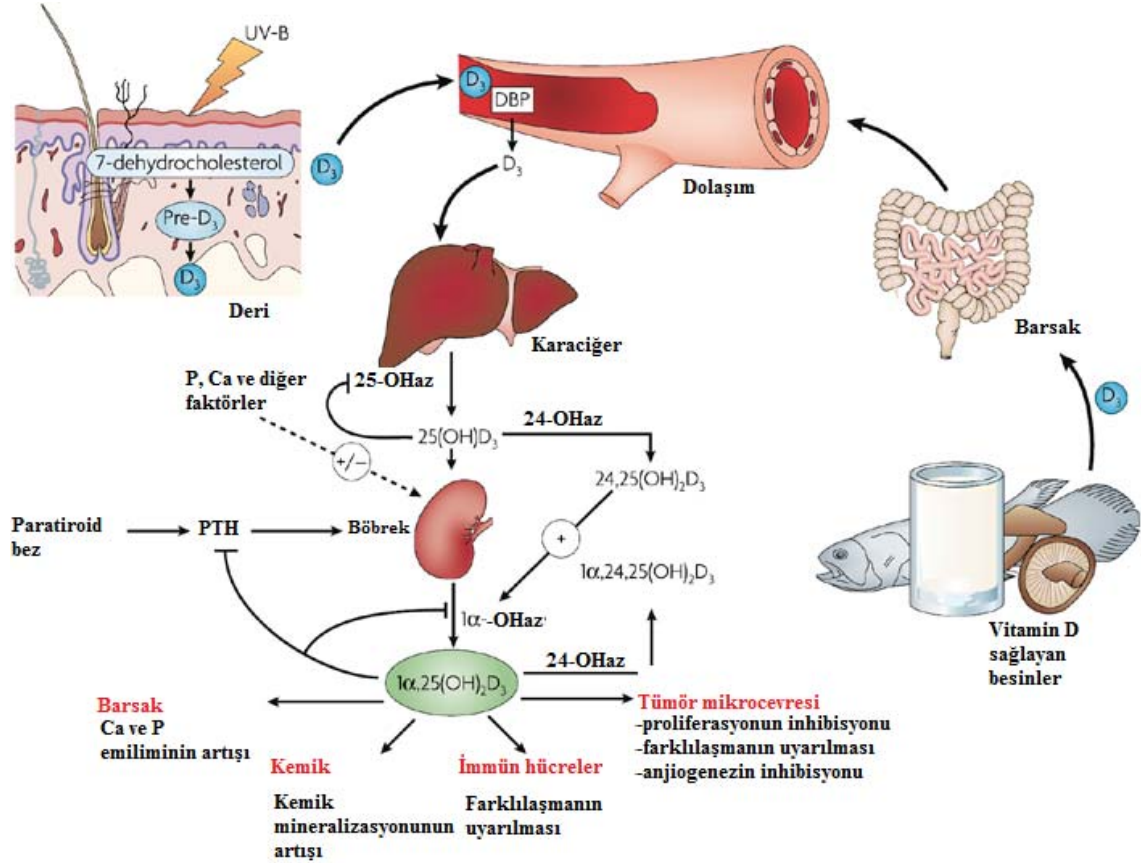
Vitamin D, insanlarda besinlerle alınma ve deride endojen üretim olmak üzere iki kaynaktan sağlanır. Deride epidermis hücrelerinin plazma membranlarındaki çift tabakalı lipid molekülleri arasında çok miktarda 7-dehidrokolesterol molekülü bulunur (4). Bu moleküller güneş ışığındaki özellikle 290-320 nm aralığındaki ultraviyole B (UVB) ışınları ile vitamin D₃ öncüllerine dönüşür. DNA ile aynı spektrumdaki UVB ışığını absorbladığı için vitamin D'nin "DNA'nın güneş kremi" olduğu ileri sürülür. Vitamin D'nin bilinen 7 farklı formu bulunur, fakat bunlardan yalnızca 1,25-dihidroksivitamin-D₃ tüm yüksek omurgalılarda ve hayvanlarda bulunur (1). Vücut ihtiyacının yaklaşık %80'i deride, morötesi ışığı absorbe eden melanin pigment düzeyine ve güneş ışığı görme miktarına bağlı olarak, endojen yolla elde edilebilir. Geri kalanı ise, derin deniz balıkları, bitkiler ve hububat gibi besin kaynaklarından elde edilmelidir. Bitkisel kaynaklarda vitamin D, öncül molekül şeklinde (ergosterol) bulunur ve vücutta vitamin D₂'ye dönüşür. Vitamin D₃ ile aynı fonksiyona sahip olan besin kaynaklı vitamin D barsaktan emildikten sonra lenf damarları ile karaciğere aktarılırken, deride üretilen vitamin D ise albumin benzeri bir plazma taşıyıcı proteini olan vitamin D bağlayan protein (DBP) ile taşınır (4, 7, 9-11).

Önemli bir bölümü deride ultraviyole B ışınları ile 7-dehidrokolestrol öncülünden sentezlenen vitamin D₃ vücutta sırasıyla, karaciğerde hidroksillenir ve böbrekte sitokrom p450 enzimleri ile aktif şekli olan 1,25(OH₂)D₃ haline dönüştürülür (12, 13) (Şekil 2-1).

Vitamin D, CYP27 (Sterol – 27 – hidroksilaz, vitamin D₃-25-hidroksilaz) enzimi tarafından 25-hidroksivitamin D₃ (25-OHD) molekülüne çevrilir. Sterol – 27 – hidroksilaz, kolesterolün 27 hidroksilasyonu ve vitamin D'nin 25- veya 24-hidroksilasyonu gibi olaylardan sorumlu olan çok fonksiyonlu bir enzimdir. Bu enzime ait gen insanda 2 no'lu kromozomda yerleşmiştir. Düzenlenmesi ve promotör bölgesinin yapısı detaylı olarak bilinmemektedir. Enzimdeki genetik anomaliler veya eksiklikler nörolojik anomalilerle tanımlanan ve “cerebrotendinous xanthomatosis” denilen bir hastalığa sebep olur (10).

25-OHD kendi reseptörüne bağlanmak üzere 25-OHD-1 α -hidroksilaz tarafından biyolojik olarak aktif hale getirilir. Bu enzimi kodlayan CYP1 geni insanda kromozom 12q13 bölgesinde yerleşmiştir (10).

25-OHD'nin alternatif hidroksilasyonu, P450cc veya CYP24 enzimi tarafından 24'üncü karbonda meydana getirilir. CYP24 geni kromozom 20q13 bölgesinde bulunur. CYP24'ün genetik bozuklukları bilinmemektedir, fakat CYP24 geni bloke edilen fareler, doğum öncesi gelişimlerinin normal olmasına karşın, erken yaşta yüksek ölüm oranı (%50) gösterirler. Ölümünün 1,25 (OH)₂ D₃ toksisitesinden kaynaklandığı düşünülür (4, 10).



Şekil 2-1: Vitamin D metabolizması (14).

2.1.2. Vitamin D reseptörü

Diğer steroid hormonlar gibi Vitamin D de, gelişim, farklılaşma ve çeşitli genlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde görevlidir (5, 15).

Kalsitriol (1,25 dihidroksivitamin D₃) vitamin D'nin aktif metabolitidir (22). Kalsitriole bağımlı gen transkripsiyonu, nükleer hormon reseptör süper ailesinin bir üyesi olan, vitamin D reseptörü (VDR) ve hedef genin promotör bölgesindeki özel vitamin D cevap elementi (VDRE) aracılığıyla gerçekleşir (5, 12, 13, 15). VDRE hormonun DNA'ya bağlanma bölgesiyle ilişkiye girerek onun hetero- veya homodimerizasyonunun oluşmasına yardımcı olur. Genellikle her gen için farklı bir VDRE görev alır. VDR, vitamin D'nin hormonal formu olan kalsitriolün bağlanmasıyla, hücre içinde bir transkripsiyon faktörü olarak rol oynar (3, 12, 16).

Fötal ve yetişkin memeli beyinlerinde VDR ekspresyonunun yapıldığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (2, 3, 17-24).

Nüklear reseptörler arasındaki heterodimerizasyon çeşitli fonksiyonlara sahip olan değişik kompleksler oluşturur. Bu da hormonal uyarı sonucunda oluşan transkripsiyon cevaplarının sayısını arttırır. VDR, ilgili genlerin transkripsiyonlarını aktif hale getirebilmek için Retinoik asit reseptörleri (RxR) ile heterodimer oluşturur (5, 13).

VDR homodimerleri, hem ligand bağımlı hem de ligand bağımlı olmayan DR6 tipi elementlere (Direct Repeats with six nucleotide spacing) (VDRE) bağlanma özelliği gösterirler. VDR:RxR heterodimerleri şekilsel farklılıklarından dolayı DR3 tipi vitamin D cevap elementlerine bağlanırlar. Ligandla teşvik edilen VDR:RxR heterodimerizasyonunun, DNA ile karşılıklı etkileşimi güçlendirdiği düşünülmektedir (10) (Tablo 2-1).

Tablo 2-1: Bazı genlerin ekspresyonunda rol alan VDRE tipleri ve dizileri (10).

Gen	VDRE dizisi	VDRE tipi
*mCalbindinD28k	GGGGGAtgtgAGGAGA	DR4
*m Pit-1	TGAACTctcaTGAACT	DR4
*h Osteocalcin	GGGTGActcaccGGGTGA	DR6
*hCalbindin D9k	TGCCCTtccttatggGGTTCA	IP9
*r Osteocalcin	TGCACTgggtgaatgAGGACA	IP9
*m c-fos	AGGTGAAAGATGTATGCCAAGACGGGGGTTGAAAG	n/a

*m: fare, h: insan, r: sıçan

VDR, ligandına bağlanmış durumdayken nükleusda bulunur. VDR'nin ligandına bağlanmadığı durumda hücredeki dağılımı ise tartışma konusudur. İmmunositokimyasal çalışmalar, liganda bağlanmamış VDR'nin az miktarda sitozolde bulunabileceğini ileri sürmektedir. Bunun yanında liganda bağlanmamış VDR'nin kromozomal DNA'ya gevşek olarak bağlanmış şekilde nükleusda ve sitozolde bir denge halinde bulunduğu da bildirilmiştir. Fluoresan işaretli kalsitriol kullanarak yapılan bir çalışmada ligandına bağlanmamış VDR'nin çoğunun sitoplazmada, genellikle Golgi kompleksi, endoplazmik retikulum ve mikrotubullerde bulunduğu, fakat plazma membranında

bulunmadığı saptanmıştır. Bu çalışmalarda kalsitriol verilmesini takip eden 5 dakika içinde sitoplazmik ve nükleer VDR miktarının dengelendiği görülmüştür (13).

VDR gen ekspresyonunun düzenlenme mekanizması iyi bilinmemekle birlikte, bu mekanizma kalsitriol sentezi ve metabolizmasına bağlıdır. VDR ekspresyonunun düzenlenmesinin hücre tipine özel olduğu ve hem transkripsiyonal hem de transkripsiyon sonrası mekanizmaları içerdiği farklı hücre soylarında yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (10).

2.1.3. Vitamin D'nin genomik olmayan fonksiyonlarına aracılık eden membran reseptörü

Vitamin D özel bir membran reseptörü aracılığı ile hızlı ve genomik olmayan çeşitli fonksiyonları yerine getirir. Bunlar arasında kalsiyum kanallarının düzenlenmesi, protein kinaz C ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolağının aktivasyonu sayılabilir. Vitamin D'nin membran reseptörü tavuk beyinde gösterilmiştir. Beyinde vitamin D'nin bu yolla nöron uyarılması ve elektrofizyolojik olaylarda rol oynadığı düşünülmektedir (3).

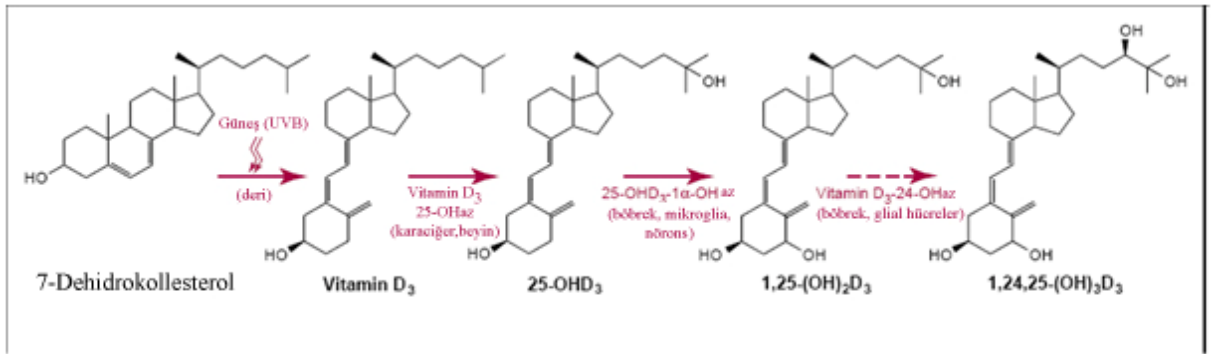
2.1.4. Vitamin D ve Beyin

Uzun süre vitamin D'nin en önemli rolünün kalsiyum ve fosfat metabolizmasını düzenlemek ve kemik yapısını korumak olduğu kabul görüyordu (3, 4, 7, 25). 1979'dan sonra yapılan çalışmalarda vitamin D'nin işlev görmesini sağlayan vitamin D reseptörünün (VDR) 50'den fazla dokuda bulunduğu gösterildi (4, 7, 26-28) VDR ve 1 α -hidroksilaz'ın yetişkin insan ve kemirgen beyinde, ayrıca fetal kemirgen beyinde bulunduğu gösterildi (17-20, 22-25, 29, 30). İnsan ve kemirgen beyindeki VDR dağılımının oldukça benzer olduğu saptandı (2). VDR'nin MSS'nin mikrogliya, astrosit, oligodendrosit hücrelerinin ve PSS'nin Schwann hücrelerinin nükleuslarında bulunduğu yapılan çalışmalarla gösterildi (17, 18, 21-23, 31, 32). Ayrıca kalsitriol enjekte edilmiş hamster beyinlerinde vitamin D'nin hafıza ve bilişsel işlevleri yerine getiren çeşitli nöron tiplerinin nükleuslarında yoğunlaştığı saptandı (20).

Bu bilgiler ışığında vitamin D'nin beyin hücrelerinin işlevlerinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (3).

2.1.4.1. Beyinde vitamin D sentezi ve indirgenmesi

Deride ultraviyole B ışınları ile 7-dehidrokolestrol öncülünden sentezlenen vitamin D, aktif şekli olan 1,25(OH)₂D₃'e, 25-OHD-1α-hidroksilaz ve vitamin D₃-25-hidroksilaz enzimleri tarafından dönüştürülür. Yapılan çalışmalar öncül vitamin D'yi biyolojik olarak aktif şekline dönüştüren bu enzimlerin beyinde de sentezlendiğini göstermiştir (Şekil 2-2) (3).



Şekil 2-2: Beyinde vitamin D metabolizması (3)

2.1.4.2. Vitamin D'nin nöronlar üzerindeki koruyucu etkileri

Vitamin D'nin sinir büyüme faktörünün (NGF) sentezini düzenlediğinin rapor edilmesiyle birlikte başlayan çalışmalar, vitamin D'nin sinir sistemi hücrelerinde nörotrofinlerin sentezini düzenlediğini göstermiştir. Vitamin D, NGF, nörotrofin 3 (NT3) ve glial kökenli nörotrofik faktör (GDNF) sentezini uyarırken, nörotrofin 4 (NT4) sentezini azaltır (3, 4, 6, 33). Vitamin D tarafından düzenlenen nörotrofin üretiminin nöron korunmasına aracılık ettiği sınırlı sayıdaki çalışmalarda gösterilmiştir. Örneğin vitamin D'nin sıçanlarda 6-hidroksidopamin ile indüklenen nörotoksisite ve hipokineziyi azalttığı saptanmıştır (3).

Nörotrofin sentezinin yanısıra vitamin D koruyucu etkisini nöron kalsiyum dengesini düzenleyerek de gösterir. Hippokampal nöronlarda L-tipi voltaj duyarlı kalsiyum kanallarının ekspresyonunu azaltarak nöronu eksitotoksisiteye karşı koruduğu bildirilmiştir. Ayrıca parvalbumin gibi kalsiyum bağlayan proteinlerin de sentezini düzenleyerek kalsiyum dengesinin korunmasına yardımcı olur. İskemi, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, AIDS, enfeksiyon, multipel skleroz ve otoimmün ensefalomyelit gibi hastalıklarda MSS nöronlarında ve nöron olmayan hücrelerde artan indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) miktarını azaltır. iNOS, nöronlarda ve

Tablo 2-2: Vitamin D'nin sinir sistemi üzerindeki moleküler ve hücresel etkileri (1, 3).

Fizyolojik olay	Vitamin D etkisi	Hedef hücre veya doku
Vitamin D Metabolizması	24OHaz mRNA↗ VDR mRNA↗	Astrositler Astrositler, glioma hücreleri, Schwann hücreleri, oligodendrositler
Büyüme Faktörleri metabolizması	NGF↗ NT-3↗ NT-4↘ GDNF↗	Yetişkin sıçan beyni, astrositler, Schwann hücreleri, hippocampal nöronlar Astrositler Astrositler Glioma hücreleri
Nörotransmitter Metabolizması	LVSCC ↘ Tirozin hidroksilaz↗ Kolin asetil transferaz↗	Hippokampal nöronlar Adrenal kromaffin hücreleri Yetişkin sıçan striatumu
Koruma	İskemiyle oluşan nörotoksisite↘ Diyabet sonucu oluşan nöropati↘ 6-hidroksidopamin toksisitesi↘ Parvalbumin↗ γ-glutamil transpeptidaz↗ Glutasyon seviyesi↗	Yetişkin sıçan korteksi Yetişkin sıçan periferel sinir sistemi Yetişkin sıçan beyni Yetişkin sıçan striatumu Yetişkin sıçan beyni, astrositler Astrositler, dopaminerjik nöronlar
Nöroimmünite	Enflamasyon↘ iNOS↘ M-CSF↘ TNF-α↘ TGF-β↗ IL-4↗	Yetişkin sıçan beyni Yetişkin sıçan beyni, astrositler, mikroglia Astrositler Astrositler Yetişkin fare beyni Yetişkin fare beyni
Nöro-onkoloji	Hücre ölümü-farklılaşma ↗ p75↗ Tenascin-C↘ M-CSF↗ Lösemi inhibitör faktörü (LIF)↗	Sıçan glioma hücreleri, insan glioblastoma Sıçan glioma hücreleri Sıçan glioma hücreleri Sıçan glioma hücreleri Sıçan glioma hücreleri

2.1.5. Vitamin D eksikliği

Vitamin D'nin vücutta yeteri kadar üretilip üretilmemesi, cilt pigmentasyonunun artması, enlem değişiklikleri, gün ışığının bulunduğu saatler, güneşte kalma süresi ve yaşlanma gibi faktörlere bağlıdır (4).

Primer vitamin D eksikliklerinin oluşma nedenleri, coğrafik koşullar, mevsimler, cilt pigmentasyonu, kültürel durum, yaşam koşulları ve beslenme olarak sıralanabilir (9).

Amerika'da 1988-1994 yılları arasında yapılan 3.Ulusal Sağlık ve Beslenme taramasından (Third National Health and Nutrition Examination Survey) elde edilen verileri kullanarak 2008 yılında Khazai ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada, beyaz ırkın %61'inde ve Afrika kökenli Amerikalıların %91'inde Vitamin D eksikliği olduğu saptanmıştır (34). Benzer bulgular bir çok ülkeye ait populasyon çalışmalarında bildirilmiştir (1). Vitamin D eksikliği gelişmiş ülkelerin sağlıklı genç populasyonlarında da yaygın olmakla birlikte, özellikle bakım evlerinde yaşayan veya kalça kırığı olan yaşlı populasyonlarında oldukça sık görülür. Yapılan çalışmalar yatan hastaların % 65-74'ünde, bakım evlerindeki hastaların %87'sinde vitamin D eksikliği olduğunu göstermiştir (1, 35).

Vitamin D eksikliğin bu kadar yaygın olmasının bilinmeyen çeşitli sağlık problemlerine sebep olabileceği düşünülmektedir (1).

Vitamin D eksikliği riket ve yetişkinlerde osteomalaziye sebep olmasının yanı sıra, ikincil hiperparatiroidizm, metabolik sendrom, kardiovasküler hastalıklar gibi sistemik bozukluklara yol açabilir (1).

Yapılan son çalışmalar vitamin D eksikliğin Parkinson ve diğer nörodejeneratif hastalıklar, duygu durum (mood) bozuklukları, multipl skleroz, Sjögren sendromu, romatoid artrit, Crohn hastalığı ve hatta tuberküloza sebep olabileceğini ileri sürmektedir (1, 3, 36, 37).

2.2. Nörodejenerasyon

2.2.1. Nörodejenerasyon nedir?

Nörodejenerasyon terimi, nöronlarda çeşitli sebeplerle meydana gelen hasarı ifade eder. Nörodejenerasyon sinir hücrelerinin yapı ve fonksiyonlarını kaybetmesiyle sonuçlanan bir süreçtir (38). Nörodejeneratif hastalıklar ilerleyici nöron hasarı ve ölümü ile tanımlanır. Bu hastalıkların en belirgin özelliklerinden biri özel nöron tiplerinde birtakım proteinlerin yanlış katlanması ve birikimidir. Söz konusu hastalıklar, belli bir düzeyde protein birikimi gerçekleştikten sonra ortaya çıkar ve ilerleyen yıllarla birlikte birçok semptomu beraberinde getirir (38, 39). Bu yüzden nörodejeneratif bir hastalığın gelişmesinde bilinen en önemli risk faktörü yaştır. Bir çok nörodejeneratif bozukluk sporadik olarak ortaya çıkmasına rağmen, nadiren genetik değişikliklerin de nörodejenerasyona sebep olduğu saptanmıştır. Bugün en iyi bilinen nörodejeneratif hastalıklar Alzheimer Hastalığı (AH), Parkinson Hastalığı (PH), Huntington Hastalığı (HH), amiyotrofik lateral skleroz (ALS) ve Prion Hastalığı olarak sıralanabilir (38-44).

2.2.2. Nörodejeneratif hastalıklar

Nörodejeneratif hastalıkların başlamasını tetikleyen olaylar birbirinden farklıdır. Bunun sebepleri şöyle sıralanabilir: Her hastalık 1)merkezi sinir sisteminin farklı bölgelerini etkiler, 2) klinik semptomları farklıdır, 3) ailesel tiplerinin oluşmasından farklı genler sorumludur. Bu hastalıkların idiopatik tiplerinin başlangıcı, klinik semptomların görülmeye başladığı an olarak kabul edilir. Fakat klinik semptomlar görülene kadar geçen sürede bu semptomlara sebep olan hücresel değişiklikler bilinmediğinden, hastalıkları tetikleyen ilk faktörleri veya olayları belirlemek neredeyse imkansızdır (41).

Nörodejeneratif hastalıkların ortaya çıkışını tetikleyen faktörler veya süreçler birbirinden farklı olsa da, bu hastalıkları tetikleyen ortak patolojik mekanizmalar aşağıdaki gibi sıralanabilir (39, 41):

1. Proteinlerin yanlış katlanmasına bağlı olarak ortaya çıkan anormal protein işlevleri, proteinlerin yıkılmasında kusurlar ve protein birikimi.
2. Oksidatif strese bağlı olarak serbest radikallerin ve reaktif oksijen ara ürünlerinin (ROS) oluşumu.
3. Biyoenerjetik zayıflık ve mitokondrilerde fonksiyon bozukluğu.

4. Nöronlarda Golgi'nin parçalar halinde dağılması.
5. Hücresel ve aksonal transportun bozulması.
6. Moleküler şaperonlarda mutasyonların ve fonksiyon bozukluklarının ortaya çıkması
7. Nörotrofinlerde fonksiyon bozukluğu
8. Nöroinflamasyon / nöroimmün işlemlerin başlaması

Tüm bu mekanizmalar nöronu ölüme götürmekle birlikte bu olayların hangi sırayla meydana geldiği halen bilinmemektedir (39).

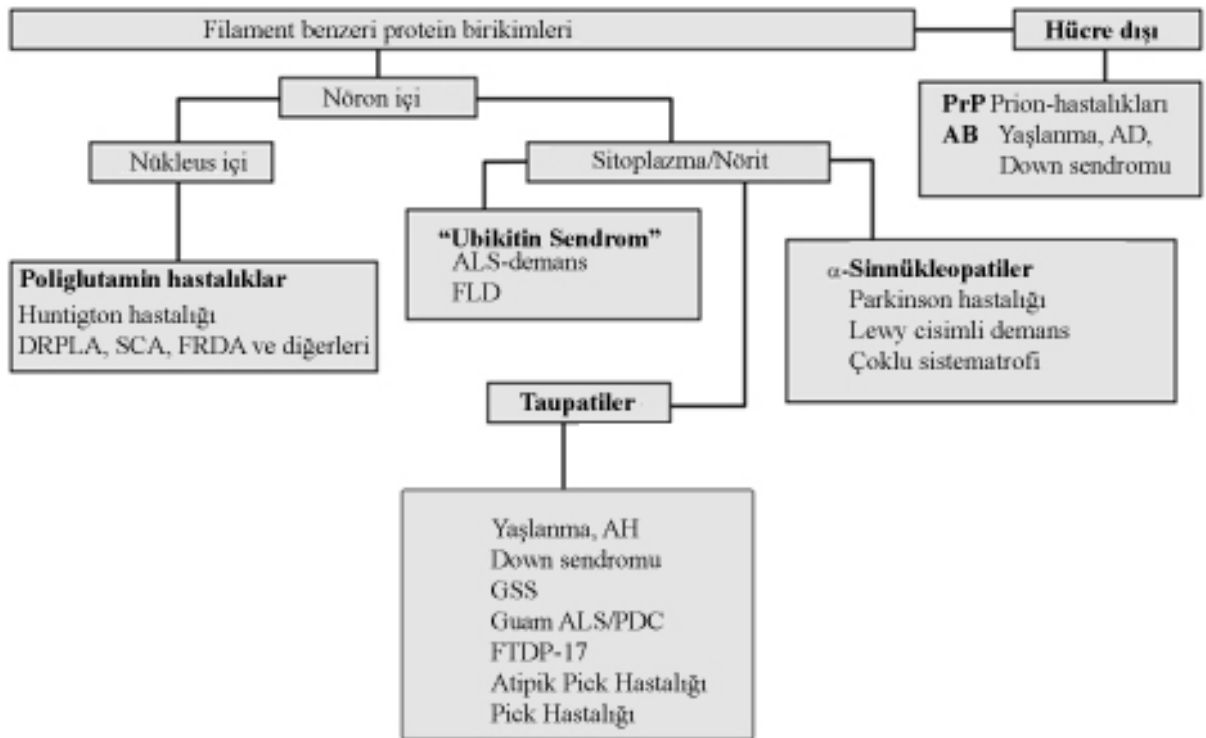
Yapılan çalışmalar Alzheimer Hastalığı, Parkinson Hastalığı, ve amiyotrofik lateral skleroz arasında ortak patolojik mekanizmalar sonucu ortaya çıkan en az 16 benzerliğin olduğunu göstermiştir. Bu benzerlikler şöyle sıralanabilir (41):

- Yavaş ilerleme.
- Sinir sisteminin çeşitli kısımlarındaki belirli nöronların yavaş yavaş fonksiyonlarını kaybederek ölmesi.
- Etkilenen nöronların biyokimyasal reaksiyonlarındaki bozuklukların çözünmeyen protein birikimlerinin oluşumuna ve hücresel proteinlerin oksidasyonu ve nitrasyonuna sebep olması.
- En erken gözlenen anomalilerden birinin, etkilenen nöronlardaki hasarlı mitokondriler oluşu.
- Elektron transport zincirinde bozuklukların ortaya çıkışı. (PH'de Kompleks I, AH'de Kompleks III ve IV, ALS'de Kompleks IV'de fonksiyon bozuklukları).
- Etkilenen nöronların sitoplazmalarında mitokondriden salınan sitokrom c bulunması.
- Etkilenen nöronların çevresinde mikrogliaların aktive olması.
- Etkilenen MSS alanında güçlü bir astrogliosis bulunması.
- Etkilenen nöronlarda lipid peroksidasyonu gözlenmesi.
- Etkilenen nöronlarda hidrojen peroksid ve süperoksid olmak üzere iki tip ROS bulunması.
- Etkilenen nöronların glutatyon seviyelerinin düşmesi.

- Patofizyolojileri ile yakından ilişkili olan bakır metabolizmasında dengesizliklerin ortaya çıkması.
- Ubikutin karboksil-terminal hidrolaz-L1 enziminin inaktive olması.
- Etkilenen nöronlarda peroksidazların uyarılması veya oluşturulması. (En önemlilerinden biri olan siklooksigenaz-2 (COX-2) nöronal proteinlerin oksidatif hasarında ve birikiminde rol oynar).
- Nörodejenerasyonun ilerlemesinde Bax ve Bcl-2 proteinlerinin rol alması.
- Etkilenen nöronlarda kaspazların aktivasyonuna bağlı olarak apoptoz görülmesi.

2.2.2.1. Nörodejeneratif hastalıklarda protein birikimi

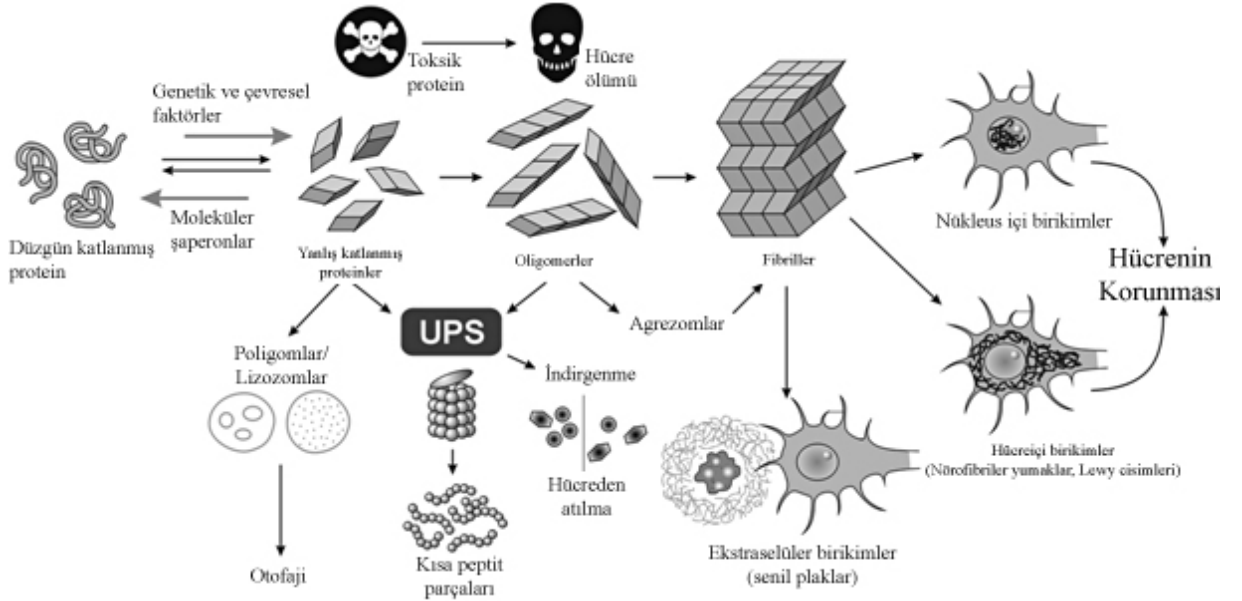
Bir çok nörodejeneratif hastalığın patolojik işareti olarak kabul edilen yanlış katlanmış proteinler, hücrenin diğer proteinleri arasında anormal etkileşimlere neden olarak, hücre içi ve dışında fibriller yapılar oluştururlar (Şekil 2-4) (39). Çalışmalar bu birikimlerin sadece söz konusu hastalıkların nöropatolojik teşhisi için bir işaret olmalarının ötesinde, nörodejenerasyonun moleküler mekanizmasında birincil rol oynadıklarını göstermektedir.



Şekil 2-4: Farklı nörodejeneratif hastalıklarda görülen protein birikimleri (39).

DRPLA, Dentatorubral-Pallidoluysian atrofi; **FLD**, frontal lob demansı; **SCA**, Spinocerebellar ataxia; **FRDA**, Friedreich ataxia; **GSS**, Gerstmann-Sträussler-Scheinker sendrom; **FTDP-17**, Frontotemporal demans ve kromozom 17 ilişkili parkinsonizm; **Guam ALS/PDC**, Guam amiyotrofik lateral skleroz / parkinsonizm-demans kompleksi.

Protein birikimlerini tetikleyen temel etkenler genetik faktörler, yaşla ilişkili endojen faktörler ve çevresel faktörler olarak sınıflandırılabilir (Şekil 2-5). Bu birikimler, poliubikutinlenmiş proteinlerden oluşur. Protein çökmesi, proteinlerin yıkılmasını sağlayan Ubikutin-proteozom sisteminin (UPS) fonksiyonunu yapmaması sonucu ortaya çıkar. Bir çok nörodejeneratif hastalıklığın belirtici olan inklüzyon cisimciklerinde proteozom altbirimlerinin bulunduğu gösterilmiştir (45).



Şekil 2-5: Hücre içi ve hücreler arası alanda protein birikimlerinin oluşumu (39).

UPS, Ubikutin proteozom sistemi

Örneğin, beta Amiloid peptidinden ($A\beta$) oluşan hücre dışı nöritik (senil) plaklar ve mikrotubul ilişkili bir protein olan tau'dan oluşan nörofibril yumaklar (NFT) Alzheimer Hastalığının en önemli işaretleridir. Parkinson hastalığında ve Lewy cisimleri ile birlikte görülen demans'da (DLB) alfa sinüklein (α -syn) filamentleri birikir ve nöron somalarında ve Lewy nöritlerinde Lewy cisimlerini oluştururlar. Bu birikimlerin beyindeki dağılımı hastalığın ilerlemesi ve nöron kaybının artışı ile birebir ilişkilidir. Bu proteinlerin nörodejenerasyondaki rollerini destekleyen en önemli bulgular, onları kodlayan genlerdeki mutasyonların nörodejeneratif hastalıkların ailesel tiplerine sebep olduğunun bulunmasıdır (42).

Örneğin, ailesel PH, 3 adet alfa-syn lokusu bulunan bireylerde ortaya çıkar. Down sendromlu hastalarda ise 21. kromozom üzerindeki amiloid öncül proteini (APP) lokusunun fazladan bir kopyası vardır ve erken yaşlarda $A\beta$ birikimleri saptanır.

Hastalıklarla ilişkili genlerin promotörlerindeki polimorfizmler de bu proteinlerin transkripsiyonunu ve nörodejeneratif hastalıkların ortaya çıkma riskini artırır. Proteinlerin birincil yapısını etkileyen mutasyonlar, proteinlerin birikim oluşturma eğilimini arttırabilir (42, 43, 45, 46).

Proteinlerin kovalent modifikasyonları da protein birikimlerinin oluşumunu iletir. Sporadik nörodejeneratif hastalıklarda genellikle proteinlerin oksidatif modifikasyonları artar. Örneğin dopamin aracılığı ile alfa-sinükleinin oksidatif modifikasyonu çökelti oluşumunu artırır. Ayrıca yaşlanma ile birlikte hücrelerin yanlış katlanan proteinleri ortadan kaldırma kabiliyetleri düşer (43, 45).

2.2.2.2. Alzheimer Hastalığı'nın genel özellikleri

Alzheimer Hastalığı nörodejeneratif hastalıkların en sık rastlanan şeklidir. 2006 yılında dünyada yaklaşık 26.6 milyon kişinin bu hastalığa yakalandığı bilinmektedir [10]. AH ilerleyen hafıza kaybı, insan ve objeleri tanıma kaybı, zihinsel ve sosyal yeteneklerin kişinin günlük yaşam faaliyetlerini etkileyecek derecede bozulması ile tanımlanan ve genellikle geç başlangıçlı olan bir hastalıktır. Ön beynin bazalinde ve hippocampusta görülen nöron dejenerasyonu kadar sinaptik patoloji ve nöron iletişim sistemindeki bozukluklar da hastalığın patogenezinde oldukça önemlidir. AH iki farklı protein birikimi ile birlikte görülür: nöritik (senil) plaklar ve nörofibriller yumaklar. Nöritik plaklar hücre dışı birikimlerdir ve esas bileşeni amiloid öncül proteininin (APP) proteolitik olarak işlenmesi sonucu ortaya çıkan amiloid beta ($A\beta$) peptididir. Mikrotubul ilişkili bir protein olan tau tarafından oluşturulan nörofibriller yumaklar ise hücre içi birikimlerdir (42, 43, 46, 47).

AH'nın ailesel tipleri özellikle APP geni, Presenilin-1 (PS-1) geni ve Presenilin-2 (PS-2) genindeki otozomal dominant mutasyonlar sonucu ortaya çıkar (42, 43, 46).

2.2.2.3. Parkinson Hastalığı'nın genel özellikleri

PH en sık rastlanılan nörodejeneratif hastalıklardan biridir. 65 yaş ve üstündeki bireylerin %1-2'sini etkiler. Klinik olarak bradikinezi, rijidite ve tremor ile birlikte görülen bir hareket bozukluğudur. PH substantia nigra pars compacta'daki dopaminerjik nöronların kaybı ve striatal dopamin seviyelerinin belirgin düşüşü ile tanımlanır. PH'nın gelişiminde hem sporadik hem de genetik faktörler önemli rol oynar. Çevresel sebepler genellikle toksinler veya serbest radikallerle ilişkilidir. Bu ajanların emilimi, lipid

peroksidasyonu, oksidatif DNA hasarı ve mitokondrial fonksiyon bozukluğu gibi bir dizi olayı tetikler. Ailesel PH için ortaya çıkarılan genler tüm PH'lerin %10'unu kapsamaktadır. Genel olarak ailesel PH'nin otozomal dominant ve otozomal ressesif olmak üzere iki tipinden söz edilir (42, 43, 46).

Otozomal dominant ailesel PH, Lewy cisimciği olarak isimlendirilen ve sporadik PH hastalarının beyinlerinde de bulunan hücre içi birikimler ile kendini gösterir. Lewy cisimcikleri, proteinlerin anormal çökmesiyle ortaya çıkan sitoplazmik inklüzyonlardır ve ubikutin (Ub) için pozitif boyama gösterirler. Ub, proteinlerin ubikutinlenmesi ve yıkılmasında rol oynayan, yüksek oranda korunmuş 76aa'lık bir peptiddir (45).

Otozomal ressesif juvenil parkinsonizm (AR-JP), genelde 20'li yaşların sonunda ve 40 yaşından önce başlamasıyla karakterize edilir. Bu hastalar, substantia nigradaki dopaminerjik nöronların özel altpopulasyonlarının dejenerasyonu ile tanımlanır. Aynı nöronların idiopatik PH'da da kaybı söz konusudur. AR-JP'nin klinik özellikleri idiopatik PH'dan ayırtedilemez (45).

2.2.2.4. Huntington Hastalığı'nın genel özellikleri

Huntington hastalığı, huntington proteininin N ucundaki poliglutamini kodlayan CAG tekrarlarının artışı ile tanımlanan nörodejeneratif bir hastalıktır. HH bir gendeki tek bir mutasyon ile ortaya çıktığından nörodejeneratif hastalıkların patogenezi araştırmak için uygun bir çalışma modeli sağlar. Bu hastalığın oluşumunda poliglutamin uzunluğuna bağlı bir eşik değeri vardır: ≥ 36 hastalık oluşur, ≤ 35 hastalık oluşmaz. Uzun tekrarlar hastalığın erken yaşlarda başlamasına sebep olur. İn vitro çalışmalarda proteinlerin çökme eşiği ile hastalığın başlangıç eşiği arasında oldukça sıkı bir ilişki gösterilmiştir ve çökme hastalığın patogenezi ile birebir ilişkilidir. Huntingtini içeren inklüzyonlar dejenere olan beyin bölgelerinde bulunur. Buna rağmen inklüzyonları içeren nöronlarla dejenere olanlar farklı nöronlardır. Fakat CAG tekrarlarının uzunluğu ile inklüzyon yoğunluğu arasında doğrusal bir ilişki vardır (42, 43, 46).

Huntingtin birikimleri yanlış katlanan huntingtin proteininin N ucuna veya ubikutine bağlanan antikorlarla işaretlenebilir. Birikimler fibriller yapılar, CREB bağlayan protein, poliglutamin ve amiloidin karakteristiği olan β -yaprak yapısı içerirler. Bu birikimlerdeki amiloid varlığı ise tartışmalıdır (43).

2.2.2.5. Amiyotrofik Lateral Skleroz'un genel özellikleri

Amiyotrofik Lateral Skleroz, omurilik lateral boynuzundaki ve serebral korteksdeki motor nöronların dejenerasyonu sonucunda motor zayıflığa sebep olan ölümcül bir hastalıktır. Ender rastlanan erken başlangıçlı ailesel tipi süperoksit dismutaz-1 (SOD1) genindeki mutasyonlar sonucunda oluşur. Hastalığın patolojisi SOD1 enzim aktivitesindeki değişikliklerle ilişkili gözükmez. Mutant SOD1 genini yüksek oranda ifade eden transgenik farelerdeki motor nöronların sitoplazmasında SOD1 protein çökeltileri içeren inklüzyonlar saptanmıştır (42, 43, 46).

2.2.2.6. Prion Hastalığı'nın genel özellikleri

Prionlar tarafından oluşturulan nörodejeneratif hastalıklar sporadik, çevresel veya genetik mutasyonlara bağlı olarak ortaya çıkabilir. Çevresel etkenler arasında enfekte olmuş beyin dokusundan kökenlenen prion partiküllerinin yenmesi veya enfekte aletlerin kullanıldığı cerrahi bir müdahale geçirmek sayılabilir. Bu hastalık ayrıca prion proteininde değişikliklere sebep olan prion genindeki bir nokta mutasyonu ile de ortaya çıkabilir. AH'dekine benzer amiloid plaklar içerir ve bu plaklar prion antikorları ile işaretlenir. Prion hastalığı üzerine yapılan çalışmalar sonucunda bu hastalığın enfekte edici viral ajanların aksine anormal katlanmış protein yapısı sonucu ortaya çıktığı gösterilmiştir. Prion birikimleri hem hücrelerarası hem de hücre içi alanlarda saptanmıştır (42, 43, 46).

2.3. Sinir Dokusunun Hücresel Bileşenleri

Sinir dokusu 2 hücre tipi içerir: uzantılara sahip sinir hücreleri olan nöronlar ve nöronları koruyup destekleyen glia hücreleri (nöroglialar)(48, 49).

2.3.1. Nöronlar

Nöron ileri derecede özelleşmiş bir hücre tipidir ve sinir sisteminin en önemli elemanıdır. Tüm nörolojik süreçler, tek bir nöron dan, birbiri ile ilişkili nöron grupları arasındaki karmaşık hücre-hücre bağlantılarına kadar uzanan bir nöronal ağa bağlıdır ve bu ağ beyin fonksiyonu için temel oluşturur. Büyük ağ (macro circuits) bir beyin bölgesinden diğerine uzanan nöron topluluklarını içerirken; küçük ağ (micro circuits) bir beyin bölgesi içindeki hücre-hücre ilişkilerini içerir. Büyük ve küçük ağın detaylı analizi sağlıklı ve hasta beyindeki kortikal fonksiyonların nöral temellerini anlamak için önemlidir.

Nöronların morfolojik özellikleri

Nöron, nöron membranı ile çevrili, içerisinde organeller ve sitoiskelet elemanlarını taşıyan farklı fonksiyonel bölgelere sahip olan bir hücredir (Şekil 2) (48, 50, 51).

Nöronlar yüksek oranda kutuplaşmış hücrelerdir ve farklı fonksiyonları olan hücresel bölgelere sahiptirler (Şekil 2). Bir nöronda morfolojik olarak farklılaşmış 3 ana bölge bulunur: **1-Hücre gövdesi veya perikaryon:** nöronun çekirdeği ve çekirdek çevresindeki sitoplazmasıdır, **2-Dendritler:** diğer nöronlardan uyarıları almak için özelleşmiş uzantılardır, **3-Akson:** tek bir uzantıdır, sinir impulsunu diğer nöronlara, kas ve bez hücrelerine iletmek üzere özelleşmiştir (48).

1-Hücre gövdesi (soma veya perikaryon): İçerisinde çekirdek (nukleus), GER, DER, Golgi ve mitokondriyi taşır .

Nöron membranı: Nöron membranı ~5nm kalınlığındadır ve bol miktarda protein taşır. Nöronların en önemli özelliklerinden biri soma, dendrit ve aksonların üzerindeki membranların farklılık göstermesidir. Bir nöronun fonksiyonu nöron membranının ve onunla ilişkili proteinlerin yapısı ve fonksiyonu anlaşılmadan çözülemez. Nöron membranı, elektrik sinyallerinin beyin ve vücut arasında iletilmesini sağlar.

Çekirdek (nukleus): Çoğu nöron büyük, yuvarlak ve açık renk boyanan ökromatik bir çekirdek ve belirgin çekirdekçik (nukleolus) içerir.

Nöron organelleri: Nöronlar çok miktarda düz yüzlü endoplazmik retikulum (DER) ve granüllü endoplazmik retikulum (GER), Golgi ve mitokondri içerirler (Şekil 2).

Sitoiskelet: Sitoiskelet, nörona karakteristik yapısını verir. Sitoiskeleti oluşturan elemanlar mikrotubuller, mikrofilamentler ve nörofilamentlerdir.

Mikrotubuller 20 nm çapındadırlar ve nöritler boyunca uzanırlar. Mikrotubul oluşumu ve fonksiyonuna katılan protein ailelerinden biri mikrotubul ilişkili proteinlerdir (MAP). MAP'lar diğer fonksiyonlarının yanı sıra mikrotubulleri birbirine bağlar. MAP ailesinden olan tau'daki patolojik değişiklikler Alzheimer hastalığının en önemli bileşenlerinden biridir.

Mikrofilamentler 5 nm çapındadır. Nöronlarda mikrofilamentler mikrotubuller gibi nörinler boyunca uzanır, ayrıca membran ile sıkı ilişkilidirler.

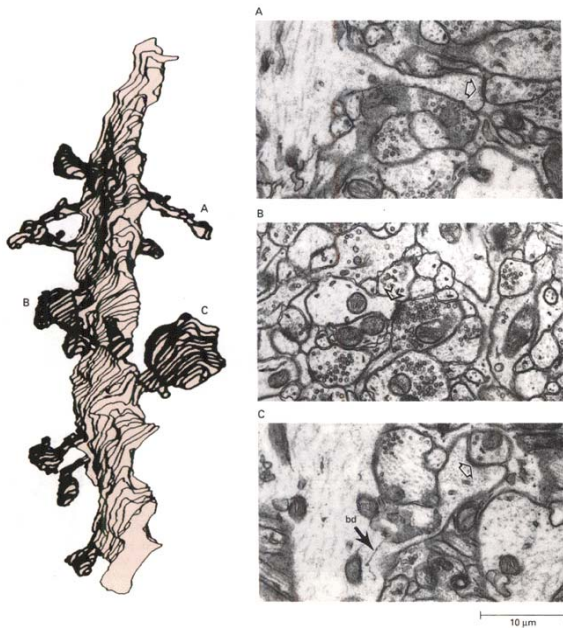
Nörofilamentler 10 nm çapındadırlar. Araflament ailesinin üyesidirler (48, 50, 51).

2-Dendritler: Hücre gövdesinden çıkıp gri maddenin (gri cevher) içine doğru dallanırlar. Nöron tipine göre şekil ve sayıları değişiktir.

Dendrit kelimesi Yunanca'da ağaç anlamına gelir. Somadan çıkan dendritler aynı bir ağacın dalları gibi uzanır. Tek bir nöronun dendritleri “**dendritik ağaç**” olarak; bu ağacın her bir dalı ise “**dendritik dal**” olarak isimlendirilir. Çok değişik şekil ve boyutta olan dendritik ağaçlar, farklı nöron gruplarının sınıflandırılmasında kullanılır.

Dendrit, bir nöronun anteni gibi fonksiyon gösterdiğinden binlerce sinaps ile çevrelenmiştir. Sinapsların altındaki postsinaptik dendritik membran sinaptik yarıktaki nörotransmitterleri tanıyan özelleşmiş reseptörler taşır.

Bazı nöronların dendritleri, **dendritik diken** denilen özel yapılar ile kaplıdır (Şekil 2-6 ve 2-7). Bu dikenler dendrite asılmış küçük torbalar gibi görünür. Bu dikensi yapılar sinaptik aktivitenin tipine ve miktarına duyarlıdır. Dikenlerdeki alışılmadık değişikliklerin kognitif bozukluğu olan bireylerin beyinlerinde ortaya çıktığı gösterilmiştir.



Şekil 2-6: Dendritik dikenler (51).

Dendritlerin sitoplazması büyük oranda aksonlarınkine benzer, sitoiskelet elemanları ve mitokondri ile doludur. İlginç bir farklılık poliribozomların dendritlerde bulunmasına rağmen aksonlarda bulunmamasıdır. Bu şekilde bazı nöronlarda sinaptik iletinin lokal protein sentezi ile yönlendirilebileceği savunulmuştur (48, 51, 52).

3-Akson: Akson nöronlara özgü ve sinir uyarılarını iletmek için farklılaşmış bir yapıdır. Aksonun somadan çıktığı bölge akson konisi olarak isimlendirilir. İki önemli özellik aksonu somadan ayırır: 1-Aksonun içerisinde GER bulunmaz, 2-Akson membranının yapısı somanınkinden oldukça farklıdır.

Bu yapısal farklılıklar fonksiyonel farklılıkları da ortaya koyar. Aksonda ribozom olmadığından protein sentezi de yoktur. Bu da aksonun somadan oluştuğu anlamına gelir. Akson membranında bulunan proteinlerdeki farklılıklar, aksonun “telgraf teli” gibi iş görerek çok uzak mesafelere kadar bilgi iletmelerini sağlar.

Aksonlar 1mm’den daha kısa mesafelerden 1 m’nin üzerindeki mesafelere kadar uzanabilirler. Aksonlar genellikle dallanırlar ve bu dallanmalara *akson kollateralleri* denir. Bazen akson kollateralleri iletişim sağlamak üzere çıktığı hücreye geri döner veya komşu hücrelerin dendritleri ile ilişki kurar. Bu tip akson dallarına “*recurrent kollateralleri*” denir (Şekil 2-7).

Akson çapı değişkenlik gösterir. İnsanda 1 μm -25 μm ’ye kadar değişik çaplarda olabilir. Akson boyutundaki bu farklılıklar önemlidir. Akson boyunca iletilen elektriksel sinyalin hızı aksonun çapına bağlıdır. En kalın aksonlar uyarı iletimini en hızlı gerçekleştirdiği aksonlardır (48, 51).

Akson sonlanması (akson terminali)

Tüm aksonların bir başlangıcı (akson tepesi veya konisi), orta parçası (esas akson) ve sonlanma bölgesi vardır. Aksonun sonu, akson sonlanması (terminal) veya terminal düğme olarak isimlendirilir. Uç kısım aksonun başka bir nöron veya hedef hücre ile bağlantı kurduğu ve bilgiyi ilettiği bölgedir. Bu bağlantı noktasına Yunanca’da “birbirine bağlanmak” anlamına gelen “*sinaps*” adı verilir (Şekil 2).

Bazı aksonların tam uç bölgelerinde bir çok dallanma vardır ve her dal aynı bölgedeki dendritler veya hücre gövdeleri için sinaps görevi yapar. Bu dallara “*terminal ağaç*” denir. Bazı aksonlar ise uzunlukları boyunca bulunan şişmiş bölgelerde sinaps oluşturur, fakat akson bu sinaps bölgelerinde sonlanmaz, devam ederek başka bir yerde

sonlanır. Bu şişkinlikler “*geçiş noktaları*” olarak isimlendirilir. Bir nöron başka bir hücre ile sinaps yaptığında, o hücreyi sinir sistemine bağlamış veya inerve etmiş olarak tanımlanır (48, 51).

Akson sonlanmasının sitoplazması aksondan farklıdır:

1-Mikrotubuller akson sonlanmasında bulunmaz.

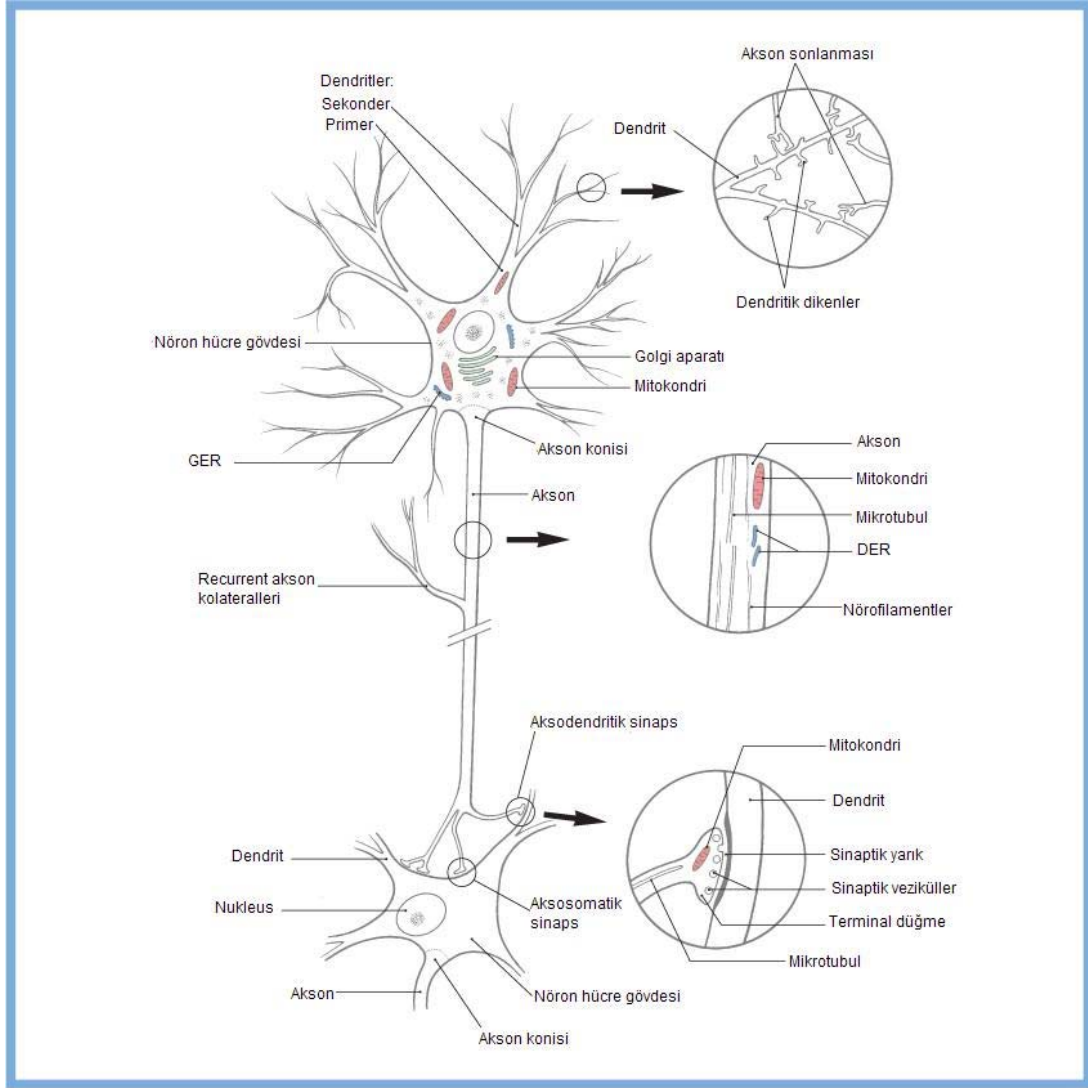
2-Akson sonlanması, ~ 50 nm çapında olan sinaptik veziküller içerir.

3-Sinapsı oluşturan membranın iç yüzü farklı yoğunlukta proteinlerle kaplıdır.

4-Çok sayıda mitokondri içerir.

Sinaps

Sinapslar sinir impulsunun iletiminden sorumlu yapılardır. Aksonun dendritlerle, perikaryonla veya nadiren başka bir nöronun aksonuyla bağlantı yerleridir. Dendrodendritik sinapslar da vardır. Sinaps presinaptik bölge, sinaptik yarık ve postsinaptik bölgeden oluşur. Presinaptik alan genellikle bir akson sonlanmasıdır, postsinaptik alan ise bir dendrit veya başka bir nöronun hücre gövdesidir. Pre- ve postsinaptik membranlar arası alan *sinaptik yarık* olarak isimlendirilir (Şekil 2-7). Bilginin bir nörondan başka bir nörona sinaps aracılığı ile aktarımına sinaptik ileti denir. Bir çok sinapta bilgi, aksonun ucuna kadar elektriksel uyarı olarak iletilir, akson ucunda kimyasal sinyale dönüşür ve sinaptik yarığa kimyasal sinyal olarak salınır. Postsinaptik membranda bu kimyasal sinyal tekrar elektriksel sinyale dönüştürülür. Kimyasal sinyaller nörotransmitter olarak adlandırılır ve akson ucunda bulunan sinaptik veziküllerde saklanır. Farklı nöron tipleri farklı nörotransmitterler kullanırlar. Bilginin elektrik-kimyasal-elektrik çevrimi beynin bir çok olasılığı hesaplama yeteneğinin olduğunu gösterir. Bu süreçlerdeki değişiklikler hafızayı, öğrenmeyi ve sinaptik iletiyi kapsayan bir çok mental bozukluğa sebep olabilir. Sinapslar sinir gazı ve bir çok psikoaktif ilacın etki ettiği noktalar (48, 51).



Şekil 2-7: Nöronun genel yapısı (49).

Aksoplazmik transport

Akson ve akson sonlanmasının sitoplazması ribozom içermemektedir. Ribozomların aksonlarda bulunmaması aksondaki proteinlerin nöronun somasında üretilip, aksone gönderildiğini gösterir. 19.yy'ın ortalarında İngiliz fizyolog *Augustus Waller*, ait olduğu nörondan ayrılan aksonların işlevini kaybettiğini göstermiştir. Bu yüzden kesilen aksonlardaki dejenerasyon "*Wallerian dejenerasyonu*" olarak isimlendirilir.

Wallerian dejenerasyonu, somadan akson sonlanmasına doğru olan normal madde akışı engellendiğinde oluşur. Maddelerin aksonun ucuna doğru olan bu

hareketine “*aksoplazmik transport*” denir. İlk kez 1940’da Amerikalı nörobiyolog *Paul Weiss ve arkadaşları* tarafından gösterilmiştir. Ancak eğer tüm maddeler akson boyunca aksoplazmik transport mekanizması ile taşınıyorsa, maddeler en uzun aksonun ucuna ulaşana kadar en az yarım yıl geçerdi. 1960’ların sonunda nöronun somasına enjekte edilen radyoaktif işaretli amino asitler yardımıyla akson boyunca transport oranı hesaplanabildi. Bu metod yardımı ile Rockefeller Üniversitesi’nden Bernice Grafstein “hızlı aksoplazmik transport”u keşfetmiştir.

Günümüzde aksoplazmik transport hakkında pek çok şey bilinmektedir. Veziküller içinde paketlenen maddeler aksonun mikrotubulleri boyunca akson ucuna doğru hareket ederler. Bu hareket kinezin denilen motor proteinler tarafından sağlanır ve ATP bağımlıdır. Kinezin, maddeleri sadece somadan akson ucuna doğru taşır. Bu yönde madde taşınımına “anterograde transport” denilir.

Başka bir taşınma mekanizması ise maddeleri akson ucundan somaya taşır. Bu mekanizmanın, akson ucundaki metabolik ihtiyaçların somaya iletilmesinde rol oynadığı düşünülür. Akson ucundan somaya doğru olan bu harekete “retrograde transport” denir. Mekanizması anterograde transporta benzer, fakat bu hareketi sağlayan motor protein “dynein”dir (48, 51).

Nöronlar fonksiyonlarına göre 5 gruba ayrılır:

- 1-Lokal bağlantıları yapan inhibitör nöronlar: serebral ve serebellar kortekste GABAerjik ara nöronlar.
- 2-Uzak bağlantıları yapan inhibitör nöronlar: bazal gangliyonun ortaboy dikensi (medium spiny) nöronları ve serebellar korteksin Purkinje hücreleri.
- 3- Lokal bağlantıları yapan uyarıcı nöronlar: serebral korteksin dikensi yıldız (spiny stellate) hücreleri.
- 4- Uzak bağlantıları yapan uyarıcı nöronlar: serebral korteksin primidal nöronlar.
- 5-Geniş mesafelerde nörotransmisyonu sağlayan nöromodulator nöronlar (48).

Nöronların morfolojilerine göre sınıflandırılması

Nörit sayısına göre

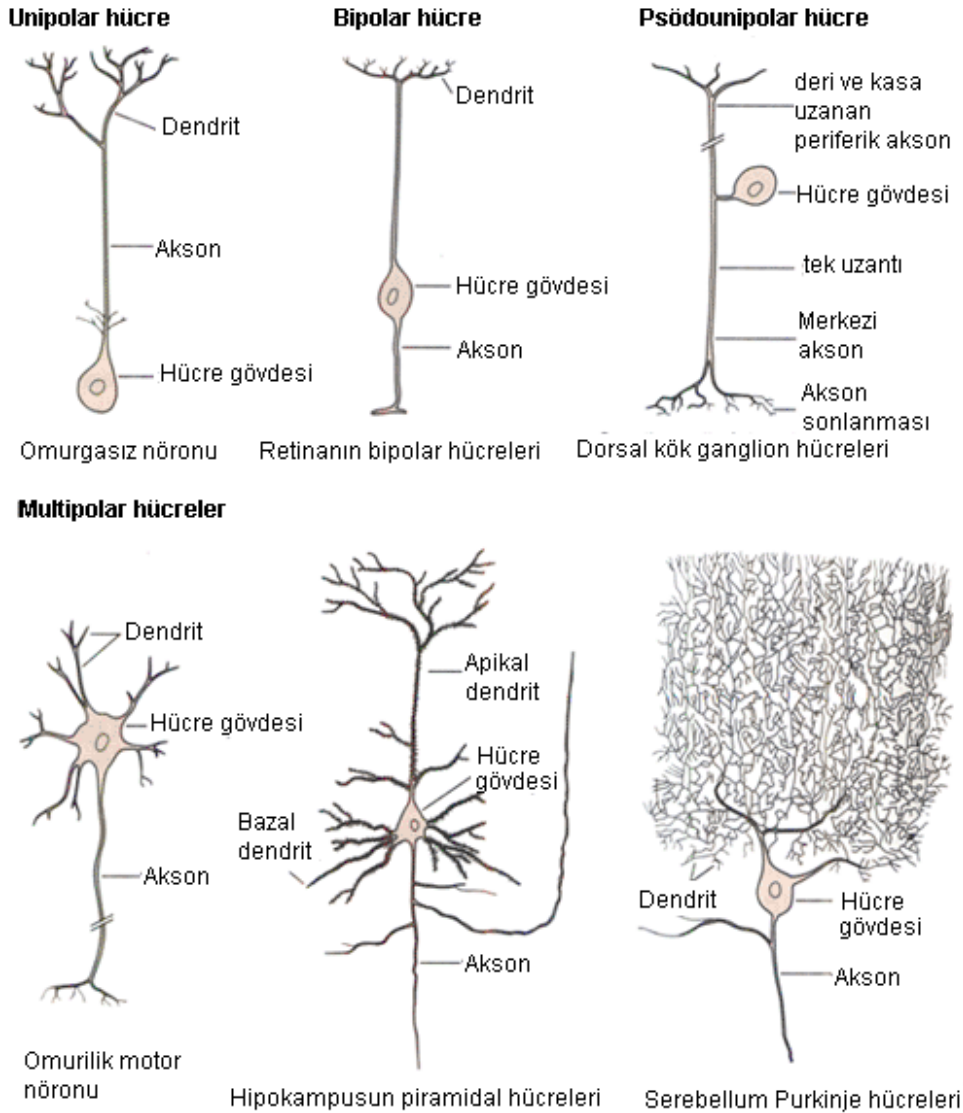
Nöronlar somadan çıkan nöritlerinin (akson ve dendritler) sayısına göre sınıflandırılabilirler (Şekil 2-8) (48, 50, 51).

1-Unipolar: Tek bir nörite sahip nöronlar.

2-Psödounipolar: Uzantı perikaryondan çıktıktan kısa bir mesafe sonra T şeklinde dallanır.

2-Bipolar: Bir akson ve bir dendrite sahip nöronlar.

3-Multipolar: Bir akson ve birden fazla dendrite sahip nöronlar.



Şekil 2-8: Nöronların morfolojilerine göre sınıflandırılması (51).

Dendritlerine göre

Dendritik ağaçlar nöronlar arasında oldukça farklılık gösterir. Sınıflandırma genelde beynin belli bir bölgesine özeldir. Örneğin serebral korteksde iki sınıf hücre vardır: piramidal hücreler ve yıldızlı hücreler.

Nöronlar dendritlerinde diken taşıyıp taşımadıklarına göre de sınıflandırılmaktadır. Diken taşıyan dendritlere sahip nöronlara dikensi, taşımayanlara ise dikensi olmayan nöronlar denir. Örneğin, serebral kortekste tüm piramidal hücreler dikensi iken yıldızlı hücreler dikensi ve dikensi olmayan nöronlardır (48).

Bağlantı kurdukları hücrelere göre

Deri veya retina gibi duyu organlarından uyarıyı alarak sinir sistemine ulaştıran nöritlere sahip nöronlara “primer duyu nöronları” denir. Kaslar ile sinaps yapan ve hareketi kontrol eden aksonlara sahip nöronlara “motor nöron” denir. Fakat sinir sistemi içindeki çoğu nöron sadece başka bir nöron ile bağlantı kurar. Bu nöronlara da “ara nöron-interneuron” denir (48).

Akson uzunluğuna göre

Bazı nöronların beynin bir bölgesinden diğerine uzanan, uzun aksonları vardır. Bu tip nöronlara “Golgi Tip I nöronları” veya projeksiyon nöronları denir. Hücre gövdesinin çevresinde sonlanan kısa aksonlara sahip nöronlara “Golgi Tip II nöronlar” veya lokal ağ (circuit) nöronları denir. Örneğin, serebral kortekste piramidal hücrelerin aksonları beynin başka bir bölümüne kadar uzanan Golgi tip I nöronlarıdır. Bunun yanında yıldızlı hücrelerin aksonları serebral korteksin dışına çıkmayan Golgi tip II nöronlardır (48).

Nörotransmittere göre

Daha önce sadece morfolojilerine göre sınıflandırılan nöronlar, yeni metodların gelişmesiyle, salgıladıkları nörotransmitterlere göre de sınıflandırılmaya başlandılar. Örneğin, hareketi kontrol eden motor nöronlar sinapslarından asetilkolin salgırlar. Bu hücreler salgıladıkları nörotransmittere göre kolinerjik olarak sınıflandırılırlar .

2.3.2. Nöroglia

MSS'deki tek hücre tipi nöron değildir. Nöronlar nöron olmayan çeşitli hücreler tarafından desteklenirler. Nöron olmayan hücreler, makroglia (astrositler ve oligodendrositler), mikroglia, ependium hücreleri olarak sınıflandırılabilir.

Bazı nöro bilimciler gliaları nöro bilimin “uyuyan devleri” olarak görürler ve bir gün gliaların, bilginin işlenmesinde çok büyük rollerinin olduğunu keşfedileceğine inanırlar. Fakat şu anki bilgilerimiz ışığında, glialar nöron fonksiyonunu destekleyen hücrelerdir ve beynin düzgün bir şekilde çalışmasını sağlarlar (48, 51).

Makroglia

En çok bulunan destek hücrelerdir . Astrosit ve oligodendroglia olmak üzer iki sınıfa ayrılırlar.

Astrositler, çok sayıda uzun uzantıları olan, yıldıza benzer, büyük nöroglia hücreleridir. Nöronlar arasında bulunurlar ve genellikle sinaptik komplekslerin etrafında bireysel kompartımanlar oluştururlar. Astrositler nöronların enerji üretimine destek olan metabolitleri sağlarlar.

Astrositlerin en önemli rollerinden biri, bulunduğu ekstraselüler alanın kimyasal içeriğini düzenlemektir. Örneğin astrositler, beyindeki sinaptik bağlantıları bir zarf gibi sararak, salınan nörotransmitterlerin, salındıkları alandan uzaklaşmasını, yayılmasını engellerler. Astrositler, membranlarında sinaptik alana salınan nörotransmitterleri ortadan kaldıran özel proteinler taşırlar. Son çalışmalarda astrositlerin membranlarında aynı nöronlar gibi nörotransmitter reseptörleri taşıdıkları ve uyarıldıklarında glial hücrelerde elektriksel ve biyokimyasal olayları tetikledikleri gösterilmiştir. Nörotransmitter düzenlenmesinin yanısıra astrositler ekstraselüler alandaki çeşitli maddelerin seviyelerinin sıkı bir şekilde kontrolünü yapar. Örneğin ekstraselüler alandaki potasyum iyonu konsantrasyonunu astrositler düzenler.

Oligodendroglialar (oligodendrositler) astrositlerden daha küçük ve uzantıları daha az sayıda ve kısa olan nöroglia hücreleridir. Makrogliaların ikinci önemli sınıfı olan bu hücreler *myelin* üretirler. *Myelin kılıfı*, kesintisiz akson membranları üzerinde çok katlı tabakalar oluşturup, membranları uzun aksonlar boyunca bioelektrik olarak aktif segmentlere böler ve aksiyon potansiyelinin arttırılmasını sağlar. Kılıfın bulunmadığı boşluklara “ranvier boğumu” denir. Myelin uyarının akson boyunca hızlı

bir şekilde iletilmesini sağlar. Oligodendroglia sadece MSS’de bulunur, PSS’de onun görevini Schwann hücreleri gerçekleştirir. Bir oligodendroglia hücresi bir çok aksonu myelinlerken, her Schwann hücresi sadece bir tek aksonu myelinler (48, 50, 51).

Mikroglialar

Küçük, yoğun ve uzamış şekilli hücrelerdir. Makrofaj/monosit serisinden hücreler ile ilişkili olduğu düşünülür (48, 50, 51).

2.4. Sinir Sistemi

Sinir sistemi anatomik olarak beyin ve omurilikten oluşan merkezi sinir sistemi (MSS) ve sinir lifleri ile sinir gangliyonlarından oluşan periferik sinir sistemi (PSS) olarak ikiye ayrılır.

2.4.1. Merkezi Sinir Sistemi

Tüm davranışlar omurilik ve beyni içeren merkezi sinir sistemi tarafından yönetilir. Memeli beyni 3 ana bölgeye ayrılır: arka beyin, orta beyin ve ön beyin. Bu 3 bölge kendi içinde özelleşmiş çeşitli alanlar içerir (52-54). Bu alanlar anatomik ve fonksiyonel olarak alt bölümlere ayrılan 6 bölgeden oluşur; medulla oblongata, pons, serebellum, orta beyin, diensefalon ve serebral hemisferler (telencefalon). Bu bölgelerin herbiri beynin her iki hemisferinde de bulunur, fakat şekilleri ve büyüklükleri farklı olabilir (Şekil 2-9) (52, 53).

1-Omurilik

Omurilik merkezi sinir sisteminin en uç ve en basit bölgesidir. Kafatasının tabanından ilk lumbar omurgaya kadar uzanır. Gövde ve uzuvların deri, eklem ve kaslarından gelen duyuşal bilgileri alır, işler, gövde ve uzuvların hareketlerini kontrol eder. Uzuvları ve gövdeyi kontrol eden motor sinirlerin çıkış bölgelerine bağılı olarak omuriliğin çapı ve şekli değişir. Omurilik, içte gri madde ve onu saran beyaz maddeden oluşur. Sinir hücre somalarını içeren gri madde, dorsal ve ventral boynuzu içerir. Servikal, torasik, lumbar ve sakral olmak üzere 4 bölgeden oluşur. Omurilik medulla oblongata, pons ve ortabeyin’den (midbrain) oluşan beyin sapı ile devam eder. Beyin sapı, kafatasının deri ve kaslarından gelen duyuşal bilgileri alır ve kafatası kaslarının motor koordinasyonunu yapar. Ayrıca omurilikten beyine, beyinden omuriliğe bilgi akışını sağlar. Beyin sapı kranyal sinir çekirdeklerini içerir. Bu çekirdeklerden bazıları kafatası deri ve kaslarından bilgileri alırken diğerleri, yüz, boyun ve göz kaslarının

motor kontrolünü yapar. Bir kısmı da duyma, denge ve tat alma gibi duyulardan gelen bilgileri almak üzere özelleşmişlerdir.

2-Medulla oblongata (Bulbus)

Hemen omuriliğin üzerinde uzanır. Sindirim, nefes alma ve kalp ritminin kontrolü gibi yaşamsal otonomik fonksiyonlardan sorumludur.

3-Pons

Medulla oblongatanın hemen üzerinde bulunur. Hareketle ilgili bilgileri serebral hemisferden serebelluma iletir.

4-Serebellum

Pons'un arkasında bulunur ve pedünkül denilen büyük sinir lifleri ile beyin sapına bağlanır. Serebellum hareketin kuvvetini ve alanını düzenler, motor becerilerin öğrenilmesinde rol oynar.

5-Orta beyin (mezensefelon)

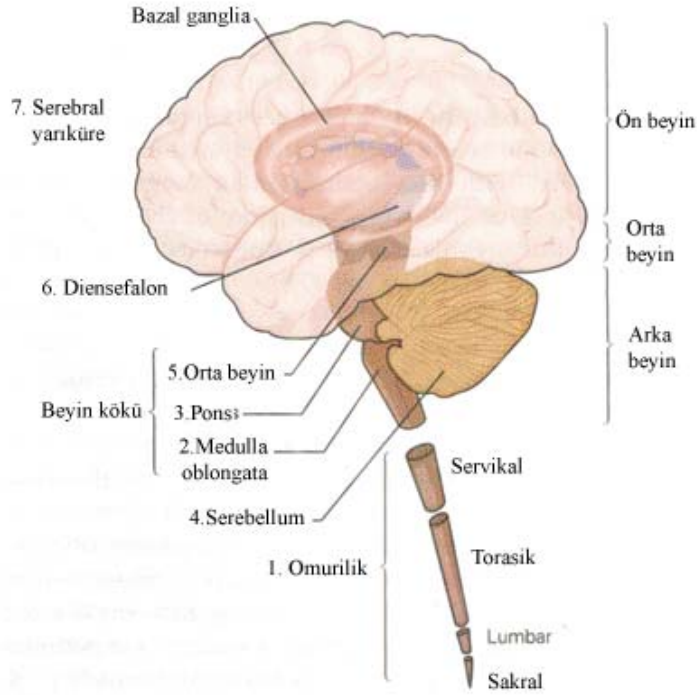
Pons'un hemen üzerinde bulunur. Göz hareketi, görme ve duyma reflekslerinin koordinasyonunu içeren birçok duyuşal ve motor fonksiyonu kontrol eder.

6-Diensefelon

Orta beynin hemen üzerinde bulunur. İki bölümden oluşur. Biri, MSS'den serebral kortekse bilgiyi taşıyan talamus'tur. Diğeri, otonomik, endokrin ve iç organlara ait fonksiyonları düzenleyen hipotalamus'tur.

7-Serebral hemisferler

Serebral korteks olarak isimlendirilen çok sayıda kıvrıma sahip bir dış tabakadan ve bu tabakanın altında yer alan 3 bölümden (bazal gangliyon, hippokampus, amigdala) oluşur. Serebral korteks frontal, parietal, temporal ve oksipital olmak üzere 4 lobtan oluşur. Bazal gangliyon motor fonksiyonların düzenlenmesine katılır. Hippokampus hafıza deposu olarak rol oynar. Amigdala duygusal durumlardaki otonomik ve endokrin cevapların eşgüdümünü sağlar.



Şekil 2-9 Merkezi sinir sisteminin 7 ana bölgesi (52).

2.4.2. Beynin işlevsel alanları

Beynin nasıl çalıştığı ve duygularımız, düşüncelerimiz ve davranışlarımızdan hangi özel serebral bölgelerin sorumlu olduğu bilim adamları ve filozofları binlerce yıldır meşgul etmiştir. Bu çalışmaların başlangıcı M.Ö. 5.yy'a, Hipokrat'ın tek taraflı beyin hasarının vücutun karşı tarafında felce yol açtığını gözlemlediği döneme kadar uzanmaktadır. Bununla birlikte, 19.yy'a kadar geçen sürede beyin haritalanmasına yönelik başka bilimsel bir çalışma gerçekleştirilmemiş ve bu konu ile ilgili veriler daha çok ruhun nerede bulunduğu konusundaki felsefi tartışmalarla sınırlı kalmıştır. Son ikiyüz yıl ise bu alanda arka arkaya yapılan sayısız deneye ve geliştirilen çok sayıda kurama sahne olmuştur. Bu kuramların bir kısmı hatalı yaklaşımlardan ibaretken, diğerleri Broca (1861), Ferrier (1876), Horsley (1887), Sherington (1903), Cushing (1906), Penfield (1937), Fulton (1946) ve diğer birçok bilimadamı tarafından uzun bir zaman sürecinde gerçekleştirilen dikkatli gözlem ve deneylere dayanmaktadır.

Belli bölgelerin hangi işlevlerden sorumlu olduğuna dair en açık kanıtlar, yerleşimi bilinen bir hasarın yol açtığı değişikliklerin gözlemlenmesine dayanmaktadır. Klinik gözlem olarak bilinen bu yaklaşım Hipokrat'dan bu yana kullanılmaktadır. Bu

yöntem özellikle kurşun yarası olan çok sayıda askerin gözlemlenmesi olanağının bulunduğu 1.Dünya Savaşı sırasında, birçok işlevsel bölgenin tanımlanmasını sağlamıştır. Elde edilen bilgiler, daha sonraki yıllarda beyin kıvrımlarının (cerebral convolutions) doğrudan elektriksel, kimyasal ya da manyetik uyarımı sonucu gelişen duysal ve motor faaliyetlerin gözlemlenmesi ile pekiştirilmiştir. Beyindeki değişik kitle lezyonlarının ve elektrofizyolojik bozuklukların tedavisi amacıyla yapılan cerrahi girişimler, hayvanlarda bazı özgül alanların deneysel amaçla cerrahi olarak hasarlanması ve modern görüntüleme yöntemleri sayesinde işlevsel alanların belirlenmesinde büyük aşamalar kaydedilmiştir. Bütün bu çalışmalar sonucunda, beyin işlevsel alanları serebral korteks içerisinde yer alan birincil alanlar, ikincil alanlar ve assosiyasyon alanları başlıkları altında sınıflandırılmıştır (55).

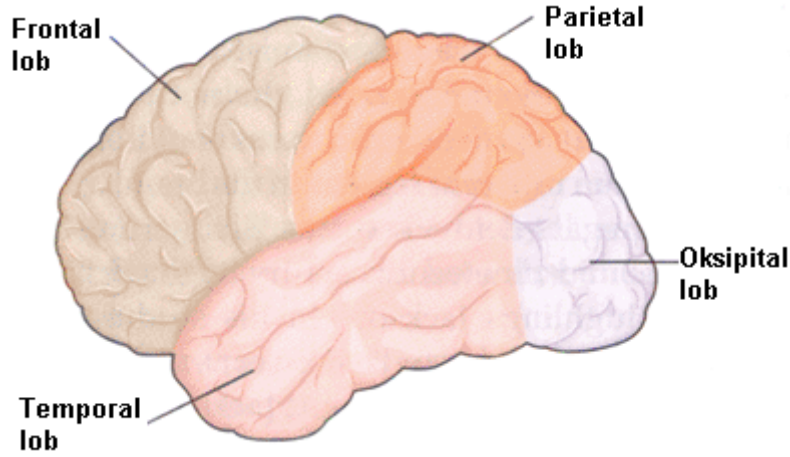
2.4.2.1. Serebral korteks

Yaşamı destekleyen bir çok fonksiyon omurilik, beyin sapı ve diensefalon tarafından kontrol edilirken, serebral hemisferlerin ince dış tabakasını oluşturan serebral korteks günlük yaşamımızdaki hareketlerimizi, davranışlarımızı planlamada ve gerçekleştirmede rol oynar. Serebral korteks, ayrıca bilgilerin depolanmasından ve kas becerilerimizin çoğunluğundan sorumlu olan yapıdır. Filogenetik olarak insan en mükemmel kortekse sahiptir ve modern nörobilimcilerin bir çoğu bugün insan korteksinin fonksiyonlarını ve bozukluklarını anlamaya çalışmaktadır.

Serebral korteks çıkıntılı bölgeleri (gyri) birbirinden ayıran oluklar (sulci) tarafından şekillendirilen yüksek oranda katlanmış, kıvrılmış bir şekle sahiptir. Bu kıvrımlı şeklin gerçek sebebi bilinmemekle birlikte nöronların sayısını arttırabilmek için evrim sırasında oluştukları düşünülür. Korteksin kalınlığı her zaman 2 ila 4 mm arasındadır ve türler arasında fazla değişiklik göstermez. Fakat yüzey alanı yüksek primatlar ve özellikle insanda oldukça büyüktür. Nöron sayısı, bilgi işlenmesi açısından korteksin kapasitesini gösteren önemli belirteçlerden biridir. Neokorteks fonksiyonel tabakalar şeklinde düzenlenmiştir. Neokorteksde bilgi kendi içinde ilişkili nöronların oluşturduğu karşılıklı tabakalarda işlenir. Korteksin yüzey alanının artması bilgiyi işleyebilmek için muazzam bir kapasite sağlar (52, 55, 56).

Serebral korteks anatomik olarak 4 loba ayrılır

Serebral korteks anatomik olarak 4 loba bölünmüştür: frontal, parietal, temporal ve oksipital lob. (Şekil 2-10). Her lob farklı bir çok fonksiyonel bölge içerir. Örneğin, Temporal lob işitme, görme veya hafıza fonksiyonlarını yerine getiren bölgeler içerir. Serebral korteksde corpus callosumun dorsal yüzeyini saran cingulate korteks ve insular korteks (insula) olmak üzere iki bölge daha bulunur: (55, 56).



Şekil 2-10: Serebral korteksin anatomik yapısı (56).

Serebral korteks tabakaları

Serebral korteks birtakım hücre tabakalarından oluşur. Tabakaların sayısı ve fonksiyonları çeşitlilik gösterir. Neokorteks tipik olarak korteksin dış yüzeyinden (pia mater) beyaz maddeye doğru numaralandırılmış 6 tabaka içerir (56).

Tabaka I:

Az sayıda hücre içeren bir tabaka olduğundan *moleküler tabaka* olarak isimlendirilir. Korteksin derinliklerindeki hücrelerin dendritlerini ve bu tabakadan geçen veya bu tabakada bağlantılar yapan aksonları içerir. Daha derin bölgeleri az sayıda yıldızsı ve iğ şeklinde horizontal uzanan Cajal hücreleri içerir.

Tabaka II

Granüler hücreler denilen küçük küresel hücreler içerir. Bu yüzden *dış granüler hücre tabakası* ismini alır.

Tabaka III

Çoğu piramidal şekilli olan bir çok hücre tipi içerir, bu yüzden *dış piramidal hücre tabakası* ismini alır.

Tabaka IV

Tabaka II gibi granüler hücrelerden oluşur, bu yüzden *iç granüler hücre tabakası* ismini alır.

Tabaka V

İç piramidal hücre tabakasıdır, hücreleri tabaka III'deki hücrelerden daha büyüktür.

Tabaka VI

Nöronların heterojen bir karışımı olduğundan *polimorfik veya multiform tabaka* ismini alır.

Serebral korteksin işlevsel alanları

Serebral korteksin bir çok bölgesi duyuşsal bilgileri işlemek veya motor emirleri iletmekle görevlidir. Bilgilerin işlenmesinde farklı görevlere sahip özelleşmiş bazı alanlar bulunur (Şekil 2-11). Bu alanlar periferik duyuşsal ve motor yollara yakınlığına göre birincil, ikincil ve üçüncül duyuşsal veya motor alanlar olarak sınıflandırılırlar (55).

Birincil Alanlar

Bu alanlar duyuşsal sinir uzantılarından özgün duyuşsal uyarıları alırlar (birincil duyuşsal alanlar) veya vücudun karşı tarafındaki özgün kas hareketlerini doğrudan yönetirler (birincil motor alanlar). Aşağıdaki şekilde sınıflandırılır: 1-Birincil motor alanlar, 2-Broca'nın alanı, 3-Birincil somatik duyuşsal alan, 4-Birincil görme alanı, 5-Birincil işitme alanı, 6-Frontal göz alanı, 7-Koku merkezi, 8-Tad merkezi

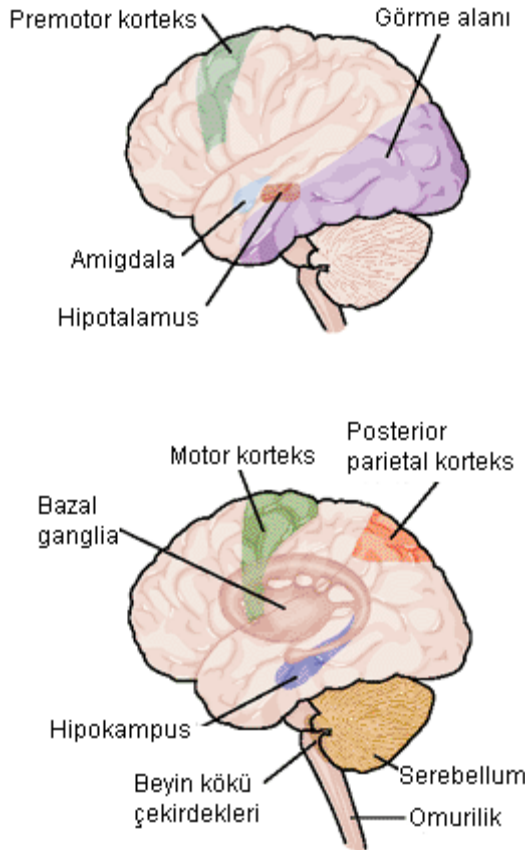
İkincil Alanlar

Bu alanlar kendilerine ait birincil alanların işlevlerini tamamlayıcı şekilde çalışmaktadır. İkincil alanların motor olanları, ilgili birincil alanlara karmaşık davranışların kalıplarını sunarken, duyuşsal olanları efferent sinyallerin ileri analizini ve anlamlandırılmasını sağlamaktadırlar. Aşağıdaki şekilde sınıflandırılır: 1-Ön motor

alan, 2-Yardımcı motor alan, 3-İkincil somatik duysal alan, 4-İkincil görme alanı, 5-İkincil işitme alanı

Assosiyasyon Alanları

Bu alanlar birden fazla duysal ve motor alanla bağlantılı olup, duysal uyarıların entegrasyonunu, bellekteki bilgilerle karşılaştırılmasını ve uygun motor yanıtların planlanmasını sağlamaktadırlar. İnsanlarda diğer canlılara göre çok daha gelişmiş olan bu bölgelerde farkındalık, düşünme, sonuç çıkarma, planlama, bellek, dikkat ve duysal davranışlar gibi üst düzey kognitif süreçler oluşmaktadır. Assosiyasyon alanları loblara göre parietooksipitotemporal assosiyasyon alanı, prefrontal assosiyasyon alanı ve temporal (limbik) assosiyasyon alanı olarak adlandırılırlar.



Şekil 2-11: Serebral korteksin işlevsel alanları (56).

2.4.2.2. Limbik Sistem

Limbik sistem, hipotalamusu çevreleyen serebral ve diensefalik yapılardan oluşmaktadır. Bu sistemin koku duysusu ile ilgili yapılarla da önemli ilişkisi bulunmaktadır. İlkel memeli hayvanlarda davranışların ortaya çıkması ve duyguların

dışa vurulmasında belirgin rol oynayan koku duyusu, daha gelişmiş memelilerde o kadar önemli değildir. Bu son grup canlıda limbik sisteme serebral assosiyasyon sahalarından gelen uyarılar daha büyük önem taşımaktadır.

Duygu terimi mutluluk, heyecan, neşe, üzüntü ve korku gibi ruhsal durumları içermektedir. Bu durumlar gülme, hiddet, saldırganlık veya ağlama gibi davranışlarla dışa vurulurlar. Duyguların oluşmasında prefrontal alanlar, dışa vurulmasında ise limbik sistem görev yapmaktadır. Limbik sistemden mezensefalona gönderilen uyarılar uyku, uyanıklık, dikkat, uyarılma, saldırganlık ve uysallık gibi davranışları kontrol etmektedir. Limbik sistemden hipotalamusa gönderilen uyarılar ise beslenme ve seks gibi temel güdüler ve ayrıca vücut ısısının, vücut sıvılarının dengesini ve vücut ağırlığının kontrolü gibi vücudun iç mekanizmalarını yönetmektedir. Bu işlevler beynin vejetatif işlevleri olarak adlandırılır. Limbik sistem ayrıca, edinilmiş deneyimlere bağlı olarak bazı otonom işlevleri etkileyebilmektedir. Örneğin daha önce köpekler tarafından saldırıya uğrayan bir kişi, başka köpeklerle karşılaşır, o kişide çarpıntı, terleme ve aşırı solunum gibi yanıtlar gelişmektedir. Yukarıda belirtilen işlevlerin yerine getirilmesinde görev yapan başlıca yapılar şunlardır (55): 1-Amigdala, 2-Hippokampus, 3-Mamiller cisimler, 4-Septum pellucidum, 5-Limbik halka

Hippokampus

Hippokampus temporal lobun iç yüzeyinde bulunan, önden arkaya doğru yay şeklinde uzanan ve insanda yaklaşık 4 cm uzunlukta olan bir yapıdır. Hippokampus yapısal özelliklerinden ve beyin sapı ile ilişkisinden yola çıkılarak küre şeklinde bir baş, üniform bir gövde ve ince bir kuyruk olmak üzere üç kısımda incelenmektedir (55).

Hippokampal baş, beyin sapının önünde bulunmaktadır. Bu yapı, üstündeki parmaklı çıkıntılar ve küresel şekli ile hippokampal gövdeden kolaylıkla ayırtedilebilmektedir. Hippokampal gövde beyin sapına komşudur ve hippokampal başın parmaklı çıkıntılarından yoksundur. Bu bölge kantitatif amaçlı histopatolojik ve MRG incelemelerinde kullanılabilecek en önemli bölgedir. Hippokampal kuyruk beyin sapının arkasında bir yay oluşturmaktadır. Gövde ve kuyruk üzerinde alveus denilen bir yapı bulunur. Alveus hippokampal aksonların izlediği ana efferent yolu oluşturmaktadır. Bu yapı daha sonra beyne uzanan ve forniks olarak adlandırılan akson demetlerini meydana getirmektedir (55).

Motor nöronlar nasıl omuriliğin uyarıcı projeksiyon nöronlarıysa, piramidal hücreler de serebral korteksin uyarıcı projeksiyon nöronlarıdır. Farklı kortikal alanlardaki piramidal hücreler morfolojik olarak benzerdirler ve nörotransmitter olarak L-glutamat kullanırlar.

CA3 ve CA1 bölgelerinde piramidal hücrelerin gövdeleri stratum pyramidale denilen devamlı tek bir tabakada yerleşmiştir. Omuriliğin motor nöronlarının tersine hippocampusun piramidal hücreleri bir değil iki dendritik ağaç taşırlar ve bunlar hücre gövdesinin zıt taraflarında yer alır: bazal dendritler akson ile aynı taraftan çıkarken, apikal dendritler tam ters tarafta konumlandırılır. CA1 piramidal nöronların uyarıcı sinyali oldukça kapsamlıdır. Yaklaşık 5000 CA3 piramidal hücre aksonu (Shaffer kollateral) tek bir CA1 hücresinde birleşir. Bu Shaffer kollateralleri CA1 hücresinin dendritik ağaçlarının yakınında sinapslar oluşturur. Shaffer kollateralleri tarafından oluşturulan bağlantılar “en passant sinapsları” olarak isimlendirilir, çünkü CA3 aksonları stratum radiatumun içinden geçerek yoluna devam eder ve birçok başka CA1 nöronu dendritiyle kontakt yapar.

Sinapsların bir çoğu dendritik dikenlerde oluşur. Beynin bir çok bölümünde dikenlerin uyarıcı ve inhibe edici olmak üzere iki ayrı sinyali vardır. Fakat CA1 bölgesindeki piramidal hücre dikenlerinin sadece bir tane uyarıcı sinapsı vardır. Bu dikenlerin dört karakteristik şekli vardır: 1-ince-seyrek, 2-mantar gibi, 3-dallı, 4-güdük. Dendritik dikenlerin bu karakteristik özellikleri, öğrenme ve hatırlama sırasında, sinaptik bağlantıların gücünü belirleyici özellikte olabilir (56).

Hippokampus serebral korteksin filogenetik olarak en ilkel bir parçasıdır. Küçük boyutuna rağmen kognitif işlevler açısından son derece önemli olan bu organ, çeşitli hastalıkların gelişiminde anahtar rol oynamaktadır. Hippokampusun MRG incelemesi temporal lob epilepsisi, Alzheimer hastalığı, çeşitli postanoksik bozukluklar, şizofreni ve posttravmatik stres bozukluğu gibi değişik kognitif patolojilerin saptanmasında, tedavilerin planlanması ve izlenmesinde birincil görüntüleme yöntemi olarak kullanılmaktadır.

Beynin hangi kısımlarının bellek ile yoğun ilişkisi olduğunu araştıran çalışmalar, başta hippocampus olmak üzere temporal loba işaret etmektedir. Hippokampus bu yapının girdi ünitesi olan subikulumdan gelen duyuşal kortikal sinyallerin değişik yollardan geçerek sonunda kendisine geri döndüğü bir devrenin merkezi parçasıdır.

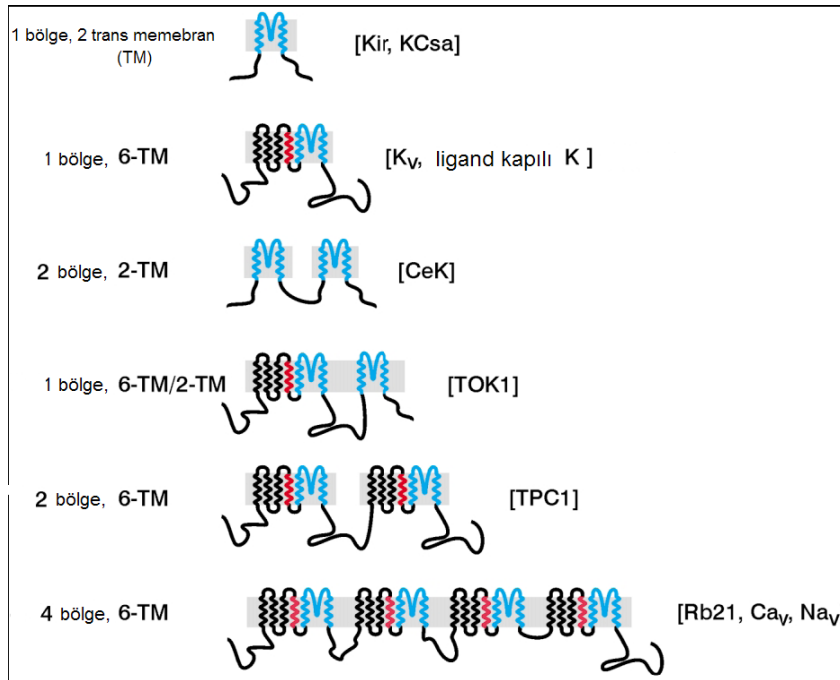
Bilişsel yönden büyük önem taşıyan bu devre kendisini bulan bilimadaminin adıyla, Papez devresi olarak adlandırılmaktadır. Papez devresinde sinyaller serebral korteksten subikulum aracılığı ile hippokampusu, oradan forniks aracılığı ile mamiller cisme, mamiller cisimden mamillotalamik traktus ile talamusa ve en son olarak da talamustan singular girusa ulaşmaktadır. Bu girusda işlenen sinyaller, singulum yoluyla hippokampusu geri dönmektedir.

Papez devresinin başlıca işlevi kısa süreli belleğin uzun süreli belleğe dönüştürülmesidir. Hippokampus, duyuşsal bir girdinin önemli olduğunu saptarsa, deneyim serebral kortekste ki assosiyasyon bölgelerinde bulunan, makrosütunlar şeklinde organize olmuş milyarlarca nöronu depolar. Baskın hemisferdeki hippokampusun ya da her iki hippokampusun hasar görmesi ya da epilepsi cerrahisi sırasında yanlış olarak çıkartılması, hasar sonrası dönemde sunulan sözel ve sembolik bilgilerin depolanamaması ile sonuçlanmaktadır. Bu durumdan hasar öncesi dönemden depolanmış bilgilerin ya da refleksif adı verilen fiziksel yetilerin öğrenilmesi (örneğin sportif aktivitelerde gerekli özel hareketler) etkilenmez. Bu devre ayrıca, serebral korteksin singulat girus aracılığı ile hippokampusu, hippokampusun da hipotalamusu etkilemesine yol açarak, bazı duyguların dışı vurulması sırasında ortaya çıkan otonom faaliyetlerin düzenlenmesini de sağlamaktadır (55).

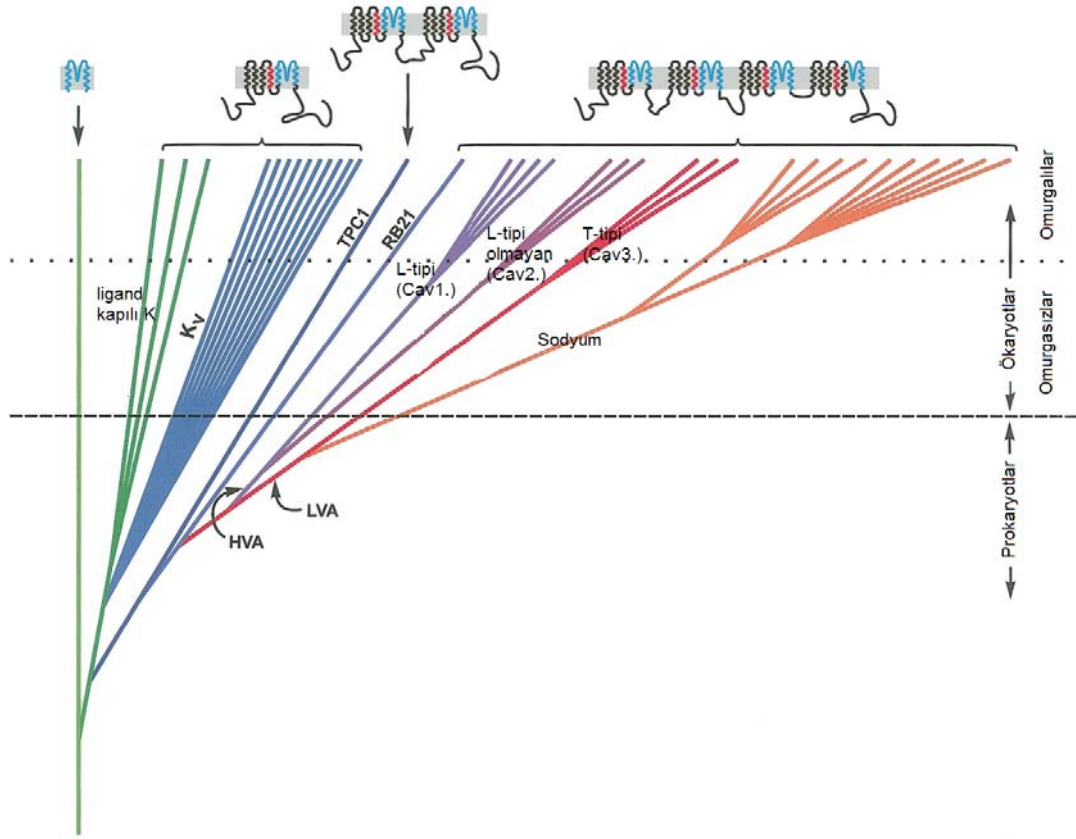
2.5. Voltaj Kapılı İyon Kanalları

Uygun büyüklük ve yükteki iyonların hücre zarından geçişine aracılık eden membran proteinleri iyon kanalları olarak isimlendirilir. İyonların, bu kanallardan geçişi özel sinyallere yanıt olarak kısa süreli açılan kapılar ile düzenlenir. Plazma membranındaki elektrik potansiyeli değişimlerine cevap olarak açılan kanallar “voltaj kapılı kanallar” olarak tanımlanır. Voltaj kapılı iyon kanallarının en önemli özelliği hücrelerde elektriksel uyarıların iletimini sağlamaktır. Böylece en hayati işlevlerden olan hareket, duyuşsal ve bilişsel fonksiyonların yerine getirilmesinde rol oynarlar. Kanallar elektrik sinyallerin iletimini hızlı bir şekilde şekil değiştirerek ve geçirgen olmayan yapılarını geçirgen bir hale getirerek gerçekleştirirler. Bu şekilde hücre membranında iyonların geçebileceği bir alan açılmış olur. İlginç olan açılmış bir iyon kanalının içinden geçen iyonların hızının difüzyon hızına bağlı olmasına karşın sadece belirli iyon tiplerinin geçebilmesidir. Sonuç olarak, kanal hangi iyon için özelleşmiş ise o iyon kanaldan geçebilir. Voltaj kapılı iyon kanalları, iki transmembran segment ve por

oluşturmak üzere bu iki segmenti ayıran bir ilmekten oluşan basit protein altbirimlerinin oluşturduğu protein kompleksleridir (Şekil 2-13). Bu basit yapı prokaryotik ve ökaryotik pek çok kanalda korunmuştur. 2 geçişli bu transmembran proteine aynı proteinden bir tane daha eklenmesi veya 4 geçişli transmembran başka bir proteinin katılması gibi kombinasyonlar ile çeşitli kanal yapıları ortaya çıkar (Şekil 2-14). Voltaj kapılı iyon kanalları ailesinin içinde voltaj kapılı potasyum, kalsiyum ve sodyum kanalları bulunur (57).



Şekil 2-13: Çeşitli voltaj kapılı iyon kanallarının yapısal özellikleri (57)



Şekil 2-14: Prokaryotik ve ökaryotik organizmalarda voltaj kapılı iyon kanallarının filogenisi (57)

2.5.1. Voltaj Kapılı Potasyum Kanalları

Voltaj kapılı K⁺ kanalları tüm voltaj kanalları arasında yapısal ve fonksiyonel açıdan en çeşitli olanıdır. Altı geçişli transmembran ana yapı üzerinde por oluşturan bir bölge içerir. K⁺ kanalı bu 6 geçişli altünitenin 4 tanesinin bir araya gelmesinden oluşur. Bu ailenin 4 ana sınıfı mevcuttur: Kv1, Kv2, Kv3, Kv4. Son çalışmalar ile bu sınıflara Kv5,6,7,8,9 da eklenmiştir. Voltaj Kapılı K⁺ kanallarının farklı ailelerinin de çeşitli üyeleri bulunmaktadır (Kv1.1-6; Kv2.1-2; Kv3.1-3; Kv4.1-3; Kv9.1-2) (57).

2.5.2. Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları

Memelilerde voltaj kapılı sodyum kanalının alfa alt ünitesini kodlayan 11 farklı gen bulunmuştur. Ancak bu kanallar önemli ölçüde benzerlik göstermektedir. Bu kanallar Na⁺ akımlarıyla uyarılıp membranı hızlı bir şekilde depolarize ederler. Bu şekilde sinyali akson boyunca iletip kasılma ve salgılama gibi olayları tetiklerler (57).

2.5.3. Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanalları

Voltaj kapılı kalsiyum kanalları plazma membranının depolarizasyonuna cevap olarak hücre içine kalsiyum alımını kontrol ederler. Bu yolla hücre kasılmasının, madde salgılanmasının (sekresyon), nörotransmisyonun ve gen anlatımının düzenlenmesinde önemli rol oynarlar.

Voltaj kapılı kalsiyum kanalları ilk kez 1994 yılında kanalın por kompleksini taşıyan α_1 alt ünitesinin bulunduğu yere göre isimlendirildiler (Ör: α_{1S} iskelet kası, α_{1A} - α_{1E}) (58).

Kalsiyum akımları farklı hücrelerde farklı fizyolojik ve farmakolojik özellikler ortaya çıkarır. 1995 yılında Tsien ve arkadaşları bu kanalları, uyarıldıkları akımın tipine göre L-tipi, N-tipi, P/Q-tipi veya R-tipi kanallar olarak adlandırdılar (59). Buna göre L-tipi kalsiyum kanalları, L-tipi kalsiyum akımları ile uyarılır. Bu akımlar aktif hale geçmek için güçlü depolarizasyona ihtiyaç duyan uzun süreli akımlardır. Organik L-tipi kalsiyum kanal antagonistleri (Dihidropridin, fenilalkilaminler, benzothiazepinler) ile bloke olurlar. N-tipi kalsiyum akımları, P/Q-tipi kalsiyum akımları ve R-tipi kalsiyum akımları da aktif hale geçmek için güçlü depolarizasyona ihtiyaç duyarlar. Çoğunlukla L-tipi kalsiyum kanal blokerlerinden etkilenmezler. Bu akımlar yılan ve örümcek zehirlerinin toksinleri ile bloke olurlar ve bu şekilde uyarılan kanallar esas olarak nöronlarda bulunurlar. Sinapslarda hızlı sinirsel iletiyi başlatıp, hücre gövdesine ve dentritlere kalsiyum alımını düzenlerler. T-tipi kalsiyum akımları ise aktif hale geçmek için zayıf depolarizasyona ihtiyaç duyan kısa süreli akımlardır.

2000 yılından sonra Ertel ve arkadaşları bu kanalları, K^+ kanallarının isimlendirmesinden yola çıkarak “Ca: iletilen iyon, v: fizyolojik düzenleyici -voltaj- , ilk numara: α_1 alt ünitesinin ait olduğu alt aile, İkinci numara: α_1 alt ünitesinin numarası (1-n)” şeklinde isimlendirdiler (60). Memelilerde voltaj kapılı kalsiyum kanalları ailesinin 10 üyesi vardır ve bunlar 3 alt aile içinde tanımlanırlar:

Cav1 alt ailesi: Cav1.1- Cav1.4 (α_{1S} , α_{1C} , α_{1D} , α_{1F} : L-tipi voltaj duyarlı kanallar) (Tablo 2-3).

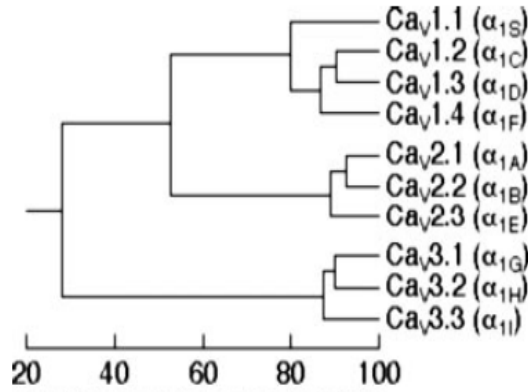
Cav2 alt ailesi: Cav2.1- Cav2.3 (α_{1A} , α_{1B} , α_{1E} : sırasıyla P/Q, N ve R-tipi voltaj duyarlı kanallar).

Cav3 alt ailesi: Cav3.1- Cav3.3 (α_{1G} , α_{1H} , α_{1I} : T-tipi voltaj duyarlı kanallar).

2.5.3.1. Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanallarının Yapısı ve Fonksiyonları

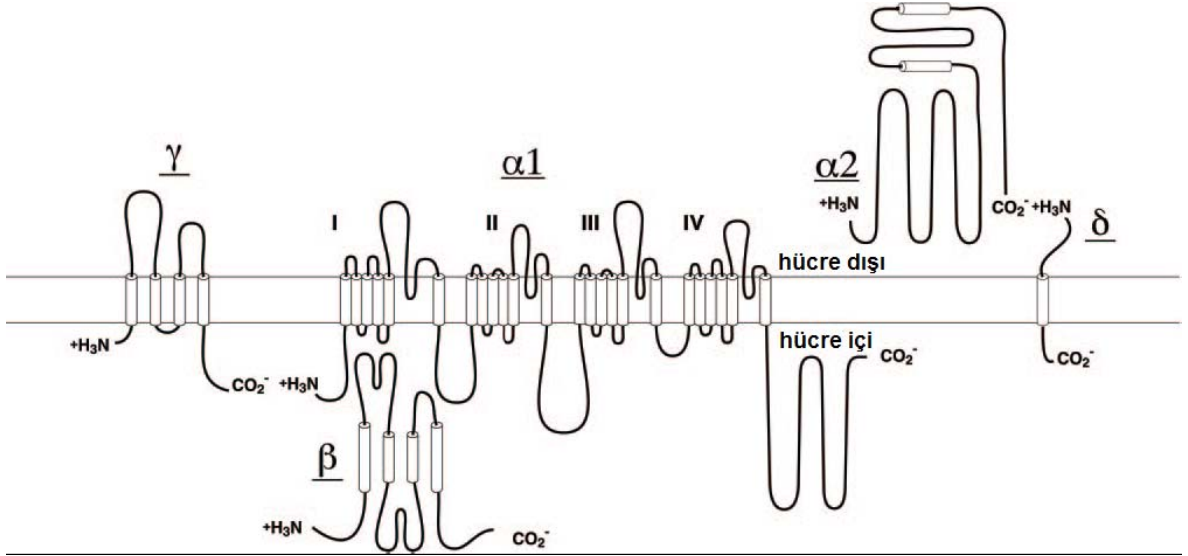
Kalsiyum kanalları 4 veya 5 farklı alt üniteden oluşan kompleks proteinlerdir. Bu alt üniteler $\alpha 1$, β , $\alpha 2\text{-}\delta$, γ olarak adlandırılır. Her biri birden fazla gen tarafından kodlanır.

Memeli $\alpha 1$ alt üniteleri 10 farklı gen tarafından kodlanır. Aynı alt aile içindeki $\alpha 1$ alt ünitelerinin amino asit dizileri %70 oranında aynıdır. Farklı alt ailelerin amino asit dizilerinin ise %40'ı aynıdır (Şekil 2-15) (61).



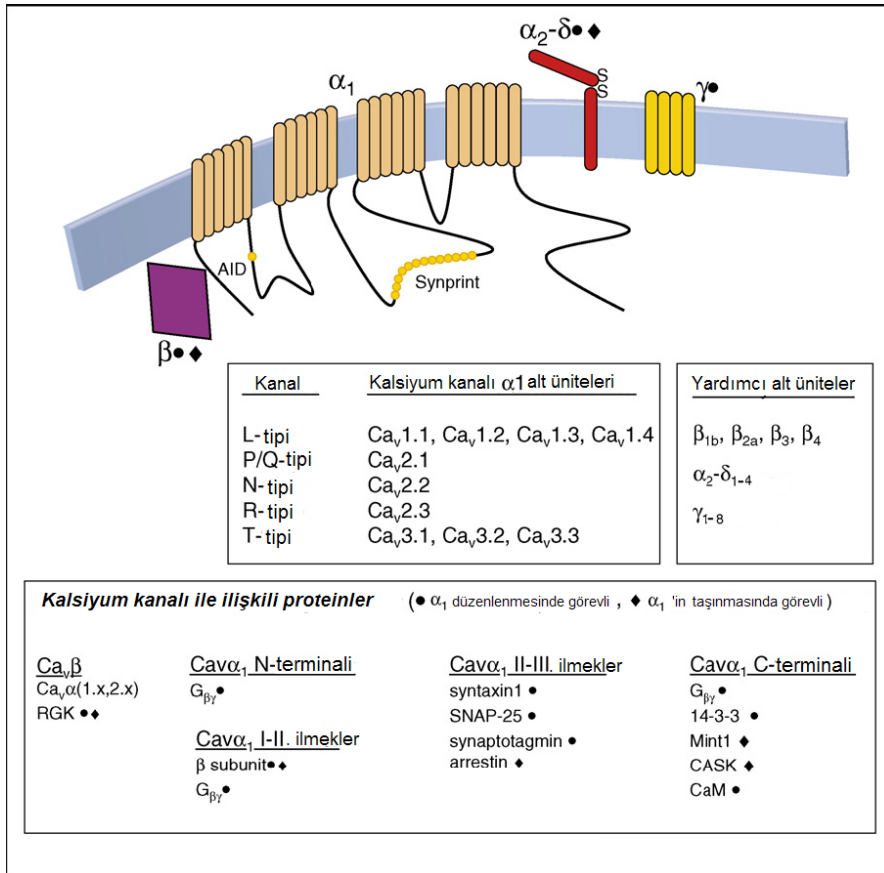
Şekil 2-15: Kalsiyum kanalı $\alpha 1$ alt üniteleri dizi benzerlikleri (61)

$\alpha 1$ alt ünitesi 190-250 kDa ağırlığındadır ve kanalın en büyük alt ünitesidir. Bu alt ünite iletim porunu, kanal apareyini, voltaj sensörünü ve kanalı düzenleyen sekonder haberciler, ilaçlar ve toksinler için pek çok bağlanma bölgesini içerir. $\alpha 1$ alt üniteleri 6 transmembran segment içeren 4 bölgeden oluşur. Bu bölgeler büyük intraselüler ilmeklerle birbirine bağlıdır (Şekil 2-14). Intraselüler alanda bulunan β alt ünitesi, dilsülfid bağı içeren ve tek geçişli transmembran protein olan $\alpha 2\delta$ alt ünitesi ve γ alt ünitesi gibi alt üniteler kalsiyum kanalının trafiği ve düzenlenmesiyle ilişkilidirler (Şekil 2-16). Şu ana kadar 4 adet β alt ünitesi 4 adet $\alpha 2\delta$ ve 8'den fazla γ tanımlanmıştır.



Şekil 2-16: Voltaj Kapılı kalsiyum kanalı (61).

L-tipi voltaj duyarlı kalsiyum kanallarının C terminali, N terminali ve intraselüler bağlantı bölgeleri önemli protein bağlanma bölgeleri içerir (Şekil 2-17).



Şekil 2-17: Voltaj kapılı kalsiyum kanalları yardımcı alt üniteleri (62).

Tablo 2-3: L-tipi voltaj duyarlı kalsiyum kanallarının bulunduğu yerler ve fonksiyonları

KANAL	AKIM	YERLEŞİM	FONKSİYON
Cav1.1 ($\alpha 1S$) (LVSCC A1S)	L-tipi	İskelet kası, transvers tubuller	Eksitasyon-kontraksiyon
Cav1.2 ($\alpha 1C$) (LVSCC A1C)	L-tipi	Kalp kası hücreleri, düz kas hücreleri, endokrin hücreler, nöron soması, proksimal dentritler	Eksitasyon-kontraksiyon, hormon salınımı, transkripsiyonun düzenlenmesi, sinapsların düzenlenmesi
Cav1.3 ($\alpha 1D$) (LVSCC A1D)	L-tipi	Endokrin hücreler, nöron soması, proksimal dentritler Kardiyak atriyal myositler, kohlea sil hücreleri	Hormon salınımı, transkripsiyonun düzenlenmesi, sinapsların düzenlenmesi, kalp kasının uyarılması, duyma, duyu hücrelerinden nörotransmitter salınımı
Cav1.4 ($\alpha 1F$) (LVSCC A1F)	L-tipi	Retinal çomak hücreleri ve bipolar hücreler, omurilik, adrenal bezler, mast hücreleri	Nörotransmitter salınımı

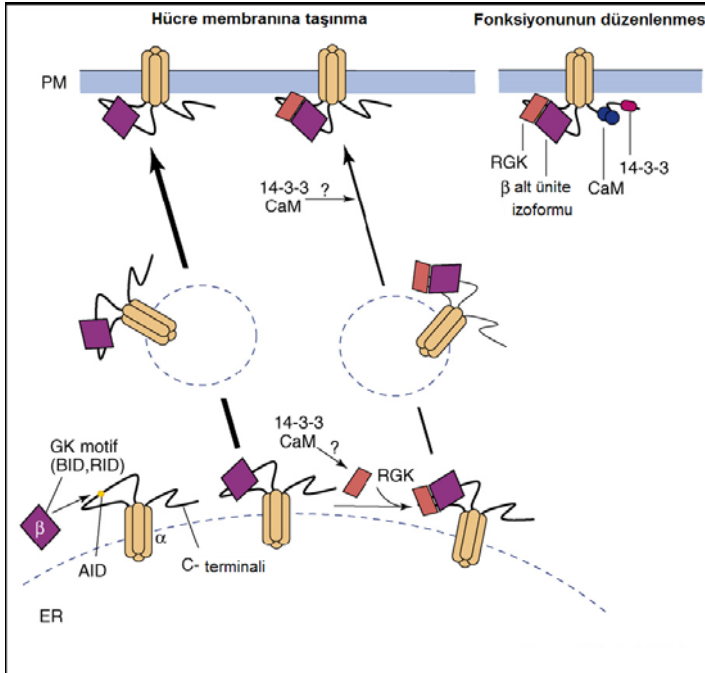
Catterall Wa. 2005 ‘den değiştirilmiştir (61).

2.5.3.2. Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanallarının Hücre İçi Dağılımı ve Düzenlenmesi

β alt ünitesinin P/Q tipi kanallarında ER’de alıkoyulma motiflerini maskelediği ve bu şekilde $\alpha 1$ - β kompleksinin plazma membranına taşınabildiği rapor edilmiştir (63).

$\alpha 2\delta$ alt ünitesinin Von Willebrand motifi ve metal iyonu bağlama bölgesi taşımasının L, N ve P/Q tipi kanalların membranda eksprese edilebilmeleri açısından önemli olduğu gösterilmiştir (64). Serebellar nöronlarda $\alpha 2\delta$ alt ünitesinin lipid sallarında $\alpha 1$ alt ünitesi ile beraber bulunmaları, $\alpha 1$ alt ünitesinin özgün yerleşimi için demirleme noktası gibi iş gördüğünü düşündürmektedir (65). γ alt ünitesi hakkında çok az şey bilinmektedir. Bu alt ünitenin yokluğunda kanal fonksiyonun veya akım yoğunluğunun az miktarda değiştiği rapor edilmiştir (66).

Kalsiyum kanalları küçük G proteinleri ile de düzenlenirler. RGK ailesinden proteinler küçük GTP bağlayan proteinler ailesinin üyesidir. Bu aile Rad, Gem (Kir), Rem, Rem2 proteinlerini içerir. RGK ailesi RasGTPaz'lerden membranda yerleşmeyi indükleyen CAAX motifini içermemeleri, düşük GTPaz etkinliğine sahip olmaları, 14-3-3 bağlanma bölgesi taşıyan uzun bir N-terminaline sahip olmaları, 14-3-3 ve Ca^{2+} /calmodulin bağlanma bölgesi taşıyan uzun bir C-terminali bulundurmalarıyla ayrılırlar. RGK ailesinin tüm üyeleri kalsiyum kanallarının β alt ünitesi ile etkileşir ve onun ekspresyonunu azaltırlar. RGK ailesinin hücre içi dağılımları 14-3-3 ve calmodulin tarafından düzenlenir. RGK'lar ER içerisinde kanalın β alt ünitesine bağlandıklarından 14-3-3 ve calmodulin kalsiyum kanalının hücre içi dağılımını da kontrol etmiş olur (Şekil 2-18) (67-70).

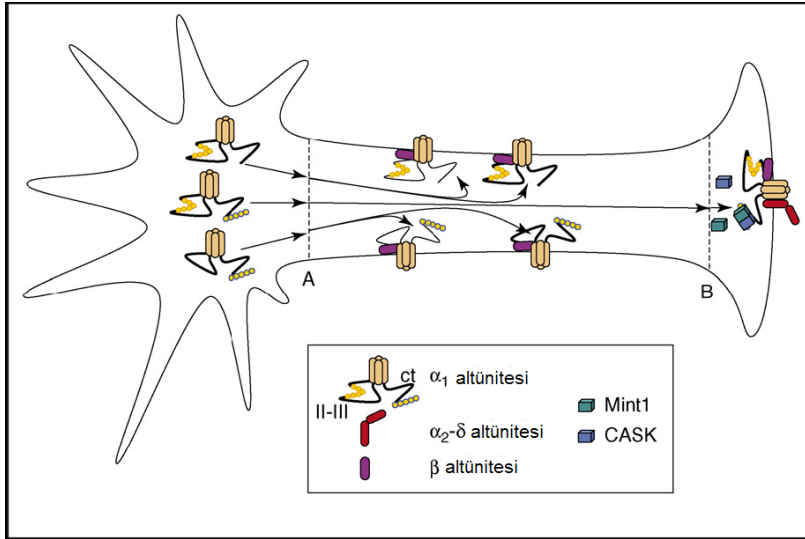


Şekil 2-18: Voltaj kapılı kalsiyum kanallarının RGK ailesi ile ilişkili proteinler tarafından düzenlenmesi (62).

2.5.3.3. Kalsiyum kanallarının sinapslara hedeflenmesi

α_1 alt ünitesinin II ve III. transmembran bölgeleri arasındaki intraselüler ilmekte bulunan Synprint bölgesi sinaptik proteinler için bağlanma noktasıdır. Bu bölgeye bağlanan sinaptik proteinler aracılığı ile kanal proteinleri, sinaptik vesiküllere paketlenirler ve sinapslara hedeflenirler (71).

N-tipi kalsiyum kanallarının C-terminallerine bağlanan Mint-1 ve CASK adaptör proteinleri presinaptik sinir sonlanmalarında bulunur. Hippokampus nöronlarında bu proteinleri sinapslara hedeflenmenin önemli bir parçası olduğu gösterilmiştir (Şekil 2-19) (72).

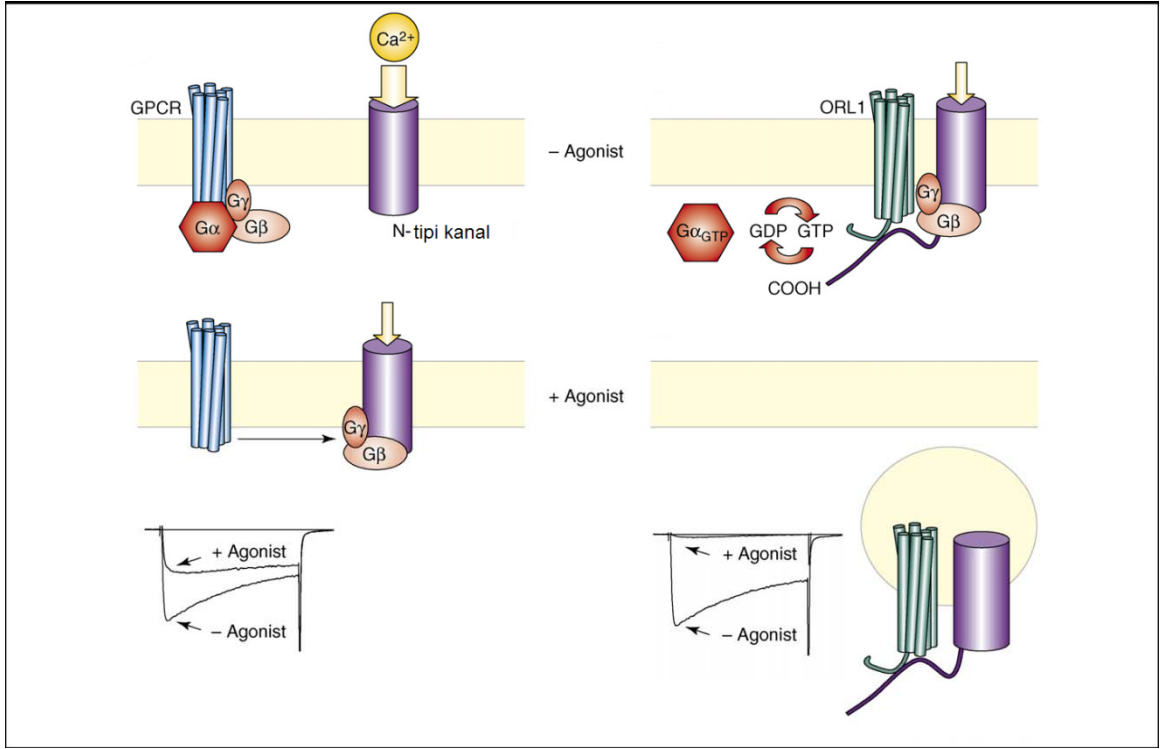


Şekil 2-19: Voltaj kapılı kalsiyum kanallarının adaptör proteinler ile düzenlenmesi (62).

2.5.3.4. Kalsiyum kanallarının sitoplazmaya geri alınımı

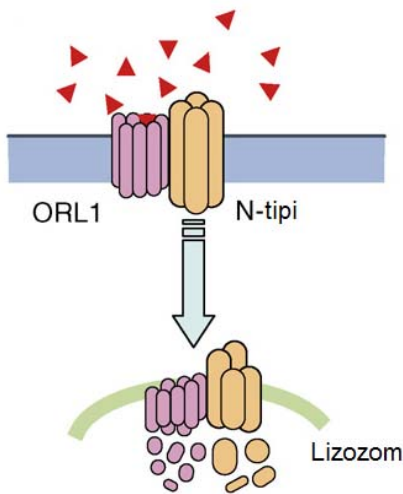
Kalsiyum kanallarının plazma membranından nasıl uzaklaştırıldığı konusunda az bilgi vardır. $\alpha_2\delta$ alt ünitesi N-tipi kanallar ile birleştiğinde kanalın yarı ömrünün uzadığı gösterilmiştir (73).

G proteini ilişkili reseptörlerin N-tipi kanalların geri alımını indüklediği gösterilmiştir (Şekil 2-20).



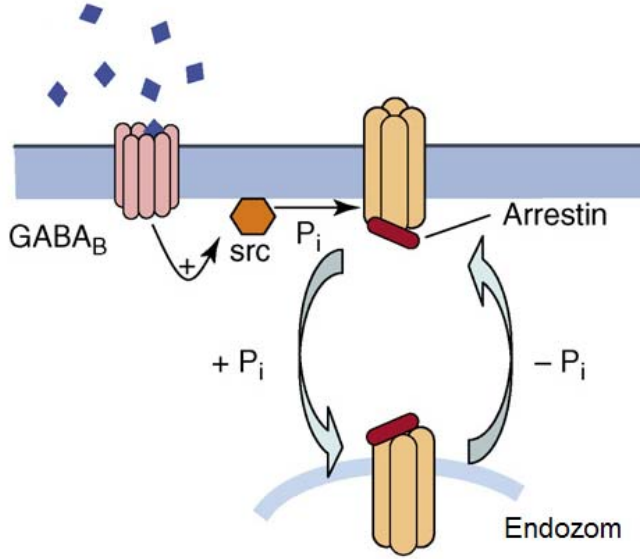
Şekil 2-20: Voltaj kapılı kalsiyum kanallarının G proteini ilişkili reseptörler ile düzenlenmesi (74).

G protein ilişkili reseptörlerden olan ORL1'in (nociceptin veya NOP) N-tipi kanallara bağlandığı ve lizozoma giderken kanalı da kendisiyle birlikte götürdüğü bildirilmiştir (Şekil 2-21) (75, 76).



Şekil 2-21: Voltaj kapılı kalsiyum kanallarının ORL1 ile lizozomlara yönlendirilmesi (62).

Bir başka G protein ilişkili reseptör GABA β da geri alınırken ilişkili olduğu kanalın da geri alınmasını sağlar. Ancak bu durumda kanallar yıkılmaz, ihtiyaç duyulduğunda tekrar GABA β ile plazma membranına geri gönderilirler (Şekil 2-22) (77, 78).



Şekil 2-22: Voltaj kapılı kalsiyum kanallarının GABA β ile endozoma alınması ve saklanması (62).

2.6. Kalsiyum Metabolizması

Kalsiyum iyonları pek çok hücre fonksiyonunda ve hücreler arası iletişimde önemli görevlere sahiptir. Kalsiyum, hormon ve nörotransmitter salınımında, membran uyarımının düzenlenmesinde ve ikinci haberci olarak bir çok sinyalleşme yolağında rol oynar. Gen transkripsiyonunun düzenlenmesi ve kontrolü kalsiyum bağımlı mekanizmalarla sağlanır. Kalsiyum bağımlı işlemler, özellikle öğrenme ve hafızada rol oynayan nöronal plastisite mekanizmalarında işlev görür. Kalsiyumun bu fonksiyonları hücre içi konsantrasyonunun düzgün bir biçimde ayarlanmasıyla sağlanır (79).

2.6.1. Kalsiyum dengesi

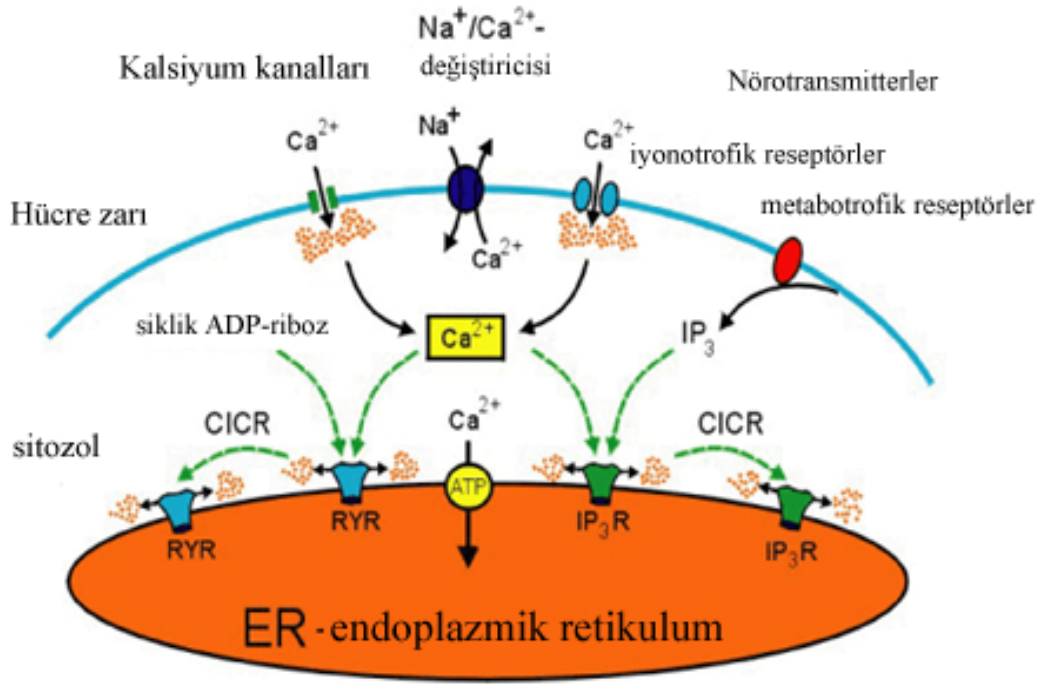
Hücre içi kalsiyum dengesi, bir çok iyon kanalı ve pompayla korunur. Kanallar genellikle hücre içi kalsiyum miktarını arttırmak için çalışır (şekil 2-23):

- Plazma membranındaki voltaj, reseptör ve depo kapılı kanallar

- Endoplazmik retikulum inositol trifosfat reseptör ve Ryanodine reseptör kapılı kanallar

Bazı kanallar da hücre içi fazla kalsiyumu dışarı pompalamak için çalışır:

- Ca^{2+} -ATPaz pompası
- Plazma membranındaki $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ deęiřtirici
- Endoplazmik retikulumdaki sarco-ER ATPaz



şekil 2-23: Hücre içi kalsiyum dengesini sağlayan kanallar ve pompalar (80).

CICR, kalsiyum ile uyarılan kalsiyum salınımı

Sitoplazmanın kalsiyum dengesini bozulursa ve denge mekanizmaları bu durumu düzeltmezse hücre ölüme gider. Ölüm hücrede biriken kalsiyum miktarına ve hücrenin içinde bulunduğu diğer koşullara bağlı olarak nekroz veya apoptoz şeklinde olur. Örneğin yüksek kalsiyum miktarı mitokondri membranının geçirgenliğini etkileyerek sitokrom c salınmasını ve böylece apoptozu tetikler (şekil 2-24). İçeriye yüksek oranda kalsiyum akışı ise hücre parçalanmasıyla nekrozu tetikler (şekil 2-25) (79).

C.elegans'daki son çalışmalar kalsiyumun nörodejenerasyonda merkezi bir faktör olduğunu göstermiştir (82).

2.6.2. Yaşlanmada kalsiyum dengesi

Yaşlanmanın doğası ve mekanizması hakkında bir çok hipotez vardır. Doğal yaşlanma süreci DNA mutasyonlarından immün sistem ve metabolik fonksiyon bozukluklarına ve toksik ürünlerin birikimine kadar geniş bir yelpazedeki değişiklikleri kapsar. Evrimsel teoriye dayanan yaşlanma hipotezi daha da geniş biyolojik bir görüş açısı sağlamıştır (disposable soma teorisi). Bu hipoteze göre nöronların fonksiyonel ve metabolik stres kaynaklarına cevap verme kapasiteleri “denge rezervi” olarak ifade edilir ve normal yaşlanma, denge rezervlerindeki bir azalma olarak tanımlanır. Yaş ile denge rezervindeki azalmadan nöronların dinlenme durumları veya minimum uyarılmaları etkilenmez. Bu azalma nöronların yüksek uyaranlara ve patolojik durumlara karşı cevabını kısıtlar (79).

Diğer bir hipotez Khachaturian tarafından ortaya atılan “Yaşlanmanın Ca^{+2} hipotezi” dir. Bu hipoteze göre, yaşa bağlı olarak kalsiyum dengesindeki nedeni bilinmeyen düzensizlikler hücre içi serbest kalsiyum düzeyinde uzun süreler boyunca küçük değişikliklere sebep olur, bunların birikimi sonucunda nöron fonksiyonunda yaşla ilgili değişiklikler meydana gelir. “nöron-beyin yaşlanmasının Ca^{+2} hipotezi” beyin yaşlanması ile Alzheimer hastalığı (AH) nöropatolojisinin ilişkisini açıklamak için ortaya atılmıştır. Kalsiyum aracılı sinyal sistemi nöron fonksiyon bozuklukları ve ölümünü ilerleten hücresel değişiklikler içerisinde en önde gelenidir.

Beyin yaşlanmasında kalsiyum hipotezinin en önemli destekçisi elektrofizyolojik deneylerdir. Bu deneyler sinaptik plastisite, öğrenme ve hafızadaki kalsiyum bağımlı işlemlerin yaşlı beyninde değiştiğini göstermiştir (79, 83).

2.6.2.1. Yaşlanma ile kalsiyum kanallarındaki değişiklikler

Beyin hücrelerinde voltaj kapılı kalsiyum kanallarının ekspresyonu nöron gelişiminin pek çok evresinde önemlidir. Nöronların kalsiyum dengesindeki değişikliklerin voltaj kapılı kalsiyum kanallarındaki artışa bağlı olduğuna dair kanıtlar vardır. Artmış kalsiyum akışı nörotoksisiteyle doğrudan ilişkilidir. Memeli hippokampal nöronlarındaki voltajla aktive edilen kalsiyum akışının yaşlanma ile ilişkisinin moleküler mekanizması açık değildir. Yetişkin ve yaşlı farelerin CA1 nöronlarında

yapılan çalışmalarda L-tipi voltaj duyarlı kalsiyum kanallarının (LVSCC) yoğunluğunun yaşlılarda artmış olduğu görülmüştür. Kalsiyum kanallarının yoğunluğundaki artış yaşlı farelerin öğrenme yetileriyle birebir ilişkili bulunmuştur. Yaşla birlikte kalsiyum kanallarındaki bu artışın nöronları yaşlılıkla ilişkili nörodejeneratif hastalıklara karşı korunmasız duruma getirdiği düşünülmektedir. L-tipi kalsiyum kanal blokerlerinin kullanımıyla yaşam süresinin uzatılabileceği ileri sürülmektedir.

Sıçan beyninden hazırlanan sinaptozomlarda artan yaşla birlikte voltaj bağımlı kalsiyum alımının düştüğü saptanmıştır. Yapılan çalışmalar yaşlı sıçanlarda hücre içi kalsiyum yoğunluğunun yetişkinlere oranla oldukça yüksek olduğunu göstermiştir. Bu yüksek konsantrasyon sinapslardaki kalsiyum kanallarını inaktif hale getirebilir. (79).

Pro-inflamasyon interlökinlerinden IL-1beta, hücre yaralanması veya stresi sırasında salınır ve yaşla ilişkili nörodejenerasyonun özelliklerinden biri de nöronda interlökin 1 (IL-1) beta ekspresyonunun artmasıdır. IL-1beta'nın yüksek konsantrasyonu kortikal sinaptozomlarda hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun artışına sebep olur. Yaşla ilişkili IL-1beta artışı membran depolarizasyonunu takiben hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu dramatik bir şekilde arttırır ve kalsiyum dengesindeki bu değişiklikler eksitotoksisteye karşı nöronları korumasız bırakır (79).

2.6.2.2. Yaşlanma ile birlikte nöron plazma membranlarında bulunan kalsiyum pompalarındaki değişiklikler

Yaşlı beyindeki nöronlarda kalsiyum taşıyıcılarının aktivitelerindeki azalmadan dolayı hücre içi serbest kalsiyum konsantrasyonunun düzenlenmesi değişir. Yaşlanmanın nöron plazma membranındaki kalsiyum düzenleyici sistemleri (Ca-ATPaz pompaları ve Na^{+2} bağımlı kalsiyum transport sistemi) azalttığı gösterilmiştir. Özellikle Na^{+2} bağımlı kalsiyum taşıyıcılarının yaşlı sıçanların sinaptik membranlarında genç olanlara göre oldukça azaldığı saptanmıştır.

Plazma membranındaki Ca^{+2} -ATPaz pompaları hücrelerin dinlenme evresindeki serbest sitozolik kalsiyum konsantrasyonunu korur. Ca^{+2} -ATPaz 4 gen tarafından kodlanır. Oluşan mRNA'ların farklı kırılmaları sonucu 9 farklı mRNA oluşur ve bunlardan her biri dokuya özgü bir biçimde dağılım gösterir. Beyindeki Ca^{+2} -ATPaz pompalarını oluşturmak üzere bu 4 genin 3'ünün anlatımı yapılır. Bu pompalar beyin kalsiyum dengesinin korunması için çok önemlidir ve kinetik davranışları yaşlı beyinde

değişir. Bu değişiklikler yaşa bağlı oksidatif strese dolaylı Ca^{+2} -ATPaz'ın oksidatif modifikasyonlarına sebep olabilir. Bu pompalar reaktif oksijen ara ürünlerine (ROS) karşı oldukça duyarlıdır ve yaşlı beyinde oksidatif stresin hedeflerinden biridir (79).

2.6.2.3. Yaşlanma ile birlikte beyin kalsiyum tamponlama sistemindeki değişiklikler

Beyin kapasitesinin yaşla birlikte bozulmasının en önemli sebebi sinaps sayılarındaki azalmadır. Bu sinaptik değişimlere aracılık eden en büyük adaylardan biri sitotoksik rolü gösterilmiş olan Ca^{+2} 'dir. Yaşlı nöronlarda kalsiyum dengesindeki değişiklikler üzerinde yapılan çalışmalar, sitoplazmik kalsiyum sinyalleşmelerinin süresinin uzadığını göstermiştir. Bu olay, hücre içine kalsiyum akışındaki artışla veya kalsiyum miktarını düzenleyen tamponlama sisteminin eksikliği ile açıklanabilir. Bu uzamış kalsiyum sinyalleşmesi lokal eksitotoksik etkilere ve aktif sinapsların ortadan kalkmasına sebep olabilir (79).

2.6.2.4. Yaşlanma ile birlikte beyindeki kalsiyum birikiminin hücresel mekanizması

Yaşlanma L-VSCC aktivasyonu ile hücre içine kalsiyum akışını artırır ve beyin plazma membranındaki Ca^{+2} -ATPaz pompalarını inhibe ederek kalsiyumun hücre dışına atılmasını engeller. Böylece kalsiyum dengesindeki bozukluk ilerler. Artan hücre içi kalsiyum mitokondriye veya ER'ye transport edilebilir. Fakat yaşlanma ile birlikte ER'deki Ca^{+2} -ATPaz'ların aktivitesi artar. Yaşla birlikte mitokondrideki Ca^{+2} -ATPaz aktivitesi ve kalsiyum içeriği bir değişikliğe uğramaz. Nukleustaki kalsiyum miktarlarının yaşla birlikte değişip değişmediği hakkında bir bilgi yoktur (79).

Yaşla birlikte sitoplazmadaki protein kinaz C (PKC) aktivitesi artar ve bu kinazın ER Ca^{+2} -ATPaz pompasını aktive ettiği düşünülmektedir.

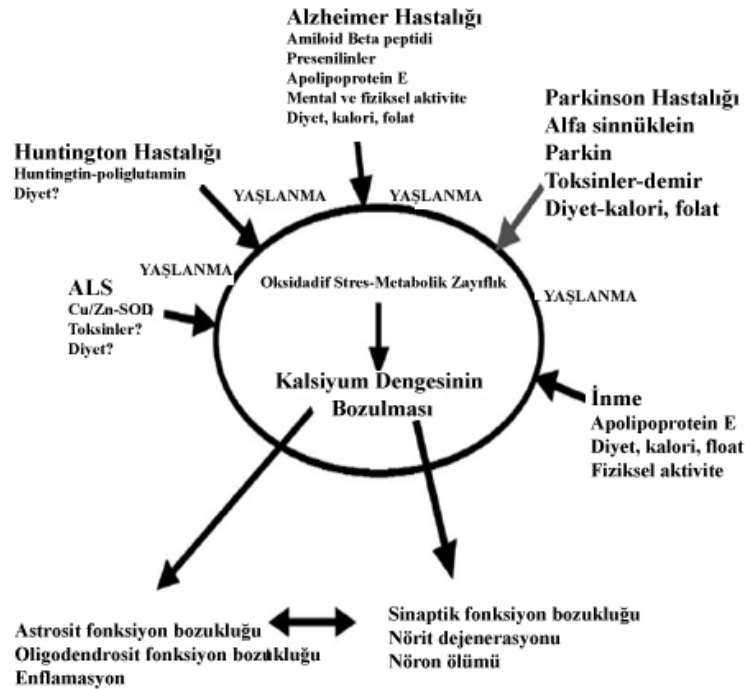
Diğer bir ilginç olay yaşlanma ile birlikte kalsiyum sinyal düzenleyicisi olan regucalcin'in serebral korteks ve hippocampustaki miktarındaki azalmadır. Bu protein nöronlarda kalsiyum bağımlı protein kinazları baskılar. Regucalcin'in bu etkisi yaşla birlikte azalıyor olabilir. Regucalcin ekspresyonundaki düşüş beyindeki kalsiyum dengesinin bozulmasında oldukça önemli olabilir (79).

Kalsiyum dengesindeki bozukluklar sonucu ER'deki protein indirgenmesi sekteye uğrayabilir ve bu da hücrede sitotoksikiteye sebep olabilir (79, 81).

2.6.3. Nörodejenerasyon ve Kalsiyum Metabolizması

Hücrel kalsiyum dengesindeki değişiklikler AH, PH, HH, ALS, inme gibi nörodejeneratif hastalıklarda görülür. Kalsiyum dengesindeki bozukluklar nöronları sinaptik fonksiyon bozuklukları, eksitotoksisite ve/veya apoptoza karşı savunmasız bırakır (84).

Çeşitli nörodejeneratif hastalıklar farklı sebepler sonucunda ortaya çıksa da bozulan kalsiyum metabolizması ve aşırı uyarılan glutamat reseptörleri nöron hasarını tetikleyen olayların merkezinde yer alır. Sinaptik yarığa yüksek miktarda glutamat salınması hücre içi serbest kalsiyum miktarının aşırı oranda yükselmesine sebep olur. Hücre içi seviyesi artan kalsiyum, kalsiyum-bağımlı enzimleri aktive eder ve toksik seviyede nitrik oksit (NO) ve serbest radikallerin oluşmasına, ayrıca glutamat reseptörlerinin aktivasyonuna sebep olur. Böylece nöronun dejenerasyonu başlar (Şekil 2-26) (85).



Şekil 2-26: Bozulan kalsiyum dengesinin nörodejeneratif hastalıklar üzerine etkisi (84).

Alzheimer hastalarının beyin dokularında yapılan analizler sonucu hücrel kalsiyum dengesindeki değişikliklerin nörodejenerasyonla ilişkili olduğu ileri sürülmüştür.

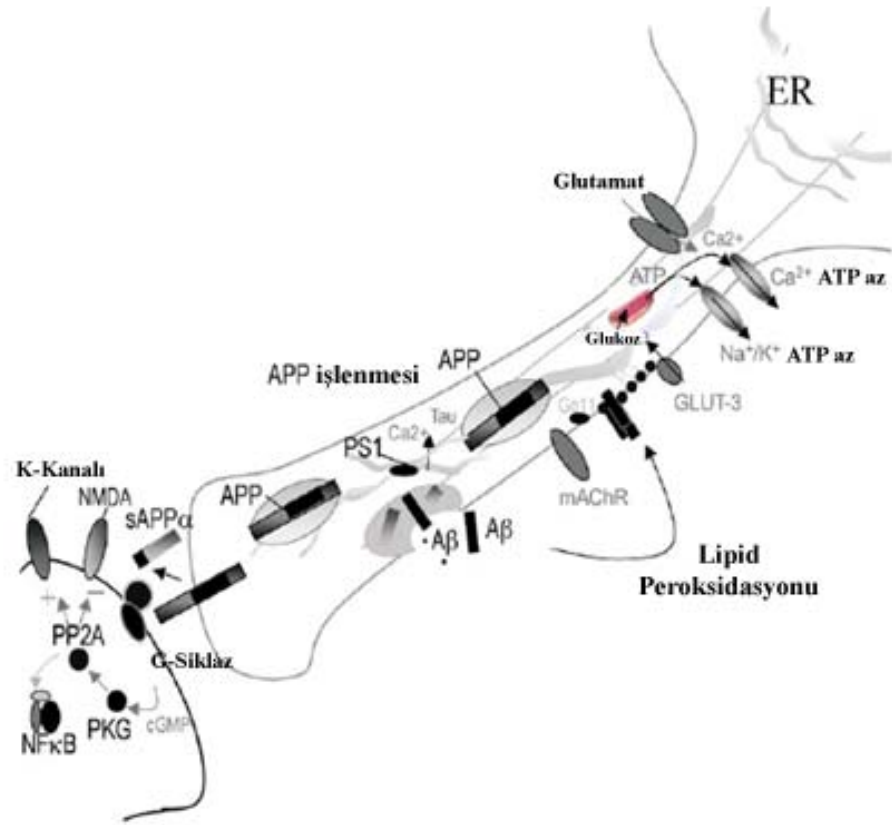
Serbest ve proteine bağı kalsiyum seviyeleri nörofibriller yumaklar içeren nöronlarda içermeyenlere nazaran yüksektir. Ayrıca yine nörofibriller yumak içeren nöronlarda aktif kalsiyum bağımlı proteazların seviyelerinin arttığı gösterilmiştir. Kalsiyum seviyesindeki artış kalsiyum/kalmodulin bağımlı protein kinaz II artışına sebep olarak yumak oluşumunu arttırıp nöronu dejenerasyona karşı savunmasız bırakabilir. Ayrıca AH beyinlerinde kalsiyumla aktive olan bir enzim olan doku transglutaminazın seviyesi artmıştır. Bu enzim in vitro'da tau proteininin çapraz bağlar oluşturmasını engeller.

Kültürdeki nöronlarda yapılan çalışmalar hücre içi kalsiyum seviyesinin yükselmesiyle glutamat reseptörlerinde artış saptanmıştır. Bu artış hücre iskeletinde nörofibriller yumakları andıran yapıların oluşumuna sebep olan değişikliklere yol açmıştır (42, 74, 84, 86).

APP metabolitleri ve nöronal kalsiyum dengesi

AH hastalarındaki en büyük değişikliklerden biri β amiloid öncül proteininin (APP) işlenmesindeki değişikliklerdir. APP'nin kesimi sonucu oluşan 42 aa'lık A β kendi başına birikim oluşturur ve nöronlar için 40 aa'lık peptide nazaran oldukça toksiktir.

Kalıtımsal AH vakalarında APP işlenmesindeki bu değişiklikler APP, presenilin 1 veya 2 genlerindeki mutasyonlarla olur. Sporadik formlarda ise bu mekanizma henüz açık değildir fakat hücre içi kalsiyum miktarındaki artışların rol oynayabileceği düşünülür. Kültür çalışmalarında da kalsiyum seviyelerinin arttırılması A β oluşumunu arttırmış, presenilin 1 mutasyonu ile yine hücre içi Kalsiyum miktarı ve buna bağı A β miktarının arttığı saptanmıştır. A β birikiminin nöron dejenerasyonuna, apoptoz ve eksitotoksisitenin ilerletilmesiyle nöron ölümüne sebep olduğuna inanılır (Şekil 2-27).



Şekil 2-27: Alzheimer hastalığında APP işlenmesindeki değişikliklerin nöron kalsiyum dengesi üzerine etkisi (84).

Kendi kendine birikmesi sırasında Aβ bakır (Cu) veya demir (Fe) gerektiren kimyasal reaksiyonlar aracılığı ile hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri oluşturur. Bu reaktif oksijen ara ürünleri (ROS) membran lipidlerinin peroksidasyonuna sebep olarak membrandaki iyon pompalarının ($\text{Na}^{+2}/\text{K}^{+}$ ve Ca^{+2} -ATPaz), glukoz ve glutamat taşıyıcılarının fonksiyonlarını zayıflatır. Bu da membran depolarizasyonuna ve hücre ATP seviyesinin düşmesine sebep olur. Aβ'nin bu etkisi hücre içi kalsiyum artışına ve glutamat reseptör aktivasyonu ile bu artışın daha da ilerlemesine sebep olur (84, 86).

APP mutant farelerde yapılan çalışmalar Aβ birikimlerinin nöron kalsiyum dengesini in vivo'da bozduğunu ortaya koymuştur.

Aβ tarafından indüklenen lipid peroksidasyonu, perokside olmuş membran yağ asitlerinden üretilen 4-hidroksi-2,3-nonenal (HNE) denilen bir aldehid ile kalsiyum dengesini bozar. HNE, proteinleri sistein, lisin ve histidin kalıntıları ile modifiye eder (Michael eklenmesi). Bu tip modifikasyonlar iyon taşıyıcı ATPaz'lar üzerinde

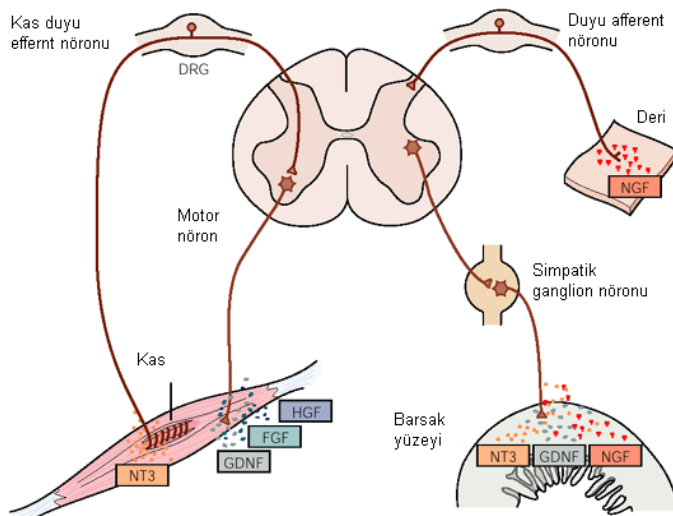
olduğunda ATPaz fonksiyonunu kaybeder ve nöron apoptoza uğrar. Normal bir nöronda HNE oluştuğunda detoksifiye edilir fakat AH hastalarında HNE'nin nöronlarda ve serebrospinal sıvıda arttığı saptanmıştır. HNE tarafından değiştirilen proteinlerden biri de tau'dur (84).

A β 'nin kendisinin membranda kalsiyum taşıyıcı porlar oluşturduğu saptanmıştır. Bunu oluşturan 11 aa'lık A β parçasının in vivo'da da bulunup bulunmadığı bilinmemektedir. Ayrıca A β , ER ve mitokondrideki kalsiyum düzenlemesini de etkiler. Tüm bunlar sAPP'nin düşen seviyelerinin kalsiyum dengesini bozduğunu ve nöron dejenerasyonuna sebep olduğunu göstermektedir (42, 84, 86).

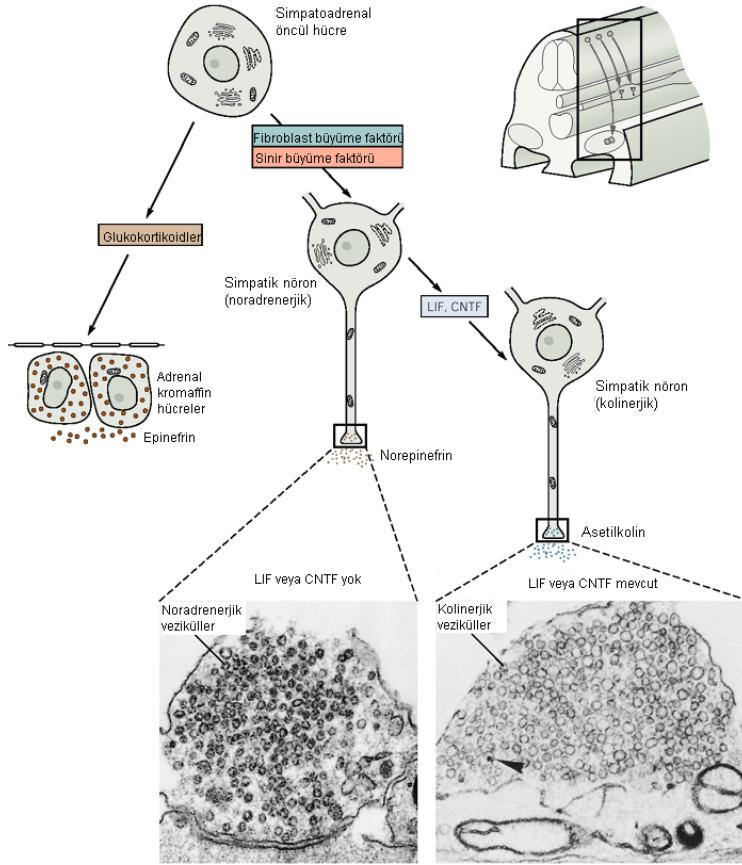
2.7. Nörotrofik Faktörler

Parakrin veya otokrin etki gösteren nörotrofik faktörler, salgılanan peptidlerdir. Büyüme faktörü olarak iş görürler. Fenotip gelişiminde, sinir sisteminin gelişiminde, spesifik nöronların hayatta kalmasını sağlamada, aksonal büyümeyi uyarmada, aksonların hedefe ulaşmasını sağlamada ve sinaps oluşumunu yönlendirmede etkilidirler.

Farklı nöron tipleri farklı nörotrofik faktörlere bağımlıdır (Şekil 2-28). Örneğin, nöral kristadaki Kromafin hücrelerinin öncülleri adrenal beze göç ederler. Adrenal korteksten salınan NGF, bu öncül hücreleri nörepinefrin sentezleyen sempatik nöronlara farklılaştırır ve bu nöronlar lösemi inhibe edici faktör (LIF) içeren bir ortamda kültüre edildiklerinde kolinerjik özellik kazanıp asetilkolin sentezlerler (Şekil 2-29) (87).



Şekil 2-28: Farklı nörotrofik faktörlerle uyarılan nöronlar (87).



Şekil 2-29: Nöronların nörotrofik faktörlerle bağlı olarak farklılaşması (87).

Nörotrofik faktörler 4 süper aile halinde gruplandırılır (Şekil 2-30):

1. Sinir büyüme faktörü (NGF) süper ailesi
NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5, NT-6
2. Glia kökenli büyüme faktörü (GDNF) ailesi
GDNF, Neurturin (NTN), pershepin (PSP) ve artemin (Art)
3. Nörokin veya nöropoietin süper ailesi
Lösemi inhibitör faktör (LIF), siliar nörotrofik faktör (CNTF), IL-6, cardiotrophin-1 (CT-1), oncostatin-M
4. Nöron kökenli olmayan büyüme faktörleri süper ailesi
Asidik fibroblast büyüme faktörü (aFGF veya FGF-1), bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF veya FGF-2), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), kemik morfogenezik protein (BMP), epidermal büyüme faktörü (EGF).

Nörotrofik faktörlerin reseptörleri 3 ana grup altında incelenir (Şekil 2-30):

1. NGF süper ailesi reseptörleri:

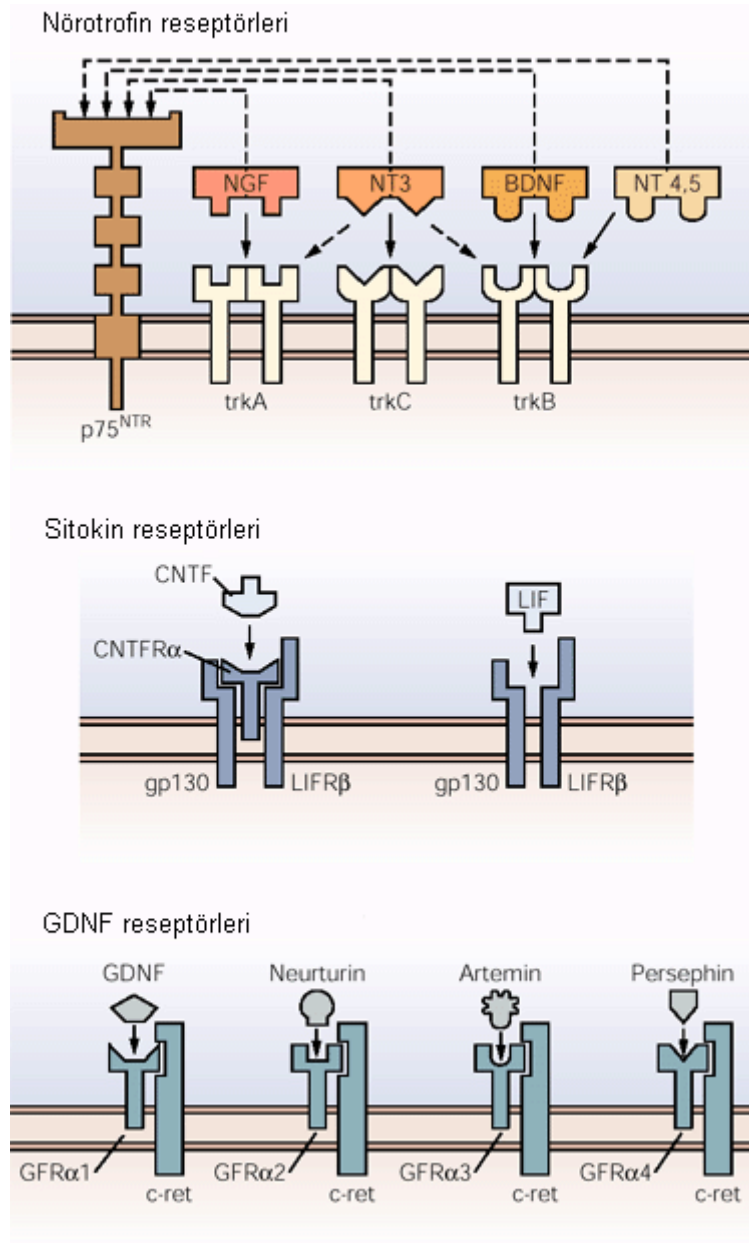
Reseptör tirozin kinazlar; TrkA, TrkB, TrkC ve p75

2. GDNF ailesi reseptörleri:

Ret reseptör kompleksi ve büyüme faktörü reseptörü; GFR α 1-4

3. Nörokin süper ailesi:

Gp130 ve lösemi inhibitör faktör reseptörü beta (LIFR- β)

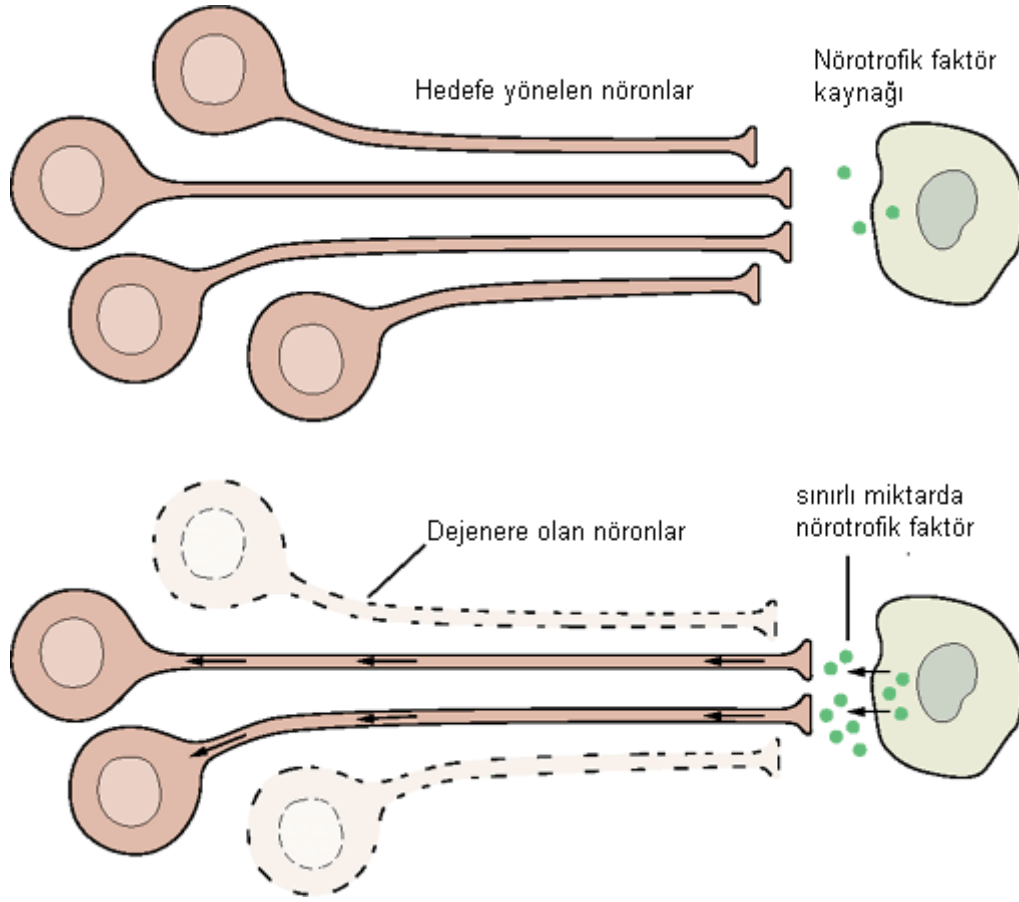


Şekil 2-30: Nörotrofik faktörler ve reseptörleri (87).

2.7.1. Sinir Büyüme Faktörü (NGF)

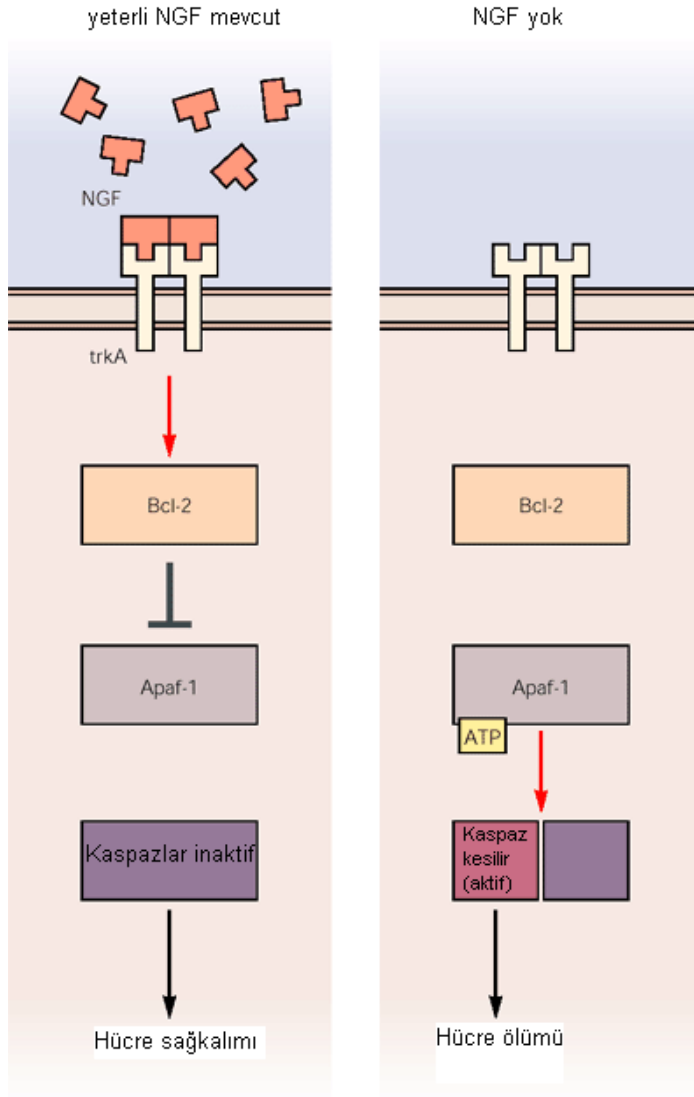
Viktor Hamburger ve Rita Levi-Montalcini 1950’de, hedef dokuların, nöron sağ kalımını düzenlemede kritik bir rol oynadığını belirlediler. Hamburger’ın eski öğrencisi olan Elmer Bueker, fareye çeşitli tümör dokularını implante ederek, tümörlerin duyu nöronlarının sağ kalımı için değişik bir periferik hedef olarak destek sağlayıp sağlayamayacağını araştırdı. Bu deneyde transplante edilen sarkoma dokularının duyu aksonlarının tümörün içine doğru büyümesine yardımcı olduğunu gözlemledi. Ayrıca implante edilmiş tümör tarafında bulunan dorsal kök gangliyonlarının, omuriliğin diğer tarafında buna karşılık gelen gangliyonlara oranla çok daha büyük olduğunu belirledi. Daha sonraki deneyler, sarkoma hücrelerinin etkisinin dokuda yayılabilen bir faktörden kaynaklandığını gösterdi. Levi-Montalcini, in vitroda tümör dokusunun, duyu ve sempatik gangliyonlardaki aksonların büyümeleri ve nöronların sağ kalımı üzerindeki etkisini ölçtü. Cohen ve Levi-Montalcini nörotrofik aktivitenin kaynağını belirlerken, önce örneklerde DNA ve RNA’dan kurtulmayı denediler. Nükleik asitleri indirmek amacıyla fosfodiesteraz kaynağı olan yılan zehiri kullandılar. Ancak yılan zehiri, deneyde kullandıkları etken maddeden daha fazla akson büyümesine yol açtı. Cohen yılan zehir bezinin fare submaksillar bezine denk olduğunu ve her ikisinin de kullandıkları etken madde için zengin bir kaynak olduğunu saptadı. Levi-Montalcini ve Stanley Cohen, NGF olarak isimlendirilen bu molekülü izole etmeyi başardılar. İzole edilen bu molekül 130,000Da ağırlığında, üç alt üiteden oluşan bir kompleks idi ve aktif kısmı 118 amino asitlik bir dizi olan ve homodimer yapıdaki β alt ünitesiydi (87).

NGF’nin keşfinden sonra ortaya atılan nörotrofik faktör hipotezine göre, nöronlar aksonlarını hedef hücreye kadar uzatırlar. Hedef hücreler ise sınırlı miktarda nörotrofik faktör salgırlar. Nörotrofik faktörler özel hücre reseptörlerine bağlanır ve yeterli miktarda nörotrofik faktör alamayan nöronlar apoptoz ile ölür (Şekil 2-31).



Şekil 2-31: Nörotrofik faktör hipotezi (87).

Örneğin, NGF'nin reseptörü olan trk'ya bağlanması Bcl-2 adı verilen bir molekülü aktif hale geçirir. Bu şekilde apoptotik yolda bir sonraki molekül olan Apaf1 baskılanır ve apoptoza yol açacak olan kaspazlar inaktif hale gelir. Ancak yeterli NGF'nin olmadığı durumlarda bu sinyal alınmayacağından Bcl-2 aktif hale geçemez ve Apaf 1 baskılanamaz. Böylece aktif kalan Apaf 1 tarafından kesilen kaspaz aktif hale geçer ve apoptoz gerçekleşir (Şekil 2-32) (87).



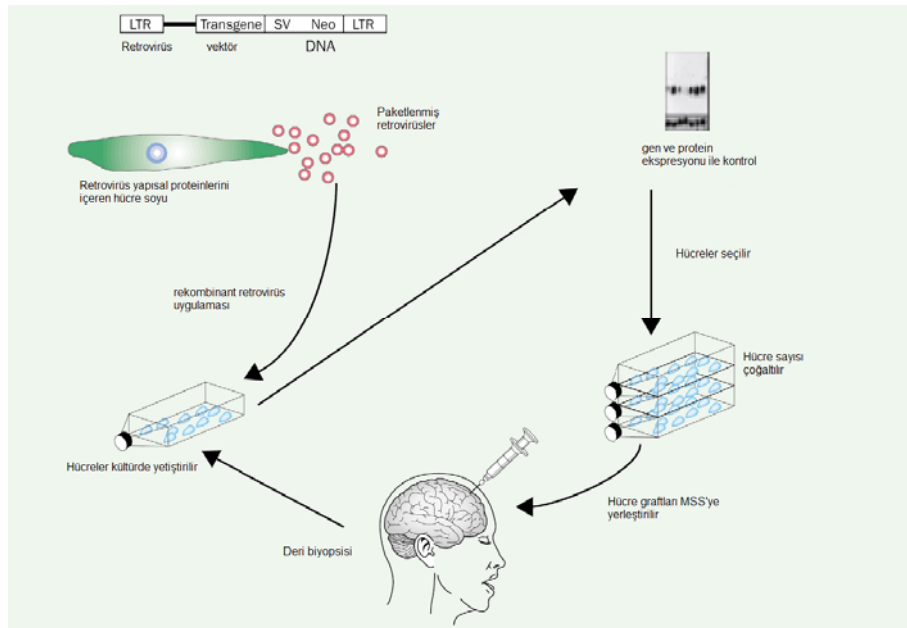
Şekil 2-32: NGF’ye bağlı hücre sağkalımı ve apoptoz (87).

Alzheimer hastalığında oluşan amiloid plaklar ve nörofibriler yumaklar kolinerjik sistem nöronlarının hasarlanmasına yol açar. Bu sistem, nörotransmitter olarak asetilkolin ve norepinefrin kullandığı için kolinerjik sistem olarak adlandırılır. Kolinerjik sistem bilgileri işleyen ve beyin fonksiyonlarını düzenleyen sinir hücrelerini içerir. Bu sistemdeki nöronların azalması asetil kolin ve norepinefrin sinyalizasyonunda da azalmaya sebep olur. Bu nöronların hayatta kalması büyük oranda NGF almalarına bağlıdır (88).

Alzheimer hastalığındaki nöron kayıplarını önlemek üzere ölmekte olan nöronlara NGF sağlamak üzere gen terapisi kullanıldı. Bu çalışmalardaki hedef kolinerjik sistem nöronları dolayısıyla kognitif fonksiyonların (algılama, tepki, hareket,

dil, öğrenme, hafıza) korunmasıydı. NGF gen tedavisinin Alzheimer hastalığını tamamen tedavi etmesi beklenmemektedir. Fakat bu yeni yaklaşım ile belirli beyin hücrelerini koruyarak ve hatta yenileyerek, birkaç yıl süresince kısa dönem hafıza kaybı gibi bazı belirtileri azaltılması umut edilmektedir (89).

2001'de California Üniversitesi San Diego Tıp Fakültesinde gerçekleştirilen çalışmada hastaların kendi deri hücrelerinden alınan hücreler içine sinir sistemi dokusundan elde edilen NGF genleri sokuldu. Üç aylık bir süre boyunca bu transgenik hücreler kültürde büyütüldü. İmplantasyon öncesinde transgenik hücrelerin yeterli miktarda NGF ürettikleri ve kontamine maddeler içermedikleri kontrol edildi. Modifiye edilen hücreler hastalara, 5 grup halinde frontal lobun altında bulunan kolinerjik sistem hücrelerini içeren ve Alzheimer'da kognitif fonksiyonların kaybına götüren dejenerasyonun olduğu yerlerden biri olan Meynertin nukleus bazalisinden verildi (Şekil 2-33). 8 adet erken başlangıçlı Alzheimer hastasının (5 kadın ve 3 erkek, ortalama yaş $67,2 \pm 2,6$) dahil edildiği bu çalışma ile NGF gen transplantasyonunun kognitif gerilemeyi **%36 - %51** oranında yavaşlatmayı başardığı saptanmıştır (90). Kolinesteraz inhibitörleri ve memantin gibi geleneksel ilaç tedavilerinin Alzheimer hastalığında kognitif gerilemeyi **%5** yavaşlattığı düşünüldüğünde sonucun Alzheimer hastalarının tedavisi ve bakım problemleri açısından çok daha iyimser bir gelecek vaad ettiği görülmektedir.



Şekil 2-33: NGF gen terapisinde transgenik hücrelerin hastaya transplantasyonu (90).

Ayrıca dejenerasyona uğrayan nöronlara NGF desteğinin invazif olmayan veya daha az invazif yollardan verilmesi, Alzheimer hastalığı ve diğer Nörodejeneratif hastalıklarda kognitif fonksiyonları korumak için yeni hedeflerden biri olacaktır (90).

2.8. Küçük RNA'lar

Küçük RNA'lar bitki ve hayvanlarda bulunan kısa ve kodlayıcı olmayan RNA molekülleridir. Gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynarlar. 1998'de Fire ve arkadaşları tarafından *Caenorhabditis elegans*'da genlerin RNA interferens (RNAi) tarafından susturulduğu keşfedildiğinden beri küçük RNA'lar çalışmaların odağı haline geldiler (91-96).

Küçük RNA'lar farklı yollar kullanarak herhangi bir genin susturulmasını sağlayabilirler. Boyları 19-31 nükleotid arasında değişen kodlama yapmayan bu RNA'lar, mRNA yıkılması, translasyonun baskılanması, heterokromatin oluşumu ve transpozonlara karşı germ serisinin genomunun korunmasında görev alırlar. Küçük RNA'lar kökenlerine veya birlikte hareket ettikleri bileşenlere göre 6 grup halinde sınıflandırılırlar (Tablo 2-4) (92).

Tablo 2-4: Küçük RNA'ların sınıflandırılması ve görevleri (92).

SINIF	UZUNLUK (nt)	GÖREV
Mikro RNA (miRNA)	19-25	Translasyonel Baskılama
Küçük müdahaleci RNA (siRNA)	19-21	Hedef mRNA kesimi
Trans-etkili siRNA (tasiRNA)	21-22	mRNA kesimi
Küçük tarayıcı RNA (scnRNA)	~28	DNA kesimi
Tekrar ilişkili siRNA (rasiRNA)	24-27	Transpozon kontrolü, transkripsiyonel susturma
Piwi ilişkili RNA (piRNA)	26-31	Üreme hücrelerinde transpozon kontrolü

Mikro RNA'lar (miRNA), küçük müdahaleci RNA'lar (small interfering RNA-siRNA), trans-etkili siRNA'lar (trans-acting siRNA-tasiRNA), küçük tarayıcı RNA'lar

(small-scan RNA-scRNA), tekrar ilişkili (repeat associated) siRNA'lar (rasiRNA) ve Piwi ilişkili RNA'lar (Piwi interacting RNA-piRNA) küçük RNA grubunun üyeleridirler. En fazla 22 nükleotid uzunluğunda olan ve saç tokası yapısındaki öncüllerden kökenlenen miRNA'lar, kurtçuk, sinek, zebra balığı ve memelileri de kapsayan metazoanlarda translasyonu baskılamakla görevlidirler. siRNA'lar uzun, Dicer tarafından işlenmiş, çift iplikli RNA'lardır ve herhangi bir geni ona ait mRNA'sını keserek sustururlar. siRNA'ların, RNA viruslerinin enfeksiyonuna karşı doğal bir savunma sistemine aracılık ettiklerine inanılır. siRNA'nın bu özelliklerinden yararlanılarak memeli hücrelerindeki bir çok gen, bu genlere ait mRNA'lar hedeflenerek susturulabilmektedir. tasiRNA'lar mRNA indirgenmesini tetikleyen endojen siRNA'lardır, fakat fonksiyonlarını trans olarak gerçekleştirirler. Bunların hedef transkriptleri oluştukları genden farklıdır. *Tetrahymena thermophila*'da bulunan ~28 nükleotidlik scnRNA'lar histon metilasyonunda ve DNA'nın ortadan kaldırılmasında rol oynayarak genomun yeniden düzenlenmesini sağlarlar. rasiRNA'lar, siRNA'lardan daha uzundurlar ve maya, bitki ve sineklerde tekrarlanan ve hareketli genetik elementleri sustururlar. Son çalışmalar sineklerdeki rasiRNA'ların memelilerdeki piRNA'lar ile benzer olduğunu göstermiştir. piRNA'lar spermatogenez sırasında germ hücre serisine özel Piwi proteini ile birlikte transpozonları susturur ve germ soyu kök hücrelerini korurlar (92, 97).

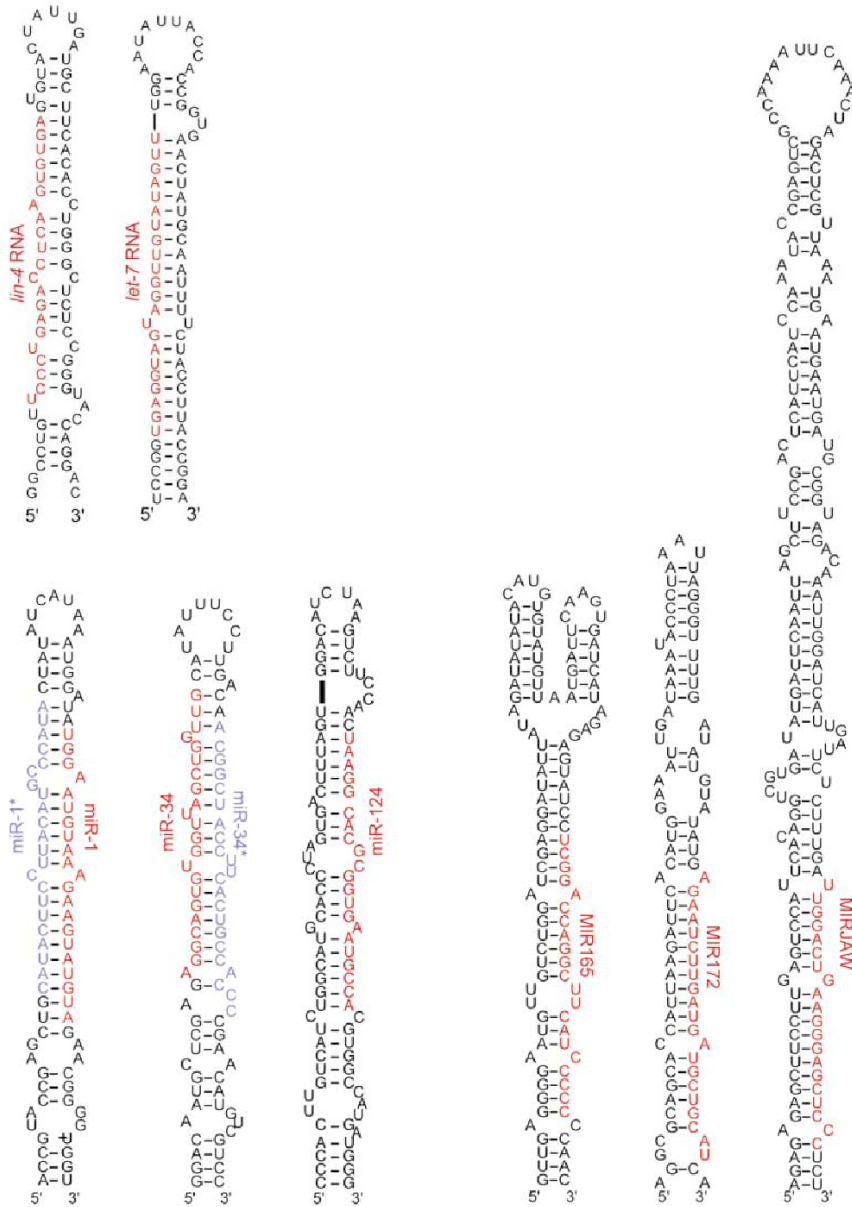
Farklı tip ve büyüklükte olmakla birlikte kodlama yapmayan tüm küçük RNA'lar hücrede gen ekspresyonunun epigenetik düzenlenmesi olarak isimlendirilen eşsiz bir fonksiyona sahiptirler (91, 92, 97).

2.8.1. mikroRNA'lar

2.8.1.1. miRNA genomik yapısı ve biogenezi

miRNA genleri tüm kromozomlarda bulunur. miRNA'ların yarısı polisistronik primer transkriptler olarak transkribe edilirler. miRNA genleri kodlama yapan ve yapmayan genlerin intronlarında, ayrıca kodlama yapan genlerin ekzonlarında bulunurlar ve RNA polimeraz II tarafından 5' ucunda m⁷G şapkası ve 3' ucunda poli A kuyruğu olan bir öncül molekül olarak transkribe edilirler (Şekil 2-34). miRNA geninin bu uzun primer transkripti (pri-miRNA), ~70 nükleotid uzunluğundaki öncül miRNA'yı (pre-miRNA) oluşturmak üzere Drosha-DGCR8 kompleksi (*Drosophila* ve *C.elegans*'da Pasha) tarafından kesilir. Drosha, RNaz III ailesinden bir endonükleazdır,

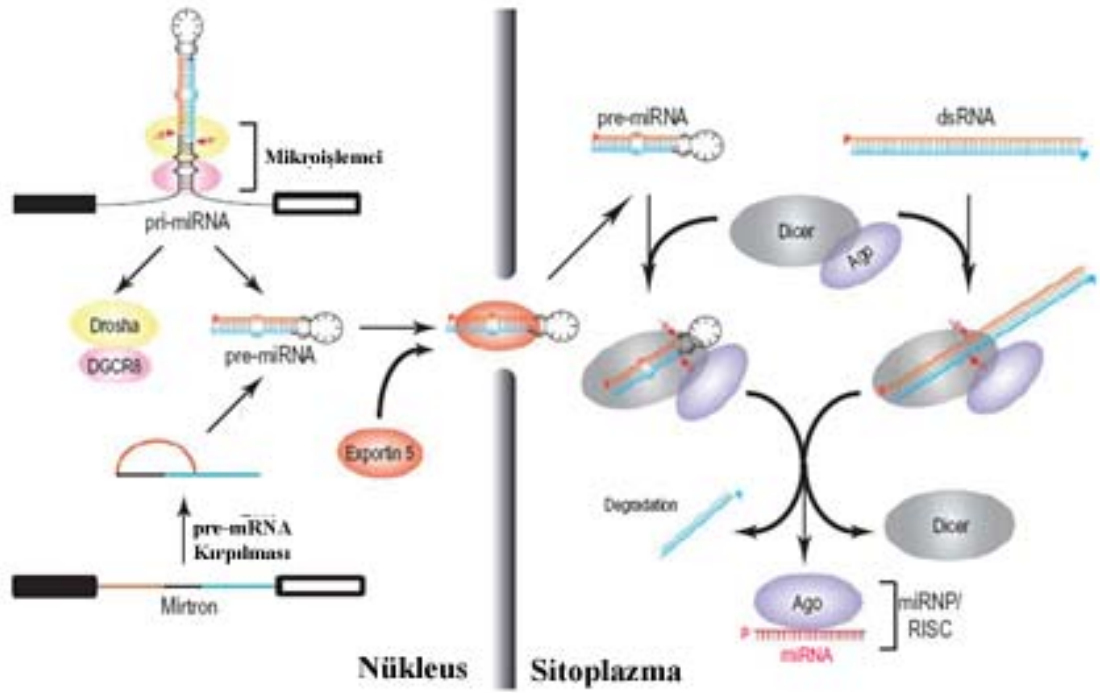
iki RNaz III bölgesi ve çift iplikliRNA bağlanma bölgesi içerir. Drosha, kompleksin kesim işlevini yerine getiren kısımdır. DGCR8, çift iplikli RNA bağlayan bir proteindir (dsRBP) ve kesim yapılacak bölgenin tam olarak belirlenmesini sağlar. Nukleustaki bu ilk işlemde sonra kısa saç tokası yapısına sahip olan pre-miRNA, nuklear eksport faktörü Exportin-5 tarafından tanınarak nuklear porlar aracılığı ile nukleustan sitoplazmaya taşınır. Pre-miRNA sitoplazmada Dicer tarafından işlenerek olgun bir miRNA oluşturulur (Şekil 2-35) (91-96).



Şekil 2-34: Metazoa miRNA örnekleri (91).

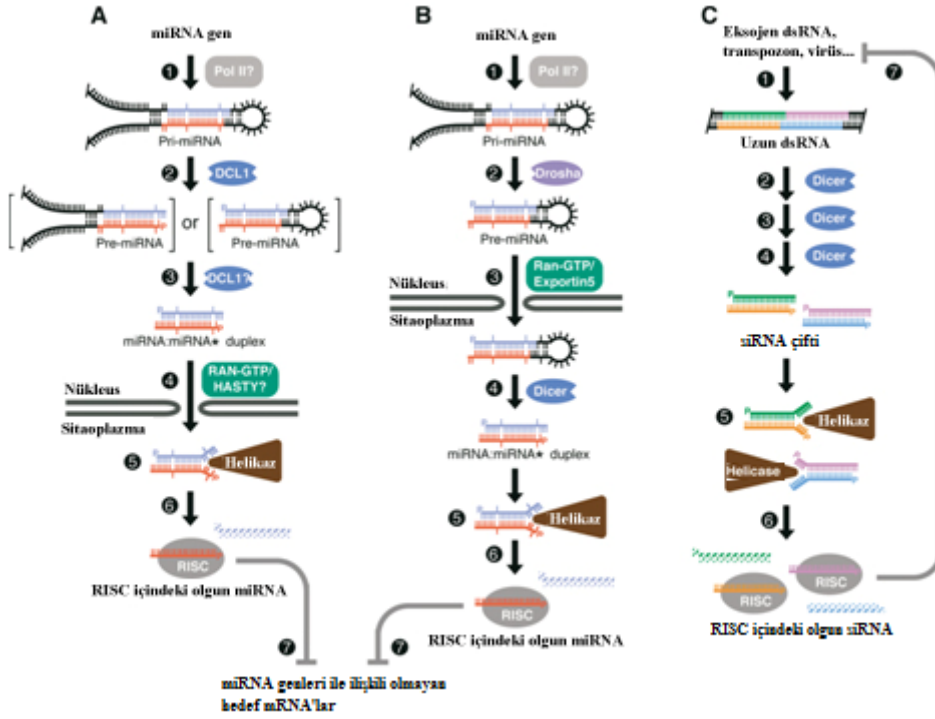
Dicer yüksek oranda korunmuş sitoplazmik bir proteindir ve RNaz III protein ailesinin bir üyesidir. Diğer RNaz III üyeleri gibi dsRBP'ler ile ilişkilidirler. Memeli

hücrelerinde Dicer, transaktivasyon-cevap element RNA-bağlayan protein (TRBP) ve interferon ile indüklenen protein kinazın protein aktivatörü (PACT) ile birlikte bulunur. Dicer ile birlikte bulunan bu proteinler RNA kesimi için gerekli değildir. Buna rağmen bu proteinler çift iplikli miRNA'nın çözüldüğü ve miRNA ile indüklenen susturma kompleksine (miRISC) yüklendiği bir sonraki basamakta rol oynarlar (91-93, 95, 97).



Şekil 2-35: miRNA işlenmesi (94).

RISC, miRNA'nın 500 kDa'luk ribonükleo protein kompleksine (miRNP) yüklenmesi sonucu oluşur (98). RISC'e yüklenme aşamasında miRNA'nın sadece bir zinciri yüklenirken diğeri ortadan kaldırılır. Zincir seçiminin, miRNA zincir çiftinin iki ucunun termodinamik kararlılığına göre yapıldığı düşünülür. 5'ucu daha az kararlı olan zincir RISC'e yüklenirken, diğeri zincir salınır veya parçalanır (Şekil 2-36). Dicer'in kendisi bir ölüm-kutusu helikazıdır (DEAD-box helicase) ve RNA'nın çözülmesini sağlar. İnsan hücrelerinde bulunan RNA helikaz A'nın bir RISC kofaktörü olarak rol oynadığı ve siRNA'nın RISC'e yüklenmesini sağladığı bulunmuştur, fakat bu mekanizmanın nasıl çalıştığı tam olarak bilinmemektedir (91-93, 95).

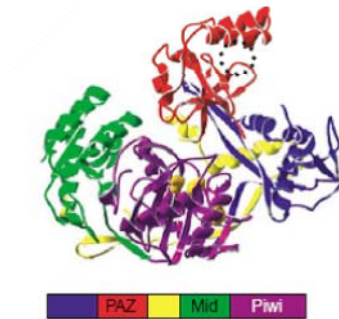


Şekil 2-36: miRNA ve siRNA'ların biogenezi (91).

Bitki miRNA'ları (A), metazoa miRNA'ları (B) ve hayvan siRNA'ları (C) biyogenezi.

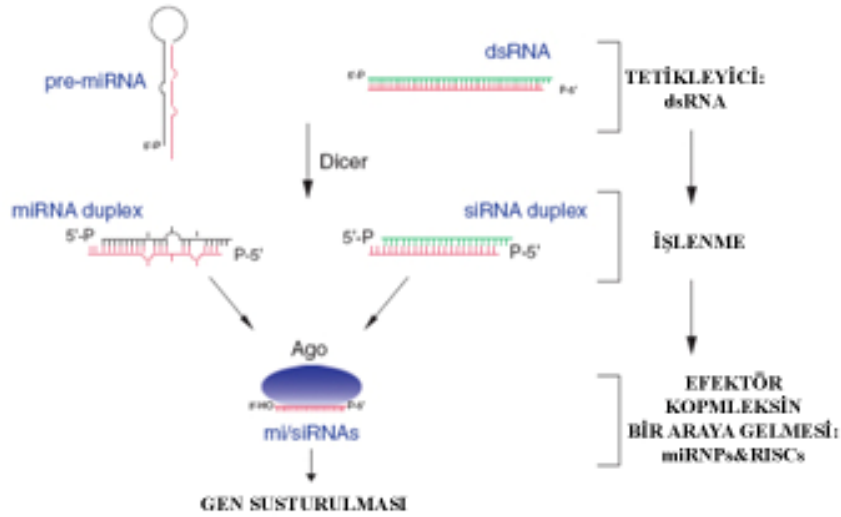
2.8.1.2. miRISC'in anahtar bileşenleri olan Argonaute proteinleri

miRISC Dicer, TRBP, PACT ve Germin 3 gibi proteinlerle ilişki halindedir, fakat miRNA ile direkt ilişkiye giren proteinler Argonaute (Ago) proteinleridir. Bu proteinler 4 bölgeden oluşurlar: N-ucu, PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille), orta ve Piwi (P-element induced wimpy testis) bölgesi (Şekil 2-37). PAZ bölgesi rehber miRNA'nın 3' ucuna bağlanırken diğer bölgeler hedef ve rehber miRNA'lara bağlanmak üzere eşsiz bir şekil oluştururlar (91-96).

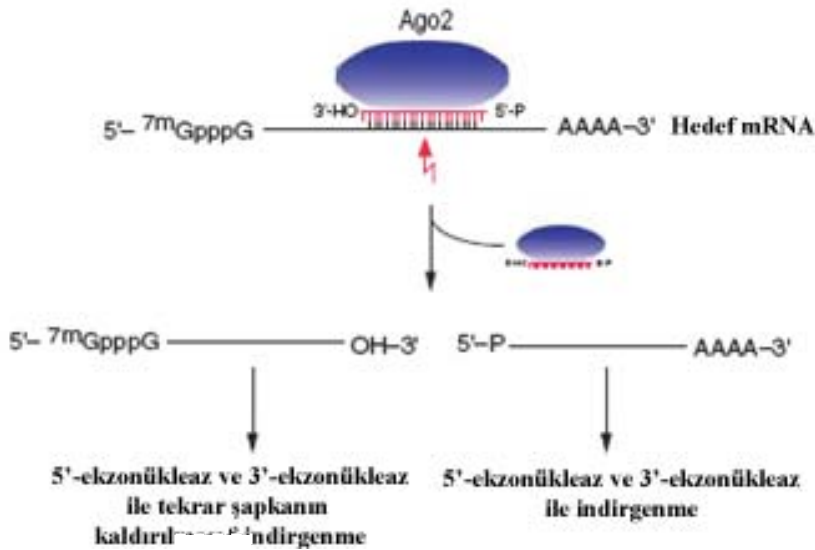


Şekil 2-37: Ago proteininin yapısı (93).

Memeli hücrelerinde endojen miRNA'lara bağlanabilen 4 Ago proteini bulunmuştur. Ago proteinlerinin dizilerindeki benzerliğe rağmen sadece Ago 2 endonükleaz aktivitesine sahiptir. Bu yüzden insan Ago 2 proteini sadece miRISC ile değil aynı zamanda siRISC ile de birlikte çalışır (Şekil 2-38). Memelilerdeki Ago proteinlerinin rolleri henüz tam olarak bilinmemektedir. Fakat *Drosophila*'ya ait Ago 1 ve Ago 2 proteinlerinin iki farklı yolda görev aldığına dair genetik ve biyokimyasal bulgular vardır. Buna göre Ago 1 translasyonun baskılanmasında miRNA ile birlikte işlev gösterirken Ago 2 hedef mRNA'ların kesilmesinde siRNA ile birlikte çalışır (Şekil 2-39) (91-96).



Şekil 2-38: Ago proteininin miRNA ve siRNA'ların biogenezindeki rolü (94).



Şekil 2-39: Ago 2 taşıyan miRNP ile hedef RNA'nın kesilmesi (94).

Yapılan çalışmalarda Ago proteinlerinin sitoplazma içerisindeki belli bölgelerde yoğunlaştığı saptanmıştır. Bu bölgelere mRNA P-cisimcikleri (mRNA P-bodies) denir. P-cisimcikleri (DCP veya GW cisimcikleri olarak da bilinirler) translasyonu yapılmamış mRNA'yı (non-translating mRNA), mRNA yeniden düzenlenmesinde ve şapka oluşumunda rol oynayan, translasyonu baskılayan ve ekzonükleaz aktivitesine sahip olan proteinleri içerirler. P-cisimciklerinin miRNA aracılı gen susturmasında hedef mRNA'nın depolandığı veya yok edildiği yer olduğuna inanılır (91, 92, 99).

2.8.2. Küçük müdahaleci RNA'lar (siRNA)

RNAi yolağı ekzojen bir çift iplikli RNA'nın sitoplazmaya girişi ile tetiklenir. Endojen miRNA'lar gibi uzun çift iplikli RNA'lar da Dicer-TRBP-PACT kompleksi tarafından işlenirler. Bu çift iplikli RNA-işleme basamağı 3' ucunda 2 nükleotidlik çıkıntı ve 5' ucunda fosfat grubu taşıyan bir RNA'nın ortaya çıkmasını sağlar. Dicer kesimi sonrası oluşan ürün siRNA olarak adlandırılır ve RNAi mekanizması ekzojen olarak hücreye giren siRNA'lar ile de aktif hale geçer. siRNA'nın karşı anlamlı zinciri *rehber zincir* olarak isimlendirilir. Çünkü bu zincir RNAi mekanizmasında diziye özel gen susturulması için kalıp görevi görür. Anlamlı zincir ise *yolcu zincir* olarak tanımlanır (92, 93, 95, 97).

Dicer işlemini takiben 21-23 nükleotidlik çift zincirli siRNA'nın rehber zinciri aktif siRISC kompleksini oluşturmak üzere Ago2'ye yüklenir, bu sırada yolcu zincir ortadan kaldırılır. Ago2 siRISC'in kesim aktivitesinden sorumlu olan endonükleazdır. siRNA rehber zinciri ile hedef mRNA arasındaki mükemmel baz eşleşmesi ve A-formu heliks yapısının oluşumu ile siRISC hedef mRNA'yı, rehber siRNA'nın 5' ucundan 10-11 nükleotid uzaklıktaki bölgeye denk gelen yerden keser. Bu işlemde sonra kompleks diğer hedef mRNA'ları kesmek üzere dağılır. siRISC tarafından kesilen mRNA ise ekzonükleazlar tarafından yıkılırlar (Şekil 2-36) (92, 93, 95).

RNAi mekanizmasının keşfedilmesiyle birlikte siRNA'lar özel genlerin susturulması için yeni bir tekniğin geliştirilmesini sağladı. Böylece hücre içine kolay girebilecek ve istenilen genin susturulmasını sağlayacak siRNA'lar tasarlanmaya başlandı (92). Bu yeni teknik post-transkripsiyonel gen susturulması (PTGS) olarak bilinir ve belirli bir genin anlatımını, karşı anlamlı zinciri hedef mRNA'ya birebir uyumlu siRNA'lar ile baskılamayı sağlar. Baskılanma sinir sistemini de içine alan belirli dokularla sınırlı olmasına rağmen, *Caenorhabditis elegans* gibi bazı

organizmalarda uygulamanın olduğu alandan dokunun en uzak bölgelerine kadar yayılarak seçilen genin tüm organizmada susturulmasına olanak sağlar (97).

RNAi ile gen susturulması geçicidir, fakat hedef doku veya hücre soyu viral vektörlerle transfekte edilip kendiliğinden çift iplikli RNA ekspresyonu yapmaları sağlandığında, baskılama kalıcı duruma getirilebilir. Bu tip anlatım sürekli veya indüklenabilir bir promotörün kontrolü altında gerçekleştirilir. Böylece istenilen zamanda susturma işlemi uyarılabilir. RNAi'lerin özgün olmayan bazı etkileri bildirilmişse de, uygun kontroller ve fizyolojik takip deneyleri ile RNAi tekniği modern genetiğin en önemli araçlarından biri haline gelmiştir. Örneğin RNAi ilaçların ve kimyasal hedeflerin onaylanmasında kullanılabilir. Ayrıca özgün bir şekilde kırılan ekzonları hedefleyebilir, böylece bir genin alternatif kırılma ile oluşan ürünlerinin araştırılmasında kullanılabilir. Heyecan verici diğer bir olasılık belirli fizyolojik işlemlerde görev alan aday genlerin belirlenmesinde RNAi teknolojisinden (genom düzeyinde RNAi taraması ile) yararlanabilmektir (97).

RNAi ile gen susturulması post-transkripsiyoneldir ve böylece gen delesyonunda olduğu gibi kompanse edici transkripsiyon mekanizmalarının hiçbiri ortaya çıkamaz. RNAi özgün ve çoğunlukla tek bir nükleotid değişimine bile duyarlıdır. Gen susturulmasını sağlayan RNAi tekniği uygulama dozuna bağlı olarak mRNA ekspresyonunu embriyonik ölüm tehlikesi olmadan ve kompanse edici gen regulasyonu riskini azaltarak düşürür. Ek olarak RNAi hızlı, diğer tekniklere göre daha ucuz ve bir çok durumda genomik gen delesyonu kadar etkilidir (97, 100).

RNAi, özellikle genomu dizilenmiş olan meyva sineği *Drosophila melanogaster*, yuvarlak kurtçuk *C. elegans* ve fare gibi model organizmalarda oldukça güçlü bir tekniktir. İnsan nöral ve nöromuskular hastalıklar için bir çok deneysel model bu üç organizmada başarıyla oluşturulur (97).

Bir RNAi çalışması için öncelikle hedef RNA'yı belirleyecek olan siRNA doğru şekilde tasarlanmalıdır. siRNA tasarımına yardımcı olan web tabanlı programlar kullanılabilir. siRNA ne kadar düzgün tasarlanmış olsa da bu onun yüksek verimlilik ile çalışacağını göstermez. İkinci olarak hedef mRNA'nın seviyesi ve bu mRNA'dan oluşacak olan protein ürün kontrol edilerek, siRNA aktivitesi belirlenmelidir. Northern analizi ve ters transkriptaz-kantitatif PCR teknikleri mRNA seviyesinin saptanmasında kullanılabilir. Protein seviyeleri de immunokimyasal metodlarla belirlenebilir. Protein

susturulma seviyesi hedef proteinin yarı ömrüne bağlıdır. Uzun yarı ömürlü proteinlerin seviyelerinin düşmesi kısa yarı ömürlü olanlara göre daha uzun süre alacaktır. Son olarak da siRNA'nın hücre içine girişini sağlayacak metod oldukça önemlidir. Hücre içine giriş ne kadar zayıf olursa susturma da o kadar zayıf olacaktır (100).

2.8.3. Kültürdeki memeli hücrelerine siRNA gönderilmesi

Çıplak, modifiye edilmemiş siRNA'ların memeli hücrelerinin içinde bulunduğu kültür medyumuna eklenmesi hedef genin etkili bir şekilde susturulmasını sağlamaz. Bunu 3 sebebi vardır: 1- Memeli hücreleri C.elegans gibi diğer türlerde bulunan etkin bir çift iplikli-RNA-alma mekanizmasına sahip değildir 2- siRNA yüksek oranda yüklüdür ve serbest olarak sitoplazmik membrandan geçemez 3- siRNA'nın sıvı-faz endositoz ile hücre içine alınması, sitoplazmaya salınması ile sonuçlanmaz. siRNA sitoplazmaya etkili bir şekilde gönderilemezse RISC ile etkileşime giremez ve hedef mRNA susturamaz (100).

2.8.3.1. Kimyasal ajanlarla siRNA aktarımı

siRNA bir nükleik asit olduğundan DNA transfeksiyonu için kullanılan ajanlar siRNA transfeksiyonunda da kullanılabilir. Nükleik asit transfeksiyonunda kullanılan ajanların iki temel özelliği vardır. Birinci olarak bu ajanlar bir şekilde nükleik asit kargosuyla ilişkiye girmek zorundadır. Bu ilişki genelde nükleik asit oluşumuna izin veren elektrostatik güçler kullanılarak sağlanır. Böyle bir kompleksin düzgün olarak şekillendirilmesi nükleik asit ve transfeksiyon ajanının aynı anda hücre membranına sunulmasını sağlar. Bu kompleksler hücre içine girişi sağlayan ajanların doğasına göre 3'e ayrılır: lipopleksler, polipleksler ve lipopolipleksler. Lipopleksler, aniyonik nükleik asitlerin katyonik lipidlerle; polipleksler, aniyonik nükleik asitlerin katyonik polimerlerle; lipopolipleksler, aniyonik nükleik asitlerin hem katyonik lipid hem de polimerlerle ilişkisi sonucu oluşur (100).

İkinci olarak transfeksiyon ajanları hücre membranını geçebilmelidir. Lipopleks ajanlar endositoz ile sitoplazmaya geçerler (100).

Transfeksiyon ajanının etkisi hücre tipine bağlıdır. Ayrıca hücre yoğunluğu, pasaj sayısı ve medyum içeriği transfeksiyon başarısını değişik derecelerde etkiler. Transfeksiyon ajanları bir çok hücre tipine siRNA girişine izin vermesine rağmen, T hücrelerinden kökenlenen hücre soyları ve primer kültürler bu tip transfeksiyona karşı

daha dirençlidir. Problemlı hücre tiplerinde elektroporasyon alternatif bir aktarım metodudur. Elektroporasyon yöntemiyle transfeksiyon oldukça yüksek oranlarda gerçekleşir fakat çok fazla sayıda hücre kaybına neden olur (100).

2.8.3.2. siRNA ekspresyonu yapan vektörlerin aktarımı

Sentetik siRNA aktarımının alternatif yollarından biri hücre içinde siRNA ekspresyonu yapan bir vektör kullanmaktır. Bu vektörler siRNA transkriptlerinin ekspresyonunu sağlayan RNA polimeraz III promotörlerini taşırlar. Polimeraz III belirli RNA transkriptlerinin düzgün şekilde sentezlenmesine olanak sağlayarak, tasarlanmış siRNA'ların üretilmesine izin verir (100).

2.8.3.3. siRNA eksprese eden kasetlerin aktarımı için viral metodların kullanılması

siRNA eksprese eden vektörlerin virüslerle aktarımı kimyasal ve mekanik metodlara göre daha başarılıdır. siRNA eksprese eden plazmidlerde olduğu gibi Pol III promotörleri kullanılır. Viral aktarım ile uyarılan RNAi ilk kez fare kök hücre virüsü (MSCV) ve Moloney murine lösemi virüsünden (MoMLV) kökenlenen retrovirüsler kullanılarak gösterilmiştir. Bu retroviral sistemler ekspresyon için hücre bölünmesine ihtiyaç duyarlar. Lentivirüslerden kökenlenen retroviral vektörler ise bölünmeyen hücreleri kalıcı olarak enfekte edebilirler. Pol III siRNA ekspresyon kasetleri içeren lentiviral vektörler HeLa, HEK293, fare embriyonik fibroblastlar, primer T hücreleri ve hematopoietik kök hücreleri gibi hücre soylarını transfekte edebilirler. MoMLV gibi retrovirüsler ve lentivirüsler konak genomunun içine yerleştikten, bunlar hücre soylarında yüksek etkinlikte kalıcı bir susturma gerçekleştirirler.

Aktarım için kullanılan üçüncü viral sistem adenovirüslerdir. Lentivirusler gibi adenovirüslerde anlatım yapabilmek için hücre bölünmesine ihtiyaç duymaz ve kültürdeki bir çok hücre tipini enfekte edebilirler. Konak genomuna ender olarak katılırlar (100).

2.9. Primer Nöron Kültürü

Pek çok doku çeşidi hücreler halinde ayrılıp bir petri tabağına ekildiğinde bir dizi özellik gösterir. Önce hücreler büyüme fazı (log phase growth) denilen hızlı bir bölünme sürecine girerler. Daha sonra birbirine yaklaşıp temas eden hücreler bölünmeyi yavaşlatır ve alındıkları dokunun karakteristik özelliklerini kazanmak üzere bir farklılaşma sürecine girerler. Örneğin, böbrek ve barsaktaki epitel hücreleri

aralarında bağlantılar oluşturarak birbirleriyle ilişki kurar ve iyonların bir hücreden diğerine taşınmasını sağlarlar, kalp kası hücreleri kendi kendilerine kasılmaya başlarlar.

Nöronlar için durum oldukça farklıdır. Embriyonik beyinden elde edilen hücreler kültüre edildiğinde, bölünmeyi tamamen durdururlar. Bu hücreler nörit uzatıp birbirleri ile temas eder ve sinaps oluştururlar böylece elektriksel olarak aktif duruma geçerler. Ancak söz konusu hücrelere nörogenez tamamlanmadan alınırsa, kültürde nadiren bazı hücrelerin bölündüğü ve daha sonra nöronal fenotip kazandığı gözlenebilir. Bu özellikler nöron kültürünün diğer hücre kültürlerinden oldukça farklı olmasını sağlar.

Doğrudan bir deney hayvanından alınan hücre veya dokulardan hazırlanan kültürlerle “primer kültür” denir. Kültürdeki hücreler tiplerine göre bölünür veya bölünmez, farklılaşır ve ölürler. Bir sonraki deney için ihtiyaç duyulan doku tekrar sağlanır ve yeni bir kültür oluşturulur.

Bölünen hücrelerden hazırlanan kültürler pasajlanıp tekrar büyüme fazına girmeleri sağlanarak sayıları arttırılabilir. Fakat bu kültürlerde zamanla farklılaşan hücre sayısı artar, bölünme hızı yavaşlar ve sonuçta ölürler. Glial hücreler en azından bir kaç jenerasyona kadar pasajlanabilirken, nöronlar için bu söz konusu değildir.

Sonsuz sayıda pasajlanabilen ve sabit bir fenotip gösteren hücreler “devamlı hücre soyları” olarak isimlendirilir. Bazı hücre soyları pasajlama sırasında kendiliğinden oluşan mutasyonlar sonucu ortaya çıkarken, bir çoğu da tümör hücrelerinin kültüre edilmesi ile elde edilir. Bu hücre soyları ölümsüz olmalarının yanı sıra, normal hücrelerden farklı bazı özelliklere sahiptir: çok hızlı bölünürler, kontakt inhibisyon özelliklerini kaybetmişlerdir ve alındıkları hayvana geri verilirlerse tümör oluştururlar. Bu tip hücreler “transforme hücreler” olarak da isimlendirilirler.

Devamlı hücre soylarının bir çok avantajı vardır. Bu hücreler uzun süre sıvı nitrojende saklanabilirler ve bu sayede tüm dünya laboratuvarları arasında paylaşılabilirler. Düzgün koşullarda saklandıklarında yıllarca kullanılabilirler.

Nörobiyolojik araştırmalarda kullanılmak üzere geliştirilen devamlı hücre soylarının kullanılmasında rastlanılan problem ise, bu hücrelerin nöronal farklılaşmanın bazı anahtar olaylarını gerçekleştirememesidir. Bu soylar farklılaşmış nöronların karakteristik özelliği olan nörotransmitterleri, iyon kanallarını ,reseptörleri ve nörona

özel proteinleri sentezleyen hücre soyları olmalarına rağmen, belirli bir nöronal fenotip için iyi bir model değildirler. Farklılaşmış bir sinir hücresinin davranışlarını göstermeye en yakın olan PC12 hücre soyu bile düzgün akson ve dendritler oluşturamaz ve sinaptik bağlantılar kuramaz. Bu yüzden bilinen hücre soyları MSS çalışmaları için sınırlı ölçüde kaynak sağlar (101).

2.9.1. Primer Nöron Kültürünün Hazırlanması

Omurgalı veya omurgasız, periferik veya merkezi sinir sistemi, nöron veya glia, hangi hücre tipi olursa olsun primer hücre kültürü hazırlamak için bazı koşullar vardır (101, 102):

1-İlgilenilen hücreleri bulunduran doku kaynağının elde edilmesi. 2-Hücrelerin uygun bir substrat üzerine ekilmesi. 3-Hücrelerin uygun bir kültür medyumunda içerisinde yaşatılması. 4-Steril koşulların sağlanması.

2.9.1.1. Primer nöron kültürü için kullanılan canlı türleri

Sıçan ve fare gibi memeliler nöron kültürü için gerekli dokuları sağlamak üzere en çok kullanılan laboratuvar hayvanlarıdır. Bir çok nöron kültürü embriyonik veya neonatal dokudan elde edildiğinden hızla üreyen sıçan ve fareler, nöronlar için vazgeçilmez bir kaynaktır. Ayrıca insana yakın olan genetik özellikleri ve bakım ve üretimlerinin ucuz olması onları avantajlı hale getirmiştir.

Bunun dışında diğer memeliler, memeli olmayan omurgalılar, omurgasızlar, tavuk embriyoları, Drosophila, kısaca sinir hücresi taşıyan tüm canlılar nöron kültürü yapmak için kullanılabilir (101).

2.9.1.2. Primer nöron kültürünün hazırlanacağı canlı türünün yaşı

Nöronlar somalarının halen küçük olduğu, akson ve dendritlerini henüz yeterince geliştirmedikleri erken evrelerde hasara karşı daha dayanıklıdır. Ayrıca erken evrelerde trofik faktörlere fazla bağımlı değildirler. Bu yüzden, nöron ve glia kültürleri genellikle embriyonik veya erken postnatal hayvan dokularından hazırlanır.

Primer nöron kültürü hazırlarken önemli olan husus, söz konusu hücrelerin oluştuğu ve postmitotik evreye girdiği gelişim dönemidir. Örneğin serebellumun Purkinje hücreleri doğumdan hemen önce, granüler hücreleri ise doğumdan iki hafta

sonra oluşurlar. Bu yüzden Purkinje hücre kültürü embriyonik hayvanlardan, granüler hücre kültürü ise postnatal hayvanlardan hazırlanmaktadır.

Serebral kortekse ait nöron kültürü 15. veya 16. embriyonik günde (E15-16) alınan serebral korteksten, hippocampusu ait nöron kültürü ise E18-19'da alınan hipokampusden yapılır. Hippokampal kültür çalışmaları, bu hücrelerin E15'de oluşmaya başladığını ve E18-19'da göç ederek hippocampusu oluşturdıkları ve postmitotik evreye geçtiklerini göstermiştir (101-103).

2.9.1.3. Disseksiyon

Primer kültür hazırlanmasının ilk adımı disseksiyondur. Disseksiyon biyolojik güvenlik kabini altında yapılır ve doku aseptik koşullarda elde edilir. İşlemler sırasında doku soğuk ortamda ve tuz ile dengelenmiş bir solusyon içinde tutulur (102, 103).

2.9.1.4. Dokunun hücrelere ayrılması

Disseksiyondan sonra doku tek tek hücrelere ayrılır. Güçlü hücre-hücre bağlantıları ve çok sayıdaki sinaps bu işi zorlaştırır. Sinapslar doku homojenize edildiğinde bile genellikle bozulmaz. Bu yüzden olgun beyin dokusundan primer kültür yapmak oldukça zordur. Genellikle dokular kalsiyum veya magnezyum içermeyen tuz ile dengelenmiş solusyonlar içinde parçalanır. Bazı durumlarda mekanik parçalama yeterli olurken hücre-hücre bağlantılarını ve sinapsları ortadan kaldırmak için genellikle proteazlar kullanılır. Kullanılan proteazlar hücre yüzey proteinlerini ve ekstraselüler matriks proteinlerini hücrelere fazla zarar vermeden parçalarlar. Fakat bu işlem sırasında diğer hücre yüzey reseptörleri de etkilenebilir. Örneğin, tripsin uygulaması nörotransmitter reseptörlerinin bazılarını yok eder, bu reseptörler ancak kültürün birinci gününden sonra tekrar oluşabilir (101).

2.9.1.5. Özel hücre popülasyonlarının eldesi

Dokunun parçalanmasından sonraki aşama, istenilen hücre tipinin yaşatılması, istenilmeyenlerin ise yok edilmesidir. En basit yöntemlerden biri farklı adezyon özelliklerine göre hücreleri ayırmaktır. Nöronlar ve bazı glial hücre tipleri herhangi bir substrat uygulanmamış olan cam veya plastik yüzeye oldukça zayıf bir şekilde bağlanırken, fibroblast gibi nöron olmayan bazı hücreler hızlıca tutunurlar. Bu şekilde karışık bir hücre süspansiyonu substrat uygulanmamış petrilere ekilip kısa bir süre

beklenirse bağlanmamış hücreler (nöronlar) ortamdan alınıp uygun bir substrat üzerine tekrar ekilebilir.

Hücrelerin ayrılması için kullanılan diğer bir yöntem gradyan santrifügasyonudur. Örneğin, metrizamide ile yapılan santrifüjleme embriyonik omurilikten hazırlanan hücre süspansiyonundan motor nöronların ayrımını sağlar.

Bu yöntemler hızlı ve daha basit ayrımlar için uygundur. Fakat MSS’de oldukça fazla sayıda ve farklı tipte nöron bulunur. Nöronların tek bir tipi incelenmek isteniyorsa immün yöntemlerle seçim yapılmalıdır. “Floresan ile aktive olan hücre ayırma” yöntemi spesifik nöronların elde edilmesini sağlar. Bu yöntemde ayrılmak istenen hücre tipinin yüzey proteinlerine özel olan primer antikolar, floresan bir boya taşıyan sekonder antikor ile işaretlenir. Böylece istenilen nöron tipi elde edilebilir (101).

2.9.1.6. Hücre sayımı ve canlı hücrelerin gösterilmesi

Ekim yapılacak hücrelerin sayılması, kültürdeki hücre yoğunluğunu belirlemek, uygulanacak deneylerin doğruluğunu ve tekrarlanabilirliğini sağlamak açısından önemlidir. Hücre sayımı genellikle hemositometre kullanılarak yapılır. Tripsin mavisi, eritrozin (erythrosin), nigrasin gibi boyalar kullanılarak canlı ve ölü hücreler ayrılır. Bu boyalar canlı hücrelere giremezken hasarlı hücrelerin içine alınırlar. Bu şekilde tanınan canlı hücrelerin sayımı yapılır ve her petride aynı sayıda hücre olacak şekilde ekim gerçekleştirilir (102, 103).

2.9.1.7. Nöronların beslenmesi ve yaşatılması

Kültür Medyumu

Kültüre edilen tüm hücrelerde kullanılan temel medyumlar serumla benzer konsantrasyonda aminoasitler, vitaminler ve diğer besinleri içerir. En çok kullanılan Eagle’ın minimum esansiyel medyum (MEM) 13 temel aminoasit ve 8 vitamin; Ham’ın F-12 medyum temel olmayan amino asitleri ve çeşitli vitaminleri içerir. İki medyum yarı yarıya içeren MEM/F-12 en çok kullanılan medyumlardan biridir. Dulbecco tarafından değiştirilen MEM (D-MEM) hızlı büyüyen hücreler için geliştirilmiştir ve MEM’de bulunan maddeleri 2 ila 4 kat daha yüksek konsantrasyonda içerir.

Brewer ve arkadaşları 1993 yılında primer nöronlar için yeni bir temel medyum geliştirmişlerdir. Nörobazal medyum (NBM) olarak adlandırılan bu medyum D-MEM

değiştirilerek oluşturulmuştur. Fakat D-MEM'e göre ozmolaritesi düşüktür ve temel olmayan bazı aminoasidleri ve vitamin B₁₂ içerir.

Serum

Hücreler sadece temel medyumların içinde yaşayamazlar, bu yüzden %5-20 oranında serum ile desteklenirler. At serumu ve fetal buzağı serumu en çok kullanılan serumlardır. Bu serumlar yüksek oranda mitojenik faktörler içerir. Çoğalan hücreler, hücre soyları, primer nöron veya glia kültüründe genellikle fetal buzağı serumu kullanılırken, postmitotik nöronlar için at serumu, sinir dokularının organotrofik kültürlerinde ise insan plasental serumu kullanılır.

Serum içermeyen medyum

1979 yılında Bottenstein ve Sato tarafından nöronal hücrelerin serum desteği olmadan yaşayabilmelerini sağlayan N₂ medyum ve 1993 yılında Brewer tarafından N₂'yi değiştirilerek oluşturulan B₂₇ medyumları geliştirildi. NBM ile birlikte kullanılan B₂₇ medyumu hippokampus ve diğer beyin bölgelerine ait primer nöronların uzun süre yaşamalarına izin verir ve nöron olmayan hücrelerin bölünmesini yüksek oranda engeller.

Serum içermeyen medyum kullanılarak yaşatılan primer nöronlar, nöron gelişimi, nöronal sinyalleşme, elektrofizyoloji, farmakoloji, plastisite, gen ekspresyonu ve nörotoksisite çalışmaları için uygundur.

Antibiyotikler

Hücre kültürlerinde mikroorganizma kontaminasyonlarına karşı penisilin ve streptomisin antibiyotikleri genellikle birarada kullanılır. Gentamicin ise düşük seviyede kontaminasyon farkedildiğinde tercih edilen bir antibiyotiktir. Bu ajanlar küf ve mayalara karşı etkili değildir.

Kültürün korunması

Nöronlar 37°C'de %5 CO₂ içeren bir ortamda yaşatılır ve 3-4 günde bir medyumlarının yarısı veya üçde biri değiştirilerek beslenirler. Tüm medyumun değiştirilmesi diğer tip hücrelerin aksine bu nöronların ürettikleri trofik faktörlerin ortamdan alınmasına ve hücrelerin ölümüne sebep olur (103).

2.10. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR), moleküler tıpta, biyoteknolojide, mikrobiyolojide ve moleküler biyolojide mRNA miktarının kantitatif olarak saptanmasında kullanılan bir tekniktir (104). Teknik 3 basamak halinde uygulanır: 1) RNA'dan ters transkriptaz ile cDNA sentez edilmesi 2) PCR ile cDNA'nın çoğaltılması 3) cDNA çoğaltılırken oluşan ürünlerin gerçek zamanlı olarak belirlenmesi ve miktar tayini (105)

qRT-PCR'da kullanılan sybr green gibi floresan boyalar veya floresan işaretli probalar kullanılarak çoğaltma (amplifikasyon) işlemi ve çoğaltmanın gerçek zamanlı olarak izlenmesi tek bir tüp içerisinde gerçekleşmektedir; oluşan ürün miktarının izlenmesi için ayrı bir tekniğe ihtiyaç yoktur (106).

Teknik, her PCR döngüsünde üretilen DNA miktarıyla birlikte artan floresan sinyal artışının ölçülmesine dayanır. Farklı renkte floresan işaretli probalar kullanılarak birden fazla hedef genin tek tüp içerisinde çoğaltılıp okunması mümkün olabilir. Her bir reaksiyonda çalışılan örnekler için okunacak değer, PCR ürünlerinin yaptığı floresan ışımanın zemindeki floresan ışımanın yada tanımlanmış bir eşik değerin üzerine çıktığı ilk döngü noktasıdır. Bu nokta, döngü eşik değeri (Ct; cycle threshold) veya geçiş noktası (Cp; crossing point) ile ifade edilir. Reaksiyona başlarken örnek içindeki hedef miktarı ne kadar fazla ise Ct değeri o kadar düşük olur. Çoğalan ürün ile floresan ışıma arasındaki korelasyon hedef molekülün miktarının doğru bir şekilde saptanmasına olanak verir. Tüpün reaksiyon sonuna kadar kapalı olması ve amplifikasyon sonrası elektroforez gibi uygulamaları gerektirmemesi çalışma süresini ve kontaminasyon riskini belirgin bir şekilde azaltmaktadır (104).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma 5 adet Sprague Dawley cinsi hamile sıçandan elde edilen 16 günlük ve 18 günlük embriyolar kullanılarak gerçekleştirildi. Embriyo beyinlerinden hippocampus ve serebral korteks bölgeleri disseksiyonla ayrıldı. Her iki bölgeden elde edilen hücreler ile primer nöron kültürleri hazırlandı. Çalışma kapsamında gerçekleştirilen nöron kültürleri, kültürdeki nöronlara vitamin D uygulamaları, post transkripsiyonel gen susturulması (PTGS) uygulamaları ve immunfloresan işaretlemeler İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Beyin ve Nörodejeneratif Hastalıklar Araştırma Laboratuvarında (Kasım 2007-Nisan 2009); mRNA izolasyonları ve cDNA sentezleri aynı Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji Laboratuvarında (Mayıs 2008-Nisan 2009); ELISA deneyleri İleri Protein Analizleri Laboratuvarında (Nisan 2009); qRT-PCR deneyleri İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Genetik Anabilim Dalı'nda (Mayıs 2008-Nisan 2009) gerçekleştirilmiştir.

3.1. Primer Nöron Kültürü Deneyleri

3.1.1. Embriyonik Günlerin Belirlenmesi ve Embriyoların Eldesi

Deneylerde kullanılacak olan embriyoları doğru embriyonik günde elde etmek üzere her deney düzeneği için Sprague-Dawley cinsi 5 dişi sıçan 2 erkek sıçanla bir gece birlikte bırakıldı. Bir gün sonra vajinal yayma preparatı hazırlanarak fecondasyon kontrolü yapıldı. Yayma preparatında sperm pozitifliği bulunan dişi sıçanlar hamileliğin 0. gününde kabul edildi (0. embriyonik gün; E0) (Şekil 3-1). Dişi sıçanlar hamileliklerinin 16. veya 18. gününde steril odada eter anestezisi altında servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Maya, mantar ve bakteri kontaminasyonunu önlemek üzere %70 etanolde 5 dk bekletilen hamile sıçanlardan elde edilen embriyolar (E16 ve E18) PBS (Gibco BRL 10010. Invitrogen Inc., New York, USA) içeren steril bir petriye alındı (Şekil 3-2, 3-3, 3-4 ve 3-5).



Şekil 3-1: Vajinal yayma preparatında sıçan sperminin görüntüsü.



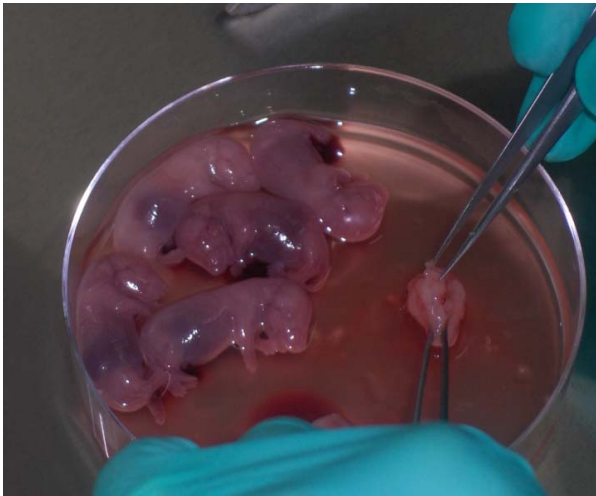
Şekil 3-2: Hamile sıçanlardan sezaryen yöntemiyle embriyoların eldesi.



Şekil 3-3: Sıçan embriyolarının amniyon kesesinden çıkartılması.



Şekil 3-4: 16 günlük sıçan embriyolarının görüntüsü.



Şekil 3-5: 18 günlük sıçan embriyoları görüntüsü.

3.1.2. Kültür petrilerinin hazırlanması

Nöron kültürü 35 mm çapında 6 kuyulu plakalar (Corning 3506. Corning Inc. New York, USA) kullanılarak yapıldı. Ekim yapılacak petrilere deneyden bir gün önce aşağıdaki protokole göre 1:50 oranında poly-L-ornithine (Sigma P-4957. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, GE) ile kaplanarak hazırlandı.

1. Stok poly-L-ornithine solusyonu, 750 µl poly-L-ornithine (PLO), 49,25 ml 0,20 µm filtreden (Sartorius 16534. Sartorius Biotech GmbH, Goettingen, GE) geçirilmiş MiliQ dH₂O ile karıştırılarak hazırlandı.
2. 35mm'lik petrilere 1,5 ml PLO solusyonu konuldu.
3. PLO ile kaplanan petrilere 37°C'deki, %5 CO₂ içeren etüvde bir gece bekletildi.
4. Ertesi gün petrilere 3 kere filtreden (0,20µm) geçirilmiş MiliQ dH₂O ile yıkandı.
5. Her bir petriye 0,5 ml Leibovitz 15 + medyumunu eklenerek kullanılıncaya kadar 37°C, %5 CO₂ içeren etüvde bırakıldı.

3.1.3. Leibovitz 15 + (L-15+) kültür medyumunun hazırlanması

L-15+ medyumunu aşağıdaki protokole göre bir gün önceden hazırlandı.

1. 200 ml L-15 Medyum (GibcoBRL 11415-064. Invitrogen Inc., New York, USA) içine,
2. Conalbumin (Sigma C-7786. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, GE), kültürdeki final konsantrasyon 0,1 mg/ml
3. %7,5 Sodyum bikarbonat (GibcoBRL 25080-094. Invitrogen Inc., New York, USA), kültürdeki final konsantrasyon 0,63 mg/ml
4. Putrescine (Sigma P-7505. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, GE), kültürdeki final konsantrasyon 0,1 mM
5. İnsülin (GibcoBRL 12585. Invitrogen Inc., New York, USA), kültürdeki final konsantrasyon 10 ng/ml
6. Sodyum selenit (Sigma S-5261. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, GE), kültürdeki final konsantrasyon 30 nM

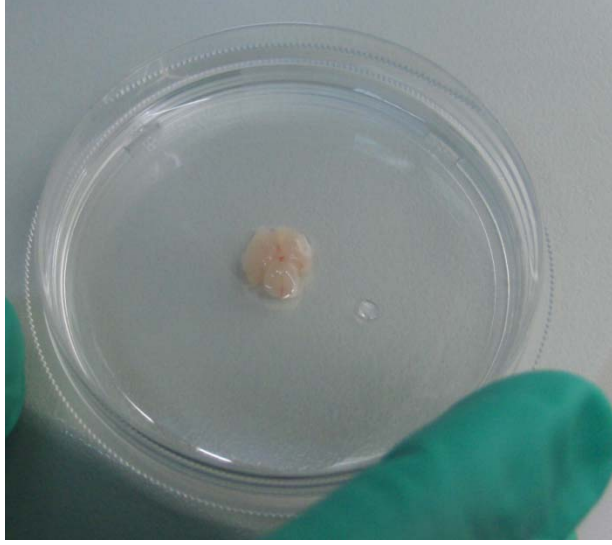
7. Progesteron (Sigma P-6149. Sigma-Alderich Chemie GmbH, Steinheim, GE), kültürdeki final konsantrasyon 20 nM
8. Glukoz (Sigma G-7021. Sigma-Alderich Chemie GmbH, Steinheim, GE), kültürdeki final konsantrasyon 20 mM
9. PenStrep (Sigma P-4333 Sigma-Alderich Chemie GmbH, Steinheim, GE), kültürdeki final konsantrasyon 10 IU/ml olacak şekilde eklendi. L-15+ hazırlandıktan sonra 0,22 µ'luk filtreden geçirildi ve kullanılabileceği kadar +4 °C'de saklandı.

3.1.4. Nörobazal + (NBM+) kültür medyumunun hazırlanması

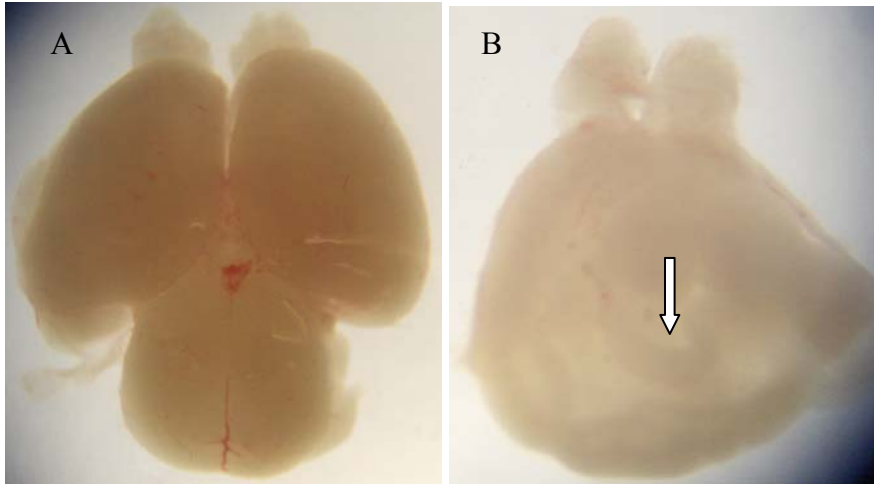
Serum içermeyen bir medyum olan Nörobazal medyum, 50 ml NBM'ye (GibcoBRL 21103-049. Invitrogen Inc., New York, USA), 1 ml B-27 (GibcoBRL 17504-044. Invitrogen Inc., New York, USA), 50 µl PenStrep (Sigma P-4333. Sigma-Alderich Chemie GmbH, Steinheim, GE), 350 µl %9'luk NaCl₂ (Sigma S-3014. Sigma-Alderich Chemie GmbH, Steinheim, GE) eklenerek hazırlandı. NBM+ hazırlandıktan sonra 0,22 µ'luk filtreden geçirildi ve kullanılabileceği kadar +4 °C'de saklandı.

3.1.5. Serebral Korteks ve Hippokampus Disseksiyonu

Hamile sıçandan çıkartılan embriyolar Sınıf 100 Steril Oda içinde bulunan Sınıf II Biyolojik Güvenlik Kabinine alındı ve sonraki tüm işlemler bu güvenlik kabini içinde gerçekleştirildi. Embriyoların beyinleri, kafa derisi ve kranial kemikler açılarak çıkartıldı. Beyinler steril PBS içeren steril bir petriye alındı (Şekil 3-6 ve 3-7A). Stereo mikroskop (Leica EZ4, Leica Microsystems Ltd., Heerbrugg, GE) altında bistüri kullanılarak serebellum ayrıldı. 0,2 mm'lik pensler (Dumont tipi no:5) kullanılarak Goslin ve Banker'ın yöntemiyle (103) 18 günlük embriyolardan sağ ve sol hemisfere ait hippocampuslar daha sonra ise 16 günlük embriyolardan meningeal membrandan arındırılmış serebral korteksler çıkarıldı (Şekil 3-7B).



Şekil 3-6: Embriyodan elde edilen beyin görüntüsü.



Şekil 3-7: Embriyodan elde edilen total beyin (A) ve hippocampusun (B) stereo mikroskop altındaki görüntüsü.

Ok, hippocampusu göstermektedir

3.1.6. Primer hippocampal ve kortikal nöron kültürlerinin hazırlanması

Serebral korteks ve hippocampusların çıkarılmasını takiben primer nöron kültürleri aşağıdaki protokole göre hazırlandı.

1. Hippokampus ve serebral korteksler çıkartıldıktan sonra steril PBS içeren farklı petrilere toplandı, iki bistüri kullanılarak küçük parçalara bölündü.
2. Petrinin içindeki dokular 5ml PBS içeren 15 ml'lik polipropilen tüpe alındı. Dokuların çökmesi beklendi ve fazla PBS atıldı.

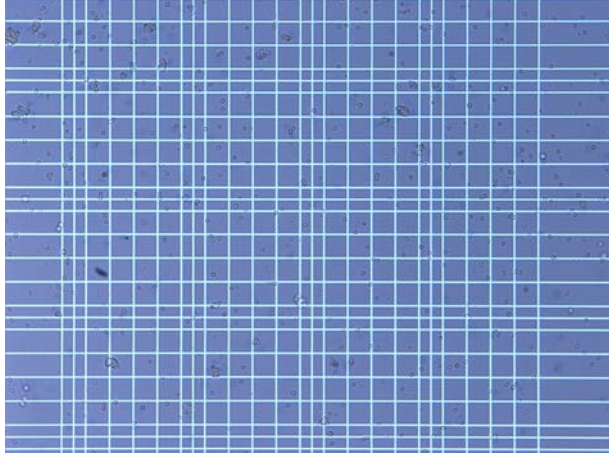
3. Dokuların üzerine 1 ml %4 BSA (GibcoBRL 15260. GibcoBRL 25080-094. Invitrogen Inc., New York, USA) ve 3 ml L-15+ medyumundan oluşan 4 ml'lik karışım eklendi.
4. Hücreler, cam pipet kullanılarak homojen hale gelene kadar karıştırıldı.
5. Bu karışım 4 ml %4 BSA içeren tüpe BSA'nın üzerinde bir katman oluşturacak şekilde eklendi.
6. 1000 RPM'de 2 dk boyunca santrifüj edildi.
7. Üst sıvı dikkatlice atıldı.
8. Çökelti üzerine 8 ml L-15+ medyumunu eklendikten sonra 1000 RPM'de 3 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üst sıvı atıldı ve çökelti üzerine 10 ml L-15+ medyumunu eklenip cam pastör pipeti ile 2-3 kere karıştırıldı.
9. Hücre sayısı hemasitometre ile aşağıda açıklandığı gibi hesaplandı. Hücreler, 35 mm'lik petriye, her bir petride 1,5 ml (L-15+ medyumunu) total hacim içerisinde 6×10^5 hücre (600 hücre/mm^2) olacak şekilde paylaştırıldı.
10. 24 saat sonra tüm petrilere L-15+ medyumunu tamamen alınarak yerine 1,5 ml NBM+ medyumunu konuldu. Daha sonra her iki-üç günde bir NBM+ medyumunun yarısı taze NBM+ medyumunu ile değiştirildi.
11. Nöronlar olgunlaşmaları için 37°C 'de, %5 CO_2 içeren etüvde 7 gün bekletildi. Vitamin D ve VDR siRNA uygulamaları kültürün 7. gününde gerçekleştirildi.

3.1.7. Hemasitometri ile hücre sayımının yapılması

1. Polipropilen tüpte toplanan hücrelerden 10 μl alınıp temiz bir tüpe konuldu.
2. Üzerine 10 μl tripan mavisi (GibcoBRL, 15250061. Invitrogen Inc., New York, USA) eklendi.
3. Hemasitometrinin her iki tarafına 10 μl örnek konuldu.
4. İçine boya almamış ve parlak görünen hücreler canlı olarak değerlendirilerek sayıldı. Sayımlar iki ayrı araştırmacı tarafından tekrarlandı (Şekil 3-8).
5. Toplam hücre sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

Toplam hücre sayısı = Hücre sayısı $\times 10^4/\text{ml}$ $\times$ hücrelerin içinde bulunduğu L15+ medyumunun miktarı $\times 2$

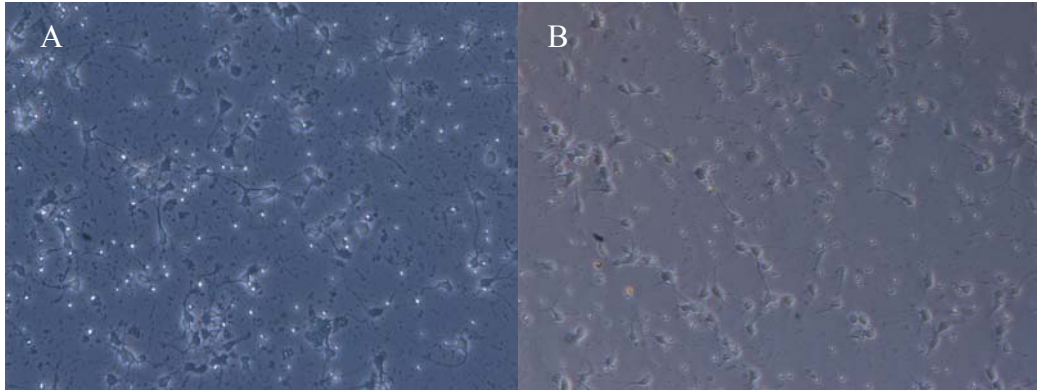
Ekim yapılacak 35 mm'lik petri sayısı = Toplam hücre sayısı / 6×10^5



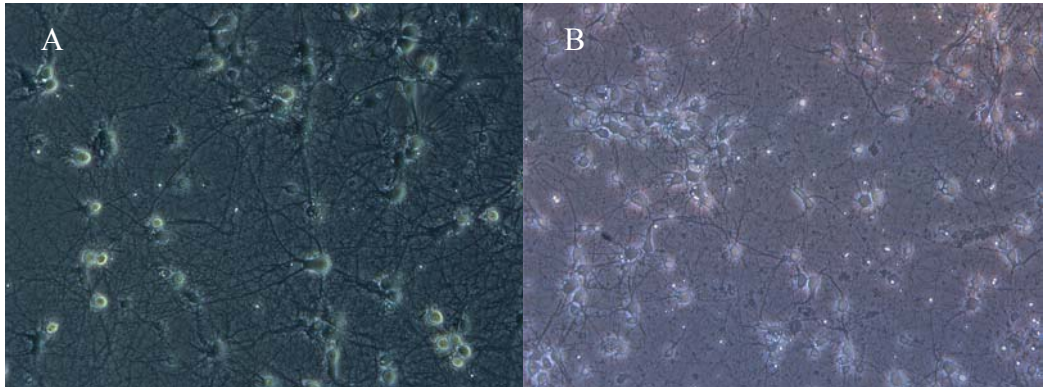
Şekil 3-8: Hemositometreye yüklenen hücrelerin invert mikroskop altındaki görüntüsü

3.1.8. Ekimi yapılan nöronların olgunlaşması

Primer hippokampal ve kortikal nöron kültüründeki hücreler ekimden sonraki 7 gün içerisinde akson ve dendritlerini uzatarak olgun nöronlar haline geldi (Şekil 3-9 ve 3-10).



Şekil 3-9: 3 günlük primer hippokampal (A) ve kortikal (B) nöronların faz-kontrast mikroskobu ile görünüşü, büyütme 20x



Şekil 3-10: 7 günlük primer hippokampal (A) ve kortikal (B) nöronların faz-kontrast mikroskobu ile görünüşü. Büyütme 20x

3.1.9. Kültürdeki hücrelerin nöron/glia ayrımının yapılması

Kültürdeki hücreler nöron ve glia hücrelerine özgü antikorlar kullanılarak immünfloresan yöntemi ile işaretlendi. Nöronların ayrımı bir nöron belirteci olan Pan Neuronal Marker primer antikor ve FITC işaretli sekonder antikorlar kullanılarak, glia hücreleri ise bir glia hücresi belirteci olan glial fibriler asidik protein (GFAP) primer antikor ve Texas Red (TR) işaretli sekonder antikorlar kullanılarak yapıldı. Primer antikorların uygulanmadığı sadece sekonder antikorların uygulandığı kültür hücreleri negatif kontrol olarak kullanıldı. Pozitif kontrol olarak ise 14 gün boyunca herhangi bir uygulama yapılmadan yaşatılan ve böylece glia hücrelerinin üremesine izin verilen primer hippocampal nöron kültürü kullanıldı.

İmmünfloresan boyama protokolü

1. Gün:

1. Kültürdeki hücreler %3,7'lik paraformaldehit (Sigma 15,812-7. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, GE) içerisinde oda sıcaklığında 30 dk fikse edildi.
2. Hücreler 3 defa 10'ar dk 2 ml PBS ile yıkandı.
3. Hücreler % 0,01 triton X-100 (Sigma X-100. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, GE) içeren T-PBS içerisinde hazırlanan %30'luk normal keçi serumunda (Chemicon S26. Millipore Corp. California, USA) oda sıcaklığında 1 saat bekletildi.
4. Hücreler primer antikor Milli-Mark™ Pan Neuronal Marker (Millipore MAB2300. Millipore Corp. California, USA) % 0,01 T-PBS içinde hazırlanan % 30 keçi serumu ile 1:50 oranında sulandırıldı, gece boyu + 4°C'de bekletildi. Bu aşamada negatif kontrollere primer antikor içermeyen % 0,01 T-PBS içinde hazırlanan % 30 keçi serumu uygulandı.

2. Gün

5. 3 kere 10'ar dk oda sıcaklığındaki 2 ml PBS ile yıkandı.
6. Bu aşamadan sonraki tüm işlemler karanlık ortamda yapıldı. Hücreler % 1,5 keçi serumu % 0,01 T-PBS içerisinde 1:50 oranında sulandırılan keçi anti-fare IgG, FITC (fluorescein isothiocyanate) (Millipore AP181F.

Millipore Corp. California, USA) sekonder antikoru ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.

7. 3 kere 10'ar dk oda sıcaklığındaki 2 ml PBS ile yıkandı
8. Hücreler % 0,01 T-PBS içerisinde hazırlanan %10'luk normal keçi serumunda oda sıcaklığında 30 dk bekletildi.
9. Hücreler primer antikor GFAP (Invitrogen AB5804. Invitrogen Inc., New York, USA) % 0,01 T-PBS içinde hazırlanan % 10 keçi serumu ile 1:750 oranında sulandırıldı, 2 saat oda sıcaklığında bekletildi. Bu aşamada negatif kontrollere primer antikor içermeyen % 0,01 T-PBS içinde hazırlanan % 10 keçi serumu uygulandı.
10. Hücreler % 1,5 keçi serumu % 0,01 T-PBS içerisinde 1:100 oranında sulandırılan keçi anti tavşan IgG TR (Texas Red) (Santa Cruz sc-2780. SantaCruz Inc. California, USA) sekonder antikoru ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
11. Hücreler 1:48.000 oranında dH₂O ile sulandırılmış 1 ml DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole) solusyonu içinde 5dk bekletildi.
12. Kapama medyumunu ile kapatıldı.
13. Hücreler invert floresan mikroskopunda (Leica DMIL, Leica Microsystems Ltd., Heerbrugg, GE) incelendi ve TR, I3 ve A3 filtreleri kullanılarak floresan kamera sistemi (Leica DFC 300 FX, Leica Microsystems Ltd., Heerbrugg, GE) ile fotoğrafları çekildi. Farklı filtrelerle çekilen aynı alana ait fotoğraflar özel bir yazılım (The Leica Application Suite Image Overlay Software, Leica Microsystems Ltd., Heerbrugg, GE) kullanılarak karşılaştırıldı.

Her bir petrinin rastgele alanlarından TR, I3 ve A3 filtreleri ile çekilen 10'ar adet fotoğraf karşılaştırıldı ve nöron ve glia hücrelerinin sayımı yapıldı. Sayım sonucunda nöron ve glia sayıları toplam hücre sayısına oranlanarak yüzde nöron/glia oranı saptandı.

3.2. Primer Hippokampal Ve Kortikal Nöron Kültüründe Gerçekleştirilen Uygulamalar

Kültürdeki nöronlara 100 nM VDR siRNA uygulanarak VDR geni susturuldu ve hücrelerde kısa süreli vitamin D eksikliği modeli oluşturuldu. Susturma işleminin gerçekleşip gerçekleşmediğini ve oranını belirlemek üzere, VDR siRNA uygulanan grup 4 farklı kontrol grubu ile VDR mRNA ekspresyon seviyeleri açısından karşılaştırıldı. Herhangi bir madde uygulanmayan kontrol grubu, nöronlardaki normal VDR mRNA ekspresyon seviyesini belirlemek üzere; transfeksiyon ajanı uygulanan kontrol grubu, nöronlarda transfeksiyon ajanından kaynaklanan toksik etkileri belirlemek üzere; Siklofilin B siRNA uygulanan pozitif kontrol grubu, her dokuda ifade edildiği bilinen Siklofilin B geninin susturulması ile transfeksiyon başarısını belirlemek üzere; hedefi olmayan siRNA uygulanan negatif kontrol grubu, mimikri ve inhibitör aktivite ile gerçek etki arasındaki ayrımı yapmak üzere kullanıldı. Bu gruplarda VDR, Siklofilin B ve LVSCC A1C genlerinin ekspresyon seviyeleri ve NGF salınımları saptandı. Ayrıca tüm gruplarda siRNA uygulamasından kaynaklanan sitotoksikite LDH salınımları ölçülerek belirlendi.

siRNA uygulama sürelerini belirlemek üzere primer kortikal nöron kültürüne 6, 12 ve 24 saat süreyle olmak üzere 3 farklı zaman aralığında siRNA uygulandı. Tüm grupların RNA izolasyonları 24. saatte yapıldı. Vitamin D, VDR siRNA uygulanan kültürde bir etkisinin olup olmadığını belirlemek üzere sadece 12 saatlik siRNA uygulamasında ortama eklendi. Çalışmanın içinde yer almadığı için diğer gruplara uygulanmadı. Primer kortikal nöron kültüründen elde edilen sonuçlara dayanarak primer hipokampal nöron kültürüne 12 saat süreyle siRNA uygulandı ve RNA izolasyonu 24. saatte gerçekleştirildi.

Tüm uygulamalar 6 ayrı deney düzeneğinde tekrarlandı.

3.2.1. Vitamin D Uygulamaları

10^{-4} M 1,25 α -dihidroksivitamin D₃ (Sigma C-9756. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, GE), 1,5 ml NBM+ içeren petrilere, final konsantrasyon 10^{-7} M ve olacak şekilde 12 saat süreyle uygulandı. Uygulamadan sonra RNA izolasyonu yapılmıncaya kadar medyum değiştirilmedi.

3.2.2. siRNA Uygulamaları

VDR ve Siklofilin B genlerine ait mRNA'ları susturacak olan siRNA'lar, her biri kendi hedefine yönelen 4 farklı siRNA'nın karışımı şeklinde ve hedefi olmayan siRNA'lar, hücrede herhangi bir mRNA'yı tanımayan 4 farklı siRNA molekülü içerecek şekilde sentezlettiirildi. VDR, Siklofilin B ve hedefi olmayan siRNA stokları aynı şekilde hazırlanıp, kültüre aynı miktar ve konsantrasyonlarda uygulandı. Nöronlara siRNA aktarımı için lipid bazlı bir transfeksiyon ajanı olan DHARMAFECT® 3 (Dharmacon T-2003-02. Dharmacon Inc. Colorado, USA) kullanıldı.

3.2.2.1. Kullanılan siRNA'ların dizileri:

VDR siRNA

ON-TARGET plus SMART pool Rat VDR, NM_017058 siRNA (Dharmacon L-097753-01-0010. Dharmacon Inc. Colorado, USA).

1. siRNA dizisi: AUGAGGAGGUACAGCGUAA
2. siRNA dizisi: UGCUGGAGGUGUUCGGCAA
3. siRNA dizisi: UGGAGUGUGUGGAGACCGA
4. siRNA dizisi: GGCGGAGCAUGAAGCGGAA

Siklofilin B siRNA

Diziler üretici firmada saklıdır.

ON-TARGET plus SMART pool Rat Siklofilin B siRNA (Dharmacon D-001820. Dharmacon Inc. Colorado, USA).

Hedefi olmayan siRNA

Diziler üretici firmada saklıdır.

ON-TARGET plus SMART pool Rat Non-Target siRNA (Dharmacon D-001810. Dharmacon Inc. Colorado, USA).

3.2.2.2. Transfeksiyon medyumunun hazırlanması ve siRNA uygulanması:

Transfeksiyon medyumuna siRNA, transfeksiyon ajanı ve antibiyotik içermeyen NBM+ bir araya getirilerek aşağıdaki protokole göre hazırlandı:

1. RNaz içermeyen steril bir mikrotüp içerisine, 2 μ M olarak hazırlanan siRNA stoğu ve antibiyotik içermeyen NBM+'dan 75 μ l konularak karıştırıldı.
2. RNaz içermeyen steril başka bir mikrotüp içerisine 1:375 oranında transfeksiyon ajanı Dharmafect 3 ve 146 μ l antibiyotik içermeyen NBM+ konularak karıştırıldı.
3. Tüpler oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
4. Her iki tüpün içeriği birleştirildi ve pipet ile karıştırıldı.
5. Oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi.
6. Üzerine hacmi 1500 μ l'ye tamamlamak üzere 1200 μ l serum ve antibiyotik içermeyen NBM+ eklendi. Böylece siRNA'nın 35 mm'lik petride final konsantrasyonu 100 nM oldu.
7. Hazırlanan transfeksiyon medyumunu (1500 μ l) petrideki kültür medyumunun tamamı çekilip atıldıktan sonra onun yerine konuldu.
8. Transfeksiyon medyumunu içeren nöronlar 37°C %5 CO₂'li etüvde 6, 12 ve 24 saat inkübe edildi.
9. 6, 12 ve 24. saatte transfeksiyonu durdurmak üzere transfeksiyon medyumunu petrilere uzaklaştırıldı. Yerine taze ve antibiyotik içeren 1500 μ l NBM+ eklendi. Sadece 12 saat siRNA uygulanan gruba taze medyum ile birlikte 10⁻⁷ M Vitamin D uygulandı.
10. 24. saatte tüm gruplardan total RNA izolasyonu yapıldı.
11. siRNA'nın VDR mRNA'sını susturma etkinliği qRT-PCR yöntemi ile saptandı.
12. LDH ölçümleri 24.saatte toplanan kültür medyumları kullanılarak yapıldı.

3.2.3. Primer kortikal nöron kültürü deney grupları

1.Grup: Kontrol grubu

7.gün, siRNA uygulanan gruplarla aynı anda tüm medyum antibiyotiksiz medyumla değiştirilen ve siRNA uygulamasının ardından diğer gruplarla eş zamanlı olarak tüm

medyumu antibiyotikli medyumla değiştirilen, herhangi bir madde uygulanmamış kontrol grubu.

2.Grup: VDR siRNA uygulanan grup

7.gün, Dharmafect 3 transfeksiyon ajanı ile 6, 12 ve 24 saat süreyle VDR siRNA uygulanan deney grubu.

3.Grup: Siklofilin B siRNA uygulanan kontrol grubu

7.gün, Dharmafect 3 transfeksiyon ajanı ile 6, 12 ve 24 saat süreyle siklofilin B siRNA uygulanan kontrol grubu.

4.Grup: Hedefi olmayan siRNA uygulanan kontrol grubu

7.gün, Dharmafect 3 transfeksiyon ajanı ile 6, 12 ve 24 saat süreyle hedeflenmemiş siRNA uygulanan kontrol grubu.

5.Grup: Transfeksiyon ajanı uygulanan kontrol grubu

7.gün, Dharmafect 3 transfeksiyon ajanı ile 6, 12 ve 24 saat süreyle hedeflenmemiş siRNA uygulanan kontrol grubu.

6.Grup: VDR siRNA ve vitamin D uygulanan grup

7.gün, Dharmafect 3 transfeksiyon ajanı ile 12 saat süreyle VDR siRNA uygulanan gruba medyumunun değiştirilmesini takiben 12 saat süreyle 10^{-7} M 1,25 dihidroksivitamin D₃ uygulanan deney grubu.

3.2.4. Primer hippokampal nöron kültürü deney grupları

1.Grup: Kontrol grubu

7.gün, siRNA uygulanan gruplarla aynı anda tüm medyumu antibiyotiksiz medyumla değiştirilen ve siRNA uygulamasının ardından diğer gruplarla eş zamanlı olarak tüm medyumu antibiyotikli medyumla değiştirilen, herhangi bir madde uygulanmamış kontrol grubu.

2.Grup: VDR siRNA uygulanan grup

7.gün, Dharmafect 3 transfeksiyon ajanı ile 12 saat süreyle VDR siRNA uygulanan deney grubu.

3.Grup: Siklofilin B (Housekeeping gen) siRNA uygulanan kontrol grubu

7.gün, Dharmafect 3 transfeksiyon ajanı ile 12 saat süreyle siklofilin B siRNA uygulanan kontrol grubu.

4.Grup: Hedefi olmayan siRNA uygulanan kontrol grubu

7.gün, Dharmafect 3 transfeksiyon ajanı ile 12 saat süreyle hedeflenmemiş siRNA uygulanan kontrol grubu.

3.3. Primer Nöron Kültürlerinden Total RNA İzolasyonu

Kültür hücrelerinden total RNA izolasyonu, RNA izolasyon kiti (High Pure RNA isolation kit Roche 11 828 665 001. Roche Diagnostics GmbH Roche Applied Science Mannheim, GE) (Tablo 3-10 ve 3-11) kullanılarak aşağıdaki protokole göre yapıldı.

1. Petrilerde bulunan 1×10^6 hücre kazınarak 200 μ l PBS içerisinde toplandı.
2. Üzerine 400 μ l Lizis/-Bağlama Tamponu eklendi ve 15 sn vortekslendi.
3. Yüksek saflıktaki filtre tüpü, toplama tüpüne yerleştirildi. Tüm örnek (maksimum 700 μ l) filtre tüpünün rezervuarına pipetlendi.
4. Tüpler 15 sn 8000 g'de santrifüj edildi.
5. Santrifüjden sonra toplama tüpünde biriken sıvı atıldı ve filtre tüpüyle kullanılmış toplama tüpü tekrar bir araya getirildi.
6. Filtre tüpü hazırlandıktan sonra
 - Steril bir eppendorf içerisinde her bir örnek için 90 μ l DNaz Inkübasyon Tamponu ve 10 μ l DNaz I eklenip karıştırıldı. Her bir örneğin üzerine bu karışımdan 100 μ l eklendi.
 - Oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi.
7. Filtre tüpünün rezervuarına 500 μ l Yıkama Tamponu I eklendi ve 15 sn 8000 g'de santrifüj edildi. Alta geçen sıvı atıldı ve tüp tekrar kullanıldı.
8. Filtre tüpünün rezervuarına 200 μ l Yıkama Tamponu II eklendi ve 2 dk 13.000 g'de santrifüj edildi.
9. Toplama tüpü ve alta geçen sıvılar atıldı ve filtre tüpünün altına steril 1,5 ml'lik eppendorf konuldu.
10. RNA'yı çözmek için her bir örneğe 50-100 μ l çözme tamponu eklendi, 1 dk 8000 g'de santrifüj edildi.
11. Çözünmüş olan RNA cDNA sentez edilene kadar -80°C 'de saklandı.

3.3.1. Örneklerin RNA miktarlarının ve saflığının ölçülmesi

RNA izolasyonunun sonuçları 1'er µl RNA örneği NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific™ Delaware, USA) cihazına yüklenerek ölçüldü. RNA konsantrasyonu 260 nm'deki optik yoğunluluğundan, saflığı da 260 nm / 280 nm'deki OD oranından tespit edildi. RNA konsantrasyonu ve saflığı aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplandı.

$$\text{RNA konsantrasyonu (ng / µl)} = \text{OD 260 nm} \times \text{seyreltme faktörü} \times 40$$

$$\text{RNA saflığı} = \text{OD 260} / \text{OD 280} = 2$$

3.3.2. 1. Normalizasyon

qRT-PCR'da her bir grup için eşit miktarda (400 ng) total RNA kullanılarak cDNA'ların sentezi yapıldı.

3.3.3. cDNA Sentezi

cDNA sentezi, cDNA sentez kiti (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, Roche 04 379 012 001. Roche Diagnostics GmbH Roche Applied Science Mannheim, GE) kullanılarak yapıldı.

1. 20 µl'lik kalıp ve primer karışımı ince cidarlı PCR tüpü içinde aşağıdaki tabloya göre hazırlandı (Tablo 3-1).

Tablo 3-1: Kullanılan kalıp RNA ve primer karışımının içeriği

	Hacim	Final Konsantrasyon
Total RNA	400 ng	
Anchored-oligo(dT)₁₈	1 µl	2.5 µM
Primer 50 pmol / µl		
Random Hexamer	2 µl	60 µM
Primer 50 pmol / µl		
dH₂O	Değişken	Toplam hacim 13 µl olacak şekilde
Toplam hacim:	13 µl	

2. Kalıp RNA-primer karışımı aşağıdaki ısı döngüsüyle kararlı hale getirildi.

65°C 10 dk

+4°C 1 dk

3. Bu işlemten sonra ters transkriptaz (RT) reaksiyonu gerçekleştirildi (Tablo 3-2).

Tablo 3-2: RT reaksiyonunda kullanılan maddelerin konsantrasyonları

	Hacim	Final Konsantrasyon
Transkriptör Ters		
Transkriptaz Reaksiyon	4 µl	(8 mM MgCl₂)
tamponu, 5x konsantrasyon		
Koruyucu RNaz		
inhibitörü (40 U/µl)	0.5 µl	20 U
dNTP karışımı, 10 mM	2 µl	1 mM her biri
Transkriptör Ters		
Transkriptaz (20 U/µl)	0.5 µl	10 U
Final hacim:	20 µl	

4. Tüpün içine konan reaksiyon karışımı dikkatlice karıştırıldı ve santrifüjlendi.

5. RT reaksiyonu aşağıda verilen ısı döngüleri kullanılarak gerçekleştirildi:

25°C 10 dk

50°C 60 dk

85°C 5 dk

+4°C ∞

6. Reaksiyon sonrası tüpler -20°C’de saklandı.

3.3.4. cDNA'ların sulandırılması

cDNA'lar qRT-PCR öncesi 3 katı kadar dH₂O ile sulandırıldı.

3.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

cDNA sentezini takiben qRT-PCR yöntemi ile hedef genlere ait mRNA miktarlarındaki değişimler saptandı. Yöntem, Roche LIGHTCYCLER 480 (Roche Applied Biosystems™, California, USA) cihazında, TaqMan Probları ve Lightcycler 480 Probe Master Mix kiti (Roche 04707494001, Roche Applied Biosystems™, California, USA) (Tablo 3-12) kullanılarak gerçekleştirildi. mRNA miktarlarının doğru şekilde saptanabilmesi için her dokuda ifade edildiği bilinen referans (housekeeping) genler kullanılarak normalizasyon (bkz. 2. normalizasyon) işlemi yapıldı. Her reaksiyonda kontaminasyon olasılığını kontrol etmek üzere kalıp cDNA içermeyen bir örnek negatif kontrol olarak kullanıldı. Reaksiyon 96 kuyulu plakalarda gerçekleştirildi. Her bir cDNA örneği için deneyler 2 kez tekrarlandı.

3.4.1. qRT-PCR yönteminin standardizasyonu

Her bir gen için qRT-PCR verimliliğini belirlemek üzere 1:1, 1:5, 1:10, 1:100, 1:500, 1:1000 oranında sulandırılmış kalıp cDNA'lar hazırlandı ve qRT-PCR deneyi gerçekleştirildi. REST 2009 yazılımında hesaplanan verimlilik değeri, aynı programda göreceli ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için kullanıldı.

3.4.2. 2. Normalizasyon

2. Normalizasyon işlemi için, çalışılan her bir hedef genin ekspresyon seviyeleri Aktin Beta (ACTB), Gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz (GAPDH) ve hipoksantin guanin fosforibozil transferaz (HPRT) olmak üzere 3 farklı housekeeping gen ile karşılaştırılarak belirlendi.

3.4.3. Deneylerde kullanılan qRT- PCR Primerleri ve Taqman Probları

1. Universal Probe Library (UPL) sıçan ACTB Gene Assay, 05046203001 (Roche Applied Biosystems™, California, USA).
2. UPL sıçan GAPDH Gene Assay, 05046203001 (Roche Applied Biosystems™, California, USA).
3. Sıçan HPRT NM_012583.2
UPL Prob #95, 04692128001 (Roche Applied Biosystems™, California, USA) (Tablo 3-3).

Tablo 3-3: HPRT prob ve primerlerinin özellikleri

Primer	Uzunluk	Yerleşim	Tm	%GC	Dizi
İleri Primer	19	54 - 72	60	58	gaccggttctgtcatgtcg
Geri Primer	24	91 - 114	59	42	acctggttcatcatcactaatcac
Prob	8	79-86	60	75	agtcccag
Ürün (61 nt)					
gaccggttctgtcatgtcgaccctcagtcaccagcgtcgtgattagtgatgatgaaccaggt					

4. Sıçan L-VSCC A1C (L-tipi voltaj duyarlı kalsiyum kanalı alfa 1c, Cacna1c) NM_012517.2
UPL Prob #73, 04688961001 (Roche Applied Biosystems™, California, USA) (Tablo 3-4).

Tablo 3-4: L-VSCC A1C prob ve primerlerinin özellikleri

Primer	Uzunluk	Yerleşim	Tm	%GC	Dizi
İleri Primer	22	3002 - 3023	59	50	cattctgctcagtagcatctcc
Geri Primer	27	3066 - 3092	59	26	aacaatgtcaaaataaaacaga atgtg
Prob	8	3030-3037	60	75	gctgagga
Ürün (91 nt)					
cattctgctcagtagcatctccctggcggctgaggaccccgccagcacacctcctcaggaaccacattctgtttattttgacattgtt					

5. Sıçan Vitamin D Reseptörü (VDR) NM_017058.1
UPL Prob #.65, 04688643001 (Roche Applied Biosystems™, California, USA) (Tablo 3-5).

Tablo 3-5: VDR prob ve primerlerinin özellikleri

Primer	Uzunluk	Yerleşim	Tm	%GC	Dizi
İleri Primer	18	612-629	59	61	gcttctccgggaactcct
Geri Primer	20	664-683	60	50	cggatggttccatcatgtct
Prob	8	632-639	60	75	tcctccag
Ürün (72 nt)					
gcttctccgggaactcctcctcctccagctctgacctgtacaccacctcactagacatgatggaacctccg					

6. Sıçan siklofilin B (peptidilprolil izomeraz B, Ppib) NM_022536.1 UPL Prob #97, 04692144001 (Roche Applied Biosystems™, California, USA) (Tablo 3-6).

Tablo 3-6: Siklofilin B prob ve primerlerinin özellikleri

Primer	Uzunluk	Yerleşim	Tm	%GC	Dizi
İleri Primer	19	495 - 513	60	47	acgtgggttttcggcaaagt
Geri Primer	20	537 - 556	59	55	cttggtgttctccaccttcc
Prob	8	517-524	60	75	tggaaggc
Ürün (62 nt)					
acgtgggttttcggcaaagttctggaaggcatggatgtggtacggaaggtggagaacaccaag					

3.4.4. Deneylerde kullanılan primerlerin sulandırılması

Primerler final konsantrasyonları 5 pmol olacak şekilde hazırlandı.

3.4.4.1. GAPDH ve ACTB primerlerinin hazırlanması

20 µM'lik ileri ve geri primer stoklarından 5 pmol'lük primerler hazırlandı.

25 µl ileri primer + 75 µl dH₂O 5 pmol

25 µl geri primer + 75 µl dH₂O 5 pmol

3.4.4.2. HPRT, LVSCC A1C, VDR ve Siklofilin B primerlerinin hazırlanması

100 µM'lik ileri ve geri primer stoklarından 5 pmol'lük primerler hazırlandı.

5 µl ileri primer + 95 µl dH₂O 5 pmol

5 µl geri primer + 95 µl dH₂O 5 pmol

3.4.5. qRT- PCR reaksiyon karışımının hazırlanması

10 µl'lik standart qRT-PCR reaksiyon karışımını hazırlamak üzere aşağıdaki işlemler takip edildi.

1. Bütün solusyonlar içeriklerinin tamamı karışımaya kadar çözündürüldü ve santrifüj edildikten sonra açıldı. Mikropipet yardımıyla karıştırılıp buz üzerine alındı.
2. Primerler ve hidroliz problemleri içeren 10x konsantrasyonda solüsyon hazırlandı.
3. Buz üzerindeki 1.5 ml tüpe 10 µl'lik reaksiyon karışımı konuldu (Tablo 3-7).

4. Karışım mikropipet yardımıyla karıştırıldı. Vorteks kullanılmadı. 96 kuyulu plakanın her bir kuyusuna 7,5 µl PCR karışımı konuldu. Üzerine 2.5 µl kalıp DNA eklendi.
5. 96 kuyulu plakanın yüzeyi kaplama folyosuyla kaplandı.
6. 96 kuyulu plaka uygun rotora sahip santrifüjde 2 dk 1500g’de santrifüj edildi ve LightCycler 480 cihazına yüklendi.

Tablo 3-7: qRT- PCR reaksiyon karışımı

Reaksiyonun bileşenleri	Hacim
LC480 Probe Master Mix (2x konsantrasyon)	5 µl
Prob	0.1 µl
Primer 1	0.2 µl
Primer 2	0.2 µl
PCR dH₂O	2 µl
cDNA	2.5 µl
Toplam Hacim	10 µl

3.4.5.1. qRT-PCR Sıcaklık Döngüsü

LightCycler 480 cihazında yapılan qRT-PCR'ın sıcaklık döngüsü aşağıdaki tabloda verildiği gibi uygulandı (Tablo 3-8).

Tablo 3-8: qRT-PCR sıcaklık döngüsü

Program İsmi	Döngü sayısı	Analiz tipi
Pre-İnkübasyon*	1	-
Amplifikasyon**	45	Kantitatif değerlendirme
Soğutma***	1	-

Sıcaklıklar (°C)	İnkübasyon	Sıcaklık değişim oranı (°C/sn)
Pre-İnkübasyon		
95 °C	10 dk	4.4
Amplifikasyon		
95 °C	10 sn	4.4
60 °C	30 sn	2.2
72 °C	1 sn	4.4
Soğutma		
40 °C	10 sn	1.5

*Pre-İnkübasyon: FastStart Taq DNA polimerazı aktif hale getirir ve DNA'yı denatüre eder **Amplifikasyon: Hedef DNA'yı çoğaltır ***Soğutma: Termal bloğu soğutur.

3.5. NGF Miktarının Ölçümü

Kültür medyumuna salınan NGF miktarı Chemikine Nerve Growth Factor (NGF) Sandwich ELISA kiti (Chemicon CYT304. Millipore Corp. California, USA) kullanılarak aşağıdaki protokole göre gerçekleştirildi.

1. Hazırlanan standartlardan (Standart 0-7) 100'er µl ve her bir örnekten 100'er µl 96 kuyulu mikrotiplalara yüklendi.
2. Mikrotiplakanın üzeri kapatılarak çalkalayıcı üzerinde +4°C'de gece boyu bekletildi. Örnekler 4 kere 1x yıkama tamponu ile yıkandı.
3. Üzerlerine 100 µl anti-fare NGF monoklonal antikor eklendi ve çalkalayıcı üzerinde 2 saat oda sıcaklığında bekletildi. Örnekler 4 kere 1x yıkama tamponu ile yıkandı.

4. Üzerlerine 100 µl peroksidaz bağlı eşek anti-fare IgG poliklonal antikor eklendi ve çalkalayıcı üzerinde 2 saat oda sıcaklığında bekletildi. Örnekler 4 kere 1x yıkama tamponu ile yıkandı.
5. Üzerlerine 100 µl oda sıcaklığındaki 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin tamponu (TMB/E) eklendi ve 15 dk oda sıcaklığında bekletildi. 500 pg/ml'lik standart koyu mavi renk aldıktan sonra örneklerin üzerine 100 µl durdurma solüsyonu eklendi. Örneklerin rengi sarıya döndükten hemen sonra absorbanları 450 nm'lik filtre ile Thermo MultiSkan EX (Thermo Fisher Scientific™ Delaware, USA) ELISA okuyucuda okundu. Her bir örneğe ait ölçümler 3 kere tekrarlandı.

3.6. Sitotoksosite Ölçümü

Sitotoksosite ölçümü, kültürdeki membranı hasarlı veya ölü hücrelerden medyuma salınan laktat dehidrogenaz (LDH) miktarının belirlenmesiyle gerçekleştirildi. LDH salınımı deneylerinde kullanılacak negatif kontrol, düşük konsantrasyonlu kontrol, yüksek konsantrasyonlu kontrol grupları diğer deneylerle birlikte hazırlandı. NBM+'dan oluşan negatif kontrol, kültür medyumundaki LDH aktivitesini belirlemek üzere hazırlandı. Her deneyde kullanılan ve hiçbir madde uygulanmayan kontrol grupları hücrelerden normal koşullardaki LDH salınımı belirlemek üzere düşük konsantrasyonlu kontrol grubu olarak kullanıldı. Kültür medyumuna %2 Triton X-100 verip 24 saatlik inkübasyon ile oluşturulan yüksek konsantrasyonlu kontrol grubu hücrelerden salınabilecek en yüksek LDH miktarını belirlemek için hazırlandı. Uygulama süreleri sonunda kontrol gruplarına ve deney gruplarına ait kültür medyumlarından 500'er µl örnek ELISA çalışmaları için toplandı ve -80°C'de saklandı.

LDH salınımı Cytotoxicity Detection (LDH) kiti (Roche 11 644 793 001. Roche Diagnostics GmbH Roche Applied Science Mannheim, GE) kullanılarak aşağıdaki protokole göre yapıldı.

1. Her bir örnekten 100 µl 96 kuyulu mikrolakalara yüklendi.
2. Üzerlerine taze hazırlanmış 100 µl reaksiyon karışımı eklendi, 30 dk oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletildi.
3. İnkübasyon sonrası örneklerin absorbanları 492 nm'lik filtre ile Thermo MultiSkan EX (Thermo Fisher Scientific™ Delaware, USA) ELISA okuyucuda okundu. Her bir örneğe ait ölçümler 3 kere tekrarlandı.

3.7. İstatistik

3.7.1. Sitotoksisite ve NGF Ölçümlerinin Analizi

Her örnek için okunan 3 adet absorbans değerinin ortalaması alındı. Bu değerlerden ve kontrollerin ortalama değerlerinden negatif kontrolün ortalaması çıkartıldı. Örneklerin kontrole göre sitotoksisite ve NGF yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı ve Microsoft Office Excel yazılımında grafik haline getirildi.

$$\text{Sitotoksisite/NGF (\%)} = \frac{\text{beklenen değer} - \text{düşük konsantrasyonlu kontrol}}{\text{yüksek konsantrasyonlu kontrol} - \text{düşük konsantrasyonlu kontrol}} \times 100$$

Her bir gruba ve kontrollere ait ham veriler GraphPad InStat DTCG 3.06 (GraphPad Software, Inc. San Diego USA) yazılımında Tek yönlü ANOVA metodu kullanılarak karşılaştırıldı, $p < 0,05$ istatistiksel açıdan anlamlı fark olarak kabul edildi.

3.7.2. qRT-PCR Deneylerinin Analizi

Örneklerin qRT-PCR deneylerinden elde edilen Ct değerleri göreceli ekspresyon seviyelerini belirlemek üzere

$$\Delta CT = 2^{-(\text{Referans Genlerin geometrik ortalaması} - \text{Ct hedef Gen})}$$

formülüne konuldu. Hesaplamalar ve sonuçlara ait grafikler Microsoft Office Excel 2007 programında yapıldı.

Gruplara ait örneklerin mRNA düzeylerinin referans genler ile ve gruplar arasındaki karşılaştırmaları, algoritması içerisinde PCR verimliliği, normalizasyon faktörü hesaplaması ve ekspresyon seviyesi %95 güvenirlilik aralığı (confidence intervals, CI) bulunan “Relative Expression Software Tool, REST 2008” (Corbett Research Pty Ltd and Michael Pfaffl, New South Wales, AU) yazılımı ile gerçekleştirildi. Yazılımında Hipotez test $P(H1)$, araştırılan iki grup arasındaki farkın şans eseri ortaya çıkma olasılığı olarak ifade edilmektedir ve $P(H1) < 0,05$ gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olduğunu, bu farkın rastgele olma şansının %5’den daha küçük olduğunu gösterir.

3.8. Deneylerde Kullanılan Stok Solusyonların Hazırlanması

3.8.1. %3,7 Paraformaldehid solüsyonunun hazırlanması

1. 1,85 g paraformaldehid üzerine 3,5 ml dH_2O ve 10 μl 10M KOH eklenerek %3,7'lik stok solüsyon hazırlandı.
2. Stok paraformaldehid çözününceye kadar 65°C 'de bekletildi.
3. Stok paraformaldehid solüsyonu PBS ile sulandırılarak %3,7'lik paraformaldehid hazırlandı.

3.8.2. 1,25 α -dihidroksivitamin D_3 stok solüsyonunun hazırlanması

1M'lık 1,25 α -dihidroksivitamin D_3 (Vitamin D, Cholecalciferol, $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}$) (Sigma C-9756. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, GE) stok solüsyonu aşağıdaki şekilde etanol içerisinde çözüldü.

1. 1gr vitamin D içeren şişeye 2,5974 ml etanol eklenerek 1M'lık stok hazırlandı.
2. 1M vitamin D stoğundan 10 μl alıp üzerine 990 μl etanol eklenerek 10^{-2}M vitamin D stoğu hazırlandı.
3. 10^{-2}M vitamin D stoğundan da 10 μl alıp üzerine 990 μl etanol eklenerek 10^{-4}M vitamin D stoğu hazırlandı.

3.8.3. Stok siRNA'ların hazırlanması

siRNA tüpleri santrifüj edilerek 1x siRNA tamponu ile Tablo 3-9'da gösterildiği gibi sulandırıldı.

Tablo 3-9: siRNA stok solüsyonun hazırlanması

siRNA miktarı (nmol)	Tercih edilen final konsantrasyon için eklenecek 1x sulandırma tamponu miktarı	
	100 μ M Stok	20 μ M Stok
1	10	50
2	20	100
5	50	250
10	100	500
20	200	1000
50	500	Tüp hacmini aşar
100	1000	Tüp hacmini aşar

1. Solüsyon pipet yardımıyla hava kabarcığı oluşturmada 3-5 kere aşağı yukarı karıştırıldı.
2. Solüsyon karıştırıcı/çalkalayıcıya konulup 30 dk oda sıcaklığında karıştırıldı.
3. Tüpler santrifüj edilerek tüm solüsyon tüpün dibinde toplandı.
4. siRNA konsantrasyonu UV spektrofotometrede (260 nm) ölçüldü.
5. siRNA'lar küçük hacimlere alikotlanıp -20°C veya -80°C'de saklandı. Her bir alikotun dondurup-çözme sayısı 5 kez ile sınırlandırıldı.

3.8.4. RNA izolasyon kiti içeriği (High Pure RNA Isolation Kiti Roche 11 828 665 001)

Tablo 3-10: RNA izolasyon kiti içeriği

İsim	İçerik/Fonksiyon
Lizis/Bağlama Tamponu	25 ml 4,5 M guanidine-HCl, 50 mM Tris-HCl, %30 Triton X-100 (w/v), pH 6,6 (25°C)
DNaz I, rekombinant liyofilize	10 KU liyofilize DNase I. 0,55 ml çözme tamponunda çözünür.
DNaz İnkübasyon Tamponu	10 ml 1M NaCl, 20 mM Tris-HCl ve 10 mM MnCl ₂ , pH 7,0 (25°C)
Yıkama Tamponu I	33 ml (ilk kullanımda üzerine 20 ml absöü etanol eklenir) içerisine 20 ml etanol eklendikten sonraki konsantrasyonu: 5 M guanidine hidroklorit ve 20 mM Tris-HCl, pH 6,6 (25°C)
Yıkama Tamponu II	10 ml (ilk kullanımda üzerine 40 ml absöü etanol eklenir) içerisine 40 ml etanol eklendikten sonraki konsantrasyonu: 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5 (25°C)
Çözme Tamponu	30 ml, nükleaz içermeyen steril çift distile su
High Pure Filtre Tüpü	50 adet iki katmanlı filtreli polipropilen tüp
Toplama Tüpü	50 adet polipropilen tüp (2 ml)

Tablo 3-11: RNA izolasyon kiti solüsyonlarının hazırlanışı

İçeriği	Hazırlanışı	Saklama Koşulları	Kullanım amacı
DNaz I	DNaz I'i 0,55 ml Çözme Tamponu içinde çözünür.	Alikotlayıp -15°C- - 25°C arası saklanır. Ömrü 12 aydır	DNA kontaminasyonunu engellemek için kullanılır
Yıkama Tamponu I	Yıkama Tamponu I 'e 20 ml Absolü etanol eklenir. İyice karıştırılır.	+15°C- +25°C arası saklanır. Son kullanma tarihine kadar kullanılabilir.	Kalıntıların giderilmesinde kullanılır
Yıkama Tamponu II	Yıkama Tamponu II'e 40 ml Absolü etanol eklenir. İyice karıştırılır.	+15°C- +25°C arası saklanır. Son kullanma tarihine kadar kullanılabilir.	Kalıntıların giderilmesinde kullanılır

3.8.5. Lightcycler 480 Probe Master Kiti (Roche 04707494 001) İçeriği**Tablo 3-12: LightCycler 480 Probe Master karışımının içeriği**

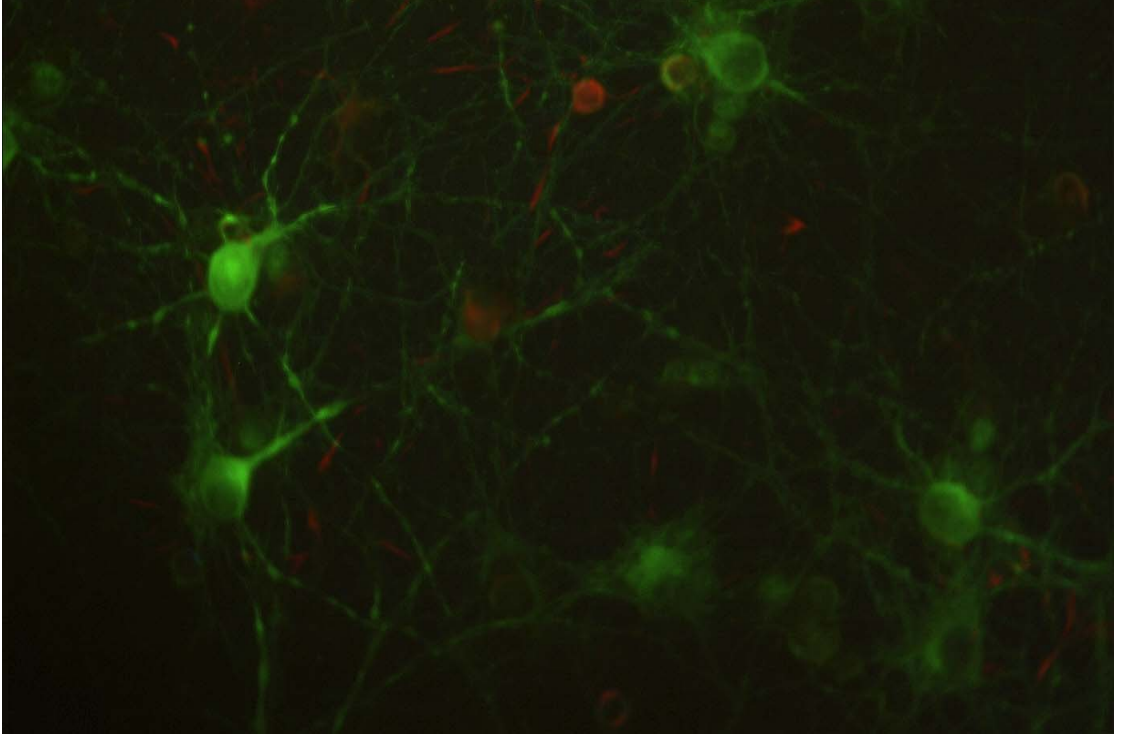
İsim	İçerik / Fonksiyon
LightCycler 480 Probe Master; 2x konsantrasyon	-5 şişe, her biri 1 ml -2x kons. Kullanıma hazır hot-start PCR mix -FastStart Taq DNA Polimeraz, Reaksiyon tamponu, dNTP karışımı (dTTP yerine dUTP) ve 6,4 mM MgCl ₂
LightCycler 480 Probes Master; dH₂O	-5 şişe, her biri 1ml -final reaksiyon hacmini ayarlama PCR- uyumlu kullanılır

4. BULGULAR

Çalışmada, hippocampus ve serebral korteksten hazırlanan primer nöron kültürlerinde post transkripsiyonel gen susturulması yöntemi ile VDR geni susturuldu. Daha sonra gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) yöntemi ile VDR, Siklofin B, LVSCC A1C genlerinin mRNA seviyelerindeki değişiklikler saptandı. Ayrıca serebral korteks primer nöron kültüründe NGF proteinindeki değişimler ELISA yöntemi ile belirlendi. Tüm gruplara sitotoksosite testi uygulandı.

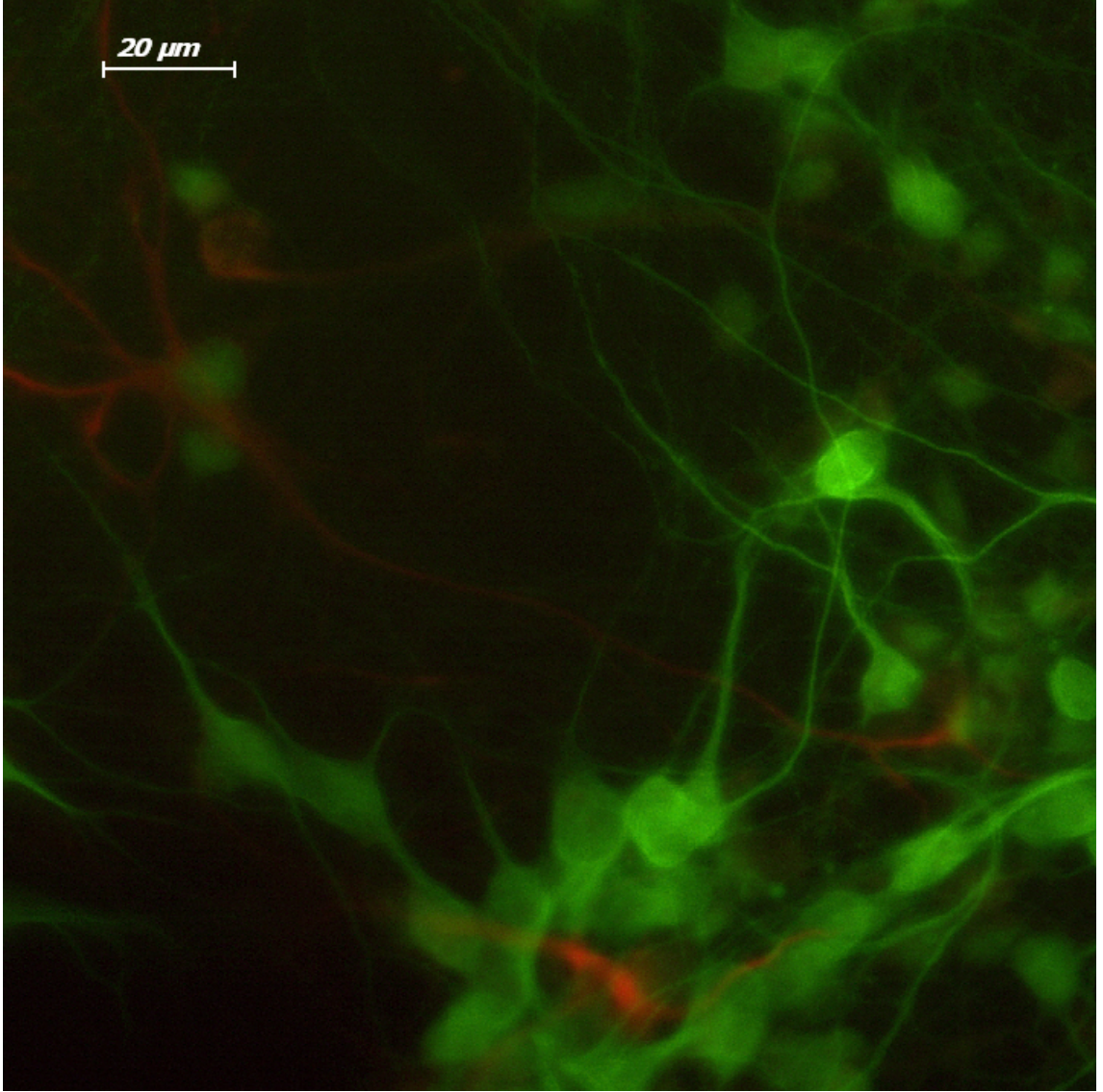
4.1. Floresan Mikroskopik Değerlendirme

Primer hippocampal ve kortikal nöron kültürleri olgunlaştıkları gün olan 7. günde bir nöron belirteci olan Pan Neuronal Marker ve glia hücreleri için GFAP antikorları ile immunfloresan yöntemi ile işaretlenerek kültürdeki nöron/glia oranı primer kortikal nöron kültürü için %5, primer hippocampal nöron kültürü için %10 olarak belirlendi. Böylece kültürün nöron bakımından zengin olduğu saptandı (Şekil 4-1, 4-2). Yedinci günden sonra medyumunu değiştirilmeyerek 14 güne kadar yaşatılan ve böylece yaşlanmasına ve glia üremesine izin verilen primer hippocampal nöron kültürü pozitif kontrol olarak kullanıldı (Şekil 4-3). Bu kültürde nöron/glia oranı %50 olarak saptandı.



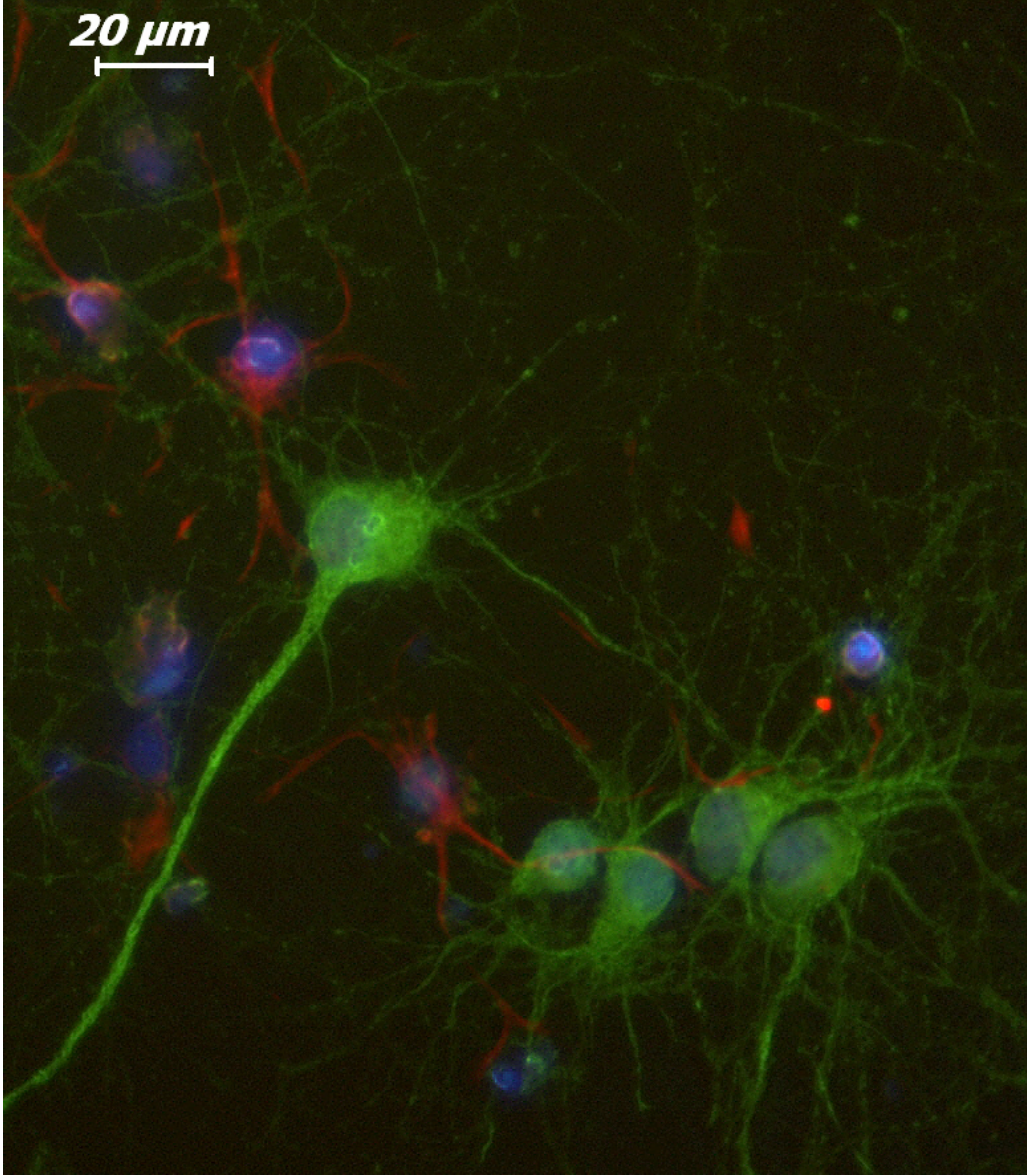
Şekil 4-1: 7 günlük primer hippocampal nöron kültüründe nöronlar ve glia hücreleri görülmektedir.

İmmunfloresan çift işaretleme yöntemiyle nöronlar, Pan Neuronal Marker ile yeşil (FITC) ve glia hücreler, GFAP ile kırmızı (Texas Red-TR) işaretlenmiştir. Nöron/glia oranı %10. Büyütme 40x.



Şekil 4-2: 7 günlük primer kortikal nöron kültüründe nöronlar ve glia hücreleri görülmektedir.

İmmunfloresan çift işaretleme yöntemiyle nöronlar, bir nöron belirteci olan Pan neuronal marker ile yeşil (FITC) ve glia hücreleri, GFAP ile kırmızı (TR) işaretlenmiştir. Nöron/glia oranı %5. Büyütme 40x.



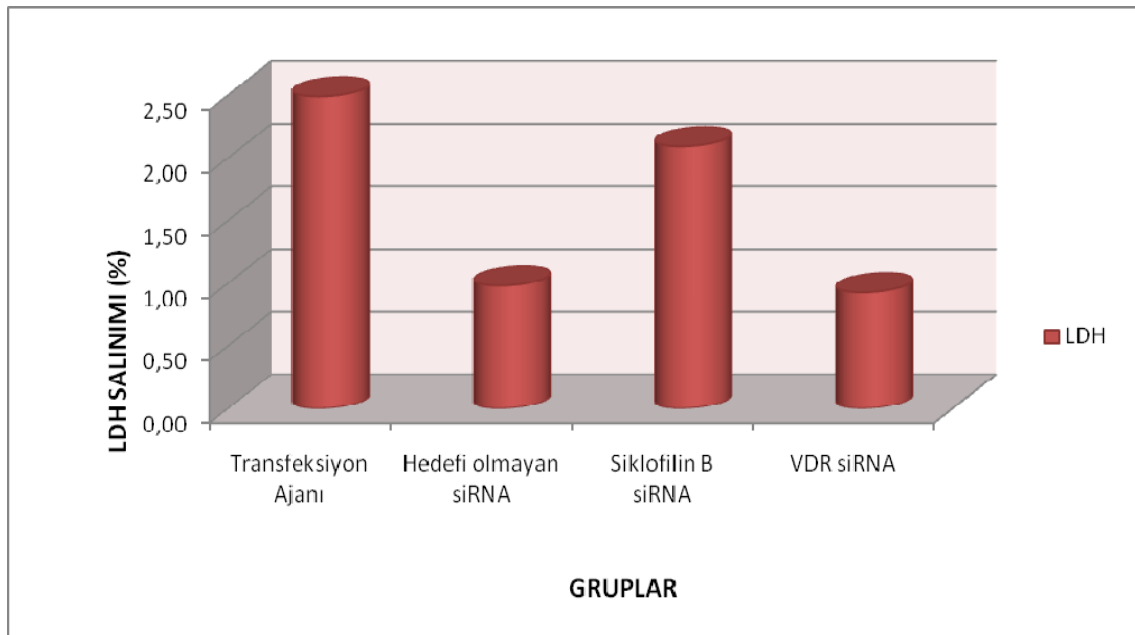
Şekil 4-3: 14 günlük primer hippocampal nöron kültürü görülmektedir.

Yaşlanmasına ve glia üremesine izin verilen 14 günlük primer hippocampal nöron kültürü pozitif kontrol olarak kullanıldı. Nöron/glia oranı %50. FITC işaretli Pan Neuronal Marker, TR işaretli GFAP antikorları ve DAPI ile üçlü boyama. Nöronlar, Yeşil (FITC); glia hücreleri, kırmızı (TR); nukleuslar, mavi (DAPI). Büyütme 40x.

4.2. Sitotoksisite Ölçüm Sonuçları

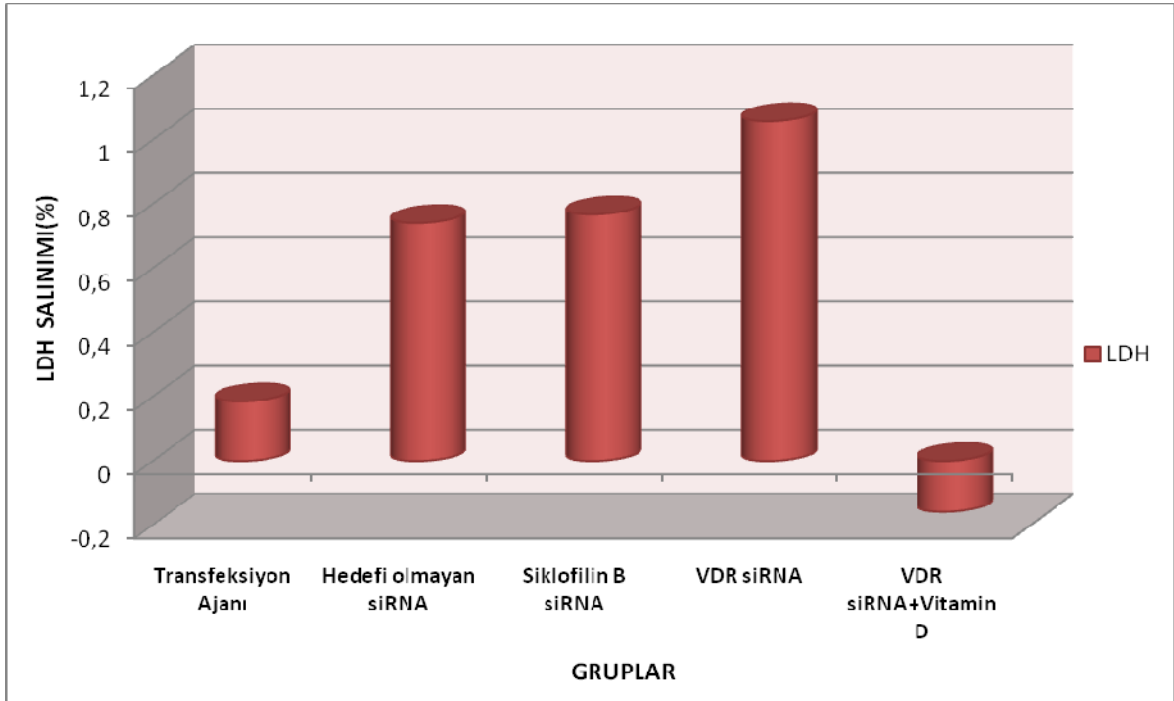
4.2.1. Primer kortikal nöron kültürü sitotoksisite ölçüm sonuçları

Primer kortikal nöron kültürüne 6, 12 ve 24 saat süreyle yapılan siRNA uygulamaları sonucu ortaya çıkabilecek sitotoksisite, hücreler tarafından ortama salınan LDH seviyesi ölçülerek saptandı. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$). Grupların LDH salınımları Şekil 4-4, 4-5 ve 4-6’de gösterilmiştir.



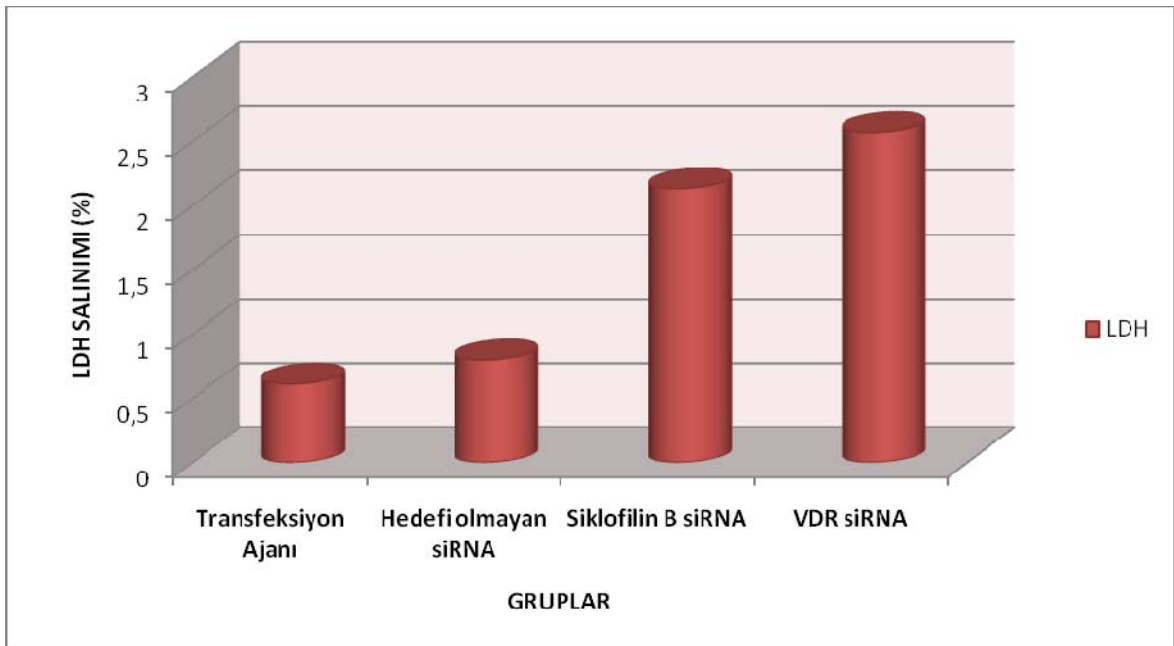
Şekil 4-4: 6 saat süreyle siRNA uygulanmış primer kortikal nöron kültürüne ait tüm grupların 24. saatteki LDH miktarları.

Kontrol grubu LDH salınımı % 0 olarak kabul edilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark yoktur ($p>0,05$).



Şekil 4-5: 12 saat süreyle siRNA uygulanmış primer kortikal nöron kültürüne ait tüm grupların 24. saatteki LDH miktarları.

Kontrol grubu LDH salınımı % 0 olarak kabul edilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark yoktur ($p>0,05$).

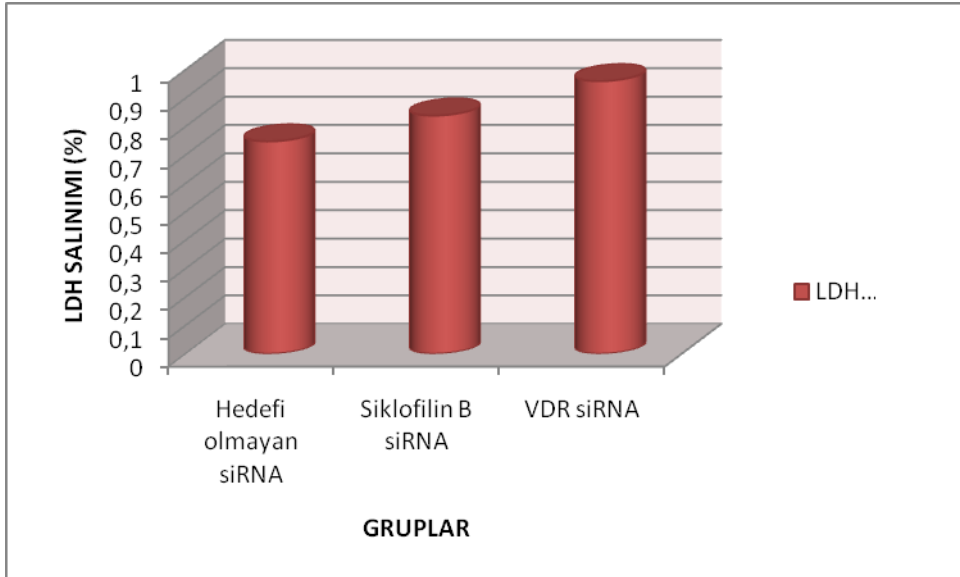


Şekil 4-6: 24 saat süreyle siRNA uygulanmış primer kortikal nöron kültürüne ait tüm grupların 24. saatteki LDH miktarları.

Kontrol grubu LDH salınımı % 0 olarak kabul edilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark yoktur ($p>0,05$).

4.2.2. Primer hippocampal nöron kültüründe sitotoksosite ölçüm sonuçları

Primer hippocampal nöron kültürüne 12 saat süreyle yapılan siRNA uygulamaları sonucu grupların LDH düzeyleri Şekil 4-7’de gösterilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).



Şekil 4-7: 12 saat süreyle siRNA uygulanmış primer hippocampal nöron kültürüne ait tüm grupların 24. saatteki LDH miktarları.

Kontrol grubu LDH salınımı % 0 olarak kabul edilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark yoktur ($p>0,05$).

4.3. siRNA Uygulaması (Post Transkripsiyonel Gen Susturulması-PTGS Yöntemi) Sonuçları

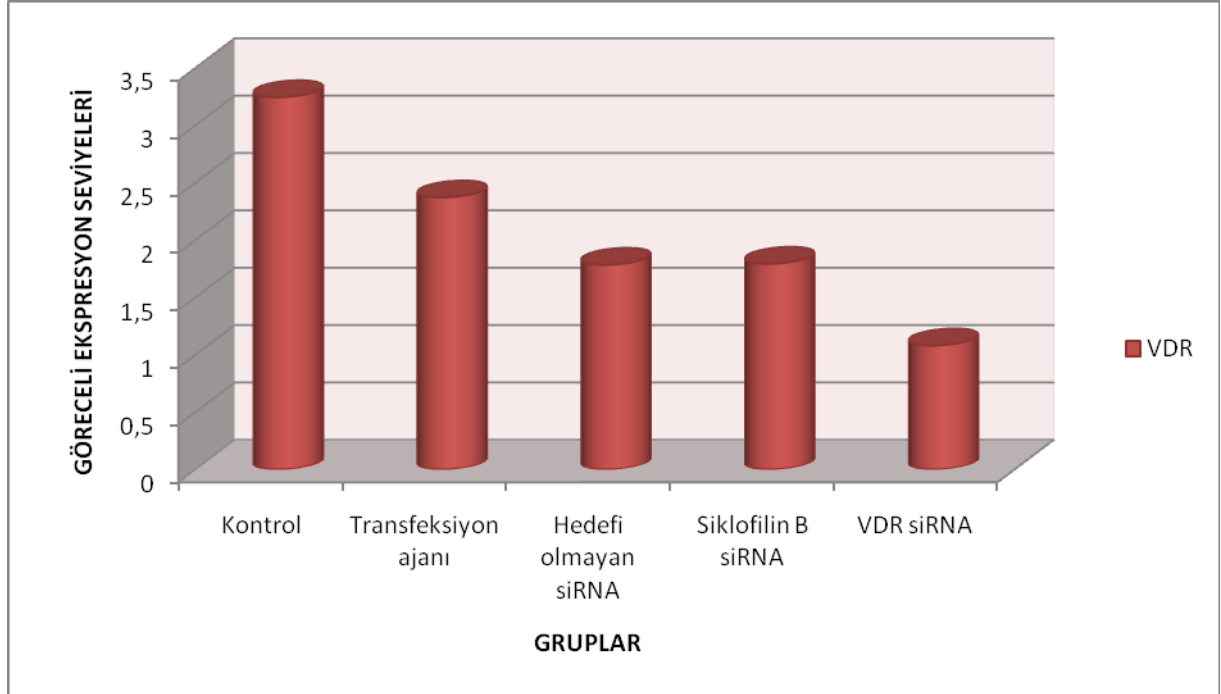
4.3.1. Primer kortikal nöron kültürü sonuçları

4.3.1.1. VDR mRNA seviyelerindeki değişimler

Primer kortikal nöron kültürüne 6 saat süreyle yapılan siRNA uygulamaları sonucunda 24. saatteki VDR mRNA seviyelerindeki değişimler

Primer kortikal nöron kültürüne 6 saat süreyle yapılan siRNA uygulamaları sonucunda qRT-PCR yöntemi ile saptanan VDR mRNA seviyeleri Şekil 4-8’de gösterilmiştir. Altı saat boyunca VDR siRNA uygulanan grubun VDR mRNA ekspresyon seviyesinin kontrol gruplarına oranla azaldığı görüldü. Ancak istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamadı (Tablo 4-1, 4-2, 4-3 ve 4-4). Kontrol grubu ile transfeksiyon ajanı, kontrol grubu ile hedefi olmayan siRNA ve kontrol grubu ile

siklofilin B siRNA uygulanmış kontrol grupları arasında VDR mRNA seviyeleri açısından istatistiksel açıdan anlamlı bir fark yoktu (sırasıyla $p= 0,841$; $p= 0,201$; $p= 0,509$).



Şekil 4-8: 6 saat süreyle siRNA uygulanmış primer kortikal nöron kültürüne ait grupların 24. saatteki VDR mRNA seviyeleri.

Tablo 4-1: 6 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun VDR mRNA ekspresyon seviyelerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	0,865				
ACTB	REF	1,0	0,995				
HPRT	REF	1,0	1,162				
VDR	HDF**	1,0	0,323	0,176 - 0,601	0,120 - 0,919	0,077	Değişim yok

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen

Tablo 4-2: 6 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun VDR mRNA ekspresyon seviyelerinin transfeksiyon ajanı uygulanmış kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	0,936				
ACTB	REF	1,0	0,925				
HPRT	REF	1,0	1,155				
VDR	HDF**	1,0	0,378	0,236 - 0,734	0,214 - 0,844	0,087	Değişim yok

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen

Tablo 4-3: 6 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun VDR mRNA ekspresyon seviyelerinin hedefi olmayan siRNA uygulanmış negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	0,910				
ACTB	REF	1,0	1,034				
HPRT	REF	1,0	1,063				
VDR	HDF**	1,0	0,568	0,347 - 1,028	0,202 - 1,448	0,147	Değişim yok

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen

Tablo 4-4: 6 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun VDR mRNA ekspresyon seviyelerinin Siklofilin B siRNA uygulanmış pozitif kontrol grubu ile karşılaştırılması.

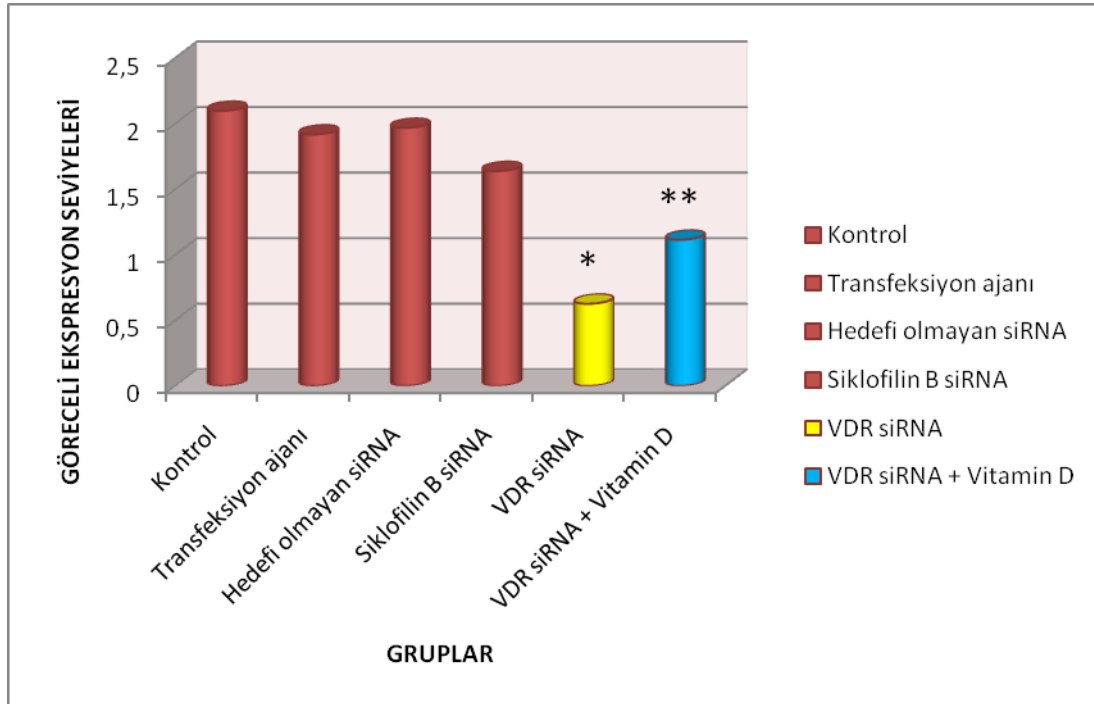
Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	0,946				
ACTB	REF	1,0	1,034				
HPRT	REF	1,0	1,022				
VDR	HDF**	1,0	0,581	0,264 - 1,108	0,236 - 1,842	0,191	Değişim yok

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen

Primer kortikal nöron kültürüne 12 saat süreyle yapılan siRNA uygulamaları sonucunda 24. saatteki VDR mRNA seviyelerindeki değişimler

Primer kortikal nöron kültürüne 12 saat süreyle yapılan siRNA uygulamaları sonucunda qRT-PCR yöntemi ile saptanan VDR mRNA seviyeleri Şekil 4-8’de gösterilmiştir. Oniki saat boyunca VDR siRNA uygulanan grubun VDR mRNA ekspresyon seviyesinin kontrol gruplarına oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görüldü. (Tablo 4-5, 4-6, 4-7 ve 4-8). VDR siRNA uygulanan grubun VDR mRNA ekspresyonu kontrol grubuna göre % 70,4; transfeksiyon ajanı uygulanan kontrol grubuna göre % 69,4; hedefi olmayan siRNA uygulanan negatif kontrol grubuna göre % 66,7; siklofilin B siRNA uygulanmış pozitif kontrol grubuna göre % 61,7 oranında baskılandı. Kontrol grubu ile transfeksiyon ajanı, kontrol grubu ile hedefi olmayan siRNA ve kontrol grubu ile siklofilin B siRNA uygulanmış kontrol grupları arasında VDR mRNA seviyeleri açısından istatistiksel açıdan anlamlı bir fark yoktu (sırasıyla $p=0,785$; $p=0,206$; $p=0,327$).

Oniki saat süreyle VDR siRNA ve 12 saat süreyle 10^{-7} M Vitamin D uygulanan VDR siRNA + Vitamin D grubunun VDR mRNA ekspresyon seviyesinin VDR siRNA uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı görüldü (Şekil 4-9, Tablo 4-9). VDR siRNA + Vitamin D grubunun VDR mRNA ekspresyon seviyesinin kontrol grubu ve transfeksiyon ajanı uygulanan kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede baskılandığı ($p<0,0001$), hedefi olmayan siRNA ve siklofilin B siRNA uygulanan kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermediği saptandı (sırasıyla $p=0,208$; $p=0,246$) (Şekil 4-9).



Şekil 4-9: 12 saat süreyle siRNA uygulanmış primer kortikal nöron kültürüne ait grupların 24. saatteki VDR mRNA ekspresyon seviyeleri.

*Kontrol gruplarına kıyasla ileri derecede anlamlı olarak baskılandı ($p < 0,0001$).

**VDR siRNA grubuna oranla ileri derecede anlamlı olarak uyarıldı ($p < 0,0001$).

Tablo 4-5: 12 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun VDR mRNA ekspresyon seviyelerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	0,905				
ACTB	REF	1,0	0,826				
HPRT	REF	1,0	1,337				
VDR	HDF**	1,0	0,303	0,223 - 0,430	0,222 - 0,440	0,000	BASKILANDI % 70,4

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen

Tablo 4-6: 12 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun VDR mRNA ekspresyon seviyelerinin transfeksiyon ajanı uygulanmış kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	0,987				
ACTB	REF	1,0	0,825				
HPRT	REF	1,0	1,228				
VDR	HDF**	1,0	0,320	0,295 - 0,347	0,294 - 0,349	0,000	BASKILANDI % 69,4

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen

Tablo 4-7: 12 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun VDR mRNA ekspresyon seviyelerinin hedefi olmayan siRNA uygulanmış negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	1,015				
ACTB	REF	1,0	0,980				
HPRT	REF	1,0	1,006				
VDR	HDF**	1,0	0,333	0,243 - 0,496	0,240 - 0,514	0,000	BASKILANDI % 66,7

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen

Tablo 4-8: 12 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun VDR mRNA ekspresyon seviyelerinin Siklofilin B siRNA uygulanmış pozitif kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	1,047				
ACTB	REF	1,0	0,889				
HPRT	REF	1,0	1,074				
VDR	HDF**	1,0	0,395	0,265 - 0,551	0,263 - 0,556	0,000	BASKILANDI % 61,7

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen

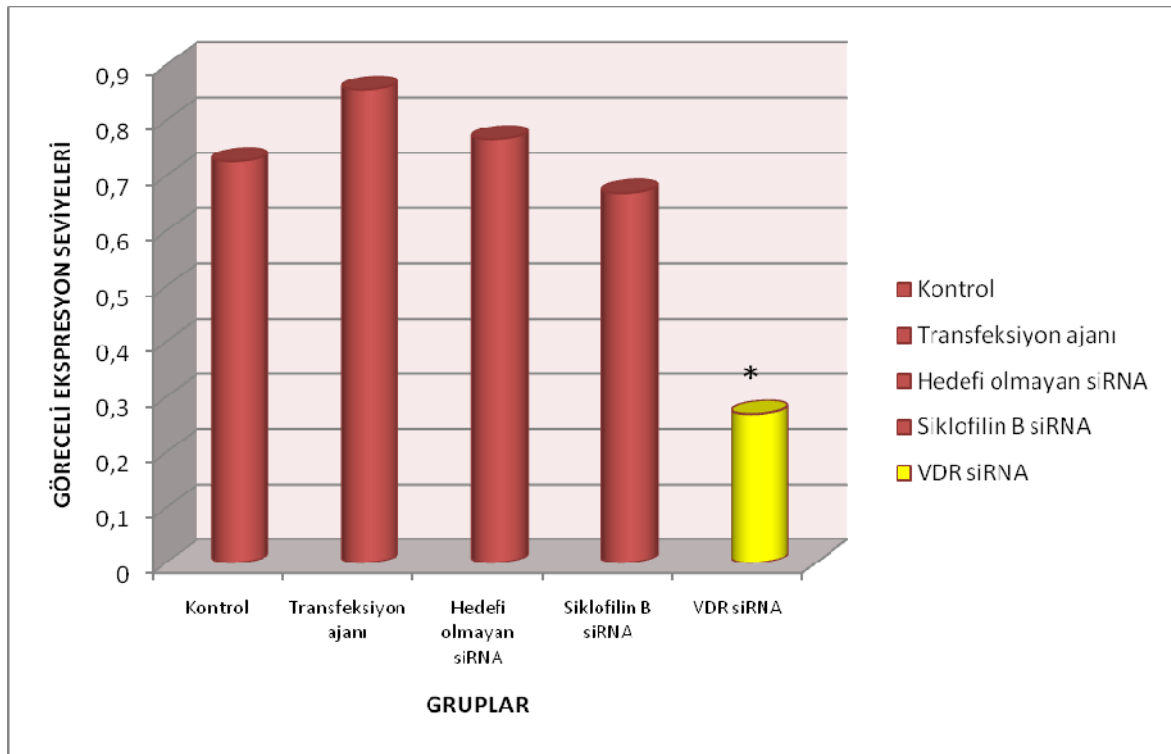
Tablo 4-9: 12 saat süreyle VDR siRNA + 10^{-7} M Vitamin D uygulanmış deney grubunun VDR mRNA ekspresyon seviyelerinin VDR siRNA uygulanmış grup ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	1,074				
ACTB	REF	1,0	0,942				
HPRT	REF	1,0	0,989				
VDR	HDF**	1,0	1,782	1,773 - 1,790	1,770 - 1,794	0,000	UYARILDI

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen

Primer kortikal nöron kültürüne 24 saat süreyle yapılan siRNA uygulamaları sonucunda 24. saatteki VDR mRNA seviyelerindeki değişimler

Primer kortikal nöron kültürüne 24 saat süreyle yapılan siRNA uygulamaları sonucunda qRT-PCR yöntemi ile saptanan VDR mRNA seviyeleri Şekil 4-10'da gösterilmiştir. Yirmi-dört saat boyunca VDR siRNA uygulanan grubun VDR mRNA ekspresyon seviyesinin kontrol gruplarına oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede baskılandığı görüldü. (Tablo 4-10, 4-11, 4-12 ve 4-13). VDR siRNA uygulanan grubun VDR mRNA ekspresyonu kontrol grubuna göre % 65,5 ; transfeksiyon ajanı uygulanan kontrol grubuna göre % 69; hedefi olmayan siRNA uygulanan negatif kontrol grubuna göre % 66,3 ; siklofilin B siRNA uygulanmış pozitif kontrol grubuna göre % 61,5 oranında baskılandı. Kontrol grubu ile transfeksiyon ajanı, kontrol grubu ile hedefi olmayan siRNA ve kontrol grubu ile siklofilin B siRNA uygulanmış kontrol grupları arasında VDR mRNA seviyeleri açısından istatistiksel açıdan anlamlı bir fark yoktu (sırasıyla $p=0,402$; $p=0,330$; $p=0,926$) (Şekil 4-9).



Şekil 4-10: 24 saat süreyle siRNA uygulanmış primer kortikal nöron kültürüne ait grupların 24. saatteki VDR mRNA ekspresyon seviyeleri.

*Kontrol grubu, transfeksiyon ajanı ve hedefi olmayan siRNA gruplarına kıyasla ileri derecede anlamlı olarak baskılandı ($p < 0,0001$). Siklofilin B siRNA grubuna kıyasla anlamlı derecede baskılandı ($p = 0,028$).

Tablo 4-10: 24 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun VDR mRNA ekspresyon seviyelerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	0,879				
ACTB	REF	1,0	0,901				
HPRT	REF	1,0	1,263				
VDR	HDF**	1,0	0,350	0,280 - 0,451	0,246 - 0,485	0,000	BASKILANDI % 65,5

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen

Tablo 4-11: 24 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun VDR mRNA ekspresyon seviyelerinin transfeksiyon ajanı uygulanmış kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	0,890				
ACTB	REF	1,0	0,987				
HPRT	REF	1,0	1,139				
VDR	HDF**	1,0	0,312	0,208 - 0,452	0,168 - 0,603	0,000	BASKILANDI % 69

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen

Tablo 4-12: 24 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun VDR mRNA ekspresyon seviyelerinin hedefi olmayan siRNA uygulanmış negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	0,968				
ACTB	REF	1,0	0,997				
HPRT	REF	1,0	1,036				
VDR	HDF**	1,0	0,338	0,240 - 0,459	0,222 - 0,495	0,000	BASKILANDI % 66,3

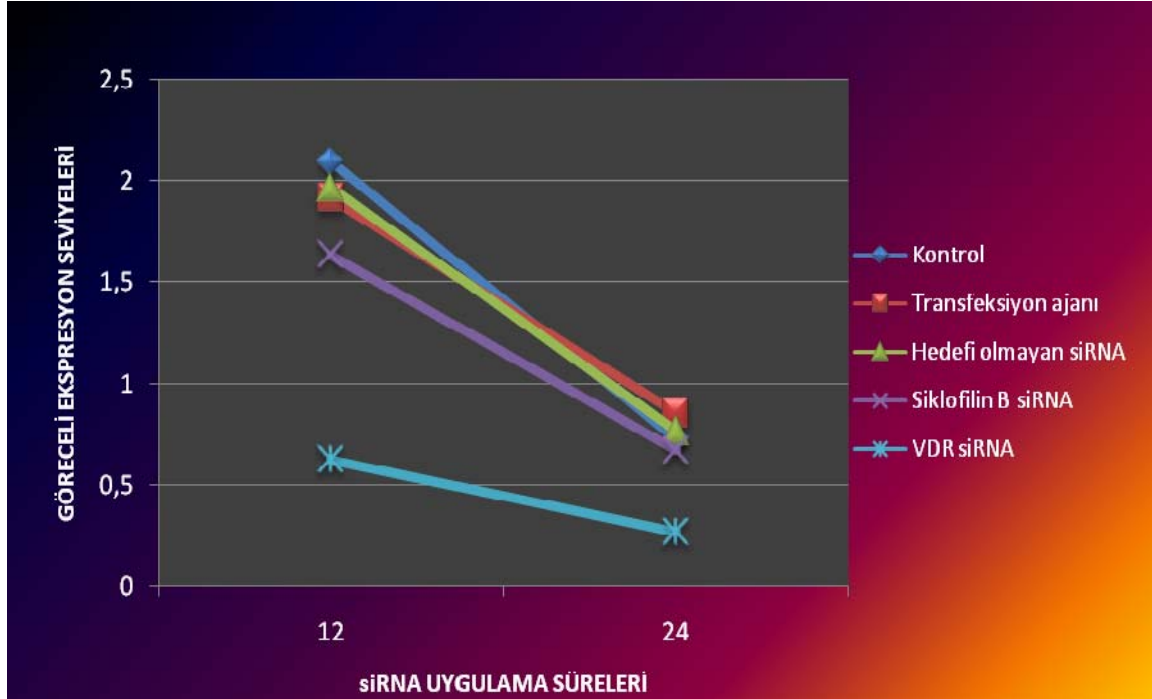
*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen

Tablo 4-13: 24 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun VDR mRNA ekspresyon seviyelerinin Siklofilin B siRNA uygulanmış pozitif kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	0,929				
ACTB	REF	1,0	1,000				
HPRT	REF	1,0	1,077				
VDR	HDF**	1,0	0,386	0,270 - 0,542	0,255 - 0,556	0,000	BASKILANDI % 61,5

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen

Primer kortikal nöron kültürüne 6, 12 ve 24 saat süre ile yapılan siRNA uygulamaları sonucunda VDR siRNA uygulanmış gruplarda VDR mRNA'sının 12 ve 24. saatlerde anlamlı derecede baskılandığı saptandı (Şekil 4-11).



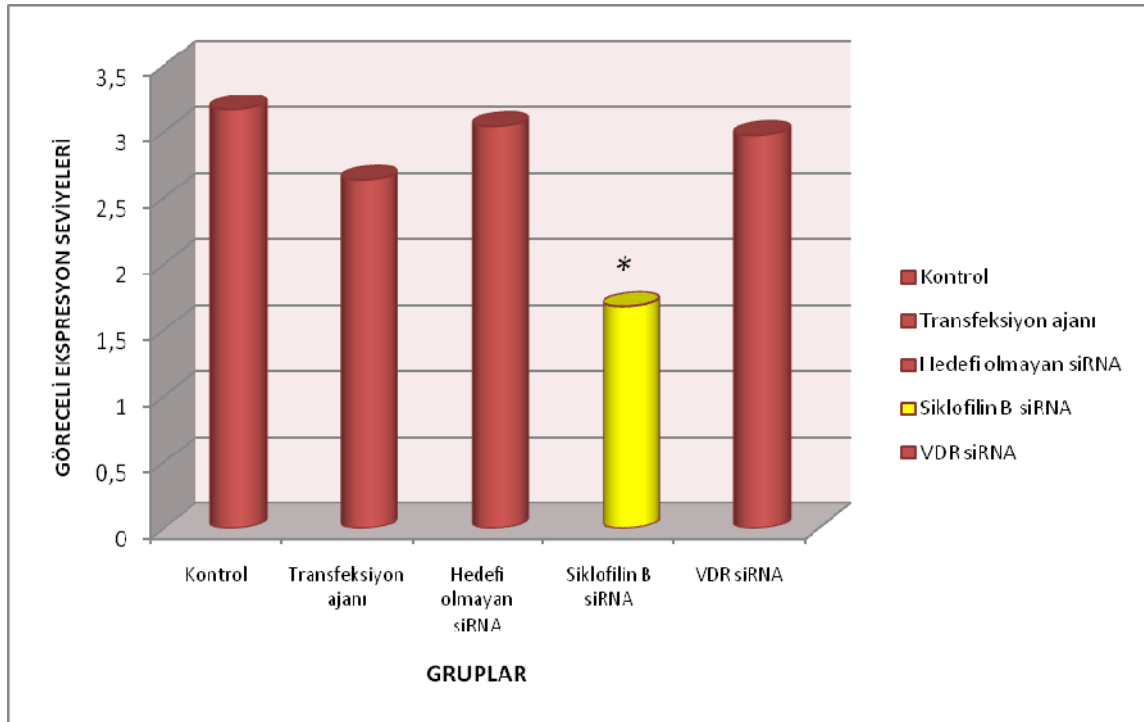
Şekil 4-11: 12 ve 24 saat süreyle siRNA uygulanmış primer kortikal nöron kültürüne ait grupların 24. saat VDR mRNA ekspresyon seviyelerindeki değişimler.

4.3.1.2. Siklofilin B mRNA seviyelerindeki değişimler

Primer kortikal nöron kültürüne 6 saat süreyle yapılan siRNA uygulamaları sonucunda 24. saatteki Siklofilin B mRNA seviyelerindeki değişimler

Primer kortikal nöron kültürüne 6 saat süreyle yapılan siRNA uygulamaları sonucunda qRT-PCR yöntemi ile saptanan Siklofilin B mRNA seviyeleri Şekil 4-12’de gösterilmiştir. Altı saat boyunca Siklofilin B siRNA uygulanan grubun Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyesinin diğer gruplara oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede baskılandığı görüldü. (Tablo 4-14, 4-15, 4-16 ve 4-17). Siklofilin B siRNA uygulanan grubun Siklofilin B mRNA ekspresyonu kontrol grubuna göre % 47,5; transfeksiyon ajanı uygulanan kontrol grubuna göre % 37 ; hedefi olmayan siRNA uygulanan negatif kontrol grubuna göre % 45 ; VDR siRNA uygulanmış deney grubuna göre % 43,5 oranında baskılandı. Kontrol grubu ile transfeksiyon ajanı, kontrol grubu

ile hedefi olmayan siRNA ve kontrol grubu ile VDR siRNA uygulanmış gruplar arasında Siklofilin B mRNA seviyeleri açısından istatistiksel açıdan anlamlı bir fark yoktu (sırasıyla $p=0,189$; $p=0,161$; $p=0,115$) (Şekil 4-12).



Şekil 4-12: 6 saat süreyle siRNA uygulanmış primer kortikal nöron kültürüne ait grupların 24. saatteki Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyeleri.

*Diğer gruplara kıyasla anlamlı derecede baskılandı.

Tablo 4-14: 6 saat süreyle Siklofilin B siRNA uygulanmış deney grubunun Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyelerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	0,922				
ACTB	REF	1,0	0,962				
HPRT	REF	1,0	1,128				
CycB***	HDF**	1,0	0,527	0,483 - 0,570	0,453 - 0,591	0,000	BASKILANDI % 47,5

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen, ***CycB: Siklofilin B

Tablo 4-15: 6 saat süreyle Siklofilin B siRNA uygulanmış deney grubunun Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyelerinin transfeksiyon ajanı uygulanmış kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	0,970				
ACTB	REF	1,0	0,940				
HPRT	REF	1,0	1,097				
CycB***	HDF**	1,0	0,632	0,588 - 0,681	0,564 - 0,698	0,004	BASKILANDI % 37

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen, ***CycB: Siklofilin B

Tablo 4-16: 6 saat süreyle Siklofilin B siRNA uygulanmış deney grubunun Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyelerinin hedefi olmayan siRNA uygulanmış negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	0,948				
ACTB	REF	1,0	1,035				
HPRT	REF	1,0	1,019				
CycB***	HDF**	1,0	0,552	0,526 - 0,576	0,512 - 0,585	0,002	BASKILANDI % 45

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen, ***CycB: Siklofilin B

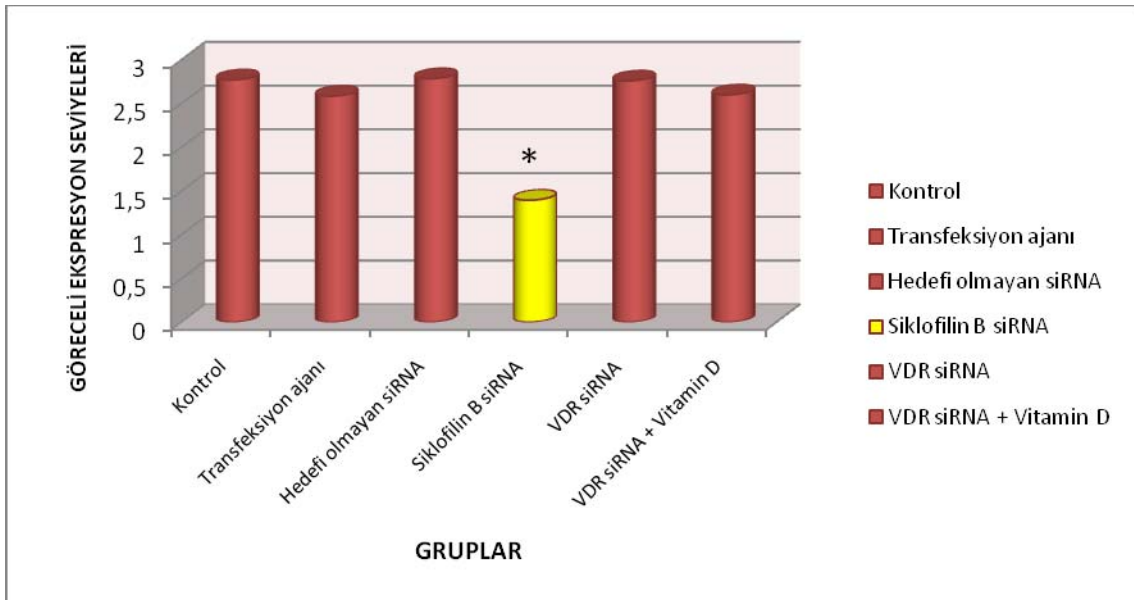
Tablo 4-17: 6 saat süreyle Siklofilin B siRNA uygulanmış deney grubunun Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyelerinin VDR siRNA uygulanmış deney grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	1,059				
ACTB	REF	1,0	0,981				
HPRT	REF	1,0	0,963				
CycB***	HDF**	1,0	0,566	0,531 - 0,615	0,504 - 0,640	0,002	BASKILANDI % 43,5

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen, ***CycB: Siklofilin B

Primer kortikal nöron kültürüne 12 saat süreyle yapılan siRNA uygulamaları sonucunda 24. saatteki Siklofilin B mRNA seviyelerindeki değişimler

Primer kortikal nöron kültürüne 12 saat süreyle yapılan siRNA uygulamaları sonucunda qRT-PCR yöntemi ile saptanan Siklofilin B mRNA seviyeleri Şekil 4-13'de gösterilmiştir. Oniki saat boyunca Siklofilin B siRNA uygulanan grubun Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyesinin diğer gruplara oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede baskılandığı görüldü. (Tablo 4-18, 4-19, 4-20, 4-21 ve 4-22). Siklofilin B siRNA uygulanan grubun Siklofilin B mRNA ekspresyonu kontrol grubuna göre % 50,8; transfeksiyon ajanı uygulanan kontrol grubuna göre % 46,6; hedefi olmayan siRNA uygulanan negatif kontrol grubuna göre % 49,4; VDR siRNA uygulanmış deney grubuna göre % 49,2, VDR siRNA + 10^{-7} M Vitamin D uygulanmış deney grubuna göre % 46,5 oranında baskılandı. Kontrol grubu ile transfeksiyon ajanı, kontrol grubu ile hedefi olmayan siRNA, kontrol grubu ile VDR siRNA ve kontrol grubu ile VDR siRNA + Vitamin D uygulanmış gruplar arasında Siklofilin B mRNA seviyeleri açısından istatistiksel açıdan anlamlı bir fark yoktu (sırasıyla $p= 0,110$; $p= 0,687$; $p= 0,519$; $p= 0,070$) (Şekil 4-13).



Şekil 4-13: 12 saat süreyle siRNA uygulanmış primer kortikal nöron kültürüne ait grupların 24. saatteki Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyeleri.

*Diğer gruplara kıyasla anlamlı derecede baskılandı.

Tablo 4-18: 12 saat süreyle Siklofilin B siRNA uygulanmış deney grubunun Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyelerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	0,888				
ACTB	REF	1,0	0,930				
HPRT	REF	1,0	1,211				
CycB***	HDF**	1,0	0,497	0,459 - 0,535	0,441 - 0,551	0,005	BASKILANDI % 50,8

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen, ***CycB: Siklofilin B

Tablo 4-19: 12 saat süreyle Siklofilin B siRNA uygulanmış deney grubunun Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyelerinin transfeksiyon ajanı uygulanmış kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	0,969				
ACTB	REF	1,0	0,921				
HPRT	REF	1,0	1,121				
CycB***	HDF**	1,0	0,536	0,501 - 0,574	0,485 - 0,615	0,003	BASKILANDI % 46,6

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen, ***CycB: Siklofilin B

Tablo 4-20: 12 saat süreyle Siklofilin B siRNA uygulanmış deney grubunun Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyelerinin hedefi olmayan siRNA uygulanmış negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	1,033				
ACTB	REF	1,0	1,052				
HPRT	REF	1,0	0,920				
CycB***	HDF**	1,0	0,507	0,456 - 0,545	0,440 - 0,603	0,005	BASKILANDI % 49,4

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen, ***CycB: Siklofilin B

Tablo 4-21: 12 saat süreyle Siklofilin B siRNA uygulanmış deney grubunun Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyelerinin VDR siRNA uygulanmış deney grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	1,026				
ACTB	REF	1,0	1,009				
HPRT	REF	1,0	0,966				
CycB***	HDF**	1,0	0,508	0,492 - 0,528	0,478 - 0,539	0,001	BASKILANDI % 49,2

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen, ***CycB: Siklofilin B

Tablo 4-22: 12 saat süreyle Siklofilin B siRNA uygulanmış deney grubunun Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyelerinin VDR siRNA+ 10⁻⁷ M Vitamin D uygulanmış deney grubu ile karşılaştırılması.

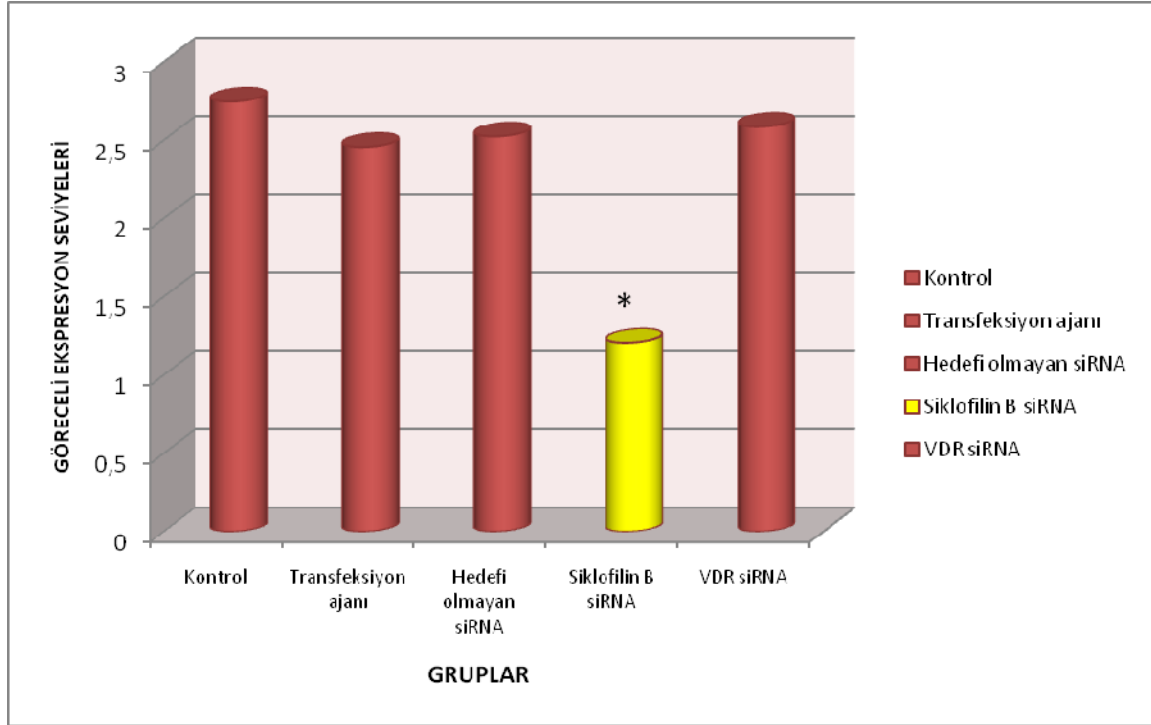
Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	1,170				
ACTB	REF	1,0	0,929				
HPRT	REF	1,0	0,921				
CycB***	HDF**	1,0	0,539	0,507 - 0,589	0,492 - 0,601	0,003	BASKILANDI % 46,5

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen, ***CycB: Siklofilin B

Primer kortikal nöron kültürüne 24 saat süreyle yapılan siRNA uygulamaları sonucunda 24. saatteki Siklofilin B mRNA seviyelerindeki değişimler

Primer kortikal nöron kültürüne 24 saat süreyle yapılan siRNA uygulamaları sonucunda qRT-PCR yöntemi ile saptanan Siklofilin B mRNA seviyeleri Şekil 4-14'de gösterilmiştir. Yirmi dört saat boyunca Siklofilin B siRNA uygulanan grubun Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyesinin diğer gruplara oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede baskılandığı görüldü (Tablo 4-23, 4-24, 4-25 ve 4-26). Siklofilin B siRNA uygulanan grubun Siklofilin B mRNA ekspresyonu kontrol grubuna göre % 56,5 ; transfeksiyon ajanı uygulanan kontrol grubuna göre % 50,9 ; hedefi olmayan siRNA uygulanan negatif kontrol grubuna göre % 52; VDR siRNA uygulanmış deney grubuna göre % 53,1 oranında baskılandı. Kontrol grubu ile transfeksiyon ajanı, kontrol grubu ile hedefi olmayan siRNA ve kontrol grubu ile VDR siRNA uygulanmış gruplar

arasında Siklofilin B mRNA seviyeleri açısından istatistiksel açıdan anlamlı bir fark yoktu (sırasıyla $p=0,143$; $p=0,088$; $p=0,163$) (Şekil 4-14).



Şekil 4-14: 24 saat süreyle siRNA uygulanmış primer kortikal nöron kültürüne ait grupların 24. saatteki Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyeleri.

*Diğer gruplara kıyasla anlamlı derecede baskılandı.

Tablo 4-23: 24 saat süreyle Siklofilin B siRNA uygulanmış deney grubunun Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyelerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	1,054				
ACTB	REF	1,0	0,876				
HPRT	REF	1,0	1,083				
CycB***	HDF**	1,0	0,437	0,405 - 0,471	0,388 - 0,493	0,000	BASKILANDI % 56,5

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen, ***CycB: Siklofilin B

Tablo 4-24: 24 saat süreyle Siklofilin B siRNA uygulanmış deney grubunun Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyelerinin transfeksiyon ajanı uygulanmış kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	0,989				
ACTB	REF	1,0	0,981				
HPRT	REF	1,0	1,030				
CycB***	HDF**	1,0	0,491	0,467 - 0,519	0,444 - 0,560	0,002	BASKILANDI % 50,9

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen, ***CycB: Siklofilin B

Tablo 4-25: 24 saat süreyle Siklofilin B siRNA uygulanmış deney grubunun Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyelerinin hedefi olmayan siRNA uygulanmış negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	1,054				
ACTB	REF	1,0	0,978				
HPRT	REF	1,0	0,970				
CycB***	HDF**	1,0	0,481	0,445 - 0,536	0,421 - 0,594	0,000	BASKILANDI % 52

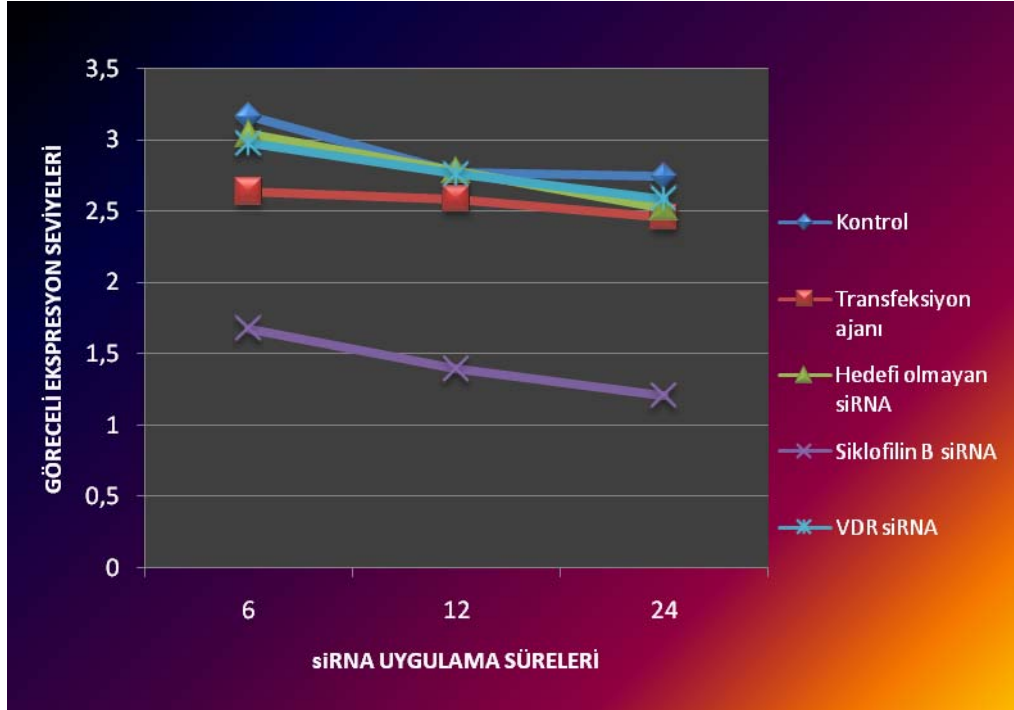
*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen, ***CycB: Siklofilin B

Tablo 4-26: 24 saat süreyle Siklofilin B siRNA uygulanmış deney grubunun Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyelerinin VDR siRNA uygulanmış deney grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	1,076				
ACTB	REF	1,0	0,983				
HPRT	REF	1,0	0,945				
CycB***	HDF**	1,0	0,470	0,429 - 0,539	0,399 - 0,554	0,001	BASKILANDI % 53,1

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen, ***CycB: Siklofilin B

Primer kortikal nöron kültürüne 6, 12 ve 24 saat süre ile yapılan siRNA uygulamaları sonucunda Siklofilin B siRNA uygulanmış gruplarda Siklofilin B mRNA'sının 6, 12 ve 24. saatlerde anlamlı derecede baskılandığı saptandı (Şekil 4-15).

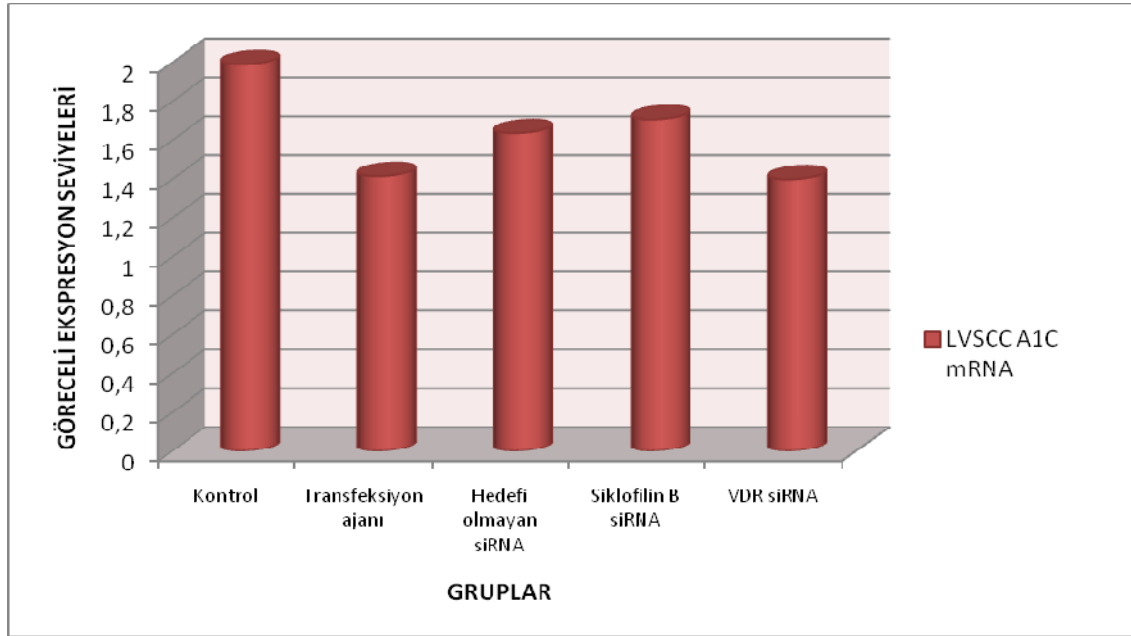


Şekil 4-15: 6, 12 ve 24 saat süreyle siRNA uygulanmış primer kortikal nöron kültürüne ait grupların 24. saat Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyelerindeki değişimler.

4.3.1.3. L-tipi voltaj duyarlı kalsiyum kanalı A1C (LVSCC A1C) mRNA seviyelerindeki değişimler

Primer kortikal nöron kültürüne 6 saat süreyle yapılan siRNA uygulamaları sonucunda 24. saatteki LVSCC A1C mRNA seviyelerindeki değişimler

Primer kortikal nöron kültürüne 6 saat süreyle yapılan siRNA uygulamaları sonucunda qRT-PCR yöntemi ile saptanan LVSCC A1C mRNA seviyeleri Şekil 4-16'da gösterilmiştir. Altı saat boyunca VDR siRNA uygulanan grubun LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyeleri ile diğer gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamadı (Tablo 4-27, 4-28, 4-29 ve 4-30). Kontrol grubu ile transfeksiyon ajanı, kontrol grubu ile hedefi olmayan siRNA ve kontrol grubu ile siklofilin B siRNA uygulanmış kontrol grupları arasında VDR mRNA seviyeleri açısından istatistiksel açıdan anlamlı bir fark yoktu (sırasıyla $p=0,093$; $p=0,225$; $p=0,488$) (Şekil 4-16).



Şekil 4-16: 6 saat süreyle siRNA uygulanmış primer kortikal nöron kültürüne ait grupların 24. saat LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyeleri.

Gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark yoktur.

Tablo 4-27: 6 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyelerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	0,879				
ACTB	REF	1,0	0,983				
HPRT	REF	1,0	1,157				
LVSCC A1C	HDF**	1,0	0,702	0,476 - 1,008	0,371 - 1,233	0,105	Değişim yok

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen

Tablo 4-28: 6 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyelerinin transfeksiyon ajanı uygulanmış kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	0,925				
ACTB	REF	1,0	0,961				
HPRT	REF	1,0	1,125				
LVSCC A1C	HDF**	1,0	0,971	0,688 - 1,294	0,569 - 1,717	0,802	Değişim yok

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen

Tablo 4-29: 6 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyelerinin hedefi olmayan siRNA uygulanmış negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	0,904				
ACTB	REF	1,0	1,058				
HPRT	REF	1,0	1,045				
LVSCC A1C	HDF**	1,0	0,845	0,613 - 1,148	0,468 - 1,378	0,295	Değişim yok

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen

Tablo 4-30: 6 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyelerinin Siklofilin B siRNA uygulanmış deney grubu ile karşılaştırılması.

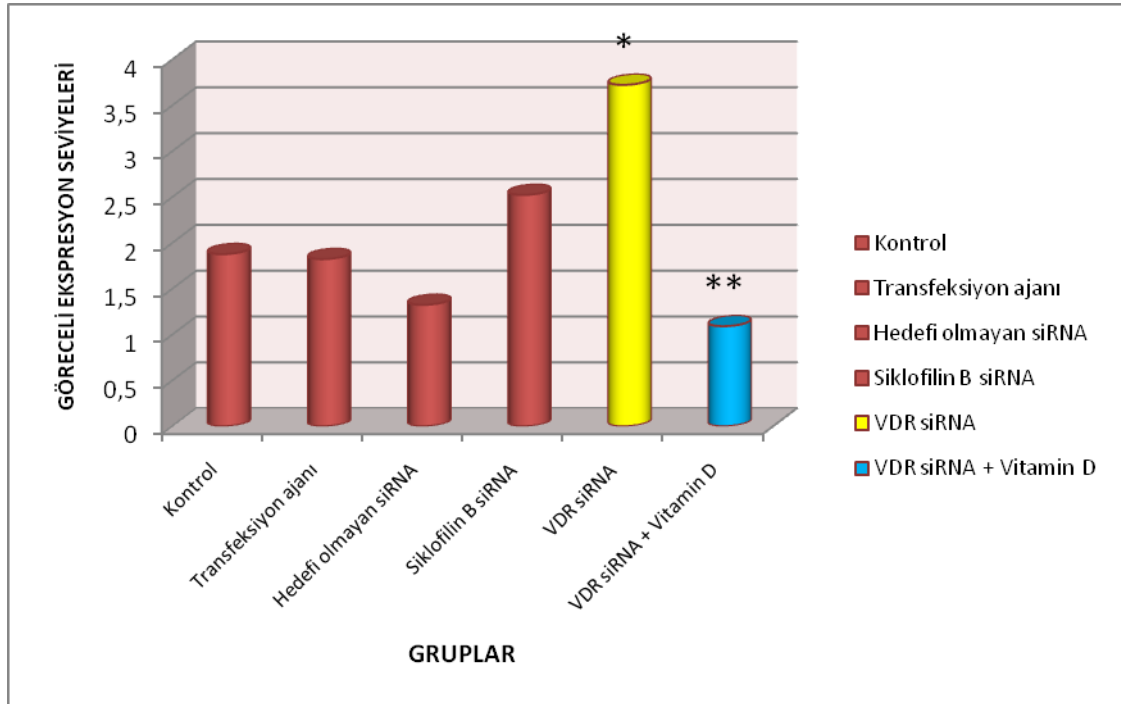
Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	0,954				
ACTB	REF	1,0	1,022				
HPRT	REF	1,0	1,026				
LVSCC A1C	HDF**	1,0	0,798	0,584 - 0,991	0,499 - 1,152	0,111	Değişim yok

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen

Primer kortikal nöron kültürüne 12 saat süreyle yapılan siRNA uygulamaları sonucunda 24. saatteki LVSCC A1C mRNA seviyelerindeki değişimler

Primer kortikal nöron kültürüne 12 saat süreyle yapılan siRNA uygulamaları sonucunda qRT-PCR yöntemi ile saptanan LVSCC A1C mRNA seviyeleri Şekil 4-17’da gösterilmiştir. Oniki saat boyunca VDR siRNA uygulanan grubun LVSCC A1C mRNA ekspresyonunun kontrol gruplarına oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı görüldü (Tablo 4-31, 4-32, 4-33, 4-34 ve 4-35). Kontrol grubu ile transfeksiyon ajanı, kontrol grubu ile hedefi olmayan siRNA ve kontrol grubu ile siklofilin B siRNA uygulanmış kontrol grupları arasında LVSCC A1C mRNA seviyeleri açısından istatistiksel açıdan anlamlı bir fark yoktu (sırasıyla $p=0,655$; $p=0,060$; $p=0,080$).

Oniki saat süreyle VDR siRNA ve 12 saat süreyle 10^{-7} M Vitamin D uygulanan VDR siRNA + Vitamin D grubunun LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyesinin VDR siRNA uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görüldü (Şekil 4-17, Tablo 4-35). VDR siRNA + Vitamin D grubunun LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyesinin kontrol, transfeksiyon ajanı, hedefi olmayan siRNA ve siklofilin B siRNA uygulanan kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermediği saptandı (sırasıyla $p=0,05$; $p=0,094$; $p=0,412$; $p=0,065$) (Şekil 4-17).



Şekil 4-17: 12 saat süreyle siRNA uygulanmış primer kortikal nöron kültürüne ait grupların 24. saat LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyeleri.

*Kontrol gruplarına kıyasla anlamlı derecede uyarıldı.

**VDR siRNA grubuna oranla anlamlı derecede baskılandı.

Tablo 4-31: 12 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyelerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	0,852				
ACTB	REF	1,0	0,940				
HPRT	REF	1,0	1,248				
LVSCC A1C	HDF**	1,0	1,661	1,077 - 3,759	0,899 - 5,209	0,015	UYARILDI

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen

Tablo 4-32: 12 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyelerinin transfeksiyon ajanı uygulanmış kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	0,930				
ACTB	REF	1,0	0,931				
HPRT	REF	1,0	1,155				
LVSCC A1C	HDF**	1,0	1,764	1,094 - 3,475	0,763 - 5,930	0,034	UYARILDI

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen

Tablo 4-33: 12 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyelerinin hedefi olmayan siRNA uygulanmış negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	0,992				
ACTB	REF	1,0	1,064				
HPRT	REF	1,0	0,948				
LVSCC A1C	HDF**	1,0	2,401	1,591 - 5,918	1,392 - 7,527	0,002	UYARILDI

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen

Tablo 4-34: 12 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyelerinin Siklofilin B siRNA uygulanmış deney grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	1,026				
ACTB	REF	1,0	0,922				
HPRT	REF	1,0	1,057				
LVSCC A1C	HDF**	1,0	2,031	1,155 - 3,423	1,147 - 3,703	0,024	UYARILDI

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen

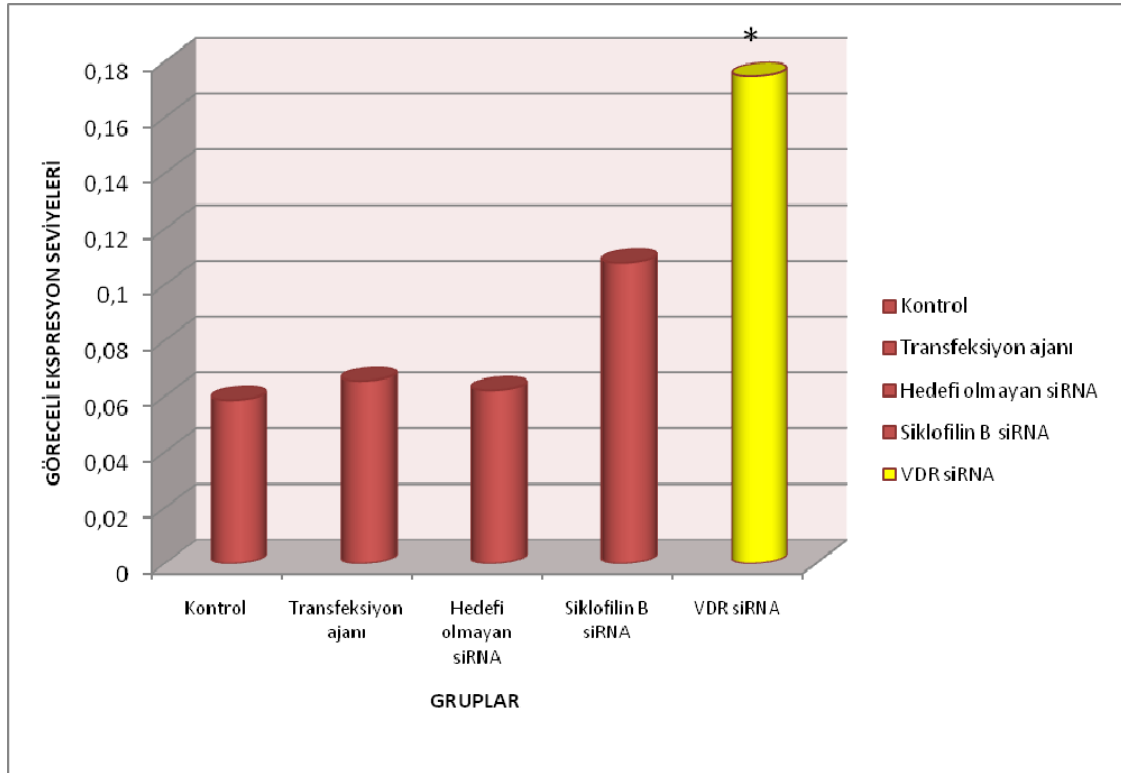
Tablo 4-35: 12 saat süreyle VDR siRNA + 10^{-7} M Vitamin D uygulanmış deney grubunun LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyelerinin VDR siRNA uygulanmış grup ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	0,891				
ACTB	REF	1,0	1,065				
HPRT	REF	1,0	1,054				
LVSCC A1C	HDF**	1,0	0,227	0,061 - 0,728	0,019 - 0,911	0,013	BASKILANDI

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen

Primer kortikal nöron kültürüne 24 saat süreyle yapılan siRNA uygulamaları sonucunda 24. saatteki LVSCC A1C mRNA seviyelerindeki değişimler

Primer kortikal nöron kültürüne 24 saat süreyle yapılan siRNA uygulamaları sonucunda qRT-PCR yöntemi ile saptanan LVSCC A1C mRNA seviyeleri Şekil 4-18'de gösterilmiştir. Yirmi dört saat boyunca VDR siRNA uygulanan grubun LVSCC A1C mRNA ekspresyonunun kontrol gruplarına oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede uyarıldığı görüldü (Tablo 4-36, 4-37, 4-38 ve 4-39). Kontrol grubu ile transfeksiyon ajanı, kontrol grubu ile hedefi olmayan siRNA ve kontrol grubu ile siklofilin B siRNA uygulanmış kontrol grupları arasında LVSCC A1C mRNA seviyeleri açısından istatistiksel açıdan anlamlı bir fark yoktu (sırasıyla $p=0,860$; $p=0,812$; $p=0,055$) (Şekil 4-18).



Şekil 4-18: 24 saat süreyle siRNA uygulanmış primer kortikal nöron kültürüne ait grupların 24. saat LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyeleri.

*Kontrol gruplarına kıyasla anlamlı derecede uyarıldı.

Tablo 4-36: 24 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyelerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	0,977				
ACTB	REF	1,0	0,862				
HPRT	REF	1,0	1,188				
LVSCC A1C	HDF**	1,0	2,992	2,150 - 4,588	1,677 - 6,186	0,002	UYARILDI

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen

Tablo 4-37: 24 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyelerinin transfeksiyon ajanı uygulanmış kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	0,919				
ACTB	REF	1,0	0,998				
HPRT	REF	1,0	1,090				
LVSCC A1C	HDF**	1,0	2,839	1,849 - 4,221	1,280 - 7,994	0,001	UYARILDI

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen

Tablo 4-38: 24 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyelerinin hedefi olmayan siRNA uygulanmış negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	0,980				
ACTB	REF	1,0	0,995				
HPRT	REF	1,0	1,026				
LVSCC A1C	HDF**	1,0	3,198	1,631 - 5,679	1,174 - 6,847	0,003	UYARILDI

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen

Tablo 4-39: 12 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyelerinin Siklofilin B siRNA uygulanmış deney grubu ile karşılaştırılması.

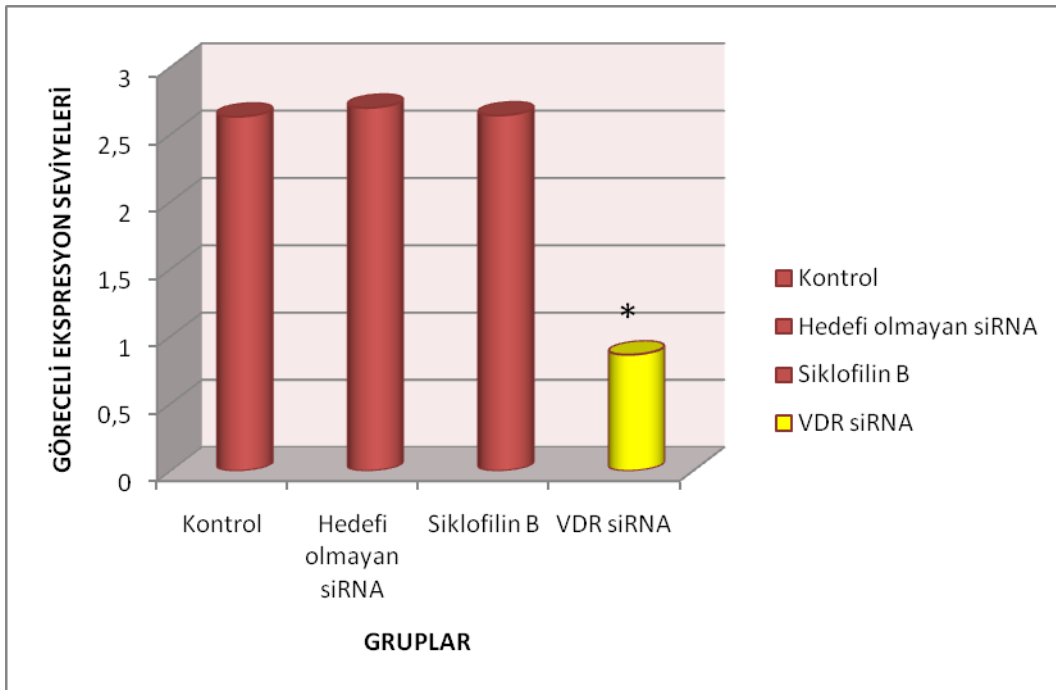
Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	0,929				
ACTB	REF	1,0	1,017				
HPRT	REF	1,0	1,058				
LVSCC A1C	HDF**	1,0	1,693	1,064 - 2,725	0,776 - 3,825	0,014	UYARILDI

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen

4.3.2. Primer hippocampal nöron kültürü sonuçları

4.3.2.1. Primer hippocampal nöron kültürüne 12 saat süreyle yapılan siRNA uygulamaları sonucunda 24. saatteki VDR mRNA seviyelerindeki değişimler

Primer hippocampal nöron kültürüne 12 saat süreyle yapılan siRNA uygulamaları sonucunda qRT-PCR yöntemi ile saptanan VDR mRNA seviyeleri Şekil 4-19'de gösterilmiştir. Oniki saat boyunca VDR siRNA uygulanan grubun VDR mRNA ekspresyon seviyesinin kontrol gruplarına oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görüldü. (Tablo 4-40, 4-41 ve 4-42). VDR siRNA uygulanan grubun VDR mRNA ekspresyonu kontrol grubuna göre % 69,1; hedefi olmayan siRNA uygulanan negatif kontrol grubuna göre % 70 ; siklofilin B siRNA uygulanmış pozitif kontrol grubuna göre % 69,8 oranında baskılandı. Kontrol grubu ile hedefi olmayan siRNA ve kontrol grubu ile siklofilin B siRNA uygulanmış kontrol grupları arasında VDR mRNA seviyeleri açısından istatistiksel açıdan anlamlı bir fark yoktu (sırasıyla $p=0,510$; $p=0,516$) (Şekil 4-19).



Şekil 4-19: 12 saat süreyle siRNA uygulanmış primer hippocampal nöron kültürüne ait grupların 24. saatteki VDR mRNA ekspresyon seviyeleri.

*Kontrol gruplarına kıyasla ileri derecede anlamlı olarak baskılandı.

Tablo 4-40: 12 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun VDR mRNA ekspresyon seviyelerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	1,019				
ACTB	REF	1,0	0,821				
HPRT	REF	1,0	1,218				
VDR	HDF**	1,0	0,315	0,315 - 0,315	0,315 - 0,315	0,000	BASKILANDI % 69,1

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen

Tablo 4-41: 12 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun VDR mRNA ekspresyon seviyelerinin hedefi olmayan siRNA uygulanmış negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	1,035				
ACTB	REF	1,0	0,760				
HPRT	REF	1,0	1,315				
VDR	HDF**	1,0	0,307	0,307 - 0,307	0,307 - 0,307	0,000	BASKILANDI % 70

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen

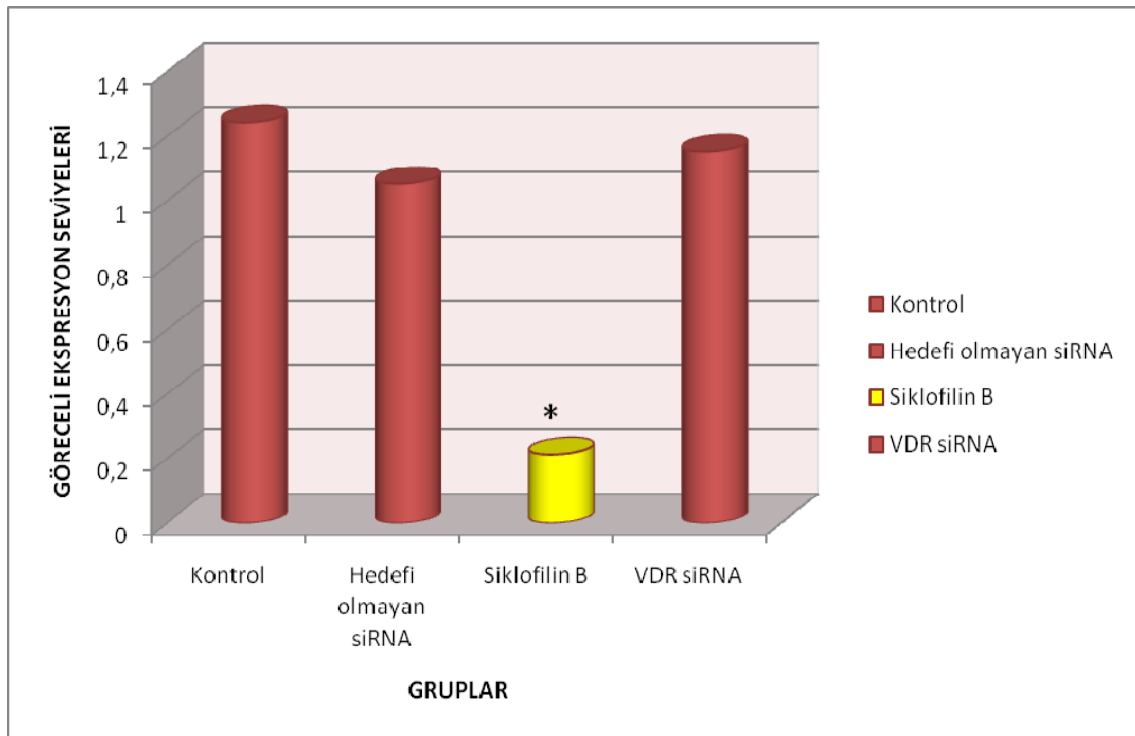
Tablo 4-42: 12 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun VDR mRNA ekspresyon seviyelerinin Siklofilin B siRNA uygulanmış pozitif kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	1,015				
ACTB	REF	1,0	0,855				
HPRT	REF	1,0	1,170				
VDR	HDF**	1,0	0,316	0,316 - 0,316	0,316 - 0,316	0,000	BASKILANDI % 69,8

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen

4.3.2.2. Primer hippocampal nöron kültürüne 12 saat süreyle yapılan siRNA uygulamaları sonucunda 24. saatteki Siklofilin B mRNA seviyelerindeki değişimler

Primer hippocampal nöron kültürüne 12 saat süreyle yapılan siRNA uygulamaları sonucunda qRT-PCR yöntemi ile saptanan Siklofilin B mRNA seviyeleri Şekil 4-20’de gösterilmiştir. Oniki saat boyunca Siklofilin B siRNA uygulanan grubun Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyesinin diğer gruplara oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede baskılandığı görüldü. (Tablo 4-43, 4-44 ve 4-45). Siklofilin B siRNA uygulanan grubun Siklofilin B mRNA ekspresyonu kontrol grubuna göre % 84,3; hedefi olmayan siRNA uygulanan negatif kontrol grubuna göre % 79,7; VDR siRNA uygulanmış deney grubuna göre % 81 oranında baskılandı. Kontrol grubu ile hedefi olmayan siRNA ve kontrol grubu ile VDR siRNA uygulanmış gruplar arasında Siklofilin B mRNA seviyeleri açısından istatistiksel açıdan anlamlı bir fark yoktu (sırasıyla $p=0,112$; $p=0,161$) (Şekil 20).



Şekil 4-20: 12 saat süreyle siRNA uygulanmış primer hippocampal nöron kültürüne ait grupların 24. saat Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyeleri.

*Diğer gruplara kıyasla anlamlı derecede baskılandı.

Tablo 4-43: 12 saat süreyle Siklofilin B siRNA uygulanmış deney grubunun Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyelerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	0,999				
ACTB	REF	1,0	0,938				
HPRT	REF	1,0	1,066				
CycB***	HDF**	1,0	0,158	0,154 - 0,164	0,147 - 0,165	0,000	BASKILANDI % 84,3

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen, ***CycB: Siklofilin B

Tablo 4-44: 12 saat süreyle Siklofilin B siRNA uygulanmış deney grubunun Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyelerinin hedefi olmayan siRNA uygulanmış negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	1,008				
ACTB	REF	1,0	0,984				
HPRT	REF	1,0	1,016				
CycB***	HDF**	1,0	0,204	0,197 - 0,211	0,193 - 0,214	0,036	BASKILANDI % 79,7

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen, ***CycB: Siklofilin B

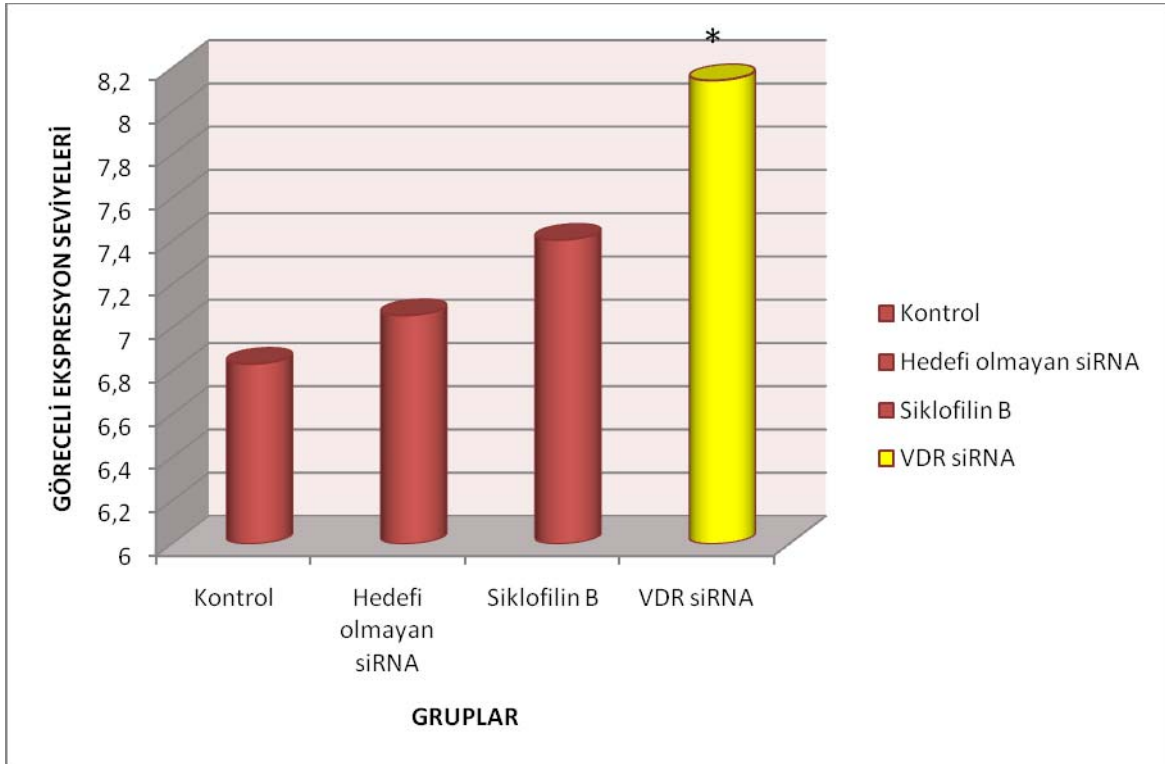
Tablo 4-45: 12 saat süreyle Siklofilin B siRNA uygulanmış deney grubunun Siklofilin B mRNA ekspresyon seviyelerinin VDR siRNA uygulanmış deney grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	1,010				
ACTB	REF	1,0	1,071				
HPRT	REF	1,0	0,934				
CycB***	HDF**	1,0	0,188	0,176 - 0,204	0,168 - 0,209	0,018	BASKILANDI % 81

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen, ***CycB: Siklofilin B

4.3.2.3. Primer hippocampal nöron kültürüne 12 saat süreyle yapılan siRNA uygulamaları sonucunda 24. saatteki LVSCC A1C mRNA seviyelerindeki değişimler

Primer kortikal nöron kültürüne 12 saat süreyle yapılan siRNA uygulamaları sonucunda qRT-PCR yöntemi ile saptanan LVSCC A1C mRNA seviyeleri Şekil 4-21’de gösterilmiştir. Oniki saat boyunca VDR siRNA uygulanan grubun LVSCC A1C mRNA ekspresyonunun kontrol gruplarına oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı görüldü (Tablo 4-46, 4-47 ve 4-48). Kontrol grubu ile hedefi olmayan siRNA ve kontrol grubu ile siklofilin B siRNA uygulanmış kontrol grupları arasında LVSCC A1C mRNA seviyeleri açısından istatistiksel açıdan anlamlı bir fark yoktu (sırasıyla $p=0,495$; $p=0,489$) (Şekil 4-21).



Şekil 4-21: 12 saat süreyle siRNA uygulanmış primer hippocampal nöron kültürüne ait grupların 24. saat LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyeleri.

*Kontrol gruplarına kıyasla anlamlı derecede uyarıldı.

Tablo 4-46: 12 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyelerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	1,007				
ACTB	REF	1,0	0,880				
HPRT	REF	1,0	1,137				
LVSCC A1C	HDF**	1,0	1,169	1,169 - 1,169	1,169 - 1,169	0,000	UYARILDI

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen

Tablo 4-47: 12 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyelerinin hedefi olmayan siRNA uygulanmış negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	1,024				
ACTB	REF	1,0	0,760				
HPRT	REF	1,0	1,315				
LVSCC A1C	HDF**	1,0	1,106	1,106 - 1,106	1,106 - 1,106	0,000	UYARILDI

*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen

Tablo 4-48: 12 saat süreyle VDR siRNA uygulanmış deney grubunun LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyelerinin Siklofilin B siRNA uygulanmış deney grubu ile karşılaştırılması.

Gen	Tip	Reaksiyon etkinliği	Ekspresyon seviyesi	Standart hata	%95 C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF*	1,0	0,995				
ACTB	REF	1,0	1,003				
HPRT	REF	1,0	0,997				
LVSCC A1C	HDF**	1,0	1,046	1,032 - 1,075	1,032 - 1,075	0,043	UYARILDI

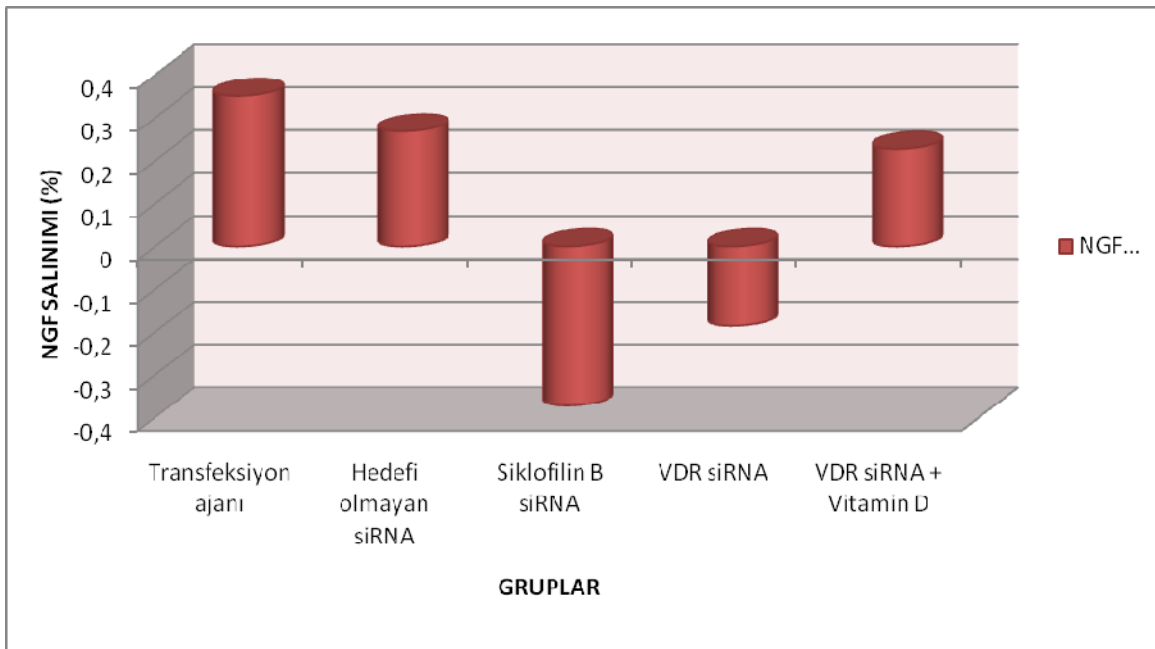
*REF: referans genler (housekeeping genler), **HDF: hedef gen

4.4. NGF Ölçüm Sonuçları

4.4.1. Primer kortikal nöron kültürü

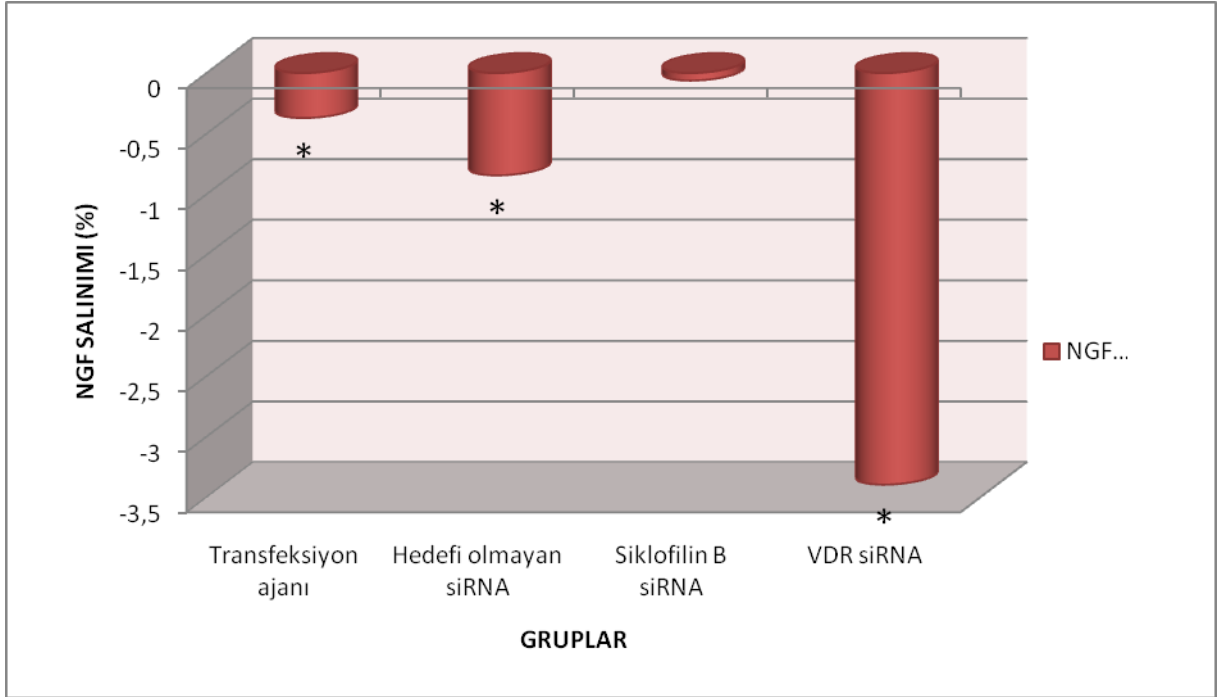
Primer kortikal nöron kültürüne 12 ve 24 saat süreyle yapılan siRNA uygulamaları sonucu grupların kültür ortamındaki NGF miktarlarının 24. saatteki değişiklikleri Şekil 4-22 ve 4-23’de gösterilmiştir. Altı saat ve 12 saat süreyle siRNA uygulaması yapılmış grupların 24. saatteki NGF miktarları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Yirmi dört saat süreyle siRNA uygulanan primer kortikal nöron kültürüne ait deney gruplarında, transfeksiyon ajanı uygulanan, hedefi olmayan siRNA ve VDR siRNA uygulanan deney gruplarının NGF miktarlarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düştüğü ($p< 0,001$); siklofilin B uygulanan gruba göre değişmediği saptandı (Tablo 4-49). VDR siRNA uygulanan grubun NGF miktarının transfeksiyon ajanı, hedefi olmayan siRNA ve Siklofilin B siRNA uygulanan gruplara göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede azaldığı görüldü ($p< 0,001$) (Tablo 4-49).



Şekil 4-22: 12 saat süreyle siRNA uygulanmış primer kortikal nöron kültürüne ait grupların 24. saatteki NGF miktarları.

Kontrol grubu NGF salınımları % 0 olarak kabul edilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark yoktur



Şekil 4-23: 24 saat süreyle siRNA uygulanmış primer kortikal nöron kültürüne ait grupların 24. saatteki NGF miktarları.

Kontrol grubu NGF salinimi % 0 olarak kabul edilmiştir.*Tüm gruplar ile istatistiksel açıdan anlamlı fark vardır.

Tablo 4-49: 24 saat süreyle siRNA uygulanmış primer kortikal nöron kültürüne ait grupların 24. saatteki NGF miktarlarının gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırılması.

KARŞILAŞTIRILAN GRUPLAR*	Ortalama Değerler arasındaki fark	q	P	%95 CI	
				Başlangıç	Son
Kontrol/Transfeksiyon ajanı	0.3705	8.139	$P<0.001$	0.1813	0.5597
Kontrol/Hedefi olmayan siRNA	0.8413	18.480	$P<0.001$	0.6521	1.031
Kontrol/Siklofilin B siRNA	0.06125	1.345	$P>0.05$	-0.1279	0.2504
Kontrol/VDR siRNA	3.392	74.509	$P<0.001$	3.203	3.581
Transfeksiyon ajanı/Hedefi olmayan siRNA	0.4708	10.341	$P<0.001$	0.2816	0.6600
Transfeksiyon ajanı/Siklofilin B siRNA	-0.3093	6.793	$P<0.001$	-0.4985	-0.1201
Transfeksiyon ajanı/VDR siRNA	3.022	66.370	$P<0.001$	2.832	3.211
Hedefi olmayan siRNA/Siklofilin B siRNA	-0.7801	17.134	$P<0.001$	-0.9693	-0.5909
Hedefi olmayan siRNA/VDR siRNA	2.551	56.029	$P<0.001$	2.362	2.740
Siklofilin B siRNA/VDR siRNA	3.331	73.163	$P<0.001$	3.142	3.520

*Tüm gruplar için örnek sayısı 6'dır (n=6)

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda primer hippokampal ve kortikal nöron kültüründeki hücrelerin vitamin D reseptör genini PTGS yöntemi ile susturarak oluşturulan vitamin D eksikliğinin L-tipi voltaj duyarlı kalsiyum kanalları (LVSCC A1C) ve NGF üretimi üzerindeki etkilerini inceledik.

Vitamin D kalsiyum ve fosfat dengesinin ve kemik yapısının korunmasında rol oynayan steroid bir hormondur. Önemli bir kısmı deride ultraviyole B ışınları ile 7-dehidrokolesterol öncülünden sentezlenen vitamin D sırasıyla, karaciğerde hidroksillenir ve böbrekte sitokrom p450 enzimleri ile aktif şekli olan vitamin D₃ (vitamin D,1,25(OH)₂D₃) haline dönüştürülür (2, 6). Son çalışmalar vitamin D'nin mineral metabolizması dışında bağışıklık sistemi, renin-anjiyotensin sistemi, kardiovasküler hastalıklar, nöromuskular fonksiyonlar ve hücre çoğalması kontrolü gibi biyolojik rollerinin olduğunu ve beyinde de 7-dehidrokolesterol öncülünden sentezlendiğini ortaya koymuştur (1, 3, 5, 6, 107).

Bir kolesterol omurgası taşıyan vitamin D'nin sekosteroid olarak sınıflandırılması daha doğrudur. Tüm vücutta steroid benzeri etkileri olan vitamin D, nüklear steroid reseptörler ailesinden olan vitamin D reseptörü (VDR) aracılığı ile 1.000'in üzerinde genin ekspresyonunu düzenler. Bu bakımdan vitamin olarak adlandırılması doğru olmamakla birlikte halen bu isimle anılmaktadır (1).

Vitamin D sinir sisteminde de aktif görev alan bir sekosteroiddir. Neredeyse tüm MSS'de vitamin D'yi aktif hale getiren enzimlerin ve nüklear reseptörü VDR'nin varlığı gösterilmiştir (2, 16-21, 23, 24, 29).

VDR veya 25-hidroksivitamin D₃ 1- α hidroksilaz genleri bloke edilmiş hayvanlarda yapılan çalışmalarda pro-enflamatuvar sitokin seviyelerinin arttığı görülmüş, fakat beyin ile ilgili önemli bir anomaliye rastlanmamıştır (1, 3). Ancak vitamin D eksikliği yaşamın herhangi bir evresinde ortaya çıkabilir. Bu eksikliğin uzun süreler boyunca devam etmesinin beyinde ne gibi sorunlar ortaya çıkarabileceğine dair henüz bir bilgi bulunmamaktadır. Son birkaç yıldır yapılan çalışmalar duygu durum bozukluğu, Alzheimer ve Parkinson hastalarının plazma 25-hidroksivitamin D₃ seviyelerinin düşük olduğunu göstermiştir (7, 9, 36). Diğer bir çalışma serum 25-

hidroksivitamin D₃ seviyeleri yeterli olan Alzheimer hastalarının bilişsel test sonuçlarının (Mini-Mental State Examination, MMSE), serum 25-hidroksivitamin D₃ seviyeleri düşük olan hastalara oranla anlamlı derecede ($p=0,01$) yüksek olduğunu göstermiştir (108).

Daha önce yapmış olduğumuz çalışmalarda vitamin D reseptör geni polimorfizmleri ile geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı arasında anlamlı bir ilişki bulunduğu literatürde ilk olarak ortaya konulmuştur (8). Alzheimer hastalarında yapılan genom kapsamındaki ilişki çalışmalarında (Genom wide association study-GWAS) kromozom 12q13 bölgesinin AH için yüksek risk taşıyan bölge olduğu saptanmıştır (109, 110). 12. kromozomda yer alan VDR geni bu bölgeye oldukça yakındır ve 2009 yılında yapılan son GWAS çalışmasında, grubumuz tarafından ortaya konulmuş olan VDR geni Apa I polimorfizminin AH riskini 2,3 kat arttırdığına dair bulgularımız da göz önüne alınarak en güçlü aday genlerden biri olarak gösterilmiştir (109).

Nörotrofik faktör üretiminde rol oynayan vitamin D'nin sinir sistemi üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olduğu ileri sürülmektedir (3, 5, 6, 10, 32, 33). 6-hidroksidopamin ile indüklenmiş sıçanlara vitamin D uygulanmasının, hipokinezi ve nörotoksik etkilerin azalmasına sebep olduğu bildirilmiştir (111). Buna ek olarak, vitamin D'nin, kalsiyum kanalları ve kalsiyum bağlayan proteinlerin ekspresyonu üzerinde etkili olarak nöron kalsiyum dengesini düzenlediği ve bu şekilde de koruyucu etki gösterdiği düşünülmektedir (3, 112, 113).

Çalışmamızda post transkripsiyonel gen susturulması (PTGS) tekniği ile sıçana özgü 4 farklı VDR siRNA kullanılarak primer kortikal ve hippocampal nöron kültüründeki hücrelerin VDR geni susturuldu. siRNA'lar hücre içine özel bir transfeksiyon ajanı yardımı ile aktarıldı. Sonuçlar kontrol, transfeksiyon ajanı uygulanmış kontrol, hedefi olmayan siRNA uygulanmış negatif kontrol ve siklofilin B siRNA uygulanmış pozitif kontrol ile karşılaştırıldı. Karşılaştırmada, hatalı bir sonuç elde etmeyi önlemek üzere, özellikle hedefi olmayan siRNA uygulanmış grup ile VDR siRNA uygulanmış grup arasındaki farklar dikkate alındı.

Transfeksiyon ajanı aracılığı ile siRNA uygulamalarının özellikle primer nöron kültürleri üzerinde toksik etkisi olduğuna dair çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (92, 93, 97, 99, 100). Çalışmamızda, kullandığımız transfeksiyon ajanının ve siRNA'ların sitotoksik olup olmadığını belirlemek üzere, ölen veya hasarlanan hücrelerin

membranlarından kültür ortamına salınan laktat dehidrogenaz (LDH) enzimi miktarı ölçüldü. Primer kortikal ve hippocampal nöron kültürlerine ait deney ve kontrol gruplarındaki LDH seviyeleri, hiç bir madde uygulanmamış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ve kullanılan transfeksiyon ajanının ve siRNA'ların primer nöron kültürü için toksik olmadığı saptandı.

Pozitif kontrol olarak kullanılan ve tüm hücrelerde ifade edildiği bilinen (housekeeping) genlerden biri olan Siklofilin B geni primer kortikal nöron kültüründe 6,12 ve 24 saat süresince 4 farklı siRNA uygulanarak tüm gruplara oranla başarılı bir şekilde susturuldu. Siklofilin B siRNA uygulanan hariç diğer kontrol grupları ve VDR siRNA uygulanan deney grubu arasında Siklofilin B mRNA ekspresyonu açısından anlamlı bir fark yoktu. Böylece her bir gen için kullanılan siRNA havuzunun hedef mRNA'ya özel olduğu ve rastgele bir baskılama sağlamadığı gösterildi.

Primer kortikal nöron kültürüne 6, 12 ve 24 saat süreyle yapılan siRNA uygulamaları sonucunda tüm grupların 24. saatteki VDR mRNA'sının göreceli ekspresyon seviyeleri saptanarak, 12 ve 24 saat süreli VDR siRNA uygulamaları ile VDR geninin 12. saatte hedefi olmayan siRNA uygulanan gruba göre % 66,7 ($p < 0,0001$), Siklofilin B siRNA uygulanan gruba göre % 61,7, 24. saatte ise hedefi olmayan siRNA uygulanan gruba göre % 66,3 ($p < 0,0001$), Siklofilin B siRNA uygulanan gruba göre % 61,5 ($p < 0,0001$) oranında susturulduğu belirlendi.

Vitamin D'nin beyinde VDR mRNA seviyesini arttırdığı ileri sürülmekle birlikte, bugüne kadar kortikal nöronlar üzerinde yapılan tek bir çalışmaya rastladık (22). Bizim çalışmamızda 12 saat VDR siRNA uygulanarak VDR geni susturulan gruba 12 saat süresince 10^{-7} M vitamin D uyguladığımızda, VDR mRNA seviyesinin vitamin D verilmeyen VDR siRNA uygulanan gruba göre anlamlı derece arttığını saptadık ($p < 0,0001$). Bu sonuçlarımız kortikal nöronlarda VDR ekspresyonunun vitamin D tarafından uyarıldığını bildiren çalışmayı desteklemektedir.

Primer kortikal nöron kültüründen elde edilen VDR mRNA'sına ait susturma bulguları göz önüne alınarak, primer hippocampal nöron kültüründeki siRNA uygulamaları sadece 12 saat ile sınırlandırıldı. Primer hippocampal nöron kültüründe de 12 saat VDR siRNA uygulanan grubun VDR mRNA ekspresyonu, hedefi olmayan siRNA ve Siklofilin B siRNA uygulanan gruba göre sırasıyla % 70 ($p < 0,0001$) ve %

69,8 ($p < 0,0001$) oranında baskılandı. Primer hippocampal nöron kültüründe Siklofilin B siRNA uygulanan grubun Siklofilin B mRNA ekspresyonu ise, hedefi olmayan siRNA uygulanan gruba göre % 79,7 ($p = 0,036$), VDR siRNA uygulanan gruba göre % 81 ($p = 0,018$) oranında baskılandı.

Çalışmamızda VDR geni baskılanan nöronlarda ekspresyonu araştırılan L-tipi voltaj duyarlı kalsiyum kanalı A1C (LVSCC A1C) kalsiyum metabolizmasının önemli proteinlerinden biridir. Yaşlanmayla birlikte beyinde ortaya çıkan en kritik değişikliklerden biri kalsiyum dengesinin bozulmasıdır. Yirmi yıldan uzun süredir, beyinde yaşlanmayla birlikte ortaya çıkan kalsiyum dengesindeki bozulmalar “beyin yaşlanması ve demansın kalsiyum hipotezi” olarak bir çok araştırmacı tarafından savunulmaktadır (114). Bu hipotez yaşlanmayla birlikte özellikle voltaja duyarlı kalsiyum kanalları (VSCC) aracılığı ile hücre içine kalsiyum akışının arttığını ileri sürmektedir. Memelilerde hippocampal nöronlarındaki voltajla aktive edilen kalsiyum akışının yaşlanma ile ilişkisinin moleküler mekanizması açık değildir, ancak yaşlı farelerin CA1 nöronlarında yapılan çalışmalarda L-tipi voltaja duyarlı kalsiyum kanallarının (LVSCC) yoğunluğunun yetişkinlere kıyasla artmış olduğu görülmüştür. Kalsiyum kanalları yoğunluğundaki artışın yaşlı farelerin öğrenme yetilerindeki azalma ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca nöronlarda artmış kalsiyum girişi nörotoksisiteyle doğrudan ilişkilidir. Yaşla birlikte kalsiyum kanallarındaki bu artışın nöronları yaşla ilişkili nörodejeneratif hastalıklara karşı korunmasız duruma getirdiği düşünülmektedir. L-tipi kalsiyum kanal blokerlerinin kullanılmasıyla yaşam süresinin uzatılabileceği ileri sürülmektedir (79, 82, 84).

Vitamin D'nin hippocampal nöronlarda LVSCC kanallarını baskıladığı gösterilmiştir (112, 113). Ancak vitamin D eksikliği bulunduğunda bu kanalların nasıl düzenlendiği hakkında herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Vitamin D eksikliği uzun yıllardır düşünülenin aksine oldukça yaygındır. Amerika'da 1988-1994 yılları arasında yapılan 3.Ulusal Sağlık ve Beslenme taramasından (Third National Health and Nutrition Examination Survey) elde edilen verileri kullanarak 2008 yılında Khazai ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada, beyaz ırkın %61'inde ve Afrika kökenli Amerikalıların %91'inde Vitamin D eksikliği olduğu saptanmıştır (34). Benzer bulgular bir çok ülkeye ait toplum taramalarında bildirilmiştir (1). Vitamin D eksikliği gelişmiş ülkelerin sağlıklı genç bireylerinde de yaygın olarak görülmekle birlikte, yapılan

çalışmalar yaşlılarda bu eksikliğin %87'ye varan oranlara ulaştığını göstermiştir. Vitamin D eksikliğinin bu kadar yaygın olmasının bilinmeyen birçok sağlık problemlerine sebep olabileceği düşünülmektedir (1, 35).

Çalışmamızda primer kortikal ve hipokampal nöron kültüründe VDR genini susturarak oluşturulan kısa süreli vitamin D eksikliğinin yaşlanma ve nörodejenerasyonda önemli rol oynadığı bildirilen LVSCC A1C kalsiyum kanalı ekspresyonu üzerine etkilerini araştırdık. Primer kortikal nöron kültürüne 6 saat süreyle yapılan siRNA uygulamaları sonucu VDR siRNA uygulanan grupta LVSCC A1C mRNA seviyelerinin kontrol gruplarına kıyasla değişmediği görüldü. Diğer saatlere ait veriler elde edildiğinde, bu durumun 6 saat uygulama ile VDR mRNA ekspresyonunun baskılanamamasından kaynaklandığı anlaşıldı. 12 saat süreyle yapılan siRNA uygulamaları sonucunda VDR siRNA uygulanan grubun LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyelerinin kontrol, transfeksiyon ajanı, hedefi olmayan siRNA ve siklofilin B siRNA uygulanmış gruplara göre anlamlı derecede arttığı saptandı. İlginç olarak 12 saatlik gruplarda bu artışın VDR siRNA uygulanan grubun baskılanma yüzdelere paralel olarak değiştiği görüldü. 24 saat VDR siRNA uygulanan grubun LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyelerinin kontrol gruplarına göre anlamlı derecede arttığı ve bu artışın VDR mRNA baskılanma yüzdeleri ile paralel olduğu saptandı.

12 saat VDR siRNA uygulanan gruba 12 saat süresince 10^{-7} M vitamin D uygulandığında, LVSCC A1C mRNA seviyesinin 12 saat VDR siRNA uygulanıp vitamin D verilmeyen gruba göre anlamlı derece baskılandığı ($p= 0,013$) ve LVSCC A1C mRNA seviyesinin kontrol grupları ile aynı seviyeye geldiği saptandı. Bu sonuçlarımız vitamin D'nin hipokampal nöronlarda olduğu gibi kortikal nöronlarda da LVSCC A1C mRNA ekspresyonunu baskıladığını literatürde ilk olarak göstermektedir.

Primer hipokampal nöron kültürüne 12 saat süreyle yapılan VDR siRNA uygulamaları sonucunda ise LVSCC A1C mRNA seviyelerinin kontrol, hedefi olmayan siRNA ve siklofilin B siRNA uygulanmış gruplara göre anlamlı derecede arttığı saptandı.

LVSCC A1C kalsiyum kanalı ve bu kanalın ekspresyonundaki artışların yaşlanma ve nörodejenerasyonda önemli rol oynadığı bir çok çalışmada ortaya konulmuştur. Bu yolda önerilen tedaviler kalsiyum kanal blokerleri ile sınırlı kalmıştır (114, 115). Vücutta kalsiyum metabolizmasının düzenlenmesinden sorumlu olan ve

kalsiyum kanalları ile kalsiyum bağlayan proteinlerin miktarını düzenleyen vitamin D'nin, hippocampusda da LVSCC kanallarını baskıladığı gösterilmiştir (112, 113). Ancak sonradan ortaya çıkan vitamin D eksikliğinin beyinde moleküler düzeyde ne gibi sorunlara yol açabileceğine dair herhangi bir bilgi yoktur.

Çalışmamızda, VDR geninin susturulması ve buna bağlı olarak kısa süreli vitamin D eksikliği sonucu serebral kortekse ve hippocampusu ait nöronlarda LVSCC A1C kalsiyum kanalları ekspresyon seviyelerinin yüksek oranda arttığı görülmüştür. Bu artışın VDR mRNA seviyelerinin baskılanmasıyla ilişkili olduğu şu sonuçlar ile doğrulanmıştır: 1- 6 saat siRNA uygulamaları sonucunda VDR mRNA'sı baskılanamamıştır ve baskılanmanın gerçekleşmediği durumda LVSCC A1C mRNA seviyeleri kontrol grubuna oranla herhangi bir değişikliğe uğramamıştır. 2- 12 ve 24 saat siRNA uygulamaları sonucunda VDR mRNA'sı baskılanan grupların LVSCC A1C mRNA ekspresyon seviyeleri diğer gruplara göre anlamlı derecede yükselmiştir. 3- 12 saat VDR siRNA uygulanan gruba 12 saat süresince 10^{-7} M vitamin D uygulandığında, bu grubun LVSCC A1C mRNA seviyesi kontrol gruplarının seviyesine düşmüş ve 12 saat VDR siRNA uygulanan vitamin D verilmeyen gruba göre anlamlı derece baskılanmıştır.

Vitamin D'nin, sinir büyüme faktörü (NGF), nörotrofin 3 ve 4, glial hücre kökenli nörotrofik faktör (GDNF) üretimi üzerindeki rolünün, sinir sistemi üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olduğu ileri sürülmektedir. NGF ekspresyonu üzerine etkisi glia hücreleri, Schwann hücreleri ve hippocampal nöronlar üzerindeki sınırlı sayıda çalışmada gösterilmiştir (3, 5, 6, 10, 32, 33, 107). Çalışmamızda primer kortikal nöron kültürüne 12 ve 24 saat süreyle yapılan VDR siRNA uygulamaları sonucu VDR geni baskılanan grupların 24. saatte kültür ortamına salınan NGF miktarlarındaki değişiklikleri saptadık. Oniki saat süreyle siRNA uygulaması yapılmış tüm grupların 24. saatteki NGF protein miktarları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark yoktu ($p>0,05$). Yirmi dört saat süreyle siRNA uygulanan primer kortikal nöron kültürüne ait deney gruplarında ise, transfeksiyon ajanı, hedefi olmayan siRNA ve VDR siRNA uygulanan deney gruplarının 24. saat NGF miktarlarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düştüğü ($p< 0,001$); siklofilin B uygulanan gruba göre ise değişmediği saptandı. VDR siRNA uygulanan grubun NGF miktarının transfeksiyon ajanı, hedefi olmayan siRNA ve Siklofilin B siRNA uygulanan gruplara

göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede düştüğü görüldü ($p < 0,001$). Bu bulgular sonucunda siRNA uygulamasının genel olarak NGF seviyesini düşürdüğü saptandı. Ancak 24 saat VDR siRNA uygulamasının NGF miktarını diğer gruplara oranla ileri derecede düşürmesi ilginç sonuçlardan biriydi.

NGF üretiminin vitamin D tarafından düzenlenmesinin yanısıra bir çok farklı molekül tarafından da düzenlendiği gösterilmiştir (116). Bu yüzden VDR mRNA'sının baskılandığı durumda NGF miktarının hızlı bir şekilde düşmesi ilgi çekicidir. Bu bulgular literatürde ilk kez kortikal nöronlarda NGF ekspresyonunun vitamin D tarafından düzenlendiğini ortaya koymaktadır. Ayrıca ilerleyen yaşla birlikte ortaya çıkan vitamin D eksikliğinin kortikal nöronlarda NGF üretimini azaltabileceğine de işaret etmektedir. Nöronun sağkalımı ve sağlıklı bir şekilde yaşayabilmesi için gerekli olan NGF'nin vitamin D tarafından düzenlenmesi ve vitamin D eksikliğinden etkilenmesi, beyinde vitamin D eksikliği sonucu ortaya çıkabilecek bozuklukların boyutlarının sanıldığından çok daha büyük olabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda kültürdeki serebral korteks ve hippokampusu ait nöronlarda oluşturduğumuz vitamin D eksikliği modeli, yaşlanma ve nörodejenerasyon mekanizmaları için uygun bir model olabilir. VDR baskılanmasına ve kısa süreli vitamin D eksikliğine cevaben oldukça hızlı bir şekilde artan LVSCC A1C mRNA miktarları ve kortikal nöronlarda azalan NGF miktarları, eksikliğin sürekli olduğu durumlarda nöronları yaşlanmaya ve nörodejenerasyona karşı korumasız duruma getirebilir. Vitamin D'nin kalsiyum metabolizması ve nörotrofik faktör üretimi üzerindeki bilinen rolleri göz önüne alındığında beyin için vazgeçilmez bir molekül olma yolunda ilerlemektedir.

Diğer ilginç bir bulgu da vitamin D'nin progesteron ve östradiol gibi nörosteroidlerle birlikte fonksiyon gösterdiği ve bu steroidlerin ekspresyonunu arttırdığıdır. Son yıllarda yapılan çalışmalar progesteronun inflamasyon, oksidatif hasar, beyin ödemi ve nöron ölümünü azaltarak hastaların bilişsel ve fiziksel durumlarını olumlu yönde etkilediğini ve travmatik beyin hasarlarında oldukça etkili bir tedavi yöntemi olabileceğini göstermektedir. Diğer taraftan travmatik beyin hasarlarında vitamin D eksikliğinin hasarı ilerlettiği ve diğer tedavilerin etkisini azalttığı ileri sürülmektedir. Periferik sinir hasarı oluşturulmuş bir sıçan modelinde yapılan çalışma vitamin D'nin aksogenezi ve akson çapını arttırdığını göstermiştir. Burdan yola çıkarak

vitamin D'nin MSS yaralanmalarında tedavi edici rolünün olabileceği ileri sürülmektedir (1).

Vitamin D'nin beyindeki sinyal yolları, kalsiyum metabolizması, nörotrofik faktör metabolizması, sinaps oluşumu, enflamasyon gibi olaylardaki rollerinin belirlenmesi eksikliğinde ortaya çıkabilecek sorunları daha net görmemizi sağlayabilir. Ayrıca tedavi edici veya önleyici molekül olarak kullanılması söz konusu olduğunda farklı görevlere sahip çeşitli analoglarının hayvan modellerinde denenmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada literatürde ilk kez primer kortikal ve hippokampal nöronlarda VDR geni susturulup kısa süreli bir vitamin D eksikliği modeli oluşturulmuştur. Ayrıca VDR geni susturulan nöronlarda LVSCC A1C kalsiyum kanalları ekspresyonunun arttığı, kortikal nöronlarda ise NGF protein seviyelerinin azaldığı ilk kez gösterilmiştir.

Sonuç olarak çalışmamız, vitamin D eksikliğinin düşünülenden çok daha önemli sonuçlar doğurabileceğini ortaya koymaktadır. Elde ettiğimiz bulgular bir çok araştırmacı tarafından savunulan “beyin yaşlanması ve demansın kalsiyum hipotezi”ni desteklemektedir ve bu hipotezde vitamin D'nin de rol alabileceğini göstermektedir. Ayrıca Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde umut ışığı olarak görülen NGF'nin vitamin D eksikliğinden etkilenmesi, güneş ışınlarıyla sentezlenen bu molekülü nörodejeneratif hastalıkların umut ışığı haline dönüştürebilir.

KAYNAKLAR

1. Cekic M, Sayeed I, Stein DG. Combination treatment with progesterone and vitamin d hormone may be more effective than monotherapy for nervous system injury and disease. *Front Neuroendocrin.* 2009;**x**:xx-xx.
2. Eyles DW, Smith S, Kinobe R, Hewison M, McGrath JJ. Distribution of the vitamin D receptor and 1 alpha-hydroxylase in human brain. *J Chem Neuroanat.* 2005;**29**:21-30.
3. Garcion E, Wion-Barbot N, Montero-Menei CN, Berger F, Wion D New clues about vitamin D functions in the nervous system. *Trends Endocrinol Metab.* 2002;**13**(3):100-5.
4. Holick M. Noncalcemic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and clinical applications. *Bone.* 1995;**17**(2):107-11.
5. Kato S, Sekine K, Matsumoto T, Yoshizawa T. Molecular genetics of vitamin D receptor acting in bone. *J Bone Miner Metab.* 1998;**16**:65-71.
6. Wion D, MacGrogan D, Neveu I, Jehan F, Houlgatte R, Brachet P. 1,25 dihydroxyvitamin-D3 is a potent inducer of NGF synthesis. *J Neurosci Res.* 1991;**28**(1):110-4.
7. McCann J, Ames BN. Is there convincing biological or behavioral evidence linking vitamin D deficiency to brain dysfunction? *FASEB J.* 2008;**22**:982-1001.
8. Gezen-Ak D, Dursun E, Ertan T, Hanagasi H, Gurvit H, Emre M, Eker E, Ozturk M, Engin F, Yilmazer S. Association between vitamin D receptor gene polymorphism and Alzheimer's disease. *Tohoku J Exp Med.* 2007;**212**:275-82.
9. Cherniack EP, Florez H, Roos BA, Troen BR, Levis S. Hypovitaminosis D in the elderly: from bone to brain. *J Nutr Health Aging.* 2008;**12**(6):366-73.
10. Bouillon R, Carmeliet G, Daci E, Segaert S, Verstuyf A. Vitamin D metabolism and action. *Osteoporos Int.* 1998;**8**:13-9.
11. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Temel Patoloji (Basic Pathology çev.). 6 ed. İstanbul: Nobel; 2000.
12. Ferrari S, Bonjour JP, Rizzoli R. The vitamin D receptor gene and calcium metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 1998;**9**(7):259-63.
13. Issa L, Leong GM, Eisman JA. Molecular mechanism of vitamin D receptor action. *Inflamm res.* 1997;**47**:451-75.
14. Kristin KD, Donald LT, Candace SJ. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer.* 2007;**7**:684-700.
15. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science.* 1988;**240**:889-95.
16. Elaroussi MA, Prah J, DeLuca HF. The avian vitamin D receptors: primary structures and their origins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;**91**:11596-600.
17. Burkert R, McGrath J, Eyles D. Vitamin D receptor expression in the embryonic rat brain. *Neurosci Res Commun.* 2003;**33**:63-71.
18. Johnson JA, Grande JP, Windebank AJ, Kumar R. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) receptors in developing dorsal root ganglia of fetal rats. *Brain Res Dev Brain Res.* 1996;**92**:120-4.
19. Langub MC, Herman JP, Malluche HH, Koszewski NJ. Evidence of functional vitamin D receptors in rat hippocampus. *Neuroscience.* 2001;**104**:49-56.

20. Musiol IM, Stumpf WE, Bidmon HJ, Heiss C, Mayerhofer A, Bartke A. Vitamin D nuclear binding to neurons of the septal, substriatal and amygdaloid area in the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*) brain. *Neuroscience*. 1992;**48**:841-8.
21. Prufer K, Veenstra TD, Jirikowski GF, Kumar R. Distribution of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. *J Chem Neuroanat*. 1999;**16**:135-45.
22. Taniura H, Ito M, Sanada N, Kuramoto N, Ohno Y, Nakamichi N, Yoneda Y. Chronic vitamin D₃ treatment protects against neurotoxicity by glutamate in association with upregulation of vitamin D receptor mRNA expression in cultured rat cortical neurons. *J Neurosci Res*. 2006;**83**:1179-89.
23. Veenstra TD, Prufer K, Koenigsberger C, Brimijoin SW, Grande JP, Kumar R. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ receptors in the central nervous system of the rat embryo. *Brain Res*. 1998;**804**:193-205.
24. Walbert T, Jirikowski GF, Prufer K. Distribution of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor immunoreactivity in the limbic system of the rat. *Horm Metab Res*. 2001;**33**:525-31.
25. Luine V, Sonnenberg J, Christakos S. Vitamin D: is the brain a target? *Steroids*. 1987;**49**:133-53.
26. Hoenderop G, Hartog A, Stuiver M, Doucet A, Willems HGM, Bindels JM. Localization of the epithelial Ca²⁺ channel in rabbit kidney and intestine. *J Am Soc Nephrol* 2000;**11**:1171-8.
27. Kahlen J, Carlberg C. Identification of a vitamin D receptor homodimer-type response element in the rat calcitriol 24-hydroxylase gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;**202**(3):1366-72.
28. Stumpf WE. Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2005;**51**:25-40.
29. Miller WL, Portale AA. Vitamin D 1 α -hydroxylase. *Trends Endocrinol Metab*. 2000;**11**:315-9.
30. Zehnder D, Bland R, Williams MC, McNinch RW, Howie A J, Stewart PM, Hewison M. Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin d(3)-1 α -hydroxylase. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;**86**:888-94.
31. Baas D, Prufer K, Ittel ME, Kuchler-Bopp S, Labourdette G, Sarlieve LL, Brachet P. Rat oligodendrocytes express the vitamin D₃ receptor and respond to 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Glia*. 2000;**31**:59-68.
32. Cornet A, Baudet C, Neveu I, Baron-Van Evercooren A, Brachet P, Naveilhan P. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ regulates the expression of VDR and NGF gene in Schwann cells in vitro. *J Neurosci Res*. 1998;**53**:742-6.
33. Neveu I, Naveilhan P, Jehan F, Baudet C, Wion D, De Luca HF, Brachet P. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ regulates the synthesis of nerve growth factor in primary cultures of glial cells. *Brain Res Mol Brain Res*. 1994;**24**:70-6.
34. Khazai N, Judd SE, Tangpricha V. Calcium and vitamin D: skeletal and extraskelatal health. *Curr Rheumatol Rep*. 2008;**10**:110-7.
35. Larrosa M, Gratacos J, Vaqueiro M, Prat M, Campos F, Roque M. Prevalence of hypovitaminosis D in elderly institutionalized residents: influence of a substitutive treatment. *Med Clin (Barc)*. 2001;**117**:611-4.
36. Evatt ML, DeLong MR, Khazai N, Rosen A, Triche S, Tangpricha V. Prevalence of vitamin D Insufficiency in patients with Parkinson Disease and Alzheimer Disease. *Arch Neurol*. 2008;**65**(10):1348-52.
37. Zasloff M. Fighting infections with vitamin D. *Nat Med*. 2006;**12**:388-90.

38. Bushati N, Cohen SM. microRNAs in neurodegeneration. *Curr Opin Neurobiol.* 2008;**18**:292-6.
39. Jellinger K. Advances in our Understanding of Neurodegeneration. İçinde: Qureshi J, Parvez HS, editor. *Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders*. Cambridge: Elsevier; 2007. p. 1-58.
40. Editorial. Molecular mechanisms of neurodegeneration and neuroprotection-experimental approaches and the diseased brain. *Int J Devl Neuroscience.* 2004;**22** 441-2.
41. Everse J, Coates PW. Neurodegeneration and peroxidases. *Neurobiology of Aging.* 2007;**xx**:xxx-xxx.
42. Higuchi M, Trojanowski JQ, Lee VMY. Pathobiological features in neurodegenerative diseases: an overview. *Int Congr Ser.* 2004;**1260**:69-75.
43. Ross C, Poirier MA. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med.* 2004;**10**:S10-7.
44. Wolozin B, Behl C. Mechanisms of neurodegenerative Disorders, Part 1: Protein Aggregates. *Arch Neurol.* 2000;**57**:793-6.
45. Dev K, van der Putten H, Sommer B, Rovelli G. Part I: parkin associated proteins and PD. *Neuropharmacology.* 2003;**45**:1-13.
46. Prusiner S. Shattuck lecture - neurodegenerative diseases and prions. *Engl J Med.* 2001;**344**(20):1516-26.
47. Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, Arrighi MH. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia.* 2007;**3** (3):186-91.
48. Haines D. The Cell Biology of Neurons and Glia. *Fundamental Neuroscience for Basic and Clinical Applications.* 3 ed. California: Elsevier; 2006. p. 15-32.
49. Squire L, Berg D, Bloom FE, du Lac S, Ghosh A, Spitzer NC. Cellular and Molecular Neuroscience. *Fundamental Neuroscience.* 3 ed. California: Elsevier; 2008. p. 41-271.
50. Bear MF. CB, Paradiso MA. Neurons and Glia. İçinde: Katz S, editor. *Neuroscience: Exploring the Brain.* 2 ed. Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 22-50.
51. Kandel E, Schwarz JH, Jessell TM. Cell and Molecular Biology of the Neuron. *Principles of Neural Science.* 4 ed. New York: McGraw-Hill; 2000. p. 67-150.
52. Kandel E, Schwarz JH, Jessell TM. The Neurobiology of Behaviour. *Principles of Neural Science.* 4 ed. New York: McGraw-Hill; 2000. p. 5-36.
53. Bear MF CB, Paradiso MA. The Structure of Nervous System. İçinde: Katz S, editor. *Neuroscience: Exploring the Brain.* 2 ed. Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 164-96.
54. Kandel E, Schwarz JH, Jessell TM. Development of the nervous system. *Principles of Neural Science.* 4 ed. New York: McGraw-Hill; 2000. p. 1019-161.
55. Karakaş HM AB. Kognitif Nöroanatomi: Beynin Genel Yapısı ve İşlevsel Birimleri. İçinde: Karakaş S, editor. *Kognitif Nörobilimler.* Ankara: Medikal & Nobel; 2008. p. 51-102.
56. Kandel E, Schwarz JH, Jessell TM. The Neural Basis of Cognition. *Principles of Neural Science.* 4 ed. New York: McGraw-Hill; 2000. p. 317-81.
57. Anderson PAV, Greenberg RM. Phylogeny of ion channels: clues to structure and function. *Comp Biochem Phys B.* 2001;**129**:17-8.
58. Birnbaumer L, Campbell KP, Catterall WA, Harpold MM, Hofmann F, Horne WA, Mori Y, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, et al. The naming of voltagegated calcium channels. *Neuron.* 1994;**13**:505-6.

59. Tsien RW, Lipscombe D, Madison D, Bley K, Fox A. Reflections on calcium channel diversity, 1988-1994. *Trends Neurosci.* 1995;**18**:52-4.
60. Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwarz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW, Catterall WA. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron.* 2000;**25**:533-5.
61. Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J International Union of Pharmacology XLVIII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. *Pharmacol Rev.* 2005;**57**:411-25.
62. Jarvis SE, Zamponi GW. Trafficking and regulation of neuronal voltage-gated calcium channels. *Curr Opin Cell Biol.* 2007;**19**:474-82.
63. Cornet V, Bichet D, Sandoz G, Marty I, Brocard J, Bourinet E, Mori Y, Villaz M, De Waard M. Multiple determinants in voltage-dependent P/Q calcium channels control their retention in the endoplasmic reticulum. *Eur J Neurosci.* 2002;**16**(5):883-95.
64. Canti C, Nieto-Rostro M, Foucault I, Hebllich F, Wratten J, Richards MW, Hendrich J, Douglas L, Page KM, Davies A, Dolphin AC. The metal-ion-dependent adhesion site in the Von Willebrand factor-A domain of $\alpha_2\delta$ subunits is key to trafficking voltage-gated Ca^{2+} channels. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;**102**(32):11320-5.
65. Davies A, Douglas L, Hendrich J, Wratten J, Tran Van Minh A, Foucault I, Koch D, Pratt WS, Saibil HR, Dolphin AC. The calcium channel $\alpha_2\delta$ -2 subunit partitions with $\text{CaV}2.1$ into lipid rafts in cerebellum: implications for localization and function. *J Neurosci.* 2006;**26**(34):8748-57.
66. Moss FJ, Viard P, Davies A, Bertaso F, Page KM, Graham A, Canti C, Plumpton M, Plumpton C, Clare JJ, Dolphin AC. The novel product of a five-exon stargazin-related gene abolishes $\text{CaV}2.2$ calcium channel expression. *EMBO J.* 2002;**21**:1514-23.
67. Be'guin P, Mahalakshmi RN, Nagashima K, Cher DHK, Kuwamura N, Yamada Y, Seino Y, Hunziker W. Roles of 14-3-3 and calmodulin binding in subcellular localization and function of the small G-protein Rem2. *Biochem J.* 2005;**390**:67-75.
68. Be'guin P, Mahalakshmi RN, Nagashima K, Cher DHK, Ikeda H, Yamada Y, Seino Y, Hunziker W. Nuclear sequestration of β -subunits by Rad and Rem is controlled by 14-3-3 and Calmodulin and reveals a novel mechanism for Ca^{2+} channel regulation. *J Mol Biol.* 2006;**355**:34-46.
69. Chen H, Puhl HL III, Niu SL, Mitchell DC, Ikeda SR. Expression of Rem2, an RGK family small GTPase, reduces N-type calcium current without affecting channel surface density. *J Neurosci.* 2005;**25**(42):9762-72.
70. Kelly K. The RGK family: a regulatory tail of small GTP-binding proteins. *Trends Cell Biol* 2005;**15**(12):640-3.
71. Jarvis SE, Zamponi GW. Masters or slaves? Vesicle release machinery and the regulation of presynaptic calcium channels. *Cell Calcium.* 2005;**37**(5):483-8.
72. Maximov A, Bezprozvanny I. Synaptic targeting of N-type calcium channels in hippocampal neurons. *J Neurosci.* 2002;**22**(16):6939-52.
73. Bernstein GM, Jones OT. Kinetics of internalization and degradation of N-type voltage-gated calcium channels: role of the $\alpha(2)/\delta$ subunit. *Cell Calcium.* 2007;**41**(1):27-40.
74. Evans RM, Zamponi GW. Presynaptic Ca^{2+} channels - integration centers for neuronal signaling pathways. *TRENDS Neurosci.* 2006;**29**(11):617-24.

75. Altier C, Khosravani H, Evans RM, Hameed S, Peloquin JB, Vartian BA, Chen L, Beedle AM, Ferguson SS, Mezghrani A, Dubel SJ, Bourinet E, McRory JE, Zamponi GW. ORL1 receptor-mediated internalization of N-type calcium channel complexes. *Nat Neurosci.* 2006;**9**:31-40.
76. Beedle AM, McRory JE, Poirot O, Doering CJ, Altier C, Barrere C, Hamid J, Nargeot J, Bourinet E, Zamponi GW. Agonist-independent modulation of N-type calcium channels by ORL1 receptors. *Nat Neurosci.* 2004;**7**(2):118-25.
77. Puckerin A, Liu L, Permaul N, Carman P, Lee J, Diverse' - Pierluissi MA. Arrestin is required for agonist-induced trafficking of voltage-dependent calcium channels. *J Biol Chem.* 2006;**281**(41):31131-41.
78. Tombler E, Cabanilla NJ, Carman P, Permaul N, Hall JJ, Richman RW, Lee J, Rodriguez J, Felsenfeld DP, Hennigan RF, Diverse' -Pierluissi MA. G protein-induced trafficking of voltage-dependent calcium channels. *J Biol Chem.* 2006;**281**(3):1827-39.
79. Yamaguchi M. Impact of aging on calcium channels and pumps. *Adv Cell Aging Gero.* 2002;**10**:47-65.
80. Timofeeva Y. Calcium signalling [web page on the Internet] Dept of Computer Science, Centre for Complexity, Science University of Warwick. www.dcs.warwick.ac.uk/~yulia/intro.html.
81. Paschen W, Mengesdorf T. Endoplasmic reticulum stress response and neurodegeneration. *Cell Calcium.* 2005;**38**:409-15.
82. Samara C, Tavernarakis N. Calcium-dependent and aspartyl proteases in neurodegeneration and ageing in *C. elegans*. *Ageing Res Rev.* 2003;**2**:451-71.
83. Toescu E, Verkhratsky A. Neuronal ageing from an intraneuronal perspective:roles of endoplasmic reticulum and mitochondria. *Cell Calcium.* 2003;**34**:311-23.
84. Mattson MP, Chan SL. Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Cell Calcium.* 2003;**34**:385-97.
85. Rajendra W, Armugam A, Jeyaseelan K. Neuroprotection and peptide toxins. *Brain Res Rev.* 2004;**45**:125-41.
86. Emilien G, Durlach C, Minaker KL, Winblad B, Gauthier S, Maloteaux JM Alzheimer Disease Neuropsychology And Pharmacology. Basel: Birkhauser Verlag; 2004.
87. Jessel T, Sanes JR. The generation and survival of nerve cells editor. İçinde: Kandel E, Schwarz JH, Jessel TM, editor. *Principals of Neural Science*. 4 ed. New York: McGraw-Hill; 2000. p. 1149-61.
88. Tuszynski MH, Alksne J, Bakay RA, Pay MM, Merrill D, Thal LJ. Growth factor gene therapy for Alzheimer disease. *Neurosurg Focus.* 2002;**13**(5):1-5.
89. Tuszynski MH. Gene therapy for neurological disease. *Expert Opin Biol Ther.* 2003;**3**:815-28.
90. Tuszynski MH, Thal L, Pay M, Salmon DP, Sang U H, Bakay R, Patel P, Blesch A Vahlsing HL, Ho G, Tong G, Potkin SG, Fallon J, Hansen L, Mufson E, Kordower JH, Gall C, Conner J. A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease. *Nat Med.* 2005;**11**(5):551-5.
91. Bartel D. MicroRNAs: Genomics,Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell.* 2004;**116**:281-97.
92. Chu C, Rana TM. Small RNAs: Regulators and Guardians of the Genome. *J Cell Physiol.* 2007;**213**:412-9.
93. Filipowicz W, Jaskiewicz L, Kolb FA, Pillai RS. Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr Opin Struct Biol.* 2005;**15**:331-41.

94. Liu X, Fortin K, Mourelatos Z. MicroRNAs: Biogenesis and Molecular Functions. *Brain Pathol.* 2008;**18**:113-21.
95. Wu L, Belasco JG. Let Me Count the Ways: Mechanisms of Gene Regulation by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 2008;**29**(1-7).
96. Zhang B, Wang Q, Pan X. MicroRNAs and Their Regulatory Roles in Animals and Plants. *J Cell Physiol.* 2007;**210**:279-89.
97. Buckingham S, Esmaili B, Wood M, Sattelle DB. RNA interference: from model organisms towards therapy for neural and neuromuscular disorders. *Hum Mol Genet.* 2004;**13**:275-88.
98. Schwarz DS, Zamore PD. Why do miRNAs live in the miRNP. *Genes Dev.* 2002;**16**:1025-31.
99. Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. Getting to the Root of miRNA-Mediated Gene Silencing. *Cell* 2008;**132**:9-14.
100. Rozema D, Lewis DL. siRNA delivery technologies for mammalian systems *Targets.* 2003;**2**:253-60.
101. Higgins D, Banker G. Primary Dissociated Cell Cultures. İçinde: Banker G, Goslin K, editor. *Culturing Nerve Cells.* 2 ed. Cambridge: MIT Press; 1998. p. 37-79.
102. Price P, Brewer GJ. Serum-Free Media for Neural Cell Cultures. İçinde: Fedoroff S, Richardson A, editor. *Protocols for Neural Cell Culture.* 3 ed. New Jersey: Humana Press; 1998. p. 255-64.
103. Goslin K, Asmussen H, Banker G. Rat Hippocampal Neurons in Low-Density Culture. İçinde: Banker G, Goslin K, editor. *Culturing Nerve Cells.* 2 ed. Cambridge: MIT Press; 1998. p. 339-71.
104. Nolan T, Hands BE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature protocols.* 2006;**1**(3):1556-82.
105. Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 1996;**6**:995-1001.
106. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Nat Biotechnol.* 1992;**10**:413-7.
107. Holick M. Noncalcemic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and clinical applications. *Bone.* 1995;**17**:107-11.
108. Oudshoorn C, Mattace-Raso FUS, van der Velde N, Colin EM, van der Cammen TJM. Higher serum vitamin D₃ levels are associated with better cognitive test performance in patients with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2008;**25**:539-43.
109. Beecham GW, Martin ER, Li YJ, Slifer MA, Gilbert JR, Haines JL, Pericak-Vance MA. Genome-wide Association Study Implicates a Chromosome 12 Risk Locus for Late-Onset Alzheimer Disease. *Am J Hum Genet.* 2009;**84**:35-43.
110. Poduslo SE, Yin X. Chromosome 12 and late onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2001;**310**:188-90.
111. Wang JY, Wu JN, Cherng TL, Hoffer BJ, Chen HH, Borlongan CV, Wang Y. Vitamin D₃ attenuates 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in rats. *Brain Res.* 2001;**904**:67-75.
112. Brewer LD, Thibault V, Chen KC, Langub MC, Landfield PW, Porter NM. Vitamin D hormone confers neuroprotection in parallel with downregulation of L-type calcium channel expression in hippocampal neurons. *J Neurosci.* 2001;**21**:98-108.
113. Brewer LD, Porter NM, Kerr DS, Landfield PW, Thibault O. Chronic 1,25-(OH)₂vitamin D₃ treatment reduces Ca²⁺-mediated hippocampal biomarkers of aging. *Cell Calcium.* 2006;**40**:277-86.

114. Thibault O, Gant JC, Landfield PW. Expansion of the calcium hypothesis of brain aging and Alzheimer's disease: minding the store. *Aging Cell*. 2007;**6**:307-17.
115. Gant JC, Sama MM, Landfield PW, Thibault O. Early and simultaneous emergence of multiple hippocampal biomarkers of aging is mediated by Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release. *J Neurosci*. 2006;**26**(13):3482-90.
116. Peeraully MR, Jenkins JR, Trayhurn P. NGF gene expression and secretion in white adipose tissue: regulation in 3T3-L1 adipocytes by hormones and inflammatory cytokines. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004. ;**287**:331-9.

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
DEKANLIĞI



Sayı : 23797

İstanbul,2. D. Eylül /2006..

Konu :

Temel Tıp Bilimleri Bölümü
Başkanlığına

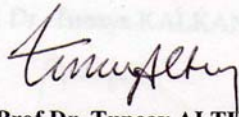
İLGİ: 14.07.2006 tarihli, 1245 sayılı yazınıza:

Bölümünüze bağlı Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında görevli Arşt.Gör.Duygu Gezen Ak'ın yürüteceği "Vitamin D'nin Nöron Yaşamı ve Nörodejenerasyon Üzerine Etkilerinin Araştırılması" başlıklı doktora tezi ile ilgili çalışma hakkında ilgi yazınız ve ekleri 18 Ağustos 2006 tarihinde toplanan Fakültemiz Deney Hayvanları Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup, oy birliği ile çalışmanın başlaması uygun bulunmuştur.

Bilgilerinizi,durumun adı geçen anabilim dalı başkanlığına bildirilmesini saygılarımla rica ederim

EKİ

1 dosya


Prof.Dr. Tuncay ALTUĞ
Deney Hayvanları Etik
Kurul Başkanı

Prof.Dr. ÖNER SÜZER
Farmakoloji Anabilim Dalı

Prof.Dr. SERGÜLEN DERVİŞOĞLU
Patoloji Anabilim Dalı

Prof.Dr. PERVİN BOZKURT
Anesteziyoloji Anabilim Dalı

Prof.Dr. HAKKI OKTAY SEYMEN
Fizyoloji Anabilim Dalı

Prof.Dr. METİN CANER
İç Hastalıkları Anabilim Dalı

Prof.Dr.AHMET DİRİCAN (YILLIK İZİNDE)
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Doç.Dr. FADIL AYAN
Genel Cerrahi Anabilim Dalı

Doç.Dr. HATUN HANZADE AKDENİZ DOĞAN
Deontoloji ve Tıp Tarihi Anabilim Dalı

Yard.Doç. Dr. SERDAR UĞURLU (YILLIK İZİNDE)
Deney Hayvanları Laboratuvarı

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Duygu	Soyadı	GEZEN-AK
Doğ.Yeri	Orhangazi	Doğ.Tar.	19.04.1978
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	26054060586
Email	duygugezenak@yahoo.com	Tel	0212 4143000/21627

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fak Tıbbi Biyoloji AD	2009
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fak Tıbbi Biyoloji AD	2003
Lisans	İstanbul Üniversitesi Fen Fak Biyoloji Bölümü	2000
Lise	İzmir Yunus Emre Anadolu Lisesi	1996

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	İstanbul Üniversitesi Sağlık Bil. Enst.	2000-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
Almanca	Çok iyi	iyi	iyi	65	
İngilizce	Çok iyi	iyi	iyi		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	62.078	62.173	62.126
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Office Word	Çok iyi
Office Excel	Çok iyi
Office PowerPoint	Çok iyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

SSCI kapsamındaki dergilerde yayınlanmış makaleler

1. Dursun E, Gezen-Ak D, Ertan T, Bilgic B, Gurvit H, Emre M, Eker E, Engin F, Uysal Ö, Yilmazer S. Interleukin 1 Alpha -889 C/T Polymorphism in Turkish Patients with Late-onset Alzheimer's Disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 27(1): 82-87,2009
2. Dursun E, Gezen-Ak D, Eker E, Ertan T, Engin F, Hanagasi H, Gurvit H, Emre M, Yilmazer S. Presenilin1 Gene Intronic Polymorphism and Late-onset Alzheimer's Disease. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology* 21(4): 268-273, 2008
3. Gezen-Ak D, Dursun E, Ertan T, Hanagasi H, Gurvit H, Emre M, Eker E, Ozturk M, Engin F, Yilmazer S. Association between vitamin D receptor gene polymorphism and Alzheimer's disease. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 212:275-282, 2007
4. Gezen Ak D., Kahraman H., Dursun E., Duman BS., Erensoy N., Alagöl F., Yilmazer S. Polymorphisms at the ligand binding site of the vitamin D receptor gene and osteomalacia. *Disease Markers* (2005) 21(4);191-197

SSCI kapsamındaki dergilerde yayınlanmış çalışma özetleri

1. Gezen-Ak D, Dursun E, Ertan T, Hanagasi H, Gurvit H, Emre M, Eker E, Ozturk M, Engin F, Yilmazer S. SNPs at the ligand binding site of the vitamin D receptor gene and Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia, Volume 2, Issue 3, Supplement 1, July 2006, Pages S195-S196.*
2. Dursun E, Gezen-Ak D, Uysal Ö, Ertan T, Bilgic B, H, Emre M, Eker E, Engin F, Yilmazer S. Vitamin D receptor, Presenilin 1 and interleukin 1 alpha gene SNPs and late-onset Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia, Volume 2, Issue 3, Supplement 1, July 2006, Page S19.*
3. Gezen Ak D, Dursun E, Ertan T, Bilgic B, Gurvit H, Emre M, Eker E, Engin F, Yilmazer S. Interleukin1 α Gene C(-889)T Polymorphism in Late-onset Alzheimer's Disease. *Neurobiology of Aging Vol: 25 S504 P4-105, 2004*

4. Dursun E, Gezen Ak D, Eker E, Ertan T, Engin F, Hanagası H, Gurvit H, Emre M, Yılmaz S. Presenilin1 Gene Intronic Polymorphism in Late-onset Alzheimer's Disease. *Neurobiology of Aging Vol: 25 S511 P4-126, 2004*

Daha Önce Aldığı Burslar / Ödüller:

1. -International Conference on Alzheimer's Disease 2009 Viyana Avusturya" için "Alzheimer's Association'dan" seyahat ve konaklama bursu
2. -TUBİTAK projesi kapsamında TUBİTAK bursiyeri (3 sene)
3. -Beyin Araştırmaları Derneği Yurtdışı Eğitim Bursu (1 Aylık, UMDNJ NewJersey-USA)
4. -2. Ulusal Sinir Bilimleri Kongresi için TUBİTAK kongre bursu
5. -3. Ulusal Sinir Bilimleri Kongresi için TUBİTAK kongre bursu
6. -10. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi için TUBİTAK kongre bursu
7. -"9th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders 2004 Philadelphia USA" için "Alzheimer's Association'dan" seyahat ve konaklama bursu
8. -Atatürkçü Düşünce Derneği-Yılın Genç Yetenekleri Ödülü-1997

Üyelikler

1. Alzheimer's Association International Society to Advance Alzheimer Research and Treatment (ISTAART) üyeliği
2. International Brain Research Organization (IBRO) üyeliği
3. Federation of European Neuroscience Society (FENS) üyeliği
4. Beyin Araştırmaları Derneği üyeliği
5. Tıbbi Biyoloji Derneği üyeliği
6. Biyologlar Derneği üyeliği

Seminerler

1. Vesiküllerin Hücre İçi Trafik, Mart 2001
2. Hibridoma Teknolojisi ve Moleküler Hücre Biyolojisi Teknikleri, Ekim 2002

3. Vitamin D Reseptör Geni Polimorfizmleri ve İlişkili Hastalıklar, Ekim 2002
4. Parkinson Hastalığının Moleküler Genetiği, Ocak 2004
5. Parkinson Hastalığında Genetik Faktörler, Aralık 2004
6. Nörodejeneratif Hastalıklar ve Oksidatif Stres, Aralık 2005
7. Parkinson Hastalığının Hücre Temelli Tedavi Yöntemleri, Şubat 2006
8. Kalsiyum Bağlayan Proteinler ve Nörodejenerasyon, Mart 2008
9. Primer Nöron Kültürü Tekniği, Nisan 2009

Kongre ve Sempozyumlar

1. International Conference on Alzheimer's Disease (ICAD) 2009, 11-16 Temmuz, 2009 Viyana, Avusturya.
2. 8. Ulusal Sinirbilimleri Kongresi, Nisan, 2009 Bolu, Türkiye
3. 10. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 06-09 Eylül, 2007 Antalya Türkiye
4. VI. Ulusal Sinirbilimleri Kongresi, 09-13 Nisan, 2007 Karabük Türkiye
5. 10th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders, 15-20 Temmuz, 2006 Madrid, Spain
6. 9. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi, 24-27 Kasım, 2005 Manisa Türkiye
7. 21st International Conference of Alzheimer's Disease International, 28 Sept-1 Oct, 2005 Istanbul Turkey
8. European Human Genetics Conference 2005, 07-10 May, 2005 Prague, Czech Rep.
9. IV. Ulusal Sinirbilimleri Kongresi, 29-02 Mart, 2005 Mersin Türkiye
10. 9th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders, 17-22 July, 2004 Philadelphia USA
11. 8. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi, 13-17 Ekim, 2004 Adana Türkiye
12. 2nd International Symposium on Alzheimer's Disease and Related Disorders in the Middle East, 1-3 May, 2003 Istanbul Turkey
13. VI. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 12-15 Eylül, 2002 Istanbul Türkiye
14. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi, 18-21 Eylül, 2001 Eskişehir Türkiye
15. 6. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi, 2-5 Kasım, 2000 Denizli Türkiye

Sertifikalar

- Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler ve Antikor Üretimi. TÜBİTAK (16-20 Ağustos 2002, Gebze)
- Yardımcı Üreme Teknikleri ve Transgenik Hayvan Modelleri. TÜBİTAK (6-10 Ekim 2003, Gebze)
- Proteomik, Protein Analizinde Yeni Yaklaşımlar. –BİYOGEİM (23.06.2003, İstanbul)
- Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu. İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fak.(11-12 Nisan 2005, İstanbul)
- Hybrid course in Statistical Genetic Analysis of Complex Phenotypes. The European School of Genetic Medicine (ESGM)- İ.Ü. DETAE (3-5 Mayıs 2006, İstanbul, Türkiye - İtalya, Bertinoro-Romagna)
- University of Medicine and Dentistry of New Jersey (UMDNJ) Department of Biochemistry and Molecular Biology, Department of Neuroscience bölümlerinde ziyaretçi araştırmacı olarak çalışma (1 ay, Ağustos 2007)

Katıldığı Projeler

1. **Proje adı:** Vitamin D'nin Alzheimer Hastalığı Modeli Üzerine Etkilerinin PTGS Yöntemi İle İncelenmesi (2007)
Proje no: 548
Destekleyen kuruluş: İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği
Görevi: Yardımcı araştırmacı
2. **Proje adı:** Alzheimer Hastalığı ile Vitamin D İlişkisinin Post Transkripsiyonel Gen Susturulması Yöntemi İle İncelenmesi (2007)
Proje no: 107S041
Destekleyen kuruluş: TÜBİTAK
Görevi: Yardımcı araştırmacı
3. **Proje adı:** Vitamin D'nin Nöron Yaşamı ve Nörodejenerasyon Üzerine Etkilerinin Araştırılması (2006)
Proje no: T-942/06102006
Destekleyen kuruluş: İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği
Görevi: Yürütücü

4. **Proje adı:** Vitamin D'nin Alzheimer Hastalığı ile İlişkisinin Araştırılması (2006)
Proje no: T-941/06102006
Destekleyen kuruluş: İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği
Görevi: Yardımcı araştırmacı
5. **Proje adı:** Vitamin D Bağlayan Protein (VDBP) polimorfizmlerinin Alzheimer hastalığı ile ilişkisinin araştırılması (2006)
Proje no: T-100/15122006
Destekleyen kuruluş: İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği
Görevi: Yardımcı araştırmacı
6. **Proje adı:** Vitamin D Reseptör Geni polimorfizmleri ile Geç Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı Arasındaki İlişkinin Araştırılması (2005)
Proje no: 460/27122005
Destekleyen kuruluş: İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği
Görevi: Yardımcı araştırmacı
7. **Proje adı:** HER2 (NEU) ve MMP1 Polimorfizmleri ile Meme Kanseri Arasındaki İlişki (2004)
Proje no: 236/29042004
Destekleyen kuruluş: İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği
Görevi: Yardımcı araştırmacı
8. **Proje adı:** Katepsin D ve İnterlökin 1 Alfa polimorfizmlerinin Alzheimer hastalığı ile ilişkisi (2002)
Proje no: 36/03092002
Destekleyen kuruluş: İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği
Görevi: Yardımcı araştırmacı

9. Proje adı: Osteomalazili hastalarda Vitamin D reseptör geni polimorfizmi (2001)

Proje no: T-1221/01112001

Destekleyen kuruluş: İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği

Görevi: Yürütücü

10. Proje adı: Alzheimer hastalarında Presenilin-1 polimorfizmi (2001)

Proje no: T-1225/01112001

Destekleyen kuruluş: İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği

Görevi: Yardımcı araştırmacı