

DÜNYA ALZHEİMER GÜNÜ SEMPOZYUMU

ALZHEİMER ARAŞTIRMALARINDA DENEYSEL MODELLER; *İN VİTRO* MODELLER

Dr. Dyt. Fatma HACET

Yakın Doğu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Fakültesi

Beslenme ve Diyetetik Bölümü

Lefkoşa, Kıbrıs

2023

**Deneysel *In vitro* Alzheimer Modelinde Sülforafan ve Allil
İzotiyosiyonatin Nöroprotektif Etkilerinin İncelenmesi**

In vitro Alzheimer modelleri

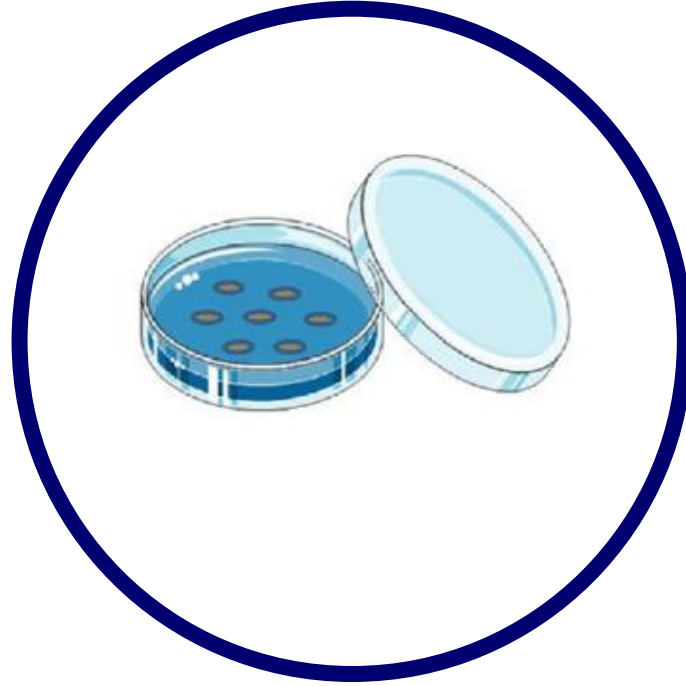
Kanser hücre hattı modelleri

İndüklenebilir pluripotent kök hücre modelleri

Nöronal öncül hücre modelleri

Serebral organoidler

ÇALIŞMANIN AMAÇ VE HEDEFLERİ



***In vitro* Alzheimer modelinin oluřturulması**

Sülforafan ve allil izotiyosiyonatin *in vitro* Alzheimer modeli ve SK-N-AS hücrelerinde nöroprotektif etkilerinin belirlenmesi

***In vitro* ortamda yapılacak olan bu çalışmanın *in vivo* ortamdaki çalışmalar için ön çalışma olması**

Klinik uygulamada sülforafan ve allil izotiyosiyanat nöroprotektif etkilerinin belirlenebilmesi için ön verilerin elde edilmesi

Nöroprotektif etkinin saptanmasıyla ileri moleküler mekanizmaların açıklanmasına yönelik yeni araştırmaların planlanması

GEREÇ VE YÖNTEM



Hücrelerin Kültürü

SK-N-AS insan nöroblastoma hücreleri

Kültür vasatı

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)

% 10 Fetal sığır serumu

% 1 Penisilin - streptomisin

% 1 L-glutamin



Hücrelerin inkübe edilmesi



Hücrelerin pasajlanması



Hücrelerin bir kısmı donduruldu

Dondurma vasatı



% 10 Dimetilsülfoksit (DMSO)

% 90 Fetal siđır serumu



1 ml

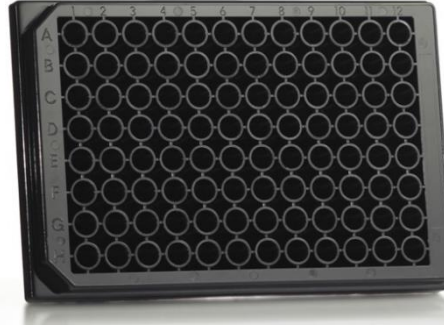


100 µl DMSO

900 µl Fetal siđır serumu

In vitro Alzheimer Modelinin Oluřturulması ve Analizi

2 farklı siyah plate hücre ekimi yapıldı



Her göze 100 μ L ekildi

**Alzheimer
Modeli**



Amiloid β -peptit (25-35) ($A\beta_{25-35}$ peptit)

Amiloid β stok solüsyonu hazırlandı (1 mM)

$A\beta_{25-35}$ peptit  distile su

37°C inkubatörde beş gün agregasyona bırakıldı

Model Kontrolü



Thioflavine T (ThT)

Alzheimer Modeli

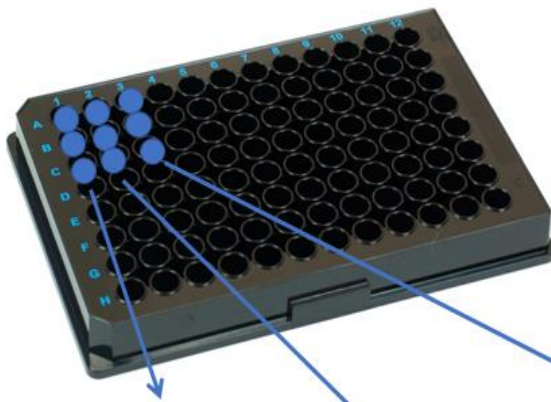
Model Oluşturma

24 saat

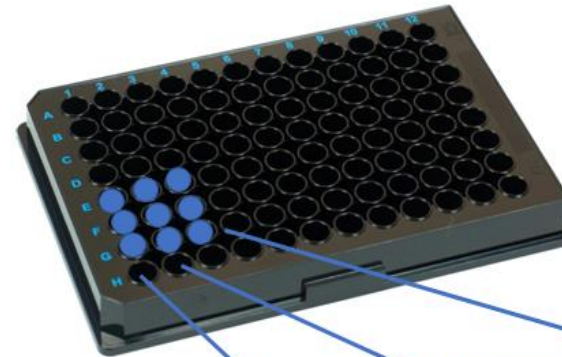
1 μM
5 μM } $\text{A}\beta_{25-35}$ peptit

48 saat

1 μM
5 μM } $\text{A}\beta_{25-35}$ peptit



24 saat



48 saat

Kontrol : 100 μL vasat

1 μM $\text{A}\beta_{25-35}$

5 μM $\text{A}\beta_{25-35}$

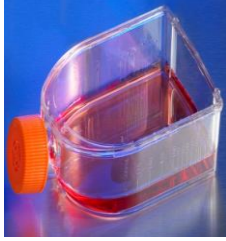
Kontrol : 100 μL vasat

1 μM $\text{A}\beta_{25-35}$

5 μM $\text{A}\beta_{25-35}$

Alzheimer Modeli

Her göze ThT solüsyonu
(200 μ L) eklendi



ThT PBS'de çözdürüldü



60 °C'de 30 dakika inkübe edildi

440 – 482 nm ölçüm yapıldı



Çalışma Grupları ve Kùltürleri



In vitro Alzheimer modeli



In vitro Alzheimer modeli
+
Sùlforafan



In vitro Alzheimer modeli
+
Allil izotiyosiyonat



SK-N-AS hùcreleri

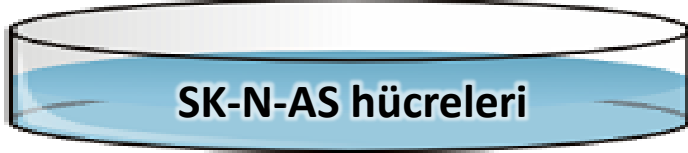


SK-N-AS hùcreleri
+
Sùlforafan

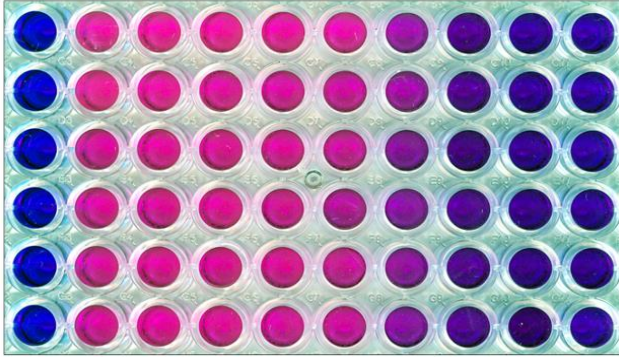


SK-N-AS hùcreleri
+
Allil izotiyosiyonat

Hücre Canlılığının Belirlenmesi

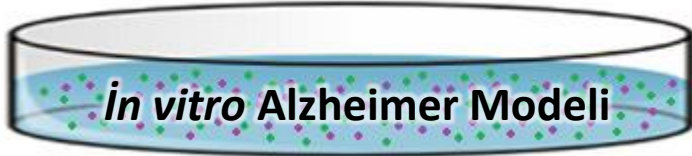
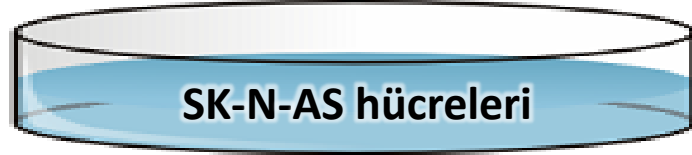


Allil izotiyosiyonat ve sülforafan beş farklı konsantrasyonda (1 μ m, 5 μ M, 15 μ M, 25 μ M, 50 μ M) 24 ve 48 saat uygulandı



Hücre canlılıkları, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) testi ile rutin protokol ile ölçüldü

İmmunositokimya



Allil izotiyosiyonat 50 μ M 48 saat
uygulandı
Sülforafan 15 μ M 48 saat
uygulandı



Primer antikorlar
Anti- α -sinüklein, anti- β -amiloid ve
anti-tau



Histolojik-skor (H-SKOR) yönetimi
kullanılarak derecelendirildi

Verilerin İstatistiksel Analizi

New in



Prism9

GraphPad Prism 9 programı kullanıldı

Veriler ortalama \pm standart sapma olarak verildi

Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ kabul edilerek değerlendirildi

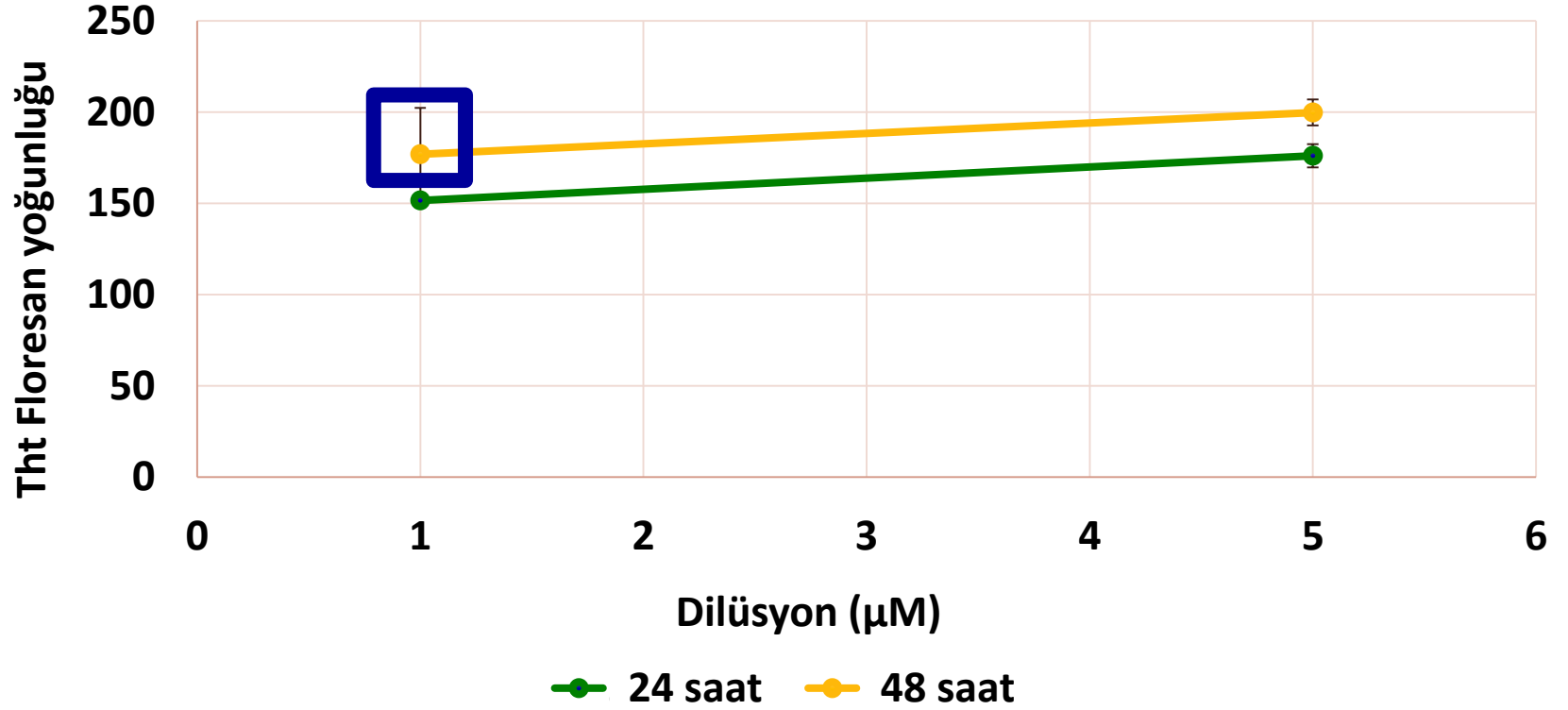
İmmünositokimya da, gruplar arasındaki farklılıklar için «İki Yönlü ANOVA», post hoc analizlerde «Tukey ve Sidak'ın çoklu karşılaştırma testleri» kullanıldı

BULGULAR



In vitro Alzheimer Modelinin Deęerlendirilmesi

A β Seviyeleri



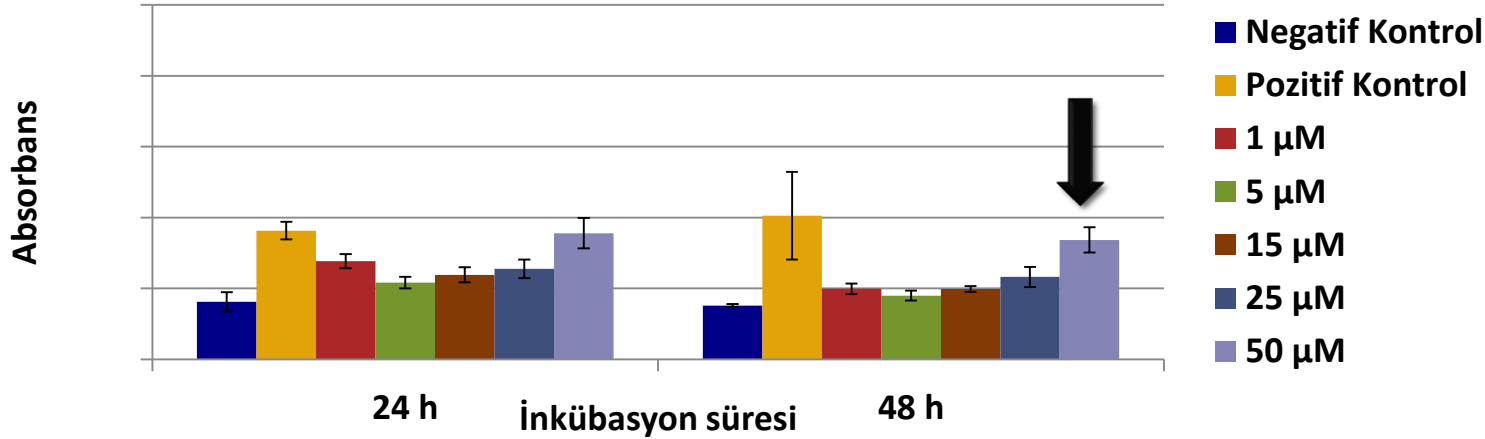
Etkin doz: 1 μ M

Model oluřumu için

Etkin süre: 48 saat

Allil izotiyosiyanatın SK-N-AS hücreleri ve *in vitro* Alzheimer modeli hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkileri

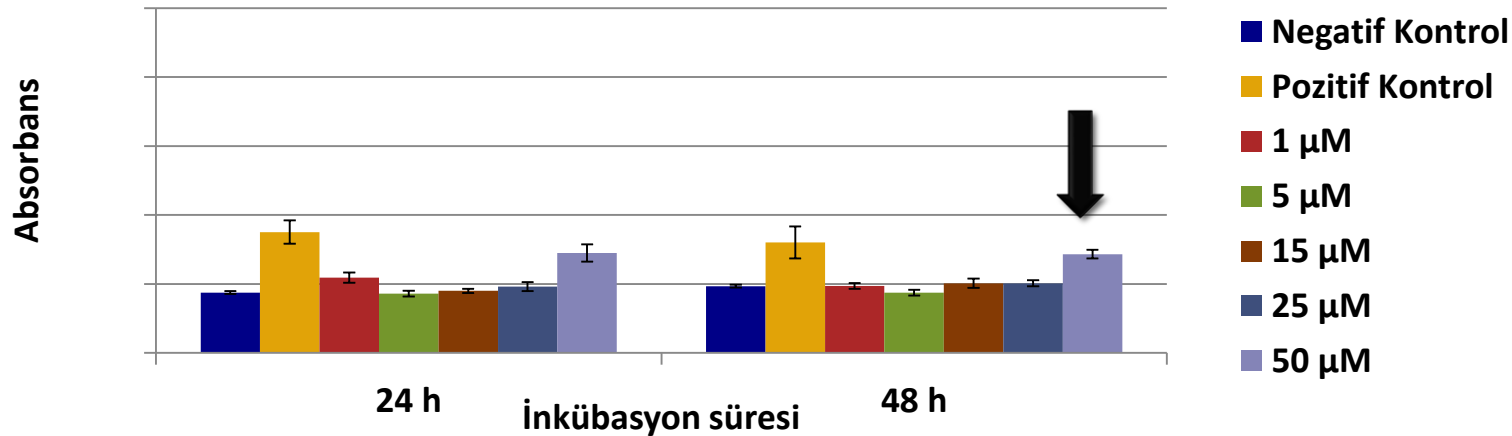
A-Allil izotiyosiyanat uygulanan SK-N-AS hücrelerinin MTT sonucu



Etkin doz:
50 µM

Etkin süre:
48 saat

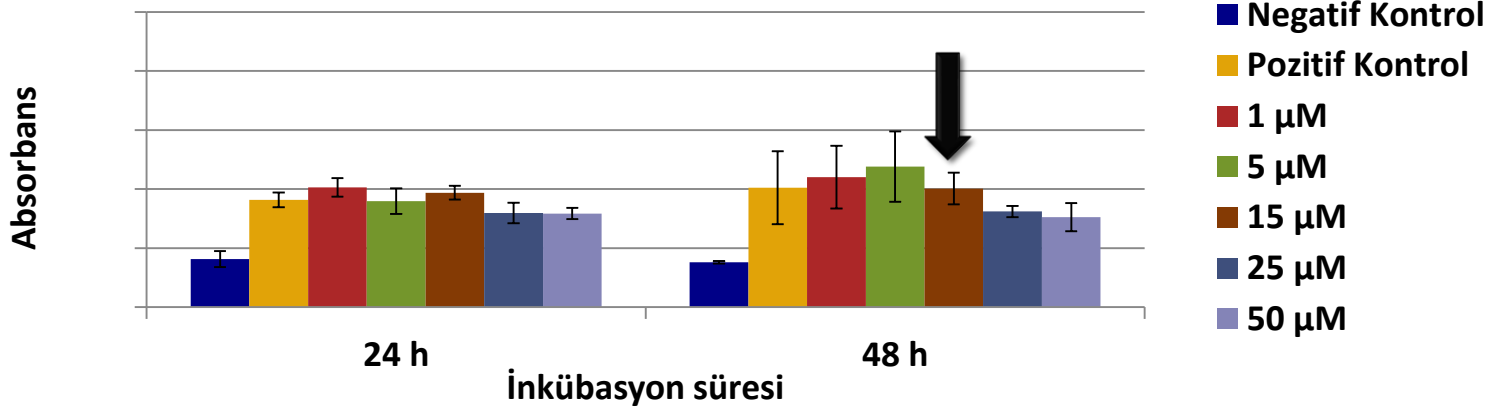
B-Allil izotiyosiyanat uygulanan *in vitro* Alzheimer model hücrelerinin MTT sonucu



*p<0.05
**p<0.01
***p<0.001

Sülforafanın SK-N-AS hücreleri ve *in vitro* Alzheimer modeli hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkileri

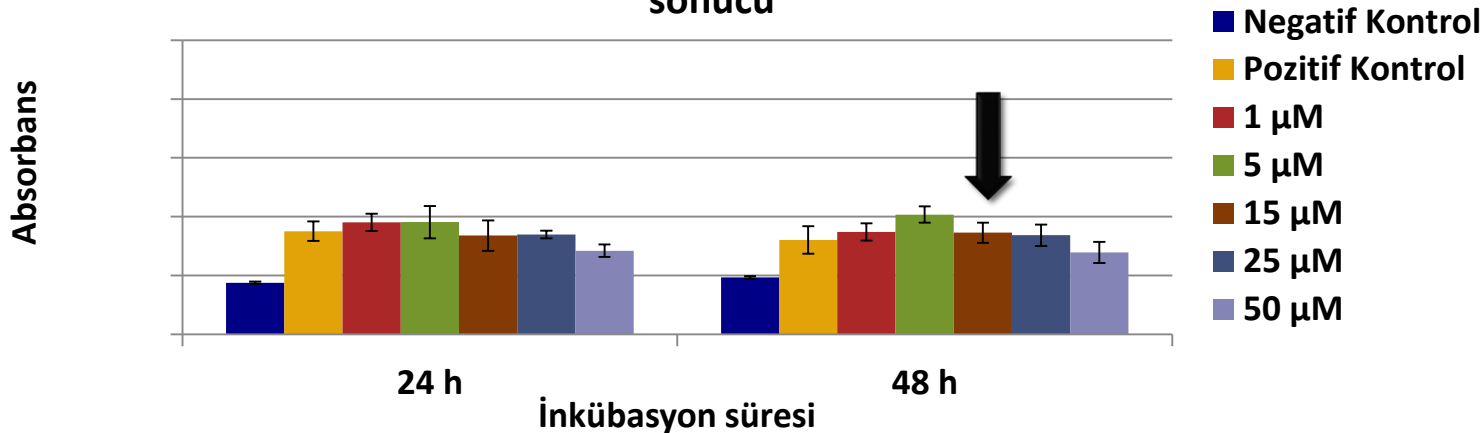
A-Sülforafan uygulanan SK-N-AS hücrelerinin MTT sonucu



Etkin doz:
15 µM

Etkin süre:
48 saat

B-Sülforafan uygulanan *in vitro* Alzheimer model hücrelerinin MTT sonucu



*p<0.05
**p<0.01
***p<0.001

50 μ M allil izotiyosiyonat (48 saat) uygulanan SK-N-AS hücrelerinde ve *in vitro* Alzheimer model hücrelerinde, 15 μ M (48 saat) sülforafan uygulanan kontrol grubu için Tau immünoreaktivitesinin H-SKOR değerleri

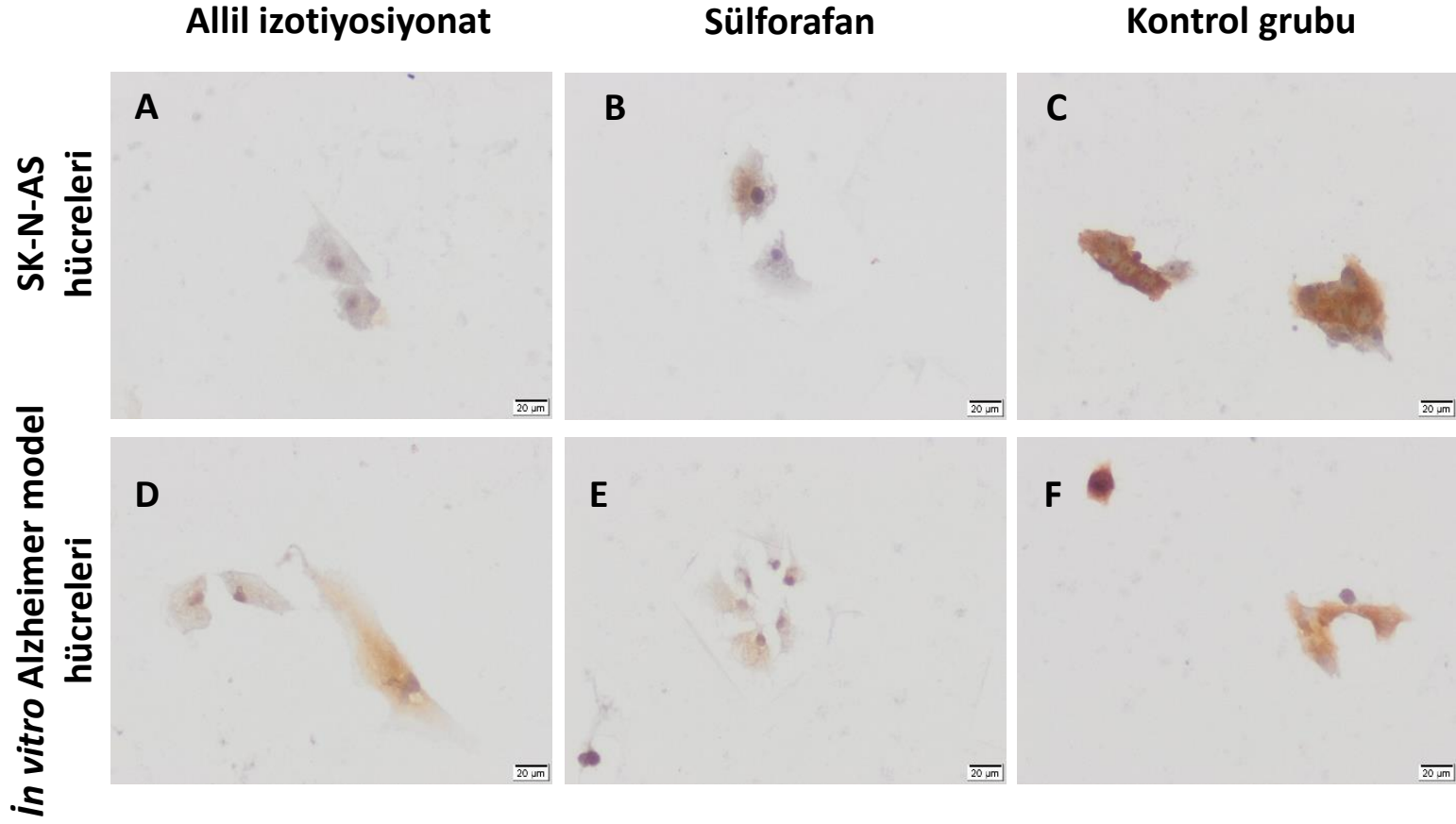
	Allil izotiyosiyonat	Sülforafan	Kontrol grup	p ¹
SK-N-AS hücreleri	125,00±28,86 ^a	145,83±41,66 ^a	338,33±53,64 ^b	<0.05*
<i>In vitro</i> Alzheimer modeli hücreleri	185,00±55,87 ^a	193,75±53,30 ^a	308,33±28,86 ^b	<0.05*
p ²	0.212	0.387	0.738	

Two-way ANOVA (ortalama \pm SS); *p<0.05

p¹: SK-N-AS hücreleri ve *in vitro* Alzheimer modeli hücrelerinde üç grup (Allil izotiyosiyonat, sülforafan ve kontrol grupları) arasındaki fark

p²: Allil izotiyosiyonat, sülforafan ve kontrol gruplarında iki grup (SK-N-AS hücreleri ve *in vitro* Alzheimer modeli hücreleri) arasındaki fark

50 μ M allil izotiyosiyonat (48 saat) uygulanan SK-N-AS hücrelerinde ve *in vitro* Alzheimer model hücrelerinde, 15 μ M (48 saat) sülforafan uygulanan kontrol grubu için Tau immünoreaktivitesi



50 μ M allil izotiyosiyonat (48 saat) uygulanan SK-N-AS hücrelerinde ve *in vitro* Alzheimer model hücrelerinde, 15 μ M (48 saat) sülforafan uygulanan kontrol grubu için β -amiloid immünoreaktivitesinin H-SKOR değerleri

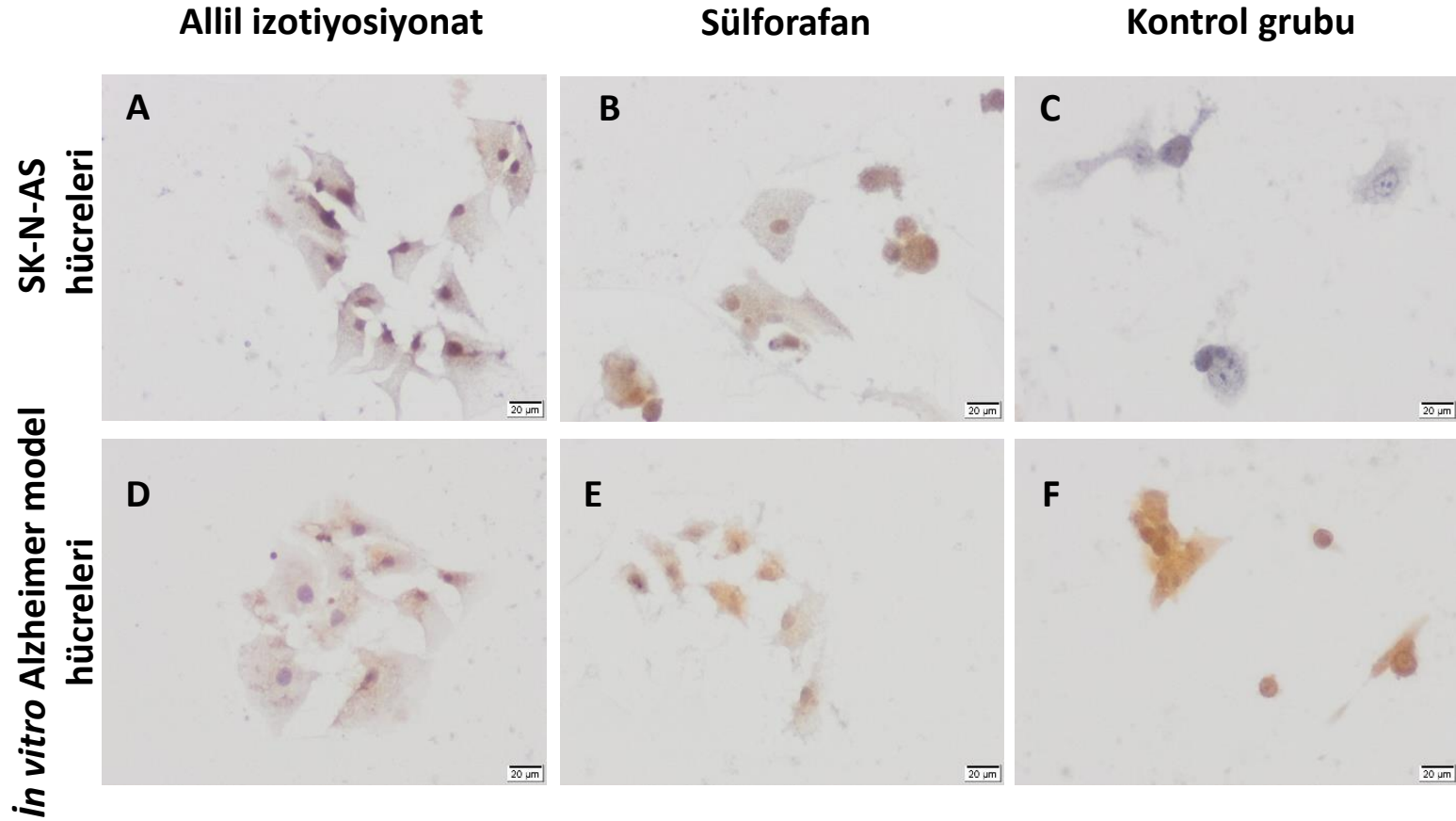
	Allil izotiyosiyonat	Sülforafan	Kontrol grup	p ¹
SK-N-AS hücreleri	284,22 \pm 40,37 ^a	273,57 \pm 40,74 ^a	120,83 \pm 25,00 ^b	<0.05*
<i>In vitro</i> Alzheimer modeli hücreleri	265,53 \pm 14,26	252,01 \pm 157,10	305,41 \pm 48,36	>0.05
p ²	0,977	0,966	0,005	

Two-way ANOVA (ortalama \pm SS); *p<0.05

p¹: SK-N-AS hücreleri ve *in vitro* Alzheimer modeli hücrelerinde üç grup (Allil izotiyosiyonat, sülforafan ve kontrol grupları) arasındaki fark

p²: Allil izotiyosiyonat, sülforafan ve kontrol gruplarında iki grup (SK-N-AS hücreleri ve *in vitro* Alzheimer modeli hücreleri) arasındaki fark

50 μ M allil izotiyosiyonat (48 saat) uygulanan SK-N-AS hücrelerinde ve *in vitro* Alzheimer model hücrelerinde, 15 μ M (48 saat) sülforafan uygulanan kontrol grubu için β -amiloid immünoreaktivitesi



50 μ M allil izotiyosiyonat (48 saat) uygulanan SK-N-AS hücrelerinde ve *in vitro* Alzheimer model hücrelerinde, 15 μ M (48 saat) sülforafan uygulanan kontrol grubu için α -sinüklein immünoreaktivitesinin H-SKOR değerleri

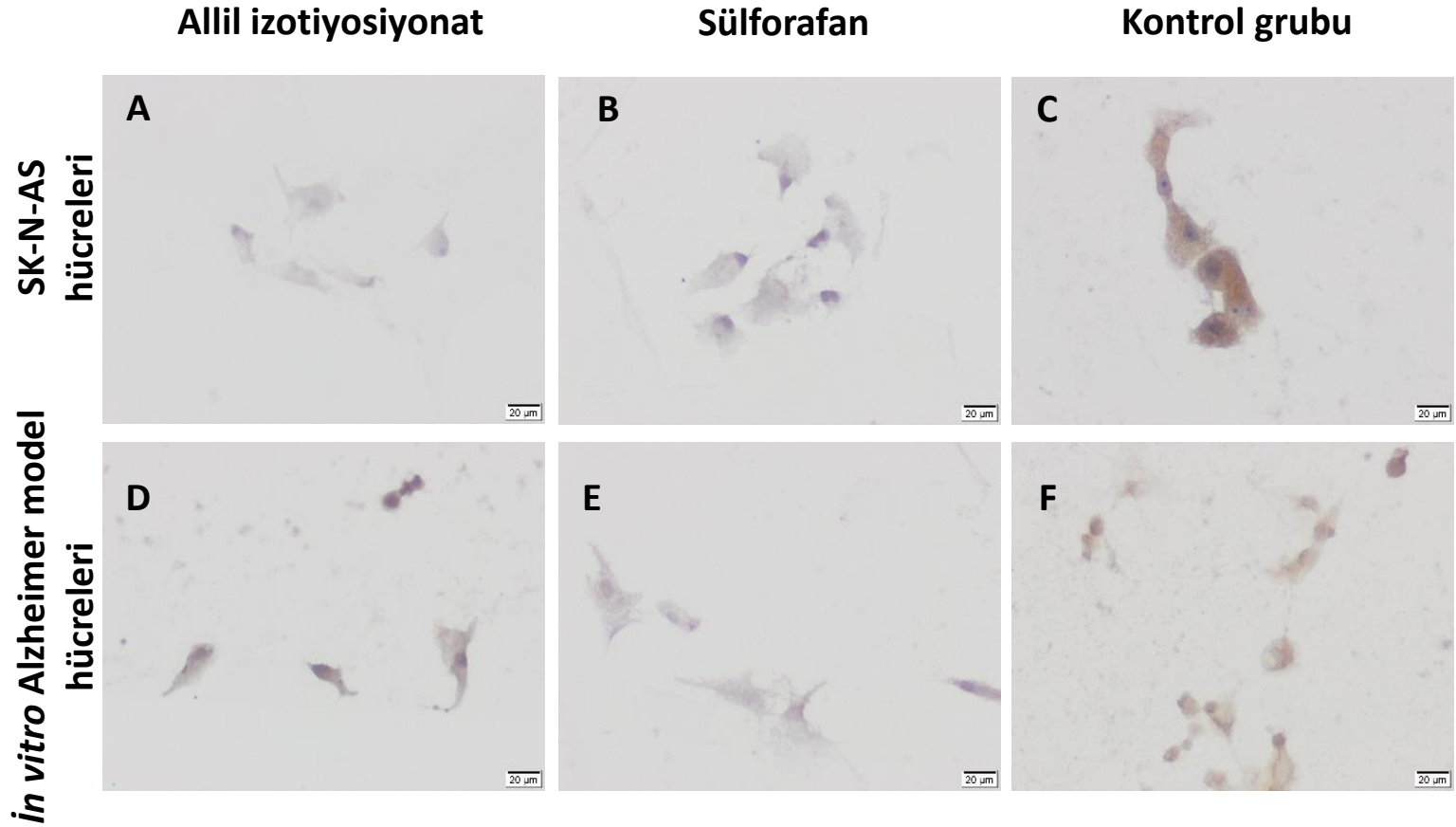
	Allil izotiyosiyonat	Sülforafan	Kontrol grup	p ¹
SK-N-AS hücreleri	117,5 \pm 23,62 ^a	135,83 \pm 12,58 ^a	291,87 \pm 56,76 ^b	<0.05*
<i>in vitro</i> Alzheimer modeli hücreleri	150,00 \pm 57,73 ^a	113,33 \pm 16,32 ^a	235,25 \pm 65,48 ^b	<0.05*
p ²	0,677	0,861	0,241	

Two-way ANOVA (ortalama \pm SS); *p<0.05

p¹: SK-N-AS hücreleri ve *in vitro* Alzheimer modeli hücrelerinde üç grup (Allil izotiyosiyonat, sülforafan ve kontrol grupları) arasındaki fark

p²: Allil izotiyosiyonat, sülforafan ve kontrol gruplarında iki grup (SK-N-AS hücreleri ve *in vitro* Alzheimer modeli hücreleri) arasındaki fark

50 μ M allil izotiyosiyonat (48 saat) uygulanan SK-N-AS hücrelerinde ve *in vitro* Alzheimer model hücrelerinde, 15 μ M (48 saat) sülforafan uygulanan kontrol grubu için α -sinüklein immünoreaktivitesi



SONUÇ



Sülforafan ve allil izotiyosiyonat birer kükürtlü biyoaktif besin bileşenleri olup *in vitro* Alzheimer model hücreleri üzerinde potansiyel nöroprotektif ajanlar olabileceği varsayılmıştır

***In vitro* Alzheimer model hücreleri üzerinde sülforafan ve allil izotiyosiyonat uygulaması gerçekleştirilen gruplarda tau immünoreaktivitelerinin kontrol grubu hücrelerine göre daha düşük olduğu saptanmıştır**

Sülforafan ve allil izotiyosiyonat uygulanan *in vitro* Alzheimer model hücrelerinde β -amiloid immünoreaktivitesi kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur

***In vitro* Alzheimer model hücreleri üzerinde sülforafan ve allil izotiyosiyonat uygulaması yapılan gruplarda α -sinüklein immünoreaktivitelerinin kontrol grubu hücrelerine göre daha düşük olduğu görülmüştür**

ÖNERİLER



Sülforafan ve allil izotiyosiyonatin Alzheimer hastalığında nöroprotektif etkilerini araştıracak farklı hücre hatlarında *in vitro*, *in vivo* ve klinik çalışmaların yapılması

Sülforafan ve allil izotiyosiyonatin farklı doz ve inkübasyon sürelerinde uygulanarak MTT ve immünositokimyasal analizlerinin incelenmesi

Sülforafan ve allil izotiyosiyonatin Alzheimer hastalığında ve diğer nörodejeneratif hastalıklarda antioksidan, anti-inflamatuvar ve nöroprotektif etkileri ile ilgili sinyal yolaklarının saptanması

Sülforafan ve allil izotiyosiyonat bileşenlerinden zengin olan besinlerin, tıbbi beslenme tedavisindeki etkileri incelenerek kapsamlı epidemiyolojik çalışmaların yapılması

TEZ ÇALIŞMASINDAN YAPILAN YAYINLAR



Investigation of Neuroprotective Effects of Sulforaphane and Allyl Isothiocyanate in an *in vitro* Alzheimer's Disease Model

Pharmacognosy Magazine

1–9

© The Author(s) 2023

Article reuse guidelines:

in.sagepub.com/journals-permissions-india

DOI: 10.1177/09731296231187443

journals.sagepub.com/home/phm



Fatma Hacet¹ , Eda Becer^{2,3}, Hafize Seda Vatansever^{3,4} and Sevinç Yücecان⁵

Abstract

Background: This study aimed to establish an *in vitro* model of Alzheimer's Disease (AD) to investigate the neuroprotective activities of *allyl isothiocyanate* (AITC) and *sulforaphane* (SFN).

Materials and Methods: Human neuroblastoma cell lines (SKNAS) were used for the *in vitro* model of AD after amyloid- β_{25-35} ($A\beta_{25-35}$) treatment. Cytotoxicity analysis was performed using the (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay. Indirect immunocytochemical methods were used to assess the tau protein, alpha-synuclein (α -synuclein), and β -amyloid distribution in the *in vitro* model of AD and SKNAS cells.

Results: An *in vitro* AD model was induced by treatment of SKNAS cells with 1 μ M of $A\beta_{25-35}$ for 48 h. AITC and SFN were applied for 48 h, and the optimal concentrations were determined as 50 μ M AITC and 15 μ M SFN. Reduced tau immunoreactivity was shown after AITC and SFN administration in SKNAS cells and *in vitro* models, demonstrating that AITC and SFN prevented amyloid plaque production in the *in vitro* AD model control group by reducing the β -amyloid level, α -synuclein levels were similar in control and *in vitro* AD model cells. Reduced α -synuclein levels were observed after SFN treatment in the AD model cells and AITC treatment in the control cells.

Conclusion: It could be concluded that AITC and SFN are potential components as neuroprotective agents against AD.

Keywords

Allyl isothiocyanate, *in vitro* Alzheimer's Disease model, *sulforaphane*, tau, α -synuclein, β -amyloid

Submitted 9 December 2022; accepted 02 June 2023

Sözel Bildiri

Fen Ve Sağlık Bilimleri Kongresi

In Vitro Alzheimer Modelinde Allil İzotiyosiyonat Ve Sulforafanın Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi- Sözel Bildiri

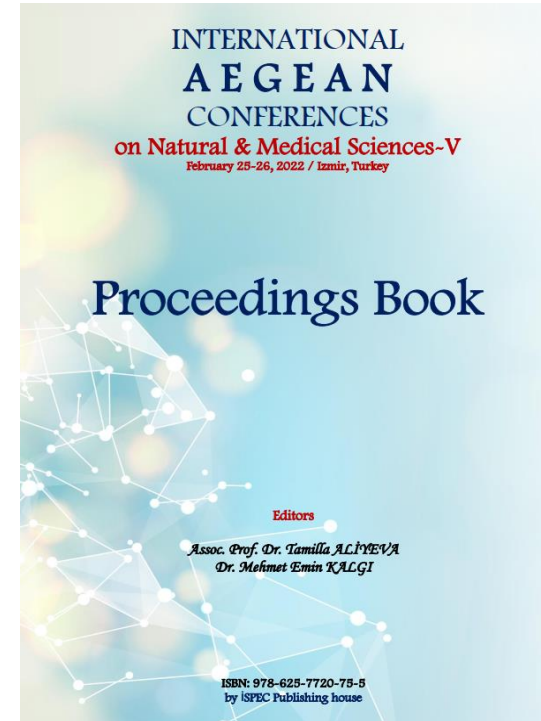
Fatma Hacet^{1*} (ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9463-8755>), Eda Becer^{2,3} (ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2378-128X>), Hafize Seda Vatansever^{3,4} (ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7415-9618>), Sevinç Yücecan⁵ (ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4751-0924>)



INTERNATIONAL AEGEAN CONFERENCES
ON NATURAL & MEDICAL SCIENCES-V
February 25-26, 2022

**İN VİTRO ALZHEİMER MODELİNDE ALLİL İZOTİYOSİYONAT VE
SULFORAFANIN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİ**
EFFECT OF ALLYL ISOTHIOCYANATE AND SULFORAPHANE ON CELL
VIABILITY IN AN IN VITRO MODEL OF ALZHEIMER'S

Fatma Hacet^{1*} (ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9463-8755>), Eda Becer^{2,3}
(ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2378-128X>), Hafize Seda Vatansever^{3,4}
(ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7415-9618>), Sevinç Yücecan⁵ (ORCID:
<http://orcid.org/0000-0003-4751-0924>)





BENİ DİNLEDİĞİNİZ İÇİN TEŞEKKÜR EDERİM