

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

PROJE BAŞLIĞI

Proje No: TCD-2013-4528

Proje Türü
Çok Disiplinli Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Yrd. Doç. Dr. Ahmet CUMAOĞLU
Eczacılık Fakültesi/Biyokimya AD.

Doç. Dr. M. Betül YERER AYCAN
Eczacılık Fakültesi/Farmakoloji AD.
Yrd. Doç Dr. Eren DEMİRPOLAT
Eczacılık Fakültesi/Farmakoloji AD.

MART 2015

KAYSERİ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	4
ABSTRACT	5
1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM	6
2. GENEL BİLGİLER	6
3. GEREÇ VE YÖNTEM	8
4. BULGULAR	10
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	21
6. KAYNAKLAR	23

ÖZET

Mikroglial hücrelerde Aldoz redüktaz inhibisyonunun inflamasyon üzerine etkileri

Merkezi sinir sisteminde, mikroglial hücrelerin aşırı aktivasyonu nöroinflamasyonda merkezi durum olarak kabul edilir. Aldoz redüktaz enzimi birçok inflamatuvar hastalıkta anahtar rollere sahiptir. Bu nedenle, aldoz redüktaz enziminin inhibisyonu anti-inflamatuvar tedavi için yararlı bir strateji olarak görünmektedir. Bu çalışmada, kesretin ve monokloropivaloilkersetin' in aldoz redüktaz ifadenmesini inhibe etmekle birlikte, lipopolisakkarit ve amiloid beta peptit ile inflamasyonun tetiklendiği mikroglial hücrelerde inflamatuvar mediyatörlerin ifadenme düzeylerini azaltarak anti-nöroinflamatuvar etkisi bulunmuştur. Ayrıca aldoz redüktaz ifadenmesinin susturulmasına yönelik mekanistik çalışmalar amiloid beta peptit ile indüklenen inflamasyonda siklooksijenaz-2 protein ifadenmesini azaltmıştır. Özellikle monokloropivaloilkersetin ile tedavi nükleer faktör kapa B p65 alt ünitesinin nükleer translokasyonunu azaltmıştır. Kesretin ve monokloropivaloilkersetin lipopolisakkarit ve amiloid beta peptit ile inflamasyonun tetiklendiği mikroglial hücrelerde siklooksijenaz ifadenme düzeylerini azalmış bu da prostoglandinE2 salınımında azalmaya neden olmuştur. Buna ilave olarak, Kesretin ve monokloropivaloilkersetin tedavisi ile mitojenle aktive edilen protein kinaz yolağının inhibisyonu her iki lipopolisakkarit ve amiloid beta peptit ile inflamasyonun tetiklendiği mikroglial hücrelerde proinflamatuvar sitokin salınımında azalmaya neden olmuştur. Lipopolisakkarit uygulaması antioksidan glutatyon düzeylerinde azalmaya neden olmasına rağmen, Amiloid beta peptit uygulaması antioksidan glutatyon düzeylerin etkilememiştir. Sorbinil, kesretin ve monokloropivaloilkersetin uygulamaları lipopolisakkarit uygulaması ile azalan antioksidan glutatyon düzeylerini normalize etmiştir. Bu bulgular, nöroinflamasyonun inhibisyonunda aldoz redüktaz' ın potansiyel hedef olabileceğini göstermekle birlikte, kesretin ve monokloropivaloilkersetin uygulamaları nöroinflamatuvar hastalıkların tedavisinde etkili olabilir.

Anahtar Kelimeler: Aldoz redüktaz, nöroinflamasyon, Mitojenle aktive edilen protein kinaz, Glutatyon, siklooksijenaz-2

ABSTRACT

Effect of Aldose reductase inhibition on inflammation in microglial cells

In the central nervous system (CNS), microglial over-activation is considered to be a central event in neuroinflammation. Aldose reductase (AR) has a key role in several inflammatory diseases. Therefore, AR inhibition seems to be a useful strategy for anti-inflammation therapy. In the present study, we found that Quercetin and monochloropivaloylquercetin showed potent inhibition on aldose reductase expression and anti-neuroinflammatory effects in lipopolisaccaride (LPS) and β -amyloid peptide ($A\beta$) induced inflammatory process by inhibiting expression of inflammatory mediators in microglial cells. Furthermore, mechanistic studies showed that Ablation of aldose reductase caused a significant reduction on Cox-2 expression in $A\beta$ induced neuroinflammation. Especially treatment with monochloropivaloylquercetin decreased the nuclear traslocation of NFkB p65 subunit. Quercetin and monochloropivaloylquercetin suppressed Cox-2 expression, which further resulted in downstream inhibition protoglandin E2 (PGE2) release in LPS and $A\beta$ inducued neuroinflammatory process. Additionally, inhibition of MAPK pathway with Quercetin and monopivaloilquercetin treatment caused a dimunition in proinflammatory cytokine release in both LPS and $A\beta$ inducued neuroinflammation. Although antioxidant glutathione levels were decreased after LPS treatment, there was no significant changes after $A\beta$ treatment. Sorbinil, Quercetin and monochloropivaloilquercetin supplementation normalised glutathione levels in LPS inducued neuroinflammation.

These findings suggested that AR is a potential target for neuroinflammation inhibition and that Quercetin and monochloropivaloilquercetin could be an effective agent for treating or preventing neuroinflammatory diseases.

Key words: Aldose reductase, neuroinflammation, Mitogen activated protein kinase, Glutathione, cyclooxygenase-2

1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Mikroglial hücreler beyin parankimi fagositer hücreleridir ve diğer dokulardaki makrofajlara benzer biçimde aktive oldukları da fagositoz, antijen sunumu ve çeşitli inflamatuvar ve nörotoksik faktörlerin salınımı gibi özellikler göstermektedir (1). Son yıllarda yapılan çalışmalar merkezi sinir sisteminin makrofajları olan mikroglial hücrelerin Alzheimer Hastalığı (AH) ve Parkinson hastalığı gibi kronik nörodejeneratif hastalıkların patogeneze katkıda bulunduğunu göstermiştir (2). Amiloid plakların çevresinde akut faz proteinleri, stokinler, kompleman elemanları ve proteazlar gibi inflamasyon sürecine katılan birçok maddenin varlığının saptanmış olması AH'da inflamatuvar süreçlerin ve glial aktivasyonun da patojenik sürecin bir parçası olduğunu ya da en azından hastalığın ilerlemesine katkıda bulunduğunu düşündürmektedir (1, 3). Kronik nörodejenerasyon sürecinde aktive duruma geçen mikroglial hücreler salgıladıkları nörotoksik faktörler (Sitokinler, reaktif oksijen metabolitleri, proinflamatuvar araşidonik asit metabolitleri) aracılığıyla nöronal hasara yol açmaktadır (1). Bu doğrultuda amiloid peptid ve inflamatuvar uyarılarla aktive olan mikroglial hücrelerden salınan proinflamatuvar sitokinlerin ve nörotoksinlerin nöronal hasara yol açması ya da şiddetlendirmesi ve inflamatuvar süreçlerin anti-inflamatuvar tedavi yaklaşımları ile hafifletilmesi veya noroinflamatuvar-nörodejeneratif hastalıklarda kısmen yarar göstermesi son zamanlarda dikkat çekicidir. Aldoz redüktaz enzim inhibisyonu ve/veya bu enzimi inhibe edebilen bileşiklerin inflamatuvar süreci hafifletici etkileri daha önceki çalışmalarda vurgulanmıştır (4-7). Bizde, çalışmamızda aldoz redüktazın (AKR1B3) gerek kimyasal (Sorbiniol, kesretin ve monokloropivaloilkersetin ile) gerekse RNA interferas yöntemi ile inhibisyonunun lipopolisakkarit ve amyloid beta peptid (1-42) ile indüklenen nöroinflamasyon ve mikroglial aktivasyondaki etkilerinin sitokin salınımı, mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) yolağı, Nüklear Faktör-KappaB (NFkB) aktivasyonu, nitrik oksit ve prostoglandinE2 salınımı ve proinflamatuvar protein ve mRNA (Cox-2 ve iNOS) ifadenme düzeylerini ölçülerek araştırdık.

2. GENEL BİLGİLER

Mikroglial hücreler merkezi sinir sisteminde var olan immün hücreler olup inflamasyonda primer mediyatörlerdir. İnsan beyninde bölgesel olarak değişmekle birlikte tüm beyin hücrelerinin %5-20 kadarını glial hücreler oluşturur [8]. Bununla birlikte astrositler de merkezi sinir sistemin immün hücreleridir. Mikroglial hücreler dinlenme halinde nöronal migrasyon, aksonal büyüme, snapsların yeniden modellenmesi, beyin ve spinal cord gelişimi gibi birçok kritik fizyolojik role sahiptir [9]. Aynı zamanda bu hücreler merkezi sinir sistemi içerisinde süre gelen hemostazisin bozulmasına karşı sensör görevi üstlenirler [10]. Mikroglialar beyinde oluşabilecek iskemi, enfeksiyon ve inflamasyona karşı hızlıca aktive olur [11]. Bu aktivasyon mikroglialarda morfolojik değişimlere neden olarak amiboid hal almasını sağlar. Böylece amiboid mikroglial hücre merkezi sinir sisteminden oluşan patolojiye karşı immün yanıtı başlatır. İmmün yanıt mikroglial hücrelerde fagositik aktivasyon, antijen sunumu, sitotoksik ve nörotrofik birçok mediatörün salınımı ve işlenişi ile başlatılır[12]. Mikroglialar sitotoksik ajan olarak; stokinler, reaktif oksijen/nitrojen türleri ve araşidonik asit metabolitleri salgılayarak

inflamasyona yanıtta etkin hal alır[13]. Mikroglial hücreler hem akut hemde kronik inflamasyonun ilerleyişinde etkin rol alır [14]. Deneysel olarak mikrogliaların aktivasyonu ve bu faktörleri salgılayan hale getirilmesi başlıca lipopolisakkarit, amiloid protein ve yüksek doz interferon gama veya diğer sitokinlerin tek başına ve/veya kombinasyonu şeklinde maruziyeti ile gerçekleştirilir[15]. Mikroglial hücrelerin kısa süreli aktivasyonu her ne kadar koruyucu olarak görünse de kronik aktivasyonu nöranal hücrelerde hasara neden olarak başta yaşlanma olmak üzere Alzheimer, Parkinson ve amyotrofik lateral sklerosis gibi nörodejeneratif hastalıkların birçoğunda potansiyel mekanizma olarak görülmektedir. Nörodejeneratif hastalıklarda prevalans yaşlanmayla artar ve beraberinde mikroglial hücrelerde nöroinflamatuvar değişim de kaçınılmazdır[12]. Alzheimer demansın en sık gözlenen formu olmakla birlikte hastalarda kısa süreli bellekte zayıflama ile karakteristik nörodejeneratif bir hastalıktır[16]. Alzheimer da beyinde beta amiloid birikimi ve hücre içi nörofibriler değişim gözlemlenir[17]. Son yıllarda yapılan çalışmalar da Alzheimer' ın geniş çaplı inflamasyonla ilişkili olabileceği ve hastalarda artan sirkülatif stokin miktarının varlığı gösterilmiştir[18]. Aynı zamanda glial hücrelerde stokin salınımındaki artış Alzheimer ile ilişkilendirilmiştir[19]. Buna ek olarak in vitro Alzheimer hastalarda ve bunların demansı olmayan kontrol gruplarından elde edilen mikroglial hücrelerde amiloid beta peptite maruziyet hücrelerden stokin salınımını anlamlı derecede artırarak mikroglial aktivasyona neden olmuştur[20]. Yapılan bir kaç post-mortem çalışmada Alzheimer lezyonlarında ve lezyona çok yakın kısımlarda aktive olmuş çok sayıda mikroglia ve stokinlerin artmış miktarları gösterilmiştir[21, 22]. Klinik birçok çalışma amiloid beta peptid aracılı inflamasyonun Alzheimer patolojisinde etkin mekanizma olabileceği vurgulanmıştır[23]. Bununla birlikte Parkinson, multiple sklerosis ve amyotrofik lateral sklerosis gibi diğer nöroinflamatuvar hastalıkların patogeneğinde de mikroglial aktivasyon sorumlu olabilir[24]. Aldoz redüktaz bir aldo-keto-redüktaz olup poliol metabolizmasında hız kısıtlayıcı enzimdir. Enzim temel olarak hücrede glukozon sorbitole dönüşümünü katalizlerken aynı zamanda reaktif aldehytlerin ve bunların glutatyon konjugatlarının redüksiyonu yoluyla detoksifikasyonundan sorumludur[25]. Enzimin artan aktivitesi hücrelerde NADPH/NAPD oranını değiştirerek glutatyon redüktaz ve glutatyon peroksidaz aktivitelerini zayıflatarak hücrelerde redükte glutatyon düzeylerinin azalışına neden olabilir. Bu değişim hücrelerde oksidatif stresi artırabilir[26]. Buna ilave olarak aldoz redüktazın gerek farmakolojik inhibisyonunun gerekse siRNA yöntemi ile ifadenemesinin azaltılması hücrelerde inflamasyona karşı koruyucu etkiler gösterdiği daha önceki birkaç çalışma ile ortaya konulmuştur [4-7]

Flavonoidler bitkilerde var olan bileşikler olup, biyolojik sistemlerde antioksidan, immün-regülatör, anti-kanser ve anti-inflamatuvar etkileri ile dikkat çekmektedir [27]. Tüm bu flavonoidler içerisinde özellikle kesretin meyvelerde, sebzelerde ve bitkilerin soğansız köklerinde fazlaca bulunur ve kesretin üzerinde son yıllarda araştırmalar devam etmektedir. Ancak kesretin' in biyoyararlanımı türler arasında farklılık göstermekte [28] bu durumda araştırmacıları yeni kesretin türevleri sentezleme ve bu bileşiklerin farmakolojik özelliklerini test etme yoluna yönlendirmektedir. Bu kapsamda kesretine yeni aktif gruplar substitüye edilerek yeni bileşikler sentezlenmektedir. Veverka ve arkadaşları [29] kesretin ana bileşimini türevlendirerek yeni bileşikler sentezlemiş ve bu bileşiklerin antioksidan ve aldoz redüktaz inhibitor etkilerini test etmişlerdir. Bizde, çalışmamızda Aldoz redüktazın (AKR1B3) gerek kimyasal (Sorbitol, kesretin ve monokloropivaloilkersetin ile) gerekse RNA interferas yöntemi ile inhibisyonunun

lipopolisakkarit ve amyloid beta peptit (1-42) ile indüklenen nöroinflamasyon ve mikroglial aktivasyondaki etkilerinin sitokin salınımı, mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) yolağı, Nüklear Faktör-KappaB (NFkB) aktivasyonu, nitrik oksit ve prostoglandinE2 salınımı ve proinflamatuvar protein ve mRNA (Cox-2 ve iNOS) ifadelenme düzeylerini ölçülerek araştırdık.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Hücre Kültürü:

Bv-2 fare mikroglia hücreleri 37 °C sıcaklıkta, % 5 karbondioksit içeren steril inkübatörde kültüre edildi. Hücreler; 30 dakika 55 °C sıcaklık da ısıtma işlemiyle inaktive edilmiş % 10 fetal sığır serumu, 100 U/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin, 2 mM glutamin içeren DMEM besiyerinde kültüre edildi. Hücreler 25 ve 75 cm² kültür kabında kültüre edildi ve 0.25% Tripsin/EDTA yardımıyla kültür kabı tabanından koparılıp bir başka kültür kabına pasajlandı.

MTT deneyi:

MTT deneyi canlı hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri sonucu sarı renkli ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)' in indirgenerek mor formazan kristaline dönüştürülmesi prensibine dayanır. 96 kuyucuklu kültür kabına kuyucuk başına 20.000 hücre 100 µl fenol kırmızısı içermeyen DMEM besiyeri içerisinde ekildi. Hücrelerin kültür kabı tabanına tutunmaları için 24 saat karbondioksitli steril etüvde inkübe edildi. 24 saat sonunda kuyucuklardaki besi yeri atıldı. Sorbinili (DMSO da çözüldü) kesretin (DMSO da çözüldü) ve monokloropivaloilkersetin (Slovak bilimler akademisi Deneysel farmakoloji ve toksikoloji enstitüsünde sentezlenmiş tarafımıza gönderilmiştir. DMSO da çözüldü) çeşitli zaman ve çeşitli konsantrasyonlarda besi yerine eklendi. Uygun inkübasyon süresi sonunda maddeleri içeren besi yeri atıldı ve hücrelere 100 mikrolitre besi yeri içerisinde 10 mikrolitre MTT reaktifi eklenerek 4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda oluşan formazan kristalleri 100 mikrolitre DMSO ile çözünerek 570 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucuda ölçüldü.

Western Blot

Transfeksiyon sonrası protein ekspresyonu (Cox-2), MAPK kaskadı, proinflamatuvar proteinlerin ifadelenme düzeyleri ve NFkB (p65) düzeyleri western blot yöntemi ile tayin edildi. Mikroglia hücreleri, 1.000.000 hücre 25 cm² hücre kültür kabına 3 ml DMEM besiyeri içerisinde ekildi. Hücrelerin kültür kabı tabanına tutunmaları için 24 saat karbondioksitli steril etüvde inkübe edildi. 24 saat sonunda kültür kaplarındaki besi yeri atıldı ve etkisi test edilecek maddeler besi yerinde verildi. İnkübasyon süresi sonunda besi yeri atıldı ve hücreler kültür kabı tabanından kopartılarak toplandı. Toplanan hücreler uygun tampon (Proteaz inhibitör kokteyil içeren RIPA) ile lizis edildi ve lizattan total protein tayini (Bisikonilik asit metodu ile kit kullanarak) yapıldı. Proteinler kuyucukta 30 mikrogram olacak şekilde SDS-poliakrilamid jelle yüklenerek 100 V da 1 saat elektroforez edildi. Süre sonunda jeldeki protein 200 mAmp akımda 1 saat PVDF membrana transfer edildi. Membran uygun

dilüsyondaki gece boyu inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası sekonder antikorla işaretlenen proteinlerden elde edilen uygun bandlar ECL reaksiyonu ile görünür hale getirildi ve X-ray filme basıldı.

Hücrelerden salınan PGE2 düzeylerinin ölçümü

24 kuyucuklu kültür kabına kuyucuk başına 500.000 hücre 200 µl DMEM besiyeri içerisinde ekildi. Hücrelerin kültür kabı tabanına tutunmaları için 24 saat karbondioksitli steril etüvde inkübe edildi. 24 saat sonunda kuyucuklardaki besi yeri atıldı ve aldoz redüktaz inhibisyonu yapıldı. Aldoza redüktaz inhibe edilen hücrelerde ve kontrol hücrelerde immünojen ve beta amiloid peptit ile inflamasyon tetiklendi. İnkübasyon süresi sonuna besiyeri ortamına salınan PGE2 miktarı ELISA kiti kullanılarak ölçüldü.

Hücrelerde proinflamatuvar Cox-2 ve iNOS mRNA düzeylerinin ölçümü

Hücrelerin inflamasyona karşı yanıtı hücrelerde aktive olan Cox-2 ve iNOS mRNA düzeylerinin qPCR ile ölçülmesi ile kontrol edildi. Bv-2 hücreleri 25 cm²'lik hücre kültür flaskına ekilerek, 37°C' de inkübe edildi. Flaskın tabanı %70-80 doluluğa ulaştığında, besiyeri yenilenerek Aldoza redüktaz inhibe elden hücrelerde ve kontrol grubu hücrelerde amyloid beta peptid ve lipopolisakkarit ile inflamasyon tetiklendi. Cox-2 ve iNOS genlerinin hücre içi mRNA ifadenmelerini ölçmek için, total RNA izolasyonu (RNA izolasyon kiti kullanıldı) yapıldı. Total RNA'dan cDNA sentezi yapıldı. Daha sonra genlerin mRNA ifadenme düzeylerini ölçmek için, 5 µl cDNA, 8 µl TaqMan master karışım, 1 µl katolog gen (primer prob karışımı) 6 µl PCR grade su ve toplam hacim 20 µl tamamlanıp karıştırıldı ve böylece Real-time PCR reaktanları hazırlandı. Realtime PCR cihazında 95 °C 10 dakikalık ön inkübasyonu, 55 tekrarlı 95°C 10 saniye, 60°C 20 saniye, 60°C 1 saniyelik annealing döngüsü sonucu elde edilen Ct değerleri kaydedildi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi.

Nitrik oksit düzeylerinin ölçümü

Bv-2 mikroglia hücreleri, 1.000.000 hücre 6 lık hücre kültür kabına 2 ml DMEM besiyeri içerisinde ekildi. Hücrelerin kültür kabı tabanına tutunmaları için 24 saat karbondioksitli steril etüvde inkübe edildi. 24 saat sonunda kültür kaplarındaki besi yeri atıldı ve etkisi test edilecek maddeler besi yerinde verildi. İnkübasyon süresi sonunda besi yeri toplandı uygun ticari kit yardımıyla kolorimetrik olarak nitrik oksit (Griess metodu) düzeyleri ölçüldü.

RNA interferans deneyi.

Hücreler transfeksiyondan 1 gün önce 6 lık kültür kabına %60-70 dolulukta ekildi. Transfeksiyon için uygun oligonükleotit dizi (sense ve antisense dizi; siRNA) dizayn edildi. Çalışmamızda Aldoza redüktaz mRNA sına uygun oligonükleotit dizi dizayn edildi. Transfeksiyon nükleik asit (oligonükleotit dizi) taşıyabilen katyonik lipozom (Lipofektamin 2000) kullanılarak gerçekleştirildi. Uygun miktar (75-100pmol) RNA yaklaşık 7,5-10 µl katyonik lipid ile inkübe edilip oligonükleotit yüklü lipozom elde edildi.

Lipozom sitotoksitenin minimum olduğu zamana kadar (24 saat optimum süre olarak belirlendi) hücrelerle inkübasyona bırakılarak transfeksiyonun gerçekleşmesi sağlandı. Transfeksiyonu takiben 24. saatde gen ekspresyonundaki değişim western blot ile gösterildi. Transfeksiyonun verimli olduğu sürede ortama amiloid beta peptit eklenerek inflamasyon tetiklendi. İnflamasyonun derecesi Cox-2 ifadelenme düzeylerini ölçerek ortaya konuldu.

Hücre antioksidan glutasyon düzeylerinin ölçümü

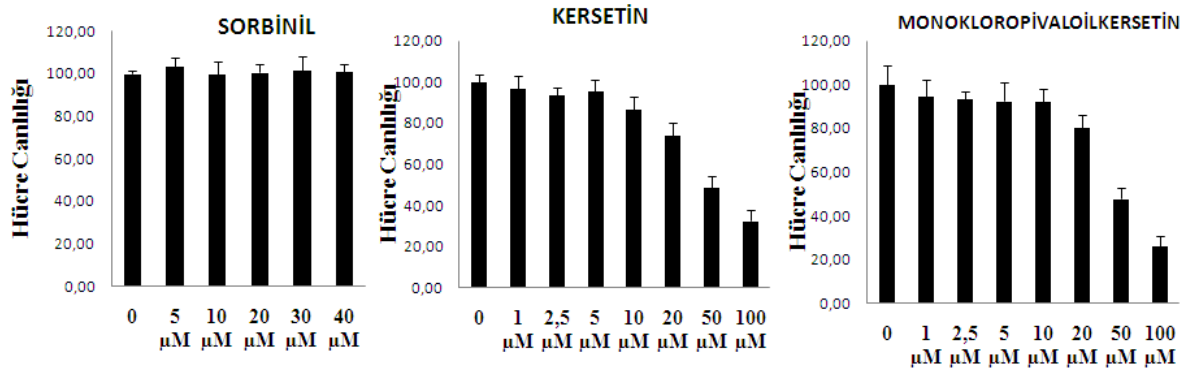
Bv-2 mikroglia hücreleri, 1.000.000 hücre 6 lık hücre kültür kabına 2 ml DMEM besiyeri içerisinde ekildi. Hücrelerin kültür kabı tabanına tutunmaları için 24 saat karbondioksitli steril etüvde inkübe edildi. 24 saat sonunda kültür kaplarındaki besi yeri atıldı ve etkisi test edilecek maddeler besi yerinde verildi. İnkübasyon süresi sonunda besi yeri atıldı ve hücreler kültür kabı tabanından kopartılarak toplandı. Toplanan hücreler uygun tampon (20 mM PBS, pH: 7,4) ile lizis edildi ve uygun ticari kit yardımıyla kolorimetrik olarak glutasyon düzeyleri ölçüldü.

4. BULGULAR

Projemiz kapsamında etkisini araştırmak istediğimiz aldoz redüktaz enzim aktivitesini potent inhibe eden sorbinile ilave olarak Kersetin (Q; Quercetin) ve monokloropivaloilkersetin (Monochloropivaloylquercetin; MPQ) nin etkileride çalışılmıştır.

MTT testi

Öncelikli amacımız bu maddelerin sitotoksik olmayan dozlarında tedavi gerçekleştirmektir. Bu kapsamda Sorbinil kesretin ve monokloropivaloilkersetin için sitotoksitate deneyleri yapılmıştır. Maddelerin sitotoksik etkileri MTT testi ile ölçülmüştür (Şekil 1.).



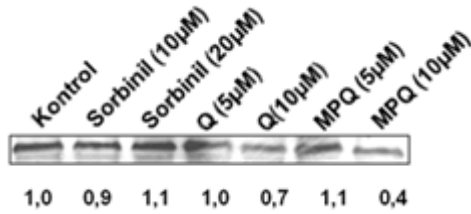
Şekil 1. Sorbinil, Kersetin ve monokloropivaloilkersetin' in BV-2 hücre canlılığı üzerine etkisi

Sitotoksitate çalışmalarımızın sonuçlarına göre Sorbinil test edilen tüm konsantrasyonlarda hücrelerde toksik etki göstermemiştir. Kesretin ve monokloropivaloilkersetin 10 µM üzeri konsantrasyonlarda

sitotoksik etki göstermiştir. Tüm bu sonuçlara göre lipopolisakkarit ve amiloid beta peptit ile indüklenen inflamasyona karşı bu maddelerin sitotoksik olmayan dozlarında (Sorbiniil 10-40 μ M, Kersetin 2,5-10 μ M, monokloropivaloilkersetin 2,5-10 μ M) koruyucu potansiyelleri ölçülmüştür.

Western Blot Aldoz redüktaz (Akr1b3) protein ifadenmesi ve inhibitörlerin etkisi

Sorbiniil, kesretin ve monokloropivaloilkersetin' in aldoz redüktaz enzim ifadenmesi üzerine etkisi western blot yöntemi ile ölçülmüştür (Şekil 2).



Şekil 2. Aldoz redüktaz (Akr1b3) protein ifadenmesi üzerine Sorbiniil, Kersetin (Q) ve monokloropivaloilkersetin (MPQ) etkileri.

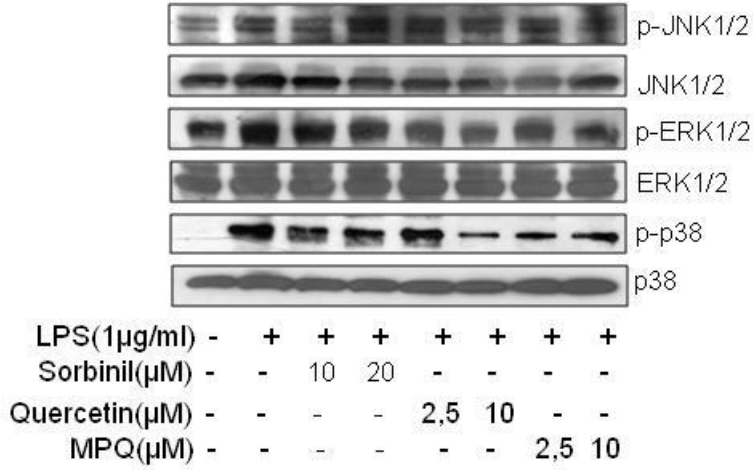
Hücreler 24 saat Sorbiniil (10 μ M ve 20 μ M), Kersetin (Q, 5 μ M ve 10 μ M) ve monokloropivaloilkersetin (MPQ, 5 μ M ve 10 μ M) ile inkübe edildi. Kontrol grubuna göre diğer gruplardaki ifadenme düzeyleri sayısal olarak figürde belirtilmiştir.

Sonuç olarak kersetin ve monokloropivaloilkersetin' in yüksek dozlarının sorbiniile göre aldoz redüktaz enzimini protein ifadenmesi düzeyinde anlamlı derecede azalttığı gözlemlenmiştir.

Western Blot MAPK yolağı, NFkB nuklear translokasyonu ve proinflamatuvar protein ifadenmeleri ve maddelerin etkisi

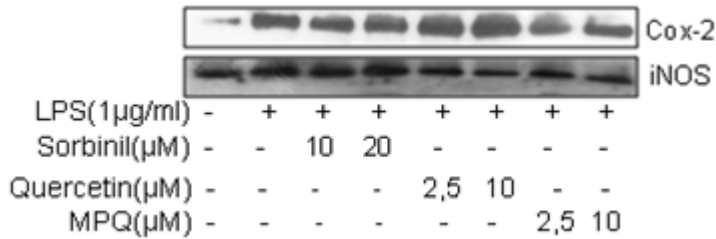
BV-2 fare mikroglia hücrelerinde nöroinflamasyon bakteriyel lipopolisakkarit ile indüklendi. Lipopolisakkarit fetal sığır serumu içermeyen fakat antibiyotik içeren besi yerinde çözdürülmüş ve 1mg/ml stok çözelti hazırlanmıştır.

Hücreler sorbiniil, kesretin ve monokloropivaloilkersetin ile 24 saat inkübasyona bırakılmış takibinde final konsantrasyon 1 μ g/ml LPS ile 6 saat inkübasyona bırakılmıştır. Deney süresi sonunda zemine tutunmuş hücrelerin üzerindeki besi yeri ayrı bir tüpte toplanmıştır. Protein izolasyonu için zemine tutunan hücreler proteaz inhibitör kokteyil içeren RIPA (Radioimmunoprecipitation assay buffer) liziz çözeltisi ile kazanılmıştır. Kazınan hücrelere 15 sn ultrasonikasyon yapılmıştır. Elde edilen stoplazmik fraksiyondaki toplam protein miktarı BCA (bicinchoninic acid) yöntemi ile tayin edilmiştir. Protein örneklerinde MAPK (Mitojenle aktive olan protein kinazlar) proteinleri (Şekil 3.), proinflamatuvar proteinlerin (Siklooksijenaz-2 (Cox-2), indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS)) ifadenme düzeyleri (Şekil 4.) ve NFkB aktivasyonu (Şekil 5.) ölçülmüştür.



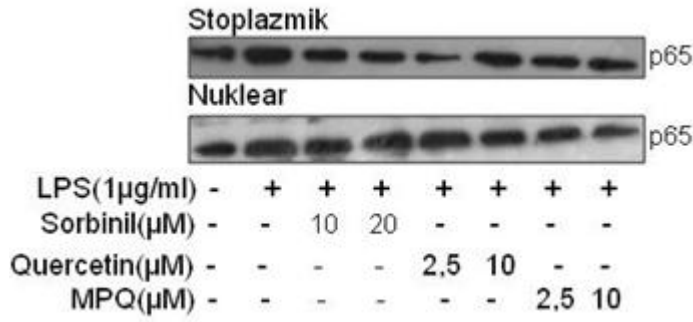
Şekil 3. Bakteriye LPS ile indüklenen nöroinflamasyon modelinde mitojenle aktive olan protein kinazlar üzerine sorbinil, kersetin (Q) ve monokloropivaloilkersetin (MPQ) etkileri

Hücreler 24 saat belirtilen konsantrasyonlarda Sorbinil, Kersetin ve monokloropivaloilkersetin ile inkübasyonu takiben final konsantrasyon 1µg/ml LPS ile 6 saat inkübasyona bırakılmıştır. Lipopolisakkarit uygulaması mitojenle aktive olan JNK (c-Jun N-Terminal kinaz), ERK (Ekstraselüler sinyal ile regüle olan kinaz) ve p38 (p38 mitojenle aktive olan protein kinaz) proteinlerinin fosforilasyon ile aktivasyonunu anlamlı derecede artırmıştır. Özellikle yüksek doz kesretin ve monokloropivaloilkersetin MAPK aktivasyonunu azaltmıştır. Yine sorbinil uygulaması da değişen dozda MAPK aktivasyonunu azaltmıştır.



Şekil 4. Bakteriye LPS ile indüklenen nöroinflamasyon modelinde proinflamatuvar proteinlerin ifadenme düzeyleri üzerine sorbinil, kersetin (Q) ve monokloropivaloilkersetin (MPQ) etkileri.

Hücreler 24 saat belirtilen konsantrasyonlarda Sorbinil, Kersetin ve monokloropivaloilkersetin ile inkübasyonu takiben final konsantrasyon 1µg/ml LPS ile 6 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol grubuna kıyasla LPS uygulanan gruplarda proinflamatuvar proteinlerin ifadenme düzeyleri artmıştır. Monokloropivaloilkersetin cox-2 ifadenme düzeylerini azaltmıştır. iNOS düzeyleri yüksek doz kesretin ve monokloropivaloilkersetin uygulamaları ile azalmıştır.



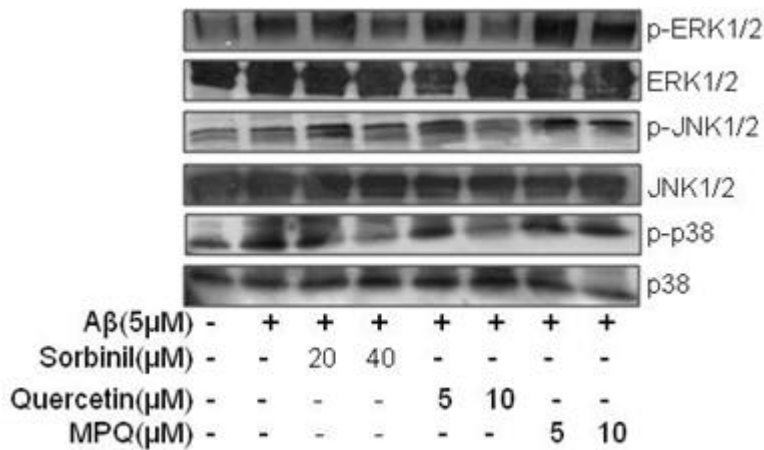
Şekil 5. NFKB aktivasyonu üzerine sorbinil, kersetin (Q) ve monokloropivaloilkersetin (MPQ) etkileri.

LPS uygulaması p65 proteininin stoplazmadan nükleusa traslokasyonunu (NFKB aktivasyonu) artırmıştır. Bununla birlikte monokloropivaloilkersetin uygulaması p65 proteininin nükleusa traslokasyonunu azaltmıştır.

Sonuç olarak aldoz redüktazın protein ifadenme düzeylerini anlamlı derecede azaltan monokloropivaloilkersetin LPS ile indüklenen nöroinflamasyonda koruyucu etkiler göstermiştir.

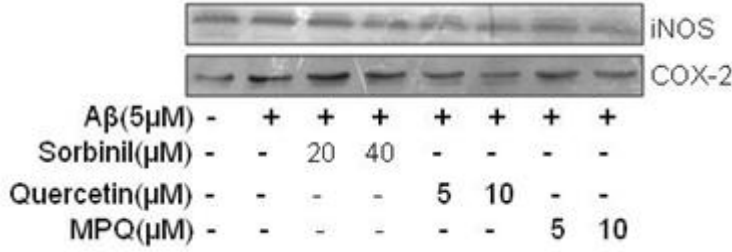
BV-2 fare mikroglia hücrelerinde nöroinflamasyon fibrillar formda amiloid beta peptid ile indüklendi. Amiloid beta peptid öncelikli olarak hekzafloroizopropanol içerisinde çözündü. Sonrasında çözünmüş protein eşit hacimde mikrosantrifüj tüplerine dağıtıldı. Mikrosantrifüj içerisindeki protein çözültisinde çözücünün uzaklaştırılması için tüpler vakumlu desikatörde 30 dakika bekletildi. Proteinler bu hali ile -20 °C de donduruldu. Nöroinflamasyon indüklenmeden 24 saat önce protein dondurucudan çıkarılıp önce dimetilsülfooksit ve 10mM hidroklorik asit içerisinde çözündükten sonra fibrillar formun oluşması için 24 saat 37 °C de bekletildi.

Hücreler 24 saat belirtilen konsantrasyonlarda Sorbinil, Kersetin ve monokloropivaloilkersetin ile inkübasyonu takiben final konsantrasyon 5 µM amiloid beta peptid ile 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Deney sonucunda elde edilen protein örneklerinde MAPK (Mitojenle aktive olan protein kinazlar) proteinleri (Şekil 6.), proinflamatuvar proteinlerin (Siklooksijenaz-2 (Cox-2), indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS)) ifadenme düzeyleri (Şekil 7.) ve NFKB aktivasyonu (Şekil 8.) ölçülmüştür.



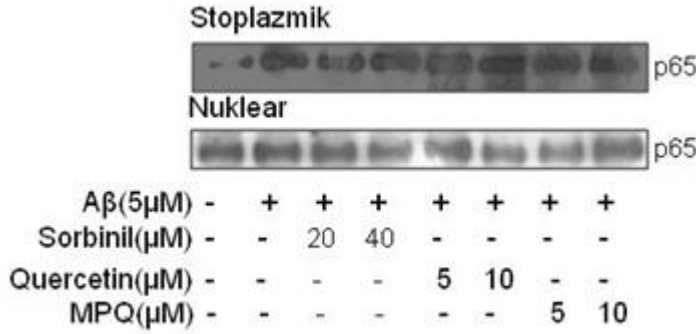
Şekil 6. Fibrilar formda amiloid beta peptit ile indüklenen nöroinflamasyon modelinde mitojenle aktive olan protein kinazlar üzerine sorbinil, kersetin (Q) ve monokloropivaloilkersetin (MPQ) etkileri.

Fibrilar formda amiloid beta peptid (A β) uygulaması mitojenle aktive olan JNK (c-Jun N-Terminal kinaz), ERK (Ekstraselüler sinyal ile regüle olan kinaz) ve p38 (p38 mitojenle aktive olan protein kinaz) proteinlerinin fosforilasyon ile aktivasyonunu anlamlı derecede artırmıştır. Yüksek doz Sorbinil ve yüksek doz kesretin uygulaması MAPK aktivasyonunu önemli derecede azaltmıştır.



Şekil 7. Fibrilar formda amiloid beta peptit ile indüklenen nöroinflamasyon modelinde proinflamatuvar proteinlerin ifadenme düzeyleri üzerine sorbinil, kersetin (Q) ve monokloropivaloilkersetin (MPQ) etkileri.

Kontrol grubuna kıyasla fibrilar amiloid beta peptit uygulanan gruplarda proinflamatuvar proteinlerin ifadenme düzeyleri artmıştır. Kesretin ve yüksek doz monokloropivaloilkersetin uygulaması Cox-2 ifadenme düzeylerini azaltmıştır. iNOS düzeyleri yüksek doz Sorbinil, kesretin ve monokloropivaloilkersetin uygulamaları ile azalmıştır.



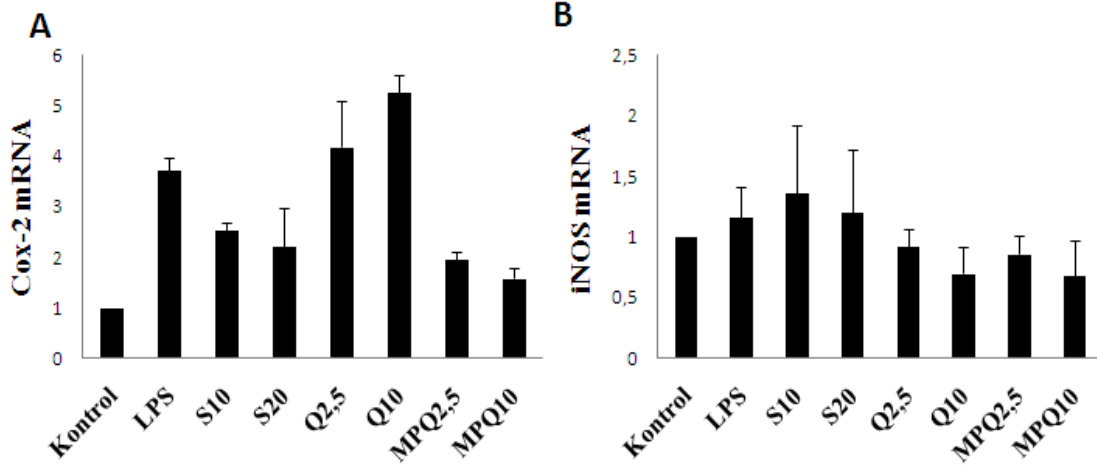
Şekil 8. NFKB aktivasyonu üzerine sorbinil, kersetin (Q) ve monokloropivaloilkersetin (MPQ) etkileri.

Fibrilar amiloid beta peptid uygulaması gerek stoplazmada p65 protein ifadenme düzeylerini gerekse nukleusa p65 traslokasyonunu artırmıştır. Yüksek doz Sorbinil, kesretin ve düşük doz monokloropivaloilkersetin uygulamaları tranlokasyonu azaltmıştır.

Sonuç olarak yüksek doz Sorbinil ve kesretin uygulamaları amiloid beta peptit ile indüklenen nöroinflamasyonda koruyucu etkiler göstermiştir.

RT PCR mRNA analizi

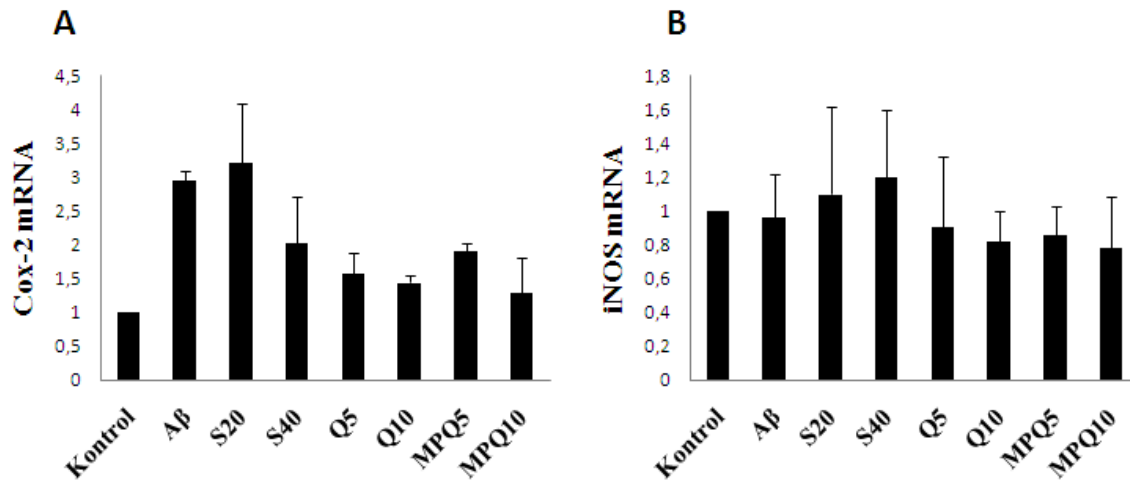
Aldoz redüktaz inhibisyonunun, LPS ile indüklenen inflamasyon üzerine etkileri Cox-2 (Şekil 9A) ve iNOS (Şekil 9B) genlerinin mRNA düzeyinde ifadenme düzeyleri ölçülerek test edildi.



Şekil 9. Bakteriyel LPS ile indüklenen nöroinflamasyon modelinde proinflamatuvar Cox-2 (A) ve iNOS (B) mRNA ifadenme düzeyleri üzerine sorbinil, kersetin (Q) ve monokloropivaloyilkersetin (MPQ) etkileri

1 µg/ml 6 saat LPS uygulaması mikroglial hücrelerde Cox-2 mRNA düzeylerini belirgin düzeylerde artırırken iNOS mRNA ifadenmesinde anlamlı değişime neden olmamıştır. Bununla birlikte Sorbinil Cox-2 mRNA düzeylerini anlamlı derecede azaltırken iNOS düzeylerinde belirgin değişime neden olmamıştır. Kersetin Cox-2 düzeylerini LPS grubuna kıyasla daha da artırırken bu değişim anlamlı değildir. Monokloropivaloyilkersetin uygulaması her iki mediyatörün mRNA ifadenme düzeylerini belirgin düzeyde azaltmıştır.

Aldoz redüktaz inhibisyonunun, amiloid beta peptid ile indüklenen inflamasyon üzerine etkileri Cox-2 (Şekil 10A) ve iNOS (Şekil 10B) genlerinin mRNA düzeyinde ifadenme düzeyleri ölçülerek test edildi.



Şekil 10. Fibrilar formda amiloid beta peptid ile indüklenen nöroinflamasyon modelinde proinflamatuvar Cox-2 (A) ve iNOS (B) mRNA ifadenme düzeyleri üzerine sorbinil, kersetin (Q) ve monokloropivaloyilkersetin (MPQ) etkileri

5 µM 24 saat amiloid beta peptid uygulaması Cox-2 mRNA düzeylerini belirgin düzeylerde artırırken iNOS mRNA ifadenmesinde anlamlı değişime neden olmamıştır. Bununla birlikte yüksek doz Sorbinil

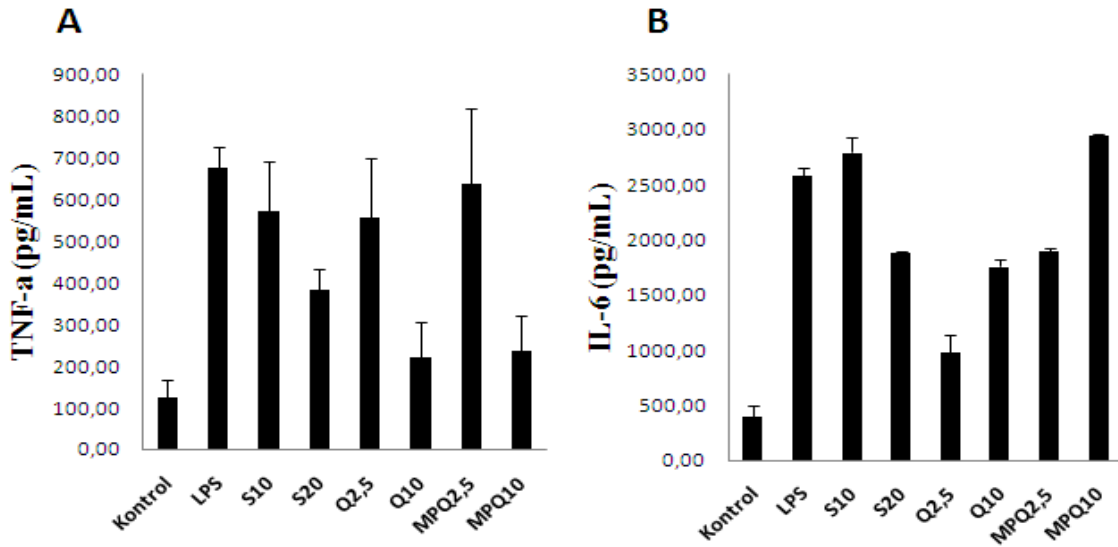
Cox-2 mRNA düzeylerini anlamlı derecede azaltırken, Sorbinil uygulaması iNOS düzeylerinde dikkate değer değışime neden olmamıştır. Kersetin ve monokloropivaloilkersetin ile tedavi edilen hücrelerde proinflamatuvar mediyatörlerin (Cox-2 ve iNOS) düzeyleri etkin biçimde azalmıştır.

ELISA Hücrelerde sitokin üretiminin analizi

Aldoz redüktaz inhibisyonunun, LPS ve Aβ ile indüklenen inflamasyon üzerine etkileri hücrelerden besi yerine salınan sitokin düzeyleri ölçülerek test edildi.

LPS ile indüklenen inflamasyon

Hücreler 24 saat belirtilen konsantrasyonlarda Sorbinil, Kersetin ve monokloropivaloyilkersetin ile inkübasyonu takiben final konsantrasyon 1µg/ml LPS ile 6 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda besi yeri örnekleri toplanmış ve analiz zamanına kadar – 80 °C de saklanmıştır. Analiz besi yeri örneklerinde TNF-a (Şekil 11 A) ve IL-6 Şekil 11 B) düzeyleri için ELISA yöntemi kullanılarak yapılmıştır.



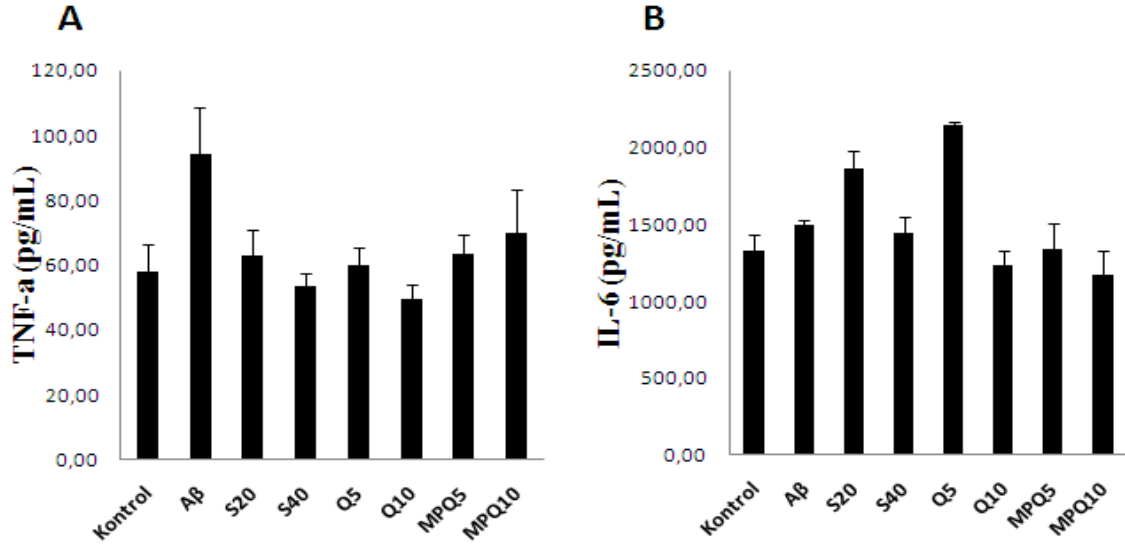
Şekil 11. Bakteriye LPS ile indüklenen nöroinflamasyon modelinde hücrelerde üretilen TNF-a (A) ve IL-6 (B) sitokinleri üzerine sorbinil, kersetin (Q) ve monokloropivaloyilkersetin (MPQ) etkileri

1µg/ml 6 saat LPS uygulaması mikroglial hücrelerde TNF-a ve IL-6 üretimini dramatik düzeylerde artırmıştır. Bununla birlikte Sorbinil uygulaması yüksek dozda, her iki sitokin düzeylerini belirgin düzeylerde azaltmıştır. Kersetinle tedavi yüksek dozda TNF-a düzeylerini azaltırken düşük doz uygulama ise IL-6 düzeylerini belirgin düzeylerde azaltmıştır. Monokloropivaloilkersetin ile tedavi yüksek dozda TNF-a düzeylerini azaltırken düşük doz uygulama ise IL-6 düzeylerini belirgin düzeylerde azaltmıştır.

Aβ ile indüklenen inflamasyon

Hücreler 24 saat belirtilen konsantrasyonlarda Sorbinil, Kersetin ve monokloropivaloyilkersetin ile inkübasyonu takiben final konsantrasyon 5 µmol/L Aβ ile 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda besi yeri örnekleri toplanmış ve analiz zamanına kadar – 80 °C de saklanmıştır.

Analiz besi yeri örneklerinde TNF-a (Şekil 12 A) ve IL-6 (Şekil 12B) düzeyleri için ELISA yöntemi kullanılarak yapılmıştır.



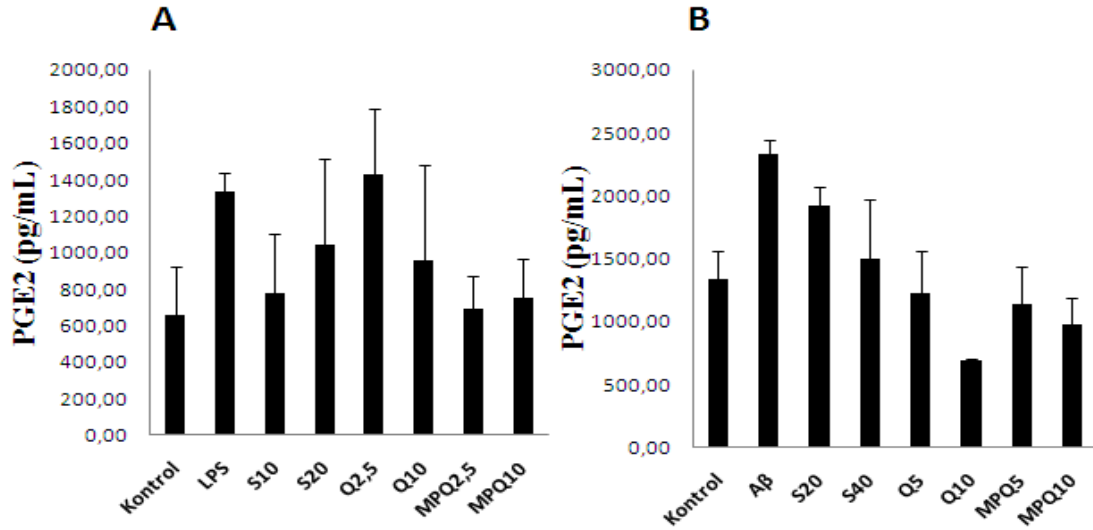
Şekil 12. Fibrillar formda amiloid beta peptid ile indüklenen nöroinflamasyon modelinde hücrelerde üretilen TNF-a (A) ve IL-6 (B) sitokinleri üzerine sorbinil, kersetin (Q) ve monokloropivaloyilkersetin (MPQ) etkileri

5 µM 24 saat amiloid beta peptid uygulaması TNF-a düzeylerini anlamlı düzeylerde artırırken IL-6 düzeyleri amiloid beta peptid uygulamasında etkilenmemiştir. Sorbinil, kersetin ve monokloropivaloyilkersetin uygulamaları amiloid beta peptid uygulaması ile artan TNF-a düzeylerini belirgin düzeylerde azaltmıştır. IL-6 beklenenin dışında IL-6 düzeylerini anlamlı derecede artırmıştır.

ELISA Hücrelerde ProstaglandinE2 (PGE2) üretiminin analizi

Aldoz redüktaz inhibisyonunun, LPS ve Aβ ile indüklenen nöroinflamasyon üzerine etkileri hücrelerden besi yerine salınan PGE2 düzeyleri ölçülerek test edildi.

Hücreler 24 saat belirtilen konsantrasyonlarda Sorbinil, Kersetin ve monokloropivaloyilkersetin ile inkübasyonu takiben final konsantrasyon 1µg/ml LPS ile 6 saat inkübasyon (LPS ile indüklenen nöroinflamasyon) veya 5 µM amiloid beta peptid 24 saat (Aβ ile indüklenen nöroinflamasyon) inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonunda besi yeri örnekleri toplanmış ve analiz zamanına kadar – 80 °C de saklanmıştır. Analiz besi yeri örneklerinde ProstaglandinE2 düzeyleri için ELISA yöntemi kullanılarak yapılmıştır (Şekil 13).

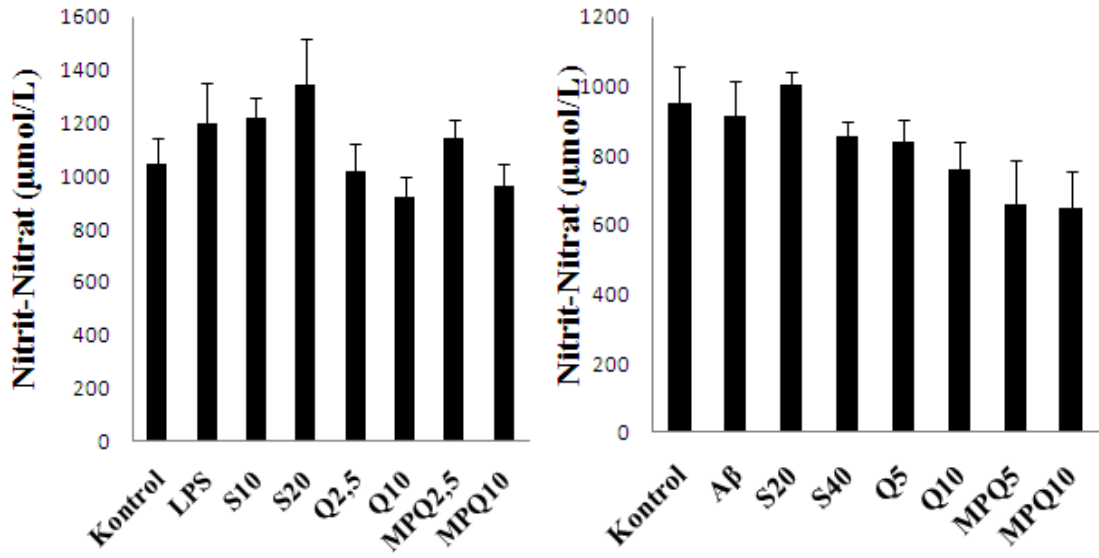


Şekil 13. Bakteriye LPS (A) ve Fibrillar formda amiloid beta peptid (B) ile indüklenen nöroinflamasyon modelinde hücrelerde üretilen PGE2 düzeyleri üzerine sorbinil, kesretin (Q) ve monokloropivaloyilkersetin (MPQ) etkileri

1 µg/ml 6 saat LPS uygulaması ve 5 µM 24 saat amiloid beta peptid uygulaması mikroglial hücrelerde siklooksijenaz enzim ürünü PGE2 düzeylerini belirgin düzeyde artırmıştır. Düşük doz Sorbinil LPS modelinde PGE2 üretimini anlamlı azaltırken, Yüksek doz Sorbinil Aβ ile indüklenen nöroinflamasyon modelinde PGE2 üretimini belirgin azaltmıştır. LPS modelinde kesretin tedavisi PGE2 üretimi üzerine etkili değilken monokloropivaloyilkersetin uygulaması PGE2 üretimini azaltmıştır. Yine Aβ ile indüklenen nöroinflamasyon modelinde kesretin ve monokloropivaloyilkersetin uygulamaları PGE2 üretimini anlamlı derecede azaltmıştır.

Nitrik oksit analizi Griess metodu

Aldoz redüktaz inhibisyonunun, LPS ve Aβ ile indüklenen nöroinflamasyon üzerine etkileri hücrelerden besi yerine salınan Nitrik oksit düzeyleri ölçülerek test edildi. Hücreler 24 saat belirtilen konsantrasyonlarda Sorbinil, Kesretin ve monokloropivaloyilkersetin ile inkübasyonu takiben final konsantrasyon 1µg/ml LPS ile 6 saat inkübasyon (LPS ile indüklenen nöroinflamasyon) veya 5 µM amiloid beta peptid 24 saat (Aβ ile indüklenen nöroinflamasyon) inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda besi yeri örnekleri toplanmış ve analiz zamanına kadar – 80 °C de saklanmıştır. Analiz besi yeri örneklerinde Nitrik oksit düzeyleri için Griess yöntemi kullanılarak yapılmıştır (Şekil 14).

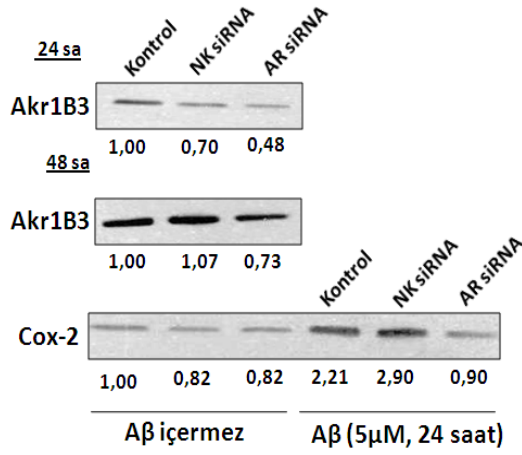


Şekil 14. Bakteriyel LPS (A) ve Fibrilar formda amiloid beta peptit (B) ile indüklenen nöroinflamasyon modelinde hücrelerde üretilen Nitrik oksit (Nitrit-Nitrat) düzeyleri üzerine sorbinil, kersetin (Q) ve monokloropivaloyilkersetin (MPQ) etkileri

1 µg/ml 6 saat LPS uygulaması ve 5 µM 24 saat amiloid beta peptid uygulaması mikroglial hücrelerde nitrik oksit üretimini belirgin düzeyde artırmamıştır. Bununla birlikte kesretin ve monokloropivaloilkersetin tedavileri besi yerine salınan nitrit nitrat düzeylerini azaltmıştır.

Transfeksiyon siRNA Aldoz redüktaz inhibisyonu

Mikroglial hücrelerde spesifik sentetik siRNA (ARsiRNA) (small interference RNA) kullanılarak Aldoz redüktaz (Akr1B3) mRNA' sı ortadan kaldırılmış ve hücrelerde amiloid beta peptid uygulanmıştır. Genin susturulması (inhibisyonu) için 24 (Şekil 15A) ve 48 (Şekil 15B) saatlik siRNA inkübasyon süreleri kullanılarak ideal süre yakalanmaya çalışılmıştır. Deneyde hücrede ifadelenen tüm mRNA dizilerine bağlanma yeteneği olmayan dizi (siRNA) negatif kontrol (NKsiRNA) olarak kullanılmıştır. Böylece aldoz redüktazı kısmen ifadeleyen hücrelerde amiloid beta peptid uygulamasının nöroinflamasyon üzerine etkileri Cox-2 protein ifadenme düzeyleri ölçülerek test edildi (Şekil 15C).

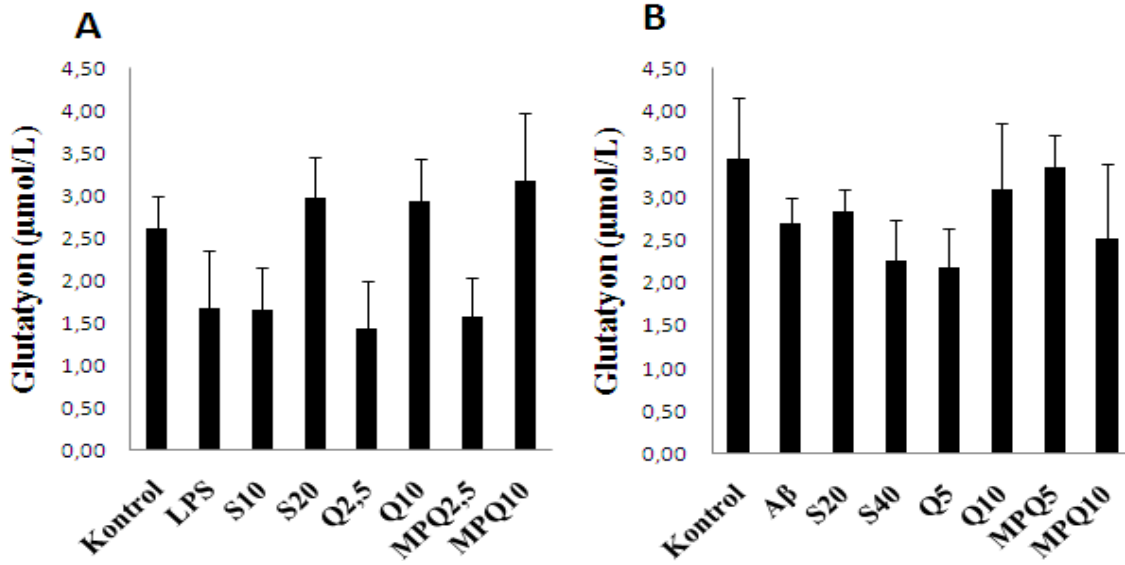


Şekil 15. 24 saat AR siRNA ve NK siRNA transfeksiyonu sonrası AKR1B3 inhibisyonu (A), 48 saat AR siRNA ve NK siRNA transfeksiyonu sonrası AKR1B3 inhibisyonu (B), 24 saat AR siRNA ve NK siRNA ile transfekte edildikten sonra amiloid beta peptit ile nöroinflamatuvar indüksiyon yapılan hücrelerde AKR1B3 inhibisyonu (C)

Deney sonuçlarına göre transfeksiyon için ideal süre 24 saat (yaklaşık % 52 inhibisyon) olarak belirlenmiştir. Aldoz redüktaz inhibe edilmiş hücrelerde amiloid beta peptit uygulaması Cox-2 düzeylerini anlamlı derecede azaltmıştır. Bu sonuç aldoz redüktaz inhibisyonunun, amiloid beta peptit ile indüklenen nöroinflamatuvar süreçte koruyucu etkisini göstermektedir. LPS ile indüklenen nöroinflamasyonda siRNA ile inhibisyon hücre ölümünü dramatik olarak artırmıştır. Bu kapsamda hücrelerde her ne kadar süre ve transfeksiyon reaktifinin miktarı değiştirilerek defalarca deneme yapılsa da bu deney modeli optimize edilememiştir. Ayrıca interferans RNA yöntemi ile Aldoz redüktaz inhibe hücrelerde LPS ile indüklenen nöroinflamasyon modeli daha önce Zeng ve arkadaşları (7) tarafından yayınlanmıştır.

Glutasyon analizi

Aldoz redüktaz inhibisyonunun, LPS ve Aβ ile indüklenen nöroinflamasyon üzerine etkileri hücrelerde üretilen antioksidan glutasyon düzeyleri ölçülerek test edildi. Hücreler 24 saat belirtilen konsantrasyonlarda Sorbinil, Kersetin ve monokloropivaloyilkersetin ile inkübasyonu takiben final konsantrasyon 1µg/ml LPS ile 6 saat inkübasyon (LPS ile indüklenen nöroinflamasyon) veya 5 µM amiloid beta peptid 24 saat (Aβ ile indüklenen nöroinflamasyon) inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücreler homojenize edildi ve analiz zamanına kadar – 80 °C de saklanmıştır. Analiz hücre homojenatlarında glutasyon düzeyleri için ticari kit kullanılarak yapılmıştır (Şekil 16).



Şekil 16. Bakteriyel LPS (A) ve Fibrillar formda amiloid beta peptid (B) ile indüklenen nöroinflamasyon modelinde hücrelerde üretilen Glutasyon düzeyleri üzerine sorbinil, kesretin (Q) ve monokloropivaloyilkesretin (MPQ) etkileri

1µg/ml 6 saat LPS uygulaması mikroglial hücrelerde glutasyon üretimini belirgin düzeylerde azaltmıştır. Bununla birlikte LPS ile azalan glutasyon düzeyleri yüksek doz Sorbinil kesretin ve monokloropivaloilkresetin tedavisi ile anlamlı düzeyde artmıştır.

5 µM 24 saat amiloid beta peptid uygulaması glutasyon düzeylerini azaltmıştır ancak bu azalış istatistiksel olarak anlam ifade etmemektedir. Bununla birlikte amiloid beta peptid uygulaması ile azalan glutasyon düzeyleri kesretin ve monokloropivaloilkresetin tedavileri ile artmıştır ancak bu artış sadece düşük doz monokloropivaloilkresetin tedavili grupta anlamlıdır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Mikroglial hücreler merkezi sinir sisteminin makrofaj hücreleridir. Kan kökenli bu hücreler erişkin yaşamda normalde beyin dokusunda inaktif durumlarını sürdürmektedir (1). İnflamatuvar olaylarda aktive olan mikrogliaların fagositoz ve antijen sunma özellikleri artmakla, salgıladığı sitokinler, kemokinler, reaktif oksijen/nitrojen radikalleri ve arasonik asid metabolitleri aracılığıyla immün yanıtta katılmaktadır (3). Fakat nörodejeneratif hastalıkların birçoğunun patolojik sürecinde mikroglial aktivasyon bu ürünler aracılığıyla nöron hasarına katılmakta ya da en azından nöron hasarını arttırmaktadır. Nörodejeneratif hastalıklarda mikroglial aktivasyon sonucu gelişen bu sürecin hastalığın patogenezinde primer mi, yoksa sekonder bir olay mı olduğu henüz kesinlik kazanmamıştır. Alzheimer (AH) patogenezinde sorumlu tutulan amiloid-beta peptidin mikroglial aktivasyonun güçlü uyarıcılarından biri olduğu bilinmektedir. Sekonder ya da primer olsun yine de mikroglial aktivasyon sürecini baskılayamaya yönelik tedavi yaklaşımları AH'da en azından hastalığın ilerlemesini yavaşlatabilir.

Bu çalışmada mikroglial hücrelerde aldoz redüktaz inhibisyonunun anti-inflamatuvar etkileri saptandı. Çalışmamızda potent aldoz redüktaz inhibitörü olan Sorbinil ile birlikte flavonoid kesretin ve sentetik monoklorokerstin' in aldoz redüktaz ifadenmesini üzerine etkileri test edildi. Kesretin ve özellikle

monokloropivaloilkersetin uygulaması sorbinile kıyasla önemli derecede aldoz redüktaz ifadenmesini baskılamıştır. Bu kapsamda bu maddelerin MAPK yolağı, NFkB aktivasyonu, sitokin salınımı, prostoglandin E2 üretimi ve proinflamatuvar proteinler Cox-2 ve iNOS üzerine olan etkileri test edilerek anti-inflamatuvar potansiyelleri ortaya konulmaya çalışıldı. Öncelikli olarak Sorbinil kesretin ve monokloropivaloilkersetin için sitotoksik olmayan tedavi dozları sitotoksiste deneyi MTT testi ile ölçüldü ve Sorbinil için 10-40 µM, kesretin ve monokloropivaloilkersetin için 2,5-10 µM dozların uygunluğu gösterildi. Bu dozlarda ön tedavi yapılan hücrelerde lipopolisakkarit ve ve amiloid beta peptit ile inflamatuvar süreç tetiklendi. Lipopolisakkarit ile inflamasyonun tetiklendiği hücrelerde aldoz redüktaz inhibitörleri (Sorbinil, kesretin ve monopivaloilkersetin) hücre içi MAPK sinyal yolunda c-JUN-N-terminal kinaz (JNK), ekstraselüler sinyal ile regüle kinaz (ERK) ve ve p38 mitojenle aktive edilen protein kinaz (p38 MAPK) aktivasyonunu baskılamıştır. Bu durum beraberinde proinflamatuvar sitokinlerin (TNF-a ve IL-6) hücrelerde üretimini de baskılamıştır. Aynı tedavi protokolü sitoplazmik p65 ifadenme düzeylerini ve p65' in nükleer translokasyonunu azaltmıştır. Bu durum NFkB ile aktive olan proinflamatuvar genler Cox-2 ve iNOS düzeylerinde de azalışa neden olmuştur. Ayrıca aldoz redüktaz inhibisyonu hücrelerde prostoglandin sentezini azaltarak anti-inflamatuvar etki göstermiştir. Bununla birlikte LPS uygulaması mikroglial hücrelerde iNOS/NO düzeylerinde anlamlı değişime neden olmamıştır. Bu durum uygulanan LPS miktarı ve inkübasyon süresi ile ilişkili olabilir. Ancak kesretin ve monokloropivaloil kesretin uygulaması iNOS/NO aksını baskılamıştır. Daha önceki yapılan bir çalışmada aldoz redüktaz inhibisyonunun gerek siRNA transfeksiyonu ile susturulması gerekse farmakolojik inhibisyonunun ((5-formilfuran-2-il) metil 4 hidroksi-2-metilenbütanoat ile inhibisyon) lipopolisakkarit ile tetiklenen nöroinflamasyonda fosfolipaz c/proteinkinaz C bağımlı NFkB ve MAPK inhibisyonuna neden olarak anti-inflamatuvar etkisi gösterilmiştir (7). Yine bir başka çalışmada aldoz redüktaz inhibisyonu sipinal hasar sonrası mikroglial hücrelerde polarizasyonu etkilemiştir. Bu çalışmada aldoz redüktaz inhibisyonu NFkB aracılı aktive olan proinflamatuvar genleri baskılamış (M1 fenotip) bununla birlikte siklik adenosin monofosfat (cAMP) cevap element bağlanma proteini (cAMP Response Element-Binding Protein, CEREB) üzerinde anti-inflamatuvar gen aktivasyonu (M2 fenotip) sağlayarak mikroglial polarizasyonu etkilemiştir (30). Sistemik makrofajlarda (RAW264.7) aldoz redüktazın gerek farmakolojik gerekse siRNA aracılı inhibisyonu hücrelerde TNF-α, IL-1β, IL-6, makrofaj-kemoatraktan protein (MCP)-1, siklooksijenaz-2 ve prostoglandin E2 biyosentezini baskılamıştır (5). Aldoz redüktaz inhibisyonunun inflamatuvar süreçte tedaviye yönelik koruyucu etkileri bu çalışmalarla sınırlı olmamakla birlikte, endotoksin ile uyarılmış retinal mikroglia hücrelerinde aldoz redüktaz' ın gerek trasfektif susturulması gerekse farmakolojik inhibisyonu inflamasyonun baskılanmasında olumlu etkiler göstermiştir (31). Tüm bu çalışmaların sonuçları göz önünde tutulduğunda, bizim çalışmamızın sonuçlarının önceki çalışmalarla uyum içersinde olduğu dikkat çekmektedir. Yaptığımız literatür taraması çalışmasına göre amiloid beta peptit ile indüklenen inflamatuvar süreç üzerine aldoz redüktaz inhibisyonunun etkilerini gösterir çalışmaya rastlanmamıştır. Biz çalışmamızda fibrilar formda amiloid beta peptit ile indüklenen inflamatuvar süreç üzerine gerek farmakolojik gerekse siRNA aracılı aldoz redüktaz inhibisyonunun etkilerini gösterdik. Bu kapsamda amiloid beta peptit' in fibrilar formu Dahlgren ve arkadaşlarının metoduna uygun hazırlamıştır. Fibrilar amiloid beta peptit hücrelerde ERK/p38/MAPK sinyal yolunu aktive etmiştir. p65 sitoplazmik

ifadelenme düzeyleri fibrilar amiloid beta peptit uygulaması ile artarken p65 proteininin nüklear traslokasyonunu etkilememiştir. Ayrıca fibrilar amiloid beta peptit uygulaması inflamatuvar süreçte oldukça etkin Cox-2/PGE2 aktivasyonunu ve proinflamatuvar sitokin TNF-a üretimini artırarak mikrogliyal hücrelerde nöroinflamasyonu tetiklemiştir. siRNA transfeksiyonu ile aldoz redüktazın geçişi inhibisyonu hücrelerde amiloid beta peptit uygulaması ile aktive olan Cox-2 ifadelenme düzeylerini azaltmıştır. Bu sonuç amiloid beta peptit ile tetiklenen nöroinflamatuvar süreçte aldoz redüktaz inhibisyonunun koruyucu etkisini ortaya koymuştur. Yine çalışmamızda özellikle Sorbinil ve kesretin ile aldoz redüktaz inhibisyonu ERK/p38/MAPK sinyal yolunu baskılayarak, hücrelerde COX-2/PGE2 aktivasyonunu azaltmıştır. Buna ilave olarak proinflamatuvar sitokin üretimini de azaltarak anti-inflamatuvar etki göstermiştir.

Tüm bu sonuçlar ışığında aldoz redüktaz inhibisyonu inflamatuvar sürecin düzenlenmesinde etkin bir tedavi stratejisi olabilir.

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından desteklenmiştir.

6. KAYNAKLAR

1. Benveniste EN, Nguyen VT, O'Kecfe GM. Immunological aspects of microglia: relevance to Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 2001; 39:381-391.
2. Rogers J, Mastroeni D, Leonard B, Joyce J, Grover A. Neuroinflammation in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: are microglia pathogenic in either disorder? *Int Rev Neurobiol.* 2007; 82:235-46.
3. Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strohmeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2000; 21:383-421.
4. Bhattacharya S, Manna P, Gachhui R, Sil PC. D-saccharic acid 1,4-lactone protects diabetic rat kidney by ameliorating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via NF- κ B and PKC signaling. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013; 267:16-29.
5. Ramana KV, Fadl AA, Tammali R, Reddy AB, Chopra AK, Srivastava SK. Aldose reductase mediates the lipopolysaccharide-induced release of inflammatory mediators in RAW264.7 murine macrophages. *J Biol Chem.* 2006; 281:33019-29.
6. Zhang Q, Bian G, Chen P, Liu L, Yu C, Liu F, Xue Q, Chung SK, Song B, Ju G, Wang J. Aldose Reductase Regulates Microglia/Macrophages Polarization Through the cAMP Response Element-Binding Protein After Spinal Cord Injury in Mice. *Mol Neurobiol.* 2014 Dec 19.

7. Zeng KW, Li J, Dong X, Wang YH, Ma ZZ, Jiang Y, Jin HW, Tu PF. Anti-neuroinflammatory efficacy of the aldose reductase inhibitor FMHM via phospholipase C/protein kinase C-dependent NF- κ B and MAPK pathways. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013; 273:159-71.
8. Lawson L.J, Perry V.H, Dri P, Gordon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain *Neuroscience*, 39 (1990), pp. 151–170
9. Kettenmann H, Hanisch U.K, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia *Physiol. Rev.*, 91 (2011), pp. 461–553
10. Kreutzberg G.W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS *Trends Neurosci* (1996), pp. 312–31
11. Smith JA, Das A, Ray SK, Banik NL. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Res Bull.* 2012; 87:10-20.
12. Dheen S.T, Kaur C, Ling E.A. Microglial activation and its implications in the brain diseases *Curr. Med. Chem.* (2007), pp. 1189–1197.
13. Nakajima K, Kohsaka S. Microglia: activation and their significance in the central nervous system. *J Biochem.* 2001;130:169-75.
14. Streit WJ, Mrak RE, Griffin WS. Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *J Neuroinflammation.* 2004;1:14.
15. Meda L, Cassatella MA, Szendrei GI, Otvos L Jr, Baron P, Villalba M, Ferrari D, Rossi F. Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature.* 1995; 374:647-50.
16. Roe CM, Rentz DM. Alzheimer disease: Before the diagnosis. *Neurology.* 2013; 80:e148-9.
17. Joachim C. L. and Selkoe D. J. "The seminal role of β -amyloid in the pathogenesis of Alzheimer disease," *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, vol. 6, no. 1, pp. 7–34, 1992.
18. Swardfager W, Lanctôt K, Rothenburg L, Wong A, Cappell J, Herrmann N. A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry.* 2010; 68:930-41.
19. Rogers J, Lue LF. Microglial chemotaxis, activation, and phagocytosis of amyloid beta-peptide as linked phenomena in Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 2001; 39:333-40.
20. Lue LF, Rydel R, Brigham EF, Yang LB, Hampel H, Murphy GM Jr, Brachova L, Yan SD, Walker DG, Shen Y, Rogers J. Inflammatory repertoire of Alzheimer's disease and nondemented elderly microglia in vitro. *Glia.* 2001; 35:72-9
21. Griffin WS, Sheng JG, Roberts GW, Mrak RE. Interleukin-1 expression in different plaque types in Alzheimer's disease: significance in plaque evolution. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1995; 54:276-81.
22. Hüll M, Berger M, Volk B, Bauer J. Occurrence of interleukin-6 in cortical plaques of Alzheimer's disease patients may precede transformation of diffuse into neuritic plaques. *Ann N Y Acad Sci.* 1996; 777:205-12.
23. Rubio-Perez J. M., Morillas-Ruiz J. M. A review: inflammatory process in Alzheimer's Disease, Role of cytokines. *ScientificWorldJournal.* 2012doi: 10,1100/2012/756357

24. Hsieh HL, Yang CM. Role of redox signaling in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *Biomed Res Int*. 2013; 2013:484613.
25. Srivastava S, Chandra A, Bhatnagar A, Srivastava SK, Ansari NH. Lipid peroxidation product, 4-hydroxynonenal and its conjugate with GSH are excellent substrates of bovine lens aldose reductase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995; 217(3):741-6.
26. Srivastava SK, Ramana KV, Bhatnagar A. Role of aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options. *Endocr Rev*. 2005; 26:380-92.
27. Dajas F. Life or death: neuroprotective and anticancer effects of quercetin. *J Ethnopharmacol*. 2012;143:383-96.
28. Guo Y, Bruno RS. Endogenous and exogenous mediators of quercetin bioavailability. *J Nutr Biochem* 2015; 26: 201-210.
29. Veverka M, Gallovic J, Svaidlenka E, Veverkova E, Pronavova N, Milackova I, Stefek M. Novel quercetin derivatives: synthesis and screening for anti-oxidant activity and aldose reductase inhibition. *Chemical Papers* 2013; 67: 76–83.
30. Zhang Q, Bian G, Chen P, Liu L, Yu C, Liu F, Xue Q, Chung SK, Song B, Ju G, Wang J. Aldose Reductase Regulates Microglia/Macrophages Polarization Through the cAMP Response Element-Binding Protein After Spinal Cord Injury in Mice. *Mol Neurobiol*. 2014 Dec 19.
31. Chang KC, Ponder J, Labarbera DV, Petrash JM. Aldose reductase inhibition prevents endotoxin-induced inflammatory responses in retinal microglia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014; 55:2853-61.