

Dr. Şemin GENÇ¹
Dr. Mustafa AKHİSAROĞLU²
Dr. Kürşad GENÇ²

* Bu araştırma Geriatrici Dergisi'nin 2001 yılı "EN İYİ
ARAŞTIRMA" yarışmasını kazanmıştır.

ÖZET

Eritropoetin (Epo), stroke, Parkinsonizm gibi akut ve kronik merkezi sinir sistemi hastalıklarının deneysel modellerinde tedavi edici etkinliği son yıllarda gösterilmiş bir sitokin-hormondur. Bu maddenin serum ya da büyüme faktörü yoksunluğu, kainik asit ya da glutamat ile indüklenen nörotoksosite, hipoksi gibi in vitro nöron hasarı modellerinde nöronları koruyucu etkisi de saptanmıştır. Bu çalışmada Epo'in PC12 hücre hattı kültürlerinde amiloid-beta peptid ile oluşturulan hücre hasarını önleyici etkisinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır. Deneyselde sıçan feokromositoma PC12 hücre hattı hücreleri kullanıldı. Ekimin ertesi günü kültürler 0.1-1.0 U/ml arasında değişen konsantrasyonlarda rekombinan insan ya da fare Epo eklendi. Bir sonraki gün ise kültür ortamlarına 1-10 mM arası konsantrasyonlarda amiloid-beta peptidin 25-35, 1-40, 40-1 ve 1-42 fragmanları konuldu. Amiloid beta peptid fragmanlarıyla 48 ya da 72 saat enkübasyonun ardından hücre canlılığı MTT testiyle, sitotoksosite LDH testiyle değerlendirildi. Apoptotik hücre ölümünü değerlendirmek amacıyla apostain ve DAPI nükleus boyaması yapıldı. Bu çalışmanın sonuçları Epo'in in vitro kültür ortamında amiloid beta peptid fragmanları ile oluşturulan hücre hasarını doza bağımlı olarak önlediğini gösterdi. Apostain boyaması Epo'in apoptotik hücre ölümünü azalttığını ortaya koydu. Amiloid-beta peptid Alzheimer hastalığının patogenezinde rolü olduğu düşünülen toksik bir ajandır. Bu maddenin PC12 hücreleri üzerine toksik etkisi daha önceki çalışmalarla gösterilmiştir. Çalışmamızın sonuçları Epo'in bu toksik etkiyi apoptotik süreci inhibe ederek kısmen ön-leyebildiğini göstermektedir ve bu ajanın kronik nörodejeneratif süreçlerin tedavisinde kullanılabileceğini düşündürmektedir. **Anahtar Sözcükler:** Eritropoetin, Amiloid-beta peptid, PC12 hücre hattı, Apoptoz, Nörotoksosite.

ARAŞTIRMA

* ERİTROPOETİN'İN PC12 HÜCRE HATTINDA AMİLOİD-BETA PEPTİD İLE OLUŞTURULAN NÖROTOKSİTEYE KARŞI KORUYUCU ETKİSİ THE PROTECTIVE EFFECT OF ERYTHROPOIETIN AGAINST NEU- ROTOXICITY INDUCED BY AMYLOID-BETA PEPTIDE IN PC12 CELL LINE

ABSTRACT

Erythropoietin (Epo) is a cytokine-hormone that has been shown to be therapeutic in experimental models of acute and chronic central nervous system disorders such as stroke, Parkinsonism. The neuroprotective effect of this agent has also been determined in in vitro neuronal injury models such as serum or growth factor deprivation, kainic acid or glutamate-induced neurotoxicity, and hypoxia. In this study, it was aimed that whether Epo has inhibitory effect on cell injury induced by amyloid-beta peptide in PC12 cell line cultures. Rat pheochromocytoma PC12 cell line was used in experiments. The day after seeding recombinant human or murine Epo was added to cultures at varying concentration of 0.1-1.0 U/ml. Next day 25-35, 1-40, 40-1 ve 1-42 fragments of amyloid-beta peptide was added at a concentration of 1-10 mM. After 48 or 72 hours incubation cell viability was evaluated by 3-(4, 5-dimethylthiazol-2yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and cytotoxicity was determined by lactic dehydrogenase (LDH) test. Apostain and DAPI nucleus staining was performed to evaluate apoptotic cell death. The results of this study showed that Epo inhibits cell injury induced by amyloid-beta peptide fragments in vitro in a dose dependent manner. Apostain staining showed that Epo decreases apoptotic cell death. Amyloid-beta peptide is a toxic agent that has been implicated in the pathogenesis of Alzheimer's disease. The in vitro toxic effect of this agent has been shown in recent studies. The results of our study shows that Epo partially prevents this toxic effect by inhibiting apoptotic process and might be used in the treatment of chronic neurodegenerative processes.

Key Words: Erythropoietin, Amyloid-beta peptide. PC12 cell line, Apoptosis, Neurotoxicity.

Geliş: 15/10/2001

Kabul: 15/12/2001

¹ Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, fizyoloji Anabilim Dalı

İletişim: Dr. Şemin GENÇ, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İnciraltı, 35340, İzmir
Tel: 0 (232) 259 59 59/4604

Fax: 0 (232) 259 05 41

e-mail: sermingenc@hotmail.com

GERİATRİ 2002, CİLT: 5, SAYI: 1, SAYFA: 1

GİRİŞ

Alzheimer Hastalığı (AH), demansın en sık görülen biçimidir ve beyin dokusunda çok sayıda nöritik plakların ve nörofibriler yumakların bulunmasıyla karakterize, progressif bir nörodejene-ratif hastalıktır. Nöritik plaklar amiloid prekürsör proteinin prote-oliz ürünü olan amiloid-beta peptidin birikimiyle oluşmaktadır.²⁰ Amiloid-beta peptidin 1-40, 25-35 ve 1-42 arasındaki aminoasid-lerde n oluşan fragmanlarının nöronlar üzerine toksik etki gösterdiği in vitro ve in vivo çalışmalarla gösterilmiştir.^{1,10,13,19,20} Amiloid-beta peptidin nöronal ölüme yol açma mekanizmalarının oksidatif stresi artırması, apoptotik hücre ölümünü indüklemesi ve hücre içi kalsiyum dengesini destabilize etmesi olduğu düşünülmektedir.²⁰ Bugün için tedavisi henüz bilinmeyen AH'nın tedavisinde bu mekanizmalar üzerine etkili ajanlar yarar gösterebilir. Bu tip deneysel tedavi araştırmalarında in vitro nöronal hücrelerde amiloid-beta peptid ile oluşturulan nörotoksosite modeli yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu aday tedavi ajanlardan biri de eritro-poetin (Epo) olabilir.

Epo, sinir sisteminde varlığı ve nöroprotektif etkisi son yıllarda gösterilmiş olan hemalo-poetik bir sitokin-hormondur.¹¹ Epo ve reseptörü hem merkezi, hem de periferik sinir sisteminde bulunmakta ve hipoksi gibi uyarımlarla ekspresyonları artmaktadır.^{8,11,16} Değişik in vitro çalışmalarda^{21,27} değişik nöron gruplarında nörotrofik etkisi ve çeşitli hasar modellerinde in vitro koruyucu etkisi gösterilmiş olan Epo'in, in vivo stroke, nöroinflamasyon, beyin travması, subaraknoid kanama, deneysel epilepsi ve Parkinsonizm gibi deneysel modellerde de nöronları koruyucu etkisi belirlenmiştir.^{3,5-7,15,23-25} Epo'nun nöroprotektif etkisinin mekanizmaları kesin belli değildir. Hücre canlılığını artırıcı sinyalleri modüle edici^{4,8,12,25} anti-apoptotik,^{24,25} anti-oksidan²⁵ anti-inflamatuvar²⁵ ve kalsiyum^{2,18} ve glutamat metabolizmaları^{22,24} üzerine modüle edici etkileri nöroprotektif etkisine aracılık ediyor olabilir. Fimbria-forniks bağlantısı kesilen erişkin sıçanlarda Epo'in septal kolinerjik nöronların canlılığını arttırdığı saptanmıştır.¹⁷ Bu bulgu kolinerjik nöron kaybının bulunduğu AH'nın tedavisinde Epo'in yararlı olabileceğini düşündürmektedir. Fakat bugüne kadar Epo'in in vitro amiloid-beta peptid ile oluşturulan nörotoksositeye karşı koruyucu etkisinin bulunup bulunmadığı araştırılmamıştır. Bu çalışmada PC12 sıçan feokromositoma hücre hattı kültürlerinde değişik amiloid-beta peptid fragmanlarıyla in vitro oluşturulan nörotoksositeye karşı Epo'in koruyucu etkisinin bulunup bulunmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Kimyasallar

Amiloid-beta peptid fragmanları (25-35, 1-40,40-1 ve 1-42), 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), isopropranolol ve formamid Sigma firmasından; laktik dehidrogenaz (LDH) sitotoksosite kiti, sıçan kuyruk kollajeni ve

rekombinan fare Epo Roche firmasından; insan rekombinan Epo Cilag firmasından; Apostain antikorunu Alexis firmasından; flore -san konjuge anti-fare IgM monoklonal antikorunu Caltag firmasından; yağsız süt tozu Nestle firmasından; DAPI-antifade Oncor firmasından; RPMI 1640 kültür ortamı. L-glutamin, penisilin ve streptomisin Biochrom KG firmasından; kültür kapları Greiner firmasından sağlandı.

PC12 Hücre Kültürü

PC12 hücre hattı Dr. Ying Wu'dan (Fransa) sağlandı. Deneysel bu hücre hattının 10-30 arasındaki pasajları kullanıldı. Deneysel kullanılan 6 ve 96 hokkalık kültür plakları ve 25 cm'lik kültür flakları hücrelerin ekiminden önce tutunmayı arttırmak amacıyla sıçan kuyruk kollajeni ile kaplandı. Kollajen % 2'lik asetik asid ile çözüldü ve kültür kaplarına 10 mg/ml konsantrasyonda eklenerek yayıldı. Bir saatlik bir enkübasyon süresinin ardından PC12 hücreleri kültür kaplarına 1×10^5 hücre/ cm^2 yoğunluğunda ekildi. Kültür ortamı olarak % 10 oranında ısıyla inaktive edilmiş fetal inek serumu, % 5 oranında ısıyla inaktive edilmiş fetal inek serumu, % 1 oranında L-glutamin, 100 U/ml penisilin ve 100 mg/ml streptomisin içeren RPMI 1640 ortamı kullanıldı. Ekim sonrası kültürler % 5 karbondioksitli nemli hava içeren $37^\circ C$ sıcaklıkta enküböre konuldu.

İn Vitro Deneysel

Hücre ekiminden 24 saat sonra kültür ortamları % 2 oranında at serumu ve % 1 oranında fetal inek serumu içeren kültür ortamı ile değiştirildi ve bazı kültürlerle rekombinan insan ya da fare Epo 0, 1-1.0 U/ml konsantrasyonlarda eklendi. Rekombinan fare Epo kullanım öncesi distile su ile sulandırıldı. Epo eklenmesinden 24 saat sonra bazı kültürlerle 1, 0-10, 0 m M arasında değişen konsantrasyonlarda amiloid-beta peptid fragmanları eklendi. Amiloid-beta peptid 25-35 fragmanı distile su ile sulandırıldıktan sonra doğrudan kullanıldı. 1-40, 40-1 ve 1-42 fragmanları ise literatürde önerilen in vitro yaşlandırma protokolü uygulandıktan sonra kullanıldı. Bu amaçla peptid fragmanları distile su ile sulandırıldıktan sonra $37^\circ C$ sıcaklıkta 5 gün süreyle enkübe edildi. Bu işlem peptid fragmanlarının agregasyonuna yol açmaktadır ve agregasyon toksik etkilerini arttırmaktadır. Peptid fragmanlarının eklenmesinden sonra kültürler karbondioksit enküböründe 48-72 saat süreyle enkübe edildi ve bu sürenin sonunda örnekler hücre canlılığı, hücre ölümü ve apoptotik hücre ölümü açısından değerlendirildi. Her in vitro deney farklı pasajdan hücrelerle ve aynı koşullarda en az üç kez bağımsız olarak tekrarlandı.

MTT Testi

MTT yöntemi ile bir hücre topluluğundaki canlı hücreler kolorimetrik ve kantitatif olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem sağlam mitokondrianın MTT boyasının tetrazolium halkasını par-

çalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır.²¹100 mg MTT 10 ml hacimde PBS içinde çözülerek % 0. 5'lik stok MTT solüsyonu steril ve karanlık koşullarda hazırlandı ve 0. 22 mm filtre ile süzüldü. Enkübasyon süresinin sonunda 96 hokkalık kültür plağının her hokkasına steril ve karanlık koşullarda 50 ml hacimde % 0. 5'lik MTT solüsyonu eklendi. Kültürler 37°C sıcaklıkta 4 saat süreyle tutuldu. Kültür plağı plak rotoru kullanılarak 1250 rpm hızda 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Formazan kristallerini solubilize duruma getirmek için önceden hazırlanmış solubilizasyon solüsyonu 100 ml/hokka hacimde eklendi. Bu solüsyon isopropanol içinde hazırlanmış 0. 04 N HCl solüsyonundan oluşmaktadır. Kültür plağı ELISA plak okuyucusuna konularak absorbans değerleri 595 nm dalga boyunda okutuldu. Referans dalga boyu olarak 655 nm dalga boyu kullanıldı. Hiçbir madde eklenmeyen kontrol kültürlerinden elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması alınarak bu değer % 100 kabul edildi. Madde eklenmiş olan kültürlerden elde edilen absorbans değerleri kontrol absorbans değerine oranlandı ve onun yüzdesi olarak gösterildi.

LDH Testi

Bu yöntemin ilkesi ölü hücrelerden açığa çıkan LDH miktarının kolorimetrik saptanmasıdır." Enkübasyon süresinin ardından kültür kaplarından süpernatant'lar toplanarak ELISA plağına aktarıldı. Her bir süpernatant örneğinden 100'er ml hacimde örnek 96 hokkalık ELISA plağına aktarıldı. Her bir hokkaya 100 ml hacimde LDH reaksiyon karışımı eklendi. ELISA okuyucusuna yerleştirilen plaktan 492 nm dalga boyunda okutma yapıldı. Referans dalga boyu olarak 620 nm seçildi. Her bir hokkaya ait absorbans değerleri yazdırıldı. Bulunan değerlerden background absorbans değeri çıkarılarak her kültür koşuluna ait LDH salınımını gösteren absorbans değerleri elde edildi. Örnekler alındıktan sonra kültür plağı santrifüj edildi. Süpernatant alınarak her hokkaya 100 ml hacimde % 1'lik Triton-X100 solüsyonu eklendi. Bir saat süreyle oda sıcaklığında enkübasyon sonunda her bir hokkadan alınan 100'er ml hacimde örnek ile LDH testi tekrarlandı ve her kültür koşuluna ait hücre içi LDH miktarını gösteren absorbans değerleri elde edildi. Her bir kültür koşulu için hücre ölümü yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı- [LDH salınımına ait absorbans değeri / (LDH salınımına ait absorbans değeri + hücre içi LDH miktarına ait absorbans değeri)] x 100.

Apostain İmmünfloresan Boyaması

Apoptotik hücre ölümünü saptamak için kullanılan bu yöntemin ilkesi apoptotik hücrelerdeki DNA'nın ısıyla denatürasyona duyarlılığının artışına dayanmaktadır.¹⁴ Bu yöntemde DNA, formamidin varlığında ısıyla denatüre edilmekte ve tek sarmallı DNA'ya spesifik monoklonal apostain antikoruyla boyanmaktadır. İn vitro deneyler tamamlandıktan sonra 6 hokkalık kültür

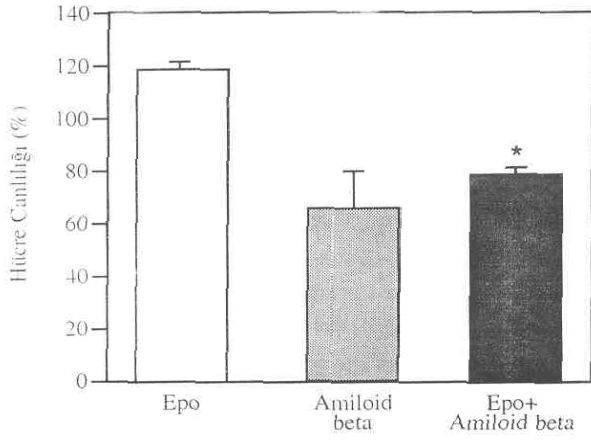
plaklarında bulunan hücreler pipetleme yöntemiyle kültür plaklarından kaldırılarak santrifüj tüplerine aktarıldı ve fosfatlı tampon solüsyonu ile yıkandı. Hücre süspansiyonları oda sıcaklığında 5 dakika süreyle ve 1200 rpm hızda santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak pellet 1 ml soğuk fosfatlı tampon solüsyonu ile resüspende edildi. Hücre süspansiyonları vortekste karıştırılırken yavaşça 6 ml soğuk (-20°C sıcaklıkta) metanol eklendi. Bu örnekler metanol içinde 16 saat süreyle ve -20°C sıcaklıkta tutularak fikse edildi. Ertesi gün hücre süspansiyonları santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırılarak pellet 0. 25 ml hacimde ve distile su ile sulandırılan % 50'lik formamid ile resüspende edildi ve örnekler oda sıcaklığında 5 dakika tutuldu. Tüpler daha sonra 75°C sıcaklığa getirilmiş su banyosunda 10 dakika tutuldu. Ardından formamid içeren tüplere 2 ml % 3'lük yağ içermeyen ve distile su ile çözülmüş ve fosfatlı tampon solüsyonu ile sulandırılmış yağsız süt tozu eklendi. Vortekste karıştırılan örnekler 15 dakika süreyle oda sıcaklığında tutuldu. Yağsız süt tozu non-spesifik boyanmayı önlemek için kullanılmaktadır. Örnekler tekrar santrifüje edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet 100 ml/örnek hacimde apostain antikoruyla resüspende edildi. Negatif kontrol örneklerine bu antikor eklenmedi. 15 dakika süreyle oda sıcaklığında enkübasyon yapıldı. Antikor solüsyonu hazırlamak için 1 ml hacimde ve 100 mg antikora PBS ile sulandırılan % 1'lik -süt tozu süspansiyonundan 9 ml eklendi. Enkübasyon işlemi sonunda Örnekler 1 ml fosfatlı tampon solüsyonu eklendi. Santrifüj aşamasından sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet 100 ml/Örnek hacimde FITC konjuge keçi-anti fare sekonder antikoruyla resüspende edildi. 15 dakika oda sıcaklığında enkübasyon yapıldı. Sekonder antikor da PBS ile sulandırılan % 1'lik süt tozu süspansiyonu ile dilüe edilmektedir. Enkübasyon işlemi sonunda örnekler 1 ml fosfatlı tampon solüsyonu eklendi. Santrifüj aşamasından sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet fosfatlı tampon solüsyonu ile resüspende edildi. Floresan mikroskopi incelemesi için hücre süspansiyonları cytospin aygıtıyla lam üzerine yayıldı. Ardından lamaların üzerine nukleus boyası DAPI-anti-fade eklenerek lamel kapatıldı. Floresan mikroskopi incelemesinde FITC florokromu için yeşil FITC filtresi, DAPI incelemesinde ise UV filtresi kullanıldı. İncelenen her lamelin en az beş ayrı bölgesinde en az 100 hücre 200 x büyütmeyle kültür koşullarına kör bir araştırmacı tarafından sayılarak ortalama apoplotik hücre yüzdesi belirlendi.

İstatistiksel Analiz

Gruplara ait ortalama hücre canlılığı, hücre ölümü ve apoptotik hücre yüzde değerleri Students' t testi kullanılarak karşılaştırıldı. İstatistiksel analizde SPSS 8.0 istatistik programı kullanıldı. Sonuçlar ortalama ± ortalamanın standart hatası biçiminde gösterildi. 0. 05'den küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Bu çalışmada daha önceki yayınların bulgularıyla uyumlu olarak amiloid-beta peptidin çeşitli fragmanlarının PC12 hücrelerine karşı doza bağımlı in vitro toksik etki gösterdiği hücre canlılığı testi MTT ile saptandı (Şekil 1-2). Sonuçları Şekil 1 'de verilen örnek deneyde PC12 hücreleri 0.5 U/ml insan Epo ile 24 saat enkübasyonun ardından amiloid-beta peptidin 1-42 fragmanı ile (10 mM) 48 saat enkübe edilmiştir. MTT testi amiloid-beta peptid 1-42 fragmanının hücre canlılığında % 50'yi aşan bir azalmaya yol açtığını göstermektedir (54.3 ± 11.7). Yalnız Epo'in PC12 hücreleri üzerine anlamlı bir proliferatif etkisi görülmemektedir (16.2 ± 1.9). PC12 hücrelerinin önceden Epo ile enkübasyonu hücre ölümünü anlamlı olarak azaltmaktadır (77.7 ± 2.7; p= 0.03).

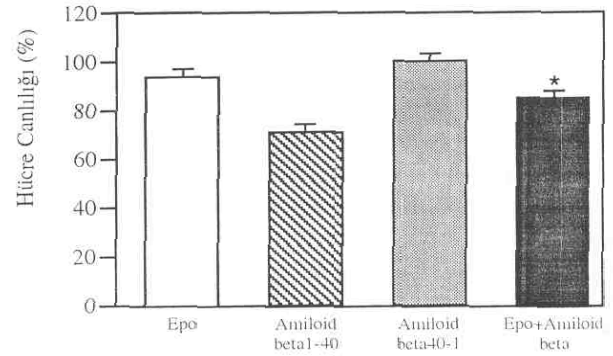


Şekil-1: 0.5 U/ml insan Epo'in PC12 hücrelerini 10 mM amiloid-beta peptid 1-42 fragmanı ile indüklenen hücre ölümüne karşı koruyucu etkisi (* p = 0.03).

Toksik etkinin spesifikliğini göstermek amacıyla bazı deneylere ters peptid fragmanları eklendi ve bu fragmanların toksik etki göstermediği bulundu (Şekil 2). Şekil 2'de sonuçları gösterilen örnek deneyde PC12 hücreleri 0.5 U/ml insan Epo ile 24 saat enkübasyonun ardından amiloid-beta peptidin 1-40 fragmanı ile (1 mM) 72 saat enkübe edilmiştir. MTT testi amiloid-beta peptid 1-40 fragmanının uygulanan dozda hücre canlılığında % 30'a yaklaşan bir azalmaya yol açtığını göstermektedir (72.2 ± 3.2). Ters 40-1 peptid fragmanı ise hücre ölümüne yol açmamıştır (101.7 ± 1.7). Tek başına Epo uygulamasının PC12 hücreleri üzerine anlamlı bir proliferatif etkisi görülmemektedir (98.3 ± 4.0). PC 12 hücrelerinin önceden Epo ile enkübasyonu hücre ölümünü anlamlı olarak azaltmaktadır (83.3 ± 3.2; p= 0.04).

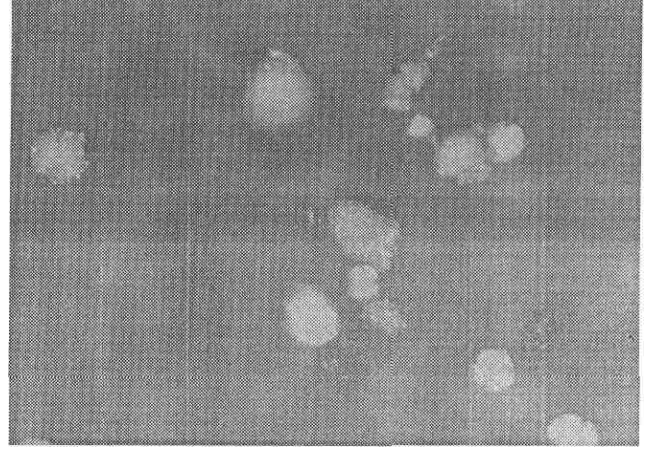
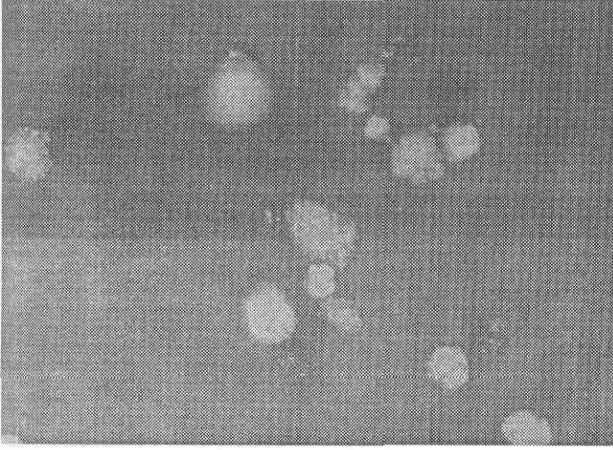
Epo'in amiloid-beta peptid toksisitesine karşı koruyucu etkisi doza bağımlı bir etki olarak gözükmemektedir. Şekil 3'de sonuçları gösterilen örnek deneyde PC12 hücreleri 0.1, 0.5 ve 1.0 U/ml fa-

re Epo ile 24 saat enkübasyonun ardından amiloid-beta peptidin 25-35 fragmanı ile (10 mM) 72 saat süreyle enkübe edilmiştir. LDH testi amiloid-beta peptid 25-35 fragmanının hücre canlılığında % 70'i aşan bir azalmaya yol açtığını göstermektedir (71.8 ± 1.5). PC12 hücrelerinin önceden Epo ile enkübasyonu hücre ölümünü anlamlı olarak ve doza bağımlı bir biçimde azaltmaktadır (0.1 U/ml Epo için 51.4 ± 2.9, p= 0.01; 0.5 U/ml Epo için 48.5 ± 1.2, p = 0.001; 1.0 U/ml Epo için 47.2 ± 2.2, p = 0.001). Çeşitli in vitro deney sistemlerinde Epo'in anti-apoptotik etkisi daha önceden bildirildiği için bu çalışmada amiloid-beta peptid toksisitesine karşı koruyucu etkisinin mekanizmalarından birinin apoptotik süreçlerin baskılanması olup olmadığını araştırmak amacıyla Apostain immünfloresan incelemesi yapıldı. Bu deneylerin sonuçları amiloid-beta peptidin PC12 hücrelerinde apoptotik



Şekil-2: 0.5 U/ml insan Epo'in PC12 hücrelerini 1 mM amiloid-beta peptid 1-40 fragmanı ile indüklenen hücre ölümüne karşı koruyucu etkisi (* p = 0.04).

hücre ölümünü indüklediğini ve Epo'in bu tip hücre ölümüne karşı tam koruma sağladığını gösterdi. Şekil 4'de sonuçları sunulan örnek deneyde PC12 hücreleri 0.5 U/ml insan Epo ile 24 saat enkübasyonun ardından amiloid-beta peptidin 1-40 fragmanı ile (1 mM) 72 saat süreyle enkübe edilmiştir. Apostain immünfloresan boyama incelemesiyle yapılan nicel değerlendirme kontrol değeriyle (2.0 ± 0.4) karşılaştırıldığında amiloid-beta peptid 1-40 fragmanının apoptotik hücre ölümünü anlamlı bir düzeyde indüklediğini göstermektedir (34.3 ± 1.7; kontrole göre p = 0.002). Ters 40-1 peptid fragmanı ise anlamlı apoptoza yol açmamaktadır (2.5 ± 0.5). PC12 hücrelerinin önceden Epo ile enkübasyonu tek başına amiloid-beta peptid grubuyla (34.3 ± 1.7) karşılaştırıldığında apoptotik hücre ölümünü anlamlı bir biçimde azaltmaktadır (3.0 ± 0.4; p= 0.003). Aynı deneye ait immünfloresan boyama görüntüsü Resim 1'de verilmiştir.



Resim-1: *Apostain immünfloresan boyaması sonrası yapılan floresan mikroskopi incelemesinde bütün hücre çekirdekleri DAPI boyasıyla mavi görüntü vermektedir. Apostain pozitif boyanan (yeşil) hücreler apoptotiktir. Tek başına amiloid beta peptidini kullandığı kültürdekine (A) oranla Epo ön uygulamasının apostain pozitif boyanan hücre oranını belirgin azalttığı görülmektedir (B). Görüntüler 200 x büyütmeyle elde edilmiştir.*

TARTIŞMA

Bu çalışmada daha önceki yayınların bulgularıyla uyumlu olarak amiloid-beta peptidini çeşitli fragmanlarının PC12 hücrelerine karşı in vitro toksik etki gösterdiği MTT ve LDH testleriyle ile saptanmıştır (Şekil 1-3).²⁰ MTT testi sonuçlarına göre Epo'in tek başına uygulanması belirgin bir proliferasyona yol açmadığı için çalışmamızda proliferasyona bağlı bir relatif hücre canlılığı artışı söz konusu değildir. Apostain immünfloresan incelemesi amiloid-beta peptidini fragmanlarının PC12 hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü indüklediğini göstermektedir (Şekil 4, Resim 1). Benzeri etkiye işaret eden daha önceki yayınlardan²⁰ farklı olarak bu çalışmada apoptoza spesifik bir antikoru olan apostain antikoru kullanılmıştır. Bu yöntemin kullanılması spesifik olarak yalnızca apoptotik hücrelerin boyanmasını sağlamak ve apoptozu nekrozdan kesin olarak ayırmaktadır.¹⁴ TUNEL gibi yalnız apoptoza spesifik olmadığı gösterilmiş olan yöntemlerin kullanımı apoptotik hücre ölümü oranının yanlış belirlenmesine ve anti-apoptotik ajanların etkinliğinin değerlendirilmesinde güçlükler yol açabilir.⁹

Epo'in amiloid-beta nörotoksitesine karşı in vitro koruyucu etkisi ortaya ilk kez bu çalışmada ortaya konmuştur. Bu etki doza bağımlı bir etkidir ve optimum Epo konsantrasyonu 0.5-1 U/ml olarak gözükmektedir. Glutamat gibi başka toksik ajanların kullanıldığı çalışmalarda da optimum Epo konsantrasyonu benzerdir ve daha yüksek dozlar ile koruyucu etkide bir artış gözlenmemiştir.^{22,24} Bu bulgu Epo reseptör down-regülasyonu ile açıklanmaya

çalışılmıştır.²⁴

Amiloid-beta nörotoksitesinde apoptotik hücre ölümü, oksidatif stres, kalsiyum dengesinin bozulması, nitrik oksid ve glutamat aracılı toksisite gibi çoğul mekanizmaların rol oynadığı düşü-

nülmektedir.²⁰ Epo bütün bu mekanizmalar üzerine etki göstererek amiloid-beta nörotoksitesine karşı koruyucu etki gösteriyor olabilir. Bu çalışmada Epo'in amiloid-beta ile indüklenen apoptotik hücre ölümünü önlediği gösterilmiştir (Şekil 4, Resim 1). Fakat Epo'in diğer mekanizmalar üzerinden de etki söz konusu olabilir ve bu hipotezi sınavacak çalışmalar da yapılmalıdır.

Daha önceki bir çalışmada fimbria-forniks bağlantısının kesilmesiyle oluşturulan sıçan modelinde Epo kullanımının koliner-jik nöronlar üzerine nörotrofik etki gösterdiği bildirilmiştir.¹⁷ Bu model AH'nın birebir in vivo modeli olmamakla birlikte Epo'in in vivo ve in vitro değişik nöron gruplarında gösterilmiş olan nörotrofik etkisi de amiloid-beta toksitesine karşı koruyucu etkisine katkıda bulunabilir. Bu hipotezi sınavmak amacıyla diferansiye edilmiş PC12 hücre kültürlerinin kullanıldığı çalışmamız sürmektedir. Bu çalışmada kullanılan PC12 hücreleri nöronal hücre özellikleri göstermektedir. Fakat bu deneylerin primer nöron kültürlerinde tekrarlanacağı çalışmaların da yapılması gereklidir.

Epo uzun yıllardır kronik anemi tedavisinde güvenle kullanılan ve yan etkileri az bir ajandır. Son yıllarda değişik nörolojik hastalık modellerinde etkinliğinin gösterilmesinin yanısıra yüksek dozlarının sistemik uygulandığında kan-beyin bariyerini de geçtiği kanıtlanmıştır.⁵ Çalışmamızın sonuçları bu ajanın in vivo deneysel AH modellerinde ve AH tedavisinde denenebileceğini ve yararlı sonuçlar verebileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Alvarez XA, Miguel-Hidalgo JJ, Fernandez-Novoa L, Cacabelos R, Intrahippocampal injections of the beta-amyloid 1-28 fragment induces behavioral deficits in rats.

- Methods Find Exp Clin Pharmacol, 1997; 19(7):471-479.
2. Assandri R, Egger M, Gassmann M, Niggli E, Bauer C, Forster I, Gorchach A. Erythropoietin modulates intracellular calcium in human neuroblastoma cell line. *J Physiol*. 1999;516:343-352.
 3. Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow and Metab*. 1999; 19(6):643-651.
 4. Bittorf T, Buchse T, Sasse T, Jaster R, Brock J, Activation of the transcription factor NF- κ B by the erythropoietin receptor. Structural requirements and biological significance. *Cell Signal*. 2001; 13(9):673-681.
 5. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lancrol-le NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A, Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97(19):10526-10531.
 6. Buemi M, Grasso G, Corica F, Calapai G, Salpietro FM, Casuscelli T, Sfacteria A, Aloisi C, Alafaci C, Sturiale A, Frisina N, Tomasello F, in vivo evidence that erythropoietin has a neuroprotective effect during subarachnoid hemorrhage. *Eur J Pharmacol*, 2000; 392(1-2):31-34.
 7. Calapai G, Marciano MC, Corica F, Allegra A, Farisi A, Frisina N, Caputi AP, Buemi M. Erythropoietin protects against brain ischemic injury by inhibition of nitric oxide formation. *Eur J Pharmacol*. 2000; 401(3):349-356.
 8. Campana WM, Myers RR, Erythropoietin and erythropoietin receptors in the peripheral nervous system: changes after nerve injury. *FASEB J*. 2001; 15(10): 1804-1806.
 9. Charriaut-Marlangue C, Ben-Ari J, A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. *Neuroreport*, 1995; 7(1):61-64.
 10. Chen SY, Harding JW, Barnes CD. Neuropathology of synthetic beta-amyloid peptide analogs in vivo. *Brain Res*. 1996; 715(1-2):44-50.
 11. Dame C, Juui SE, Christensen RD, The biology of erythropoietin in the central nervous system and its neurotrophic and neuroprotective potential. *Biol Neonate*, 2001; 79(3-4):228-235.
 12. Digicaylioglu M, Lipton SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF- κ B signalling cascades. *Nature*. 2001; 412(6847):641-647.
 13. Emre M, Geula C, Ransil BJ, Mesulam MM. The acute neurotoxicity and effects upon cholinergic axons of intracerebrally injected beta-amyloid in the rat brain. *Neurobiol Aging*. 1992; 13(5):553-559.
 14. Frankfurt OS, Krishan A. Identification of apoptotic cells by formamide induced DNA denaturation in situ. *J Histochem Cytochem*, 2001; 49(3):369-378.
 15. Gene S, Kuralay F, Gene K, Akhisaroglu M, Fadiloglu S, Yorukoglu K, Fadiloglu M, Güre A. Erythropoietin exerts neuroprotection in 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-treated C57/BL mice via increasing nitric oxide production. *Neurosci Lett*, 2001; 298(2):139-141.
 16. Juui S, Anderson DK, Li Y, Christensen RD, Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system. *Pediatr Res*, 1998; 43(1):40-49.
 17. Konishi Y, Chui DH, Hirose H, Kunishita T, Tabira T. Trophic effect of erythropoietin and other hematopoietic factors on central cholinergic neurons in vitro and in vivo. *Brain Res*. 1993; 609(1-2):29-35.
 18. Koshimura K, Murakami Y, Sohmiya M, Tanaka J, Kato Y. Effect of erythropoietin on neuronal activity. *J Neurochem*, 1999; 72(6):2565-2572.
 19. Kowall NW, McKee AC, Yankner BA, Bcal MF, in vivo neurotoxicity of beta-amyloid [β (1-40)] and the beta 25-35 fragment. *Neurobiol Aging*, 1992; 13(5):537-542.
 20. Mattson MP. Cellular actions of β -amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev*, 1997; 77:1081-1132.
 21. McGahon AJ, Martin SJ, Bissonnette RP, Mahboubi A, Shi Y, Mogil RJ, Nishioka WK, Green DR: The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro, Schwartz LM, Osborne BA (Ed.): *Methods in Cell Biology, Cell Death*. Academic Press. San Diego, 1995; Cilt 46.s 150-181.
 22. Morishita E, Masuda S, Nagao M, Yasuda Y, Sasaki R. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience*. 1997; 76(1):105-116.
 23. Sadamoto Y, Igase K, Sakanaka M, Sato K, Otsuka H, Sasaki S, Masuda S, Sasaki R. Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998; 253(1):26-32.
 24. Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, Masuda S, Morishita E, Nagao M, Sasaki R. in vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998; 95(8):4635-4640.
 25. Siren A-L, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewezuk P, Keenan S, Gleiter C, Pasquali C, Capobianco A, Mennini T, Heumann R, Cerami A, Ehrenreich (H, Ghezzi P, Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001; 98(7):4044-4049.

1

1