

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TİMOKİNON TEDAVİSİNİN SPORADİK ALZHEİMER MODELİ
OLUŞTURULMUŞ SIÇAN BEYİN DOKUSUNDAKİ mikroRNA VE mRNA
EKSPRESYONU ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TUĞÇE AYDOĞAN**

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Programı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Fahri AKBAŞ

OCAK 2017

BEZMİLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TİMOKİNON TEDAVİSİNİN SPORADİK ALZHEİMER MODELİ
OLUŞTURULMUŞ SIÇAN BEYİN DOKUSUNDAKİ mikroRNA VE mRNA
EKSPRESYONU ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TUĞÇE AYDOĞAN

140305109

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Programı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Fahri AKBAŞ
Eş Danışman: Yrd.Doç.Dr.Birsen ELİBOL

OCAK 2017

**BEZMİALEM VAKIF UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES**

**INVESTIGATING THE MECHANISM ON EXPRESSION OF mRNA and
microRNA TRIGGERED BY TIMOQUINON TREATMENT IN BRAIN OF
SPORADIC ALZHEIMER'S DISEASE MODEL RATS**

**MASTER THESIS
TUĞÇE AYDOĞAN**

**Department of Biotechnology
Biotechnology Program**

**Supervisor: Doç. Dr. Fahri AKBAŞ
Co-Supervisor: Yrd.Doç.Dr.Birsen ELİBOL**

JANUARY 2017

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 140305109 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Tuğçe AYDOĞAN, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “Timokinon tedav sporadik Alzheimer modeli oluşturulmuş sıçan beyin dokusundaki mikroRN mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisinin araştırılması” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Doç.Dr.Fahri AKBAŞ**

Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Eş Danışman : **Yrd.Doç.Dr.Birsen ELİBOL**

Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Doç.Dr.Gözde YEŞİL**

Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Yrd.Doç. Dr.Ender ÇOŞKUNPINAR

Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Teslim Tarihi : **9 Aralık 2016**

Savunma Tarihi : **20 Ocak 2017**

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması Bezmialem Vakıf Üniversitesi Araştırma Merkezinin sağladığı üstün teknolojik araç gereç ve kimyasal malzemelerle yapılmıştır. Merkez'in Müdürü aynı zamanda Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve Danışmanım Sayın Hocam Doç. Dr. Fahri Akbaş'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca, tezin projelendirme, uygulama ve yazım aşamalarında yardımcı olan, laboratuvar çalışmalarının tümünde yol gösteren ve her konuda benden yardımlarını esirgemeyen danışmandan çok daha fazlası olan İkinci Danışmanım Sayın Hocam Yrd. Doç. Dr. Birsen ELİBOL'a,

Çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen özellikle laboratuvar aşamasında öneri ve deneyimlerinden yararlandığım değerli ablam Arş. Gör. Merve BEKER'e, minik anne Arş. Gör. Şule TERZİOĞLU'na,

Çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen yüksek lisans arkadaşım Zekiye DİŞÇİ'ye, Araştırma Merkezi bünyesinde çalışan tüm arkadaşlarıma,

Tüm eğitim hayatım boyunca yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen çok sevgili Aileme,

Bana her an sonsuz destek olan ve inanan sevgili eşim CAN DALLI'ya,

En içten Teşekkürlerimi sunarım.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tuğçe AYDOĞAN



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	v
BEYAN.....	vi
KISALTMALAR	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
TABLO LİSTESİ	xii
ÖZET.....	xiii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Alzheimer Hastalığı.....	3
2.1.1 Demans ve Alzheimer Hastalığı	3
2.1.2 Alzheimer Hastalığı'nın genetiği.....	4
2.1.3 Alzheimer Hastalığı'nın patolojisi.....	5
2.1.3.1 Amiloid prekürsör protein ve A β peptidi.....	6
2.1.3.2 Nörofibriler yumak	8
2.1.3.3 Kolinerjik kayıp	8
2.1.4 Alzheimer Hastalığı'nda tedavi	10
2.2. Kullanılan Hayvan Modelleri	10
2.2.1 Transgenik olmayan hayvan modelleri.....	10
2.2.2 Transgenik hayvan modelleri.....	11
2.3. Timokinon.....	11
2.4. MikroRNA	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	14
3.1. Gereç.....	14
3.1.1 Kullanılan Cihazlar	14
3.1.2 Kullanılan Malzemeler	15
3.2. Yöntem	16
3.2.1 Hayvan Çalışmaları.....	16

3.2.2 A β İnfüzyonu	17
3.2.3 STZ Enjeksiyonu	17
3.3. Davranış Deneyleri.....	18
3.3.1 Pasif sakınma testi	18
3.3.2 Morris su labirenti.....	18
3.4. Dokuların alınması.....	19
3.5. Histolojik Çalışmalar	19
3.5.1 Cresyl Violet.....	19
3.5.2 Congo Red	20
3.5.3 Amiloid beta immünfloresan	20
3.5.4 Fosforile tau	20
3.6. Moleküler Çalışmalar	21
3.6.1 RNA çalışmaları (mRNA ve mikroRNA)	21
3.7 Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR.....	23
3.8 ELISA Çalışması	24
4. BULGULAR	26
4.1. Morris Su labirenti.....	26
4.2. Pasif Sakınma Testi.....	30
4.3. Histolojik Boyamalar	32
4.3.1 Nissl Boyaması ve hücre sayımı	32
4.3.2 Amiloid Beta Birikimi	34
4.3.3 CongoRed Boyaması	35
4.3.4 FosforileTau Proteinin İmmunofloresan Olarak İncelenmesi	37
4.4. Gerçek Zamanlı PCR.....	39
4.4.1 A β Modeli oluşturulan hayvanlarda qPCR.....	39
4.4.2 STZ Modeli oluşturulan hayvanlarda qPCR.....	41
4.5. ELISA Testi	42
5. TARTIŞMA	44
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	51
KAYNAKLAR	52
EKLER.....	58
ÖZGEÇMİŞ.....	59

KISALTMALAR

AH	: Alzheimer Hastalığı
Aβ	: Amiloid Beta
APP	: Amiloid Prekürsör Protein
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
C_t	: Döngü eşiği
ICV	: İntraserebroventriküler
MAP	: Mikrotübüle Bağlı Protein
miRNA	: mikroRNA
NFY	: Nörofibriler Yumak
NMDA	: N-Metil-D-Aspartat
PSN 1	: Presenilin 1
PSN 2	: Presenilin 2
STZ	: Streptozotosin
TQ	: Timokinon

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1 : (A) Makroskobik olarak AH beynin ve sağlıklı insanın beyninin karşılaştırması.....	5
Şekil 2 : Alzheimer Hastalığı patolojisi	6
Şekil 3: APP'nin amilodojenik olmayan ve amiloidojenik yolları ile kesilimi	7
Şekil 4: Tau proteinin düzenlenmesi	8
Şekil 5: Asetilkolin metabolizması.....	9
Şekil 6: <i>Nigella sativa</i> bitkisi (a), çiçeği (b) tohumu (c); tohumların biyoaktif bileşenin kimyasal yapısı olan timokinon (TQ) (d)	12
Şekil 7: Amiloid Beta infüzyonu ile yapılan Alzheimer modelinde Morris su labirenti öğrenme deneyi (yüzülen süre)	26
Şekil 8: Amiloid Beta infüzyonu ile yapılan Alzheimer modelinde Morris su labirenti öğrenme deneyi (yüzülen mesafe)	27
Şekil 9: Amiloid Beta infüzyonu ile yapılan Alzheimer modelinde Morris su labirenti deneyinde bellek ölçümü.....	27
Şekil 10: STZ enjeksiyonu ile yapılan Alzheimer modelinde Morris su labirenti öğrenme deneyi (yüzülen süre)	28
Şekil 11: STZ enjeksiyonu ile yapılan Alzheimer modelinde Morris su labirenti öğrenme deneyi (yüzülen mesafe)	29
Şekil 12: STZ enjeksiyonu ile yapılan Alzheimer modelinde Morris su labirenti deneyinde bellek ölçümü.....	29
Şekil 13: Amiloid Beta infüzyonu ile yapılan Alzheimer modelinde sıçanların pasif sakınmada gösterdikleri korku hafızası performans sonuçları.....	30
Şekil 14: STZ enjeksiyonu ile yapılan Alzheimer modelinde sıçanların pasif sakınmada gösterdikleri korku hafızası performans sonuçları.....	31
Şekil 15: Amiloid Beta infüzyonu ile yapılan Alzheimer modelinde cresyl violet boyaması ile hücre sayısının belirlenmesi.....	32
Şekil 16: Amiloid Beta infüzyonu ile yapılan Alzheimer modelinde cresyl violet boyaması ile belirlenen CA1 ve Dentat Girus (DG) hücre sayısı	32

Şekil 17: STZ enjeksiyonu ile yapılan Alzheimer modelinde sıçanların cresyl violet boyaması ile hücre sayısının belirlenmesi.....	33
Şekil 18: STZ enjeksiyonu ile yapılan Alzheimer modelinde sıçanların cresyl violet boyaması ile belirlenen CA1 hücre sayısı.....	33
Şekil 19: Amiloid Beta infüzyonu ile yapılan Alzheimer modelinde amiloid beta birikimi.....	34
Şekil 20: Amiloid Beta infüzyonu ile yapılan Alzheimer modelinde amiloid beta birikimi ve timokinonun etkinliği	35
Şekil 21: Amiloid Beta infüzyonu ile yapılan Alzheimer modelinde congored boyaması	35
Şekil 22: Amiloid Beta infüzyonu ile yapılan Alzheimer modelinde congored boyaması	36
Şekil 23: STZ enjeksiyonu ile yapılan Alzheimer modelinde fosforile TAU proteinin immunofloresan görüntüsü (20X büyütme).....	37
Şekil 24: STZ enjeksiyonu ile yapılan Alzheimer modelinde fosforile TAU proteinin hipokampus DG bölgesinde nörofibriler yumaklar halinde immunofloresan görüntüsü	37
Şekil 25: STZ enjeksiyonu ile yapılan Alzheimer modelinde fosforile TAU proteinin dansite ölçümü	38
Şekil 26: STZ enjeksiyonu ile yapılan Alzheimer modelinde fosforile TAU alanların sayımı	38
Şekil 27: A β modelinde AchE miktarının ölçülmesi.....	42
Şekil 28: STZ modelinde AchE miktarının ölçülmesi.....	43

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1: Gerçek zamanlı PCR’da kullanılmak üzere tasarlanan primerler	23
Tablo 2: A β modeline göre miRNA’ların artış ve azalış miktarının gösterilmesi	39
Tablo 3: A β modeline göre genlerin artış ve azalış miktarının gösterilmesi.....	40
Tablo 4: STZ modeline göre miRNA’ların artış ve azalış miktarının gösterilmesi ..	41
Tablo 5: STZ modeline göre genlerin artış ve azalış miktarının gösterilmesi	41



TİMOKİNON TEDAVİSİNİN SPORADİK ALZHEİMER MODELİ OLUŞTURULMUŞ SIÇAN BEYİN DOKUSUNDAKİ mikroRNA VE mRNA EKSPRESYONU ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Alzheimer hastalığı en sık rastlanan nörodejeneratif hastalıklardan birisidir. Hafıza ve öğrenme kontrolünün gerçekleştiği hipokampus bölgesinde sinaptik yetmezlik, nöron hasarı ve nöron kaybı Alzheimer hastalığının nöropatolojik bulguları arasında sayılabilir. Moleküler boyutta incelendiğinde ise nöronların ölümüne ve sinaptik bağlantılardaki bozulmalara bağlı olarak apoptoz, nörogenez, hücre bölünmesi ve döngüsü, sağ kalım vb. yollarda gen düzeyinde ve protein düzeyinde bir çok regülasyon meydana gelmektedir. Ayrıca hücre fonksiyonunun epigenetik seviyede kontrolünde büyük önemi olduğu bilinen mikroRNA'ların Alzheimer hastalığında da etkili olduğu, hastalık süreciyle birlikte tekrardan düzenlendiği hem insan hem de hayvan çalışmalarıyla gösterilmiştir. Timokinon (TQ), *Nigella sativa* (çörek otu) bitkisinde %18.4-24 oranında bulunan en önemli biyoaktif bileşendir. Daha önce yapılan birçok çalışmada TQ'nun anti-oksitatif, anti-inflamatuvar, anti-kanserojenik gibi pek çok yararlı etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde nörolojik bozuklukların patolojilerinde TQ'nun nöroprotektif etkili bir bileşik olduğu bildirilmektedir. Aynı zamanda *in vitro* yapılan çalışmalarda TQ'nun Alzheimer hastalığına karşı nöroprotektif etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Fakat literatürde TQ'nun moleküler etki mekanizmasına dair *in vivo* çalışma bulunmamaktadır.

Bu nedenle çalışmamızda, Amiloid beta (A β) ve Streptozotosin (STZ) ile indüklenen sporadik Alzheimer modellerinde Timokinon tedavisinin etkinliğinin karşılaştırılmasını ve bu modellerden elde edilen hippocampus dokularında TQ'nun ilgili genlerin ve mikroRNA'ların ekspresyon düzeylerindeki etkisini araştırmayı amaçladık. İnanıyoruz ki elde ettiğimiz veriler, TQ'nun henüz tedavi edici bir ilaca sahip olmayan Alzheimer hastalığında aday molekül olma potansiyeline ışık tutacaktır.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer Hastalığı, Timokinon, mikroRNA, A β , STZ

INVESTIGATING THE MECHANISM ON EXPRESSION OF mRNA and microRNA TRIGGERED BY THIMOQUINON TREATMENT IN BRAIN OF SPORADIC ALZHEIMER'S DISEASE MODEL RATS

SUMMARY

Alzheimer's disease is one of the most common neurodegenerative diseases. Synaptic deficiency, neuronal damage and neuron loss in the hippocampal region in which memory and learning control are performed are among neuropathological findings of Alzheimer's Disease (AD). At the molecular level, in response to neuronal death and deficiencies in synaptic connections, regulations at the gene and protein levels occur in the apoptosis, neurogenesis, cell division and cycling, survival, etc. pathways. It has also been shown in both human and animal studies that microRNAs, known to be a major factor in controlling cell function at the epigenetic level, are also effective in Alzheimer's disease and rearranged during the disease progression. Thymoquinone (TQ) is the most important bioactive component found in *Nigella sativa* (Black cumin) in the ratio of 18.4-24%. In many previous studies, it has been shown that TQ has many beneficial effects such as anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-cancerogenic. Similarly, it has been reported that TQ is neuroprotective against the pathologies of neurological disorders. However, there is no *in vivo* study on the mechanism of molecular action of TQ in the literature while there are *in vitro* studies related neuroprotective effect of TQ on AD.

We therefore aimed to compare the effects of TQ in the amyloid beta (A β) and Streptozotocin (STZ) induced sporadic Alzheimer's models and to investigate the effect of TQ on the expression levels of AD-related genes and microRNAs in hippocampal tissues. We believe that the data we obtain will shed light on the potency of TQ as a candidate molecule in Alzheimer's disease which has not yet had an effective therapy.

Key Words: Alzheimer's Disease, Thymoquinone, microRNA, A β , STZ

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Alzheimer hastalığı en sık rastlanan nörodejeneratif hastalıklardan birisidir. Bu hastalığın altında yatan temel patoloji sinaptik yetmezlik, nöron hasarı ve nöron kaybına bağlı ortaya çıkan ilerleyici beyin işlev bozukluğudur. Bu patolojik durumlara özellikle hipokampal dokudaki hücreler arası boşlukta biriken amiloid- β proteinleri ve hücre içinde oluşan nörofibriler yumaklar ve bu yumaklardaki Tau proteini varlığının neden olduğu düşünülmektedir [1]. Bu patofizyolojik etmenler nöronlar arası iletişimi engelleyerek ve hücreleri apoptoza yönlendirerek hafıza hasarlarına neden olmaktadır [2].

Alzheimer hastalığının teşhisinde ve tedavi edici süreçlerin incelenmesinde gen düzeyindeki yaklaşımlar oldukça önem arz etmektedir. Mikroarray çalışmalarıyla Alzheimer hastalığına bağlı patofizyolojik süreçte birçok genin ekspresyon miktarında düzenlemeler gerçekleştiği bulunmuştur [3]. Bunlar nörotransmitter sekresyonu ve transportu, sinaptik transport, sinaptik plastisite, nöronal ve aksonal büyüme, mikrotübüler transport, nöroenez ve apoptoz ile ilişkili genlerdir [4]. MikroRNA'lar epigenetik düzeyde gen ifadesinin kontrolünde görevli kısa zincirli RNA molekülleridir. Son yapılan çalışmalarla Alzheimer hastalığı ile ilişkili birçok mikroRNA keşfedilmiş fakat bu çalışmalar çok fazla detaylandırılmamıştır. Gerek insan [5] gerekse hayvan çalışmaları [6] göstermiştir ki bu mikroRNA'lar hastalık patolojisinin ve olası tedavi süreçlerinin aydınlatılması için moleküler boyutta önemli ipuçları sunmaktadır.

Bu çalışmada, başta antioksidatif özellikleri olmak üzere Alzheimer hastalığının tedavisinde sıklıkla kullanılan "asetilkolin esterase inhibitörü" olma özelliğine de sahip olduğu bilinen timokinon (TQ) molekülünün hipokampusteki potansiyel iyileştirici etkisinin detaylandırılarak incelenmesi amaçlanmaktadır. TQ kan-beyin bariyerini geçebilme vasfından ötürü, gerek damar yolundan enjeksiyonla gerekse oral yoldan kolay bir şekilde uygulanabilir olduğundan alternatiflerine göre oldukça umut vaat etmektedir [7]. Literatürde TQ'nun iyileştirici etkisini gösteren moleküler yollar tam olarak açıklanmamış olmakla birlikte TQ'nun Alzheimer hastalığı üzerindeki etkisi sadece *in vitro* çalışmalarla belirlenmiştir [8]. Alhebshi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada TQ'nun sıçan hipokampal ve kortikal nöron

hücrelerinde $A\beta_{1-42}$ toksisitesine karşı nöroprotektif etki gösterdiği [8], buna ek olarak yapılan diğer bir çalışmada da TQ'nun $A\beta_{1-42}$ toksisitesinin oluşturduğu mitokondriyel bozukluk ve oksidatif strese karşı koruyucu etki gösterdiği bulunmuştur [9]. Fakat, literatürde henüz *in vivo* Alzheimer modellerinde TQ'nun koruyucu etkisine dair bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu projenin temel amacı sporadik Alzheimer modellerinde TQ'nun hastalığa bağlı gelişen patolojik süreçlerde etkili mRNA ve mikroRNA düzeyindeki değişimlere etkisinin belirlenmesini sağlamaktır. Bunun için iki farklı sporadik Alzheimer modeli (amyloid- β veya STZ ile indüklenmiş) geliştirilmiş ve TQ tedavisi oluşturulmuş sıçanların hipokampus dokusunda Alzheimer hastalığının belirteçleri olan genlerin ekspresyonlarının mRNA düzeyinde incelenmesi ve bunlara ek olarak mikroRNA analizlerinin yapılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

2.1.1 Demans ve Alzheimer Hastalığı

Demans (Latince *de-* "uzak" + *mens* (masdarmentis) "mantık"), düşünce bozukluğudur. Halk arasında bunama da denir. Demans, beyin hasarından kaynaklanan kişinin günlük yaşamını sürdürmesinde, zihinsel ve sosyal açıdan güçlükler yaşaması halidir. Demans durumunda beyinde hafıza, dikkat, dil ve problem çözme alanları özellikle etkilenen bölgelerdir. İleri aşamalarda, kişi zaman, yer ve oryantasyonunu kaybeder [10]. Bir çok ülkede en yaygın olarak görülen Alzheimer hastalığı (AH), beyin nöronlarına saldıran, bellek kaybı, düşünce, dil becerileri ve davranışta değişiklik ile sonuçlanan ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır [11]. AH ilk olarak 1906 yılında psikiyatri ve nöroloji uzmanı Alois Alzheimer tarafından yayınlanan bir vakada tanımlanmıştır [12]. Hastalığın başlangıcında hastanın ailesi kişilik ve davranış değişikliklerini fark edip onu Alois Alzheimer'a getirmiştir. Daha sonra Dr. Alzheimer, hastada, demans, bellek, davranış ve dilde bozukluk, ajitasyon ve afazi olmak üzere birçok anormal belirti kaydetmiştir [13]. Hastanın ölümünün ardından Dr. Alzheimer'ın gerçekleştirdiği otopside serebral kortekste küçülme, beyin hücrelerinde körelme gözlemlenmiştir. Otopsi sonucu olarak; Alzheimer hastalığının göstergesi nörofibriler yumaklar ve senil plaklar keşfedilmiştir [2].

AH'nın görülme sıklığı yaşla birlikte katlanarak artar. Bu durum 64-75 yaşındaki bireylerde yaklaşık olarak ~ %3 iken 85 yaş ve üzeri bireylerde ~ %25 olarak görülmektedir. Etiyolojik çalışmalarda AH'nın tek bir faktöre bağlı olmadığı çevresel ve genetik faktörlerin de etkili olduğu bulunmuştur [14].

AH'nın ilk belirtilerini isimleri ve kelimeleri unutma, yakın geçmişi hatırlayamama ve konuşma bozukluğu oluşturmaktadır. Hastalığın ileriki evrelerinde ise; yönelim kaybı (örneğin; kaybolma), kişilik değişiklikleri, karmaşık görevleri uygulama güçlüğü (örneğin; giyinme işlemi) gözlenir [15]. Son evresinde ise; beslenme

güçlüğü, aile bireylerini tanıyamama, postür bozukluğu, halüsinasyonlar, depresyon ve ajitasyon gerçekleşir ve sonuçta hastalar bakıma muhtaç kalırlar [15, 16].

AH oluşum şekline göre; sporadik ve ailesel, başlangıç yaşına göre ise; erken başlangıçlı ve geç başlangıçlı olmak üzere iki şekilde gruplandırılır. Erken başlangıçlı Alzheimer 65 yaş altındaki bireylerde ve seyrek görülür, geç başlangıçlı Alzheimer ise 65 yaş üzerindeki bireylerde ve daha sık görülür [17]. Erken başlangıçlı Alzheimer gen mutasyonları (örneğin; Amiloid Prekürsör Geni) sonucunda oluşurken, geç başlangıçlı AH'nda çevresel etkenler (toksik maddeler; alüminyum gibi) ve genetik faktörlerin (ApoE geninin ϵ 4 allelindeki mutasyon gibi) etkisi söz konusudur [18].

2.1.2 Alzheimer Hastalığı'nın genetiği

AH için en önemli risk faktörü yaştır. Hastaların büyük çoğunluğunun 65 yaşın üzerindeki yaşta (geç başlangıçlı AH) klinik semptomlar geliştirmesine rağmen, hastaların % 2-10'unda hastalığın erken başlamasına (erken başlangıçlı AH) rastlanmaktadır [19]. Bunlardan yaklaşık %40'ı sporadik ve %60'ı dominant ailesel geçişlidir.

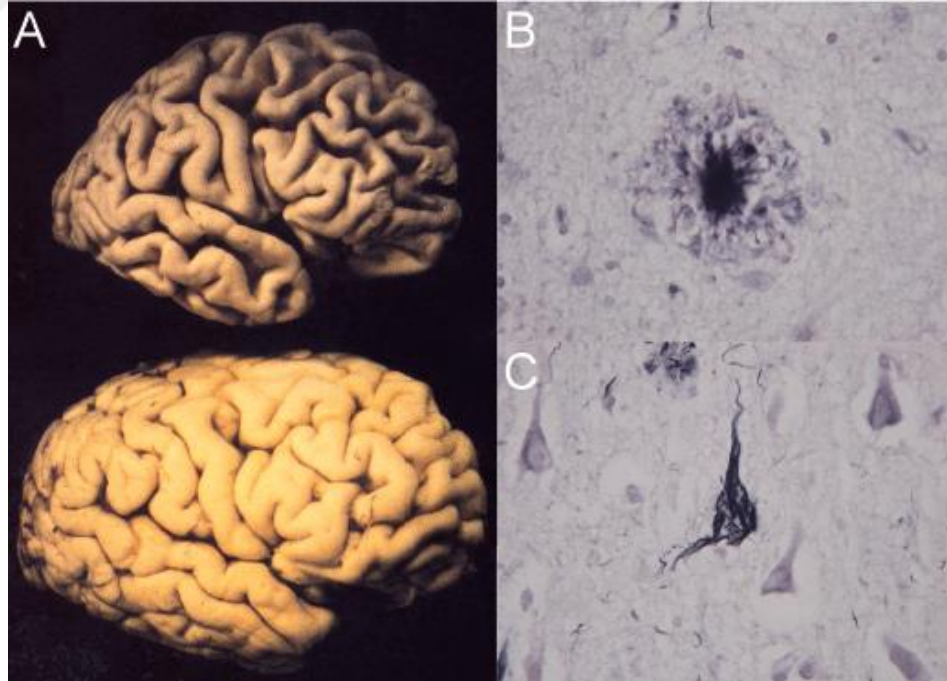
Ailesel erken başlangıçlı Alzheimer Hastalığı'ndan kromozom 1, 14 ve 21 üzerindeki tek gen mutasyonları sorumludur. Mutasyonların her biri anormal protein oluşumuyla sonuçlanır. Kromozom 21'de Amiloid Prekürsör Proteini (APP), Kromozom 14'de Presenilin 1 (PSN 1), Kromozom 1 üzerinde Presenilin 2 (PSN 2) genlerinde mutasyonlar oluşmaktadır. Bu genlerin kodladığı üç protein de nöronal plastisitede rol oynadıkları öne sürülen transmembran proteinlerdir. PSEN1 ve PSEN2 büyük ölçüde homolog genlerdir. PSEN1 mutasyonları tam penetrans ile en şiddetli AH formlarına neden olur ve hastalık başlangıcı 25 yaşına kadar iner. PSEN1 mutasyonlarına kıyasla, PSEN2 mutasyon taşıyıcıları hastalığın başlangıç yaşını (39-83 yaş) gösterir, ancak başlangıç yaşı PSEN2'den etkilenen aile üyeleri oldukça azdır. Bu genlerdeki mutasyonlar APP'den metabolize edilen Amiloid beta ($A\beta$) proteinin atılamayarak amiloid plaklar içinde daha uzun şeklinin ($A\beta$ 42) üretiminin artmasına neden olur [20-22].

Geç başlangıçlı AH genetik ve çevresel faktörlerin kombinasyonu sonucu oluşur. 19. kromozomda bulunan APOE geni sporadik AH risk faktörüdür. APOE, karaciğer, beyin, makrofajlar ve monositlerde eksprese edilen polimorfik bir glikoproteini kodlar. APOE, kolesterol ve diğer lipitlerin taşınmasına katılır ve nöronal büyüme,

doku hasarı tamiri, sinir rejenerasyonu, immün-regülasyon ve lipolitik enzimlerin aktivasyonunda etkilidir. APOE geninin farklı izoformları olan APOE2, APOE3 ve APOE4'ü kodlayan tek bir gen lokusunda üç büyük ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$) allelik varyant içerir [23]. APOE $\epsilon 4$ alleli geç başlangıçlı AH'da riski artırır, ancak hastalığa neden olmak için yeterli değildir. Risk faktörünün APOE $\epsilon 3$ heterozigot taşıyıcılar için üç kat, APOE $\epsilon 4$ homozigot taşıyıcılar için 15 kat olduğu tahmin edilmektedir. $\epsilon 2$ allelinin koruyucu bir etkiye (OR = 0.6) sahip olduğu ve AH'nın başlangıç yaşını $\epsilon 4$ allele göre 20 yıllık farkla geciktirdiği düşünülmektedir. [24]. Kalıtsallığının henüz açıklanamayan kısmı, yıllardır devam eden genetik risk faktörlerini araştırmaya neden olmuştur.

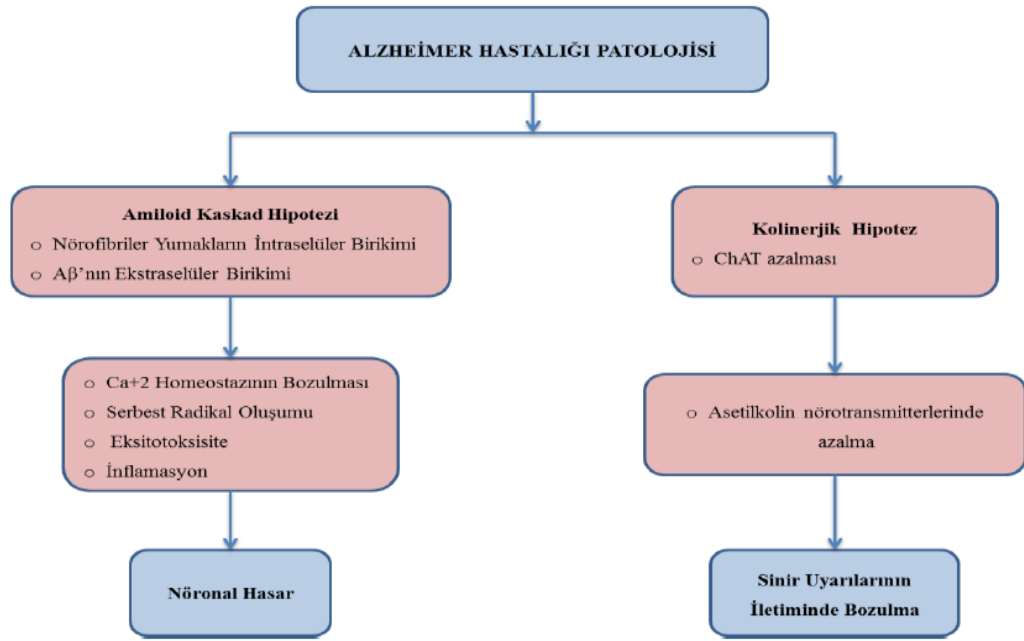
2.1.3 Alzheimer Hastalığı'nın patolojisi

Alzheimer Hastalarının post mortem sonrası beyinlerinde makroskopik olarak köremiş kortikal, genişlemiş oluklar, daralmış girus ve lateral ventrikülde genişleme aynı zamanda hipokampus, temporal ve parietal lob, serebral kortekste atrofi gözlenir. Mikroskopik olarak, hücre dışında senil plaklarda A β proteinin ve hücre içinde nörofibriller yumakları oluşturan mikrotübüllerle ilişkili tau proteinin birikimi gözlenir [25].



Şekil 1: (A) Makroskopik olarak AH beynin (üst şekil) ve sağlıklı insanın beyninin (alt şekil) karşılaştırması. Mikroskopik olarak A β plak (B) ve nörofibriller yumak (C) görüntüsü (<http://uu.diva-portal.org/smash/record.jsf?pid=diva2%3A713716&dswid=5621>)

AH ile ilgili olarak 2 önemli hipotez bulunmaktadır; Amiloid kaskad hipotezi ve kolinerjik hipotez (Şekil 2). Amiloid kaskad hipotezi, patogenezinde ekstraselüler olarak A β peptidinin ve intraselüler olarak nörofibriler yumak yapısının aşırı birikmesiyle başlar. Bu birikim, nöronlarda Ca⁺² homeostazının bozulması, eksitotoksikite, serbest radikal üretimi ve inflamasyon gibi çok sayıda nörotoksik yolağı harekete geçirir. Kolinerjik hipoteze göre ise, kolin asetil transferazın (ChAT) kaybı sonucunda bir nörotransmitter olan asetilkolinin azalmasıyla bilişsel ve hafıza ile ilgili fonksiyonlarda bozulma ortaya çıkar [26].



Şekil 2 : Alzheimer Hastalığı patolojisi [27]

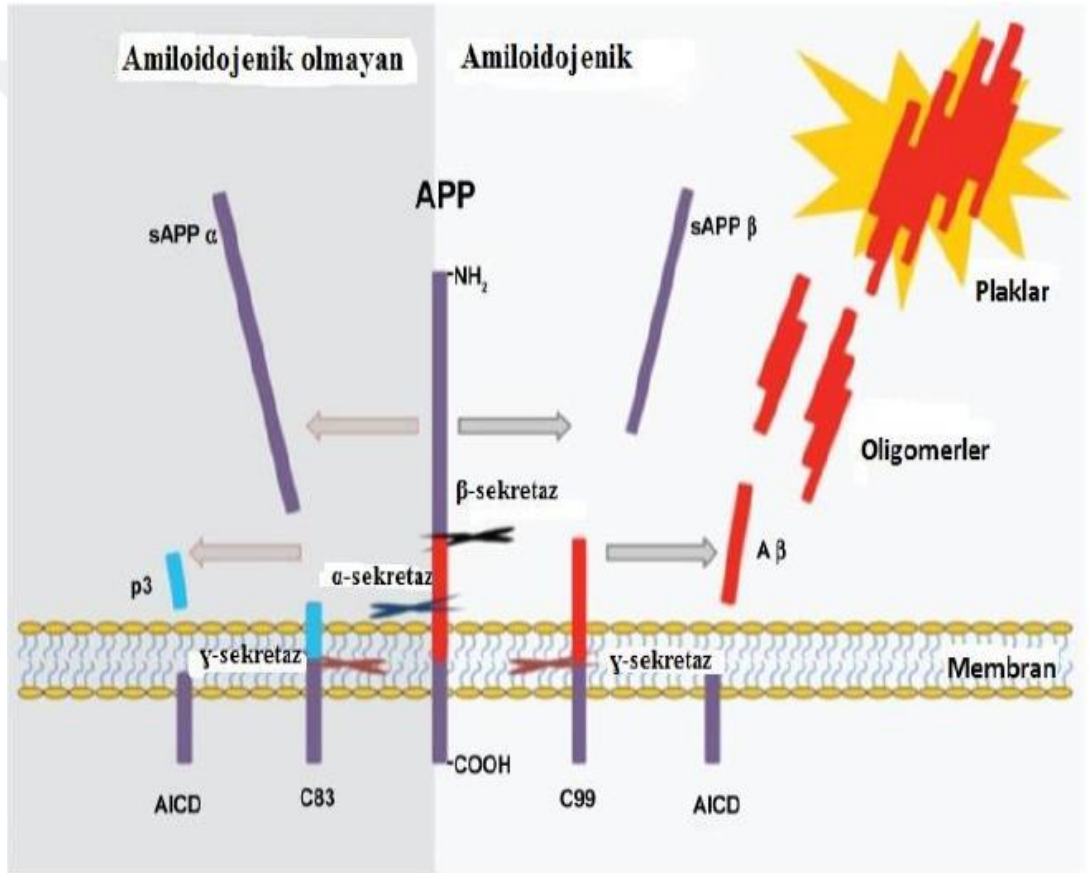
2.1.3.1 Amiloid prekürsör protein ve A β peptidi

A β peptid, senil plakların major komponentidir ve nöronlar, astrositler, glial hücreler ve beyin endotelyumu üzerinde çok sayıda toksik etkisi vardır [27]. A β peptidi, 40-42 aminoasitten oluşan proteindir ve APP'den proteolitik yolla oluşur. A β , APP'nin metabolizma ürünlerindedir. APP'nin nöron gelişimi ve nöronal aktivitenin düzenlenmesinde çok önemli olduğunu bilinmektedir.

AH'nda APP, enzimatik reaksiyonlar ile daha küçük parçalara dönüştürülmektedir [28]. Bu parçalar, nöron hücreleri dışında beta amiloid fibriller şeklinde birikerek senil plak denilen formları oluştururlar [29]. Öncül proteinin birikimi amiloid oluşumunu başlatan ilk basamaktır. Amiloid öncül proteinleri bir araya gelerek

amiloid fibrillerini oluşturur. Amiloid peptid birikiminin, A β 'yla sonuçlanan bir patojenik kaskadın başlangıcı olduğu düşünülmektedir.

APP'nin hücre içi karboksil ucu, hücre dışı amino ucu vardır. A β , APP'nin membran içi 28 aminoasitlik bölgesini de içeren parçasıdır. APP proteolitik enzimle kesilerek metabolize edilir. Enzimlere α , β ve γ sekretaz adları verilir. A β 'nın öncülü olan APP hücrede iki farklı şekilde yıkılmaktadır. APP, γ -sekretaz ve/veya α -sekretaz enzimleriyle kesildiğinde oluşan peptid yıkılabilmektedir ve bu nedenle de amiloid plak oluşturacak özellikte değildir [30]. Ancak APP'nin γ -sekretaz ve β -sekretaz ile kesilmesi durumunda oluşan 40-42 aminoasitlik bir peptid (A β) amiloid oluşturabilme özelliğindedir [31]



Şekil 3: APP'nin amiloidojenik olmayan ve amiloidojenik yolları ile kesilmesi [32]

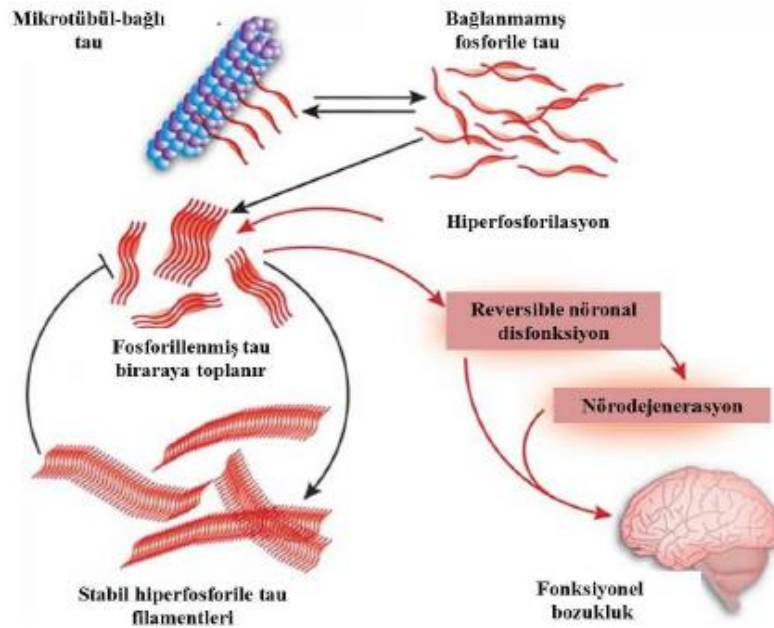
α -sekretaz APP'yi yaklaşık olarak ortasından keser. Kesim sonucunda A β yerine α -APPs ya da sAPP- α adı verilen ekstraselüler yeni protein meydana gelir. β ve γ -sekretazlar, APP'yi amino ucundan veya karboksil ucundan böler. Bölme işleminde ürün olarak A β oluşur ve oluşan A β 40-42 aminoasit uzunluğundadır [33] (Şekil 3). A β 'nın amiloidojenik olanı 42 aminoasitlik form olup ilk çöken de odur [34, 35].

Daha sonra A β diffüz plaklar halinde agrage olur ve nöritik plaklara dönüşür [36]. A β 'nın 40 ve 42 rezidülerinin AH'nda görülen plak oluşumunun majör komponentleri olduğu ve Alzheimer'da görülen nöronal dejenerasyonda çok önemli rol oynadıkları gösterilmiştir [37, 38].

2.1.3.2 Nörofibriler yumak

Nörofibriler yumak (NFY) çoğunlukla kümeleşmiş hiperfosforilize tau proteininden oluşur. Tau proteini mikrotübüle bağlı protein (MAP) ailesinin bir üyesidir. Tau'nun normal işlevi, tübülünü bağlamak ve böylece nöronal aksonlardaki mikrotübülleri stabilize ederek besin maddelerini ve sinir ileticilerini aksonlar boyunca hücre gövdesi ve sinapslar arasında taşınmasına izin vermektir [39].

Alzheimer patogenezinde tau proteininin mikrotübüllere bağlanma yeteneği bozulur. Fosforilize tau çözünemeyen çift sarmallı filamentlere polimerize olur [40]. Fosforilize tau proteinleri zamanla NFY'lar haline gelirler (Şekil 4). NFY'lar, aksonal transportu ve hücre iskeletinin bütünlüğünü bozar, bu nedenle hücre ölümüne sebep olur.



Şekil 4: Tau proteinin düzenlenmesi [41]

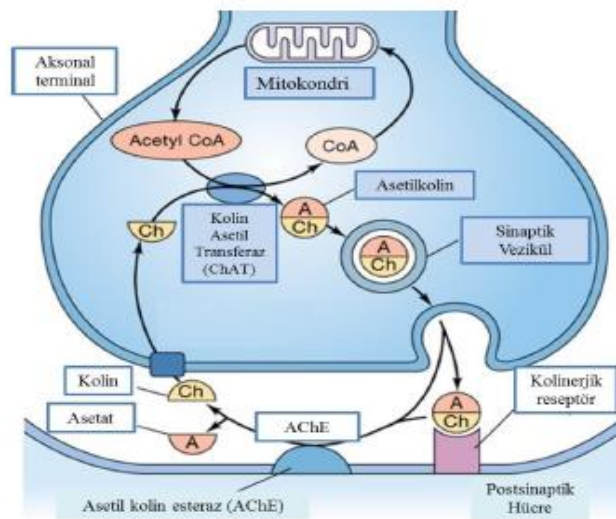
2.1.3.3 Kolinerjik kayıp

AH'nda önemli olarak düşünülen senil plaklar ve nörofibriler yumaklar ile Alzheimer hastalarının beyinlerinde başta asetilkolin (ACh) olmak üzere çok sayıda

nörotransmitter sistem etkilenmektedir. ACh, AH'nda en fazla azalma gösteren nörotransmitterdir [42]. ACh seviyesindeki azalma, sinaptik bozukluğun da en erken belirtilerinden birisidir.

ACh belli kolinerjik nöronların gövdesinde, kolinin asetil CoA ile kolin asetil transferaz (ChAT) enzimi sayesinde katalize edilmesiyle oluşur. Asetil CoA glikoliz reaksiyonunun bir ürünüdür. Kolinin ise besinler ve hücre membranındaki fosfolipidler dışındaki en önemli kaynağı ACh hidrolizi sonucu açığa çıkan ve yeniden asetilkolin sentezinde kullanılan kolindir. ACh'in sinapstaki varlığı, asetilkolini sentezleyen ChAT ve asetilkolini parçalayan asetilkolin esteraz (AChE) enzimlerinin etkinliğine bağlıdır. ChAT enziminin seviyesinin Alzheimer hastalarının hipokampus ile neokorteksinde azaldığı görülmektedir [42, 43].

ACh sentezlendikten sonra, presinaptik nöronlardaki veziküllerde depolanır ve bu veziküller, nörona sinir uyarısı geldiğinde içeriğini sinaptik aralığa döker. Sinaptik aralığa salınan ACh moleküllerinin çoğu postsinaptik reseptörlere bağlanır. Reseptörlere bağlanmayan ACh molekülleri AChE tarafından yıkılır. Postsinaptik nörona bağlanan ACh molekülleri, sinir uyarısının diğer nörona iletilmesinin ardından reseptörden ayrılır, AChE tarafından yıkılır ve açığa çıkan kolin yeniden kullanılmak üzere presinaptik nörona gönderilir (Şekil 5). Çalışmalar, AChE inhibisyonuna bağlı ACh düzey artışlarının, AH'nın erken evrelerindeki kognitif yetmezliği iyileştirebileceğini göstermiştir [44].



Şekil 5: Asetilkolin metabolizması

(http://faculty.pasadena.edu/dkwon/chap%208_files/textmostly/slide58.html)

2.1.4 Alzheimer Hastalığı'nda tedavi

Şimdiye kadar, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Komitesi (FDA) tarafından AH'nın tedavisi için AChE inhibitörü olarak 4 ilaç (Takrin, Donepezil, Galantamin ve Rivastigmin) onaylanmış ve birkaç tane de yeni AChE inhibitörü deneme aşamasına geçmiştir. Bu ilaçlar tek başına semptomatik iyileşme sağlar, ancak hastalık sürecini değiştirmek için daha az etki yapar. Son on yılda AH'daki moleküler ve hücrel patomekanizması hakkında kapsamlı bir bakış açısı, hastalığın anlaşılmasında önemli ilerleme sağlamıştır. Bilişsel belirtilerin tedavisi, beyindeki kimyasal habercilerin etkisini değiştirmeyi amaçlar [45].

Hafif ve orta derece Alzheimer demansı için Donepezil (Aricept®), Rivastigmin (Exelon®) veya Galantamin (Reminyl®) kullanılmaktadır. Fakat bu ilaçların klinik kullanımlarının, yarılanma sürelerinin kısa olması, periferik kolinerjik sistem üzerindeki yan etkileri ve hepatoksisite nedeniyle kısıtlı olduğu bildirilmektedir [46]. Örneğin; takrinin kullanımı karaciğer harabiyetine neden olması bakımından sınırlıdır ve bu nedenle artık kullanılmamaktadır [47]. Donepezil, takrinin dezavantajlarının üstesinden gelmek üzere geliştirilmiş ve onay almıştır. Kullanımında karaciğer üzerinde olumsuz etkiler görülmemiştir fakat kolinerjik yan etkiler göstermiştir [48]. Yan etkileri daha çok da gastrointestinal sistem üzerinden olmuştur. Rivastigmin, prelinik biyokimyasal çalışmalarda belirgin santral sinir sistemi seçiciliği gösterilmiş olan kısmi geri dönüşümlü bir AChE inhibitörüdür [49].

2.2. Kullanılan Hayvan Modelleri

AH için kullanılan hayvan modelleri, hastalığın ilerlemesini etkileyen veya hızlandıran birçok faktöre ışık tutmaktadır. Ayrıca, yeni biyolojik belirteçleri veya potansiyel yeni terapötik hedefleri belirlemek için de bizlere bilgi vermektedir [50]. Aslında, hayvan modellerinin çoğunda ilk amaç, AH'nın nöropatolojik bulgularını taklit etmek ve nöroprotektif ajanların insanlarda ve hayvan modellerinde benzer biyolojik sonuçları olup olmadığını ve bilişsel işlevin korelasyonunu belirlemektir. Hayvan modelleri: Transgenik model ve Transgenik olmayan model üzere ikiye ayrılır [50, 51].

2.2.1 Transgenik olmayan hayvan modelleri

Bu amaçla kullanılan transgenik olmayan modellerden birisi intraserebroventriküler (ICV) enjeksiyon ile streptozotosin (STZ) verilmesidir [52]. STZ her iki lateral

ventriküle uygulandığında; öğrenme, hafıza ve bilişsel fonksiyonlarda uzun süreli ve devam eden bozukluklarla karakterize kronik bir beyin hasarı modelinin oluşmasını sağlar [53].

Transgenik olmayan hayvan modellerinin ikincisi; amiloidojenik kaskad ve A β ile ilgili patolojik yolları hedef alır. Bu yöntemde genel ilke hayvan beynine amiloid peptid enjekte ederek hayvanın Alzheimer hastalığıyla ilgili klinikte belgelenen patolojik özelliklerin bir veya birkaçının taklit edilmesidir. Akut enjeksiyon veya kronik infüzyonda çeşitli A β formları kullanılır. İntraserebroventriküler infüzyon veya intrahipokampal enjeksiyon yoluyla A β 1-40 ve A β 1-42 en sık kullanılan A β formlarıdır [54, 55].

2.2.2 Transgenik hayvan modelleri

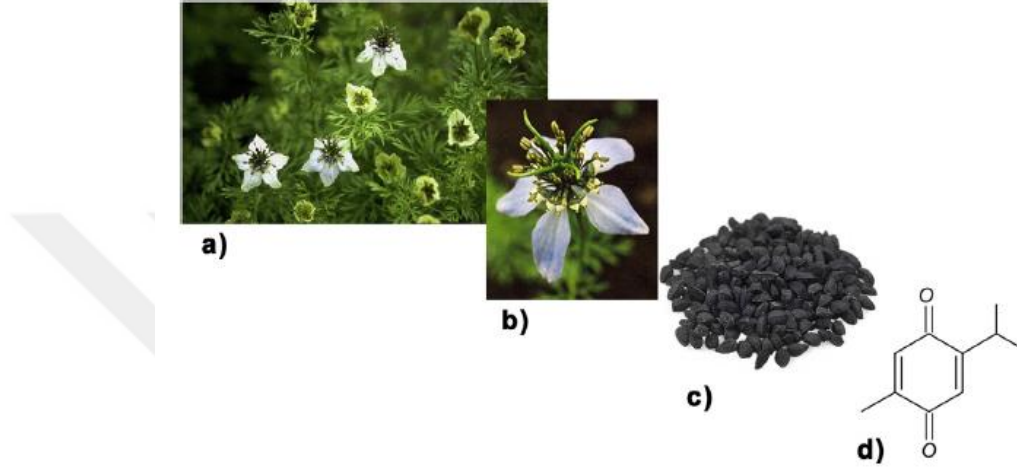
Transgenik hayvan modellerinde en sık kullanılan model farelerdir. Fakat sıçanlar farelere kıyasla daha belirgin avantajlar sunmaktadır. Sıçanlar fizyolojik, genetik ve morfolojik olarak insanlara daha yakındır [51]. Mevcut sıçan transgenik modelleri, inflamasyon ve distrofiknöritlerin varlığı da dahil olmak üzere amiloid patolojisinin tüm yönlerini kopyalarken, "gerçek" insan benzeri nörofibriller yumaklar geliştirmeden tamamlanmamış modeller olarak kalır. Bu zayıf noktalara rağmen, mevcut transgenik sıçan modelleri, hastalık ilerlemesiyle ilgili süreçleri ve mekanizmaları anlamamıza önemli katkıda bulunmaktadır. Tg6590, McGill-R-Thy1-APP transgenik sıçan modellerine örneklerdir. İkisinde de kortekste, hipokampüste aşamalı birikimler söz konusudur [56].

AH araştırması için en yaygın kullanılan transgenik fare modeli Tg2576'dır. Ailesel AH'na (APP K670N / M671L) neden olan mutasyonlarla birlikte insan APP'sini ekspres eder ve serebral A β birikimi plaklar ve kognitif defisitler karakteristiklerinde rol oynar[57] . Bir diğer fare modeli, üçlü transgenik fare (mutasyonlu insan APP'si PSEN1 ve tau taşıyan), hem A β plaklar ve nörofibriler yumaklarda rol oynar [58].

2.3. Timokinon

Timokinon (TQ; 2-izopropil-5-metil-1,4-benzokinon) çörek otu tohumlarının uçucu yağının ana bileşenidir [59]. TQ'nun güçlü bir antioksidan ve anti-inflamatuar özelliğe sahip olduğu bilinmektedir [60]. Doğal olarak tüketilen bir madde olarak TQ, son zamanlarda terapötik özellikleri nedeniyle özel bir öneme sahiptir. TQ lipofilitesi ve küçük boyu sayesinde kan-beyin bariyerini kolaylık geçer [61, 62]. TQ ayrıca morfolojik iyileştirmelere neden olur ve kronik toluen maruziyeti ile nörodejenerasyonu önler [63]. Antioksidan aktivite çalışmalarında sıçanlar üzerinde

yapılan çalışmalarda timokinonun oksidatif hasarlara karşı önemli bir antioksidan ajan olduğu belirtilmiştir [64]. Farelerde embriyo gelişimi esnasında meydana gelebilecek oksidatif hasarlara karşı timokinonun antioksidan aktivite özelliği araştırılmış, timokinon verilen dişi farelerde embriyonun serbest radikallere karşı korunduğu ve fiziksel gelişiminde herhangi bir hasarın olmadığı görülmüştür [65]. Çörek otu yağının artritte rahatlatıcı bir antienflamatuvar etkiye sahip olduğu bilinmektedir [59].



Şekil 6: *Nigella sativa* bitkisi (a), çiçeği (b) tohumu (c); tohumların biyoaktif bileşenin kimyasal yapısı olan timokinon (TQ) (d) [66]

2.4. MikroRNA

miRNA'lar, gen ifadesinin post-transkripsiyonel düzenlenmesinde yer alan, küçük (18-25 nükleotid), tek sarmallı, kodlamayan RNA'ların yeni bir sınıfıdır. Bunların etki mekanizmaları, hedef mRNA'nın bozunması veya translasyonel baskısına neden olan mRNA'nın 3' transle olmayan bölgesi (3' UTR) tamamlayıcı bağlanması yoluyla oluşur [67]. Hücresel çekirdeğinde birincil bir transkript (pri-miRNA) RNA polimeraz II tarafından oluşturulur ve daha sonra RNase Drosha, pre-miRNA adı verilen ve sitoplazmaya taşınan pri-miRNA torelaz saç tokası yapılarını sindirir. Burada Dicer adı verilen başka bir RNase pre-miRNA, daha sonra Argonaute (Ago) proteinlerine bağlanan çift iplikçikli miRNA üretir. Sonra sadece bir strand korunur ve mRNA çevirisini kontrol etmek için RNA ile uyarılan sessizleştirme komplekslerine (RISC) eşlik eder [68].

miRNA'lar proliferasyon, gelişme, apoptoz, inflamasyon gibi neredeyse tüm biyolojik süreçlerde yer alırlar ve olgun miRNA'ları stabilize eden enzimler, DNA metilasyonu ya da histon modifikasyonu gibi epigenetik mekanizmalarla

ekspresyonları düzenlenir [69]. Farklı kronik hastalıklarda miRNA profillemesi üzerine yapılan birkaç çalışma ile gösterilen miRNA'lar, belirli bir dokuya özgü ve zamansal dağılım gösterirler ve tüm insan biyolojik sıvılarında bulunurlar. Özellikle, bu küçük RNA'ların, beyin omurilik sıvısında (BOS) ve kanda dengeli oldukları gösterilmiştir; muhtemelen bu sayede lipozomlar veya lipoproteinler tarafından parçalanmaları önlenerek taşınabilmektedirler [70, 71].

miRNA seviyelerini ölçmek için farklı yöntemler kullanılabilir. Bunlardan en yaygın kullanılan mikroarray ve kantitatif PCR'dır. Mikroarray analizi, birkaç miRNA'nın analiz edilmesi gerektiğinde hedefe yönelik olmayan bir yaklaşım için kullanılan yüksek teknoloji bir yöntemdir. Kantitatif PCR, daha duyarlıdır ve çoğunlukla mikroarray analizinden elde edilen sonuçların doğrulanması için kullanılan yöntemdir [72].

Profilleme teknikleri kullanılan çeşitli çalışmalarda, AH insan beyinde miRNA'ların düzensiz olduğunu, deneysel koşullarla ilgili bazı farklılıklara rağmen gösterilmiştir. Erken başlangıçlı AH patolojisinde serebral kortekste gri madde (GM) ve beyaz maddenin (WM) miRNA'ları arasındaki farkı anlamak için özel olarak miRNA sentezlenmesi değerlendirilmiştir. Çalışmayı yapan bu grup gri madde de regülasyonu azalan birçok miRNA'yı, gri maddeye yakın dokularda amiloid plak yoğunluğuyla ilişkilendirmişlerdir [73].

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1 Kullanılan Cihazlar

- Stereotaksi
 - Hayvanlarda beyin içi enjeksiyonda koordinatları hesaplamak ve sabit tutmak için kullanıldı.
- MAY-PA Passive Avoidance System
 - Hayvanlarda bellek parametrelerini ölçmek için kullanıldı.
- Morris Su labirenti
 - Hayvanlarda bellek parametrelerini ölçmek için kullanıldı.
- Leica LM 15105 Kriostat
 - Donmuş beyin dokusu kesitlerinin alınması için kullanıldı.
- Next Advance Bullet Homojenizatör
 - Dokuların yüksek devirde parçalanması için kullanıldı.
- Nüve 1200R Soğutmalı Santrifüj
 - Soğuk koşullarda santrifüj yapma olanağı sağladı.
- ThermoScientific Multiscan Go
 - Nanospektrofotometrik ölçümlerde kullanıldı.
- Runik Thermal Cycle
 - PCR tekniği için kullanıldı.
- BioRad CFX Connect Real Time PCR
 - Real Time PCR tekniğinde kullanıldı.
- Nikon TS100 Upright Mikroskop
 - Kesit görüntülenmesi için kullanıldı.
- IC Sıvı Nitrojen Tankı
 - Dokuların sıvı azot içinde dondurulması için gereklidir.

3.1.2 Kullanılan Malzemeler

- A β (1- 42) Rat Sigma-Aldrich
 - Model oluşturmak için kullanıldı.
- Alzet mini ozmotik pompa
 - Model oluşturmak için kullanıldı.
- Locit yapıştırıcı
 - Model oluşturulan hayvanda pompayı sabitlemek için kullanıldı.
- SensiFAST SYBR Green
 - Real Time PCR'da kullanıldı.
- qScript cDNA sentez kit
 - cDNA sentezi yapılmak için kullanıldı.
- qScript mikroRNA cDNA sentez kit
 - mikroRNA'yı cDNA'ya çevirmek için kullanıldı.
- USCN ELISA kit
 - ELISA testi yapmak için kullanıldı.
- RINO Tüp next advance
 - miRNA çalışması için kullanıldı.
- Thermo Scientific GeneJET RNA Pürifikasyon kit
 - RNA izolasyonu için kullanıldı.
- RNaseZAP
 - RNA çalışmalarında ortamı RNase free yapmak için kullanıldı.
- Phospho-PHF-tau Antikoru
 - Fosforilettau boyaması için kullanıldı.
- Thymoquinone Aldrich
 - Tedavi amaçlı kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1 Hayvan Çalışmaları

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deneysel Hayvanları Araştırma Etik Kurul komitesinden 9.2015/ 26 sayılı etik onayı alınarak ve deneysel hayvanlarının bakım ve kullanımı ile ilgili rehber çalışma süresince (NIH publication No. 85-23, revised 1996) takip edilerek uygulamalar yapıldı.

52 adet dişi *Sprague Dawley* sıçan (250 gr–330 gr) rastgele bir şekilde 8 deney grubuna ayrıldı. Sıçanlar Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deneysel Hayvanları Ünitesi'ndeki sıcaklık ve ışık kontrollü bir odada (21 ± 2 °C ve 12 saat aydınlık/ 12 saat karanlık döngüsü) sıçan yemi ve musluk suyu ile serbest olarak beslendi. Hayvan grupları aşağıdaki şekilde belirlenmiştir:

- **Grup 1 (A β):** 15 günlük A β infüzyonunu takiben oluşturulmuş sporadik Alzheimer modeli grubu (15 hayvan),
 - Grup 1.1 (A β):** Alzheimer modeli oluşturulmuş ve gavajla TQ çözücüsü olan mısır yağı verilen grup (7 hayvan),
 - Grup 1.2 (A β +TQ):** Alzheimer modeli oluşturulmuş ve gavajla TQ tedavisi uygulanan grup (8 hayvan),
- **Grup 2 (STZ):** STZ ile beyin içi enjeksiyonu takiben oluşturulmuş sporadik Alzheimer modeli grubu (14 hayvan),
 - Grup 2.1 (STZ):** Alzheimer modeli oluşturulmuş ve gavajla TQ çözücüsü olan mısır yağı verilen grup (6 hayvan),
 - Grup 2.2 (STZ+TQ):** Alzheimer modeli oluşturulmuş ve gavajla TQ tedavisi uygulanan grup (8 hayvan),
- **Grup 3 (SHAM-A β):** 15 günlük salin infüzyonunu takiben oluşturulmuş Grup 1'in kontrol grubu (8 hayvan),
- **Grup 4 (SHAM-STZ):** Yapay BOS ile beyin içi enjeksiyonunu takiben oluşturulmuş Grup 2'in kontrol grubu (8 hayvan),
- **Grup 5 (KONTROL):** Sağlıklı hayvanlardan oluşan (hiçbir muameleye maruz kalmamış) TQ çözücüsü olan mısır yağı verilen grup (4 hayvan).
- **Grup 6 (KONTROL-TQ):** Sağlıklı hayvanlardan oluşan (hiçbir muameleye maruz kalmamış) TQ verilen grup (4 hayvan),

3.2.2 A β İnfüzyonu

β -Amiloid (1-42) 1 ml stok hazırlanmak üzere %64,9 dH₂O, %35 asetonitril, %0,1 TFA içeren solüsyonda çözdürüldü. 226 μ M'lık stok çözeltiden toplamda 4200 pmol/200 μ l/pompa olacak şekilde dH₂O ile seyreltme yapıldı. Hazırlanan çözelti 37 °C'de 3 gece çalkalayıcı üzerinde agregasyonu indüklemek amacıyla inkübasyona bırakıldı. 300 pmol/gün salınım yapma özelliğine sahip pompalar kullanımdan bir gece önce aktive edildi [74]. Bunun için, 2 gece boyunca 37 °C'de inkübe edilen agregate β -Amiloid (1-42) çözeltisi dikkatlice pompalara dolduruldu ve infüzyon katateri ve kanülü ile birleştirildi. Daha sonra pompalar izotonik salin solüsyonuna (% 0,9 NaCl) tamamen gömülecek şekilde bir kabın içerisine yerleştirilerek 3. geceyi tamamlamak üzere 37 °C'deki inkübasyonlarına devam ettirildi.

Aktive edilen β -Amiloid (1-42) içeren pompalar inkübatörden alınarak hayvanlara transplante edilmek üzere hazırlandı. 35 mg/kg rompun, 50 mg/kg ketalar anestezisi altındaki hayvanlar stereotaksi çemberine yerleştirilip kafaları sabitlendi. Sağ hipokampus koordinatlarına (AP:-3,60: L:-2,00: V:-4,00) denk gelen nokta belirlenerek kemik matkabı ile kafatasını delme işlemi gerçekleştirildi. İnfüzyon kanüllerinin istenilen derinliğe (V:-4,00) inmesi amacıyla infüzyon kitinden çıkan spacerlar kullandı. 2 adet spacer geçirilmiş kanül kafatasının delinen noktasından dikkatlice beyne sokuldu. Kanülün hareket etmemesi için loctit yapıştırıcı ile kafatasına sabitleme yapıldı. Daha sonra infüzyon kataterine bağlı olan pompa hayvanların sırt bölgesine yerleştirildi. Hayvanlardaki su kaybını telafi etmek amacıyla 1 ml deri altı izotonik salin ve enfeksiyonu önlemek amacıyla da 0.1 ml Sefazon antibiyotik enjeksiyonu yapıldı.

Operasyonları takiben 15 gün sonra hayvanlar rastgele iki gruba ayrıldı. Hayvanların yarısına (n=7, tedavi grubu) mısır yağında çözdürülmüş TQ (20 mg/kg) diğer yarısına (n=8, kontrol grubu) ise aynı miktarda mısır yağı gavaj yoluyla 15 gün boyunca intübe edildi.

3.2.3 STZ Enjeksiyonu

35 mg/kg rompun, 50 mg/kg ketalar anestezisi altındaki hayvanlar stereotaksi çemberine yerleştirilip kafaları sabitlendi. Sağ ve sol hipokampus koordinatlarına (AP:0,80: L: +/- 1,50: V:-3,50) denk gelen nokta belirlenerek kemik matkabı ile kafatasını delme işlemi gerçekleştirildi. Yapay BOS içerisinde çözdürülmüş 3 mg/kg STZ toplamda 20 μ l olacak şekilde bilateral olarak enjekte edildi [75]. STZ

enjeksiyonu iki doz şeklinde uygulandı. Birinci gün kabul edilen ilk muamelenin ardından 1 gün ara verilerek üçüncü günde diğer dozun uygulaması aynı şekilde gerçekleştirildi. Hayvanlardaki su kaybını telafi etmek amacıyla 1 ml deri altı izotoniksalin ve enfeksiyonu önlemek amacıyla da 0.1 ml Sefazon antibiyotik enjeksiyonu yapıldı.

Son enjeksiyon gününü takiben 15 gün sonra hayvanlar rastgele iki gruba ayrıldı. İlk gruba (n=6, tedavi grubu) mısır yağında çözdürülmüş TQ (20 mg/kg) diğer gruba ise (n=8, kontrol grubu) mısır yağı gavaj yoluyla 15 gün boyunca her gün verildi. (6 ml mısır yağında çözdürdüğümüz 120 mg TQ [76]).

3.3. Davranış Deneyleri

3.3.1 Pasif sakinme testi

Deney düzeneği paslanmaz ızgara çelik tabanlı elektrik şoku verilmeyen aydınlık oda 40x30x26 cm ebatlarında (2000 lümen aydınlatmalı) ve hafif düzeyde elektrik şoku verilebilecek düzenekte hazırlanmış karanlık oda (40x30x 26 cm) olmak üzere iki bölümden oluşmakta ve düzenekte bölmeler arası bir geçiş kapısı (8x4,5 cm) bulunmaktadır [75]. Öğrenme testi sıçanın aydınlık odaya yerleştirilmesi ile başladı ve ortamı keşfetmeleri amacıyla aydınlık ortamdan karanlık ortama geçiş kapısı 20 saniye boyunca kapalı bırakıldı. 20 saniye sonunda kapı açıldı ve aydınlık odadan karanlık odaya geçen sıçanlara karanlık odada yerdeki ızgaralardan 2 saniye boyunca elektrik şoku verildi. Hayvanlar karanlık odadan tekrar aydınlık odaya geçtiklerinde deney bilgisayar yazılımı ile otomatik olarak sonlandırıldı. Kısa süreli bellek değerlendirilmesi için 1 saat sonra aydınlık odaya yerleştirilen hayvanların karanlık odaya geçiş süreleri hesaplandı. Uzun süreli belleği değerlendirmek için 24 saat ve 72 saat sonra tekrar aydınlık odadan karanlık odaya geçiş süreleri değerlendirildi. Üç farklı günde yapılan bu deneyde hayvanların odalar arası geçiş süresini değerlendirmek için maksimum bekleme süresi 300 saniye olarak belirlendi [75].

3.3.2 Morris su labirenti

Morris tarafından sıçan ve farelerin kısa süreli bellek, uzun süreli bellek ve uzaysal bellek parametrelerini ölçmek için geliştirilen test, 51 cm yüksekliğinde ve 210 cm çapında su dolu (23°C sıcaklıkta) silindir bir tanktan oluşmaktadır. Deney başlangıcında, su dolu havuza toksik olmayan yeşil renkli gıda boyası dökülerek havuzun yüzeyinin ve kaçış platformunun sıçan tarafından görülmesi önlendi. Su labirentinin dört tarafını çevreleyen duvarlara sıçanın konum tahmini yapabilmesi için farklı şekillerde görsel ipuçları yerleştirildi (üçgen, yuvarlak, kare). Havuzun

dörtte birlik kısmının rastgele bir bölgesine su yüzeyinden 1 cm içeriye hayvanın göremeyeceği seviyede kaçış platformu yerleştirildi. Sıçanlar her gün dört deneme ile havuzun farklı kutuplarından (doğu, batı, kuzey, güney) suya bırakılarak suyun içinde gizlenmiş olan platformu 60 sn içinde bulmaya çalıştı. İlk gün 60 sn içinde platforma ulaşamayan sıçanlara platform konumu gösterildi. Sıçanların günlük dört denemede platforma ulaşma süreleri kaydedildi. 7. gün testin prob denemesi yapıldı. Su labirentindeki kaçış platformu prob denemesinde çıkarıldı. Sıçanlar önceki denemelerde olduğu gibi tankın herhangi bir kutbundan suya bırakıldı ve bir dakika boyunca kaçış platformunun önceden bulunduğu çeyrek bölge içerisinde hayvanların vakit geçirme süresi hesaplandı.

3.4. Dokuların alınması

Davranış deneylerinin tamamlanması ile birlikte isofloran anestezisi altındaki hayvanlar dekapitasyon ile sakrifiye edildi. Sakrifiye olan hayvanlardan alınan beyin dokuları kuru buz üzerinde dondurularak -80 °C dondurucuya saklanmak üzere kaldırıldı.

Donmuş beyin dokuları krayoprotektan mediumlara gömülerek krayostat cihazında 20 µm kalınlığında hipokampus seviyesinden kesildi, pozitif yüklü lamlara toplandı. Dokular ısı ile fiksasyonun ardından -80°C dondurucuya kaldırıldı. Kesitlerin bir kısmı da miRNA çalışmasında kullanılmak üzere RNase free tüplere alınıp -80°C dondurucuya kaldırıldı.

3.5. Histolojik Çalışmalar

3.5.1 Cresyl Violet

-80 °C dondurucudan çıkarılan slaytlar 37 °C'lik ısıya ayarlı inkübatörde 30 dakika kurutuldu. Fikse etmek için Paraformaldehitte (PFA) bekletildi. Fosfat tamponunda 5 dakika bekletildi. Suyu giderme aşamasında sırasıyla %70, %95 ve %100'lük etanolde 2'şer dakika, bekletildi. Yağdan arındırma aşamasında Ksilende sırasıyla 5 dakika, 10 dakika ve 1 dakika bekletildi. Kesitleri tekrar rehidre yapmak amacıyla sırasıyla %100, %95 ve % 70'lik etanolde 1'er dakika ve distile suda 30 saniye bekletildi. Boyama aşamasında kresil viyolet solüsyonunda 10 dakika bekletildi sonrasında distile su ile yıkandı kesitler yeniden alkol serisinden geçirilerek dehidre edilip ksilen solüsyonuna alındı ve su bazlı kapama solüsyonu ile kapatıldı.

3.5.2 Congo Red

-80 °C dondurucudan çıkarılan slaytlar 37 °C ısıya ayarlı inkübatörde 30 dakika kurutuldu. Fikse etmek için PFA'da 10 dakika bekletildi. Fosfat tamponunda 5 dakika bekletildi. Hazırlanan CongoRed solüsyonunda 7 dakika bekletildi. Distile su ile 5 dakika süre ile ikişer defa yıkandı. Sırasıyla %50, %70, %80, %95 ve %100'lük etanolde 2'şer dakika bekletildi. Ardından ksilende 2 dakika bekletildi ve entellan yardımı ile kapatıldı.

3.5.3 Amiloid beta immünfloresan

-80 °C dondurucudan çıkarılan kesitler 37 °C ısıya ayarlı inkübatörde 30 dakika kurutuldu. Fikse etmek için PFA'da 20 dakika bekletildi. Antijen kurtarma aşamasında % 1 Sodyum Dedosil Sülfat (SDS) içinde fosfat tamponu ile oda ısısında inkübe edildi ve yine aynı tampon ile 3 kere yıkandı. Kesitler daha sonra % 10 Normal Keçi Serum ve %0,3 Triton X deterjanı içeren fosfat tamponunda 1 saat oda sıcaklığında bekletilerek endojen enzimler bloklanması sağlandı. Birincil antikor solüsyonu %2 NGS, %0,3 Triton X içeren tampon çözeltisinde 1:1000 oranında olacak şekilde A β antikor hazırlandı. Üzeri parafilm ile kapalı olarak bir gece boyunca +4 °C'de bekletilen kesitler ertesi gün fosfat tamponu ile yıkanarak %10 NGS ve %0,3 Triton X içeren tampon çözeltisinde 1:500 oranında hazırlanmış ikincil antikora oda ısısında 2 saat maruz bırakıldılar. İki saatlik sürenin sonunda fosfat tamponu ile yıkanan kesitler DAPI'li kapama medyumuna ile kapatıldı.

3.5.4 Fosforile tau

-80 °C dondurucudan çıkarılan kesitler 37 °C ısıya ayarlı inkübatörde 30 dakika kurutuldu. Fikse etmek için -20 °C'de soğutulmuş Aseton içerisine yerleştirilerek -20°C'de 10 dakika bekletildi. Ardından 5 dakika süre ile 3'er kez fosfat tamponu ile yıkama yapıldı. Kesitler daha sonra % 10 Normal Keçi Serum ve %0,3 Triton X deterjanı içeren fosfat tamponunda 1 saat oda sıcaklığında bekletilerek endojen enzimler bloklanması sağlandı. Birincil antikor solüsyonu (fosforile Tau proteinine karşı geliştirilmiş) %2 NGS, %0,3 Triton X içeren tampon çözeltisinde 1:100 oranında olacak şekilde hazırlandı. Üzeri parafilm ile kapalı olarak kesitler bir gece boyunca +4 °C'de bekletildi. Ertesi gün kesitler 3'er kez 5 dakika süre ile fosfat tamponunda yıkandı. %10 NGS ve %0,3 Triton X içeren tampon çözeltisinde 1:500 oranında hazırlanmış ikincil antikor oda ısısında 1,5 saat olacak şekilde kesitlerin

üzerine damlatıldı. Bir buçuk saatlik sürenin sonunda fosfat tamponu ile yıkanan kesitler DAPI'li kapama medyumunu ile kapatıldı.

3.6. Moleküler Çalışmalar

3.6.1 RNA çalışmaları (mRNA ve mikroRNA)

3.6.1.1 RNA İzolasyonu

Çalışılan ortam, kullanılan cihazlar, araç ve gereçler RNase ZAP temizleme solüsyonu ile steril edildi. -80 °C dondurucudan çıkarılan dokuların üzerine doku ağırlıklarıyla orantılı olarak Trizol^R solüsyonu eklendi. Homojenizasyon için teflon mikro boncuklardan yararlanıldı. Homojenizasyon cihazında 20 sn parçalanmış doku lizatının, süpernatantları temiz tüplere ayrıldı. Trizol miktarı kadar kloroform ilavesinin ardından bu homojenizat iyice karıştırılarak 12000g'de santrifüj edildi. Üst faz alınarak üzerine eşit miktarda % 70 etanol ilave edildi ve DNA'yı elimine eden RNA yakalayıcı kolanlara yüklenerek tekrar 12000g'de santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Daha sonraki yıkama aşamasında kolonlar birbiri ardına yıkama solüsyonları ile muamele edilerek santrifüj edildi. Kolanlara son olarak nükleaz içermeyen su ilave edildi ve 12000 g'de santrifüj işlemiyle elüsyon gerçekleştirildi, böylece RNA'lar izole edildi.

3.6.1.2 RNA Miktarının Ölçülmesi

Örneklerden 2'şer µl alınarak spektrofotometrede 260 nm, 280 nm ve 230 nm dalga boylarında ölçüm yapıldı. Spektrofotometre cihazının hesaplamasına göre örnek konsantrasyonları µg/ml cinsinden hesaplandı

3.6.1.3 cDNA Sentezi

Çalışılan ortam, kullanılan cihazlar, araç ve gereçler RNase ZAP temizleme solüsyonu ile steril edildi. Reaksiyon karışımı (optimize edilmiş tampon çözelti, magnezyum, oligodTprimer, randomprimer ve dNTP seti) ve ters transkriptaz enzimi içeren bir ana karışım hazırlanarak kuyu başına 5 µl olacak şekilde 96 kuyuluk plakalara paylaştırıldı. Eklenmesi gereken su ve RNA miktarları 500 ng RNA'ya denk gelecek şekilde konsantrasyonlarına göre hesaplandı. RNA eklenmesiyle son hacim su ile 20 µl'ye tamamlanarak Runik termal cihazında aşağıda belirtilen koşullarda cDNA sentez reaksiyonu gerçekleştirildi.

- 22°C'de 1 döngü, 5 dk,

- 42°C'de 1 döngü, 30 dk,
- 85°C'de 1 döngü, 5 dk,

Elde edilen cDNA'ların üzerine 80 µl nükleaz içermeyen su eklenerek 1:5 oranında seyreltme yapıldı. Saklanmak üzere cDNA'ları içeren plaka -20 °C'ye kaldırıldı.

3.6.2 miRNA cDNA sentezi

3.6.2.1 PolyA zincir uzatma reaksiyonu

Her çalışma öncesi yapıldığı gibi çalışılan ortam, kullanılan cihazlar, araç ve gereçler RNase ZAP temizleme solüsyonu ile steril edildi. PolyA tampon karışımı (optimize edilmiş PolyA tampon çözeltisi, ATP, magnezyum), su ve PolyA polimeraz enzimi içeren bir ana karışım hazırlanarak 96 kuyulu plakalara kuyu başına 2,2 µl olacak şekilde eklendi. Eklenmesi gereken su ve RNA miktarları 500 ng RNA'ya denk gelecek şekilde konsantrasyonlarına göre hesaplandı. RNA ve suyun eklenmesiyle son total hacim 7,5 µl'ye tamamlanarak Runik termal cihazında aşağıda belirtilen koşullarda cDNA sentez reaksiyonu gerçekleştirildi.

- 37°C'de 1 döngü, 60 dk,
- 70°C'de 1 döngü, 5 dk,

3.6.2.2 Tek zincir cDNA sentezleme reaksiyonu

PolyA kuyruğu uzatma reaksiyonunun ardından örnekleri içeren plaka santrifüj edilerek örneklerin çökmesi sağlandı. Reaksiyon karışımı (optimize edilmiş tampon çözelti, magnezyum, oligodT primer, random primer ve dNTP seti) ve ters transkriptaz enzimi içeren bir ana karışım hazırlanarak kuyu başına 7,5 µl olacak şekilde 96 kuyuluk plakalara paylaştırıldı. Üzerlerine örnek başına 7,5 µl olacak şekilde PolyA zincir uzatma reaksiyonunun ürünleri eklendi ve toplamda 15 µl reaksiyon karışımı elde edildi. Aşağıda belirtilen koşullarda cDNA sentez reaksiyonu gerçekleştirildi.

- 42°C'de 1 döngü, 20 dk,
- 85°C'de 1 döngü, 5 dk,

Elde edilen MikroRNA cDNA'larının üzerine 35 µl nükleaz içermeyen su eklenerek 3:10 oranında seyreltme yapıldı. Saklanmak üzere cDNA'ları içeren plaka -20 °C'ye kaldırıldı.

3.7. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR

3.7.1 Primer Tasarlama

Çalışma kapsamında primer bölgelerinin çoğaltımı için uygun primer çiftleri Sentromer firması tarafından sentez ettirilmiştir. (Tablo 4)

Tablo 1: Gerçek zamanlı PCR’da kullanılmak üzere tasarlanan primerler

Primer Adı	Baz Sayısı	Baz Dizisi (5’- 3’)
miR-26b	21	TTCAAGTAATTCAGGATAGGT
miR-29a	22	TAGCACCATCTGAAATCGGTTA
miR-29c	22	TAGCACCATTTGAAATCGGTTA
miR-124	20	TAAGGCACGCGGTGAATGCC
APP	221	F GGAGCAGA ACTACTCCGACG R CGTCGACAGGCTCAACTTCA
BACE-1	197	F CCAACCTTCGTTTGCCCAAG R GCGGAAGGACTGATTGGTGA
Presenilin-1	235	F ATGCTGGTCGAAACAGCTCA R GACTGTCTCTTTGGGCCTCC
Presenilin-2	178	F AGCTCCCTTACGATCCAGAGA R CCCACCAGAACGCTGTAGAA
APO-E	216	F TTGGGCTGGCGATTACCC R TCAGAAAGCGTCTGCACCCA
TAU	194	F CAGCCATGATTTTGCCACC R GATACAGTGGCTGTGCGAGG
MAP-2	153	F AAAAAGCGGCACCTCAACAC R CTGGGCACCAAGATGCCAAAT
DCX	204	F GTTCATTGCTTGTGGCCCTG R GCGTCTTGGTCGTTACCTGA
NGF	206	F TCGCTCTCCTTCACAGAGTTT R TGCCTGTACGCCGATCAAAA
AKT	185	F CACCGCTTCTTTGCCAACAT

		R CTCCGTTCACTGTCCACACA
BCL-2	243	F GAGGGGCTACGAGTGGGATA R CGGTAGCGACGAGAGAAGTC
NFKB	162	F CAGACACCTTTGCACTTGGC R CTTGAGTAGGACCCCGAGGA
SİNAPSİN	165	F CCTTCAACCTTCCAGAGCCA R CTCAGGACCCAGAGAGGGTT
SİNAPTOFİZİN	197	F AAGGCCTGTCCGATGTGAAG R GCCTGTCTCCTTGAACACGA
BAX	166	F AGGACGCATCCACCAAGAAG R CAGTTGAAGTTGCCGTCTGC
P53	245	F AGTTAGGGGGTACCTGGCAT R AACTCTGCAACATCCTGGGG

3.7.2 qPCR

Gerçek Zamanlı PCR yapmak için; ileri primer, geri primer, su ve reaksiyon karışımı (syber yeşil boyası, DNA polimeraz, dUTP içeren dNTP) plakalara 14 µl olacak şekilde paylaştırıldı. cDNA örneklerinden 1 µl alınarak plakalara eklendi. Aşağıda belirtilen koşullarda gerçek zamanlı PCR reaksiyonu gerçekleştirildi.

- Polimeraz aktivasyonu: 95°C'de 1 döngü, 2 dk,
- Denatürasyon: 95°C'de 1 döngü, 5 sn,
- Primer Bağlanması: 60-65°C'de 1 döngü, 10sn,
- Uzatma: 72°C'de 1 döngü, 15sn,

3.8. ELISA Çalışması

3.8.1 Doku homojenizasyonu

-80 °C dondurucudan çıkarılan dokular kuru buz üzerine alındı. Hassas terazide dokuların ağırlıkları ölçüldü ve 100 mg örnek başına 500 µl olacak şekilde lizis buffer eklendi. Örneklerin üzerine Laemli Tamponu ekledikten sonra normal buz üzerine alındı Homojenizatör cihazında homojenizasyon yapıldı. Vorteksleyip 20 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon ardından tekrar vorteksleyerek +4 °C' de 14.000 rpm 15 dk santrifüj yapıldı. Süpernatantlar başka bir eppendorfa alındı.

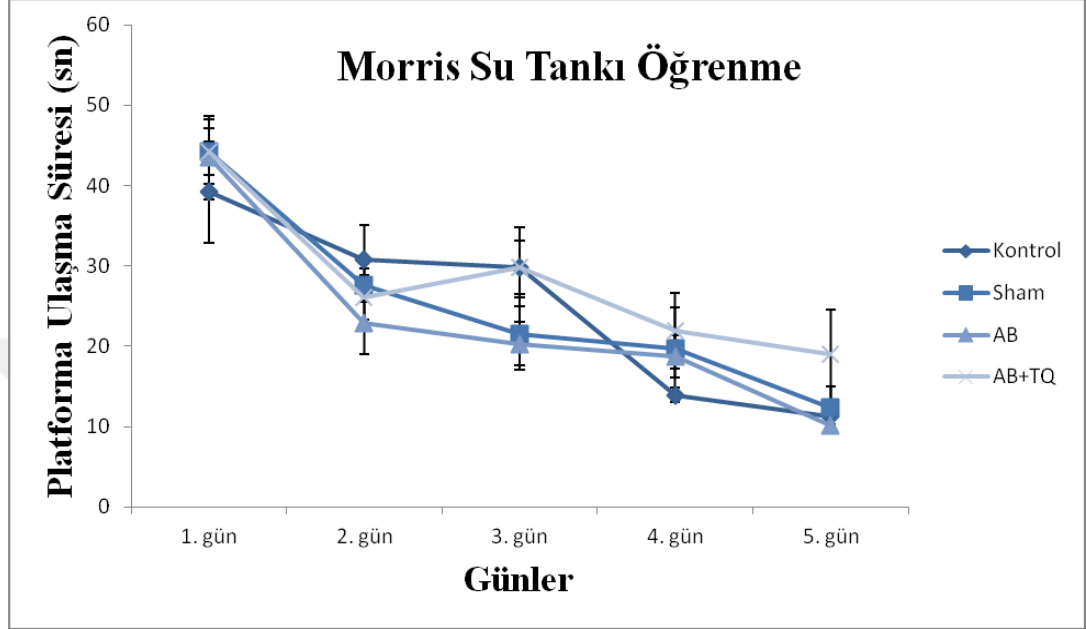
3.8.2 ELISA

Çalışmaya başlamadan önce kit bileşenleri ve numuneler oda sıcaklığına getirildi. Kit ile birlikte gelen 96 kuyuluk plakanın içine 10 µl homojenize doku örnekleri eklendi ve 37 °C'de 2 saat inkübe edildi. Kuyuların içerisinden örnekler aspire edildi. Kuyuların içerisine kitin içerisinde yer alan 10 µl Deteksiyon Ayıracı A ilave edildi ve 37°C'de 1 saat inkübe edildi. 1 saatlik sürenin sonunda deteksiyon ayıracı aspire edilip kuyular 3'er kez yıkandı. Yıkanan kuyuların içerisine kitin içerisinde yer alan 10 µl Deteksiyon Ayıracı B ilave edildi ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından deteksiyon ayıracı aspire edilip kuyular 5'er kez yıkandı. Bir sonraki aşamada kuyulara kitin içerisinde yer alan 90 µl substrat çözeltisi eklendi ve 37°C'de 15 dakika inkübe edildi. Kitin içinde yer durdurma solüsyonunu da kuyulara 50µl ölçüsünde eklendi. Ardından Thermo scientific multi scan go cihazında 450 nm'de okuma yapıldı.

4.BULGULAR

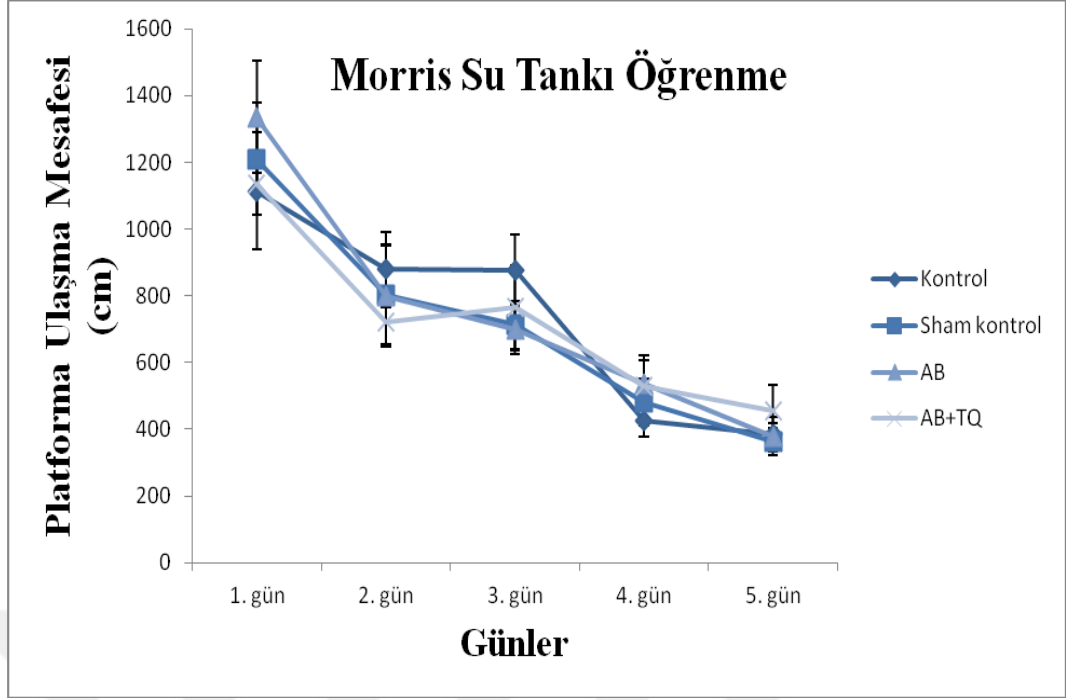
A β ve STZ modeli oluşturulan hayvan gruplarının tüm deneysel çalışmalarında gruplara kendi arasında değerlendirme yapıldı.

4.1 Morris Su labirenti



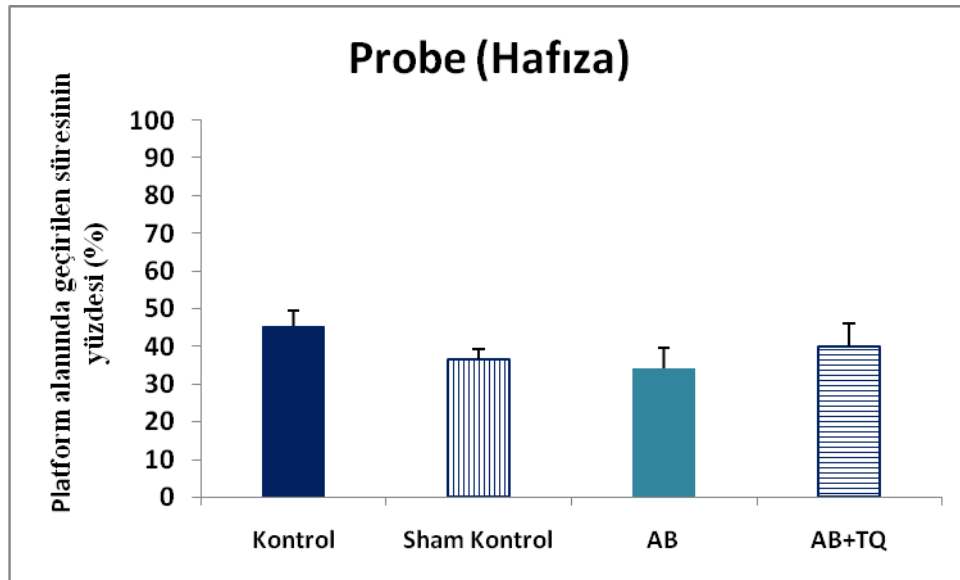
Şekil 7: Amiloid Beta infüzyonu ile yapılan Alzheimer modelinde Morris su labirenti öğrenme deneyi (yüzülen süre)

Şekil 7 'de görüldüğü üzere ve tekrarlı ölçüm ANOVA verilerine göre günler arasında ($F_{(4,84)}=37,580$ $p<0.001$) anlamlı bir değişiklik bulunurken 5 günlük yer öğrenme deneylerinde gruplar arasında ($F_{(3,21)}=0,893$ $p=0.557$) fark bulunmamaktadır.



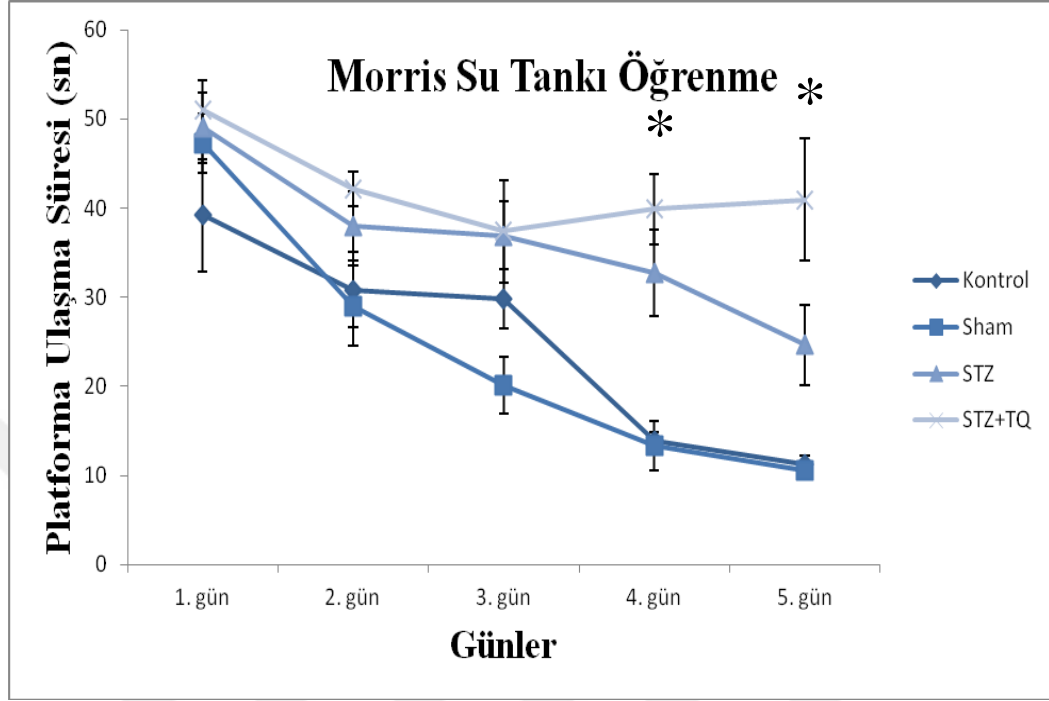
Şekil 8: Amiloid Beta infüzyonu ile yapılan Alzheimer modelinde Morris su labirenti öğrenme deneyi (yüzülen mesafe)

Şekil 8 'de görüldüğü üzere ve tekrarlı ölçüm ANOVA verilerine göre günler arasında ($F_{(4,84)}=36,847$ $p<0.001$) anlamlı bir değişiklik bulunurken 5 günlük yer öğrenme deneylerinde yüzülen mesafeye bakıldığı zaman gruplar arasında ($F_{(3,21)}=0,06$ $p=0,980$) fark bulunmamaktadır.



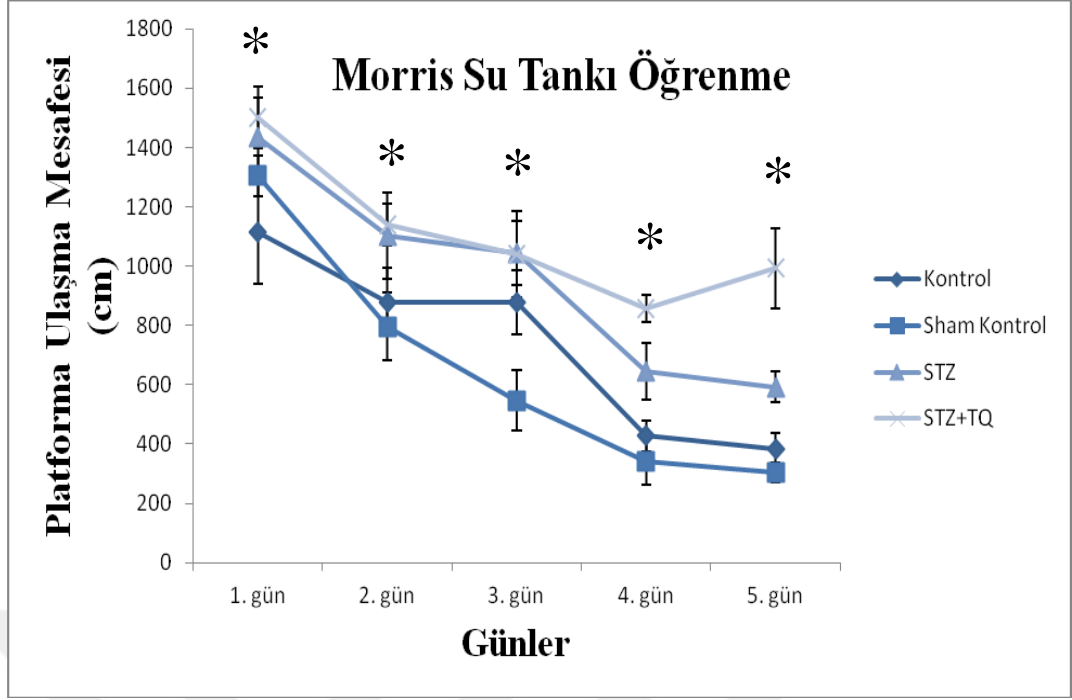
Şekil 9: Amiloid Beta infüzyonu ile yapılan Alzheimer modelinde Morris su labirenti deneyinde bellek ölçümü

Öğrenme deneylerinde olduğu gibi hafıza ölçümleri için kullanılan platformsuz probe deneylerinde de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($F_{(3,23)}=1,092$ $p=0,375$) (Şekil 9).



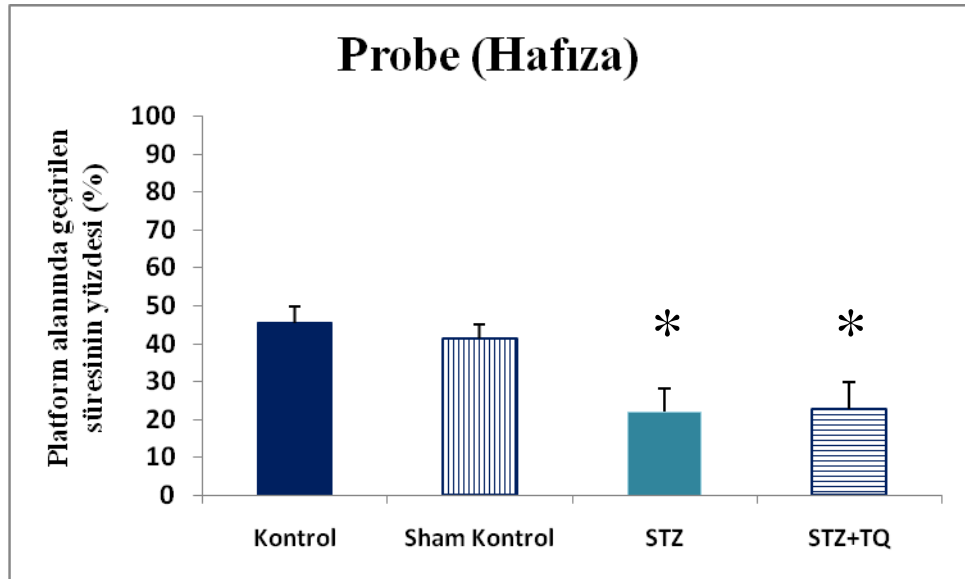
Şekil 10: STZ enjeksiyonu ile yapılan Alzheimer modelinde Morris su labirenti öğrenme deneyi (yüzülen süre)

Şekil 10 'da görüldüğü üzere ve tekrarlı ölçüm ANOVA verilerine göre günler arasında ($F_{(4,92)}=31,856$ $p<0,001$) anlamlı bir değişiklik bulunurken 5 günlük yer öğrenme deneylerinde yüzülen mesafeye bakıldığı zaman da gruplar arasında ($F_{(3,23)}=12,774$ $p<0,001$) istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır. Gruplar arasındaki farklılık özellikle 3. Günden sonra anlamlı seviyelerde seyretmiş ve STZ grubundaki hayvanlarda kontrol ve sham kontrol grubuna göre yer öğrenmede gecikme gözlenmiştir. TQ verilen grupta ise bu gecikme daha da artmıştır ($p<0,05$).



Şekil 11: STZ enjeksiyonu ile yapılan Alzheimer modelinde Morris su labirenti öğrenme deneyi (yüzülen mesafe)

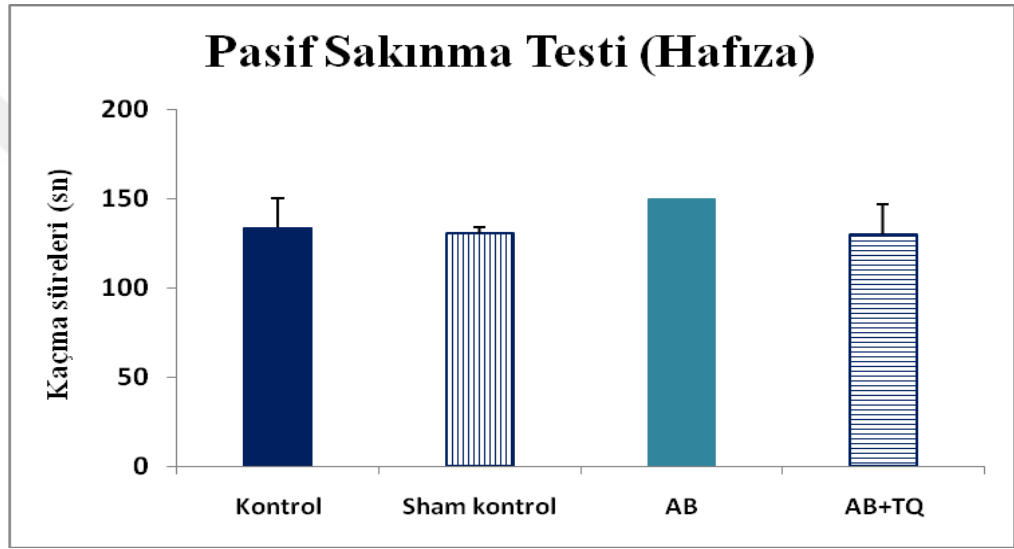
Kaçış platformuna ulaşıncaya kadar geçen sürede görüldüğü gibi platforma ulaşıncaya kadar yüzülen mesafede de istatistiksel olarak hem günler arasında ($F_{(4,92)}=45,696$ $p<0.001$) hem de gruplar arasında ($F_{(3,23)}=12,699$ $p<0.001$) anlamlı bir farklılık bulunmaktadır.



Şekil 12: STZ enjeksiyonu ile yapılan Alzheimer modelinde Morris su labirenti deneyinde bellek ölçümü

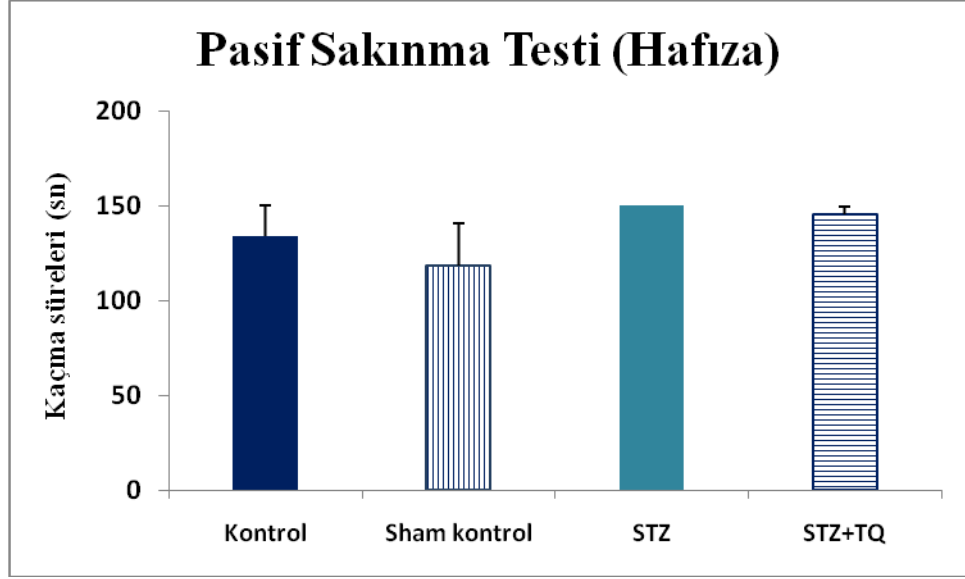
Öğrenme deneylerinde olduğu gibi hafıza ölçümleri için kullanılan platformuz probe deneylerinde de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmiştir ($F_{(3,23)}=4,945$ $p=0,010$) (Şekil 6). Tek yönlü varyans analizine göre STZ enjeksiyonu yapılan grupta hem kontrol grubuna oranla ($p=0,007$) hem de sham kontrolüne ($p=0,022$) oranla hafızada bir azalma görülmektedir. TQ verilen grupta ise yine kontrol ($p=0,009$) ve sham kontrol grubuna ($p=0,027$) oranla anlamlı bir azalma bulunurken tedavi edilmeyen gruba oranla bir iyileşme gözlenmemiştir ($p=0,925$).

4.2 Pasif Sakınma Testi



Şekil 13: Amiloid Beta infüzyonu ile yapılan Alzheimer modelinde sıçanların pasif sakınmada gösterdikleri korku hafızası performans sonuçları

Tek yönlü ANOVA yapıldığında Amiloid Beta infüzyonu ile yapılan Alzheimer modelinde sıçanların pasif sakınmada gösterdikleri korku hafızasında gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark gözlenmemiştir ($F_{(3,25)}=0,454$ $p=0,717$) (Şekil 13).

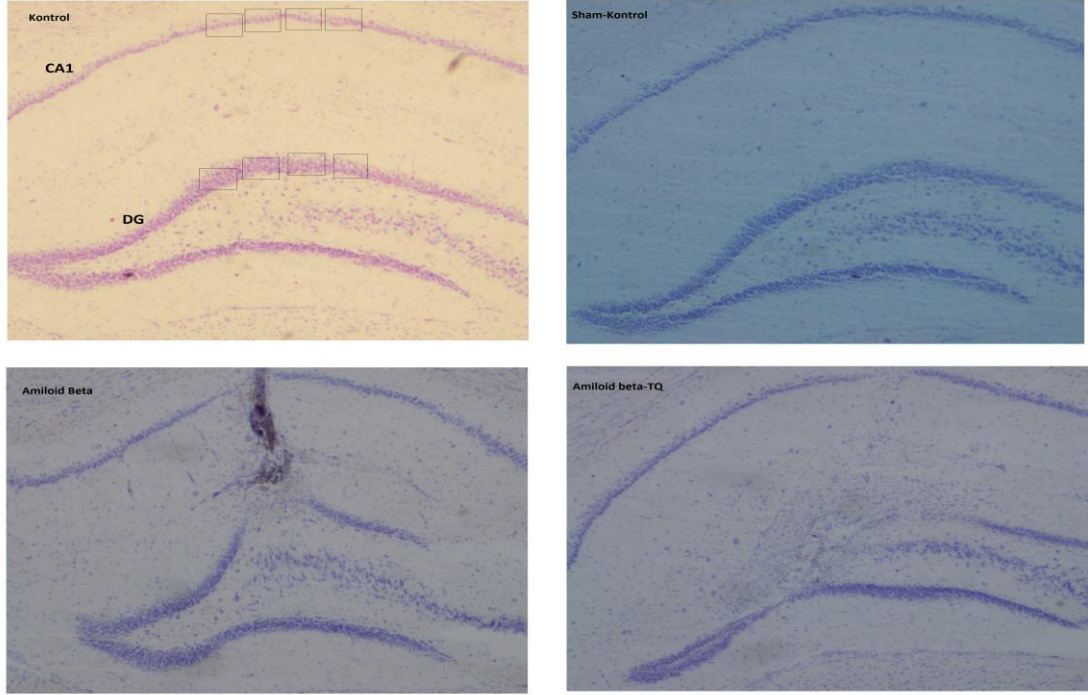


Şekil 14: STZ enjeksiyonu ile yapılan Alzheimer modelinde sıçanların pasif sakınmada gösterdikleri korku hafızası performans sonuçları

Tek yönlü ANOVA yapıldığında STZ enjeksiyonu ile yapılan Alzheimer modelinde sıçanların pasif sakınmada gösterdikleri korku hafızasında gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark gözlenmemiştir ($F_{(3,24)}=1,058$ $p=0,388$) (Şekil 8).

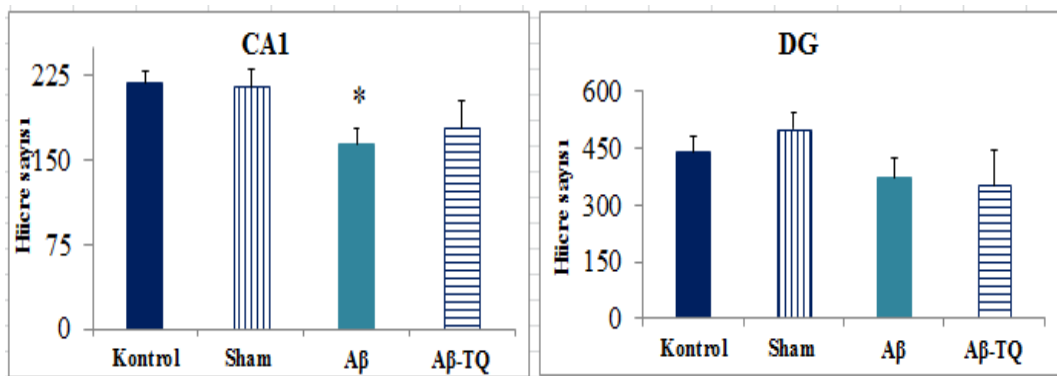
4.3 Histolojik Boyamalar

4.3.1 Nissl Boyaması ve hücre sayımı



Şekil 15: Amiloid Beta infüzyonu ile yapılan Alzheimer modelinde cresyl violet boyaması ile hücre sayısının belirlenmesi

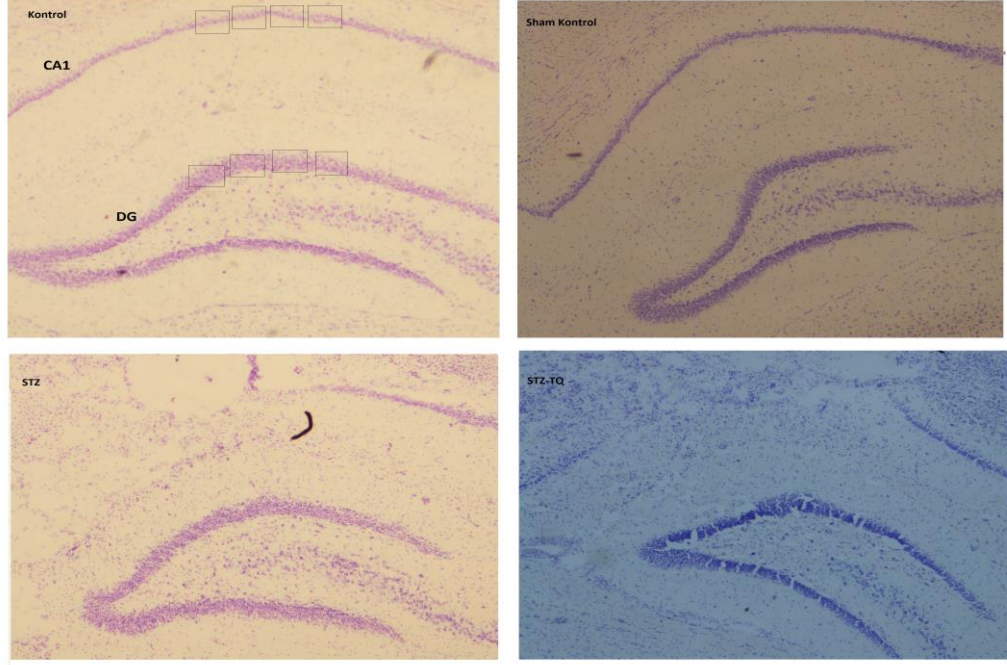
Nissl boyaması ile boyanan kesitlerin her birinde 40X objektifte 250 µm X 250 µm çekilen fotoğraflarda (her bölge için infüzyonun yapıldığı alanı kaplayan 4 adet resim) hücre sayımı yapıldı. Toplam hücre sayıları gruplar arasında karşılaştırıldı.



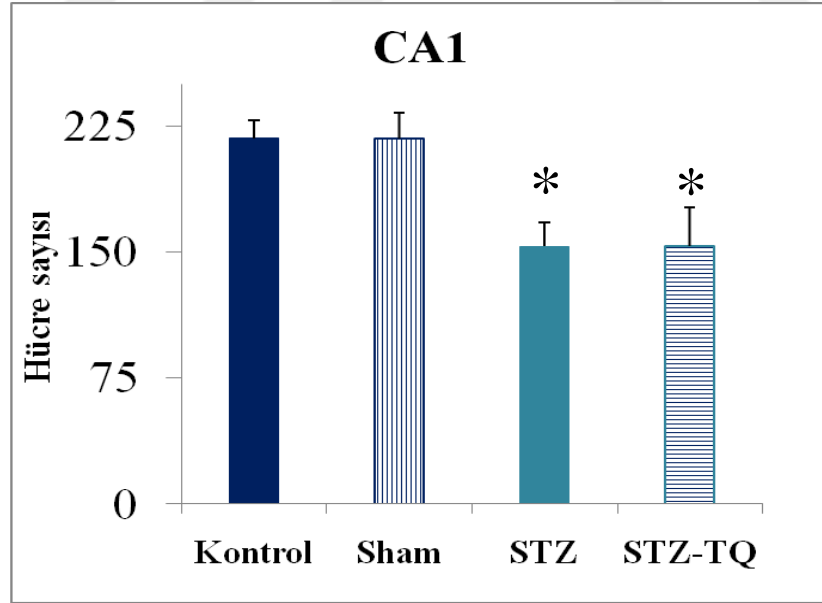
Şekil 16: Amiloid Beta infüzyonu ile yapılan Alzheimer modelinde cresyl violet boyaması ile belirlenen CA1 ve Dentat Girus (DG) hücre sayısı

Tek yönlü ANOVA yapıldığında Amiloid Beta infüzyonu ile yapılan Alzheimer modelinde sıçanların CA1 hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş kaydedildi. TQ verilen grupta ise kontrol ve sham kontrol grubuna oranla anlamlı bir

hücre kaybı gözlenmedi ($F_{(3,30)}=2,792$ $p=0,05$) (Şekil 10). DG granül hücrelerinde ise anlamlı bir değişim kaydedilmedi.



Şekil 17: STZ enjeksiyonu ile yapılan Alzheimer modelinde sıçanların cresyl violet boyaması ile hücre sayısının belirlenmesi

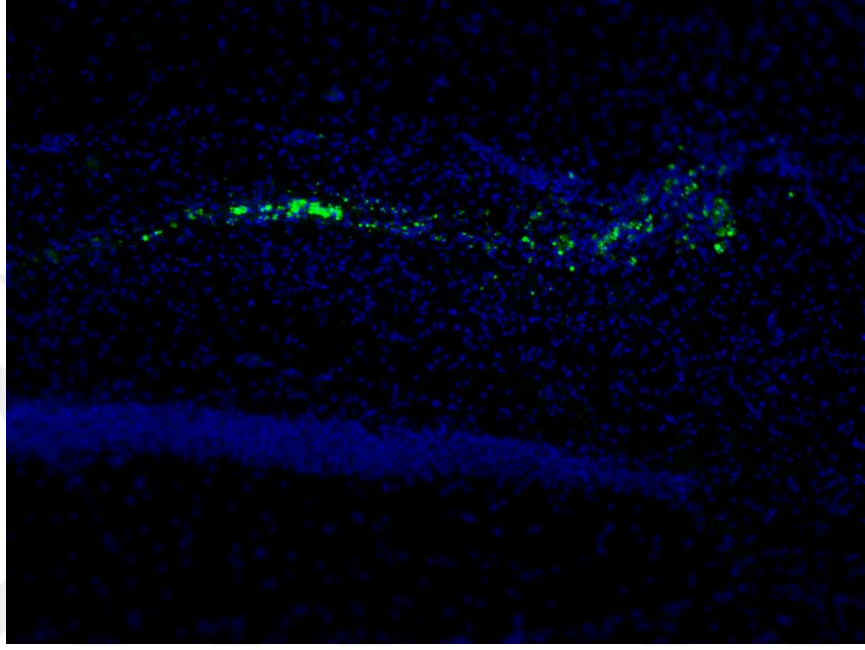


Şekil 18: STZ enjeksiyonu ile yapılan Alzheimer modelinde sıçanların cresyl violet boyaması ile belirlenen CA1 hücre sayısı

Tek yönlü ANOVA yapıldığında STZ enjeksiyonu ile yapılan Alzheimer modelinde sıçanların CA1 hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş kaydedilmiştir.

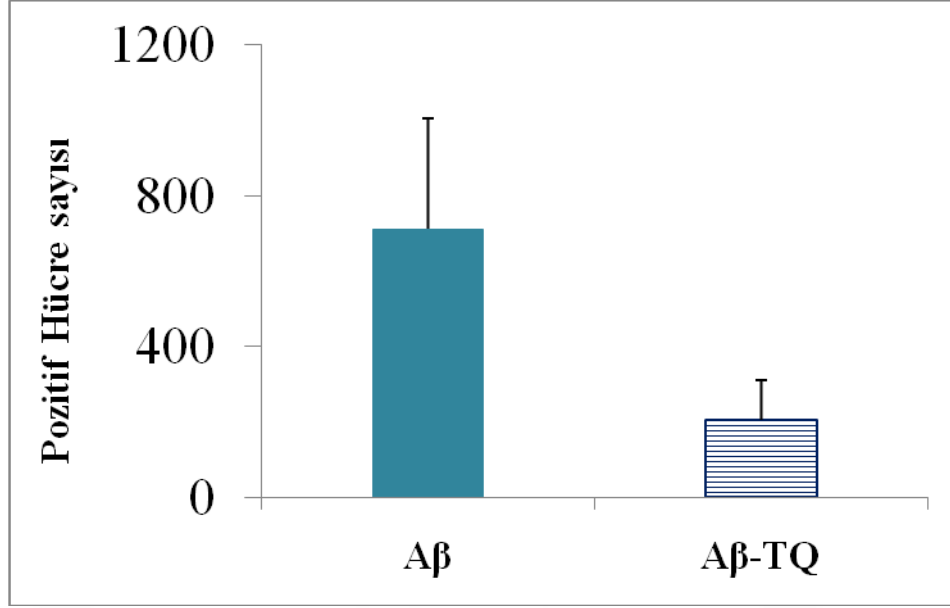
TQ verilen grupta ise kontrol ve sham kontrol grubuna oranla yine anlamlı bir hücre kaybı gözlenmektedir ($F_{(3,28)}=3,760$ $p=0,23$) (Şekil 17 ve Şekil 18).

4.3.2 Amiloid Beta Birikimi



Şekil 19: Amiloid Beta infüzyonu ile yapılan Alzheimer modelinde amiloid beta birikimi (10X)

Amiloid beta antikoru ile yapılan boyamalarda amiloid beta birikimi sadece amiloid beta infüzyonu ile yapılan Alzheimer modelinde görülmüştür (Şekil 19). STZ enjeksiyonu ile yapılan modelde ise amiloid beta birikimi gözlenmemiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda STZ modelinde amiloid beta birikiminin gerçekleşmesi için gerekli sürenin enjeksiyon yapıldıktan 6 ay veya 9 ay sonrası olduğu bulunmuştur[77].

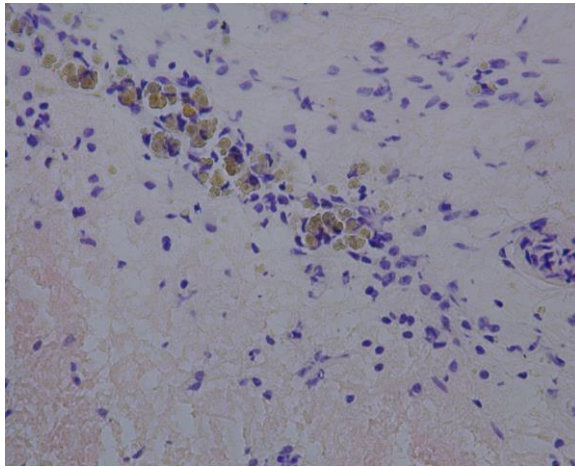


Şekil 20: Amiloid Beta infüzyonu ile yapılan Alzheimer modelinde amiloid beta birikimi ve timokinonun etkinliği

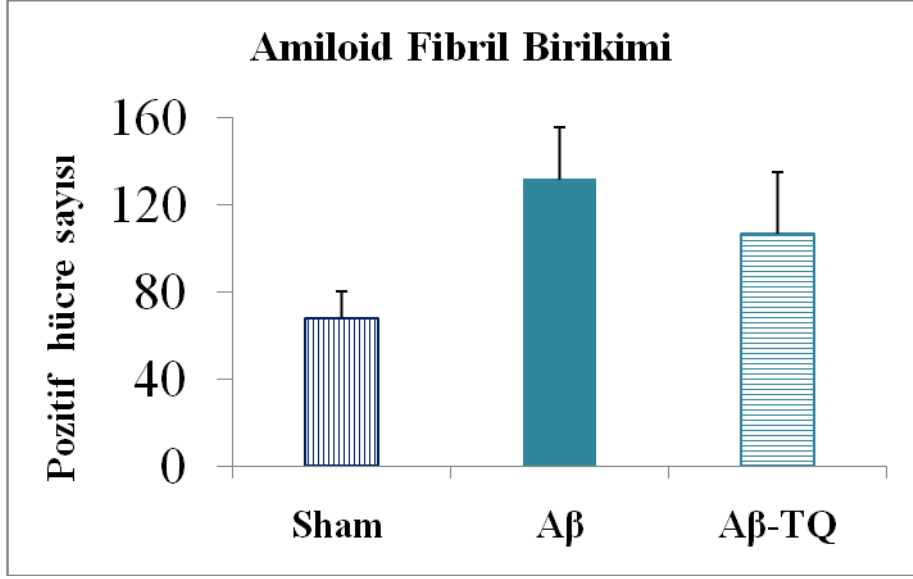
Timokinonun amiloid beta birikimini azalttığı şekil 20’de görülmektedir. Fakat Student’s t test ile yapılan istatistiksel analiz sonucunda bu azalmanın marjinal bir azalma olduğu gözlenmiştir ($p=0.08$).

4.3.3 CongoRed Boyaması

Congored boyaması protein oligomerizasyonunu gösterdiğinden amiloid fibrillerin gösterilmesi için yapılan diğer bir boyama türüdür. Bu boyamada STZ enjeksiyonu yapılan kesitlerde fibril oluşumu görünmemiştir. Bu nedenle değerlendirmeler sadece amiloid beta infüzyonu yapılan örneklerde yapılmıştır.



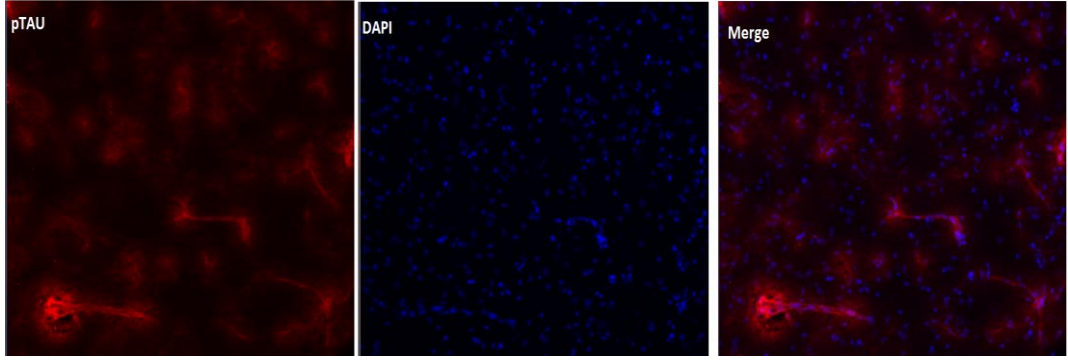
Şekil 21: Amiloid Beta infüzyonu ile yapılan Alzheimer modelinde congored boyaması



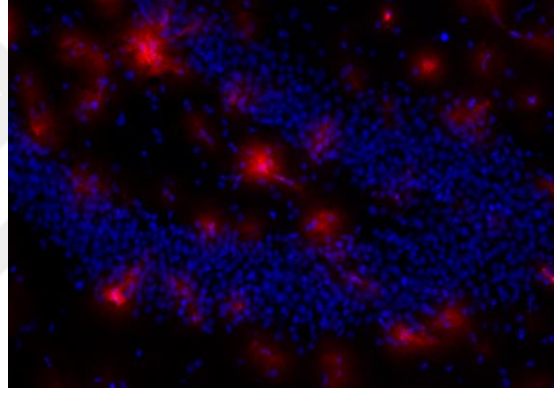
Şekil 22: Amiloid Beta infüzyonu ile yapılan Alzheimer modelinde congored boyaması

Tek yönlü ANOVA yapıldığında Amiloid Beta infüzyonu ile yapılan Alzheimer modelinde amiloid fibril birikimi konusunda bir artma görülmesine rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlı seviyelere ulaşmamıştır ($F_{(2,12)}=2,040$ $p=0,173$) (Şekil 22). Post hoc LSD testlerine göre, amiloid beta verilen grupta biriken amiloid fibril miktarı sham kontrol grubuna oranla marjinal olarak anlamlı bir şekilde artış gösterdi ($p=0.068$). AB+TQ grubunda ise her iki grupta da kıyaslandığında bir fark gözlenmedi.

4.3.4 Fosforile Tau Proteinin İmmunofloresan Olarak İncelenmesi

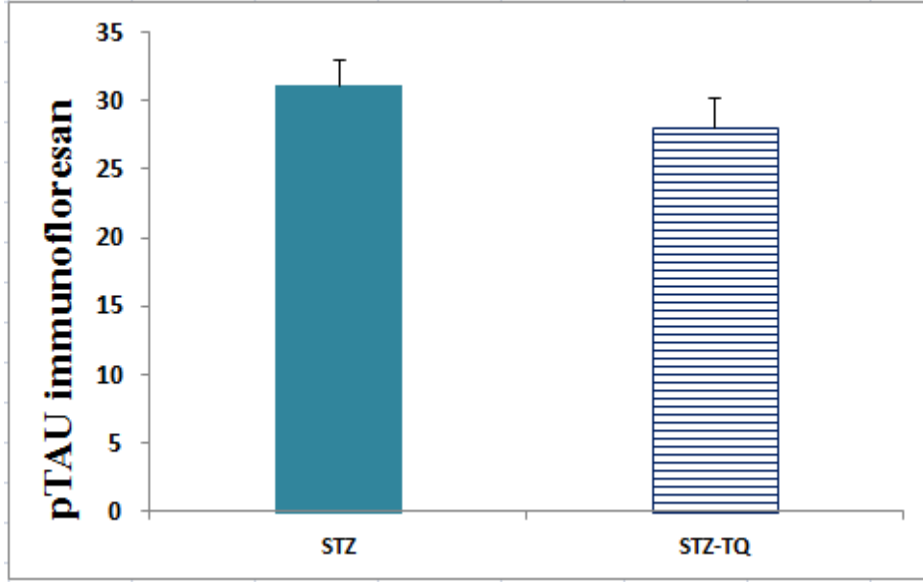


Şekil 23: STZ enjeksiyonu ile yapılan Alzheimer modelinde fosforile TAU proteinin immunofloresan görüntüsü (20X büyütme)



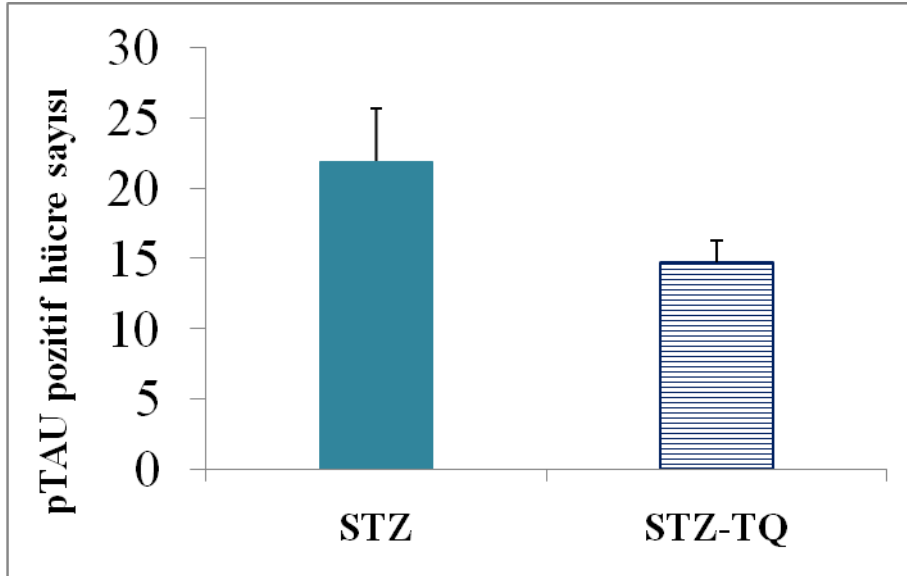
Şekil 24: STZ enjeksiyonu ile yapılan Alzheimer modelinde fosforile TAU proteinin hipokampus DG bölgesinde nörofibriler yumaklar halinde immunofloresan görüntüsü (20X büyütme)

Fosforile TAU antikoru ile yapılan boyamalarda nörofibriler yumakların bir göstergesi olan hiperfosforile tau analizi sadece STZ enjeksiyonu ile yapılan Alzheimer modelinde incelenmiştir (Şekil 24). Yapılan incelemelerde nörofibriler yumak görünümü şeklinde fosforile olmuş tau hipokampus bölgesinde de tespit edilmiştir. Bu bölgeden elde edilen resimlerden image J programı ile dansite ölçümü yapılmıştır.



Şekil 25: STZ enjeksiyonu ile yapılan Alzheimer modelinde fosforile TAU proteinin dansite ölçümü

Timokinonun fosforile TAU immunofloresan dansite ölçümünü azalttığı şekil 25'te görülmektedir. Fakat Student's t test ile yapılan istatistiksel analiz sonucunda bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir ($p=0.30$). Bunu takiben yapılan fosforile tau pozitif alanların sayımında da benzer sonuçlar elde edilmiştir ($p=0.1$) (Şekil 26).



Şekil 26: STZ enjeksiyonu ile yapılan Alzheimer modelinde fosforile TAU alanların sayımı

4.4 Gerçek Zamanlı PCR

Gerçek zamanlı PCR reaksiyonu sonucunda ölçülen C_t (döngü eşiği) değerleri, aktin ile normalize edilerek kontrol gruplarına göre oranlandı ve kat farkları elde edildi (Formül 1). Her gen için hesaplanan kat farkları renklendirilmiş tablolar olarak sunulmuştur. Mavi renk tonlamaları artışı ifade ederken kahverengi tonlamalar azalışı ifade etmektedir.

$$\Delta Ct = Ct(\text{ilgilenilen gen}) - Ct(\text{kontrol gen})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{muamele grubu}) - \Delta Ct(\text{kalibratör grubu})$$

$$\text{Kat Farkı} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Formül 1

4.4.1 A β Modeli oluşturulan hayvanlarda qPCR

Tablo 2: A β modeline göre miRNA'ların artış ve azalış miktarının gösterilmesi

	A β ipsi	A β kontra	A β - TQ ipsi	A β -TQ kontra	Azalış	Artış
					...<1	...<1
					1<...<2	1<...<2
Mir-26b	1,85	1,83	1	1,12	2<...<3	2<...<3
Mir-29a	1,45	1,16	1,16	1,77	3<...<4	3<...<4
Mir-29c	1,87	1,47	1,41	1,2	4<...<5	4<...<5
Mir-124	2,33	1,1	2,51	1,93	5<...	5<...

A β modeli oluşturulan sıçanlarda gerçek zamanlı PCR sonucuna bakıldığında kontrole göre, hem A β modeli hayvanların hem de TQ ile tedavi edilen hayvanların ipsilateral yarımküresinde (A β enjekte ettiğimiz bölge) miR-124 seviyelerinde 2 kat artış gözlenmiştir. Mir-26b, mir-29a, mir-29c seviyelerinde ise kontrole göre anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir.

Tablo 3: A β modeline göre genlerin artış ve azalış miktarının gösterilmesi

	A β ipsi	A β kontra	A β -TQ ipsi	A β -TQ kontra
APP	1,01	1,14	1,08	1,07
BACE1	1	1,46	1,14	1,26
PSEN1	1,36	1,51	1,16	1,62
PSEN2	1,19	1,03	1,04	1,28
APOE	1,36	1,97	1,2	1,42
Tau	1,2	1,59	1,82	2,09
MAP2	2,67	8,31	3,47	14,86
Sinapsin	1,08	1,18	1,15	1,38
Sinaptofizin	1,15	1,09	2,28	1,1
DCX	1,26	2,82	1,2	2,55
NGF	1,17	1,53	1,58	3,07
NFkB	1,41	1,31	1,14	1,02
AKT	1,16	1,53	1,07	1,68
BAX	1,79	1,27	1,09	1,02
p53	1,52	1,11	1,07	1,1

A β modeli ile oluşturulan hayvanlarda gerçek zamanlı PCR sonucunda C_t değerleri kontrole göre kıyaslandığında MAP-2’de A β modelinde ipsilateral yarımkürede 2 kat, A β kontralateral yarımkürede (A β enjekte ettiğimiz bölgenin karşı bölgesi) 8 kat, A β modeli oluşturulup TQ ile tedavi edilen hayvanların ipsilateralinde 3 kat ve kontralateralinde 14 kat azalma gözlenmiştir. NGF’in A β modeli oluşturulup TQ ile tedavi edilen hayvanlarda kontralateral yarımkürede kontrole kıyasla 3 kat düşüş gözlenmiştir. DCX’nin A β modelinin TQ ile tedavisi sonucunda kontralateralde kontrole kıyasla 2 kat azalma gözlenmiştir.

4.4.2 STZ Modeli oluşturulan hayvanlarda qPCR

Tablo 4: STZ modeline göre miRNA'ların artış ve azalış miktarının gösterilmesi

	STZ	STZ-TQ
Mir-26b	1,07	1,02
Mir-29a	1,38	1,34
Mir-29c	1,11	1,13
Mir-124	1,4	3,57

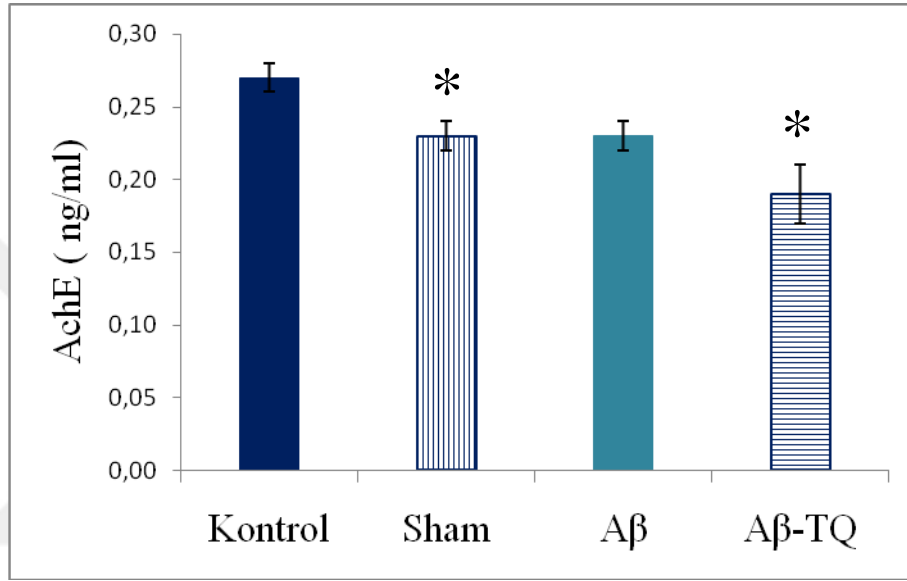
STZ modeli oluşturulan hayvanlarda gerçek zamanlı PCR sonucunda kontrol ile kıyaslandığında STZ modelinde TQ tedavisinin miR-124 seviyelerinde 3 kat artış sağladığı gözlenmiştir. Mir-26b, mir-29a, mir29-c'de ise kontrole göre anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir.

Tablo 5: STZ modeline göre genlerin artış ve azalış miktarının gösterilmesi

	STZ	STZ-TQ
APP	1,02	1,02
BACE1	1,07	1,12
PSEN1	1,52	1,4
PSEN2	1,07	1,18
APOE	2,22	1,94
Tau	1,58	1,84
MAP2	1,38	1,45
Sinapsin	1,24	1,18
Synaptophysin	1,76	2,33
DCX	1,95	1,28
NGF	1,84	1,9
NFkB	1,08	1,07
AKT	1,49	1,48
BAX	1,24	1,35
p53	1,17	1,05

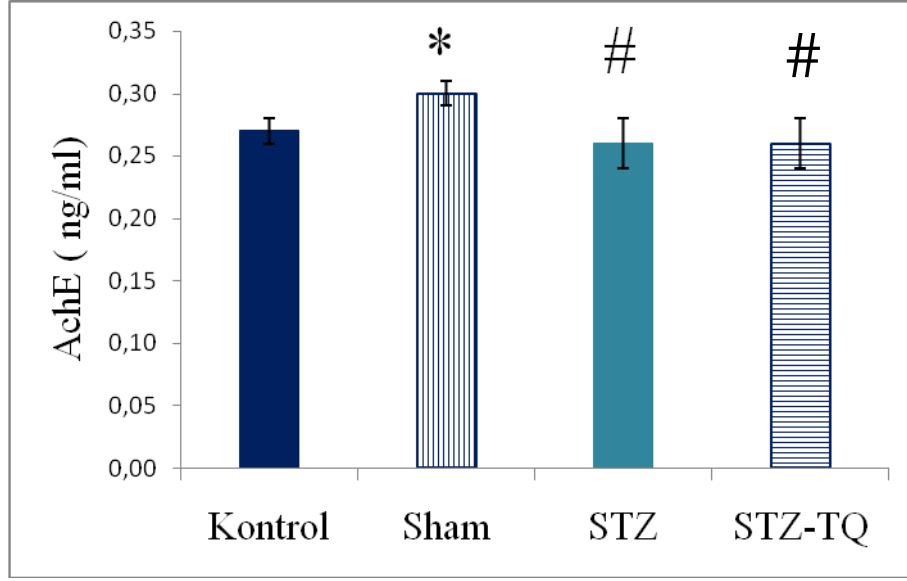
STZ modeli hayvanlarda gerçek zamanlı PCR sonucunda STZ modeli oluşturulup TQ ile tedavi edilen hayvanlarda APOE miktarlarında kontrole göre 2 kat artış gözlenmiştir. Sinaptofizinde ise kontrole kıyasla TQ ile tedavi edilen hayvanlarda 2 kat azalma gözlenmiştir.

4.5 ELISA Testi



Şekil 27: Aβ modelinde AchE miktarının ölçülmesi

ELISA çalışmasına tek yönlü ANOVA yapıldığında Aβ modeli yapılan sıçalarda; sham grubunda ve TQ tedavi grubunda kontrole göre anlamlı bir azalış gözlenmiştir (Şekil 27).



Şekil 28: STZ modelinde AchE miktarının ölçülmesi

Tek yönlü ANOVA ile istatistiksel değerlendirme yapıldığında STZ modeli sıçanlarda; sham grubunda kontrole göre anlamlı bir artış gözlenmiştir. STZ grubunda ve TQ tedavi grubunda ise kontrole göre anlamlı bir değişiklik gözlenmezken sham grubuna göre STZ ve TQ ile tedavi edilen hayvanlarda anlamlı bir azalma gözlenmiştir (Şekil 28).

5.TARTIŞMA

Alzheimer Hastalığında hem tanı hem de tedaviyi hedef alan çalışmalar çok önemlidir [78]. Bu tür çalışmaların birçoğu farklı yöntemlerle geliştirilen hayvan modelleri kullanılarak yapılmaktadır. AH için ilaçlar geliştirmek, hastalığın fizyopatolojisini, neden olduğu davranışsal değişiklikleri ve beyindeki nörokimyasal veya nöropatolojik değişikliklerini incelemek amacıyla bu hastalığın bazı patofizyolojik özelliklerini taklit eden kemirgen hayvan modelleri oluşturulmuştur [12]. AH'nda kullanılan mevcut modeller, beynin korteks, hipokampus ve ön beynin meynert bazal nükleus bölgesi gibi bölgelerinde stereotaksik cerrahi yöntemlerle lezyon oluşturma, nörotoksik ajanlarla AH'ndakine benzer nitelikte nöron harabiyeti oluşturma ve benzer genetik patolojilerin taklit edilmesi esaslarına dayanır [15]. Biz bu çalışmada A β infüzyonu ve STZ enjeksiyonu ile oluşturulmuş sporadik Alzheimer modelini taklit eden hayvanlar oluşturduk ve bu hayvanlarda A β birikimi ve STZ'ye bağlı olarak gelişen hasarı tedavi etmek amacıyla TQ uygulaması gerçekleştirdik. Bu amaçla, çalışmamızda A β ve STZ muamelesiyle indüklenen nöronal hasarı, nörodejenerasyonu, sinaptik disfonksiyonu hücresel ve fonksiyonel seviyede incelemek ve TQ tedavisinin etkinliğini ölçmek için davranış deneyleri, histopatolojik incelemeler ve moleküler analizler yapıldı.

Hafızayı değerlendirmek için uyguladığımız Morris su labirenti deneyleri transgenik olmayan AH modeli kemirgenlerdeki kognitif bozuklukları araştırmak için kabul gören en iyi yöntemlerden biridir. Bu yöntem, AH ile ilişkili başlangıç semptomlarında en çok etkilenen bilişsel süreçleri değerlendirmeyi sağlar [79]. Moris su labirenti deneyinde hayvanların yüzme mesafeleri ve platformu bulma süreleri göz önünde bulundurularak hipokampuse bağlı mekansal öğrenme ve hafızanın kontrol edilmesi sağlanmıştır. Sonuçlara bakıldığında A β infüzyonu ile yapılan Alzheimer modelindeki hayvanlarda günler arasında anlamlı bir değişiklik bulunurken 5 günlük yer öğrenme deneylerinde yüzülen mesafeye bakıldığı zaman gruplar arasında fark bulunmamaktadır. Öğrenme deneylerinde olduğu gibi hafıza ölçümleri için kullanılan platformsuz probe deneylerinde de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Bu sonuçlara göre A β ile oluşturulan modelin incelen süre boyunca davranışsal yönden ölçülebilecek seviyede hasar oluşturmadığını söyleyebiliriz. Hipokampal amiloid birikimi sıçanlar

tarafından tolere edilmiş olabileceği gibi amiloid plakları davranışsal etki gösterecek patolojik seviyelere ulaşmamış olabilir. bizim çalışmamızın aksine literatürde A β ile benzer şekilde oluşturulan modellerde amiloidin hafıza üzerindeki etkisi davranışsal olarak gösterilmiştir. 14 gün boyunca uygulanmış A β infüzyonu ile yapılan benzer diğer bir çalışmada, hayvanlar daha uzun süre yaşatılıp (6 hafta) sakrifiye edilmiştir [80]. Ayrıca bu çalışmada fibrilize etmek üzere bizim çalışmamızdan farklı olarak sıçan A β 1-42 peptidi kullanılmıştır. Bizim çalışmamızda insan A β 1-42 peptidini kullanmamızın amacı, bu peptidin sıçan beyinde akümülyasyona daha çok meyilli olduğunun tespit edilmesidir [81]. TQ tedavisinin etkinliğine bakıldığında, davranışsal olarak herhangi bir farklılık gözlenmemektedir.

STZ ile indüklenen modelde ise yürülen mesafelere göre gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmaktadır. STZ enjeksiyonu yapılan grupta hem kontrol grubuna oranla hem de sham kontrolüne oranla platforma ulaşma süresinde ve ulaşmaya kadar yürülen mesafede anlamlı bir artış görülmüştür (Şekil 10). Bu artışın STZ'ye bağlı olarak meydana gelen bellek problemlerinden kaynaklandığı düşünülebilir. Daha önce yapılan çalışmalarda da STZ ile oluşturulan nörodejenerasyon modellerinde mekansal öğrenmede gecikmenin olduğu kaydedilmiştir [75]. Ancak STZ enjeksiyonuna bağlı oluşan hasarı tedavi etmek amacıyla uygulanan TQ'un mevcut çalışmamızda herhangi bir etkinliğinin olduğu söylenemez. aksine mekansal öğrenme parametrelerinde bozulmanın derecesini arttırdığı tespit edilmiştir. Bu durum STZ ile oluşturulan AH modelinin farklı bir mekanizmayı takip ederek nörodejenerasyona sebep olması TQ'nun bu mekanizma üzerinde sinerjetik etkisine işaret etmektedir. STZ'nin i.c.v olarak beyne enjeksiyonu insüline dirençli bir beyin hali oluşmasına sebep olmaktadır [77]. TQ'nun ise STZ ile oluşturulmuş diyabet modellerinde insülin konsantrasyonunu artırarak koruma sağladığına dair veriler elde edilmiştir [82] İnsülin direncinde reseptörler insüline cevap veremediğinden dolayı artan insülin miktarının bir takım hasarların oluşması sebep olabileceği düşünülmektedir. Davranış deneylerinin yanı sıra oluşturulan hasarı incelemek amacıyla histopatolojik değerlendirmeler yapıldı. Nöronal hücre kaybını değerlendirmek için nissl cisimciklerini spesifik boyayan kresil violet boyaması yapıldı. A β infüzyonu yapılan hayvanlarda hipokampusün dentat girus ve CA1 bölgeleri, STZ enjeksiyonu yapılan hayvanlarda ise hipokampusün yalnızca CA1 bölgesinde hücre sayımı yapıldı. Hücre sayımı sonuçlarına bakıldığında CA1

bölgesinde A β ile indüklenen grupta beklenildiği gibi hücre sayısında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma kaydedilmiştir. Ayrıca A β ile indüklenen grupta TQ tedavisi uygulandığında kontrol grupları ile olan fark ortadan kaybolmuş ve böylece TQ'nun hücre sayısında protektif bir etki gösterdiği kaydedilmiştir. Alzheimer hastalığında amiloid beta birikiminin kolinerjik nöron sayısında azalmaya sebep olduğu bilinmektedir. Timokinonun da asetilkolinesteraz inhibitörü olarak görev yaptığı bulunmuştur [83]. Timokinon bu etkisi sayesinde hücre sayısındaki azalmayı durdurmuş olabilir. Fakat STZ ile indüklenen AH modelinde azalan hücre sayısına TQ tedavisinin hiç bir etkisi olmamıştır AH tedavisinde geliştirilen terapötik stratejilerden biri de Asetilkolinesteraz (AChE), asetilkolin hidrolizi (ACh) ile ilgili temel enzim inhibitörlerinin kullanımınıdır [84]. Bazal forebrain çekirdeğinin dejenerasyonundan kaynaklanan bir eksiklik AH'nin önemli bir patolojik ve nörokimyasal özelliğidir. AH'nin hastalık seyri boyunca nikotinik reseptörlerin ilerleyici bir kaybı da tarif edilmiştir. Asetilkolin ve kolinerjik belirteçlerin tükenmesinin, hastalığın başlangıcında ve hafızadaki bozuklukla ilişkili olduğu düşünülmektedir. AH'nin erken safhasındaki kolinerjik defisitler, kolinerjik sinyal transdüksiyon bozukluklarıyla ilişkili olabilir. Kolinerjik transmisyonu düzeltmek için; Asetilkolin sentezini artırma, presinaptik asetilkolin salınımını artırma, kolinerjik postsinaptik muskarinik ve nikotinik reseptörün uyarılması, kolinerjik asetilkolinesteraz inhibitörleri ve asetilkolin sinaptik yıkılmasını artırmak gibi stratejileri vardır [85]. TQ'nun güçlü bir antioksidan olmasının haricinde AchE önleyici etkisi de vardır. Elde ettiğimiz ELISA sonuçlarına göre (Şekil 27) A β ile indüklenen Alzheimer modelinde kontrol grubuna göre sham ve TQ ile tedavi edilen grupta anlamlı bir azalma görülmektedir. Bu sonuçlara göre TQ'nun AchE üzerindeki düşürücü etkisini görmek mümkündür. Fakat A β grubunda herhangi bir azalma görülmemektedir. Yalnızca A β muamelesi AchE seviyelerinde bir değişikliğe neden olmamıştır. A β , AchE üretimini tetikleyecek veya inhibe edecek bir süreç başlatmamıştır. A β 'nin beyindeki asetil koline bağlı sinyal iletimini düşürdüğü bilinmektedir [49]. Ancak AchE üzerindeki etkisi konusunda soru işaretleri bulunmaktadır. Sonuçlarımıza göre amiloid beta muamelesi kısa dönemde hipokampal AchE miktarı üzerinde net bir etki yapmamaktadır. STZ ile indüklenen Alzheimer modelinde ise kontrole göre anlamlı artış sadece sham grubunda gözlenmektedir. STZ muamelesi ve TQ ile tedavi sonucunda ise yine kontrole göre bir anlamlılık görülmezken sham grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre STZ

muamelesine bağı olarak AchE konsantrasyonunda anlamlı bir düşüş gerçekleştiği için STZ'nin AchE üzerindeki spesifik inhibe edici etkisi görülmektedir. Ancak TQ muamelesi bir fark yaratmamıştır.

Amiloid beta antikoru ile yapılan boyamalarda amiloid beta birikimi sadece amiloid beta infüzyonu ile yapılan Alzheimer modelinde görülmüştür (Şekil 19). Amiloid beta ile yapılan modelde timokinonun amiloid beta birikimini de azalttığı kaydedilmiştir. Fakat istatistiksel olarak bu azalmanın marjinal bir azalma olduğu gözlenmiştir. Buna paralel olarak protein oligomerizasyonuna bağı olarak amiloid fibrillerin oluşumu da incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı olmasada Amiloid Beta infüzyonu ile yapılan Alzheimer modelinde marjinal oranda bir amiloid fibril birikimi tespit edilmiş fakat bu birikimin TQ ile daha azaldığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar TQ'nun amiloid beta birikimi ve fibrillerin oluşumu konusunda temizleyici bir etkiye sahip olabileceği yönünde bize bilgi vermektedir. STZ enjeksiyonu ile yapılan modelde ise amiloid beta birikimi gözlenmemiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda STZ modelinde amiloid beta birikiminin gerçekleşmesi için gerekli sürenin enjeksiyon yapıldıktan 6 ay veya 9 ay sonrası olduğu bulunmuştur [80]. Ayrıca STZ enjeksiyonu ile yapılan Alzheimer modelinde nörofibriler yumakların bir göstergesi olan nörofibriler yumak görünümü şeklinde fosforile olmuş tau hipokampus bölgesinde tespit edilmiştir. Timokinonun fosforile TAU immunofloresan dansite ölçümünü azalttığı fakat bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir.

miRNA'lar hücre büyümesinde farklılaşmasında, proliferasyonunda ve hücre ölümünde bir veya daha fazla hedef genin baskılanmasında rol oynar [86]. Çeşitli miRNA ekspresyon düzey değişiklikleri diğer birçok hücrel proteinin ekspresyon düzeylerini etkilemektedir. Literatürde Alzheimer hastalarının beyinlerinde mir-124'ün ekspresyonunun azaldığı görülmüştür [87]. Ayrıca mir-26b [88] , mir-29a [89], ve mir-29c [70] ekspresyonlarının da AH gibi nörodejeneratif hastalıklarda değiştiği literatürde gösterilmiştir. Mevcut çalışmamızda, gerçek zamanlı PCR sonuçlarına bakıldığında mir-26b, mir-29a, mir-29c genlerinde anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Fakat mir-124 geni, A β grubunda, TQ verilen A β grubunda ve TQ verilen STZ grubunda yaklaşık 3 kat artış göstermiştir. miR-124 türler arasında korunmuş ve bol miktarda ifade edilen sinir sistemine özgü miRNA'lardan biridir [90]. Mir-124'ün merkezi sinir sisteminde başta beyin felci ve beyin tümörleri olmak

üzere çeşitli patolojik durumlarda artış gösterdiği bilinmektedir. mir-124 sinaptik plastisite ve hafıza ile ilişkili moleküler mekanizmaların düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir [68, 91]. Ayrıca mir-124'ün BACE-1 enzimini regüle ederek Alzheimer hastalığında gözlenen hücre ölümlerini azalttığına dair bulgular vardır [92, 93]. Çalışmamızda A β uygulanan hayvanlarda ipsilateral yarımkürede mir-124 miktarlarındaki artışın anlamlı olduğu ama kontralateralde böyle anlamlı bir değişimin olmadığı söylenebilir. Bu da amiloid agregatlarının mir-124 seviyesini arttırmaya yönelik bir etki gösterdiğine işaret etmektedir. TQ tedavisi alan hayvanlarda ipsilateral yarım kürede A β 'ya bağlı oluşan bu artış devam etmektedir. Mir-124'ün ifadesindeki bu artışa bağlı olarak amiloid beta ile indüklenen modelin RNA seviyesinde etkili olduğu düşünülebilir. Mir-124'ün kontrol ettiği düşünülen BACE-1 enziminin ekspresyon seviyelerinde ise herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Kontralateral yarımkürede TQ tedavisinin mir-124 seviyelerini çok olmamakla birlikte daha da arttırdığı gözlemlenmektedir. Bu durumda TQ tedavisinin mikroRNA düzeyinde anlamlı bir etkisi olduğu düşünülemez. STZ uygulanan kontrol hayvanlarına bakıldığında ise mir-124 seviyesinde anlamlı bir değişim gözlenmezken TQ tedavisi uygulanmış hayvanlarda mir-124 seviyesinin 3 kata yakın oranda fazla olduğu bulunmuştur. Bu modelde TQ muamelesinin mir-124 üzerinde indükleyici etkisi net bir şekilde gözlenmektedir. Amiloid beta uygulanan hayvanlarda böyle bir sonuç gözlenmezken STZ uygulanan hayvanlarda mir-124 ekspresyonu üzerindeki bu değişiklik beyinde STZ' ile tetiklenen patolojik mekanizmaların TQ muamelesine bağlı olarak değiştiği söylenebilir.

Çalışmamızda, mikroRNA'ların yanı sıra kalıtsal Alzheimer hastalığı ile ilişkili olduğu bilinen APP [22], BACE1 [94], PSEN1 [95], PSEN2 [20], Tau, MAP-2, APOE [95] genlerinin ekspresyon seviyelerini de inceledik [96]. Bu genlere ek olarak STZ ve A β infüzyonunun ve TQ tedavisinin hücre sağ kalımı ve apoptoz üzerine etkilerine bakmak için AKT, BAX, NGF, DCX [97], p53 ve NF κ B, sinaptik plastisite üzerine etkilerine bakmak için ise Sinapsin ve Sinaptofizin [98] genlerinin ekspresyon seviyelerini inceledik. Gerçek zamanlı PCR sonuçlarına göre A β ile indüklenen Alzheimer modelinde kontrol grubuna göre; TQ ile tedavi edilen grubun ipsilateralinde Sinaptofizinde ve hem ALZ modelinde hem de TQ ile tedavi edilen grupların kontralateralinde DCX miktarında azalma görüldü. DCX göç eden nöron progenitorlerine has bir proteindir [97, 99]. Dolayısıyla nörojenezin güvenilir bir göstergesi olarak kullanılır [100]. Sinaptofizin ise sinapslarda veziküler transporttan

sorumlu bir proteindir ve sinaptik fonksiyon hakkında önemli bilgiler sunabilir. AH'da etkilenmiş kortikal bölgelerde; kantitatif olarak %30-50 arasında sinaps bağımlı protein kaybı olabilir. Sinaptik veziküller ile ilişkili bir glikoprotein olan sinaptofizin sinaps kaybını göstermede yararlıdır [98]. Hasar durumlarında ipsilateraldeki nöronlara destek olduğu bilinen kontralateral bölgedeki DCX azalması ve ipsilateraldeki sinaptofizin azalması hipokampüsteki hasara bağlı olarak hem gelişmekte olan nöronların zarar gördüğünü hemde sinapslarda bir zararın oluştuğunu göstermektedir. MAP-2 mikrotübüller ile etkileşen ve onları stabilize etmekle sorumlu bir adaptör proteindir. Alzheimer hastalığında mikrotübüllerin patolojik formları tespit edilmiştir. MAP-2'ya benzer işlevler gösteren Tau proteininin aşırı fosforilasyonuna bağlı oluşan nörofibriler yumaklar buna örnek gösterilebilir. Çalışmamızda Tau proteininden ziyade MAP-2 üzerinde çok daha anlamlı değişiklikler gözlenmiştir. Amiloid beta muamelesinin MAP-2 gen ekspresyonu üzerinde oldukça azaltıcı bir etkisi olduğu söylenebilir. MAP-2 mikrotübülleri stabilize etmekle görevli ve dentritlerde yoğun olarak bulunan bir proteindir. Nöronal olgunlaşmada kritik bir role sahiptir. Çeşitli amiloid formları ile indüklenen Alzheimer modellerinde MAP-2 protein seviyesinin düştüğü bilinmektedir [101]. Çalışmamızda gen ifadesindeki bu değişiklik protein seviyesinde de kontrol edilerek, konfirme edilmelidir. TQ muamelesinin MAP-2 transkript seviyeleri üzerinde iyileştirici bir etkisi gözlemlenmemiş, kontralateral yarımkürede hem amiloid beta infüzyonu grubunda hem de TQ verilen amiloid beta grubunda MAP-2 seviyelerinin daha da düştüğü sonucuna varılmıştır. TQ molekülünün hangi mekanizmayla MAP-2 gen ekspresyonuna müdahale ettiği araştırmaya açık bir konudur. Stabilize edici özellikteki MAP-2 proteini amiloid beta birikimi yüzünden bozulan mikrotübül dinamiklerini düzenlemek ve dengelemek amacıyla hücre içerisindeki negatif kontrol mekanizmalarıyla regüle edilmiş olabilir. Son olarak, Tau bilindiği gibi MAP-2 gibi mikrotübüllere bağlanabilen ve mikrotübüllerin stabilitesini düzenleyen bir proteindir. Alzheimer hastalığının en bilinen fenotiplerinden biri olan nörofibriler yumakların oluşumu Tau patolojisinin bir sonucudur. Ancak çalışmamızda gen seviyesinde Tau miktarında model oluşturulan hayvanlarda kontrollere oranla anlamlı bir farklılık olduğu söylenemez. Daha önceki çalışmalarda STZ modeli hayvanlarda total tau miktarının kontrole göre değişmediği fakat taunun farklı amino asitlerinden fosforile olabildiği gösterilmiştir. STZ'ye bağlı olarak fosforlanan amino asitler transgenik veya diğer sporadik

modellerde değişiklik gösterebilmektedir [102]. STZ ile indüklenen Alzheimer modeline bakıldığında APOE geninin ekspresyonunun arttığı ve bu artışı TQ muamelesinin nispeten düşürdüğü görülmektedir. ApoE geni kanda lipoproteinlerin taşınmasından sorumlu olan ApoE reseptörlerinin ligandı apolipoprotein E ligandını kodlamaktadır. ApoE'nin Alzheimer hastalığında önemli bir risk faktörü olduğu bilinmektedir. Polimorfik ε4 alleleline sahip homozigot bireylerin beyinlerinde glikoz metabolizmasının bozulduğu ve diğer Alzheimer hastalarında olduğu gibi kognitif sorunlar gösterdikleri bilinmektedir [103]. ApoE gen ekspresyonundaki bu farklılık timokinon muamelesinin glikoz metabolizmasına bağlı bir etki göstermiş olabileceğini düşündürmektedir.

Yapılan analizler sonucunda amiloid beta infüzyonu ile yapılan Alzheimer modeli ve STZ enjeksiyonu ile yapılan Alzheimer modeli arasında farklılıklar bulunmuştur. Timokinon tedavisinin etkinliğini tartışmadan önce oluşturduğumuz modellerin hastalığın fenotipini ne seviyede yansıttığını göz önünde bulundurmak gerekir. Amiloid muamelesi STZ muamelesi kadar toksik bir etki göstermediğinden ötürü davranışa yansıyan bir etki olmamıştır. Fakat moleküler seviyede amiloidin farklı mekanizmaları tetiklediği gözlenmiştir. Moleküler analizler her iki modelde farklı mekanizmalar üzerinden bir hasar meydana geldiğini göstermiştir. İmmün boyamalarla, hücre sağkalımı ve plak birikimi değerlendirildiğinde timokinon molekülünün tedavi edici etkisi olduğu fakat bu etkinin beklenen derecede olmadığı gözlenmektedir. Moleküler mekanizmaya odaklandığında özellikle gen seviyesinde timokinona bağlı düzeltici bir etkinin tam anlamıyla gözlendiği söylenemez. Timokinonun etkisini daha açık gözlemek daha uzun bir tedavi süreciyle mümkün olabilir.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Alzheimer hastalığının insidansı dünya çapında 4,6 milyona yakındır. Günümüzde tedaviye yönelik kullanılan ilaçların kesin çözüm olmamakla beraber, hastalık sonucunda oluşan bazı patolojik süreçleri inhibe ederek veya etkilerini azaltarak hastalığın ilerlemesini yavaşlatığı ancak tamamen yok etmediği bilinmektedir.

TQ, çörek otundan elde edilebilen bitkisel bir ekstraktır. Asetilkolin esteraz inhibitörü olma, antioksidatif özellikte olma, nöroprotektif etkiye sahip olma ve kan-beyin bariyerini aşabilme gibi özellikleri sayesinde Alzheimer hastalığının tedavisi için yüksek potansiyele sahiptir. TQ'nun Alzheimer patolojisi üzerindeki etkisinin henüz çalışılmamış olması heyecan verici olup, bu proje kapsamında yapılan deneylerle *in vivo* olarak TQ'nun Alzheimer patolojisi üzerindeki olası etkisi detaylı moleküler deneylerle tespit edilmeye çalışılmıştır.

Bu anlamda başta Alzheimer hastalığı olmak üzere diğer nörodejeneratif hastalıkların tedavisine yönelik umut verici bilgileri literatürle paylaşma olanağına sahip olunacaktır Ayrıca elde ettiğimiz sonuçlar ileriki çalışmalarımız için aydınlatıcı ve yol gösterici olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Crews, L. and E. Masliah, *Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease*. Hum Mol Genet, 2010. 19(R1): p. R12-20.
2. Jellinger, K.A. and C. Bancher, *Neuropathology of Alzheimer's disease: a critical update*. J Neural Transm Suppl, 1998. 54: p. 77-95.
3. Humphries, C., et al., *Alzheimer disease (AD) specific transcription, DNA methylation and splicing in twenty AD associated loci*. Mol Cell Neurosci, 2015. 67: p. 37-45.
4. Borjabad, A. and D.J. Volsky, *Common transcriptional signatures in brain tissue from patients with HIV-associated neurocognitive disorders, Alzheimer's disease, and Multiple Sclerosis*. J Neuroimmune Pharmacol, 2012. 7(4): p. 914-26.
5. Olivier, C.M., et al., *MicroRNA: Implications for Alzheimer Disease and other Human CNS Disorders*. Current Genomics, 2009. 10(3): p. 154-168.
6. Garza-Manero, S., et al., *Identification of age- and disease-related alterations in circulating miRNAs in a mouse model of Alzheimer's disease*. Front Cell Neurosci, 2015. 9: p. 53.
7. Racoma, I.O., et al., *Thymoquinone inhibits autophagy and induces cathepsin-mediated, caspase-independent cell death in glioblastoma cells*. PLoS One, 2013. 8(9): p. e72882.
8. Alhebshi, A.H., M. Gotoh, and I. Suzuki, *Thymoquinone protects cultured rat primary neurons against amyloid beta-induced neurotoxicity*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. 433(4): p. 362-7.
9. Khan, A., et al., *Attenuation of Abeta-induced neurotoxicity by thymoquinone via inhibition of mitochondrial dysfunction and oxidative stress*. Mol Cell Biochem, 2012. 369(1-2): p. 55-65.
10. Wimo, A., B. Winblad, and L. Jonsson, *The worldwide societal costs of dementia: Estimates for 2009*. Alzheimers Dement, 2010. 6(2): p. 98-103.
11. Rachakonda, V., T.H. Pan, and W.D. Le, *Biomarkers of neurodegenerative disorders: how good are they?* Cell Res, 2004. 14(5): p. 347-58.
12. Blennow, K., M.J. de Leon, and H. Zetterberg, *Alzheimer's disease*. Lancet, 2006. 368(9533): p. 387-403.
13. Fernandez-Moriano, C., E. Gonzalez-Burgos, and M.P. Gomez-Serranillos, *Mitochondria-Targeted Protective Compounds in Parkinson's and Alzheimer's Diseases*. Oxid Med Cell Longev, 2015. 2015: p. 408927.
14. Hampel, H., et al., *The future of Alzheimer's disease: the next 10 years*. Prog Neurobiol, 2011. 95(4): p. 718-28.
15. Selkoe, D.J., *Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy*. Physiol Rev, 2001. 81(2): p. 741-66.
16. Agrawal, M. and A. Biswas, *Molecular diagnostics of neurodegenerative disorders*. Front Mol Biosci, 2015. 2: p. 54.
17. Liu, C.C., et al., *Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy*. Nat Rev Neurol, 2013. 9(2): p. 106-18.
18. Bu, G., *Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy*. Nat Rev Neurosci, 2009. 10(5): p. 333-44.
19. Gatz, M., et al., *Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease*. Arch Gen Psychiatry, 2006. 63(2): p. 168-74.

20. Sherrington, R., et al., *Alzheimer's disease associated with mutations in presenilin 2 is rare and variably penetrant*. Hum Mol Genet, 1996. 5(7): p. 985-8.
21. Jayadev, S., et al., *Alzheimer's disease phenotypes and genotypes associated with mutations in presenilin 2*. Brain, 2010. 133(Pt 4): p. 1143-54.
22. Sleegers, K., et al., *APP duplication is sufficient to cause early onset Alzheimer's dementia with cerebral amyloid angiopathy*. Brain, 2006. 129(Pt 11): p. 2977-83.
23. Farrer, L.A., et al., *Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium*. Jama, 1997. 278(16): p. 1349-56.
24. Saunders, A.M., et al., *Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease*. Neurology, 1993. 43(8): p. 1467-72.
25. Amemori, T., et al., *Alzheimer's Disease: Mechanism and Approach to Cell Therapy*. Int J Mol Sci, 2015. 16(11): p. 26417-51.
26. Francis, P.T., et al., *The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1999. 66(2): p. 137-47.
27. Parihar, M.S. and T. Hemnani, *Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions*. J Clin Neurosci, 2004. 11(5): p. 456-67.
28. Hooper, N.M., *Roles of proteolysis and lipid rafts in the processing of the amyloid precursor protein and prion protein*. Biochem Soc Trans, 2005. 33(Pt 2): p. 335-8.
29. Ohnishi, S. and K. Takano, *Amyloid fibrils from the viewpoint of protein folding*. Cell Mol Life Sci, 2004. 61(5): p. 511-24.
30. Morgan, C., et al., *Structure and function of amyloid in Alzheimer's disease*. Prog Neurobiol, 2004. 74(6): p. 323-49.
31. Kumar, A., A. Singh, and Ekavali, *A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update*. Pharmacol Rep, 2015. 67(2): p. 195-203.
32. Chen, S., et al., *Advances with RNA interference in Alzheimer's disease research*. Drug Des Devel Ther, 2013. 7: p. 117-25.
33. Selkoe, D.J., *Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease*. Nature, 1999. 399(6738 Suppl): p. A23-31.
34. Iwatsubo, T., et al., *Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43)*. Neuron, 1994. 13(1): p. 45-53.
35. Di Carlo, M., D. Giacomazza, and P.L. San Biagio, *Alzheimer's disease: biological aspects, therapeutic perspectives and diagnostic tools*. J Phys Condens Matter, 2012. 24(24): p. 244102.
36. Davinelli, S., et al., *The "Alzheimer's disease signature": potential perspectives for novel biomarkers*. Immun Ageing, 2011. 8: p. 7.
37. Wong, P.T., et al., *Amyloid-beta membrane binding and permeabilization are distinct processes influenced separately by membrane charge and fluidity*. J Mol Biol, 2009. 386(1): p. 81-96.
38. Verdier, Y., M. Zarandi, and B. Penke, *Amyloid beta-peptide interactions with neuronal and glial cell plasma membrane: binding sites and implications for Alzheimer's disease*. J Pept Sci, 2004. 10(5): p. 229-48.

39. Castellani, R.J., et al., *Molecular pathogenesis of Alzheimer's disease: reductionist versus expansionist approaches*. Int J Mol Sci, 2009. 10(3): p. 1386-406.
40. Iqbal, K., et al., *Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies*. Biochim Biophys Acta, 2005. 1739(2-3): p. 198-210.
41. Duff, K. and E. Planel, *Untangling memory deficits*. Nat Med, 2005. 11(8): p. 826-7.
42. Pillay, R., et al., *Acetylcholine reduces cyanide-induced superoxide anion generation and lipid peroxidation in rat brain homogenates*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2003. 27(1): p. 61-4.
43. Wenk, G.L., *Neuropathologic changes in Alzheimer's disease*. J Clin Psychiatry, 2003. 64 Suppl 9: p. 7-10.
44. Chaudiere, J. and R. Ferrari-Iliou, *Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms*. Food Chem Toxicol, 1999. 37(9-10): p. 949-62.
45. Zemek, F., et al., *Outcomes of Alzheimer's disease therapy with acetylcholinesterase inhibitors and memantine*. Expert Opin Drug Saf, 2014. 13(6): p. 759-74.
46. Bond, M., et al., *The effectiveness and cost-effectiveness of donepezil, galantamine, rivastigmine and memantine for the treatment of Alzheimer's disease (review of Technology Appraisal No. 111): a systematic review and economic model*. Health Technol Assess, 2012. 16(21): p. 1-470.
47. Watkins, P.B., et al., *Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease*. Jama, 1994. 271(13): p. 992-8.
48. Nordberg, A. and A.L. Svensson, *Cholinesterase inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease: a comparison of tolerability and pharmacology*. Drug Saf, 1998. 19(6): p. 465-80.
49. Foster, P.S., et al., *Acetylcholinesterase inhibitors reduce spreading activation in dementia*. Neuropsychologia, 2012. 50(8): p. 2093-9.
50. Lecanu, L. and V. Papadopoulos, *Modeling Alzheimer's disease with non-transgenic rat models*. Alzheimers Res Ther, 2013. 5(3): p. 17.
51. Do Carmo, S. and A.C. Cuellar, *Modeling Alzheimer's disease in transgenic rats*. Mol Neurodegener, 2013. 8: p. 37.
52. Biasibetti, R., et al., *Hippocampal changes in STZ-model of Alzheimer's disease are dependent on sex*. Behav Brain Res, 2017. 316: p. 205-214.
53. Salkovic-Petrisic, M., et al., *Cerebral amyloid angiopathy in streptozotocin rat model of sporadic Alzheimer's disease: a long-term follow up study*. J Neural Transm (Vienna), 2011. 118(5): p. 765-72.
54. Nakamura, S., et al., *Progressive brain dysfunction following intracerebroventricular infusion of beta(1-42)-amyloid peptide*. Brain Res, 2001. 912(2): p. 128-36.
55. Zhang, J., et al., *Th17 cell-mediated neuroinflammation is involved in neurodegeneration of abeta1-42-induced Alzheimer's disease model rats*. PLoS One, 2013. 8(10): p. e75786.
56. Spires, T.L. and B.T. Hyman, *Transgenic models of Alzheimer's disease: learning from animals*. NeuroRx, 2005. 2(3): p. 423-37.
57. Hsiao, K., et al., *Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice*. Science, 1996. 274(5284): p. 99-102.
58. Oddo, S., et al., *Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction*. Neuron, 2003. 39(3): p. 409-21.

59. Ali, B.H. and G. Blunden, *Pharmacological and toxicological properties of Nigella sativa*. *Phytother Res*, 2003. 17(4): p. 299-305.
60. Nagi, M.N. and M.A. Mansour, *Protective effect of thymoquinone against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: a possible mechanism of protection*. *Pharmacol Res*, 2000. 41(3): p. 283-9.
61. Hosseinzadeh, H. and S. Parvardeh, *Anticonvulsant effects of thymoquinone, the major constituent of Nigella sativa seeds, in mice*. *Phytomedicine*, 2004. 11(1): p. 56-64.
62. Al-Majed, A.A., F.A. Al-Omar, and M.N. Nagi, *Neuroprotective effects of thymoquinone against transient forebrain ischemia in the rat hippocampus*. *Eur J Pharmacol*, 2006. 543(1-3): p. 40-7.
63. Kanter, M., *Nigella sativa and derived thymoquinone prevents hippocampal neurodegeneration after chronic toluene exposure in rats*. *Neurochem Res*, 2008. 33(3): p. 579-88.
64. Daba, M.H. and M.S. Abdel-Rahman, *Hepatoprotective activity of thymoquinone in isolated rat hepatocytes*. *Toxicol Lett*, 1998. 95(1): p. 23-9.
65. Al-Enazi, M.M., *Effect of thymoquinone on malformations and oxidative stress-induced diabetic mice*. *Pak J Biol Sci*, 2007. 10(18): p. 3115-9.
66. Darakhshan, S., et al., *Thymoquinone and its therapeutic potentials*. *Pharmacol Res*, 2015. 95-96: p. 138-58.
67. Femminella, G.D., N. Ferrara, and G. Rengo, *The emerging role of microRNAs in Alzheimer's disease*. *Front Physiol*, 2015. 6: p. 40.
68. Lukiw, W.J., *Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus*. *Neuroreport*, 2007. 18(3): p. 297-300.
69. Maes, O.C., et al., *MicroRNA: Implications for Alzheimer Disease and other Human CNS Disorders*. *Curr Genomics*, 2009. 10(3): p. 154-68.
70. Nelson, P.T., W.X. Wang, and B.W. Rajeev, *MicroRNAs (miRNAs) in neurodegenerative diseases*. *Brain Pathol*, 2008. 18(1): p. 130-8.
71. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. *Cell*, 2004. 116(2): p. 281-97.
72. Cai, X., C.H. Hagedorn, and B.R. Cullen, *Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs*. *Rna*, 2004. 10(12): p. 1957-66.
73. Friedman, R.C., et al., *Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs*. *Genome Res*, 2009. 19(1): p. 92-105.
74. Lecanu, L., et al., *Caprospinol reduces amyloid deposits and improves cognitive function in a rat model of Alzheimer's disease*. *Neuroscience*, 2010. 165(2): p. 427-35.
75. Isik, A.T., et al., *Curcumin ameliorates impaired insulin/IGF signalling and memory deficit in a streptozotocin-treated rat model*. *Age (Dordr)*, 2009. 31(1): p. 39-49.
76. Radad, K., et al., *Thymoquinone ameliorates lead-induced brain damage in Sprague Dawley rats*. *Exp Toxicol Pathol*, 2014. 66(1): p. 13-7.
77. Knezovic, A., et al., *Staging of cognitive deficits and neuropathological and ultrastructural changes in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease*. *J Neural Transm (Vienna)*, 2015. 122(4): p. 577-92.
78. Bertram, L. and R.E. Tanzi, *The genetic epidemiology of neurodegenerative disease*. *J Clin Invest*, 2005. 115(6): p. 1449-57.
79. Tran, T.T., M. Srivareerat, and K.A. Alkadhi, *Chronic psychosocial stress accelerates impairment of long-term memory and late-phase long-term*

- potentiation in an at-risk model of Alzheimer's disease. Hippocampus, 2011. 21(7): p. 724-32.*
80. Alkadhi, K.A., et al., *Chronic psychosocial stress exacerbates impairment of synaptic plasticity in beta-amyloid rat model of Alzheimer's disease: prevention by nicotine. Curr Alzheimer Res, 2011. 8(7): p. 718-31.*
 81. Alkadhi, K.A., et al., *Elevation of BACE in an Abeta rat model of Alzheimer's disease: exacerbation by chronic stress and prevention by nicotine. Int J Neuropsychopharmacol, 2012. 15(2): p. 223-33.*
 82. Kanter, M., *Protective effects of thymoquinone on streptozotocin-induced diabetic nephropathy. Journal of Molecular Histology, 2009. 40(2): p. 107-115.*
 83. Sahak, M.K., et al., *The Role of Nigella sativa and Its Active Constituents in Learning and Memory. Evid Based Complement Alternat Med, 2016. 2016: p. 6075679.*
 84. Kihara, T. and S. Shimohama, *Alzheimer's disease and acetylcholine receptors. Acta Neurobiol Exp (Wars), 2004. 64(1): p. 99-105.*
 85. Jukic, M., et al., *In vitro acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. Phytother Res, 2007. 21(3): p. 259-61.*
 86. Lukiw, W.J., *Gene expression profiling in fetal, aged, and Alzheimer hippocampus: a continuum of stress-related signaling. Neurochem Res, 2004. 29(6): p. 1287-97.*
 87. Qi, L., et al., *A SNP site in pri-miR-124 changes mature miR-124 expression but no contribution to Alzheimer's disease in a Mongolian population. Neurosci Lett, 2012. 515(1): p. 1-6.*
 88. Wang, C., et al., *Neuroprotection of microRNA in neurological disorders (Review). Biomed Rep, 2014. 2(5): p. 611-619.*
 89. Hebert, S.S., et al., *Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(17): p. 6415-20.*
 90. Lagos-Quintana, M., et al., *New microRNAs from mouse and human. Rna, 2003. 9(2): p. 175-9.*
 91. Sun, Y., et al., *An updated role of microRNA-124 in central nervous system disorders: a review. Front Cell Neurosci, 2015. 9: p. 193.*
 92. Fang, M., et al., *The miR-124 regulates the expression of BACE1/beta-secretase correlated with cell death in Alzheimer's disease. Toxicol Lett, 2012. 209(1): p. 94-105.*
 93. Lukiw BS, M., PhD, Walter J., *Evolution and Complexity of Micro RNA in the Human Brain. Frontiers in Genetics, 2012. 3(166).*
 94. Yan, R. and R. Vassar, *Targeting the beta secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy. Lancet Neurol, 2014. 13(3): p. 319-29.*
 95. Wang, W., et al., *Presenilin 1 mutations influence processing and trafficking of the ApoE receptor apoER2. Neurobiol Aging, 2017. 49: p. 145-153.*
 96. Kosenko, E.A., et al., *Pathogenesis of Alzheimer disease: role of oxidative stress, amyloid-beta peptides, systemic ammonia and erythrocyte energy metabolism. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2014. 13(1): p. 112-9.*
 97. Gang, B., et al., *Limited hippocampal neurogenesis in SAMP8 mouse model of Alzheimer's disease. Brain Res, 2011. 1389: p. 183-93.*

98. Tampellini, D., et al., *Effects of synaptic modulation on beta-amyloid, synaptophysin, and memory performance in Alzheimer's disease transgenic mice*. J Neurosci, 2010. 30(43): p. 14299-304.
99. Verwer, R.W., et al., *Mature astrocytes in the adult human neocortex express the early neuronal marker doublecortin*. Brain, 2007. 130(Pt 12): p. 3321-35.
100. Boekhoorn, K., M. Joels, and P.J. Lucassen, *Increased proliferation reflects glial and vascular-associated changes, but not neurogenesis in the presenile Alzheimer hippocampus*. Neurobiol Dis, 2006. 24(1): p. 1-14.
101. Iqbal, K., et al., *Tau in Alzheimer disease and related tauopathies*. Tau in Alzheimer Disease and Related Tauopathies Curr Alzheimer Res, 2010. 7(8): p. 656-64.
102. Chen, Y., et al., *A non-transgenic mouse model (icv-STZ mouse) of Alzheimer's disease: similarities to and differences from the transgenic model (3xTg-AD mouse)*. Mol Neurobiol, 2013. 47(2): p. 711-25.
103. Chen, Z. and C. Zhong, *Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: implications for diagnostic and therapeutic strategies*. Prog Neurobiol, 2013. 108: p. 21-43.

EKLER

Ek-1.Etik Kurul Onay Belgesi



T.C.
BEZMİÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
KARAR METNİ

SAYI: 2015/ 229
KONU: Sn. Doç. Dr. Fahri AKBAŞ

24.11.2015

Sayın, Doç. Dr. Fahri AKBAŞ

“Timokinon tedavisinin sporadik Alzheimer modeli oluşturulmuş sıçan beyin dokusundaki microRNA ve mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisinin araştırılması” başlıklı projeniz 24.11.2015 tarihinde yapılan Yerel Etik Kurul toplantısında değerlendirilmiş ve onanmıştır.

Doç. Dr. Fahri AKBAŞ
Etik Kurul Başkan Vek.

KAYI NO: 2015/229

Prof. Dr. Ahmet BELCE
Üye

Prof. Dr. Erhan AYŞAN
Üye

Prof. Dr. İsmail MERAL
Üye

Prof. Dr. Serdar ÖŞÜMEZ
Üye

Yrd. Doç. Dr. Ömer UYSAL
Üye

KAYI NO: 2015/229

Vet. Hek. Mert ÇELİKTEN
Üye

Nasuhi GÜNAY
Üye

Hakan AKTÜRK
Üye

- Etik kurulumuzdan onam alan her proje için, çalışma başlamadan üç ay önce çalışılacak hayvan rezervinin uygunluğunu (tır, yaş, cinsiyet) belirlemek amacıyla Deney Hayvanları Laboratuvarına başvurulmalıdır.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Tuğçe AYDOĞAN
Doğum Tarihi ve Yeri : 1992 / ANKARA
E-posta : tugceaydogan59@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2010, İstanbul Arel Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm
- **Yükseklisans** : 2017, Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Biyoteknoloji Program

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- Bezmialem Vakıf Üniversitesi Moleküler Biyolog Ekim 2015 - halen

YÜKSEK LİSANS TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Karakas-Beker M., Aydogan T., Terzioglu-Uzak S., Akbas F., Kilic U., Elibol B.** “The effects of thymoquinone in the amyloid beta-induced sporadic alzheimer models in rats” Program No. 513.06/X9, 2016 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, CA: Society for Neuroscience, 2016. Online