

# Alzheimer Hastalığının Önlenmesi ve Tedavisinde Melatoninin TRPA1 Kanalları Üzerinden Potansiyel Etkileri

## Potential Effects of Melatonin on TRPA1 Channels in the Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease

Ahmet ÖZŞİMŞEK<sup>1</sup>, İshak Suat ÖVEY<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı, Antalya, Türkiye

<sup>2</sup>Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Antalya, Türkiye

### ÖZ

**Amaç:** Alzheimer hastalığı (AH) demansın en yaygın nedenidir ve ilerleyici bir nörodejeneratif hastalık olarak tanımlanır. AH ilerleyici bozukluğunun ana klinik özellikleri öğrenme ve hafıza kaybıdır. Çeşitli çalışmalar mitokondrinin AH patogeneğinde kritik bir rol oynadığını göstermiştir. Bu çalışmada, Alzheimer hastalığının in vitro bir modelini oluşturarak melatoninin nöroblastom hücrelerinde mitokondriye bağımlı TRPA1 iyon kanalları üzerindeki etkisini araştırdık.

**Yöntem:** Bir AH modeli oluşturmak için SH-SY5Y (insan nöroblastom hücre dizisi) hücrelerine okadaik asit uygulandı. Hücreler farklılaşma sonrası yedi ana grup (Grup 1 (Kontrol), Grup 2 (Mel+AH), Grup 3 (Mel+AH+AP18), Grup 4 (AH), Grup 5 (AH+AP18), Grup 6 (AH+Mel) ve Grup 7 (AH+Mel+AP18)) oluşturuldu ve melatoninin nöroblastom hücrelerinde kalsiyuma bağımlı TRPA1 kanalları üzerindeki etkisi incelenerek in vitro Alzheimer hastalığı belirlendi.

**Bulgular:** Kontrol grubuna göre melatonin+AH, AH ve AH+melatonin gruplarında  $Ca^{2+}$  konsantrasyonu daha yüksekti ( $p<0,001$ ). Ancak Mel+AH+AP18, AH+Mel+AP18 ve kontrol arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu. Melatonin+AH ve AH+melatonin gruplarında  $Ca^{2+}$  düzeylerinin AH grubuna göre daha düşük olduğunu belirledik ( $p<0,001$  ve  $p<0,05$ ). Ayrıca sitozolik  $Ca^{2+}$  konsantrasyonları melatonin+AH grubunda AH+melatonin

grubuna göre daha düşük bulundu ( $p<0,05$ ). Apoptoz ve oksidatif stres düzeylerini değerlendirirken, melatonin+AH, AH ve AH+melatonin gruplarında apoptoz ve hücre içi ROS değerlerinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu bulduk ( $p<0,001$ ). Bu doğrultuda melatonin+AH, AH ve AH+melatonin gruplarında mitokondriyal depolarizasyon ve kaspaz 3 ve kaspaz 9 düzeyleri kontrol grubuna göre daha yüksekti ( $p<0,001$ ). Ayrıca mitokondriyal depolarizasyon, kaspaz 3 ve kaspaz 9 değerleri AH grubunda melatonin+AH ve AH+melatonin gruplarına göre daha yüksek ( $p<0,001$ ), mitokondriyal depolarizasyon ve kaspaz 3 düzeyleri melatonin+AH grubunda AH+melatonin grubundan daha düşüktü ( $p<0,001$ ). Ancak aynı gruplarda kaspaz 9 sonuçlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu. Ayrıca kaspaz 9 değerleri melatonin+AH grubu, AH grubu ve AH+melatonin gruplarında sırasıyla melatonin+AH+AP18, AH+AP18 ve AH+melatonin+AP18 gruplarına göre daha düşüktü ( $p<0,001$  ve  $p<0,05$ ).

**Sonuç:** Sonuçlarımız melatoninin, TRPA1 kanalları aracılığıyla sitozolik  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunu, apoptozu ve hücre içi ROS'u azaltarak Alzheimer hastalığının tedavisinde ve profilaksisinde etkili bir seçenek olabileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** TRPA1, Alzheimer hastalığı, melatonin, nöroblastom hücreleri, apoptosis

### ABSTRACT

**Introduction:** Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia and is defined as a progressive neurodegenerative disease. Main clinical features of AD are progressive impairment in learning and memory loss. Several studies have indicated that mitochondria play a critical role in the pathogenesis of AD. In this study, we investigated the effect of melatonin on mitochondria-dependent TRPA1 ion channels in neuroblastoma cells by creating an in vitro model of Alzheimer's disease.

**Methods:** Okadaic acid was applied to SH-SY5Y (human neuroblastoma cell line) cells to create an AD model. After cellular differentiation, the following 7 main groups were created: Group 1 (Control), Group 2 (Mel+AD), Group 3 (Mel+AD+AP18), Group 4 (AD), Group 5 (AD+AP18), Group 6 (AD+Mel), and Group 7 (AD+Mel+AP18), and Alzheimer's disease was determined in vitro by examining the effect of melatonin on calcium-dependent TRPA1 channels in neuroblastoma cells.

**Results:** The  $Ca^{2+}$  concentration was greater in the melatonin+AD, AD and AD+melatonin groups than in the control ( $p<0,001$ ). However, there was no statistically significant difference between Mel+AD+AP18, AD+Mel+AP18 and the control. We determined that  $Ca^{2+}$  levels were lower in the melatonin+AD and AD+melatonin groups than in the AD group ( $p<0,001$  and  $p<0,05$ ). Additionally, cytosolic  $Ca^{2+}$  concentrations were found to be

lower in the melatonin+AD group than in the AD+melatonin group ( $p<0,05$ ). In evaluating the apoptosis and oxidative stress levels, we found that the apoptosis and intracellular ROS values were higher in the melatonin+AD, AD and AD+melatonin groups than in the control ( $p<0,001$ ). In this respect, the mitochondrial depolarization and caspase-3 and caspase-9 levels were higher in the melatonin+AD, AD and AD+melatonin groups than in the control group ( $p<0,001$ ). Additionally, the mitochondrial depolarization, caspase-3 and caspase-9 values were higher in the AD group than in the melatonin+AD and AD+melatonin groups ( $p<0,001$ ), while mitochondrial depolarization and caspase-3 levels were lower in the melatonin+AD group than in the AD+melatonin group ( $p<0,001$ ). However, in the same groups, there was no statistically significant difference in caspase-9 results. Additionally, the caspase-9 values were lower in the melatonin+AD group, AD group and AD+melatonin groups than in the melatonin+AD+AP18, AD+AP18 and AD+melatonin+AP18 groups, respectively ( $p<0,001$  and  $p<0,05$ ).

**Conclusion:** Our results suggest that melatonin may be an effective option in the treatment and prophylaxis of Alzheimer's disease by reducing cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration, apoptosis and intracellular ROS through TRPA1 channels.

**Keywords:** TRPA1, Alzheimer's disease, melatonin, neuroblastoma cells, apoptosis

**Cite this article as:** Özşimşek A, Övey İS. Alzheimer Hastalığının Önlenmesi ve Tedavisinde Melatoninin TRPA1 Kanalları Üzerinden Potansiyel Etkileri. Arch Neuropsychiatry 2022; 59:188-192.

## Öne Çıkan Noktalar

- Melatonin, TRPA1 kanalları aracılığıyla anti-apoptotik etki gösterir.
- Melatonin Alzheimer hastalığında SH-SY5Y hücrelerinde koruyucu etkiye sahiptir.
- Melatonin uyku bozukluğu olan Alzheimer hastalığında koruyucu etkiye sahiptir.

## GİRİŞ

Alzheimer hastalığı (AH) oksidatif hasara, inflamasyona ve seçici nöronal kayba yol açan hücre dışı amiloid ve hücre içi mikrotübül birikimi ile karakterize demansın en yaygın nedenidir ve ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır (1). Melatonin, epifiz bezi tarafından salgılanan, herhangi bir ilaç etkileşimi ve yan etkisi olmayan güçlü pleotropik nörohormondur (2). Çeşitli çalışmalar, Melatonin'in (N-asetil-5-metoksitriptamin), AH ve Parkinson hastalığı dahil olmak üzere birçok nörodejeneratif olaya karşı koruyucu bir rol oynadığını göstermiştir (3,4). Bu nedenle, yaşlı kişilerde melatonin üretiminin azalması, AH gelişimi için önemli bir risk faktörü olarak kabul edilir. Melatonin'in ayrıca amiloid beta-proteinin klirensi ve üretimi arasındaki dengeyi düzenlemede A $\beta$  kaynaklı nörotoksititeye karşı koruma sağladığı gösterilmiştir (5). Bu bulgular, TRP kanal patolojileriyle ilgili birçok prelinik modelde teyit edilen melatoninin genel mitokondriyal stabilizasyonu ve antiapoptotik rolü ile uyumludur (6,7). Örneğin birçok deneysel modelde melatoninin demans gelişiminin iki önemli aracı olan ROS ve Ca toksisitesine karşı TRP kanalları aracılığıyla koruma sağladığı yakın zamanda gösterilmiştir (8,9). Geçici reseptör potansiyeli ankirin 1 (TRPA1) en iyi ağrı modülasyonunda bilinmesine rağmen, son veriler TRPA1 reseptörlerinin beyinde de önemli ölçüde ekspres edildiğini göstermiştir. Bu bulgular, AH nöroblastom hücrelerinde TRPA1 kanallarındaki melatoninin in vitro koşullarda nöroprotektif bir etki gösterip göstermediğini varsaymamıza neden oldu. Çalışmamızın, özellikle AH gelişimi söz konusu olduğunda, TRP kanalları aracılığıyla mitokondriyal disfonksiyonun rolüne ilişkin hızla çoğalan veriler bağlamında özel çıkarımları vardır (6,10). Nöroblastom hücrelerinde melatoninin TRPA1 kanalları üzerindeki rolünü inceledik.

## YÖNTEM

### Hücre Kültürü ve Farklılaşma

İnsan nöroblastom (SH-SY5Y) hücreleri, American Type Culture Collection'dan (ATCC; Manassas, VA) temin edildi. SH-SY5Y hücreleri, F12'de HAM'ler ve DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ile fetal bovin serumu (%10) (Fisher Scientific) ve pen./strep antibiyotik kombinasyonu (%1) içeren 1/1 oranında 8-10 şişede (5 ml, 25 cm<sup>2</sup>, steril filtre kapağı) kültür oluşturuldu. Hücreler, nemlendirilmiş bir inkübatörde 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'de inkübe edildi. Farklılaşma için hücreler 7 gün boyunca 5  $\mu$ M retinoik asit (Sigma) içeren büyüme ortamında tutuldu (9). Farklılaşma periyodundan sonra, nöroblastom hücreleri, gruplar bölümünde tarif edildiği gibi melatonin ve okadaik asit ile inkübe edildi. Önceki raporlar, Okadaik asit ile inkübe edilerek SH-SY5Y'de (Human Neuroblastoma cell line) Alzheimer hastalığı modellerinin oluşumunu tarif etmişti (11,12). Hücreler, kontaminasyon kanıtı için günlük olarak kontrol edildi. İnkübasyondan sonra hücreler, laboratuvar incelemeleri için sterilize edilmiş (falcon, 15 ml) ayrıldı (11,12). Hücre hatları, İnsan Doku Yasası kapsamında ilgili materyal değildir. Hücre hatlarının araştırma için saklanması HTA lisansı gerektirmez. Bu nedenle yazarlar etik kurul onayına gerek olmadığını ve Helsinki Deklarasyonuna uygun olarak yürütüldüğünü beyan ederler.

### Kit ve Boyalar

Calbiochem'den (Darmstadt, Almanya) Fura 2 (AM) floresan kalsiyum boyası ve Biovision'dan (San Francisco, ABD) Pluronic® F-127, önceki çalışmada ayrıntılı olarak tanımlandığı gibi kullanıldı.

### Gruplar

Hüresel farklılaşmadan sonra, çalışma aşağıdaki yedi ana gruba planlandı:

**Grup 1 (Kontrol):** Herhangi bir ilaç uygulanmadı ve SH-SY5Y aynı hücre kültürü altında bir şişede tutuldu.

**Grup 2 (Mel+AH):** Bu gruptaki SH-SY5Y' ler 10  $\mu$ M melatonin ile 24 saat, ardından 30 nm okadaik asit ile 24 saat muamele edildi (11,12).

**Grup 3 (Mel+AH+AP18):** Bu gruptaki SH-SY5Y' ler, 24 saat boyunca 10  $\mu$ M melatonin ile muamele edildi ve ardından 24 saat boyunca 30 nm okadaik asit ile muamele edildi ve ardından TRPA1 kanal blokeri AP18 ile muamele edildi (100  $\mu$ M, 20 dakika).

**Grup 4 (AH):** Bu gruptaki SH-SY5Y' ler 24 saat boyunca 30 nm okadaik asit ile muamele edildi (12).

**Grup 5 (AH+AP18):** Bu gruptaki SH-SY5Y' ler, 24 saat 30 nm okadaik asit ile muamele edildi ve ardından TRPA1 kanal blokeri AP18 (100  $\mu$ M, 20 dakika) ile muamele edildi.

**Grup 6 (AH+Mel):** Bu gruptaki SH-SY5Y' ler 24 saat 30 nm okadaik asit ile muamele edildi ve ardından 24 saat 10  $\mu$ M melatonin ile muamele edildi (11,12)

**Grup 7 (AH+Mel+AP18):** Bu gruptaki SH-SY5Y' ler, 24 saat 30 nm okadaik asit ile muamele edildi ve ardından 24 saat boyunca 10  $\mu$ M melatonin ile muamele edildi ve ardından TRPA1 kanal blokeri AP18 ile muamele edildi (100  $\mu$ M, 20 dakika).

Kalsiyum sinyallemede (Fura2/AM), SH-SY5Y' ler hücre dışı ortamda 1.2 mM Kalsiyum ve kalsiyum içermeyen tampon varlığında 0.1 mM sinnalaldehit (Cin) ile 20. döngüde uyarıldı. Caspase 3 ve Caspase 9, programlanmış hücre ölümü, hücre içi reaktif oksijen türleri, mitokondriyal depolarizasyon analizi için hücreler ayrıca TRPA1 kanallarının aktivasyonu için TRPA1 kanal uyarıcısı Cin (100  $\mu$ M, 10 dakika) ile işlendi.

### Hücre İçi Kalsiyum ve Fura-2 Yükleme Ölçümleri

SH-SY5Y hücrelerinde hücre içi kalsiyum seviyesini ölçmek için Fura 2 AM (asetoksimetil ester) boyası kullanıldı. Hücreler, 1,2 mM CaCl<sub>2</sub> ve kalsiyum içermeyen HEPES-tamponlu salin [HBS; 5 mM KCl, 145 mM NaCl, 10 mM D-glukoz, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES ve %0,1 (a/h) bovin serum albümini (BSA); pH 7,4] 5  $\mu$ M Fura-2 AM ve %0,05 (a/h) Pluronic F-127 60 dakika süreyle 37°C'de ve karanlıkta aynı solüsyonu içermektedir. Yüklene hücreler iki kez HBS ile yıkandı ve Fura-2 AM de-esterifikasyonuna izin vermek için karanlıkta 37°C'de en az 20 dakika boyunca 2,5 mM probenesid ile desteklenmiş 1 ml HBS ile kaplandı. 510 nm'de (emisyon) floresan yoğunluğu, 50 edinim döngüsü için her 3 saniyede bir 340 ve 380 nm' lik değişen uyarma dalga boylarında otomatik bir enjeksiyon sistemi (SynergyTM H1, Biotek, ABD) ile donatılmış bir plaka okuyucu kullanılarak bireysel kuyucuklarda belirlendi. Hücre içi kalsiyum sinyali ölçümü sırasında TRPA1 kanalları 20. döngüde Cin (0,1 mM) ile otomatik enjektör ile uyarıldı. Boyama işlemi modifikasyonu dahil [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> ölçümü Martinez ve arkadaşlarının yöntemine göre yapıldı (13,14).

### Apoptoz Tahlihi ve Hücre İçi ROS Üretim Ölçümü

APO PercentageTM (hücre apoptoz tahlihi) ve hücre zarı penetrasyonu (yüksüz ve floresan olmayan boya [Dihidrorhodamine-123 (DHR-

123) kullanılarak, önceki protokolümüze göre apoptozu ve hücre zarı penetrasyonunu belirlemek ve ölçmek için kullanıldı (14,15). SH-SY5Y hücreleri, spektrofotometri (çoklu plaka okuyucu) ile 550 nm'de (SynergyTMH1, Biotek, ABD) apoptotik hücreleri belirlemek için analiz edildi ve sonuçlar tedaviden önce taban çizgisine göre kat değişimi olarak sunuldu (deney/ kontrol).

### Kaspaz 3 ve 9 Aktivite Testleri ve Mitokondriyal Membran Potansiyeli (JC-1) Analizleri

Kaspaz 3 (AC-DEVD-AMC) ve 9 (AC-LEHD-AMC) substratı Synergy TMH1 mikropilaka okuyucusu (Biotek, ABD) ile 360 nm ve 460 nm dalga boylarında (eksitasyon/emisyon) belirlendi. Kaspaz 3-9 aktiviteleri daha önce bildirilen yöntemlere göre analiz edildi (14). Bulgular, floresan birimleri/mg protein olarak ve başlangıç seviyesinin katlarında (deneysel/kontrol) değişiklik olarak sunulur.

Mitokondriyal membran potansiyeli floresan boya [JC1 (1  $\mu$ M)] yoğunluğu farklı dalga boyları altında kontrol edilmiş ve veriler önceki çalışmamızda olduğu gibi sunulmuştur (14,15).

Dihidrorodamin-123 (DHR-123) hücre zarından kolayca geçer. SH-SY5Y hücrelerinin içinde, DHR-123, mitokondride lokalize olan ve yeşil floresan gösteren katyonik rodamin-123'e (Rh-123) oksitlenir. Hücreler (grup başına 106 hücre/ml), floresan oksidan boya olarak 20  $\mu$ M DHR-123 ile 37°C'de 25 dakika (15) inkübe edildi. Rh-123 floresan şiddetinin belirlenmesi için Synergy™ H1 otomatik mikropilaka okuyucu cihazı kullanıldı. Analizler 488 nm uyarma dalga boyunda ve 543 nm emisyon dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Verileri tedavi öncesi seviyeye göre kat değişimi olarak sunduk. (14,15).

Caspase 3 (AC-DEVD-AMC) ve Caspase 9 (AC-LEHD-AMC) substrat bölünmeleri, 360 nm ve 460 nm dalga boylarında (uyarma/emisyon) Synergy™ H1 mikropilaka okuyucusu (Biotek, ABD) ile ölçüldü. Caspase 3 ve Caspase 9 aktivite değerlendirme yöntemleri daha önce bildirilenlere dayanmaktadır (15). Değerler floresan birim/mg protein olarak değerlendirildi ve tedavi öncesi seviyeye (deney/kontrol) göre kat değişimi olarak gösterildi (14,15).

### Mitokondriyal Membran Potansiyeli (JC-1) Analizleri

Mitokondriyal membran potansiyeli floresan boyası [JC1 (1  $\mu$ M)] yoğunluğu, 485 nm (yeşil) uyarma dalga boyu ve 535 nm emisyon dalga boyu, 540 nm'de kırmızı sinyal (uyarma) ve 590 nm (emisyon) dalga boyları (SynergyTM) ile değerlendirildi. H1, Biotek, ABD). Veriler emisyon oranları (590/535) olarak sunulmuştur. Mitokondriyal membran potansiyeli değişiklikleri, deney/kontrolün JC1 floresans oranındaki düşüşün integrali olarak nicelendirildi (14,15).

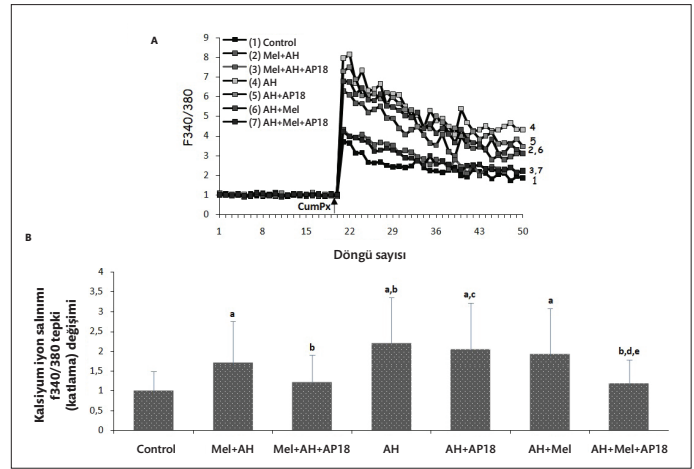
### İstatistiksel Analizler

Tüm bulgular ortalama  $\pm$  standart sapma (SD) olarak sunulmuştur. Grupların istatistiksel karşılaştırması tek yönlü ANOVA ile yapıldı. İstatistiksel analizler Windows için GraphPad ve Prism sürüm 7.04 (GraphPad Software, San Diego California, ABD) ile yapılmıştır. P<0.05 anlamlı olarak kabul edildi.

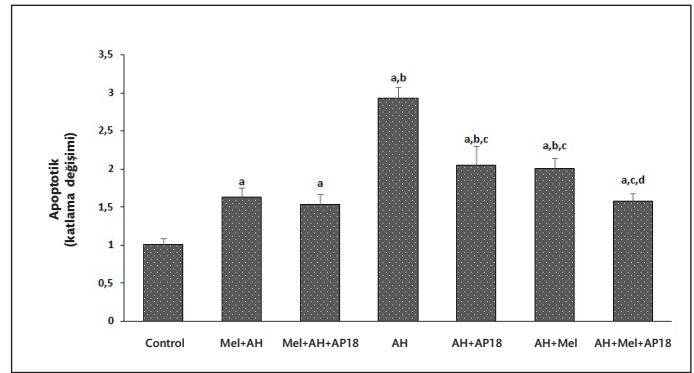
## BULGULAR

### Okadaik Asit ile İndüklenen in vitro AH Modelinde Mel'in Sitolizik Kalsiyum Seviyeleri Üzerindeki Etkileri

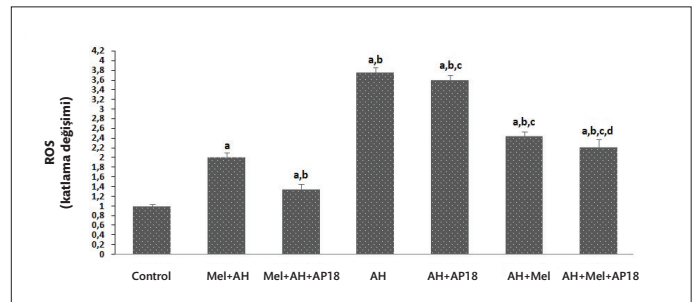
Okadaik asit ile indüklenen SHSY-5Y' larde melatonin uygulamalarının sitozolik kalsiyum seviyeleri üzerindeki etkisi Şekil 1a, b'de gösterilmektedir. TRP Ankyrin 1 kanal uyarıcısı sinmaldehit ve bloker AP18, in vitro AH modelinde TRPA1 kanalları yoluyla hücre içi Ca<sup>2+</sup> artışı değerlendirmek için kullanıldı. Şekil 1b'de görüldüğü gibi SH-



**Şekil 1. a, b.** Okadaik asit (AH, 30 nM, 24 saat) ve melatoninin (10  $\mu$ M, 24 saat) TRPA1 kanalları aracılığıyla hücre içi serbest kalsiyum artışı üzerindeki etkisi in vitro AH modeli (n=3 ve ortalama  $\pm$  SD). SH-SY5Y'ler sinmaldehit tarafından uyarılır (Cin, 20. döngüde 100  $\mu$ M) ancak AP18 tarafından bloke edilirler (30 dakika boyunca 100  $\mu$ M) (ortalama  $\pm$  SD ve n=3). [<sup>a</sup>p<0,001 kontrole karşı, <sup>b</sup>p<0,001 ve <sup>c</sup>p<0,05 Mel+AH'ye karşı, <sup>d</sup>p<0,05 ve <sup>e</sup>p<0,001 AH'ye karşı ve <sup>f</sup>p<0,001 AH+Mel grubuna karşı].

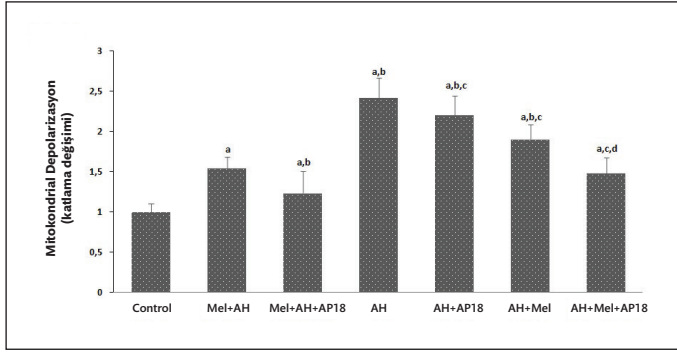


**Şekil 2.** Okadaik asit (AH, 30 nM, 24 saat) ve melatoninin (10  $\mu$ M, 24 saat) in vitro AH modelinde programlanmış hücre ölümü seviyeleri üzerindeki etkisi. SH-SY5Y'ler, AP18 (30 dakika süreyle 0.1 mM) tarafından bloke edildi ve sinmaldehit (Cin ve 0.1 mM 10 dakika süreyle) ile uyarıldı (ortalama  $\pm$  SD ve n=10). [<sup>a</sup>p<0,001 kontrole karşı, <sup>b</sup>p<0,001 Mel+AH'ye karşı, <sup>c</sup>p<0,001 AH'ye karşı ve <sup>d</sup>p<0,001 AH+Mel'e karşı].

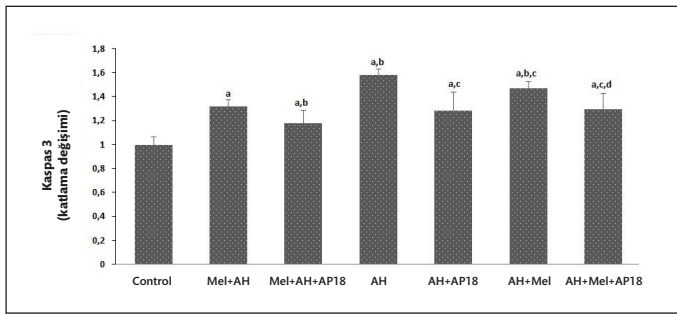


**Şekil 3.** Okadaik asit (AH, 30 nM, 24 saat) ve melatoninin (10  $\mu$ M, 24 saat) reaktif oksijen türleri seviyeleri üzerindeki etkisi in vitro AH modelinde. SH-SY5Y'ler, AP18 (30 dakika boyunca 100  $\mu$ M) tarafından bloke edildi ve sinmaldehit (10 dakika boyunca Cin, 100  $\mu$ M) ile uyarıldı (ortalama  $\pm$  SD ve n=10). [<sup>a</sup>p<0,001 kontrole karşı, <sup>b</sup>p<0,001 Mel+AH'ye karşı, <sup>c</sup>p<0,001 AH'ye karşı ve <sup>d</sup>p<0,001 AH+Mel'e karşı].

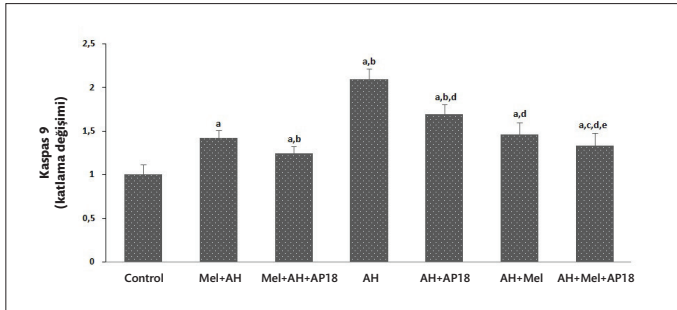
SHSY-5Y' deki Ca<sup>2+</sup> konsantrasyonu melatonin+Alzheimer Hastalığı, AH ve Alzheimer Hastalığı+melatonin gruplarında kontrole göre daha yüksekti (p<0,001) ancak Mel+AH+AP18, AH+Mel+AP18 ve kontrol arasında istatistiksel olarak fark yok. Ca<sup>2+</sup> düzeyi melatonin+AH ve Alzheimer Hastalığı+melatonin'de AH grubuna göre daha düşüktü (p<0,001 ve p<0,05). Ayrıca sitozolik Ca<sup>2+</sup> konsantrasyonu melatonin+AH'de Alzheimer Hastalığı+melatonin'e göre azalmıştı (p<0,05).



**Şekil 4.** Okadaik asit (AH, 30 nM, 24 saat) ve melatoninin (10 µM, 24 saat) in vitro AH modelinde mitokondriyal depolarizasyon seviyeleri üzerindeki etkisi. SH-SY5Y'ler, AP18 (30 dakika boyunca 100 µM) tarafından bloke edildi ve sinmaldehit (Cin, 10 dakika boyunca 100 µM) ile uyarıldı (ortalama ± SD ve n=10). [<sup>a</sup>p<0,001 kontrole karşı, <sup>b</sup>p<0,001 Mel+AH'ye karşı, <sup>c</sup>p<0,001 AH'ye karşı ve <sup>d</sup>p<0,001 AH+Mel'e karşı].



**Şekil 5.** Okadaik asit (AH, 30 nM, 24 saat) ve melatoninin (10 µM, 24 saat) in vitro AH modelinde kaspaz-3 seviyeleri üzerindeki etkisi. SH-SY5Y'ler, AP18 (30 dakika boyunca 100 µM) tarafından bloke edildi ve sinmaldehit (Cin, 10 dakika boyunca 100 µM) ile uyarıldı (ortalama ± SD ve n=10). [<sup>a</sup>p<0,001 - kontrol, <sup>b</sup>p<0,001 - Mel+AH, <sup>c</sup>p<0,001 - AH ve, <sup>d</sup>p<0,001 - AH+Mel].



**Şekil 6.** Okadaik asit (AH, 30 nM, 24 saat) ve melatoninin (10 µM, 24 saat) in vitro AH modelinde kaspaz-9 seviyeleri üzerindeki etkisi. SH-SY5Y'ler, AP18 (30 dakika boyunca 100 µM) tarafından bloke edildi ve sinmaldehit (Cin, 10 dakika boyunca 100 µM) ile uyarıldı (ortalama ± SD ve n=10). [<sup>a</sup>p<0,001 kontrole karşı, <sup>b</sup>p<0,001 ve <sup>c</sup>p<0,05 Mel+AH'ye karşı, <sup>d</sup>p<0,001 AH'ye karşı ve <sup>e</sup>p<0,001 AH+Mel'e karşı].

### Okadaik Asit ile İndüklenen in vitro AH Modelinde Mel'in Programlanmış Hücre Ölümü ve Hücre İçi Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Seviyeleri Üzerindeki Etkileri

Mel uygulamalarının SH-SY5Y'lerde apoptoz ve ROS düzeyleri üzerine etkisi Şekil 2 ve 3'te gösterilmiştir. Programlanmış hücre ölümü ve ROS değerleri Melatonin+Alzheimer Hastalığı, AH ve Alzheimer Hastalığı+Melatonin gruplarında kontrol grubuna göre daha yüksekti ( $p<0,001$ ). AH' de programlanmış hücre ölümü ve ROS değerleri melatonin+AH ve Alzheimer Hastalığı+melatonin grubuna göre daha yüksekti ( $p<0,001$ ) ve Alzheimer Hastalığı+melatonin'de programlanmış hücre ölümü (apoptoz) düzeyi melatonin+AH grubuna göre daha yüksekti ( $p<0,001$ ). Ayrıca melatonin+AH grubu, AH grubu ve Alzheimer Hastalığı+melatonin gruplarında da sırasıyla melatonin+Alzheimer Hastalığı+AP18, Alzheimer

Hastalığı+AP18 ve Alzheimer Hastalığı+melatonin+AP18 gruplarına göre daha yüksek bulundu ( $p<0,001$ ).

### TARTIŞMA

Çalışmamız, melatoninin deneysel AH koşullarında önemli bir nöroprotektif etki uyguladığını buldu. Okadaik asit uygulaması öncesi melatonin uygulamasının okadaik asit uygulaması sonrası uygulamasına göre anlamlı derecede daha etkili olduğunu gözlemledik. Bu, Alzheimer hastalarında, özellikle uyku bozukluğu olanlarda demansın önlenmesi için özel etkileri olabilecek kritik bir bulgudur. Melatoninin nöroprotektif etkisinin altında yatan mekanizmaları değerlendirirken, melatoninin etkisine özel TRP Ca kanalları aracılık ettiğini gözlemledik. Bu bulgu, TRP Ca kanallarının nörodejeneratif kaskadları indüklemeye önemli bir rol oynadığına dair son verilerle iyi bir uyum içindedir. Ek olarak, birkaç yeni çalışma melatoninin  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$ -sekretazlar gibi amiloid metabolizmasından sorumlu kritik enzimleri transkripsiyonel düzeyde düzenleyerek amiloidojenik süreci eski haline getirdiğini göstermiştir (4,16,17). Ek olarak, yakın zamanda amiloid beta kaynaklı nöroinflamasyon ve TRP kanalları arasında güçlü bir bağlantı önerilmiştir. Örneğin, Bosson ve ark. AH patolojisinde TRP kanallarının inflamasyona bağlı Ca artışında ve anormal protein agregasyonunda kritik bir rol oynadığını zaten ortaya koymuşlar, astrositlerin neden olduğu toksik oksijen radikallerini içeren AH'deki nöroinflamatuvar süreçte mitokondrinin özel rolü de vurgulanmıştır (10,18). Ayrıntılı mekanizmaları değerlendirirken, TRP kanallarının melatoninin nöroprotektif etkisine aracılık etmede kritik bir rol oynadığını da gösterdik. Bununla birlikte, TRP kanalları aracılığıyla Kaspaz, ROS ve Ca seviyelerinde anlamlı faydalı değişiklikler bulmamıza rağmen (Şekil 1-6), tedavi gruplarında TRP kanal inhibisyonunun apoptoz seviyeleri üzerinde anlamlı bir etkisi gözlemledik (Şekil 2). Bu farklılığa neyin sebep olduğunu tahmin etmek zor. Bununla birlikte, TRPA1 dahil olmak üzere birden fazla TRP kanalının, TRPA1 kanallarının spesifik inhibisyonu ile değiştirilemeyen nihai nöronal hücre ölümü sürecine dahil olduğunu varsaymak mantıklıdır. Bununla birlikte, hemen hemen tüm büyük hücre ölümü basamakları (mitokondriyal depolarizasyon, Ca<sup>2</sup> akışı ve ROS üretimi dahil) TRP A1'e özgü Ca<sup>2</sup> kanallarına bağlanabilir. Son olarak, melatoninin Ca, kaspaz, mitokondriyal depolarizasyon, ROS ve hücre apoptozu dahil olmak üzere apoptotik hücre basamaklarını modüle ederek, özellikle okadaik asit uygulamasından önce verildiğinde, okadaik asitten sonra uygulanmasına kıyasla önemli bir nöroprotektif etki gösterdiğini gösterdik (Şekil 1-6) (19).

Birkaç çalışma, uyku ile ilgili bozuklukların, AH gelişimine yol açan bozulmuş amiloid-beta eliminasyonundan sorumlu olduğunu bulmuştur. Bu nedenle, hızla artan kanıtlar, uyku bozukluklarının AH için önemli bir risk faktörü olduğunu düşündürmektedir. Bu bakış açısından, melatonin, AH gelişimi ile güçlü bir şekilde bağlantılı uyku bozuklukları için potansiyel önleyici eylemlerden biri olarak düşünülebilir. Her ne kadar melatoninin nörotoksik hakareten önce uygulandığında daha güçlü bir nöroprotektif etki gösterdiğini bulmuş olsak da, sonuçlarımız ayrıca AH sırasında uyku bozukluklarında melatoninin terapötik uygulaması için özel çıkarımlara sahiptir (20). Sonuç olarak, bulgularımız, melatoninin Alzheimer hastalığı adayı sağlıklı kişilerde ve uyku bozukluğu olan AH hastalarının her ikisinde de hem profilaktik hem de terapötik bir seçenek olarak kullanıldığında yeni bir nöroprotektif ajan olabileceğini ve bunun uyku bozukluğu ve AH ile ilişkili hücre ölümü basamakları üzerinde ikili etkisini ortaya koyduğunu düşündürmektedir.

**Etik Komite Onayı:** Hücre çalışması olması nedeniyle etik kurul gerektirmemektedir.

**Hasta Onamı:** Hasta onam formu yoktur

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış Bağlımsız.

**Yazar Katkıları:** Fikir - AÖ, İSÖ; Tasarım - AÖ, İSÖ; Denetleme - AÖ, İSÖ; Kaynaklar - AÖ, İSÖ; Malzemeler: AÖ, İSÖ; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - AÖ, İSÖ; Analiz ve/veya Yorum - AÖ, İSÖ; Literatür Taraması - AÖ, İSÖ; Yazıyı Yazan - AÖ, İSÖ; Eleştirel İnceleme - AÖ, İSÖ.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

**Finansal Destek:** Makalenin tasarımında, toplanmasında, analizinde, yorumlanmasında veya yazılmasında hiçbir finansman kuruluşu yer almamıştır. Makalenin dergi basım ücreti Sanovel İlaç A.Ş. tarafından karşılanmıştır.

## KAYNAKLAR

- Li Y, Zhang J, Wan J, Liu A, Sun J. Melatonin regulates A $\beta$  production/clearance balance and A $\beta$  neurotoxicity: A potential therapeutic molecule for Alzheimer's disease. *Biomed Pharmacother.* 2020;132:110887. [Crossref]
- Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *J Biomed Sci.* 2000;7(6):444-458. [Crossref]
- Savaskan E, Ayoub MA, Ravid R, Angeloni D, Fraschini F, Meier F, et al. Reduced hippocampal MT2 melatonin receptor expression in Alzheimer's disease. *J Pineal Res.* 2005;38(1):10-16. [Crossref]
- Hossain F, Uddin S, Uddin S, Sumsuzzman D, Islam S, Barreto G, et al. Melatonin in Alzheimer's disease: a latent endogenous regulator of neurogenesis to mitigate Alzheimer's neuropathology. *Mol Neurobiol.* 2019. [Crossref]
- Tordjman S, Chokron S, Delorme R, Charrier A, Bellissant E, Jaafari N, et al. Melatonin: pharmacology, functions and therapeutic benefits. *Curr Neuropharmacol.* 2017;15:434-443. [Crossref]
- Nazıroğlu M. Role of melatonin on calcium signaling and mitochondrial oxidative stress in epilepsy: focus on TRP channels. *Turk J Biol.* 2015;39:813-821. [Crossref]
- Koşar PA, Nazıroğlu M, Övey İS, Çiğ B. Synergic effects of doxorubicin and melatonin on apoptosis and mitochondrial oxidative stress in MCF-7 breast cancer cells: involvement of TRPV1 channels. *J Membr Biol.* 2016;249(1-2):129-140. [Crossref]
- Pancani T, Phelps JT, Searcy JL, Kilgore MW, Chen K-C, Porter NM, et al. Distinct modulation of voltage-gated and ligand-gated Ca<sup>2+</sup> currents by PPAR-gamma agonists in cultured hippocampal neurons. *J Neurochem.* 2009;109(6):1800-1811. [Crossref]
- Gironès X, Guimerà A, Cruz-Sánchez CZ, Ortega A, Sasaki N, Makita Z, et al. N epsilon carboxymethyllysine in brain aging, diabetes mellitus, and Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.* 2004;36(10):1241-1247. [Crossref]
- Payrits M, Borbely E, Godo S, Ernsts D, Kemeny A, Kardos J, et al. Genetic deletion of trpa1 receptor attenuates amyloid beta-1-42(A $\beta$ 1-42)-induced neurotoxicity in the mouse basal forebrain in vivo. *Mech Ageing Dev.* 2020;189:111268. [Crossref]
- Pappolla MA, Sos M, Omar RA, Bick RJ, Hickson-Bick DL, Reiter RJ, et al. Melatonin prevents death of neuroblastoma cells exposed to the Alzheimer amyloid peptide. *J Neurosci.* 1997;17(5):1683-1690. [Crossref]
- Romero A, Egea J, González-Muñoz GC, Martín de Saavedra MD, del Barrio L, Rodríguez-Franco MI, et al. ITH12410/SC058: a new neuroprotective compound with potential in the treatment of Alzheimer's disease. *ACS Chem Neurosci.* 2014;5(9):770-775. [Crossref]
- Martinez NA, Ayala AM, Martinez M, Martinez-Rivera FJ, Miranda JD, Silva WI. Caveolin-1 Regulates the P2Y2 Receptor Signaling in Human 1321N1 Astrocytoma Cells. *J Biol Chem.* 2016;291(23):12208-12222. [Crossref]
- Övey İS, Güler Y. Apoptotic efficiency of capecitabine and 5-fluorouracil on human cancer cells through TRPV1 channels. *Indian J Biochem Biophys.* 2020;57(1):64-72. Corpus ID: 214790785
- Öz A, Çelik Ö. Curcumin inhibits oxidative stress-induced TRPM2 channel activation, calcium ion entry and apoptosis values in SH-SY5Y neuroblastoma cells: Involvement of transfection procedure. *Mol Membr Biol.* 2016;33(3-5):76-88. [Crossref]
- Shukla M, Govitrapong P, Boontem P, Reiter RJ, Satayavivad J. Mechanisms of melatonin in alleviating Alzheimer's disease. *Curr Neuropharmacol.* 2017;15(7):1010-1031. [Crossref]
- Cardinali DP, Furio AM, Brusco LI. Clinical Aspects of Melatonin Intervention in Alzheimer's Disease Progression. *Curr Neuropharmacol.* 2010;8(3):218-227. [Crossref]
- Bosson A, Paumier A, Boisseau S, Jacquier-Sarlin M, Buisson A, Albrieux M. TRPA1 channels promote astrocytic Ca<sup>2+</sup> hyperactivity and synaptic dysfunction mediated by oligomeric forms of amyloid- $\beta$  peptide. *Mol Neurodegener.* 2017;12(1):53. [Crossref]
- Lee K-I, Lee H-T, Lin H-C, Tsay H-J, Tsai F-C, Shyue S-K, et al. Role of transient receptor potential ankyrin 1 channels in Alzheimer's disease. *J Neuroinflamm.* 2016;13(1):92. [Crossref]
- Peter-Derex L, Yammine P, Bastuji H, Croisile B. Sleep and Alzheimer's disease. *Sleep Med Rev.* 2015;19:29-38. [Crossref]