



**İMİNODİASETİK ASİDİN *IN VITRO* VE *IN VIVO* ANTI-ALZHEIMER
POTANSİYELİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Tuğba GEZMİŞ

Yüksek Lisans Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ

2019

Her hakkı saklıdır.



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İMİNODİASETİK ASİDİN *IN VITRO* VE *IN VIVO* ANTI-ALZHEIMER
POTANSİYELİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Tuğba GEZMİŞ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Erzurum

2019

Her hakkı saklıdır

T.C.
ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ ONAY FORMU

**İMİNODİASETİK ASİDİN *IN VITRO* VE *IN VIVO* ANTI-ALZHEIMER
POTANSİYELİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ danışmanlığında, Tuğba GEZMİŞ tarafından hazırlanan bu çalışma 15 / 01 / 2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak Oy birliği / Oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Başkan	: Prof. Dr. Turgay ŞİŞMAN	<i>İmza</i>	:
Üye	: Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ	<i>İmza</i>	:
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Elanur AYDIN KARATAŞ	<i>İmza</i>	:

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ
Enstitü Müdürü

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

15 / 01 / 2019

İmzası

Tuğba GEZMİŞ

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İMINODİASETİK ASİDİN *IN VITRO* VE *IN VIVO* ANTI-ALZHEIMER POTANSİYELİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Tuğba GEZMİŞ

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ

Alzheimer hastalığı (AH), en sık görülen nörodejeneratif hastalıklardan biridir. Dünya genelinde yaşlı insanlardaki bunama olgusunun % 80' inden fazlasını oluşturmaktadır. AH patolojik olarak, hücre içi nörofibriler yumaklar ve hücre dışı amiloid protein birikimleri ile karakterizedir. AH için henüz etkin bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Bu nedenle, AH' na karşı önleyici veya yavaşlatıcı terapötiklerin geliştirilmesine yönelik araştırmalar büyük önem taşımaktadır. Mevcut tez çalışmamızda, çeşitli yararlı biyolojik etkileri olduğu bilinen, iminodiasetik asit (IDA) aminoasidinin anti-Alzheimer potansiyeli değerlendirilmiştir. IDA aminoasidinin potansiyel nöroprotektif etkisi, SH-SY5Y hücre hattıyla, WST-8 testi, LDH testi ve metal şelatlama çalışması yapılmıştır ve $AlCl_3$ maruziyetiyle indüklenen deneysel AH modeli oluşturulan sıçanlarda biyokimyasal, hematolojik, histopatolojik değerlendirmeler ve bununla birlikte moleküler genetik analizler yapılarak belirlenmiştir. Çalışmada 16 adet dişi Sprague-Dawley sıçan kullanılarak 4 grup oluşturulmuştur. Grup 1: kontrol grubu (n=4); Grup 2: $AlCl_3$ maruziyeti ile deneysel AH oluşturulan grup (n=4); Grup 3: tedavi amaçlı IDA uygulanan grup (n=4); Grup 4: IDA grubu (n=4). $AlCl_3$ maruziyeti ile AH oluşturulan sıçanlarda oksidatif stres ve nörodejenerasyon gözlenmiştir. Yapılan moleküler genetik analizler ile alüminyumun β -sekretaz ve γ -sekretaz aktivitelerini artırırken α -sekretaz aktivitesini azalttığı ortaya konmuştur. Bulgularımız IDA aminoasidinin uygulanması ile alüminyum toksisitesinin etkisiyle oluşan nörodejenerasyon ve oksidatif hasar düzeylerinin azaltılabileceğini açıkça ortaya koymuştur. Bu tez çalışması sonucunda elde edilen verilerin $AlCl_3$ ' e bağlı nörodejenerasyon ve oksidatif strese karşı iyileştirici potansiyele sahip yeni bileşiklerin sentezlenmesine ve yeni tedavi strateji araştırmalarına farklı bir bakış açısı sunacağı kanaatindeyiz.

2019, 71 sayfa

Anahtar Kelimeler: Alzheimer hastalığı, $AlCl_3$, İminodiasetik asit, Nöroprotektif etki

ABSTRACT

MS. Thesis

EVALUATION OF *IN VITRO* AND *IN VIVO* ANTI-ALZHEIMER POTENTIAL OF IMINODIASETIC ACID

Tuğba GEZMİŞ

Erzurum Technical University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ

Alzheimer's disease (AD) is one of the most common neurodegenerative diseases and accounts for more than 80% of the worldwide population of dementia in elderly people. AD is pathologically characterized by the accumulation of intracellular neurofibrillar tangles and extracellular amyloid protein. Yet, there is no fully qualified treatment for AD. For this reason, therapeutic studies in the areas of AD prevention or slowing down are of great importance. In the study, the anti-Alzheimer potential of iminodiacetic acid (IDA) amino acid was investigated. The potential neuroprotective effect of IDA amino acid, WST-8 test, LDH test and metal chelation study with SH-SY5Y cell line and also biochemical, hematological, histopathological evaluations and molecular genetic analyzes were determined in rats induced experimentally with $AlCl_3$ exposure. Four groups of female Sprague-Dawley rats were used in the study. These groups were as; Group 1 control (n = 4), Group 2 $AlCl_3$ exposed experimental AH model group (n = 4), Group 3 IDA (n = 4) and IDA 's neuroprotective effect on AD Group 4 $AlCl_3$ + IDA (n=4). Oxidative stress and neurodegeneration were observed in AD-induced rats with $AlCl_3$ exposure. Molecular genetic analysis revealed that aluminum reduces β -secretase and γ -secretase activity while reducing α -secretase activity. Our results revealed that the application of IDA amino acid could reduce the levels of neurodegeneration and oxidative damage caused by aluminum toxicity. We believe that the data obtained from this thesis will give a different perspective to the synthesis of new compounds with $AlCl_3$ -dependent neurodegeneration and oxidative stress, and to new treatment strategy researches.

2019, 71 pages

Keywords: Alzheimer's disease, $AlCl_3$, Iminodiacetic acid, Neuroprotective effect

TEŞEKKÜR

Bütün yüksek lisans çalışmam boyunca bilgi, tavsiye ve deneyimleriyle katkıda bulunan, hiçbir zaman desteğini esirgemeyen kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca ilgi ve desteklerini esirgemeyen tüm Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Tez çalışması sırasında dokuların patolojik incelemesinde destek olan Atatürk Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi Dr. Öğr. Üyesi Onur CEYLAN'a,

Tez çalışmamın uygulama kısımlarında ve birçok alanda yüksek toleransıyla yardımlarını esirgemeyen Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Arş. Gör. Dr. Özlem ÖZDEMİR TOZLU'ya,

Lisans ve yüksek lisans eğitimim süresince, her zaman bütün koşullarda yanımda olan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen saygıdeğer arkadaşım Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencisi Arzugül TANAS'a,

Hayatım boyunca benden desteklerini, sevgilerini ve sabırlarını hiç esirgemeyen, zor zamanlarımda her zaman arkamda olan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tuğba GEZMİŞ

Ocak 2019

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Alzheimer Hastalığının Tanımı ve Tarihiçesi	1
1.2. Alzheimer Hastalığının Epidemiyolojisi	1
1.3. Alzheimer Hastalığının Patofizyolojisi	2
1.3.1. Kolinergic hipotez.....	3
1.3.2. Amiloid kaskad hipotezi	3
1.3.3. Tau hipotezi.....	5
1.3.4. Oksidatif stres ve kalsiyumun rolü.....	6
1.4. Alzheimer Hastalığının Türleri	7
1.4.1. Erken başlangıçlı alzheimer hastalığı.....	7
1.4.2. Geç başlangıçlı alzheimer hastalığı.....	8
1.5. Alzheimer Hastalığının Risk Faktörleri	9
1.6. Alzheimer Hastalığının Tanısı	11
1.7. Alzheimer Hastalığının Tedavisi.....	11
1.8. Alzheimer Hastalığı Modelleri.....	2
1.8.1. Alüminyum maruziyeti ile oluşturulan deneysel hayvan modeli.....	14
1.9. İminodiasetik Asit	15
2. KAYNAK ÖZETLERİ	19
3. MATERYAL ve YÖNTEM	22
3.1. Materyal	22
3.1.1. Kimyasallar	22
3.1.2. Cihazlar	22
3.2. Yöntem.....	24
3.2.1. <i>In Vitro</i> çalışmalar.....	24

3.2.1.1. Hücre kültürü	24
3.2.1.2. SH-SY5Y Hücrelerinin Farklılaştırılması.....	24
3.2.1.3. Hücre canlılık testi (WST-8) ve LDH testi	25
3.2.1.5. Metal Şelatlama Çalışması.....	26
3.2.2. <i>In Vivo</i> çalışmalar.....	26
3.2.2.1. Deney hayvanları	26
3.2.2.2. Vücut ağırlığı	28
3.2.2.3. Biyokimyasal analizler.....	28
3.2.2.4. Hematolojik analizler	28
3.2.2.5. Mikroçekirdek testi	28
3.2.2.6. Patolojik inceleme.....	29
3.2.2.7. Toplam antioksidan kapasite (TAK) ve toplam oksidatif stres (TOS) analizi...	29
3.2.2.8. Moleküler genetik analizler.....	30
3.2.2.8.1. Dokudan RNA izolasyonu	30
3.2.2.8.2. Spektrofotometrik RNA ölçümü	30
3.2.2.8.3. cDNA sentezi	31
3.2.2.8.4. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR)	31
3.2.3. İstatistiksel değerlendirme	32
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	33
4.1. <i>In Vitro</i> ' da AlCl ₃ ' ün Toksikite Sonuçları.....	33
4.2. Metal Şelatlama Çalışmaları Sonuçları.....	34
4.3. WST-8 ve LDH Analiz Sonuçları	35
4.4. Vücut Ağırlığı Değişimi Sonuçları	37
4.5. Biyokimyasal Analiz Sonuçları.....	38
4.6. Hematoloji Analiz Sonuçları.....	39
4.7. Mikroçekirdek Testi Sonuçları.....	41
4.8. Patolojik İnceleme Sonuçları	41
4.9. TAK ve TOS Analizlerinin Sonuçları.....	42
4.10. <i>In Vivo</i> Deneysel AH Sıçan Modelinde Moleküler Genetik Yanıtlar.....	44
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	51
KAYNAKLAR	52
EKLER.....	69
EK-1	69
ÖZGEÇMİŞ.....	71

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler Açıklama

°	Derece
mg	Miligram
L	Litre
g	Gram
mM	Milimolar
cm	Santimetre
sn	Saniye
dk	Dakika
µL	Mikrolitre

Kısaltmalar

AA	Askorbik Asit
AChE	Asetilkolin Esteraz
ADAM	Disintegrin ve metalloproteinaz
AH	Alzheimer Hastalığı
Al	Alüminyum
AlCl ₃	Alüminyum Klorür
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amiloid Prekürsör Protein
Aβ	Amiloid βeta
BACE	β Sekretaz Enzimi
BB-CK	Beyin Tipi Kreatin Kinaz
BDNF	Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
CK	Kreatin Kinaz
EBAH	Erken Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı

EBAAH	Erken Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı
GBAH	Geç Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı
IDA	İminodiasetik asit
iGluR	İyonotropik glutamat reseptör
i.p	İntraperitoneal
LDH	Laktat Dehidrogenaz
LIPUS	Düşük yoğunluklu değişkenli ultrason
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MSS	Merkezi sinir sistemi
MTT	4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NFY	Nörofibriler Yumaklar
NMDA	N-metil D-aspartat
PFK	Prefrontal Korteks
PS1	Presenilin 1 geni
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
RT-PCR	Ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu
SEBAH	Sporadik Erken Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı
TAK	Toplam Antioksidan Kapasite
TOS	Toplam Oksidatif Stres
TNF- α	Tümör Nekroz Faktör α
γ -sekretaz	Gama sekretaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. (A) Amiloidojenik olmayan yolak ve (B) Amiloidojenil yolak ile APP proteolizi.	4
Şekil 1.2. AH'de, mikrotübüllere bağlanma ve mikrotübül düzeneğini yükseltme yeteneğinde bir azalma vardır. Hiperfosforile Tau, stabilize mikrotübül ağına, aksonal transportun bozulmasına ve nihayetinde nörofibriler yumak (NFY) oluşumuna ve nöronal ölüme katkıda bulunabilmektedir	6
Şekil 1.3. Glisin'in Yapısı.....	17
Şekil 1.4. IDA'nın Yapısı.	17
Şekil 3.1. İntraperitoneal Enjeksiyon İşlemi.	27
Şekil 4.1. IDA'nın 200 µmol/L Al ³⁺ , Fe ³⁺ , Cu ²⁺ ve Zn ²⁺ (200 µmol/L) Varlığında UV-Vis Spektrumu.	35
Şekil 4.2. <i>In Vitro</i> Deney Sisteminde AlCl ₃ Sitotoksitesine Karşı IDA'nın Etkisi.	36
Şekil 4.3. <i>In Vitro</i> Deney Sisteminde AlCl ₃ Sitotoksitesine Karşı IDA'nın LDH Seviyesine Etkisi.	37
Şekil 4.4. Kontrol Grubu (A), AH Grubu (B) ve AlCl ₃ +IDA Grubuna (C) Ait Beyin Dokularının Işık Mikrokobu Görüntüleri.....	42
Şekil 4.5. Deneysel Gruplara Ait Beyin Dokularında Alınan Örneklerdeki APP Ekspresyon Seviyelerinin Dağılımı.	45
Şekil 4.6. Deneysel Gruplara Ait Beyin Dokularında Alınan Örneklerdeki <i>BACE1</i> Ekspresyon Seviyelerinin Dağılımı.	46
Şekil 4.7. Deneysel Gruplara Ait Beyin Dokularında Alınan Örneklerdeki <i>VEGFA</i> Ekspresyon Seviyelerinin Dağılımı.	47
Şekil 4.8. Deneysel Gruplara Ait Beyin Dokularında Alınan Örneklerdeki <i>TNFα</i> Ekspresyon Seviyelerinin Dağılımı.	48
Şekil 4.9. Deneysel Gruplara Ait Beyin Dokularında Alınan Örneklerdeki <i>APH1a</i> Ekspresyon Seviyelerinin Dağılımı.	49
Şekil 4.10. Deneysel Gruplara Ait Beyin Dokularında Alınan Örneklerdeki <i>PSENN</i> Ekspresyon Seviyelerinin Dağılımı.....	50

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3. 1. Tez araştırması için kullanılan kimyasal ve kitlerin isimleri ve alındıkları firmalar.	22
Çizelge 3.2. Araştırmada kullanılan cihazlar.	23
Çizelge 3.3. Araştırma İçin Kullanılan Gruplar, Hayvan Sayıları, Uygulanan Doz ve Uygulama Süreleri.....	27
Çizelge 3.4. RT-PZR’ de Kullanılan Genlere Özgü Primerler.	31
Çizelge 4.1. RA ile Farklılaştırılmış SH-SY5Y Hücrelerinde AlCl ₃ 'ün Sitotoksik Etkileri.....	33
Çizelge 4.2. Tüm Deneysel Sıçanların Uygulama Öncesinde ve Sonundaki Vücut Ağırlıkları.....	38
Çizelge 4.3. Tüm Deneysel Gruplara Ait Biyokimyasal Analiz Sonuçları.....	38
Çizelge 4.4. Tüm Deneysel Gruplara Ait Hematoloji Analizi Sonuçları.....	40
Çizelge 4.5. Tüm Deneysel Grupların Kan Smear Örneğinde Gözlenen Mikroçekirdek Frekansları.....	41
Çizelge 4.7. <i>In Vivo</i> Beyin Dokusunda TAK Seviyeleri.....	43
Çizelge 4.8. <i>In Vivo</i> Beyin Dokusunda, Kontrolün, Alzheimer Grubunun, IDA'nın ve AICI ₃ Varlığında IDA'nın TOS Seviyeleri.	43

1. GİRİŞ

1.1. Alzheimer Hastalığının Tanımı ve Tarihçesi

Alzheimer hastalığı (AH), dejeneratif bir beyin hastalığı olup bunamanın nedenlerinden en yaygın olanıdır (De Strooper and Karran 2016; Waite 2015). 2015 yılında dünya çapında demansla yaşayanların sayısı 47,47 ve bu sayının 2030'da 75,63 milyona, 2050'de ise 135,46 milyona ulaşabileceği tahmin edilmektedir (Lindsey 2010).

AH ilk olarak 1906 yılında psikiyatrist Dr. Alois Alzheimer tarafından bir toplantıda açıklanmıştır (Korolev 2014). Dr. Alois Alzheimer, ilk kez 1907 yılında yayınlanan ve daha sonra AH olarak adlandırılan olgunun ilk vakası bellek kaybı ve halsizlik ile başlayan, depresyon, halusinasyonlar ve bunama ile devam eden ve sonunda ölümle sonuçlanan klinik belirtileri taşıyan 51 yaşında bir kadındır. Dr. Alzheimer, hastanın beyninin yapısındaki anormal değişiklikleri mikroskop ile analiz ettiğinde beyinde, serebral kortekste lezyonlar, kortikal nörofibrillerin sıra dışı kümelenmesi ve distorsiyonu ile birlikte atrofi olduğunu gözlemlemiştir (Fox et al. 1999).

AH'nin ana klinik özelliği ilerleyici hafıza kaybıdır. AH ayrıca, konuşma ve motor yeteneklerinde bozukluk, depresyon, sanrılar, halusinasyonlar ve agrasif davranışlar ile de karakterize edilebilir (Voisin and Vellas 2009).

1.2. Alzheimer Hastalığının Epidemiyolojisi

2005 yılında dünya çapında 24,2 milyon insana bunama tanısı konulmuştur ve her yıl 4,6 milyon yeni vaka ortaya çıkmaktadır. Bu vakaların yaklaşık % 70'i AH'ye aittir (Alzheimer's Association 2008). Türkiye'deki Alzheimer hastalarının sayısı yaklaşık olarak 300.000'dir (Taşci et al. 2012). AH prevalansı yaşla birlikte artmaktadır, 65-74 yaş aralığının da AH'ye yakalanma riski % 3 artarken, 85 yaş ve üzerindeki için bu risk % 50'ye çıkmaktadır (Castellani et al. 2010).

1. GİRİŞ

Erken başlangıçlı Alzheimer Hastalığı (EBAH) olan hastaların prevalansı düşüktür, ancak çalışmalarda % 6 ile % 16 arasında değişiklik göstermektedir ve bazı gözlemler,

EBAH'ın geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı (GBAH)'na göre farklı ve daha şiddetli olabileceğini sunmaktadır (Panegyres and Chen 2014; Yokota et al. 2005).

Ayrıca, AH'li bir ebeveyne, erkek kardeşe veya kız kardeşe sahip olan bireylerin, Alzheimer'in birinci dereceden akrabasına sahip olmayan kişilere göre hastalığı geliştirme olasılığı daha yüksektir (Green 2002; Wilson et al. 2005).

1.3. Alzheimer Hastalığının Patofizyolojisi

AH'nin kesin olarak teşhisi ve etkin bir şekilde tedavi edilmesi, AH patofizyolojisinin doğru bir şekilde anlaşılmasına dayanmaktadır (Selkoe 2000). Bununla birlikte, hastalığın patogenezinin anlaşılmasındaki kayda değer gelişmelere rağmen, son birkaç yılda yapılmış olan çalışmalar AH'nin mekanizmasını tam olarak açıklayamamıştır. Apolipoprotein E (APOE)'nin genotiplemesi, sitoskeletal proteinlerin hiperfosforilasyonu, oksidatif stres, anormal hücre döngüsüne yeniden giriş, inflamasyon ve amiloid β ($A\beta$) metabolizması ile bağlantılı olarak patolojik lezyonları ve nöronal sitopatolojiyi ele almak için birkaç farklı hipotez önerilmiştir (Dong et al. 2012).

AH'nin altında yatan nörobiyolojik mekanizmalar, patolojinin anlaşılmasında kilit bir unsur olmuştur, şu ana kadar tanımlanan en önemli hipotezler şu şekildedir:

- (1) kolinerjik hipotez,
- (2) amiloid kaskad hipotezi,
- (3) tau hipotezi,
- (4) oksidatif stres ve kalsiyumun rolü

(Sanabria-Castro et al. 2017).

1.3.1. Kolinerjik hipotez

AH, ilerleyici hafıza kaybı ve diğer entellektüel işlevlerle karakterize ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır. Ön beyindeki kolinerjik nöronların aşırı azalması ve kortikal kolin asetiltransferaz aktivitesinin seviyesinin düşmesi, AH ile karakterize olan nörobiyolojik değişikliklerin ve bilişsel bozuklukların derecesi ile ilişkilidir (Perry et al. 1978; Whitehouse et al. 1981). Sonuç olarak, merkezi sinir sisteminde kolinerjik fonksiyon kaybının ileri yaş ve AH ile ilişkili bilişsel gerilemeye önemli ölçüde katkıda bulunduğunu belirten “kolinerjik hipotez” geliştirilmiştir (Bartus 2000).

Kolinerjik hipotez, AH için tedavi stratejileri ve ilaç geliştirme yaklaşımlarının çoğunluğu için bir temel olarak hizmet etmiştir. Hali hazırda bilişsel bozulma ile beyin içindeki azalmış kolinerjik iletim arasındaki gözlenen ilişkinin AH'de önemli bir rol oynadığı konusunda ortak bir görüş birliği vardır, ancak kendi başına hastalığın kesin nedenselliğini oluşturmamaktadır (Pena et al. 2006).

1.3.2. Amiloid kaskad hipotezi

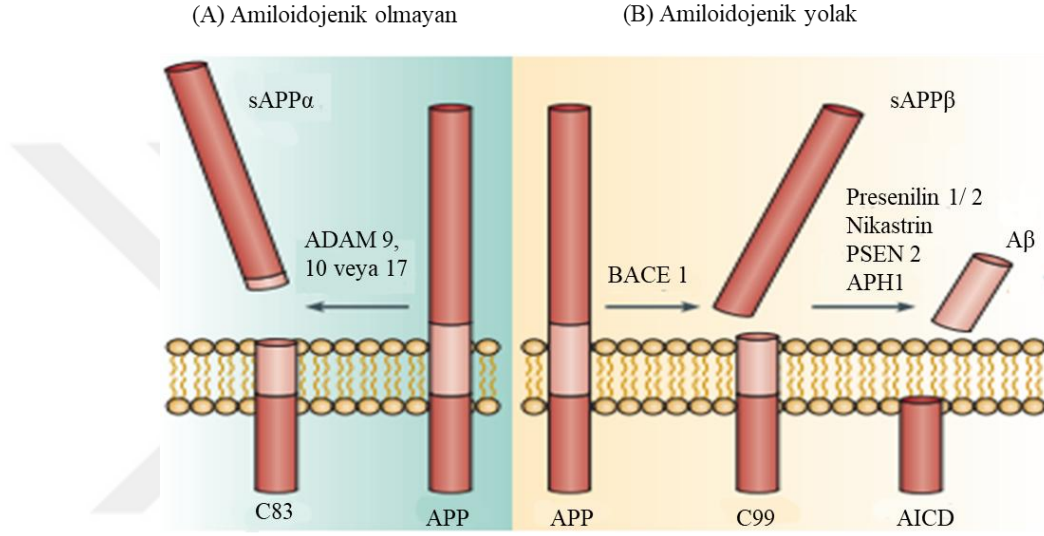
Amiloid kaskad hipotezi, beyindeki aşırı miktarda A β peptidinin (özellikle A β 42); amiloid plaklar, nörofibriler yumaklar, sinaps kaybı ve nihai nöronal hücre ölümü de dahil olmak üzere AH ile ilişkili patolojiden sorumlu olduğunu ortaya koymaktadır (Hardy and Selkoe 2002). AH taşıyan beyinlerde kortikal plaklar büyük ölçüde, amiloid beta öncü proteininden (APP) üretilen toksik A β peptidlerini içermektedir (Blennow et al. 2006).

AH'nin belirteçlerinden biri olan A β , APP' nin α -, β - ve γ -sekretaz olarak adlandırılan enzimler ya da enzim grupları tarafından ardışık endoproteoliziyle üretilmektedir (Frank M. LaFerla 2007). Disintegrin ve metalloproteinaz ailesine (ADAM9,ADAM10 ve ADAM17; aynı zamanda tümör nekroz faktörü dönüştürücü enzim olarak bilinmektedir) ait α -sekretaz aktivitesi olan üç enzim tanımlanmıştır (Allinson et al. 2003). ADAM ailesinin bir üyesi olan ADAM10 (kromozom 15), APP'nin birincil α -sekretazı olarak tanımlanmıştır ve AH'deki A β yükünün hafifletilmesindeki yararlı rolü hem *in vivo* hem de *in vitro* araştırmalarda ortaya çıkarılmıştır (Kuhn et al. 2010; Postina et al. 2004). Bununla birlikte, aspartil proteazın pepsin ailesinden tip 1

1. GİRİŞ

integral membran proteini olan β -site APP parçalayan enzim 1 (kromozom 11, BACE 1), β -sekretaz olarak tanımlanmıştır (Sinha et al. 1999; Vassar et al. 1999). γ -sekretaz ise, PSEN 1 veya PSEN 2, nicastrin, anterior farinks defekt ve presenilin güçlendirici 2' den oluşan enzimlerin bir kompleksi olarak tanımlanmıştır (Wolfe et al. 1999; Yu et al. 2000).

APP'nin bölünmesi ve işlenmesi, amiloidojenik olmayan yolak ve amiloidojenik yolak olarak iki ayrı şekilde incelenmektedir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. (A) Amiloidojenik olmayan yolak ve (B) Amiloidojenik yolak ile APP proteolizi (LaFerla et al. 2007).

Yaygın amiloidojenik olmayan yolda APP, hücre dışı ortama salgılanan büyük bir amino (N)-terminal ektodomain (sAPP α) üreten, karboksil (C) terminalinden 83 aminoasitlik bir pozisyonda α -sekretaz ile parçalanmaktadır (Kojro and Fahrenholz 2005). Oluşan 83-aminoasit C-terminali fragmanı (C83) membranda tutulmakta ve daha sonra α -sekretaz ile parçalanarak, p3 adlı kısa bir fragman oluşturmaktadır. A β bölgesi içinde meydana gelen, α -sekretaz ile yarılmamanın sonucunda A β 'nin oluşumunun engellenmesi önemlidir (Haass et al. 1993).

Amiloidojenik yolak APP için alternatif bir bölünme yolu olup A β üretimine yol açmaktadır. Yolak da iki aşamalı bir kesim görülmektedir. İlk aşamada APP başlangıçta β -sekretaz ile sAPP β 'yi ekstraselüler alana bırakmak ve 99 aminoasit C-terminal fragmanını (C99) zar içinde bırakmak üzere yarılmaktadır (Selkoe 1994). İkinci aşamada

ise, C99; A β ve APP hücre içi C-terminal domenini (AICD) serbest bırakmak için γ -sekretaz ile 38-43 aminoaside işlenir. Bu işlemin sonucunda % 90 oranında A β 40 ve % 10 oranında toksik olan A β 42 oluşmaktadır. A β 42 varyantı, A β 40'a göre daha hidrofobiktir, fibril oluşumuna daha yatkındır ve daha uzun şekilli olup, aynı zamanda serebral plaklarda bulunan baskın izoformdur. Yakın zamanda yapılan araştırmalarda, A β üretimi için γ -sekretaz aktivitesinin α -sekretaz tarafından da negatif bir şekilde düzenlenebileceği ve α yolu ile β yolu arasında bir tartışma gösterdiği bulunmuştur (Findeis 2007; Jarrett et al. 1993; Tian et al. 2010).

Bu yollar üzerinde diyet, hormonal durum ve APP'nin işlenmesini etkileyebilen mutasyonlar gibi birçok faktör bulunmasından dolayı yolların nasıl düzenlendiği tam olarak aydınlatılamamıştır (Krishnaswamy et al. 2009).

1.3.3. Tau hipotezi

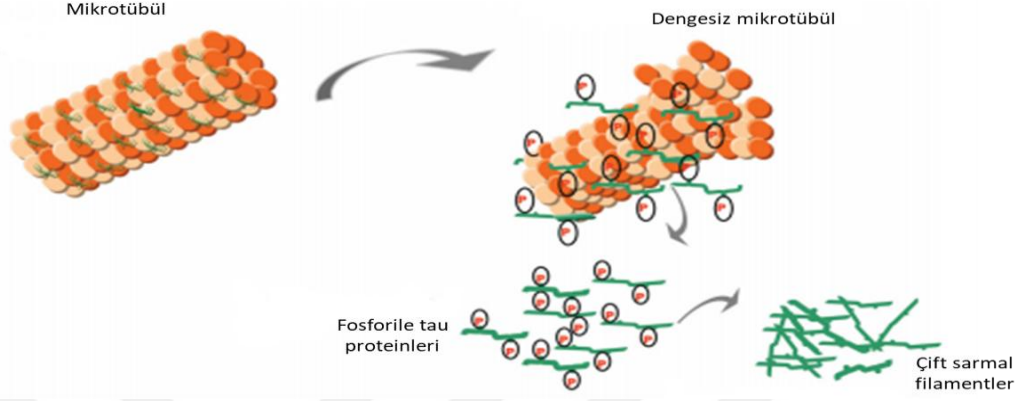
Bu hipotezde, tau proteini nörodejenerasyona neden olan ikincil bir patojenik olay olarak ortaya çıkmaktadır (Roberson et al. 2007). Nöronlarda, mikrotübüller nöronal yapı, aksonal taşıma ve sinaptik plastisite onarımı için gereklidir (Cleveland and Hoffman 1991). Tau proteini esas olarak nöronlarda bulunur ve mikrotübüller ile ilişkili proteinlerin ailesine aittir (Tucker 1990). Ayrıca bu mikrotübüller yapısal değişiklikler, aksonal transport ve nöronal büyüme için destek sağlamaktadır (Goedert et al. 2006).

Patolojik koşullar altında, sitoplazmada hiperfosforile tau proteinlerinin seviyelerinde anormal bir artış gözlenmiştir (Kuret et al. 2005). Hiperfosforile olan Tau proteinleri nörofibriler yumakları (NFY) oluşturmaktadır. Hiperfosforile tau proteini; sitoskeletal proteinler ile anormal agregasyon ve mikrotübüllerle daha düşük bir etkileşim derecesi göstermektedir. Ayrıca, hiperfosforile tau proteini, serbest Tau proteininin artışına neden olmasından dolayı daha yüksek agregasyon ve fibrillizasyona yol açmaktadır. Bu anormalliklerin sonucunda ise aksonal transportun bozulma miktarını arttırmaktadır (Kuret et al. 2005; Rafii and Aisen 2009).

Bilimsel literatür, AH'nin patogenezinde nöronal disfonksiyondan sorumlu en önemli faktörler olarak tau proteininde ve A β oligomerlerinde değişiklikler

1. GİRİŞ

bildirmektedir (Şekil 1.2) (Stoothoff and Johnson 2005). Nöropatolojik olarak AH tau proteinlerinden oluşan intranöronal nörofibriler lezyonların varlığı olarak tanımlanmaktadır (Trojanowski and Mattson 2003).



Şekil 1.2. AH'de, mikrotübüllere bağlanma ve mikrotübül düzeneğini yükseltme yeteneğinde bir azalma vardır. Hiperfosforile Tau, destabilize mikrotübül ağına, aksonal transportun bozulmasına ve nihayetinde nörofibriler yumak (NFY) oluşumuna ve nöronal ölüme katkıda bulunabilmektedir (de Paula et al. 2009).

1.3.4. Oksidatif stres ve kalsiyumun rolü

Nörodegeneratif hastalıklarda ortak özelliklerden birinin oksidatif stres (OS) ve nöronal apoptozis arasındaki ilişki olduğu uzun zamandır bilinmektedir (Lin and Beal 2006). OS, aktif reaktif oksijen türlerinin üretimi ile antioksidanların seviyesi arasındaki dengenin önemli ölçüde bozulduğu ve hücre hasarına yol açtığı bir durumdur (Gandhi and Abramov 2012). AH'nin senil plaklardan ve nörofibriler yumaklardan oluşturulmuş patolojisine ek olarak, yaygın OS'nin varlığı, AH'nı taşıyan beyinlerin bir diğer özelliğidir (Praticò 2008). Ayrıca, AH bulunan beyinde proteomik analizi, enerji metabolizması yolları gibi hayati hücresel işlevlerde önemli rollere sahip olan, büyük olasılıkla işlevsiz olan çok sayıda oksitlenmiş proteini tanımlanmıştır (Reed et al. 2009).

AH patogeneğinde OS önemli bir faktör olmasına rağmen, redoks dengesinin değiştirildiği mekanizmalar ve serbest radikallerin kaynakları tamamen bilinmemektedir (Sanabria-Castro et al. 2017).

1. GİRİŞ

Yaygın bir intrasellüler haberci olan kalsiyum, çoklu fizyolojik fonksiyonları düzenler, konsantrasyon gradyanları oluşturur, çeşitli proteinlere, reseptörlere ve iyon kanallarına bağlanmaktadır. AH'de, nöronların kalsiyumun girişini, çıkışını ve hücre içi bölümlenmesini düzenleyebilme yeteneği tehlikeye girmektedir (Wang and Sun 2010). Kalsiyum bozulmasından kaynaklanan değişiklikler; yaşla ilişkili OS, hastalık ile ilişkili A β oligomerlerin birikmesiyle birlikte metabolik bozukluğun ve presenilin kodlayan genlerin mutasyonlarının varlığının sonucu olmaktadır (K.N. Green and I.F. Smith 2007). Özellikle A β varlığı OS'yi indükleyerek kalsiyumu aşırı yüklemektedir (Crompton et al. 2002).

1.4. Alzheimer Hastalığının Türleri

AH; erken başlangıçlı ve geç başlangıçlı olarak iki temel gruba ayrılmaktadır.

1.4.1. Erken başlangıçlı alzheimer hastalığı

65 yaşın altındaki insanlarda demans sıklıkla erken başlangıçlı Alzheimer Hastalığı (EBAH) olarak adlandırılmaktadır (van der Flier et al. 2011). EABH; AH'nin % 10'nunu oluşturmaktadır ve erken başlangıçlı ailesel AH (EBAAH) veya sporadik erken başlangıçlı AH (SEBAH) olarak ikiye ayrılabilir (Antonell et al. 2013).

EBAAH, 65 yaşından önce ve AH için pozitif aile öyküsü olan bunama ile karakterize bir durumdur (Wu et al. 2012). EBAAH, 1930'lardan beri tanınmaktadır (Lowenberg and Waggoner 1934). Aile öyküsü, AH 'de yaş faktöründen sonra ikinci en etkili risk faktörü olarak gösterilmektedir (Gatz et al. 2006; Tanzi and Bertram 2005). EBAAH' ye amiloid beta öncü proteini (kromozom 21, *APP*) mutasyonu (EBAAH'nin % 10-% 15'i), presenilin 1(kromozom 14, *PSEN1*) mutasyonu (EBAAH'nin % 30-70'i) ve presenilin 2 (kromozom 1, *PSEN2*) mutasyonu (EBAAH'nin % 5'inden fazlası) neden olmaktadır (Bird 1993).

En az 40 *APP* mutasyonunun, esas olarak otozomal dominant kalıtım paterni ile aktarılan ailevi AH'ye neden olduğu bilinmektedir. Bu olguyu destekleyen bir fenomen de, 21 kromozom üçlüsü nedeniyle *APP*'nin fazladan kopyasını taşıyan Down Sendromlu

1. GİRİŞ

hastaların genellikle erken yaşlarda AH geliştirmesidir (Żekanowski and Wojda 2009).

PSEN1, Alzforum veri tabanında patojen olarak rapor edilen 221 mutasyonla en sık görülen gendir, *PSEN2* ise 19 farklı patojenik mutasyon rapor edilmiştir(<https://www.alzforum.org/mutations>). *PSEN1* mutasyonlarının A β 42 ile A β 40 oranını arttırdığı görülmektedir, bu da γ -sekretaz aktivitesinde azalmaya neden olan bir fonksiyon değişikliğine neden olmaktadır (De Strooper and Karran 2016). A β 42'nin birikmesinin *PSEN1* mutasyon taşıyıcılarında erken bir klinik öncesi olay olabileceği öne sürülmüştür. *PSEN2* ile ilişkili mutasyonlar ise, insanlarda ve farelerde A β 42 ile A β 40 oranını arttırdığı bildirilmiştir (Scheuner et al. 1996).

SEBAH ise daha az görülmekte ve aile öyküsü taşımamaktadır (Antonell et al. 2013). SEBAH'nın, 65 yaşın altındaki bireylerde ailesel Alzheimer hastalığı gibi görülmesine rağmen, herhangi bir gen ile veya yolla ilişkilendirilmesinin daha zor olduğu kanıtlanmıştır (Antonell et al. 2013). SEBAH'ın gelişimi için en önemli genetik risk faktörü *APOE* geninin E4 varyantının varlığıdır (Corder et al. 1993; Strittmatter et al. 1993).

1.4.2. Geç başlangıçlı alzheimer hastalığı

Geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı (GBAH), 65 yaş üstü hastaların klinik semptomlar gösterdiği, en yaygın demans şeklidir ve GBAH olan bireylerin sayısı 2050 yılına kadar üç katına çıkacağı tahmin edilmektedir (Association 2014). İkiz çalışmalarda GBAH'ın kalıtım oranının % 80 gibi yüksek bir düzeyde olduğu tahmin edilmektedir (Gatz et al. 2006). Apolipoprotein E (kromozom 19, *APOE*), GBAH için en önemli duyarlılık geni olarak kesin bir şekilde belirlenmiştir (Genin et al. 2011). Polimorfik *APOE* geninin en yaygın izoformları; ϵ 2, ϵ 3 ve ϵ 4 olarak bulunmaktadır (Nalbantoglu et al. 1994). *APOE* geninin ϵ 4 allelinin, AH için güçlü bir genetik risk faktörü olduğu keşfedilmiştir (Dergunov et al. 2000; Ljungberg et al. 2003). ApoE, AH hastalarının beyindeki A β ile birlikte lokalize olmaktadır, bu da ApoE'nin, A β 'nin metabolizmasına, agregasyonuna ve / veya birikimine dahil olabileceğini düşündürmektedir (Namba et al. 1991). AH, *APOE* geninin ϵ 4 şeklini devralması, bir bireyin AH geliştireceğini garanti etmemektedir (Association 2014).

Epigenetik mekanizmalar, gen transkripsiyonunda ve ekspresyonundaki tersinir değişimlerle hareket etse de, giderek artan bir şekilde nörolojik ve psikiyatrik bozuklukların karakteristiği olan uzun süreli ve progresif davranışsal anormalliklere yol açan gen ekspresyonu üzerindeki kontrolde kalıcı değişiklikler uygulayabildiği kabul edilmektedir (Tsankova et al. 2007). Hayvan çalışmalarında, erken yaştaki çevresel uyaranların metilasyon paternlerini değiştirdiğini, modifiye davranışlarla sonuçlanabilecek ya da yetişkinlikte hastalık riskini artırabilecek gen ekspresyon değişikliklerine yol açabileceğini açıkça göstermiştir (Weaver et al. 2004). Davranışsal ve beslenme dengesizliklerine ek olarak, kimyasala maruz kalma da DNA metilasyonunu engelleyebilmektedir (Poirier and Vlasova 2002). DNA metilasyonuna ek olarak, çevresel ajanlar da kromatin yeniden yapılanmasını bozabilir ve gen ifadesinde uzun vadeli değişiklikler yapabilmektedir (Schumacher et al. 2011).

GBAH, hastalık etiolojisinde epigenetik bir bileşen olduğunu gösteren birçok Mendel dışı anomaliyi sergiler (Wang et al. 2008). GBAH'nı taşıyan beyin dokusunda kontrollere göre anlamlı epigenetik farklılık gösterdiği ve epigenetik distans yaşla arttığı, AH'nın gelişiminde epigenetik etkilerin rol oynadığı gösterilmiştir. Özellikle *PSENI* ve *APOE*, GBAH yatkınlığına katkıda bulunabilecek önemli bir bireyler arası epigenetik değişkenlik sergilemiştir (Fuso et al. 2006).

Demans hastalarının beyinlerinde anormal metilasyon yolları tespit edilmiştir. Bu değişiklikler demansın patolojik ve klinik değişikliklerinden çok daha erken saptanabilmesinden dolayı epigenetik mekanizmanın GBAH'nın başlangıç aşamasındayken etkileyebildiğini göstermektedir (Alagiakrishnan et al. 2012). GBAH oluşumunda histon modifikasyonları veya DNA metilasyonu gibi epigenetik anormalliklerle görülmektedir (Schumacher et al. 2011). Genetik olarak GBAH ile ilişkili olan genlerden *APOE* geni, DNA metilasyonunda en büyük bireylerarası varyansı göstererek, en değişken metile edilmiş dizileri sergilemiştir (Wang et al. 2008).

1.5. Alzheimer Hastalığının Risk Faktörleri

AH'nin nedeni tam olarak bilinmemesine rağmen birçok risk faktörü ile ilişkilendirilmiştir. AH için yaş, genetik ve kafa travması gibi potansiyel risk faktörleri

1. GİRİŞ

hakkında çok miktarda veri bulunmaktadır. Bazı risk faktörleri potansiyel olarak değiştirilebilmektedir (Ballard et al. 2011; Burns and Iliffe 2009).

AH için risk faktörlerinden bazıları şunlardır;

1. Sosyodemografik faktörler;

- Yaş: yaşın ilerlemesi
- Cinsiyet: tutarlı bir kanıt yoktur
- Ulusal ve etnik profil: Bölgesel varyasyonlara dair bazı kanıtlar

2. Ailesel ve genetik faktörler;

- Aile öyküsü: Birinci derece akraba etkilendiğinde 3,5 kat risk artışı
- Mutasyona neden olan hastalıklar: 1, 14 ve 21 numaralı kromozomlardaki mutasyonlar
- ApoE genotipi
- Down Sendromu: herbiri sonunda Alzheimer hastalığının nöropatolojik özelliklerini geliştirir
- Premorbid bilişsel rezervleri: daha uzun eğitim ve daha yüksek zeka koruması

3. Tıbbi öykü ve tedaviler;

- Kafa yaralanmaları: antienflamatuar ilaçlar riskte azalma ile ilişkilidir
- Östrojen değişimi: tutarlı bir kanıt yoktur
- Vasküler risk faktörleri: hipertansiyon, diyabet, homosistein ve kolesterolün tamamı ilişkilidir
- Depresyon: Alzheimer hastalığı ile ilişkilidir
- Herpes simplex (Uçuk hastalığı): ApoE e4'ün varlığında muhtemel bir risk faktörüdür.

4. Alışkanlıklar;

Tutarlı bir kanıt yoktur (Burns and Iliffe 2009).

1.6. Alzheimer Hastalığının Tanısı

AH prevalansının, önümüzdeki yıllarda önemli ölçüde artacağı tahminiyle, hastalığın erken teşhisi için etkili biyobelirteçlerin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır (Kehoe et al. 2014). Son yıllarda A β ve Tau gibi biyobelirteçlerde, AH için amiloid görüntüleme ve bilişsel zayıflamada önemli gelişmeler olmasına rağmen, özellikle plazma A β ile ilgili çalışmalar çelişkili sonuçlar doğurmuştur. (Laske 2013; Roe et al. 2013). Bununla birlikte, AH için terapötik müdahalelerin, nörodejenerasyonun tersine çevrilmesi yerine hastalık başlangıcının önlenmesi veya geciktirilmesinde daha başarılı olması muhtemeldir, bu nedenle AH'nin erken saptanması çok önemlidir ve etkili biyobelirteçlerin geliştirilmesi gerekmektedir (Langbaum et al. 2013). Ayrıca, dejeneratif değişikliklerin başlangıcının klinik semptomların ortaya çıkmasından 20-30 yıl önce başladığı düşünülmektedir (Pietrzak et al. 2018).

Nörogörüntüleme yöntemleri, AH için biyobelirteçler olarak büyük bir potansiyel sunmaktadır ve özellikle manyetik rezonans tekniklerindeki son gelişmeler, AH ile ilişkili erken beyin değişikliklerinin saptanmasında etkili olmuştur. AH tanısında en çok kullanılan nörogörüntüleme tekniklerinden birisi ise yapısal Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG)'dir (Kehoe et al. 2014).

Ancak yüksek özgüllük taşıyan ve doğru tanı yöntemleri ile dikkatli bir teşhis konulduktan sonra, gelecekte yenilikçi, önleyici ve hastalık modifiye edici tedaviler uygulanabilir ve bu tanı herhangi bir görünür hastalık kanıtı veya hafıza kaybı meydana gelmeden önce müdahaleyi başlatmak için çok önemlidir (Gotovac et al. 2014; Schwartz 2001).

1.7. Alzheimer Hastalığının Tedavisi

AH, dünya çapında bunamanın en yaygın nedenidir. Etiyoloji multifaktöryeldir ve

1. GİRİŞ

hastalığın patofizyolojisi karmaşıktır. Bununla birlikte, AH vakaları hızla artmaktadır. AH ayrıca, hastanın ailesine ve topluluğuna muazzam duygusal ve mali yük getirmektedir. Bu veriler, AH için etkili bir tedavinin ne derece önemli olduğunu göstermektedir (Anand et al. 2014). Ne yazık ki, bütün bilimsel çabalara rağmen, şu anda AH'nin önlenmesi ve tedavisi için etkili bir farmakoterapötik seçenek bulunmamaktadır

(Yiannopoulou and Papageorgiou 2013). Kullanılan lisanslı, farmakolojik ve immünoterapi tedavilerinden örnekler; semptomatik tedaviler (kolinesteraz inhibitörleri, N-metil D-aspartat (NMDA) reseptör antagonistleri), nöropsikiyatrik belirtiler için tedaviler (atipik antipsikotikler, antidepresanlar, antikonvülsanlar) ve önerilen hastalık değiştirici tedaviler (immunoterapi, sekretaz inhibitörleri, amiloid agregatları, bakır ve çinko modülatörler, Tau agregasyon inhibitörleri, glikojen sentez kinaz 3, doğal ürünler ve vitaminler) olarak verilebilir (Ballard et al. 2011).

AH'nin kolinerjik hipotezi, bazal önbeyin içindeki kolinerjik sistemlerin, asetilkolin nöronlarının kaybı, asetilkolin sentezi ve bozunması için enzimatik fonksiyon kaybı gibi hastalık sürecinin erken dönemlerinde etkilendiği sonucuna varmaktadır, bu da hafıza kaybına ve diğer bilişsel ve nöropsikiyatrik belirtiler gibi bilişsel olmayan işlevlerin bozulmasına neden olur. Sinaptik yarık arasındaki asetilkolin bozulmasını geciktirmek için asetilkolin inhibitörleri kullanarak kolinerjik iletimi geliştirmeye yönelik bir strateji önerilmiştir (Bartus et al. 1982). Bugüne kadar, hafif ve orta şiddette AH tedavisinde üç ayrı asetilkolin inhibitörü onaylanmıştır, bunlar; donepezil, rivastigmin ve galantamindir (Farlow vd 2000). Yaygın olarak kullanılan bu üç kolinesteraz inhibitörü, hemen hemen aynı genel etki mekanizmasına sahiptir, ancak güvenlik ve tolerabilite profillerini etkileyebilecek diğer farmakolojik özellikler bakımından büyük ölçüde farklılık göstermektedirler (Lockhart et al. 2009).

Orta ve şiddetli AH için başka bir terapötik seçenek ise, memantindir. Bu ilaç, nöronları eksitotoksisiteden koruduğu düşünülen, rekombinant, orta afiniteli bir NMDA antagonistidir (Yiannopoulou and Papageorgiou 2013). Memantin, davranışsal skorları ve özellikle ajitasyon ve agresif davranışla ilişkili alt ölçekleri iyileştirdiği gösterilmiştir (Wollen 2010). Memantin sıklıkla asetilkolin inhibitörleri ile kombinasyon halinde kullanılmakta, klinik olarak anlamlı gelişmeler sağlayıp sağlamadığı tartışılmaktadır

(Francis et al. 2012; Maelicke and Albuquerque 2000; Venneri et al. 2005).

Asetilkolin inhibitörleri ve / veya memantin ile semptomatik tedaviye dayanan bir klinik yararın sadece 6 ila 12 ay sürdüğü kabul edilmektedir. Bu durum oldukça sınırlı görünse de, hem hastalık başlangıcını hem de progresyonu sadece 1 yıl geciktirebilecek müdahalelerin, 2050 yılında hastalığın beklenen vakalarının yaklaşık 9,2 milyon kadar azaltabileceği düşünülmektedir (Brookmeyer et al. 2007). Dahası, birçok çalışma asetilkolin inhibitörlerini 3-5 yıllık bir süre için bilişsel gerilemeyi yavaşlattığını ve AH'nin erken döneminde asetilkolin inhibitör tedavisinin başlaması halinde daha etkili olduğunu göstermektedir. Böyle bir erken tedavi başlangıcı, bazı asetilkolin inhibitörleri için önerilen nöroprotektif etkiler açısından makul görünmektedir (Wollen 2010).

1.8. Alzheimer Hastalığı Modelleri

AH etiyolojisini anlamamanın anahtarı, hastalığa ait bütün yönleri ideal olarak özetlemesi gereken etkili hastalık modellerinin gelişiminde yatmaktadır. Yıllar boyunca AH'nin modellerinin geliştirilmesinde *in vivo*, *in vitro* ve *in silico* platformları içeren birçok teknik kullanılmıştır. Bu yaklaşımların her biri, AH'nin bazı temel özelliklerini ortaya çıkarmasına karşın, hiçbiri AH insan beyninde gözlenen patolojik işaretleri tam olarak taklit etmeyi başaramamıştır (Ranjan et al. 2018).

Kullanılan AH modelleri şunlardır;

- 1) AH'nin *in vitro* modelleri
 - Doku modelleri
 - Hücre modelleri
 - Moleküler simülasyon modelleri

2) AH'nin transgenik hayvan modelleri

- *APP* transgenik fare modeli
- *Tau* transgenik fare modeli
- *APP* ve *Tau* ikili transgenik fare modeli
- Üçlü transgenik fare modeli
- 5xTransgenik-AH modeli
- Transgenik sıçan modelleri

3) AH'nin transgenik olmayan hayvan modelleri

- Doğal AH modelleri
- Yüksek yağ diyeti ile indüklenmiş AH modelleri
- AH'nin müdahale modelleri (Kimyasal olarak indüklenmiş AH modelleri ve lezyon modelleri) (Li et al. 2016)

1.8.1. Alüminyum maruziyeti ile oluşturulan deneysel hayvan modeli

Alüminyum (Al), güçlü bir pozitif yük ve nispeten küçük iyonik yarıçap ile karakterizedir. Al'nin bu iyonik yarıçapı, çeşitli proteinlerin metal bağlayıcı amino-asitleri ile bağlanmasını kolaylaştırmaktadır (Kawahara and Kato-Negishi 2011). Al bilinen bir nörotoksindir ve Al maruziyetinin AH patogenezi için bir risk faktörü olduğu düşünülmektedir (Wang et al. 2016). Ancak, Al ve AH arasındaki ilişki, AH patogenezinin kesinlik kazanmamasından dolayı tartışma konusu olmaktadır (Bondy 2010; Kawahara and Kato-Negishi 2011; Yegambaram et al. 2015). Bu konu üzerine yapılan çalışmalar, çoğu nöronun bölünmeyen doğası ve oksidatif strese karşı savunmasız olmaları nedeniyle beyin Al'ye duyarlı olduğunu göstermiştir (Liang et al. 2013; Wang et al. 2014).

Al kan-beyin bariyerini geçerek beyinde birikebilir ve Al'nin beyinden atımı diğer organlara göre daha yavaş olmaktadır (Banks and Kastin 1989; Yokel and McNamara 2001). Ayrıca Al, AH'nin belirteci olan A β ile kompleks oluşturup, A β birikimini

arttırabilmektedir. Bununla birlikte, Al ile birleşen A β 'nin, membran bozulmasına, kalsiyum homeostazının kaybına, mitokondriyal solunumun pertürbasyonuna ve son olarak nöronların ölümüne neden olan normal A β 'dan daha toksik olduğu bulunmuştur (Denise Drago et al. 2008; D. Drago and 2008; Kawahara and Kato-Negishi 2011b).

Oksidatif ve inflamatuvar olayların AH sürecine katkıda bulunduğu açıktır (Yan et al. 1995; Zhou et al. 1995). Bununla birlikte, önemli çalışmalar Al'nin nöroinflamatuvar bir yanıt ortaya çıkarabileceğini; *in vivo* ve *in vitro* olarak beyindeki reaktif oksijen türlerinin oluşumunu şiddetlendirdiğini göstermektedir (Bondy et al. 1998; Johnson and Sharma 2003). Ayrıca, Al'ye fazla maruz kalmanın AH patogenezinde ilerleyici bir katkısı olduğu yapılan beyin otopsi örneklerinin analizi ile kanıtlanmıştır (Exley and Vickers 2014; Walton 2006).

AH'nin kimyasal olarak indüklenmiş modelleri, başlangıçta, sıçanlara A β enjekte edilerek çevre nöronlardaki etkilerini araştırmak için kurulmuştur. AH benzeri bir patolojiyi indüklemek için kullanılan maddeler arasında kolinerjik nöronlar için nispeten spesifik skopolamin, NMDA reseptörlerini aktive etmek için L-metiyonin, tau fosforilasyon için okadaik asit, mitokondriyal disfonksiyon için sodyum azid ve ayrıca reaktif oksijen türlerinin arttırılması için Al gibi ağır metaller bulunmaktadır. Bu maddeler, nöronal veya nörotransmitter yollarını bloke ederek hayvanlarda demansı indükler, bu da, hasarın bilişsel işlev üzerindeki belirli bir nörotransmisyon yoluna etkilerini araştırmak ve ayrıca bu yollarda hedeflenen önemli ilaçları test etmek için ayırt edici bir araç sağlamaktadır (Li et al. 2016).

1.9. İminodiasedik Asit

Glutamat, glutamik asit anyonudur ve nörolojide nörotransmitter olarak görev alır. Ayrıca, bir sinir hücresinin başka hücrelere sinyal olarak gönderdiği kimyasallardan birisidir ve omurgalı sinir sisteminde büyük oranda bulunmaktadır (Meldrum 2000). N-metil D-aspartat reseptörleri (NMDAR), beyin fizyolojisi ve bilişsel işlevlerin (öğrenme ve hafıza gibi) çeşitli yönlerinde yer alan iyonotropik glutamat reseptörleridir (iGluR) (Bliss and Collingridge 1993). Ayrıca, eksitotoksisite, NMDAR aktivitesi arttıkça, örneğin; nöronlar yaralandığı zaman, normal seviyelerdeki glutamatla bile devreye

1. GİRİŞ

girebilmektedir (Lipton 2004). NMDAR, farklı fizyolojik ve patolojik süreçlere aracılık ettiğine inanılan sinaptik ve ekstrasinaptik lokalizasyonlarda nöronal hücre zarlarında bulunmaktadır (Papouin et al. 2012). NMDAR, magnezyum (Mg^{+2}) blokajının uzaklaştırılması, yüksek kalsiyum (Ca^{+2}) geçirgenliği ve nispeten yavaş ligand-bağımlı kinetikleri yoluyla voltaj ilişkili aktivasyonunda diğer iGluR'lerden farklıdır. Bu benzersiz özellikler, NMDAR'ı sinaptik fonksiyon ve plastisitede çok önemli bir rol için eşsiz ve vazgeçilmez kılmaktadır (Collingridge and Singer 1990; Cotman et al. 1988).

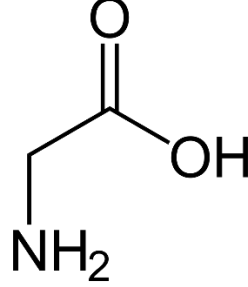
AH ilerlemesi, bellek ve bilişe karışan hassas beyin bölgeleri olan hipokampus ve neokortekste işlev ve yapıdaki kademeli bir hasar ile ilişkilendirilmiştir. AH, sinaptik kayıp, A β plaklarının birikmesi, NFY'ler ve hiperfosforile Tau ile karakterizedir. Bu değişiklikler NMDAR'lerinin aktivasyonu ve nihayetinde AH patolojisi ile sonuçlanan stres ile ilişkilidir. Ayrıca, A β birikiminin, oksidatif stres, bozulmuş enerji metabolizması ve defektif Ca^{+2} homeostazında yaşlanma ile ilişkili artışları şiddetlendirebilecek nöronlarda NMDAR aracılı Ca^{+2} akışını, eksitotoksisite ve stresle ilişkili sinyal yollarını tetiklediği de bildirilmiştir (Bezprozvanny and Mattson 2008).

A β birikiminin eksitotoksisite üzerindeki spesifik etkileri henüz tam olarak anlaşılammıştır ve AH'de NMDAR aktivasyonunun tam rolü belirsiz olmasına rağmen, birkaç çalışma A β agregasyonunun NMDAR'a bağlanabildiğini ve sinir hücrelerine Ca^{+2} akışının arttığını kanıtlamıştır (Molnár et al. 2004).

Bununla birlikte, sinaptik ve ekstrasinaptik NMDAR'ların sırasıyla farklı endojen koagenler olan D-serin ve glisin tarafından aktive edildiği bulunmuştur (Papouin et al. 2012). Ayrıca, NMDAR aktivasyonunun etki mekanizması net değildir, özellikle glisin bağlama yerlerinin endojen geçitleri ile ilgili temel bilgiler hala aydınlatılmamıştır (Johnson and Ascher 1987). NMDAR'ların aktive edilmek üzere, glutamatın ve başka bir antagonistin bağlanmasını gerektirir. Glisin (Şekil 1.3), ilk olarak NMDAR'ların aktivasyonunda bir yardımcı olarak hizmet ettiği önerilmiştir (Forsythe et al. 1988; Johnson and Ascher 1987; Kleckner and Dingledine 1988). Glutamat ve bir yardımcı ligand, nöron postsinaptik depolarize bir durumda iken bağlanırsa, NMDA kanalları açılarak kalsiyumun hücrelere girmesine izin vermektedir. Hücrelere kalsiyum akışının artması, öğrenme ve hafıza altında yatan mekanizmalar ile ilgili olduğuna inanılmaktadır

1. GİRİŞ

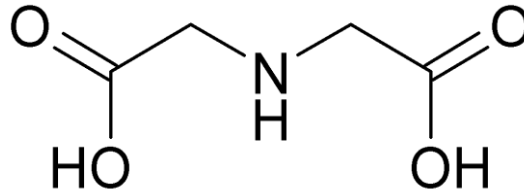
(Henneberger et al. 2010). Eğer hücre içindeki Ca^{+2} miktarı artarsa, NMDR'leri aşırı aktive olur ve bu artış hücre ölümünü başlatan bir dizi süreci tetiklemektedir (Ferreira et al. 2012).



Şekil 1.3. Glisin'in Yapısı.

Eksojen kaynaklı glisin, NMDAR'ların yanıtlarını güçlendirmektedir (Forsythe et al. 1988; Johnson and Ascher 1987; Kleckner and Dingledine 1988). Bununla birlikte, ekstrasinaptik NMDAR ile indüklenen yanıtlar, AH' de meydana gelen fizyolojik değişiklikler ile sıkı bir şekilde ilişkili görünmektedir (Léveillé et al. 2008). Ayrıca, yakın zamandaki bir çalışmada A β birikiminin nöronal kayıplara neden olan ekstrasinaptik NMDAR'ları aktive ettiğini ve memantin A β ile indüklenen negatif etkileri antagonize ettiğini göstermiştir (Talanta et al. 2013).

İminodiasetik asit (IDA) bir poliamino karboksilli asittir. IDA anyonu, iki, kaynaşmış, beş üyeli kenetleme halkaları ile bir metal kompleksi oluşturmak için bir tridentat ligand olarak hareket edebilmektedir (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. IDA'nın Yapısı.

Bununla birlikte, iminodiasetik asit, nitrojene bağlanan hidrojenlerden birinin bir karboksimetil grubu ile ikame edilen bir amino dikarboksilik asittir. Ayrıca, IDA'nın nitrojen atomundaki proton, chelex 100 gibi bir iyon değişim reçinesi oluşturmak için bir

1. GİRİŞ

polimerin bir karbon atomu ile değiştirilebilmektedir. Aynı zamanda IDA, glisin türevi ve protein olmayan alfa-aminoasit olup, şelatör olarak rol oynamaktadır. Gündelik kullanımda ise IDA, karaciğer, safra kesesi ve safra kanalında çeşitli hastalıkları teşhis etmek için hepatobilier iminodiasetik asit taraması olarak da adlandırılan HIDA taramasında kullanılmaktadır. Ayrıca, yapılan bazı çalışmalarda IDA'nın A β 42 agregasyonu üzerinde belirsiz bir etkiye sahip olduğunu gösterilmiştir (Xie et al. 2017).

Bütün verilen bilgiler ışığında, IDA aminoasidinin potansiyel antioksidan ve nöroprotektif özellikleri, WST-8 testi, LDH testi, metal şelatlama çalışması ve AlCl₃ ile indüklenen AH sıçan modellerinde, biyokimyasal, hematolojik, histopatolojik ve moleküler genetik parametreler ile ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu araştırmada, vaka sayısı hızla ivme kazanan ve henüz tedavisi bulunamamış olan AH için yeni bir terapötik yaklaşım stratejisi hedeflenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Lin et al. (2015), yaptıkları çalışmada AH sıçan modelinde düşük yoğunluklu değişkenli ultrason (LIPUS) stimülasyonunun alüminyum kaynaklı beyin hasarına karşı koruyucu etkisini araştırmışlardır. Nörotrofik faktörlerin protein ifadeleri, beyindeki LIPUS ile arttırılabilmektedir. LIPUS, her bir $AlCl_3$ uygulamasından 7 gün önce uygulanmış ve eş zamanlı olarak 6 hafta boyunca günlük olarak $AlCl_3$ verilmiştir. Hipokampusta nörotrofik faktörler western blot analizi ile ölçülmüştür. Morris su tankındaki davranış değişiklikleri ve yükseltilmiş artı labirent, $AlCl_3$ uygulamasından sonra sıçanlarda incelenmiştir. Beyin hasarlarının derecesini değerlendirmek için çeşitli biyokimyasal analizler yapılmıştır. LIPUS, sıçan beyinde beyinden türetilmiş nörotrofik faktör, glial hücre dizisi kaynaklı nörotrofik faktör ve vasküler endotelial büyüme faktörü seviyelerini uyarma yeteneğine sahiptir. $AlCl_3$ uygulaması $AlCl_3$ ile muamele edilmiş sıçanlarda alüminyum konsantrasyonu, asetilkolinesteraz aktivitesi ve beta-amiloid ($A\beta$) birikiminde önemli bir artışa neden olmuştur. LIPUS uyarımı, $AlCl_3$ ile tedavi edilen sıçanlarda alüminyum konsantrasyonu, asetilkolinesteraz aktivitesi, $A\beta$ birikimi ve karyopiknozu önemli ölçüde azaltmıştır. Ayrıca, LIPUS, $AlCl_3$ ile indüklenen hafıza bozukluğunda hafıza tutulumunu önemli ölçüde iyileştirmiştir. Bu deneysel sonuçlar, LIPUS'un $AlCl_3$ 'ün neden olduğu serebral hasarlara ve bilişsel işlev bozukluğuna karşı nöroprotektif etkilere sahip olduğunu göstermektedir.

Ulusoy vd (2015), AH'de gözlenen progresif nörodejenerasyona benzer şekilde, $AlCl_3$ nörotoksitesisi, AH modelini üretmek için çeşitli şekillerde $AlCl_3$ yönetiminde kullanılmıştır. Sıçanlarda uzun süre intraperitoneal olarak düşük doz (4.2 mg / kg) $AlCl_3$ enjeksiyon bazı araştırmacılar tarafından tercih edilen yöntemdir. Bu çalışmada, bir AH modelinin üretilmesi için bu yöntemin etkinliği değerlendirilmiştir. $AlCl_3$ 'ün nöropatolojisine ve AH' nin karakteristik lezyonlarına histolojik ve immünohistokimyasal tekniklerle bakılmıştır ve $AlCl_3$ ile tedavi edilen ve kontrol sıçanlarının beyinlerinde oksidatif stres belirleyicileri tanımlanmıştır. Ayrıca, hipokampusta elektrofizyolojik kayıtlar yapılmıştır ve Morris su labirenti testi ile olası davranış değişikliklerini değerlendirilmiştir. Bununla birlikte, hipokampüste uzun süreli güçlenme bozukluğu dışında hayvanlarda herhangi bir patolojik değişiklik meydana gelmemiştir. Bu

çalışmanın bulgularına göre, iyi bir AH modeli üretmek için, sıçanlarda düşük miktarda ip $AlCl_3$ yeterli değildir. Bu nedenle, daha yüksek dozlar (≥ 10 mg / kg) kullanılmalıdır.

Thenmozhi et al. (2016), bu çalışmada, hesperidin'in $AlCl_3$ ile indüklenmiş kognitif bozukluk, oksidatif stres ve apoptoza karşı koruyucu etkisi incelenmiştir. Erkek Wistar sıçanları, kontrol grubuna ayrılarak, $AlCl_3$ ile (100 mg / kg), $AlCl_3$ ve hesperidin birlikte (100 mg / kg) ve tek başına hesperidin ile muamele edilmiştir. Kontrol ve deneysel sıçanlarda, öğrenme ve hafıza bozukluğu radyal kol labirenti, yükseltilmiş artı labirent ve pasif kaçınma testleri ile ölçülmüştür. Ayrıca oksidatif stres, pro ve anti-apoptotik belirteçlerin ekspresyonu da değerlendirildi. $AlCl_3$ 'ün (100 mg / kg) 60 gün boyunca intraperitoneal olarak enjeksiyonu, öğrenme ve hafıza bozukluklarını, tiyobarbitürik asit reaktif maddelerinin seviyelerini ve X ilişkili Bifo lenfoma-2 protein (Bax)'in ifadesini önemli ölçüde arttırdı ve azaltılmış glutatyon düzeylerini, enzimatik antioksidanların aktivitelerini ve Bcl-2'nin hipokampus, korteks ve serebellumdaki kontrol grubuna kıyasla Bcl-2 ekspresyonunu azaltmıştır. Hesperidin'in (100 mg / kg) 60 gün süreyle birlikte uygulanması, kognitif bozukluklar, biyokimyasal anormaller ve $AlCl_3$ tedavisi ile uyarılan apoptozu önlemiştir.

Asokan et al. (2017), çemen tohumu tozunun $AlCl_3$ indüklü AH sıçanlarına karşı nöro-koruyucu etkisi analiz edilmiştir. Davranışsal, biyokimyasal ve moleküler çalışmalar ile çemen otu tohumu tozunun birlikte uygulanmasının, aktif sıçanların sinerjik etkisine bağlı olarak, AH sıçanlarda $AlCl_3$ ile indüklenen hafıza açıkları, amiloid ve tau patolojisi, oksidatif stres ve enflamasyonun önemli ölçüde azaldığını ortaya koymuştur.

Olajide et al. (2017), burada, sıçanların prefrontal korteks (PFK) ve hipokampusundaki $AlCl_3$ ile başlatılan davranışsal defisitleri ve nörotoksik kaskadları tersine çevirmede askorbik asidin (AA) etkinliğini araştırılmıştır. 15 gün boyunca günlük olarak oral $AlCl_3$ (100 mg/ kg) uygulanan bir grup sıçan, kontrolle karşılaştırıldığında davranışsal değerlendirmeler sırasında önemli kilo kaybı, azaltılmış hafıza, frontal-bağımlı motor defisitleri, bilişsel gerileme, hafıza disfonksiyonu ve anksiyete ile karakterize olan dejeneratif değişiklikler göstermiştir. Sonraki analizler, tükenmiş süperoksit dismutaz ve lipid peroksidasyonu (glutatyon-S transferaz aktivitesi ile ilişkili)

ile ortaya çıkan oksidatif bozukluğun, artmış nöral asetilkolinesteraz (AChE) ekspresyonu ve artmış laktat dehidrojenaz ile görülen kolinerjik defisitlerin davranış

değişiklikleri altında yatan mekanizma olduğunu göstermiştir. Ayrıca, nöronal aksonlarda ve dendritlerde azaltılmış Nissl profilleri ile PFK ve hipokampal kesitlerin hematoksilin ve eosin boyamasında gözlenen apoptotik değişikliklere karşılık gelen proteoliz kanıtları görülmüştür. Bununla birlikte, AA (15 gün boyunca günlük 100 mg / kg), AlCl₃ ile aktive edilen moleküler ve hücrel stresli proteinlerin inhibisyonu yoluyla sıçanlarda davranışsal bozukluklar önemli ölçüde azaltmıştır. Elde edilen sonuçlar, AA terapötik avantajlarının altında yatan temel mekanizmaların serbest radikalleri temizleme, membran lipid peroksidasyonunu önleme, nöronal biyoenerjetikleri modüle etme, AChE inhibitörü gibi davranma ve anti-proteolitik özellikleri ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu bulgular, endojen AA kapasitesinin farmakolojik alımı yoluyla desteklenmesinin AH ile ilişkili nörodejeneratif süreçlerin ve davranış değişikliklerinin ilerlemesini önleyebileceğini göstermektedir.

Hend et al. (2018), söz konusu çalışma, sıçanlarda ağır metal kaynaklı Alzheimer benzeri hastalığı, AH'nin bir deneysel modeli olarak doğrulamayı ve oksidatif stres-inflamatuar yol üzerindeki etkisini izleyerek berberinin terapötik etkisini araştırılması amaçlanmıştır. AH benzeri hastalık taşıyan sıçanlarda üç ay boyunca alüminyum, kadmiyum ve florür karışımı ile oral olarak indüklendi, bunu bir ay boyunca berberin ile tedavi izlemiştir. Berberin, Morris su labirent testindeki bilişsel davranışları kontrole kıyasla önemli ölçüde iyileştirmiştir ve ağır metal kaynaklı hafıza bozukluğuna karşı koruyucu bir etki sunmuştur. Silico çalışmasıyla eşleşen, berberin AChE ekspresyonunu azaltmış ve beynin dokularındaki aktivitesini inhibe etmiştir. Ayrıca, inflammatuar elemanlarının üretimini normalize etmiştir. Dahası, antioksidan Aβ40'ın üretimini uyarmıştır ve Aβ agregasyonlarından sorumlu Aβ42'nin oluşumunu inhibe etmiştir. Histopatolojik incelemeler berberinin nöroprotektif etkisini doğrulamıştır. Mevcut veriler, AH için anti-inflamatuar / antioksidan mekanizma yoluyla berberinin terapötik modalitesi olarak potansiyel yararlı etkisini savunmaktadır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan kitler ve kimyasalların listesi Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3. 1. Tez araştırması için kullanılan kimyasal ve kitlerin isimleri ve alındıkları firmalar.

Kimyasallar ve Kitler	Alındığı Firma
AlCl₃	Sigma-Aldrich®
cDNA Sentez Kiti	Applied Biosystems™®
CVDK-8 Kit	Ecotech Biotechnology®
IDA	Sigma-Aldrich®
DMEM-F12	Gibco®
DMSO	Sigma-Aldrich®
Etanol	Sigma-Aldrich®
FBS (Fetal Bovine Serum)	Gibco®
Giemsa	Sigma-Aldrich®
LDH Assay Kit	Thermo Scientific™®
PBS	Sigma-Aldrich®
Retinoik asit	Sigma-Aldrich®
RNA İzolasyon Kiti	Invitrogen™®
Sybr Green Master Mix	Applied Biosystems™®
TAK Kiti	Rel Assay Diagnostics®
TOS Kiti	Rel Assay Diagnostics®
Tripan Mavisi	Sigma-Aldrich®
Tripsin/EDTA	Sigma-Aldrich®

3.1.2. Cihazlar

Tez çalışması boyunca kullanılan cihazların listesi Çizelge 3.2’de verilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Çizelge 3.2. Araştırmada kullanılan cihazlar.

CİHAZIN ADI	MODELİ
-20 Soğutucu	J.P. Selecta
+4 Soğutucu	J.P. Selecta
Analitik Terazı	ShimadzuATX 224
Biyogüvenlik Kabini	ESCO NordicSafe™
CO ₂ 'li İnkübatör	ESCO Celculture
Derin dondurucu – 86	Esco, uus-439b
Dijital Mikrobiyolojik Emniyet Kabini	ESCO, AC2-4E8M
Isıtıcı-soğutucu Kuru Blok	Bioer, ch 202
Isıtıcı Manyetik Karıştırıcı	Daihan, shr
İnvert Mikroskop	Leica DFC450C Model: CH-9435
Masaüstü pH Metre	Adwa, AD1000
Otoklav	JSR, JSAC-60
PZR Cihazı	SensoQuest
Real-time PZR Cihazı	Qiagen Rotor-Gene Q
Santrifüj	Hettich Zentrifugen Universal 320R
Soğutmalı Santrifüj	Hettich, Universal 320R
Spektrofotometre	Biotek EPOCH
Su Banyosu	Daihan
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore, Q-3W
Vorteks	Wisd Wisemix VM-10

3.2.Yöntem

3.2.1. *In Vitro* çalışmalar

3.2.1.1. Hücre kültürü

Araştırmamızda, insan nöroblastoma kökenli SH-SY5Y hücreleri, tek katman halinde, Dulbecco'nun modifiye Eagle besiyeri (DMEM) (içerisinde, %10 Fötal Dana Serumu: FBS, %1 penisilin/streptomisin ve %1 L-glutamin bulunmaktadır.): F12 besiyerinde %5 oranında CO₂ bulunduran 37 °C'lik inkübatörde yetiştirilmiştir. Hücreler takip edilerek %70-80 konfluense ulaşıldığında haftada en az iki kere pasajlama yapılmıştır ve hücre sayısı arttırılmaya devam edilmiştir. Pasajlama işlemi için öncelikle flastaki besi ortamı çekilmiştir. Sonrasında fosfat tamponlu salin (PBS) ile besiyeri içeren flask birkaç kez yıkanmış ardından %0,1 tripsin ve %0,04 EDTA solüsyonu ilave edilmiştir. Tripsinin aktivasyonu için flasklar inkübatörde 5 dakika (dk)'lık bekleme süresinden sonra, hücrelerin hepsinin flask zemininden koptuğundan emin olunmuştur ve flastaki tripsini inhibe edebilen FBS içeren besiyeri flaska eklenmiştir. Flasklardan hücreler 15 ml'lik tüplere toplanarak 3 dk boyunca 1500 rpm'de santrifüje tabi tutulmuştur, süre sonunda oluşan pelet süpernatantan ayrılmış ve pelet besiyeriyle çözdürülmüştür. Hücre sayımı tripan mavisi kullanılarak hemositometrde tespit edilmiştir. Hücre ekimi 25 cm²- lik flasklara içerisinde 1x10⁵ hücre bulunacak şekilde yapılmıştır ve flasklardaki besiyerleri iki günde bir yenilenmiştir.

3.2.1.2. SH-SY5Y Hücrelerinin Farklılaştırılması

Bittencourt Pasquali et al. (2016) tarafından önerilen yöntem esas alınarak yapılan farklılaştırma işleminde, hücreler ilk olarak 75cm² olan flasklarda 1,5 x 10⁴ hücre / cm² bulunacak şekilde ekim yapılmıştır, 24 saat sonra flask zeminine tutunmuş olan hücrelere yeni besiyeri olarak ısıyla inaktive hale getirilmiş %1 FBS ve 10 µM retinoik asit (RA) bulunduran DMEM:F12 verilmiştir. Sonraki 11 gün süresince, besi ortamları 3 günde bir yenilenmiştir ve hücrelerin morfolojisindeki değişiklikler ve farklılaşmalar ışık mikroskobu kullanılarak takip edilmiştir.

3.2.1.3. Hücre canlılık testi (WST-8) ve LDH testi

Tetrazolyum tuzları olan WST-8, MTT, XTT, MTS veya WST-1 arasında duyarlılığı en yüksek olan WST-8'dir. WST-8, hücre kültürü ortamında çözünür olan turuncu renkli bir ürün verecek şekilde hücrelerde dehidrojenazlarla azaltılmaktadır. Canlı hücrelerin dehidrojenazlarının salgıladığı turuncu renkli formazan boyasının miktarı canlı hücre sayısı ile paralellik göstermektedir. Bu nedenle ticari CVDK-8 kiti ile WST-8 miktarı tespit edilmiştir. Farklılaşması tamamlanmış SH-SY5Y hücrelerinin 96 tane kuyu bulunduran plakalara ekimi yapıldıktan 24 saat sonra plakalara tutunmuş hücrelere 200 µM'lık toksik doz olarak seçilen AlCl₃ ile birlikte IDA aminoasidi 0-800 mg/L arasındaki farklı derişimlerde verilerek 24 saat süresine inkübasyona bırakılmıştır. Hücre canlılığı tespiti için kitteki prosedür izlenmiştir ve bu prosedür özetlenirse, IDA ile muamele hücrelere 10 µl CVDK-8 reaktifi ilave edilmiştir ve 37°C'de iki saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Örneklerin hepsinin ayrı ayrı 450 nm dalga boyundaki ölçümleri ile hücrelerin canlılığı % değer olarak hesaplanmıştır.

Laktat dehidrogenaz (LDH) neredeyse bütün hücrelerin sitoplazmasında bulunmaktadır ve hücre membranı zarar gördüğünde ortama salınmaktadır. Thermo Scientific Pierce LDH Sitotoksosite Test Kiti, hücrel sitotoksosite ve sitoliz için biyobelirteç olarak LDH kantitatif olarak ölçülmesi için güvenilir bir kolorimetrik yaklaşım sunmaktadır. Farklılaşmasını tamamlamış SH-SY5Y hücreleri 96'lık plakalara ekim yapılarak 24 saat boyunca bekletilmiştir. Bu süre sonunda tutunan hücrelere 200 µM'lık toksik doz olarak seçilen AlCl₃ ile IDA aminoasidi 0-800 mg/L arası farklı derişimlerde verilerek 24 saat inkübasyona bırakılmıştır ve süre bitiminden sonra kitte önerilen prosedür uygulanarak sitotoksosite tespit edilmiştir. Özetle, prosedürde, her örnekten 50 µl serum farklı bir 96'lık plakaya alınmıştır ve 50 µl reaksiyon karışımı ile karıştırılmıştır. Ardından, oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyondan sonra plakaya, 50 µl reaksiyon durdurma solüsyonu ilave edilmiştir. Sonrasında, referans değeri olarak 680 nm seçilmiş ve 490 nm dalga boyunda ayrı ayrı bütün örneklerin absorbansı ölçülmüştür.

Kit içinde bulunan 10X lizis tamponu en yüksek LDH aktivitesini belirlemek için ve spontan LDH aktivitesi ise distile su kullanılarak tespit edilmiştir.

3.2.1.5. Metal Şelatlama Çalışması

200 µmol/L IDA, sadece IDA veya 200 µmol/L hacimlerde olan AlCl₃, FeCl₃, CuSO₄ veya ZnCl₂ varlığında 30 dakika süresince oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır ve süre bitiminden sonra, IDA' nın emilim spektrumu UV-Vis spektrofotometresi ile 200-500 nm aralığındaki dalga boyları ile ölçülmüştür. Ayrıca, şelatlama çalışmaları suda yapılmıştır.

3.2.2. *In Vivo* çalışmalar

3.2.2.1. Deney hayvanları

Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyle Yere Etik Kurulu (AÜHADYEK) tarafından verilen 10.05.2018 tarihli ve 77040475-000-E.1800140631-1851 sayılı yazısı ve 121 nolu karar ile çalışmanın bütün uygulamaları onaylanmıştır (Ek-1). Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinden (ATADEM), tez çalışması için kullanılmış olan sıçanlar sağlanmıştır. Yaptığımız deneyler boyunca yetişkin 200-300 gram arası ağırlıklara sahip sağlıklı Sprague Dawley ırkı toplamda 16 adet dişi sıçan kullanılmış olup kayıp olmadan 16 adet sıçan ile uygulamalar gerçekleştirilmiştir. Bütün hayvanlar 25°C' de standart ışıkta 12 saat aydınlıkta ve 12 saat karanlık da tutulmuştur, yeterli miktarda su ve yem sağlanarak standart plastik materyalli kafeslerde çalışmanın sonuna kadar yaşamlarına devam ettirilmişlerdir. Çalışma grupları ve hayvan sayıları aşağıdaki tabloda belirtildiği şekilde kurulmuştur (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Araştırma İçin Kullanılan Gruplar, Hayvan Sayıları, Uygulanan Doz ve Uygulama Süreleri.

Deney Grupları	Hayvan sayısı (n)	Uygulanan Doz	Uygulama Süresi
Kontrol	4	-	4 hafta
Alzheimer (AlCl ₃)	4	5 mg/kg/gün	4 hafta
IDA	4	3,6 mg/kg/gün	4 hafta
AlCl ₃ +IDA	4	5 mg/kg/gün, 3,6 mg/kg/gün	4 hafta

Alzheimer Grubu (AlCl₃) (n=4): Alzheimer hastalığının sıçanlarda oluşturulması için intraperitoneal (i.p.) yolla (Şekil 3.1) distile suda çözülen AlCl₃ (5 mg/kg/gün) 4 hafta boyunca enjekte edilmiştir.

IDA Grubu (n=4): Sıçanlara 4 hafta boyunca i.p. ile olarak 3,6 mg/kg/gün suda çözülmüş olarak IDA enjekte edilmiştir.

AlCl₃ + IDA Grubu (n=4): Sıçanlara 4 hafta boyunca i.p. AlCl₃ ve 3,6 mg/kg/gün IDA enjekte edilmiştir.

Kontrol Grubu (n=4): Sıçanların rutin yaşamları korunarak hiçbir bir uygulama yapılmamıştır.



Şekil 3.1. İntraperitoneal Enjeksiyon İşlemi.

Bütün sıçanların son uygulamalarının ardından üretan enjekte edilerek (i.p.), batınları açılmış ve heparinli enjektör ile yaklaşık 5 ml kan intrakardiyak yöntem ile heparinli tüplere konulduktan sonra sıçanlar dekapite edilmiştir.

3.2.2.2. Vücut ağırlığı

Bütün sıçanların uygulamaların öncesinde vücut ağırlıkları tespit edilmiştir ve uygulamaların başlaması ile sıçanların vücut ağırlıkları haftalık olarak tespit edilmiştir. İşlemlerin bitiminde sıçanların ölçülen vücut ağırlıkları ile işlemler öncesinde ölçülen ağırlıkları arasındaki değişimler tespit edilmiştir.

3.2.2.3. Biyokimyasal analizler

Üretan anestezisi etkisindeki bütün sıçanların batını açılmış, intrakardiyak yöntemle yaklaşık 5 ml kan çekilmiş ve edetik asitli (EDTA) tüplere alınmıştır. Numunelerin biyokimyasal analizleri Atatürk Üniversitesi Araştırma Hastanesi, Biyokimya laboratuvarlarında hizmet alımı ile yapılmıştır.

3.2.2.4. Hematolojik analizler

Üretan anestezisi etkisindeki bütün sıçanların batını açılarak heparinli enjektör ile intrakardiyak yöntemle yaklaşık 5 ml kan heparinli tüplere alınmıştır. Numunelerin hematolojik analizleri Atatürk Üniversitesi Araştırma Hastanesi, Hematoloji laboratuvarlarında hizmet alımı ile yapılmıştır.

3.2.2.5. Mikroçekirdek testi

Tolbert et al. (1992) ve Al-sabti et al. (1995)'in belirlediği prosedüre göre mikroçekirdek (MÇ) testi yapılmıştır. Kan numuleri heparinli şırınga ile alınmıştır ve cam slaytlara yayılarak preparatlar hazırlanmıştır. Sonrasında, 10 dk süresince metanol içinde sabitlenmiş preparatlar, 12 boyunca oda sıcaklığında gece kuruması için bekletilmiştir. Ardından, kurumuş olan slaytlar 10 dk %5'lik Giemsa boyası ile muamele edilmiştir

(Palhares and Grisola 2002). Boyama işlemi sonrasında preparatlar dikey olarak havada kurutularak lamel ile üzeri kapatılmıştır. Sonrasında, ışık mikroskopunda incelemeleri yapılmıştır. Ayrıca, her sıçan için iki preparat hazırlanmıştır. Kan hücrelerinde çekirdeksel bozukluklar ve mikronükleusları tespit etmek için her preparat için 1000 çekirdek skorlanmıştır.

3.2.2.6. Patolojik inceleme

Üretan anestezisi etkisindeki bütün gruptaki sıçanların beyin dokuları alınmıştır ve bu dokular histolojik analiz için PBS ile yıkanarak %10'luk formaldehit bulunan kapların içine konulmuştur. Beyin korteksleri Hematoksin-eosin (H-E) ile boyanmıştır ve dokudan kesit alınarak kesitler ışık mikroskopunda incelenmiştir.

3.2.2.7. Toplam antioksidan kapasite (TAK) ve toplam oksidatif stres (TOS) analizi

TAK, beyin doku örneklerindeki toplam antioksidan kapasitenin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. İmalatçının öneride bulunduğu prosedüre göre, 30 µl beyin homojenat örneği ile 500 µl reaktif 1 karıştırılmıştır ve 30 saniye bekletilmiştir. Sonrasında, spektrofotometrede 660 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüştür. Ardından, 75 µl reaktif 2 ilave edilmiştir ve 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Tekrardan 660 nm dalgaboyunda spektrofotometre ölçüm yapılmıştır. Ayrıca, deiyonize su ve standart olarak 1mmol/L Trolox ekvivalenti ile de aynı işlemler yapılmıştır. Sonuçların ifadesinde mmol/L birimi kullanılmıştır.

Ticari TOS kitleri kullanılarak toplam oksidatif stres tespit edilmiştir. Üreticinin tavsiye ettiği prosedür göre, 75 µl beyin homojenatı ile 500 µl reaktif 1 karıştırılmıştır. 30 saniye bekleminin sonrasında 530 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçüm yapılmıştır. Sonrasında 25 µl reaktif 2 ilave edilerek oda sıcaklığında 10 dakika boyunca beklenmiştir. Beklemenin sonunda 530 nm dalgaboyunda ikinci absorbans ölçülmüştür. Deney, 200 mmol/L hidrojen peroksit ile kalibre edilmiştir. Sonuçların ifadesinde µmol H₂O₂ Equiv./L birimi kullanılmıştır.

3.2.2.8. Moleküler genetik analizler

3.2.2.8.1. Dokudan RNA izolasyonu

Üretan etkisindeki sıçanlardan alınan beyin dokuları sıvı azot içerisinde dondurularak izolasyon yapılana kadar saklanmıştır. Beyin dokusu metal boncuk ile homojenizatörde 4 dk boyunca 40 rpm'de parçalanmıştır. PureLink™ RNA Mini Kiti ile homojenize dokuların RNA izolasyonu yapılmıştır. İmalatçının tavsiyede bulunduğu prosedüre göre örnekler oda sıcaklığında 12.000xg'de 2 dk süresince santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında RNA bulduran sıvı kısmın tamamı ayrı bir tüpe aktarılmıştır ve %70'lik etanolden 500 µl üzerine ilave edilmiştir. Ardından, vorteks işlemi yapılmıştır. Sonrasında, her bir örnekden 700 µl kitte bulunan kolonlara aktarılmış ve 12.000xg'de 15 saniye(sn) süresince oda sıcaklığında santrifüj yapılmıştır ve aynı işlem kalan örneklerde uygulanmıştır. Kitte bulunan Wash I ve Wash II solüsyonları ile yıkama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Kolondan geçirilmiş olan numunelere 700 µl Wash I ilave edilerek 12.000xg'de 15 sn boyunca santrifüj yapılmıştır ve sonrasında örneklere 500 µl Wash II ilave edilerek 15 sn süresince 12.000xg'de santrifüj yapılmıştır. İkinci yıkama basamağı bir kere daha yapılmıştır. Yıkama işleminden sonra tüpün altında kalan sıvı atılarak tüp, 12.000xg'de 2 dk boyunca santrifüje tabi tutulmuştur. Tüpden kolon kısmı alınarak yeni tüplere yerleştirilmiş ve 30 µl RNase içermeyen su ilave edilerek 1 dk boyunca oda sıcaklığında beklemeye bırakılmıştır. Sonrasında 2 dk boyunca 12.000xg'de oda sıcaklığında santrifüj yapılarak RNA numuneleri tüpte toplanmış ve kullanılıncaya kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2.8.2. Spektrofotometrik RNA ölçümü

İzolasyonu gerçekleştirilen RNA numunelerinin saflığı ve miktarları Epoch cihazı ile µg/ml birimi ile tespit edilmiştir. Belirlenen en düşük RNA miktarı, cDNA sentezinin kalibrasyonu için seçilmiştir.

3.2.2.8.3. cDNA sentezi

“High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” ile cDNA sentezi yapılmıştır. İmalatçının tavsiyesi üzerine gerçekleştirilen prosedüre göre, cDNA sentezi reaksiyonunda kullanılan bileşikler; 10µl RNA örneği, 2 µl 10XRT random primer, 2 µl 10XRT buffer, 0,8 µl 25XdNTP mix, 4,2 µl nükleaz içermeyen su ve 1µl MultiScribe™Reverse Transkriptaz enzimidir. cDNA sentezi için uygulanan PZR programı, 25°C’de 10 dk, 37°C’de 120 dk, 85°C’de 5 dk ve 4°C’de ∞ olarak kurulmuştur. Oluşturulan cDNA numuneleri kullanılabildiği kadar -20°C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.2.8.4. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR)

Oluşturulan cDNA’lar belirlenen genlere ait mRNA ifadelerinin tespiti için bu genlere özgü primerler kullanılarak Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) ile çoğaltılmıştır. Çizelge 3.4’de çoğaltılan genlere özgü primerlerin dizileri bulunmaktadır.

Çizelge 3.4. RT-PZR’ de Kullanılan Genlere Özgü Primerler.

Gen Sembolü	Forward	Reverse
<i>PSENI</i>	TGCACAGATGTCTGAGGACAG	TGCTCTATCACCTGCCTGGTA
<i>MAPT</i>	CAGAAAGGCACATCCAATGC	GTTGGTAGGGATGGGGTACG
<i>APP</i>	GGAGGAGAGCGACAGCATC	CTCCACATCCTCGTCATCCT
<i>ADAMI0</i>	TGCCTCCCAAAGTCTCTCAT	AGACGTTGCTCTCGCATAACA
<i>BACE1</i>	ACTGTGCGTGCCAACATT	GCTTCACCAGGGAGTCAAAA
<i>PSENE1</i>	TGCCTTTTCTTTGGTTGGTC	TGATCCAGGTGGTGAGAACA
<i>EGFR</i>	TCATCAGGGGAAATGCTCTC	GAGGATGGGGTTGTTGCTAA
<i>APOE</i>	AACCGCTTCTGGGATTACCT	AGCTGTTCTCCAGCTCCTT
<i>BDNF</i>	ACAGTATTAGCGAGTGGGTAC	GAACATACGATTGGGTAGTTCCG
<i>DAXX</i>	AGCCTCTGGTCCCTCTGAGT	GCTGCAGTTTGTGGAGGAAC
<i>VEGFA</i>	TCAGTTCGAGGAAAGGAAA	GCGAGTCTGTGTTTTTGCAG
<i>APHIA</i>	GTGTTTTTCGGATGCACCTT	CTGATCGGTCTGTACATGG
<i>TNF-α</i>	TGCCTCAGCCTCTTCTCATT	CCCATTTGGGAACCTTCTCT
<i>NCSTN</i>	ATTGTGTGGGGAAACTCAG	CCGTCAATACCCATTTTCAGG
<i>ACTB</i>	ATCGCTGACAGGATGCAGAAG	AGAGCCACCAATCCACACAGA

Real Time-PZR üçlü tekrar şeklinde gerçekleştirilmiştir ve ayrı ayrı bütün numuneler için 2 µl cDNA, 5µl Sybr Green Master Mix, 2,0 µl nükleaz içermeyen su ve 0,5 µl primer içeren RT-PZR reaksiyon karışımı oluşturulmuştur. Oluşturulan karışım vortekslenmiş ve örneklerin hem tamamen dibe çökmesi hem de oluşan kabarcıkların eliminasyonu amacıyla Mini spin cihazında 1 dk boyunca santrifüj yapılmıştır. Hazırlanan örnekler Qiagen Rotor-Gene Q Real-Time PZR cihazında, ısı şartları 50°C’de 2 dk, 95°C’de 10 dk X 40 döngü, 95°C’de 15 sn ve 60°C’de 1 dk olarak kurulmuştur. Ayrıca, seçilen referans gen Actb’dır. Analiz sonunda gen ifadelerindeki değişiklikler 2- $\Delta\Delta CT$ metodu ile hesaplanmıştır.

3.2.3. İstatistiksel değerlendirme

SPSS® 21.0 programı ile elde edilen sonuçların istatistiksel analizleri yapılmıştır. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir. İstatistiki analiz için, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile post-hoc olarak Duncan’s testi tercih edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ şeklinde belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. In Vitro' da AlCl₃' ün Toksikite Sonuçları

İnsan nöroblastoma hücresi olan SH-SY5Y hattının, nöronal benzeri hücelere farklılaşma süreci için retionik asit (RA) kullanılmıştır. SH-SY5Y hücrelerine geniş doz aralıklı olarak AlCl₃ (1,25, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 400 ve 800 µM) verilerek, anti-Alzheimer potansiyel değerlendirilmesi için en ideal AlCl₃ konsantrasyonu belirlenmiştir (n=6). WST-8 analizi kullanılarak, hücrelerinin % canlılık oranları belirlenmiştir. WST-8 analizi sonuçları, çeşitli konsantrasyonlara bağlı AlCl₃ toksisitesini göstermiştir. Bu sonuçlar Çizelge 4.1' de verilmiştir.

Çizelge 4.1. RA ile Farklılaştırılmış SH-SY5Y Hücrelerinde AlCl₃'ün Sitotoksik Etkileri.

AlCl ₃ Konsantrasyonu (µM)	% Hücre Canlılığı
1,25	95,24 ± 4,22
2,5	91,12 ± 4,01
5	82,54 ± 6,24
10	75,21 ± 7,32
25	72,24 ± 5,58
50	63,36 ± 3,32
100	60,27 ± 6,49
200	52,02 ± 5,07
400	32,25 ± 5,39
800	15,36 ± 5,22
Kontrol	100

(p<0,05)

En yüksek AlCl₃ konsantrasyonu olan 800 µM, hücre kültürlerinin canlılık oranını %15,36'e düşürmüştür. En düşük AlCl₃ konsantrasyonu olan 1,25 µM ise, kontrol grubuna kıyasla %4,76 oranında hücre ölümüne neden olmuştur. 200 µM AlCl₃

uygulanmış hücrelerde %52,02 canlılık oranı görülmüştür. Dolayısıyla, sonraki çalışmalarda, 200 µM AlCl₃ dozunun uygulanması tercih edilmiştir.

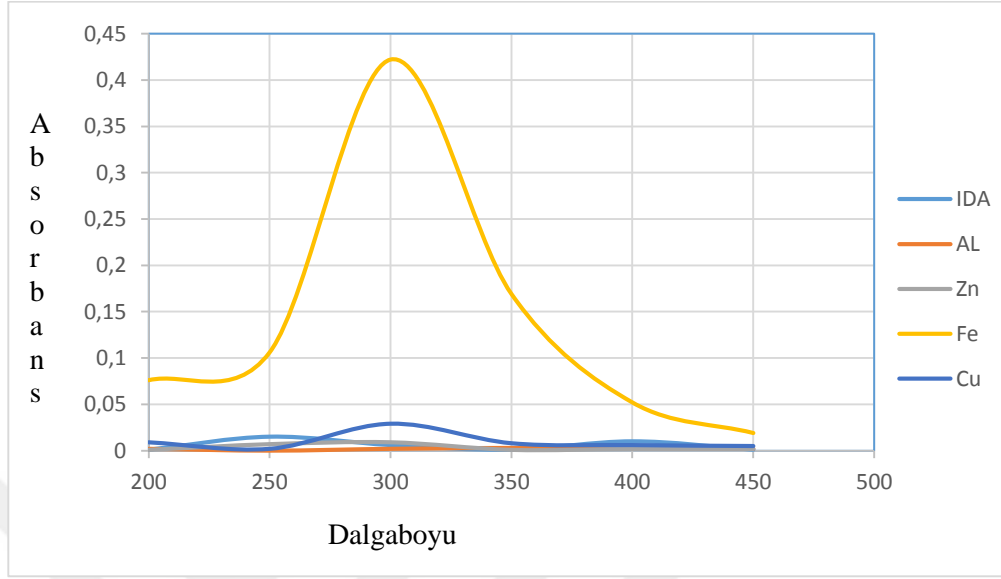
Bu sonuçlar, AlCl₃ uygulaması hücrelerin canlılığını anlamlı bir oranda azaltmıştır. Bununla birlikte, ortaya çıkan verileri destekleyici olarak, Rizvi et al. (2014), SH-SY5SY hücrelerini çeşitli konsantrasyonlardaki AlCl₃'e maruz bırakmıştır ve 400 µM'lık AlCl₃'nin hücre ölümüne götüren yaklaşık % 50'lik popülasyondan % 31,6 hücre, % 16,19 nekrotik popülasyona karşı apoptotik olduğunu göstermiştir. Ayrıca, AlCl₃ maruziyeti AH patogenezinde olan, Aβ birikimini (Kawahara and Kato-Negishi 2011), Tau hiperfosforilasyonunu (Walton 2010) ve oksidatif hasarını arttırdığı (Walton 2007) bildirilmiştir.

4.2. Metal Şelatlama Çalışmaları Sonuçları

Metal iyonlarının beyinde, yaşlanmanın yanı sıra AH de dahil olmak üzere çeşitli nörodejeneratif bozukluklar sırasında anormal şekilde biriktiği gösterilmiştir (Lovell et al. 1998; Filiz et al. 2008). Bununla birlikte, AH etiyojisinin diğer özelliklerin yanı sıra karakteristik Aβ birikimi, şiddetli oksidatif stres ve metal- Aβ etkileşimlerini içerdiğine dair güçlü kanıtlar bulunmaktadır (Khan et al. 2004; Cuajungco et al. 2005; Kirkitadze and Kowalska 2005). Ayrıca, son çalışmalar, bakır (Cu), demir (Fe) ve çinko (Zn) gibi fizyolojik geçiş metallerini ve AlCl₃ gibi fizyolojik olmayan prooksidant elementleri, AH' nin patofizyolojisinde kilit faktörler olarak göstermiştir (Jagannatha 1999; Denise Drago et al. 2008). AH tedavisi için yeni ve daha etkili ilaçlara olan talep artmaya devam ettikçe, beyin metal iyonlarını düşürmeyi ve Aβ / metal iyonları etkileşimlerini hedeflemeyi amaçlayan farmakolojik stratejiler şelasyon terapisi için büyük bir potansiyel sunabilmektedir (Hegde et al. 2009).

Bu analizde, IDA aminoasidinin biyometal Al³⁺, Fe³⁺, Cu²⁺ ve Zn²⁺ varlığında şelatlama potansiyel etkisi, UV-Vis spektrometrisi ile incelenmiştir. Analiz sonucunda (Şekil 4.1) IDA' nın absorpsiyon spektrumu Fe³⁺ ilavesinden sonra anlamlı bir artış göstermiştir. Bu artış IDA ile Fe³⁺ arasında bir şelasyon gerçekleştiğini göstermektedir. Ayrıca Liu et al. (2017), yaptıkları çalışmada iki fonksiyonlu nano-modülatörde IDA

gruplarının, metal şelatlayıcı olarak çalıştığını ve A β 42 agregasyonunun inhibisyonuna katıldığını sunmuşlardır.



Şekil 4.1. IDA'nın 200 μ mol/L Al $^{3+}$, Fe $^{3+}$, Cu $^{2+}$ ve Zn $^{2+}$ (200 μ mol/L) Varlığında UV-Vis Spektrumu.

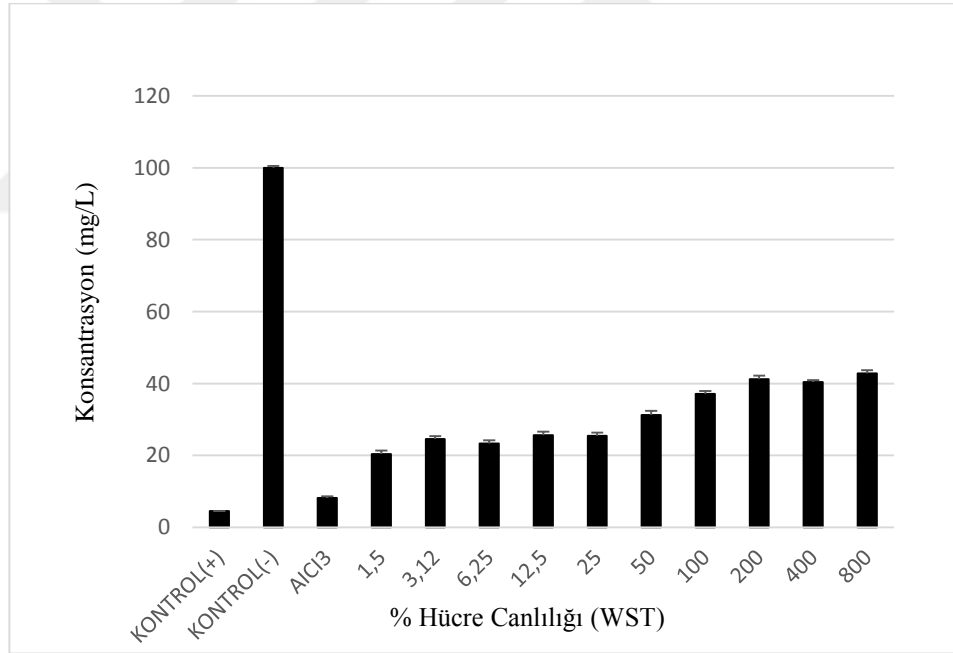
4.3. WST-8 ve LDH Analiz Sonuçları

IDA aminoasidinin koruyucu etkisinin farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerine 200 μ M konsantrasyonunda AlCl $_3$ uygulanarak oluşturulan Alzheimer modelinde 10 farklı doz ile WST-8 ve LDH yöntemleri ile kolorimetrik ve kantitatif olarak saptanmıştır. WST-8 testi, mitokondriyal dehidrojenaz performans ölçümü, hücre metabolizmasını veya kullanılan fonksiyonu ölçmek için hücre proliferasyonunun ve sitotoksikite kolorimetrik analizinin hızlı bir değerlendirmesidir. Hücre içi laktat dehidrojenazın kaybı ve kültür ortamına salınması, hücre zarı hasarına bağlı olarak geri dönüşümsüz hücre ölümünün bir göstergesidir ve LDH analizi hücre dışı ortamda laktat dehidrojenaz aktivitesinin ölçülmesine dayanmaktadır (Decker and Lohmann-Matthes 1988; Fotakis and Timbrell 2006). Pozitif kontrol grubu olarak kültür ortamına lizis tamponu (10X) eklenirken, negatif kontrol olarak ise IDA aminoasidinin bulunmadığı kültür vasatı kullanılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Çeşitli IDA konsantrasyonları (1,5-800 mg/L) tek tek hücre kültürlerine uygulandığında kontrol gruba göre hücre canlılığı oranlarını değiştirmemiştir. Ayrıca, IDA doza bağlı olarak alüminyumun sitotoksitesine karşı farklı seviyelerde önleyici etki göstermiştir. *In vitro* nörotoksosite araştırmalardan elde edilen sonuçlar aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir (Şekil 4.2 ve Şekil 4.3).

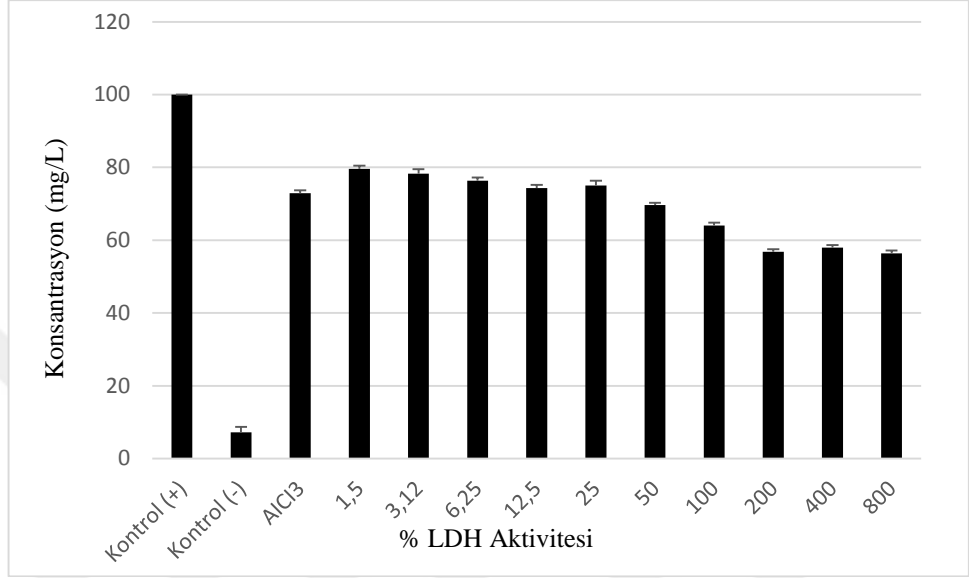
Farklılaştırılmış SH-SY5Y hücreleri 24 saat boyunca $AlCl_3$ ile muamele edilerek sitotoksosite potansiyeli WST-8 testi izlenmiştir. Hücre canlılığında $AlCl_3$ uygulaması önemli bir azalmaya yol açmıştır (200 μM ; yaklaşık %49). Farklı konsantrasyonlarda IDA uygulamalarının $AlCl_3$ kaynaklı sitotoksositeyi azalttığı gösterilmiştir. $AlCl_3$ maruziyetinin neden olduğu hücre ölümünü IDA inhibe ederek, 200 mg/L konsantrasyonda hücre canlılığında anlamlı bir oranda artış sağlamıştır.



Şekil 4.2. *In Vitro* Deney Sisteminde $AlCl_3$ Sitotoksitesine Karşı IDA'nın Etkisi.

LDH testi ile farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerinde 200 μM $AlCl_3$ 'e 24 saat maruziyetten kaynaklı hücre zarının hasarı, apoptoza veya nekroza uğrayan bu hücrelerin ortama saldıkları LDH enziminin aktivitesinin ölçülmesiyle tespit edilmiştir. $AlCl_3$ maruziyeti, negatif kontrole kıyasla LDH seviyesini anlamlı bir şekilde yükseltmiştir.

LDH testi sonuçlarına göre, çeşitli IDA aminoasitlerinin uygulamalarının, SH-SY5Y hücre membranı $AlCl_3$ ile indüklenen sitotoksositeye karşı önleyici etkisi olduğunu göstermektedir. IDA, $AlCl_3$ maruziyetinin dolaylı gerçekleşen hücre ölümünü inhibe ederek, 200 μM konsantrasyonda hücre canlılığında anlamlı bir oranda bir artış sağlamıştır.



Şekil 4.3. *In Vitro* Deneysel Sistemde $AlCl_3$ Sitotoksitesine Karşı IDA'nın LDH Seviyesine Etkisi.

4.4. Vücut Ağırlığı Değişimi Sonuçları

In vivo deney süresince kontrol, AH, IDA ve $AlCl_3$ +IDA gruplarının haftalık vücut ağırlıkları ölçülmüştür ve tüy dökme durumları takip edilerek kayıt altına alınmıştır. Bu kayıtların sonucunda, tüy dökümü herhangi bir hayvanda gözlenmemiş olup deneysel gruplar arasında vücut ağırlıklarına dair istatistiksel analizler sonucunda kontrol grubuna kıyasla AH grubu, $AlCl_3$ 'ün toksik etkisiyle vücut ağırlıklarında anlamlı bir şekilde azalma göstermiştir. IDA grubunda, IDA pozitif bir etki göstererek vücuda herhangi bir zararının olmadığı anlaşılmaktadır. $AlCl_3$ +IDA grubunda ise, vücut ağırlıklarında AH grubuna kıyasla anlamlı bir artış gözlenmiş olup, IDA'nın $AlCl_3$ 'ün toksik etkisini önleyici bir etkisi olduğu anlaşılmaktadır. Bütün deney gruplarının uygulama başlangıcında ve sonunda ölçülen vücut ağırlıkları Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Tüm Deneysel Sıçanların Uygulama Öncesinde ve Sonundaki Vücut Ağırlıkları.

Deney Grupları	Uygulama öncesi (gr)	Uygulama sonrası (gr)
Kontrol	292,50±9,18	297,18±10,72
Alzheimer (AICI ₃)	283,20±11,82	273,31±10,74
IDA	257,00±11,82	260,00±14,85
AICI ₃ +IDA	270,50±12,23	263,50±8,96

(p<0,05)

4.5. Biyokimyasal Analiz Sonuçları

Biyokimyasal analizler, üretan altındaki sıçanlardan alınan kan örnekleri ile yapılmıştır. Bu analizin sonuçları Çizelge 4.3'de verilmiştir. Elde edilen sonuçların istatistiksel analizlerine göre kreatin kinaz (CK) ve ürik asit parametreleri kontrol grubu ile diğer gruplar arasında kıyaslandığında anlamlı değişiklikler göstermişlerdir.

Çizelge 4.3. Tüm Deneysel Gruplara Ait Biyokimyasal Analiz Sonuçları.

Parametre	Kontrol	Alzheimer (AICI ₃)	IDA	AICI ₃ +IDA
CK	647,50±35,77 ^b	474,60±85,53 ^a	656,50±41,70 ^b	518,50±21,36 ^a
AST	280,75±27,48 ^a	337,50±62,90 ^a	268,25±40,08 ^a	273,66±17,17 ^a
ALT	68,40±13,60 ^a	79,33±7,73 ^a	72,75±2,21 ^a	80,00±5,59 ^a
Total kolesterol	78,00±2,82 ^b	78,16±4,11 ^b	65,00±9,27 ^b	79,00±6,68 ^b
P	8,30±0,60 ^a	7,91±0,64 ^a	8,15±0,30 ^a	8,07±0,09 ^a
Mg	3,15±0,35 ^b	2,31±0,15 ^a	2,63±0,24 ^{ba}	2,83±0,67 ^{ba}
Kreatin	0,40±0,08 ^b	0,26±0,05 ^a	0,27±0,05 ^a	0,30±0,00 ^a
Na	132,50±2,88 ^b	126,16±2,22 ^a	127,25±2,75 ^a	126,75±3,30 ^a
K	13,87±0,94 ^a	15,76±1,72 ^a	13,87±2,83 ^a	15,07±0,21 ^a
Ürik asit	7,07±1,05 ^b	3,11±0,53 ^a	6,25±0,28 ^b	3,82±0,87 ^a

(p<0,05)

CK, tersinir reaksiyonu katalize eden ökaryotik enerji metabolizmasında anahtar bir enzimdir: kreatin+ ATP ↔ kreatin fosfat+ ADP+ H⁺. CK reaksiyonu, oksidatif fosforilasyondan veya de novo yolundan çok daha yüksek bir ATP sentez hızına sahiptir ve böylece ATP'yi diğer ATP sentez yollarından daha kolay temin edebilmektedir (David et al. 1998). CK, beyin hasarı belirlenmesi gibi çeşitli fizyolojik anormalliklerin bir göstergesi olarak kullanılır ve CK, AH çözünür fraksiyonlarında daha düşük bir aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Smith et al. 1991; Vázquez et al. 1995). Her yerde

bulunan mitokondriyal CK ile birlikte sentezlenen sitosolik beyin tipi kreatin kinaz (BB-CK), AH hastalarında oksidasyon ile önemli ölçüde inaktive edilmektedir (Wallimann et al. 1992). BB-CK, aktivitesinin ve AH' li beyindeki içeriğın azalması, ciddi şekilde etkilenen bölgelerdeki nörodejenerasyon özellikleriyle ilişkilidir (Hensley et al. 1995). Elde edilen verilere göre, AH grubunun CK değeri, kontrol grubuna kıyasla beklenildiği üzere anlamlı bir şekilde azalmıştır. Ayrıca, IDA ve AICI₃+IDA gruplarının CK değerleri ise AH grubunun değerlerine göre, kontrol grubuna daha yakın bir sonuç vermiştir.

Ürik asit, pürin metabolizmasının son ürünü olup sayısız böbrek ve metabolik bozuklukların tanısında kullanılan ölçümdür (Al-khateeb et al. 2015). Ürik asidin, AH' nin gelişimi veya ilerlemesi için önemli olup olmadığı net değildir (Rinaldi et al. 2003; Irizarry et al. 2009). Öte yandan, kontrol deneklerine göre AH'de düşük serum ürik asit düzeyleri, AH' nin patogeneğinde oksidatif yaralanmaların önemli rol oynayabileceğine dair çeşitli hipotezler bulunmaktadır (Al-khateeb et al. 2015). Yapılan biyokimyasal analize göre, kontrol grubunun ürik asit değerlerine kıyasla AH grubunun değerleri anlamlı bir şekilde azalmıştır. IDA ve AICI₃+IDA gruplarının ürik asit değerleri ise AH grubunun değerlerine göre, kontrol grubuna daha yakın bir değer vermiştir.

4.6. Hematoloji Analiz Sonuçları

Hematoloji analizleri, üretan altındaki sıçanlardan alınan kan örnekleri ile yapılmıştır. Bu analizin sonuçları Çizelge 4.4'de verilmiştir. Elde edilen sonuçların istatistiksel analizlerine göre, prokalsitonin (Procalcitonin: PCT) ve trombosit dağılım genişliği (Platelet Distribution Width: PDW) değerleri anlamlı sonuçlar vermiştir.

Çizelge 4.4. Tüm Deneysel Gruplara Ait Hematoloji Analizi Sonuçları.

Parametre	Kontrol	Alzheimer (AIC ₃)	IDA	ALCI ₃ +IDA
WBC	4,10±0,009 ^a	6,48±0,55 ^c	5,73±0,06 ^b	6,31±0,44 ^c
MONO	0,95±0,57 ^c	0,31±0,20 ^a	0,55±0,05 ^b	0,33±0,03 ^a
RBC	6,36±0,05 ^a	7,60±0,47 ^b	6,15±0,04 ^a	7,45±0,05 ^b
HGB	12,23±0,19 ^a	13,21±0,90 ^b	12,27±0,35 ^a	13,36±0,22 ^b
MCH	20,21±0,70 ^b	16,91±0,64 ^a	20,10±0,27 ^b	19,77±0,20 ^b
MCHC	31,15±1,32 ^a	30,75±2,23 ^a	31,55±1,67 ^a	30,30±0,34 ^a
RDW-CV	15,25±0,62 ^a	21,76±2,61 ^b	15,40±2,51 ^a	18,60±3,81 ^b
MPV	8,00±0,00 ^a	8,48±0,52 ^a	8,12±0,25 ^a	8,15±0,17 ^a
PCT	0,47±0,09 ^a	0,59±0,07 ^b	0,49±0,02 ^a	0,54±0,01 ^{ba}
PDW	8,15±0,40 ^b	7,20±0,58 ^a	8,12±0,49 ^b	7,7±0,18 ^{ba}
P-LCR	9,20±0,00 ^a	15,45±4,88 ^b	9,87±3,92 ^a	12,10±1,03 ^{ba}

(p<0,05)

Kalsitonin öncüsü olan prokalsitonin (PCT) kanda ciddi sistemik bakteriyel enfeksiyonlar ve sepsis için belirlenmiş bir belirteçtir (Ernst et al. 2007). PCT'nin plazma veya serumda ölçümü rutin olarak yapılırsa da, PCT'nin enflamasyon veya enfeksiyon sırasında beyin omurilik sıvısındaki rolü henüz belirsizliğini korumaktadır (Gendrel et al. 1997; Jereb et al. 2001; Shimetani et al. 2001). Ayrıca PCT'nin akut inflamasyonda seviyesinin arttığı kanıtlanmıştır. Daha az akut düzeyde nöroinflamasyon gösteren, demansın patogenezinde, özellikle en sık görülen demans şekli olan AH' de önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Akiyama et al. 2000; Minghetti 2005). Bununla birlikte, yapılan araştırmalarda sağlıklı kontrollere göre demanslı beyin omurilik sıvısında PCT seviyesinin yükseldiği gösterilmiştir (Ernst et al. 2007). Yaptığımız hematoloji analiz sonuçlarına göre AH grubunda PCT değerleri kontrol değerlerine kıyasla yükselmiştir ve AIC₃' ün bu etkisi üzerine, IDA aminoasidi azalatici bir rol üstlenmiştir.

Trombositler nöroinflamasyonda önemli bir rol oynamaktadır (Horstman et al. 2010) ve ayrıca aktive edilmiş trombositler aşırı A β üretimine neden olabilmektedirler (Li et al. 1998). Bu nedenle, trombosit AH patogenezi mekanizmalarını incelemek için ideal bir model olmaktadır. Bazı raporlar, trombosit APP'nin AH hastaları için yeni bir teşhis belirleyicisi olarak tanımlandığını göstermiştir (Borroni et al. 2010). PDW, trombosit büyüklüğündeki değişimi göstermektedir ve yapılan çalışmalarda PDW seviyesinin sağlıklı kontrollere göre AH'de daha düşük olduğunu göstermiştir. Hematoloji analiz sonuçlarımıza göre, AIC₃ indüklenmesi sonucu PDW değeri kontrole kıyasla daha düşüktür ve IDA bu olumsuz etkiyi azalatici bir tesirde bulunmuştur.

4.7. Mikroçekirdek Testi Sonuçları

Hazırlanan mikroçekirdek (MÇ) preparatlarının analizleri sonucunda (Çizelge 4.5), IDA uygulanan grubunun kan smear örneklerinde, kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış gözlenmemiştir. Bu durum IDA aminoasidinin genotoksik etkisinin bulunmadığına işaret etmektedir. AH grubunda, kontrol grubuna kıyasla mikroçekirdek sıklığında anlamlı bir artış gözlenmiştir. AICI₃+IDA grubunda ise IDA aminoasidinin AICI₃'ün genotoksik etkisini önlediği gözlenmiştir.

Çizelge 4.5. Tüm Deneysel Grupların Kan Smear Örneğinde Gözlenen Mikroçekirdek Frekansları.

Gruplar	Mç PKE/1000 PKE
Kontrol	14,60±2,31 ^a
Alzheimer (AICI₃)	27,83±2,04 ^c
IDA	13,10±2,35 ^a
AICI₃+IDA	22,26±2,05 ^b

(p<0,05)

4.8. Patolojik İnceleme Sonuçları

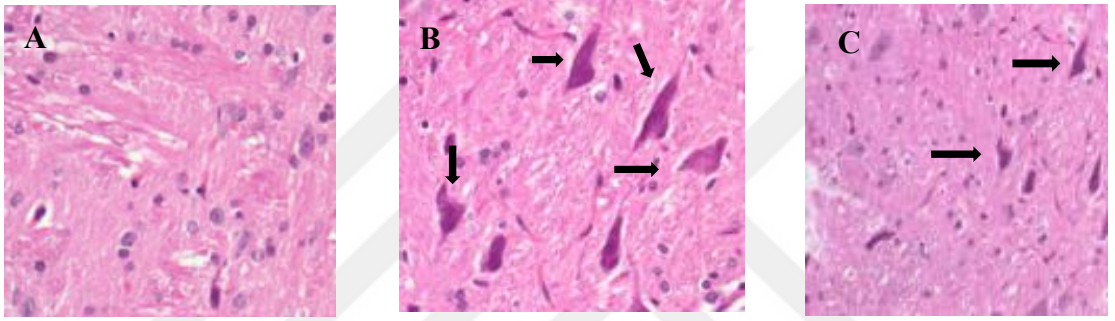
Bütün deneysel grupların beyin dokularının nispi ağırlığı ölçülmüştür, değerler Çizelge 4.6'de gösterilmiştir. Sonuçlara göre, kontrol değerine kıyasla AH grubunun değerinde beklendiği üzere anlamlı bir azalma gözlenmiştir. AICI₃+IDA grubundaki değerler, AH grubu değerleri ile kıyaslandığında IDA'nın AICI₃'ün toksik etkisini azalttığı gözlenmiştir.

Çizelge 4.6. Tüm Deneysel Grupların Beyin Dokularının Ağırlıkları.

Deneysel Gruplar	Ölçüm (gr)
Kontrol	2,19±0,01 ^c
Alzheimer (AICI₃)	1,70±0,06 ^a
IDA	2,12±0,02 ^c
AICI₃+IDA	1,84±0,09 ^b

(p<0,05)

Kontrol grubu, AH grubu ve $AlCl_3$ +IDA grubunun sıçanlarının beyin kortekslerinin H-E ile boyanmış kesitleri Şekil 4.4'de verilmiştir. Kesitler ışık mikroskopu ile incelendiğinde, kontrol grubuna kıyasla, $AlCl_3$ maruziyetiyle oluşturulan AH grubunda mikroskopik düzeyde histopatolojik bulgularında hipokampal nöronlarda belirgin dejeneratif değişiklikler gözlemlenmiştir ve hücrel hasarın göstergesi olan sitoplazmik ve nükleer büzüşme nedeniyle piknotik bir görünüm kazanan nöronlarda yoğun bir şekilde boyanma görülmüştür. $AlCl_3$ +IDA grubunda ise bu bulguların daha az olduğu görülmüştür. Bu durum ise IDA aminoasidinin koruyucu potansiyelinin varlığını kanıtlar niteliktedir.



Şekil 4.4. Kontrol Grubu (A), AH Grubu (B) ve $AlCl_3$ +IDA Grubuna (C) Ait Beyin Dokularının Işık Mikroskopu Görüntüleri (NFY' ler oklar ile gösterilmiştir).

4.9. TAK ve TOS Analizlerinin Sonuçları

AH hastalarının beyini, anormal seviyede belirgin $A\beta$ birikimi ve nörofibriler yumakların birikmesi ile ilişkili olarak önemli ölçüde oksidatif hasar göstermektedir (Christen 2000). Oksidatif stres, genellikle reaktif oksijen türlerinin ve antioksidan savunma sisteminin üretiminde dengesizlik ile karakterizedir (Harman 1981). Ayrıca AH'li hastalarda beyin dokusunun hastalık seyri sırasında oksidatif strese (örneğin, protein oksidasyonu, lipit oksidasyonu, DNA oksidasyonu ve glikoksidasyon) maruz kaldığına dair kanıtlar bulunmaktadır (Gella and Durany 2009). Yapılan araştırmalarda, oksidatif stresin β -amiloide ve β -amiloidin ise, sırayla oksidatif strese, nöronal disfonksiyona ve nihayetinde nöron ölümüne neden olduğu (Grundman and Delaney 2002) ve tau proteininin aşırı eksprese eden hücrelerin, olası olarak peroksizomların tükenmesinden dolayı oksidatif strese karşı duyarlılığının arttığı gösterilmiştir (Stamer et al. 2002). Bu nedenle, AH ile ilişkili oksidatif stresi azaltmak için çeşitli bileşikler ve

antioksidanlar (vitamin E, vitamin A ve vitamin C gibi) önerilmektedir (Grundman and Delaney 2002).

IDA, AICI₃+IDA ve AICI₃ ile indüklenmiş deneysel AH modeli sıçan gruplarından alınan beyin dokuları üzerinde toplam antioksidan kapasitesi (TAK) ve toplam oksidatif stres (TOS) seviyeleri üzerindeki etkileri Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.8’de gösterilmektedir. TAK analizinde, pozitif kontrol olarak 10 µM trolox (vitamin E) kullanılmıştır. Analiz sonuçlarına göre, kontrole kıyasla AH modelinin TAK düzeyi anlamlı bir azalış gösterirken, IDA kontrole yakın bir değer vermiştir, AICI₃+IDA grubunda ise IDA, AICI₃ etkisi karşısında TAK düzeyini anlamlı bir şekilde değiştirememiştir. TOS analizinde ise, kontrole kıyasla AH modelinde, AICI₃ toksik etkisini göstererek oksidatif stresi arttırmıştır, IDA oksidatif stres oluşturacak kadar anlamlı bir artış göstermemiştir. AICI₃+IDA grubunda ise IDA, AICI₃’ün neden olduğu oksidatif strese karşı anlamlı bir etki gösterememiştir.

Çizelge 4.7. *In Vivo* Beyin Dokusunda TAK Seviyeleri.

Gruplar	TAK seviyesi (mmol Trolox E/L)
Kontrol	2,25±0,24 ^b
Alzheimer (AICI₃)	1,30±0,34 ^a
IDA	2,23±0,15 ^b
AICI₃+IDA	1,82±0,25 ^a

(p<0,05)

Çizelge 4.8. *In Vivo* Beyin Dokusunda, Kontrolün, Alzheimer Grubunun, IDA’nın ve AICI₃ Varlığında IDA’nın TOS Seviyeleri.

Gruplar	TOS seviyesi (mmol H ₂ O ₂ E/L)
Kontrol	2,38±0,24 ^a
Alzheimer (AICI₃)	2,92±0,14 ^b
IDA	2,42±0,10 ^a
AICI₃+IDA	2,79±0,85 ^b

(p<0,05)

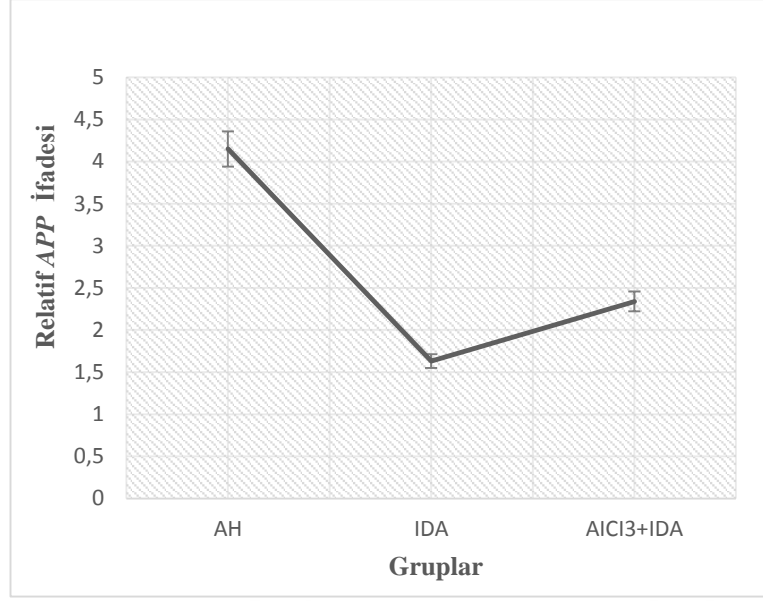
Çevresel ve yaşam tarzı faktörlerinin insan popülasyonundaki genetik stabilite üzerindeki etkisini incelemek için en hızlı ve etkili tekniklerden biri mikroçekirdek testidir (Nersesyan et al. 2002). MÇ, kromozom kırılmasından veya kromozom anormal

segregasyon olaylarından kaynaklanabilir ve bu nedenle genomik kararsızlığı araştırmak için ideal biyobelirteçler olarak kullanılmaktadır (Migliore et al. 2011). Alüminyum bileşiklerin uzun süreli maruziyetlerinin, *in vivo* ve *in vitro* olarak çeşitli test sistemlerinde kromozomal değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir (Roy vd 1990; Roy et al. 1991). $AlCl_3$, kromozomları parçalayarak veya hücrel bölünme sırasında dengeli kromozom dağılımını değiştiren mitotik iğlerin oluşumuna müdahale ederek etkiyen genotoksik bir madde olduğunu göstermektedir (Paz et al. 2017). Bununla birlikte, mevcut çalışmalar $AlCl_3$ konsantrasyonlarının düşük konsantrasyonlarda bile ($5 \mu M$ - *in vitro* ve 49 mg / kg - *in vivo*) genetik materyale zarar verebileceğini ve böylece MÇ oluşumuna neden olduğunu göstermiştir. Ayrıca, düşük konsantrasyonlarda ($10 \mu M$) alüminyuma benzer bir kimyasal formun mikronükleus testiyle saptanabilen DNA hasarına neden olabileceğini göstermiştir (Kamalov et al. 2011).

4.10. *In Vivo* Deneysel AH Sıçan Modelinde Moleküler Genetik Yanıtlar

IDA aminoasidinin $AlCl_3$ 'e karşı potansiyel nöroprotektif etkisinin altında yatan moleküler mekanizmaları araştırmak için seçilen 14 adet genin ekspresyon seviyeleri tespit edilmiştir. Bu araştırma için gruplardaki bütün hayvanların beyin dokusundan RNA izole edilerek, ters transkripsiyon ile cDNA sentezlenmiştir. Elde edilen cDNA örnekleri seçilen genlere ait spesifik primerler varlığında kantitatif PZR ile çoğaltılmıştır.

$AlCl_3$ ile indüklenen deneysel AH modelinde, kontrol grubu ile kıyaslandığında *APP*, *BACE 1*, *VEGFA*, *PSENEN*, *APH1a* ve *TNF- α* genlerinde ekspresyon düzeylerinde anlamlı değişiklikler gözlenmiştir (Şekil 4.5-4.10).



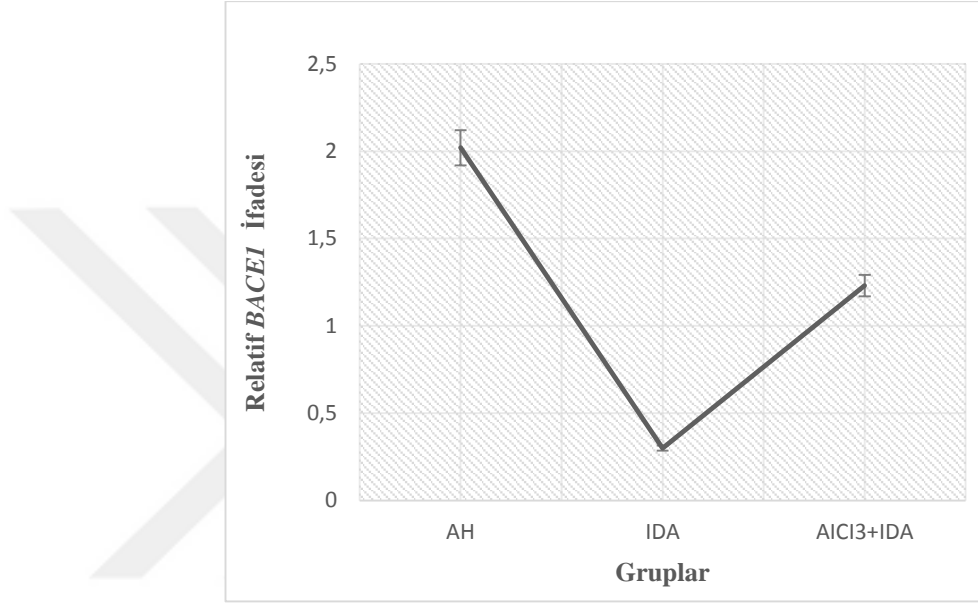
Şekil 4.5. Deneysel Gruplara Ait Beyin Dokularında Alınan Örneklerdeki *APP* Ekspresyon Seviyelerinin Dağılımı.

APP, $A\beta$ amiloid 40-42 aminoasitten oluşmaktadır ve işlevi tam olarak anlaşılamamıştır (Glennner and Wong 1984). *APP*, $A\beta$ 'nin yaklaşık olarak ortasından α -sekretaz enzimi tarafından kesilince, çözülebilir $A\beta$ yerine *APP* ya da s*APP* adı verilen ekstraselüler yeni bir protein meydana gelmektedir ve bu molekülün olumlu etkileri gösterilmiştir. (Cummings et al. 2018). Hücre yüzeyinde *APP* doğrudan α -sekretaz ve daha sonra $A\beta$ üretmeyen bir işlem olan γ -sekretaz ile proteolize edilebilmektedir (O'Brien and Wong 2011). Genetik mekanizmalar sonucunda ya sübstrat olan *APP* miktarında bir artışın olması ile ya da β -sekretaz (*BACE1* olarak da bilinir) veya γ -sekretaz enzim aktivasyonuna bağlı aşırı üretim olması nedeni ile amiloid β miktarı artmaktadır. Yapılan bir çalışmada, oral yoldan verilen $AlCl_3$ 'ün birikmiş formlarında $A\beta$ miktarında belirgin bir artışa ve insan *APP* geniyle transfekte edilmiş AH-model farelerde senil plakların birikiminin artmasına neden olduğunu bulmuşlardır (Praticò et al. 2002).

APP, presenilin 1 (PS1) veya presenilin 2' deki (PS2) genetik mutasyonların, AH patolojisinin bir özelliği olan amiloid plakların oluşumunu teşvik ettiği gösterilmiştir (De Strooper et al. 2012; Li et al. 2014). Apolipoprotein E (*ApoE*) geni, üç izoformu kodlar: *ApoE2*, *ApoE3* ve *ApoE4*. Ayrıca, *ApoE4* izoformu, GBAH için $A\beta$ ve amiloid birikiminin temizlenmesi üzerindeki etkisinden dolayı genetik bir risk faktörü olarak tanımlanmaktadır (Holtzman et al. 2012; Liu et al. 2013). *ApoE*, reseptör boyunca $A\beta$

birikimini de etkileyebilmektedir, çünkü ApoE reseptörü nakavt fareleri, klirensin azalması nedeniyle A β birikimini arttırdığını göstermiştir (Shibata et al. 2000).

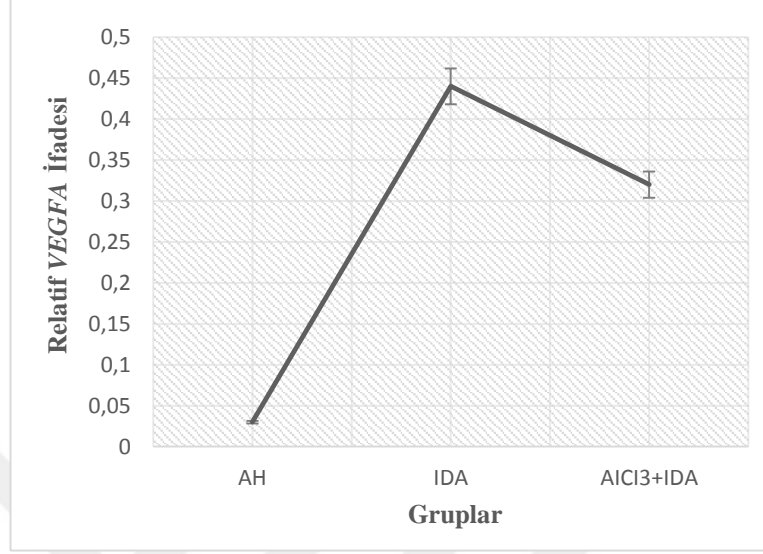
PZR sonucunda, kontrole göre AH'nin (Praticò et al. 2002) ile indüklenen grupta *APP* gen seviyesi (Şekil 4.5) artmıştır, AICI₃+IDA grubunun verilerine göre ise IDA, AICI₃ toksisitesi üzerinde nöroprotektif bir etki göstermiştir.



Şekil 4.6. Deneysel Gruplara Ait Beyin Dokularında Alınan Örneklerdeki *BACE1* Ekspresyon Seviyelerinin Dağılımı.

Her ne kadar çeşitli araştırmalar yapılmış olsada farklı şekillerde birleştirilen A β biçimlerinin nasıl sinaptik fonksiyon bozukluğuna neden olduğunun altında yatan kesin biyokimyasal mekanizmalar hala belirlenmemektedir ama biyokimyasal ve morfolojik çalışmalar sinaptik terminallerde A β birikimini olduğunu göstermiştir (Coleman et al. 2004; Audrain et al. 2016). Bu lokal birikim, BACE1'in sinaptik terminallerde A β üretimini başlatması gerçeğine bağlı olabilir (Kandalepas et al. 2013). Yüksek *BACE1* seviyeleri, AH beyinlerinde A β kaynaklı patoloji ile doğrudan koreledir (Fukumoto et al. 2002; Holsinger et al. 2002). AH beyin dokularında BACE1 düzeylerinin arttığı bildirilmiştir ve AICI₃ maruziyeti sonucu *BACE1* geninin ekspresyonunun yükseldiği gösterilmiştir AH hastalarının beyin dokularında BACE1 düzeylerinin arttığı bildirilmiştir (Castorina et al. 2010).

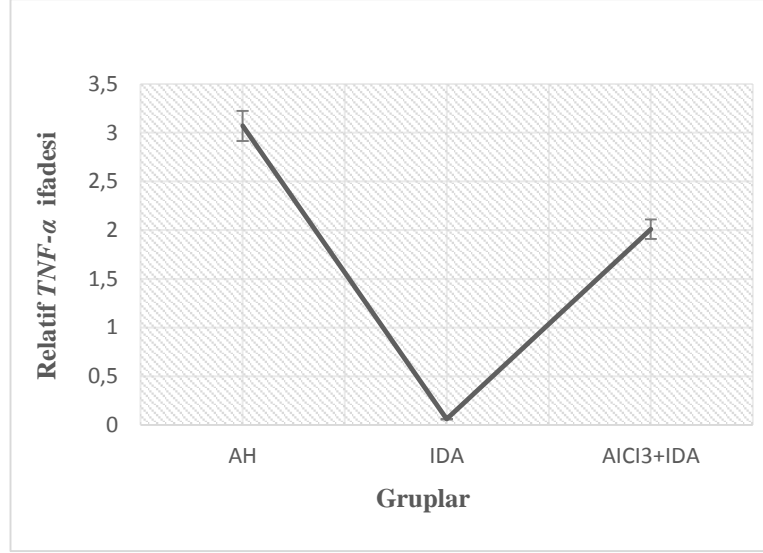
Yapılan analiz sonuçlarına göre (Şekil 4.6), *BACE1* seviyesi $AICl_3$ maruziyetinde artmışken IDA bu toksik etkiyi önleyici bir rol üstlenmiştir.



Şekil 4.7. Deneysel Gruplara Ait Beyin Dokularında Alınan Örneklerdeki *VEGFA* Ekspresyon Seviyelerinin Dağılımı.

Nöronal hücre kaynaklı büyüme faktörleri arasında vasküler endotelial hücre büyüme faktörü (VEGF), merkezi sinir sisteminde (MSS) bol miktarda eksprese edilmektedir (Udo et al. 2008). Birçok AH hastası, kan damarlarında A β birikimine bağlı olarak serebrovasküler patoloji göstermektedir. A β peptidleri, VEGF gibi anjiyojenik faktörlerin ekspresyonunda değişikliklerle anjiyogenez ve amiloid yük paralelliklerini inhibe etmektedir (Kalaria et al.1998; Tarkowski et al. 2002). Yapılan bir çalışmada, sonuçlar AH hastalarında ortalama VEGF konsantrasyonunun kontrol deneklerinde karşılık gelen seviyelere göre anlamlı derecede düşük olduğunu (yaklaşık -30%) göstermiştir (Echeverria et al. 2017).

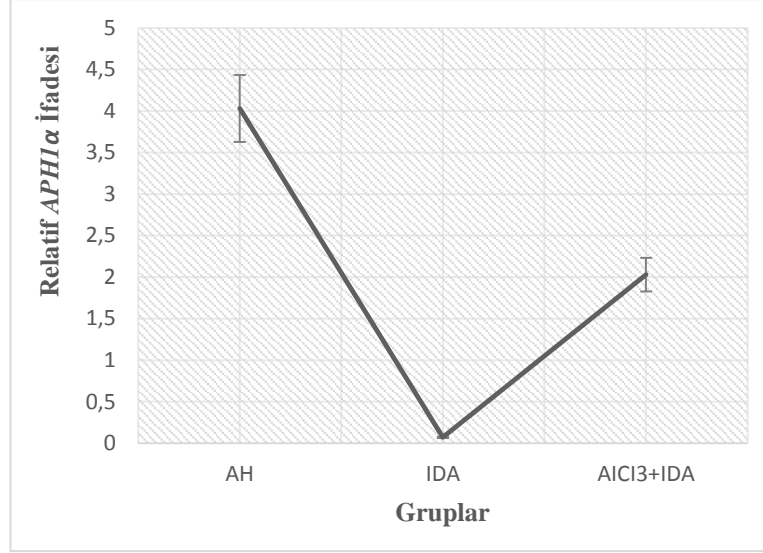
VEGFA'nın PZR sonuçlarına göre (Şekil 4.7), kontrole kıyasla $AICl_3$ grubunda anlamlı bir azalış görülmüştür, $AICl_3$ +IDA grubundaki sonuçlara göre ise IDA, $AICl_3$ 'ün olumsuz etkisine karşı koruyucu bir rol üstlenmiştir.



Şekil 4.8. Deneysel Gruplara Ait Beyin Dokularında Alınan Örneklerdeki $TNF\alpha$ Ekspresyon Seviyelerinin Dağılımı.

Nöroinflamasyonda rol oynayan sitokinler arasında, tümör nekroz faktörü α ($TNF-\alpha$) en çok çalışılmıştır ve inflamatuvar yanıt sırasında sitokin kaskadında önemli bir rol oynamaktadır. Periferdeki $TNF\alpha$ seviyeleri ve sağlıklı yetişkinlerin MMS'lerinde çok düşük seviyelerde tutulur, bu sitokin seviyeleri AH'li hastaların kanlarında ve MSS'lerinde önemli ölçüde artar ve birçok klinik ve hayvan çalışması beyinde ve AH'de $TNF\alpha$ düzeyleri arasında bir bağlantı olduğunu göstermiştir (Fillit et al. 1991; Tarkowski et al. 2003; Cheng et al. 2014). $TNF-\alpha$ 'nın AH'nin patofizyolojisindeki rolü hem klinik hem de hayvan çalışmalarında incelenmiştir. İnsan AH beyinlerinde yapılan çalışmaların ardından TNFR1 sinyalleşmesinin A β kaynaklı nöronal ölüm için gerekli olduğunu ve TNFR1 protein seviyelerinin AH beyinlerinde normal olmayan beyinlere kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür (Dickson 1997). Ayrıca, $TNF-\alpha$ 'nın AH patolojisindeki rolüyle ilgili bildirilen klinik bulgular, AH' nin fare modellerinde yapılan gözlemlerle tutarlıdır. AH transgenik farelerin beyin dokularında yüksek $TNF-\alpha$ düzeyleri gözlenmiştir (Sly et al. 2001).

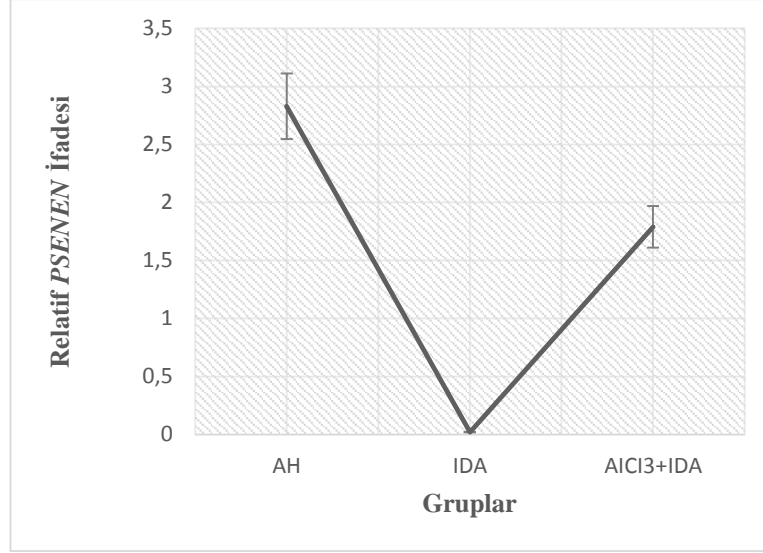
TNF için yapılan PZR analizinin sonucunda (Şekil 4.8), AICI₃ ile indüklenen AH grubunda TNF seviyesinin kontrole göre yükseldiği, AICI₃+IDA grubunda ise AICI₃'ün olumsuz etkisinin IDA tarafından düşürüldüğü görülmüştür.



Şekil 4.9. Deneysel Gruplara Ait Beyin Dokularında Alınan Örneklerdeki *APH1α* Ekspresyon Seviyelerinin Dağılımı.

γ -sekretazlar, dört proteinden oluşan her yerde eksprese edilen membran proteaz ailesidir: presenilin (*PSEN*), ön fareks defektif-1 (*APH1*), nicastrin (*NCT*) ve presenilin arttırıcı-2 (*PSEN2*) (De Strooper 2003). γ -sekretaz aktivitesi, AH için karakteristik olan amiloid plaklarda biriken A β peptidini serbest bırakan *APP*'nin nihai bölünmesinden sorumludur (De Strooper et al. 1998). *APH1α* kompleksleri, embriyogenez sırasında Notch sinyali için çok önemlidir (Ma et al. 2005). γ -sekretazlar, seçici olarak patojenik A β 42 türlerinin oluşumunu azaltan ve ancak üretilen toplam A β miktarını etkilemeyen bir bileşik sınıftır.

APH1α seviyesi için yapılan PZR analizi sonucuna göre (Şekil 4.9), AH grubu seviyesi anlamlı bir şekilde artmıştır, AICI₃+IDA grubundaki anlamlı artış IDA'nın nöroprotektif etkisini destekler niteliktedir.



Şekil 4.10. Deneysel Gruplara Ait Beyin Dokularında Alınan Örneklerdeki *PSENE* Ekspresyon Seviyelerinin Dağılımı.

PSENE (*PSEN2*) mutasyonu, γ -sekretaz aktivitesini artırabilir ve hücre temelli çalışmalar ayrıca fare modelleri, bazı *PSEN2* mutasyonlarının, AH hastalarının beyninde artmış A β 42 üretimine neden olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, Presenilin mutasyonları AH için önemli bir risk faktörü olmaktadır (Citron et al. 1997). Çeşitli araştırmalar, AH ile ilgili presenilin mutasyonlarının hücre içi kalsiyum sinyalini değiştirerek, beyin plakları ve nöronal hücre ölümü oluşturmak için A β birikimine yol açtığını göstermiştir (Leissring et al. 2000, Leissring 2001).

PZR sonuçları ile *PSENE*'nin kontrole göre AH grubunda, AICI₃ toksisitesiyle arttığını ve AICI₃+IDA grubunun değerlerine göre bu toksisitenin IDA'nın koruyucu etkisiyle anlamlı bir oranda azaldığı görülmektedir (Şekil 4.10).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez kapsamında, $AlCl_3$ ile indüklenerek oluşturulan AH sıçan modelinde ilk kez IDA aminoasidinin uygulama dozunda nöroprotektif etkisi ortaya konmuştur. IDA'nın nöron koruyucu özelliğinin varlığı ile birlikte *in vivo* koşullarda toksik etkilere yol açmadığı da tespit edilmiştir. Bu veriler ışığında, Alzheimer hastalığı ile birlikte diğer nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde uygulanabilecek yeni bir koruyucu stratejileri önermekteyiz. Nitekim, IDA aminoasidinin non-sitotoksik ve non-genotoksik etkilerinin varlığı bu aminoasidin protektif ajan olarak kullanım potansiyelini yükseltmektedir.



KAYNAKLAR

- Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, M. G., Cooper, R. N., Eikelenboom, P., Emmerling M., Fiebich, L. B., Finch, E. C., Frautschy, S., Griffin, W. S. T., Hampel, H., Hull, M., Landreth, G., Lue, L., Mrak, R., Mackenzie, I. R., McGeer, P. L., O'Banion, M. K., Pachter, J., Pasinetti, G., Plata-Salaman, C., Rogers, J., Rydel, R., Shen, Y., Streit, W., Strohmeyer, R., Tooyoma, I., Van Muiswinkel, V. L., Veerhuis, R., Walker, D., Webster, S., Wegrzyniak, B., Wenk, G., Wyss-Coray, T., 2000. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 21(3):383-421.
- Alagiakrishnan, K., Gill, S. S., Fagarasanu, A., 2012. Genetics and Epigenetics of Alzheimer's Disease. *Postgraduate Medical Journal*, 88(1043):522-29.
- Al-khateeb, E., Althafer, A., Al-khateeb, M., Al-Musawi, H., Azzouqah, O., Al-Shweiki, S., Shafagoj, Y., 2015. Relation between Uric Acid and Alzheimer's Disease in Elderly Jordanians. *Journal of Alzheimer's Disease*, 44(3):859-65.
- Allinson, T. M. J., Parkin, E. T., Turner, A. J., Hooper, N. M., 2003. ADAMs family members as amyloid precursor protein α -secretases. *Journal of Neuroscience Research*, 74(3):342-52.
- Alzheimer's Association, 2008. 2008 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 4(2):110-33.
- Anand, R., Gill, K. D., Mahdi, A. A., 2014. Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology*, 76:27-50.
- Antonell, A., Lladó, A., Altirriba, J., Botta-Orfila, T., Balasa, M., Fernández, M., Ferrer, I., Sánchez-Valle, R., Molinuevo, J. L., 2013. A preliminary study of the whole-genome expression profile of sporadic and monogenic early-onset Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 34(7):1772-78.
- Alzheimer's. Association, 2014. 2014 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*. 10(2):e47-92.
- Audrain, M., Fol, R., Dutar, P., Potier, B., Billard, J. M., Flament, J., Alves, S., Burlot, M. A., Dufayet-Chaffaud, G., Bemelmans, A. P., Valette, J., Hantraye, P., Déglon, N., Cartier, N., Braudeau, J., 2016. Alzheimer's Disease-like APP Processing in Wild-Type Mice Identifies Synaptic Defects as Initial Steps of Disease Progression. *Molecular Neurodegeneration*, 11:5.
- Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A., Brayne, C., Aarsland, D., Jones, E., 2011. Alzheimer's disease. *The Lancet*, 377(9770):1019-31.
- Banks, W. A., Kastin, A. J., 1989. Aluminum-Induced neurotoxicity: Alterations in membrane function at the blood-brain barrier. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 13(1):47-53.

- Bartus, R. T., Dean, R. L., Beer, B., Lippa, A.S., 1982. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*, 217(4558):408-14.
- Bartus, R.T., 2000. On Neurodegenerative Diseases, Models, and Treatment Strategies: Lessons Learned and Lessons Forgotten a Generation Following the Cholinergic Hypothesis. *Experimental Neurology*, 163(2):495-529.
- Bezprozvanny, I., Mattson, M. P., 2008. Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends in Neurosciences*, 31(9):454-63.
- Bird, T. D., 1993. Early-Onset Familial Alzheimer Disease. University of Washington, Seattle.
- Blennow, K., de Leon, M. J., Zetterberg, H., 2006. Alzheimer's disease. *The Lancet*, 368(9533):387-403.
- Bliss, T.V., Collingridge, G. L., 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361(6407):31-39.
- Bondy, S. C., Guo-Ross, S. X., Pien, J., 1998. Mechanisms underlying the aluminum-induced potentiation of the pro-oxidant properties of transition metals. *Neurotoxicology*, 19(1):65-71.
- Bondy, S. C., 2010. The neurotoxicity of environmental aluminum is still an issue. *NeuroToxicology*, 31(5):575-81.
- Borroni, B., Agosti, C., Marcello, E., Di Luca, M., Padovani, A., 2010. Blood Cell Markers in Alzheimer Disease: Amyloid Precursor Protein Form Ratio in Platelets. *Experimental Gerontology*, 45(1):53-56.
- Brookmeyer, R., Johnson, E., Ziegler-Graham, K., Arrighi, H. M., 2007. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 3(3):186-91.
- Burns, A., Iliffe, S., 2009. Alzheimer's Disease. *BMJ*, 338:b158.
- Castellani, R. J., Rolston, R. K., Smith, M. A., 2010. Alzheimer Disease. *Disease-a-month*, DM 56(9):484-546.
- Castorina, A., Tiralongo, A., Giunta, A., Carnazza, M. L., Scapagnini, G., D'Agata, V., 2010. Early Effects of Aluminum Chloride on Beta-Secretase mRNA Expression in a Neuronal Model of β -Amyloid Toxicity. *Cell Biology and Toxicology*, 26(4):367-77.
- Cheng, X., Shen, Y., Li, R., 2014. Targeting TNF: A Therapeutic Strategy for Alzheimer's Disease. *Drug Discovery Today*, 19(11):1822-27.
- Christen, Y. 2000. Oxidative Stress and Alzheimer Disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71(2):621S-629S.
- Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., Kholodenko, D., Motter, R., Sherrington, R., Perry, B., Yao, H., Strome, R., Lieberburg, I., Rommens, J., Kim, S., Schenk, D.,

- Fraser, P., St George Hyslop, P., Selkoe, D. J., 1997. Mutant Presenilins of Alzheimer's Disease Increase Production of 42-Residue Amyloid Beta-Protein in Both Transfected Cells and Transgenic Mice. *Nature Medicine*, 3(1):67-72.
- Cleveland, D. W., Hoffman, P. N., 1991. Neuronal and glial cytoskeletons. *Current opinion in neurobiology*, 1(3):346-53.
- Coleman, P., Federoff, H., Kurlan, R., 2004. A Focus on the Synapse for Neuroprotection in Alzheimer Disease and Other Dementias. *Neurology*, 63(7):1155-62.
- Collingridge, G. L., Singer, W., 1990. Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trends in pharmacological sciences*, 11(7):290-96.
- Corder, E., Saunders, A., Strittmatter, W., Schmechel, D., Gaskell, P., Small, G., Roses, A., Haines, J., Pericak-Vance, M., 1993. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, 261(5123):921-23.
- Cotman, C. W., Monaghan, D. T., Ganong, A. H., 1988. Excitatory amino acid neurotransmission: NMDA receptors and Hebb-type synaptic plasticity. *Annual review of neuroscience*, 11(1):61-80.
- Crompton, M., Barksby, E., Johnson, N., Capano, M., 2002. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death. *Biochimie*, 84(2-3):143-52.
- Cuajungco, M. P., Frederickson, C. J., Bush, A. I., 2005. Amyloid-Beta Metal Interaction and Metal Chelation. *Sub-Cellular Biochemistry*, 38:235-54.
- Cummings, J., Lee, G., Ritter, A., Zhong, K., 2018. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2018. *Alzheimer's & Dementia : Translational Research & Clinical Interventions*, 4:195-214.
- David, S., Shoemaker, M., Haley, B. E., 1998. Abnormal properties of creatine kinase in Alzheimer's disease brain: Correlation of reduced enzyme activity and active site photolabeling with aberrant cytosol-membrane partitioning. *Molecular Brain Research*, 54(2):276-87.
- De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., Von Figura, K., Van Leuven, F., 1998. Deficiency of Presenilin-1 Inhibits the Normal Cleavage of Amyloid Precursor Protein. *Nature*, 391(6665):387-90.
- De Strooper, B., 2003. Aph-1, Psen-2, and Nicastrin with Presenilin Generate an Active Gamma-Secretase Complex. *Neuron*, 38(1):9-12.
- De Strooper, B., Iwatsubo, T., Wolfe, M. S., 2012. Presenilins and γ -Secretase: Structure, Function, and Role in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(1):a006304.
- Decker, T., Lohmann-Matthes, M. L., 1988. A Quick and Simple Method for the Quantitation of Lactate Dehydrogenase Release in Measurements of Cellular

Cytotoxicity and Tumor Necrosis Factor (TNF) Activity. *Journal of Immunological Methods*, 115(1):61-69.

- Dergunov, A. D., Smirnova, E. A., Merched, A., Visvikis, S., Siest, G., Yakushkin, V. V., Tsibulsky, V., 2000. Conformation of apolipoprotein E both in free and in lipid-bound form may determine the avidity of triglyceride-rich lipoproteins to the LDL receptor: structural and kinetic study. *Biochimica et biophysica acta*, 1484(1):14-28.
- Dickson, D. W., 1997. The Pathogenesis of Senile Plaques. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 56(4):321-39.
- Dong, S., Duan, Y., Hu, Y., Zhao, Z., 2012. Advances in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: A Re-Evaluation of Amyloid Cascade Hypothesis. *Translational Neurodegeneration*, 1(1):18.
- Drago, D., Bolognin, S., Zatta, P., 2008. Role of Metal Ions in the A β Oligomerization in Alzheimers Disease and in Other Neurological Disorders. *Current Alzheimer Research*, 5(6):500-507.
- Drago, D., Cavaliere, A., Mascetra, N., Ciavardelli, D., Di Ilio, C., Zatta, P., Sensi, S. L., 2008. Aluminum Modulates Effects of β Amyloid1-42 on Neuronal Calcium Homeostasis and Mitochondria Functioning and Is Altered in a Triple Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Rejuvenation Research*, 11(5):861-71.
- Echeverria, V., Barreto, G., Avila, M., Tarasov, V., Aliev, G., 2017. Is VEGF a Key Target of Cotinine and Other Potential Therapies Against Alzheimer Disease?. *Current Alzheimer research*, 14.
- Ernst, A., Morgenthaler, N., Buerger, K., Dodel, R., Noelker, C., Sommer, N., Schwarz, M., Koehrl, J., Bergmann, A., Hampel, H., 2007. Procalcitonin Is Elevated in the Cerebrospinal Fluid of Patients with Dementia and Acute Neuroinflammation. *Journal of Neuroimmunology*, 189(1-2):169-74.
- Exley, C., Vickers, T., 2014. Elevated brain aluminium and early onset Alzheimer's disease in an individual occupationally exposed to aluminium: a case report. *Journal of Medical Case Reports*, 8(1):41.
- Farlow, M., Anand, R., Messina Jr, J., Hartman, R., Veach, J., 2000. A 52-Week Study of the Efficacy of Rivastigmine in Patients with Mild to Moderately Severe Alzheimer's Disease. *European Neurology*, 44(4):236-41.
- Ferreira, I. L., Bajouco, L. M., Mota, S. I., Auberson, Y. P., Oliveira, C. R., and Rego, A. C., 2012. Amyloid beta peptide 1-42 disturbs intracellular calcium homeostasis through activation of GluN2B-containing N-methyl-d-aspartate receptors in cortical cultures. *Cell calcium*, 51(2):95-106.
- Filiz, G., Price, K. A., Caragounis, A., Du, T., Crouch, P. J., White, A. R., 2008. The Role of Metals in Modulating Metalloprotease Activity in the AD Brain. *European Biophysics Journal*, EBJ 37(3):315-21.

- Fillit, H., Ding, W. H., Buee, L., Kalman, J., Altstiel, L., Lawlor, B., Wolf-Klein, G., 1991. Elevated Circulating Tumor Necrosis Factor Levels in Alzheimer's Disease. *Neuroscience Letters*, 129(2):318-20.
- Findeis, M. A., 2007. The role of amyloid β peptide 42 in Alzheimer's disease. *Pharmacology & Therapeutics*, 116(2):266-86.
- van der Flier, W. M., Pijnenburg, Y. A. L., Fox, N. C., Scheltens, P., 2011. Early-onset versus late-onset Alzheimer's disease: the case of the missing APOE ϵ 4 allele. *The Lancet Neurology*, 10(3):280-88.
- Forsythe, I. D., Westbrook, G. L., Mayer, M. L., 1988. Modulation of excitatory synaptic transmission by glycine and zinc in cultures of mouse hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 8(10):3733-41.
- Fotakis, G., Timbrell, J. A., 2006. In Vitro Cytotoxicity Assays: Comparison of LDH, Neutral Red, MTT and Protein Assay in Hepatoma Cell Lines Following Exposure to Cadmium Chloride. *Toxicology Letters*, 160(2):171-77.
- Fox, P. J., Kelly, S. E., Tobin, S. L., 1999. Defining dementia: social and historical background of Alzheimer disease. *Genetic testing*, 3(1):13-19.
- Francis, P. T., Parsons, C. G., Jones, R. W., 2012. Rationale for combining glutamatergic and cholinergic approaches in the symptomatic treatment of Alzheimer's disease. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 12(11):1351-65.
- LaFerla, F. M., Green, K. N., Oddo, S., 2007. Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(7):499-509.
- Fukumoto, H., Cheung, B.S., Hyman, B.T., Irizarry, M. C., 2002. Beta-Secretase Protein and Activity Are Increased in the Neocortex in Alzheimer Disease. *Archives of Neurology*, 59(9):1381-89.
- Fuso, A., Seminara, L., Cavallaro, R. A., D'Anselmi, F., Scarpa, S., 2006. S-adenosylmethionine/homocysteine cycle alterations modify DNA methylation status with consequent deregulation of PS1 and BACE and beta-amyloid production. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 28(1):195-204.
- Gandhi, S., Abramov, A. Y., 2012. Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012:1-11.
- Gatz, M., Reynolds, C. A., Fratiglioni, L., Johansson, B., Mortimer, J. A., Berg, S., Fiske, A., Pedersen, N. L., 2006. Role of Genes and Environments for Explaining Alzheimer Disease. *Archives of General Psychiatry*, 63(2):168.
- Gella, A., Durany, n., 2009. Oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell Adhesion & Migration*, 3(1):88-93.
- Gendrel, D., Raymond, J., Assicot, M., Moulin, F., Iniguez, J. L., Lebon, P., Bohuon, C., 1997. Measurement of Procalcitonin Levels in Children with Bacterial or Viral

Meningitis. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 24(6):1240-42.

- Genin, E., Hannequin, D., Wallon, D., Slegers, K., Hiltunen, M., Combarros, O., Bullido, M. J., Engelborghs, S., De Deyn, P., Berr, C., Pasquier, F., Dubois, B., Tognoni, G., Fiévet, N., Brouwers, N., Bettens, K., Arosio, B., Coto, E., Del Zompo, E., Mateo, I., Epelbaum, J., Frank-Garcia, A., Helisalmi, S., Porcellini, E., Pilotto, A., Forti, P., Ferri, R., Scarpini, E., Siciliano, G., Solfrizzi, V., Sorbi, S., Spalletta, G., Valdivieso, F., Vepsäläinen, S., Alvarez, V., Bosco, P., Mancuso, M., Panza, F., Nacmias, B., Bossù, P., Hanon, O., Piccardi, P., Annoni, G., Seripa, D., Galimberti, D., Licastro, F., Soininen, H., Dartigues, J. F., Kamboh, M. I., Van Broeckhoven, C., Lambert, J. C., Amouyel, P., Campion, D., 2011. APOE and Alzheimer disease: a major gene with semi-dominant inheritance. *Molecular psychiatry*, 16(9):903-7.
- Glenner, G. G., Wong, J. W., 1984. Alzheimer's Disease: Initial Report of the Purification and Characterization of a Novel Cerebrovascular Amyloid Protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 120(3):885-90.
- Goedert, M., Klug, A., Crowther, R. A., 2006. Tau protein, the paired helical filament and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 9(3 Suppl):195-207.
- Gotovac, K., Hajnšek, S., Pašić, M. B., Pivac, N., Borovečki, F., 2014. Personalized medicine in neurodegenerative diseases: how far away? *Molecular diagnosis & therapy*, 18(1):17-24.
- Green, R. C., 2002. Risk of Dementia Among White and African American Relatives of Patients With Alzheimer Disease. *JAMA*, 287(3):329.
- Grundman, M., Delaney, P., 2002. Antioxidant Strategies for Alzheimer's Disease. *Proceedings of the Nutrition Society*, 61(02):191-202.
- Haass, C., Hung, A. Y., Schlossmacher, M. G., Teplow, D. B., Selkoe, D. J., 1993. beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *The Journal of biological chemistry*, 268(5):3021-24.
- Hardy, J., Selkoe, D. J., 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297(5580):353-56.
- Harman, D., 1981. The Aging Process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(11):7124-28.
- Hegde, M. L., Bharathi, P., Suram, A., Venugopal, C., Jagannathan, R., Poddar, P., Srinivas, P., Sambamurti, K., Rao, K. J., Scancar, J., Messori, L., Zecca, L., Zatta, P., 2009. Challenges Associated with Metal Chelation Therapy in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease, JAD* 17(3):457-68.
- Henneberger, C., Papouin, T., Olier, S. H. R., Rusakov, D. A., 2010. Long-term potentiation depends on release of d-serine from astrocytes. *Nature*, 463(7278):232-36.

- Hensley, K., Hall, N., Subramaniam, R., Cole, P., Harris, M., Aksenov, M., Aksenova, M., Gabbita, S. P., Wu, J.F., Carney, J. M., Lovell, M., Markesbery, W. R., Butterfield, D. A., 1995. Brain Regional Correspondence Between Alzheimer's Disease Histopathology and Biomarkers of Protein Oxidation. *Journal of Neurochemistry*, 65(5):2146-56.
- Holsinger, R. M. D., McLean, C. A., Beyreuther, K., Masters, C. L., Evin, G., 2002. Increased Expression of the Amyloid Precursor Beta-Secretase in Alzheimer's Disease. *Annals of Neurology*, 51(6):783-86.
- Holtzman, D. M., Herz, J., Bu, G., 2012. Apolipoprotein E and Apolipoprotein E Receptors: Normal Biology and Roles in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(3):a006312.
- Horstman, L. L., Jy, W., Ahn, Y. S., Zivadinov, R., Maghzi, A. H., Etemadifar, M., Alexander, J. S., Minagar, A., 2010. Role of Platelets in Neuroinflammation: A Wide-Angle Perspective. *Journal of Neuroinflammation*, 7:10.
- Irizarry, M. C., Raman, R., Schwarzschild, M. A., Becerra, L. M., Thomas, R. G., Peterson, R. C., Ascherio, A., Aisen, P. S., 2009. Plasma Urate and Progression of Mild Cognitive Impairment. *Neuro-Degenerative Diseases*, 6(1-2):23-28.
- Jagannatha, R., 1999. Trace elements in Alzheimer's brain: a new hypothesis. *Alzheimer's Reports*, 2(4):241-246
- Jarrett, J. T., Berger, E. P., Lansbury, P. T., 1993. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry*, 32(18):4693-97.
- Jereb, M., Muzlovic, I., Hojker, S., Strle, F., 2001. Predictive Value of Serum and Cerebrospinal Fluid Procalcitonin Levels for the Diagnosis of Bacterial Meningitis. *Infection*, 29(4):209-12.
- Johnson, J. W., Ascher, P., 1987. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature*, 325(6104):529-31.
- Johnson, V. J., Sharma, R. P., 2003. Aluminum Disrupts the Pro-Inflammatory Cytokine/Neurotrophin Balance in Primary Brain Rotation-Mediated Aggregate Cultures: Possible Role in Neurodegeneration. *NeuroToxicology*, 24(2):261-68.
- Kalaria, R. N., Cohen, D. L., Premkumar, D. R., Nag, S., LaManna, J. C., Lust, W. D., 1998. Vascular Endothelial Growth Factor in Alzheimer's Disease and Experimental Cerebral Ischemia. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 62(1):101-5.
- Kamalov, J., Carpenter, D. O., Birman, I., 2011. Cytotoxicity of Environmentally Relevant Concentrations of Aluminum in Murine Thymocytes and Lymphocytes. *Journal of Toxicology*, 2011:796719.
- Kandalepas, P. C., Sadleir, K. R., Eimer, W. A., Zhao, J., Nicholson, D. A., Vassar, R., 2013. The Alzheimer's β -Secretase BACE1 Localizes to Normal Presynaptic

Terminals and to Dystrophic Presynaptic Terminals Surrounding Amyloid Plaques. *Acta Neuropathologica*, 126(3):329-52.

Kawahara, M., Kato-Negishi, M., 2011a. Link between Aluminum and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: The Integration of the Aluminum and Amyloid Cascade Hypotheses. *International journal of Alzheimer's disease*, 2011:276393.

Kawahara, M., Kato-Negishi, M., 2011b. Link between Aluminum and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: The Integration of the Aluminum and Amyloid Cascade Hypotheses. *International journal of Alzheimer's disease*, 2011:276393.

Kawahara, M., Kato-Negishi, M., 2011c. Link between Aluminum and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: The Integration of the Aluminum and Amyloid Cascade Hypotheses. *International journal of Alzheimer's disease*, 2011:276393.

Kawahara, M., Kato-Negishi, M., 2011b. Link between Aluminum and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: The Integration of the Aluminum and Amyloid Cascade Hypotheses. *International journal of Alzheimer's disease*, 2011:276393.

Kawahara, M., Kato-Negishi, M., 2011c. Link between Aluminum and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: The Integration of the Aluminum and Amyloid Cascade Hypotheses. *International journal of Alzheimer's disease*, 2011:276393.

Kehoe, E. G., McNulty, J. P., Mullins, P. G., Bokde, A. L. W., 2014. Advances in MRI biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease. *Biomarkers in Medicine*, 8(9):1151-69.

Khan, A., Ashcroft, A. E., Korchazhkina, O. V., Exley, C., 2004. Metal-Mediated Formation of Fibrillar ABri Amyloid. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98(12):2006-10.

Kirkitadze, M. D., Kowalska, A., 2005. Molecular Mechanisms Initiating Amyloid Beta-Fibril Formation in Alzheimer's Disease. *Acta Biochimica Polonica*, 52(2):417-23.

Kleckner, N. W., Dingledine, R., 1988. Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science*, (New York, N.Y.) 241(4867):835-37.

Green, K. N., Smith, I. F., Laferla, F. M., 2007. Role of Calcium in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease and Transgenic Models. *Calcium Signalling and Disease*. Dordrecht, Springer Netherlands.

Kojro, E., Fahrenholz, F., 2005. The non-amyloidogenic pathway: structure and function of alpha-secretases. *Sub-cellular biochemistry*, 38:105-27.

Korolev, I., 2014. Alzheimer's Disease: Clinical and Basic Science Review. *Medical Student Research Journal*, 24-33.

Krishnaswamy, S., Verdile, G., Groth, D., Kanyenda, L., Martins, R. N., 2009. The structure and function of Alzheimer's gamma secretase enzyme complex. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 46(5-6):282-301.

- Kuhn, P. H., Wang, H., Dislich, B., Colombo, A., Zeitschel, U., Ellwart, J. W., Kremmer, E., Roßner, S., Lichtenthaler, S. F., 2010. ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive α -secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *The EMBO Journal*, 29(17):3020-32.
- Kuret, J., Congdon, E. E., Li, G., Yin, H., Yu, X., Zhong, Q., 2005. Evaluating triggers and enhancers of tau fibrillization. *Microscopy Research and Technique*, 67(3-4):141-55.
- Langbaum, J. B., Fleisher, A. S., Chen, K., Ayutyanont, N., Lopera, F., Quiroz, Y. T., Caselli, R. J., Tariot, P. N., Reiman, E. M., 2013. Ushering in the Study and Treatment of Preclinical Alzheimer Disease. *Nature Reviews. Neurology*, 9(7):371-81.
- Laske, C., 2013. Blood-Based Biomarkers in Alzheimer Disease: Where Are We Now and Where Have We to Go? *JAMA Neurology*, 70(1):133.
- Leissring, M. A., LaFerla, F. M., Callamaras, N., Parker, I., 2001. Subcellular Mechanisms of Presenilin-Mediated Enhancement of Calcium Signaling. *Neurobiology of Disease*, 8(3):469-78.
- Leissring, M. A., Yamasaki, T. R., Wasco, W., Buxbaum, J. D., Parker, I., LaFerla, F. M., 2000. Calsenilin Reverses Presenilin-Mediated Enhancement of Calcium Signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(15):8590-93.
- Léveillé, F., Gaamouch, F. E., Gouix, E., Lecocq, M., Lobner, D., Nicole, O., Buisson, A., 2008. Neuronal viability is controlled by a functional relation between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(12):4258-71.
- Li, Q. X., Whyte, S., Tanner, J. E., Evin, G., Beyreuther, K., Masters, C. L., 1998. Secretion of Alzheimer's Disease Abeta Amyloid Peptide by Activated Human Platelets. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 78(4):461-69.
- Li, X., Bao, X., Wang, R., 2016. Experimental models of Alzheimer's disease for deciphering the pathogenesis and therapeutic screening. *International Journal of Molecular Medicine*, 37(2):271-83.
- Li, Y., Bohm, C., Dodd, R., Chen, F., Qamar, S., Schmitt-Ulms, G., Fraser, P. E., St George-Hyslop, P. H., 2014. Structural Biology of Presenilin 1 Complexes. *Molecular Neurodegeneration*, 9:59.
- Liang, R. F., Li, W. Q., Wang, H., Wang, J. X., Niu, Q., 2013. Impact of Sub-chronic Aluminium-maltolate Exposure on Catabolism of Amyloid Precursor Protein in Rats. *Biomedical and Environmental Sciences*, 26(6):445-52.
- Lin, M. T., Beal, M. F., 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443(7113):787-95.

- Lipton, S. A. 2004. Failures and successes of NMDA receptor antagonists: Molecular basis for the use of open-channel blockers like memantine in the treatment of acute and chronic neurologic insults. *NeuroRX*, 1(1):101-10.
- Liu, C. C., Liu, C. C., Kanekiyo, T., Xu, H., Bu, G., 2013. Apolipoprotein E and Alzheimer Disease: Risk, Mechanisms and Therapy. *Nature Reviews. Neurology*, 9(2):106-18.
- Ljungberg, M. C., Asuni, A., Pearce, J., Dayanandan, R., März, W., Hoffmann, M. M., Bertrand, P., Siest, G., Rupniak, H. T., Anderton, B. H., Huettinger, M., Lovestone, S., 2003. Apolipoprotein E (apoE) uptake and distribution in mammalian cell lines is dependent upon source of apoE and can be monitored in living cells. *Neuroscience Letters*, 341(1):69-73.
- Lockhart, I. A., Mitchell, S. A., Kelly, S., 2009. Safety and Tolerability of Donepezil, Rivastigmine and Galantamine for Patients with Alzheimer's Disease: Systematic Review of the 'Real-World' Evidence. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 28(5):389-403.
- Lovell, M. A., Robertson, J. D., Teesdale, W. J., Campbell, J. L., Markesbery, W. R., 1998. Copper, Iron and Zinc in Alzheimer's Disease Senile Plaques. *Journal of the Neurological Sciences*, 158(1):47-52
- Lowenberg, K., Waggoner, R. W., 1934. Familial Organic Psychosis (Alzheimer's Type). *Archives of Neurology And Psychiatry*, 31(4):737.
- Ma, G., Li, T., Price, D. L., Wong, P. C., 2005. APH-1a Is the Principal Mammalian APH-1 Isoform Present in Gamma-Secretase Complexes during Embryonic Development. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(1):192-98.
- Maelicke, A., Albuquerque, E. X., 2000. Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease. *European journal of pharmacology*, 393(1-3):165-70.
- Meldrum, B. S., 2000. Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain: Review of Physiology and Pathology. *The Journal of Nutrition*, 130(4):1007S-1015S.
- Migliore, L., Coppedè, F., Fenech, M., Thomas, P., 2011. Association of Micronucleus Frequency with Neurodegenerative Diseases. *Mutagenesis*, 26(1):85-92.
- Minghetti, L., 2005. Role of Inflammation in Neurodegenerative Diseases. *Current Opinion in Neurology*, 18(3):315-21.
- Molnár, Z., Soós, K., Lengyel, I., Penke, B., Szegedi, V., Budai, D., 2004. Enhancement of NMDA responses by beta-amyloid peptides in the hippocampus in vivo. *Neuroreport*, 15(10):1649-52.
- Nalbantoglu, J., Gilfix, B. M., Bertrand, P., Robitaille, Y., Gauthier, S., Rosenblatt, D. S., Poirier, J., 1994. Predictive value of apolipoprotein E genotyping in Alzheimer's disease: Results of an autopsy series and an analysis of several combined studies. *Annals of Neurology*, 36(6):889-95.

- Namba, Y., Tomonaga, M., Kawasaki, H., Otomo, E., Ikeda, K., 1991. Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain research*, 541(1):163-66.
- Nersesyan, A. K., Vardazaryan, N. S., Gevorgyan, A. L., Aroutiounian, R. M., 2002. Micronucleus level in exfoliated buccal mucosa cells of cancer patients. *Archive of Oncology*, 10.
- O'Brien, R. J., Wong, P. C., 2011. Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. *Annual review of neuroscience*, 34:185-204.
- Panegyres, P. K., Chen, H. Y., 2014. Early-onset Alzheimer's disease: A global cross-sectional analysis. *European Journal of Neurology*, 21(9):1149-54.
- Papouin, T., Ladépêche, L., Ruel, J., Sacchi, S., Labasque, M., Hanini, M., Groc, L., Pollegioni, L., Mothet, J. P., Oliet, S. H. R., 2012. Synaptic and Extrasynaptic NMDA Receptors Are Gated by Different Endogenous Coagonists. *Cell*, 150(3):633-46.
- de Paula, V. D. R., Guimarães, F. M., Diniz, B. S., Forlenza, O. V., 2009. Neurobiological pathways to Alzheimer's disease: Amyloid-beta, TAU protein or both? *Dementia & Neuropsychologia*, 3(3):188-94.
- Paz, L. N. F., Moura, L. M., Feio, D. C. A., Cardoso, M. S. G., Ximenes, W. L. O., Montenegro, R. C., Alves, A. P. N., Burbano, R. R., Lima, P. D. L., 2017. Evaluation of in vivo and in vitro toxicological and genotoxic potential of aluminum chloride. *Chemosphere*, 175:130-37.
- Pena, F., Gutierrez-Lerma, A., Quiroz-Baez, R., Arias, C., 2006. The Role of β -Amyloid Protein in Synaptic Function: Implications for Alzheimers Disease Therapy. *Current Neuropharmacology*, 4(2):149-63.
- Perry, E. K., Tomlinson, B. E., Blessed, G., Bergmann, K., Gibson, P. H., Perry, R. H., 1978. Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. *British medical journal*, 2(6150):1457-59.
- Pietrzak, K., Czarnecka, K., Mikiciuk-Olasik, E., Szymanski, P., 2018. New Perspectives of Alzheimer Disease Diagnosis – the Most Popular and Future Methods. *Medicinal Chemistry*, 14(1).
- Poirier, L. A., Vlasova, T. I., 2002. The prospective role of abnormal methyl metabolism in cadmium toxicity. *Environmental health perspectives*, 110 Suppl(suppl 5):793-95.
- Postina, R., Schroeder, A., Dewachter, I., Bohl, J., Schmitt, U., Kojiro, E., Prinzen, C., Endres, K., Hiemke, C., Blessing, M., Flamez, P., Dequenne, A., Godaux, E., van Leuven, F., Fahrenholz, F., 2004. A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(4):598-598.

- Praticò, D., 2008. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease: a reappraisal. *Trends in pharmacological sciences*, 29(12):609-15.
- Praticò, D., Uryu, K., Sung, S., Tang, S., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. Y., 2002. Aluminum Modulates Brain Amyloidosis through Oxidative Stress in APP Transgenic Mice. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(9):1138-40.
- Rafii, M. S., Aisen, P. S., 2009. Recent developments in Alzheimer's disease therapeutics. *BMC Medicine*, 7(1):7.
- Ranjan, V. D., Qiu, L., Tan, E. K., Zeng, L., Zhang, Y., 2018. Modelling Alzheimer's Disease: Insights from in Vivo to in Vitro Three-Dimensional Culture Platforms. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12(9):1944-58.
- Schwartz R. B., 2001. Apparent Diffusion Coefficient Mapping in Patients with Alzheimer Disease or Mild Cognitive Impairment and in Normally Aging Control Subjects: Present and Future. *Radiology*, 219(1):8-9.
- Reed, T. T., Pierce, W. M., Markesbery, W. R., Butterfield, D. A., 2009. Proteomic identification of HNE-bound proteins in early Alzheimer disease: Insights into the role of lipid peroxidation in the progression of AD. *Brain Research*, 1274:66-76.
- Rinaldi, P., Polidori, M. C., Metastasio, A., Mariani, E., Mattioli, P., Cherubini, A., Catani, M., Cecchetti, R., Senin, U., Mecocci, P., 2003. Plasma Antioxidants Are Similarly Depleted in Mild Cognitive Impairment and in Alzheimer's Disease. *Neurobiology of Aging*, 24(7):915-19.
- Roberson, E. D., Scearce-Levie, K., Palop, J. J., Yan, F., Cheng, I. H., Wu, T., Gerstein, H., Yu, G. Q., Mucke, L., 2007. Reducing Endogenous Tau Ameliorates Amyloid -Induced Deficits in an Alzheimer's Disease Mouse Model. *Science*, 316(5825):750-54.
- Roe, C. M., Fagan, A. M., Grant, E. A., Holtzman, D. M., Morris, J. C., 2013. CSF Biomarkers of Alzheimer Disease: 'Noncognitive' Outcomes. *Neurology*, 81(23):2028-31. *Neurology*, 81(23):2028-31.
- Roy, A. K., Sharma, A., Talukder, G., 1991. Effects of Aluminium Salts on Bone Marrow Chromosomes in Rats in Vivo. *Cytobios*, 66(265):105-11.
- Roy, A. K., Talukder, G., Sharma, A., 1990. Effects of Aluminium Sulphate on Human Leukocyte Chromosomes in Vitro. *Mutation Research*, 244(2):179-83.
- Sanabria-Castro, A., Alvarado-Echeverría, I., Monge-Bonilla, C., 2017. Molecular Pathogenesis of Alzheimer's Disease: An Update. *Ann Neurosci*, 24:46-54.
- Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T. D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levy-Lahad, L., Viitanen, M., Peskind, E., Poorkaj, P., Schellenberg, G., Tanzi, R., Wasco, W., Lannfelt, L., Selkoe, D., Younkin, S., 1996. Secreted amyloid β -protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and

- 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature Medicine*, 2(8):864-70.
- Schumacher, A., Bihagi, S. W., Zawia, N., 2011. Epigenetics and late-onset Alzheimer's disease. January.
- Selkoe, D. J., 1994. Normal and Abnormal Biology of the beta-Amyloid Precursor Protein. *Annual Review of Neuroscience*, 17(1):489-517.
- Shibata, M., Yamada, S., Kumar, S. R., Calero, M., Bading, J., Frangione, B., Holtzman, D. M., Miller, C. A., Strickland, D. K., Ghiso, J., Zlokovic, B. V., 2000. Clearance of Alzheimer's Amyloid- β (1-40) Peptide from Brain by LDL Receptor-Related Protein-1 at the Blood-Brain Barrier. *The Journal of Clinical Investigation*, 106(12):1489-99.
- Shimetani, N., Shimetani, K., Mori, M., 2001. Levels of Three Inflammation Markers, C-Reactive Protein, Serum Amyloid A Protein and Procalcitonin, in the Serum and Cerebrospinal Fluid of Patients with Meningitis. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 61(7):567-74.
- Sinha, S., Anderson, J. P., Barbour, R., Basi, G. S., Caccavello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H. F., Frigon, N., Hong, J., Jacobson-Croak, K., Jewett, N., Keim, P., Knops, J., Lieberburg, I., Power, M., Tan, H., Tatsuno, G., Tung, J., Schenk, D., Seubert, P., Suomensari, S. M., Wang, S., Walker, D., Zhao, J., McConlogue, L., John, V., 1999. Purification and cloning of amyloid precursor protein β -secretase from human brain. *Nature*, 402(6761):537-40.
- Sly, L. M., Krzesicki, R. F., Brashler, J. R., Buhl, A. E., McKinley, D. D., Carter, D. B., Chin, J. E., 2001. Endogenous Brain Cytokine mRNA and Inflammatory Responses to Lipopolysaccharide Are Elevated in the Tg2576 Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Brain Research Bulletin*, 56(6):581-88.
- Smith, C. D., Carney, J. M., Starke-Reed, P. E., Oliver, C. N., Stadtman, E. R., Floyd, R. A., Markesbery, W.R., 1991. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(23):10540-43.
- Stamer, K., Vogel, R., Thies, E., Mandelkow, E., Mandelkow, E. M., 2002. Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *The Journal of Cell Biology*, 156(6):1051-63.
- Stoothoff, W. H., Johnson, G. V. W., 2005. Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1739(2-3):280-97.
- Strittmatter, W. J., Weisgraber, K. H., Huang, D. Y., Dong, L. M., Salvesen, G. S., Pericak-Vance, M., Schmechel, D., Saunders, A. M., Goldgaber, D., Roses, A. D., 1993. Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(17):8098-8102.

- De Strooper, B., Karran, E., 2016. The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell*, 164(4):603-15.
- Talantova, M., Sanz-Blasco, S., Zhang, X., Xia, P., Akhtar, M. W., Okamoto, S., Dziewczapolski, G., Nakamura, T., Cao, G., Pratt, A. E., Kang, Y. J., Tu, S., Molokanova, E., McKercher, S. R., Hires, S. A., Sason, H., Stouffer, D.G., Buczynski, M. W., Solomon, J. P., Michael, S., Powers, E. T., Kelly, J. W., Roberts, A., Tong, G., Fang-Newmeyer, T., Parker, J., Holland, E. A., Zhang, D., Nakanishi, N., Chen, H. S. V., Wolosker, H., Wang, Y., Parsons, L. H., Ambasadhan, R., Masliah, E., Heinemann, S. F., Piña-Crespo, J. C., Lipton, S. A., 2013. A β Induces Astrocytic Glutamate Release, Extrasynaptic NMDA Receptor Activation, and Synaptic Loss. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(27):E2518-2527.
- Tanzi, R. E., Bertram, L., 2005. Twenty Years of the Alzheimer's Disease Amyloid Hypothesis: A Genetic Perspective. *Cell*, 120(4):545-55.
- Tarkowski, E., Andreasen, N., Tarkowski, A., Blennow, K., 2003. Intrathecal Inflammation Precedes Development of Alzheimer's Disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 74(9):1200-1205.
- Tarkowski, E., Issa, R., Sjögren, M., Wallin, A., Blennow, K., Tarkowski, A., Kumar, P., 2002. Increased Intrathecal Levels of the Angiogenic Factors VEGF and TGF-Beta in Alzheimer's Disease and Vascular Dementia. *Neurobiology of Aging*, 23(2):237-43.
- Taşci, S., Tekinsoy Kartin, P., Ceyhan, Ö., Sungur, G., Göriş, S., 2012. Living with an alzheimer patient in Turkey. *Journal of Neuroscience Nursing*, 44(4):228-34.
- Tian, Y., Crump, C. J., Li, Y. M., 2010. Dual Role of α -Secretase Cleavage in the Regulation of γ -Secretase Activity for Amyloid Production. *Journal of Biological Chemistry*, 285(42):32549-56.
- Trojanowski, J. Q., Mattson, M. P., 2003. Overview of Protein Aggregation in Single, Double, and Triple Neurodegenerative Brain Amyloidoses. *NeuroMolecular Medicine*, 4(1-2):1-6.
- Tsankova, N., Renthal, W., Kumar, A., Nestler, E. J., 2007. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(5):355-67.
- Tucker, R. P., 1990. The roles of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis: a review. *Brain Research Reviews*, 15(2):101-20.
- Udo, H., Yoshida, Y., Kino, T., Ohnuki, K., Mizunoya, W., Mukuda, T., Sugiyama, H., 2008. Enhanced Adult Neurogenesis and Angiogenesis and Altered Affective Behaviors in Mice Overexpressing Vascular Endothelial Growth Factor 120. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(53):14522-36.
- Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M. A., Biere, A. L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J. C.,

- Collins, F., Treanor, J., Rogers, G., Citron, M., 1999. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*, (New York, N.Y.) 286(5440):735-41.
- Vázquez, M. D., Sánchez-Rodríguez, F., Osuna, E., Diaz, J., Cox, D. E., Pérez-Cárceles, M. D., Martínez, P., Luna, A., Pounder, D. J., 1995. Creatine Kinase BB and Neuron-Specific Enolase in Cerebrospinal Fluid in the Diagnosis of Brain Insult. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 16(3):210-14.
- Venneri, A., McGeown, W. J., Shanks, M. F., 2005. Empirical evidence of neuroprotection by dual cholinesterase inhibition in Alzheimer's disease. *NeuroReport*, 16(2):107-10.
- Vitvitsky, V. M., Garg, S. K., Keep, R. F., Albin, R. L., Banerjee, R., 2012. Na⁺ and K⁺ ion imbalances in Alzheimer's disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1822(11):1671-81.
- Voisin, T., Vellas, B., 2009. Diagnosis and Treatment of Patients with Severe Alzheimer's Disease. *Drugs & Aging*, 26(2):135-44.
- Waite, L. M., 2015. Treatment for Alzheimer's disease: Has anything changed? *Australian Prescriber*, 38(2):60-63.
- Wallimann, T., Wyss, M., Brdiczka, D., Nicolay, K., Eppenberger, H. M., 1992. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *The Biochemical journal*, 281 (Pt 1):21-40.
- Walton, J. R., 2006. Aluminum in hippocampal neurons from humans with Alzheimer's disease. *NeuroToxicology*, 27(3):385-94.
- Walton, J. R., 2007. An aluminum-based rat model for Alzheimer's disease exhibits oxidative damage, inhibition of PP2A activity, hyperphosphorylated tau, and granulovacuolar degeneration. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 101(9):1275-84.
- Walton, J. R., 2010. Evidence for participation of aluminum in neurofibrillary tangle formation and growth in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease*, JAD 22(1):65-72.
- Wang, J. M., Sun, C., 2010. Calcium and Neurogenesis in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, 4:194.
- Wang, L., Hu, J., Zhao, Y., Lu, X., Zhang, Q., Niu, Q., 2014. Effects of Aluminium on β -Amyloid (1-42) and Secretases (APP-Cleaving Enzymes) in Rat Brain. *Neurochemical Research*, 39(7):1338-45.
- Wang, S. C., Oelze, B., Schumacher, A., 2008. Age-Specific Epigenetic Drift in Late-Onset Alzheimer's Disease. *Plos One*, 3(7):e2698.

- Wang, Z., Wei, X., Yang, J., Suo, J., Chen, J., Liu, X., Zhao, X., 2016. Chronic exposure to aluminum and risk of Alzheimer's disease: A meta-analysis. *Neuroscience Letters*, 610:200-206.
- Weaver, I. C. G., Diorio, J. C., Seckl, J. R., Szyf, M., Meaney, M. J., 2004. Early environmental regulation of hippocampal glucocorticoid receptor gene expression: characterization of intracellular mediators and potential genomic target sites. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1024:182-212.
- Whitehouse, P., D. P., Struble, R., Clark, A., Coyle, J., Delon, M., 1981. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science*, 215(4537):1237-39.
- Wilson, R. S., Scherr, P. A., Hoganson, G., Bienias, J. L., Evans, D. A., Bennett, D. A., 2005. Early life socioeconomic status and late life risk of Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology*, 25(1):8-14.
- Wolfe, M. S., Xia, W., Ostaszewski, B. L., Diehl, T. S., Kimberly, W. T., Selkoe, D. J., 1999. Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and γ -secretase activity. *Nature*, 398(6727):513-17.
- Wollen, K. A., 2010. Alzheimer's disease: the pros and cons of pharmaceutical, nutritional, botanical, and stimulatory therapies, with a discussion of treatment strategies from the perspective of patients and practitioners. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic*, 15(3):223-44.
- Wu, L., Rosa-Neto, P., Hsiung, G. Y. R., Sadovnick, A. D., Masellis, M., Black, S. E., Jia, J., Gauthier, S., 2012. Early-onset familial alzheimer's disease (EOFAD). *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 39(4):436-45.
- Xie, B., Zhang, H., Li, X., Dong, X., Sun, Y., 2017. Iminodiacetic Acid-Modified Human Serum Albumin: A Multifunctional Agent against Metal-Associated Amyloid β -Protein Aggregation and Cytotoxicity. *ACS Chemical Neuroscience*, 8(10):2214-24.
- Yan, S. D., Yan, S. F., Chen, X., Fu, J., Chen, M., Kuppasamy, P., Smith, M. A., Perry, G., Godman, G. C., Nawroth, P., Zweier, J. L., Stern, D., 1995. Non-enzymatically glycosylated tau in Alzheimer's disease induces neuronal oxidant stress resulting in cytokine gene expression and release of amyloid β -peptide. *Nature Medicine*, 1(7):693-99.
- Yegambaram, M., Manivannan, B., Beach, T. G., Halden, R. U., 2015. Role of environmental contaminants in the etiology of Alzheimer's disease: a review. *Current Alzheimer research*, 12(2):116-46.
- Yiannopoulou, K. G., Papageorgiou, S. G., 2013. Current and future treatments for Alzheimer's disease. *Therapeutic advances in neurological disorders*, 6(1):19-33.
- Yokel, R. A., McNamara, P. J., 2001. Aluminium Toxicokinetics: An Updated MiniReview. *Pharmacology & Toxicology*, 88(4):159-67.

- Yokota, O., Sasaki, K., Fujisawa, Y., Takahashi, J., Terada, S., Ishihara, T., Nakashima, H., Kugo, A., Ata, T., Ishizu, H., Kuroda, S., 2005. Frequency of Early and Late-Onset Dementias in a Japanese Memory Disorders Clinic. *European Journal of Neurology*, 12(10):782-90.
- Yu, G, Nishimura, M., Arawaka, S., Levitan, D., Zhang, L., Tandon, A., Song, Y. Q., Rogaeva, E., Chen, F., Kawarai, T., Supala, A., Levesque, L., Yu, H., Yang, D. S., Holmes, E., Milman, P., Liang, Y., Zhang, D. M., Xu, D. H., Sato, C., Rogaeve, E., Smith, M., Janus, C., Zhang, Y., Aebersold, R., Farrer, L., Sorbi, S., Bruni, A., Fraser, P., St George-Hyslop, P., 2000. Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and β APP processing. *Nature*, 407(6800):48-54.
- Żekanowski, C., Wojda, U., 2009. Aneuploidy, chromosomal missegregation, and cell cycle reentry in Alzheimer's disease. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 69(2):232-53.
- Zhou, Y., Richardson, J. S., Mombourquette, M. J., Weil, J. A., 1995. Free radical formation in autopsy samples of Alzheimer and control cortex. *Neuroscience, Letters* 195(2):89-92.

EKLER

EK-1



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 75296309-050.01.04-E.1800138962
Konu : HADYEK Kararı.

04.05.2018

HUKUK MÜŞAVİRLİĞİNE

İlgi : 26.04.2018 tarihli ve 77040475-000-E.1800132410 sayılı belge.

İlgide kayıtlı yazınız, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 27.04.2018 tarih ve 5 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 121 no'lu kararı ile sözkonusu araştırma çalışmanın yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, mevcut oy birliği ile karar verilmiş olup, çalışmada kullanılan hayvanlara ait bilgilerin, T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü'nün, Hayvanları Koruma Bilgi Sistemi (HAYBİS)'ne girilebilmesi için ekte sunulan "HADYEK Sonuç Raporu"nun Başkanlığımıza gönderilmesi hususunda;

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Prof.Dr. Fikret ÇELEBİ
Kurul Başkanı

TOPLANTI TARİHİ : 27.04.2018

TOPLANTI SAYISI : 5

KARAR NO 121: Erzurum Teknik Üniversitesi Rektörlüğü, Fen Fakültesi Dekanlığı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Hasan TÜRKEZ'in yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülecek olan "Serin, Tryptofan, Glisin ve Penisilamin Aminoasit Türevlerinin *In Vivo* Sıçan Alzheimer Hastalığı Modelinde Nöron Koruyucu Etkilerinin Değerlendirilmesi" isimli araştırma çalışması ile ilgili 26.04.2018 tarih ve 77040475-000-E.1800132410 sayılı Atatürk Üniversitesi Rektörlüğü, Hukuk Müşavirliğinin yazısı ekindeki Erzurum Teknik Üniversitesi Rektörlüğü, Personel Dairesi Başkanlığına 20.04.2018 tarih ve 16423269-050.99-E.980 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi 25240 Erzurum
Tel: +90 442 2317222
Elektronik Ad: <http://www.atauni.edu.tr/birim-veteriner-fakültesi>

Bilgi: Mehmet KOCA
Faks: +90 442 2317244
E-Posta: vetfak@atauni.edu.tr

Kep Adresi: atauni@k01.kep.tr



kurallarına uygun olduğuna, çalışma sonucunun Başkanlığımıza bildirilmesine, mevcut oy birliği ile kabulüne: (Yönetmeliğin 8.maddesinin 8/h bendi gereğince, Prof.Dr.Ahmet HACMÜFTÜOĞLU, görüşmeye katılmadı ve oy kullanmadı). karar verildi.

Ek : Sonuç Raporu. 1 Adet.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı-Soyadı :Tuğba GEZMİŞ
Uyruğu : T.C.
Doğum Tarihi ve Yeri :22.08.1993/ILICA
Medeni Hali : Bekar
Telefon : +905320559452
e-mail :tgbgzms@gmail.com

Eğitim

Derece	Üniversite	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Erzurum Teknik Üniversitesi	2019
Lisans	Atatürk Üniversitesi	2016
Lise	Hacı Sami Boydak Anadolu Lisesi	2011