



**SARKOZİN'İN *IN VITRO* VE *IN VIVO*
NÖROPROTEKTİF ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Arzugül TANAS

**Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ**

2019

Her hakkı saklıdır.



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**SARKOZİN'İN *IN VITRO* VE *IN VIVO* NÖROPROTEKTİF ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Arzugül TANAS

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

**SARKOZİN'İN *IN VITRO* VE *IN VIVO* NÖROPROTEKTİF ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Prof.Dr. Hasan TÜRKEZ danışmanlığında, Arzuğül TANAS 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 ile** kabul edilmiştir.

Başkan	: Prof. Dr. Turgay ŞİŞMAN	<i>İmza</i>	:
Üye	: Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ	<i>İmza</i>	:
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi MEHMET ENES ARSLAN	<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

Arzuğül TANAS

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SARKOZİN'İN *IN VITRO* VE *IN VIVO* NÖROPROTEKTİF ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Arzugül TANAS

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ

Alzheimer hastalığı (AH), bilişsel fonksiyonlarda azalma ve bellek kaybına ek olarak davranışsal ve psikolojik bozukluklarla da karakterize nörodejeneratif progresif bir hastalıktır. AH'nin moleküler mekanizması, patofizyolojisi ve genetik altyapısı kesin olarak aydınlatılmadığından henüz etkin bir tedavi yöntemi de bulunmamaktadır. Bu nedenle bu tez çalışmasında AH için sarkozinin koruyucu etkisini ortaya çıkarmak hedeflenmiştir. Tez kapsamında SH-SY5Y retinoik asit (RA) ile nöron benzeri hücrelere dönüştürülmüş ve böylece *in vitro* AH modeli oluşturulmuştur. *In vitro* AH modelinde sarkozinin nöroprotektif etki potansiyeli WST-8 ve LDH testleri ile değerlendirilmiştir. Çalışmada ayrıca sarkozinin *in vivo* nöroprotektif etkisinin değerlendirilmesi amacıyla 16 adet dişi Sprague-Dawley rat kullanılarak 4 farklı deney grubu oluşturulmuştur. Bunlar: 1.grup kontrol grubu (n=4), 2.grup AlCl₃ uygulaması ile deneysel AH oluşturulan grup (n=4), 3.grup sarkozin verilen grup (n=4) ve 4. Grup AlCl₃ ile birlikte sarkozin verilen grup (n=4). *In vivo* ortamda AlCl₃ ve sarkozinin TAK ve TOS seviyeleri üzerine olan etkileri belirlenmiştir. Deneysel AH modeli oluşturulan ratlarda biyokimyasal, hematolojik ve histopatolojik değerlendirmelerin yanı sıra moleküler genetik analizler ile çalışma detaylandırılmış ve tüm testlerin genetik altyapısını aydınlatmak amacıyla qRT-PZR yapılmıştır. Bu genetik analizler sonucunda AlCl₃'ün β-sekretaz ve γ-sekretaz aktivitelerini artırırken α-sekretaz aktivitesini azalttığı bulunmuştur. Sarkozin uygulaması, AlCl₃ toksisitesi nedeniyle oluşan nöron hasarında hem *in vitro* hem de *in vivo* ortamda iyileşme ve koruma sağlamıştır. Bu çalışma sonucunda elde edilen bulguların, AlCl₃'e bağlı nörodejenerasyon ve bilişsel bozukluğa karşı koruyucu ve iyileştirici etkisi olan ilaçların tasarlanmasında katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

2019, 72 sayfa

Anahtar Kelimeler: Alzheimer, Anti-Alzheimer aktivite, Alüminyum, Sarkozin, Nöroprotektif etki, *In vitro*, *In vivo*

ABSTRACT

Select for Master's or PhD Thesis

EVALUATION OF THE *IN VITRO* AND *IN VIVO* NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF SARCOSINE

Arzugül TANAS

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 a neurodegenerative disease characterized by behavioral and psychological disorders in addition to loss of cognitive function and memory loss. Due to the molecular mechanism, pathophysiology and genetic background of AD are not clear, there is no effective treatment method. For this reason, it is aimed to reveal the protective effect of sarcosine for AD. The neuroprotective effect of sarcosine in SH-SY5Y cell line was evaluated by WST-8 and LDH tests. In this study, in order to evaluate the neuroprotective effect of sarcosine, 16 female Sprague-Dawley rats were used in 4 different experimental groups. Group 1 Control group (n = 4), Group 2 experimental AD group with administration of AlCl₃ (n = 4), Group 3 Sarkosine group (n = 4) and Group 4 treatment with Sarkosine (n = 4). The effects of AlCl₃ and sarcosine on TAC and TOS levels were determined. In addition to biochemical, hematological and histopathological evaluations, experimental genetic model was used to elucidate the experimental model of AD and qRT-PCR was performed to elucidate the genetic background of all these tests. As a result of these genetic analyzes, it has been found that AlCl₃ decreases α -secretase activity while increasing β -secretase and γ -secretase activities. The administration of sarcosine resulted in improvement and protection of neuronal damage caused by AlCl₃ toxicity, both *in vitro* and *in vivo*. It is thought that the results obtained from this study may contribute to the design of drugs that have protective and curative effect against AlCl₃-induced neurodegeneration and cognitive impairment.

2019, 72 pages

Keywords: Alzheimer's, Anti-Alzheimer activity, Aluminum, Sarcosine, Neuroprotective effect, *In vitro*, *In vivo*

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam için bana daima yardımcı olan ve yol gösteren, desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ' e,

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

Dokuların patolojik incelemesinde yardımcı olan Atatürk Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi Dr. Öğr. Üyesi Onur Ceylan'a,

Tezimin uygulama kısmında güler yüzle ve sabırla bana yol gösteren, bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Arş. Gör. Özlem ÖZDEMİR TOZLU' ya,

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca hoşgörü ve sabırla her konuda bana destek olan, dostluğu ve yardımseverliği ile her zaman yanımda olan Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencisi Tuğba GEZMİŐ' e

Bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan, desteklerini ve sevgilerini benden esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Arzugül TANAS

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.....	1
1.2 Alzheimer Hastalığının Tarihçesi.....	1
1.3. Alzheimer Hastalığının Epidemiyolojisi.....	2
1.4. Alzheimer Hastalığının Belirti ve Evreleri.....	2
1.5. Alzheimer Hastalığının Patofizyolojisi.....	3
1.5.1. A β Plakları.....	4
1.5.2. Nörofibriler yumaklar.....	5
1.5.3. Amiloid kaskad hipotezi.....	7
1.6. Alzheimer hastalığının genetik yapısı.....	8
1.6.1. Ailesel alzheimer hastalığı.....	8
1.6.2. Sporadik alzheimer hastalığı.....	9
1.7. Alzheimer hastalığında etkili risk faktörleri.....	10
1.8. Alzheimer Hastalığının Tanı ve Tedavisi.....	11
1.8.1. Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan antikolinergik ilaçlar.....	12
1.8.2. Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan glutamat antagonistleri.....	13
1.9. Alüminyum ile İndüklenen Alzheimer Rat Modelleri.....	15
1.10. Sarkozin.....	17
2. KAYNAK ÖZETLERİ	19
3. MATERYAL VE YÖNTEM	23
3.1. Materyaller.....	23
3.2. Yöntem.....	24
3.2.1. <i>In Vitro</i> çalışmalar.....	24
3.2.1.1. Hücre kültürü ve farklılaşma.....	24

3.2.1.2. WST-8 Testi	25
3.2.1.3. LDH Testi	27
3.2.1.4. Metal şelatlama	28
3.2.2. <i>In Vivo</i> çalışmalar.....	29
3.2.2.1. Rat modelleri.....	29
3.2.2.2. Vücut ağırlığı	30
3.2.2.3. Hematolojik analizler	31
3.2.2.4. Biyokimyasal analizler.....	31
3.2.2.5. Patolojik inceleme	31
3.2.2.6. Mikroçekirdek Testi	31
3.2.2.7. Toplam oksidatif stres (TOS) ve toplam antioksidan kapasite (TAK) analizi ...	32
3.2.2.8. Moleküler genetik analizler.....	33
3.2.2.8.1. Dokudan RNA izolasyonu	33
3.2.2.8.2. cDNA sentezi	34
3.2.2.8.3. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR)	35
3.2.3. İstatistiksel Analizler.....	36
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	37
4.1. <i>In Vitro</i> AlCl ₃ Toksikite Sonuçları	37
4.2. <i>In Vitro</i> Sarkozin'in Nöroprotektif Potansiyeli.....	37
4.3. Metal Şelatlama.....	40
4.4. Vücut Ağırlık Ölçümleri	41
4.5. <i>In Vivo</i> Hematolojik Bulgular	42
4.6. <i>In Vivo</i> Biyokimyasal Bulgular	43
4.7. Patolojik İnceleme.....	45
4.8. Mikroçekirdek Bulguları	48
4.9. TAK ve TOS Testleri	49
4.10. Moleküler Genetik Yanıtlar	50
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	55
KAYNAKLAR	56
EKLER.....	70
EK-1	70
ÖZGEÇMİŞ.....	72

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
°	Derece
C	Çevrim zamanı (dakika)
EB_{ij}	İşlemin en erken başlama zamanı
g	Yerçekimi ivmesi
K	Kelvin
m	Metre
P	Basınç

Kisaltmalar

ACh	Asetilkolin
AChE	Asetilkolin Esteraz
AChEIs	Asetilkolin Esteraz İnhibitörleri
ADAM	Metalloproteinaz Disintegrin Protein
AH	Alzheimer Hastalığı
Al	Alüminyum
$AlCl_3$	Alüminyum Klorür
AMPA	α - amino-3-hidroksi-5-4-isoksazolpropionik asit
APOE	Apolipoprotein E
APP	Amiloid Prokürsör Protein
APP_{α}	Amiloid Prokürsör Protein α
$A\beta$	Amiloid beta
BT	Bilgisayarlı Tomografi
BuChE	Butirilkolinesteraz
BuChEIs	Butirilkolin Esteraz İnhibitörleri
EBAAH	Erken Başlangıçlı Ailevi Alzheimer Hastalığı
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GBAH	Geç Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı

GlyT	Glisin Taşıyıcıları
i.p.	İntraperitoneal
MAP	Mikrotübül Asosiye Protein
MR	Manyetik Rezonans
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
NFY	Nörofibriler Yumak
NMDA	N-metil-D-aspartat
PET	Pozitron Emisyon Tomografi
PSEN 2	Presenilin 2
PSEN1	Presenilin 1
RA	Retinoik asit
RT-PCR	Ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu
SP	Senil Plak
SPECT	Tek Foton Emisyon Tomografisi
TAK	Toplam Antioksidan Kapasite
TNF- α	Tümör Nekroz Faktör α
TOS	Toplam Oksidatif Stres
α -CTF	C- Terminal α Fragman

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Normal Beyin ile (sol) Alzheimer Hastalığı Bulunan Beyin (sağ) Arasındaki Karşılaştırma (Öber et al. 2008).....	1
Şekil 1.2 Alzheimer Hastalığının Evreleri (Med et al. 2016).	3
Şekil 1.3 Hasta Nöronlarda Görülen SP'ler ve NFY'ler (Chen et al. 2013).	4
Şekil 1.4 APP İşleme Yollarının Şematik Gösterimi (Kumar et al. 2015).	5
Şekil 1.5 Sağlıklı Nöronlarda ve AH Bulunan Nöronlarda Tau Proteini (Chen et al. 2013).....	7
Şekil 1.6 NMDA Reseptörlerinin Topoloji ve Farmakolojik Tanıma Alanlarının Şematik Gösterimi (Parsons et al. 2007).	15
Şekil 1.7 Glisin'in Yapısı	17
Şekil 1.8 Sarkozin'in Yapısı	18
Şekil 3.1 WST-8 ile Hücre Canlılığı Tespiti Prensibi.....	26
Şekil 3.2 LDH ile Sitotoksisite Tespit Prensibi	28
Şekil 3.3 İntraperitoneal Enjeksiyon Uygulaması.....	30
Şekil 4.1 SH-SY5Y Hücrelerinde AlCl ₃ Toksisitesine Karşı Sarkozin'in Koruyucu Etkisi.....	38
Şekil 4.2 SH-SY5Y Hücrelerinde AlCl ₃ Toksisitesine Karşı Sarkozin'in LDH Aktivitesine Koruyucu Etkisi.	39
Şekil 4.3 Sarkozin'in Şelatlama Potansiyeli.	41
Şekil 4.4 Deney Gruplarına Ait Beyin Dokularının Işık Mikroskobu Görüntüleri.....	47
Şekil 4.5 Deney Gruplarına Ait Beyin Örneklerindeki APP Ekspresyon Düzeyi.	51
Şekil 4.6 Deney Gruplarına Ait Beyin Örneklerindeki BACE1 Ekspresyon Düzeyi.	52
Şekil 4.7 Deney Gruplarına Ait Beyin Örneklerindeki APHIA Ekspresyon Düzeyi.	52
Şekil 4.8 Deney Gruplarına Ait Beyin Örneklerindeki PSENEN Ekspresyon Düzeyi.....	53
Şekil 4.9 Deney Gruplarına Ait Beyin Örneklerindeki TNF- α Ekspresyon Düzeyi.	54

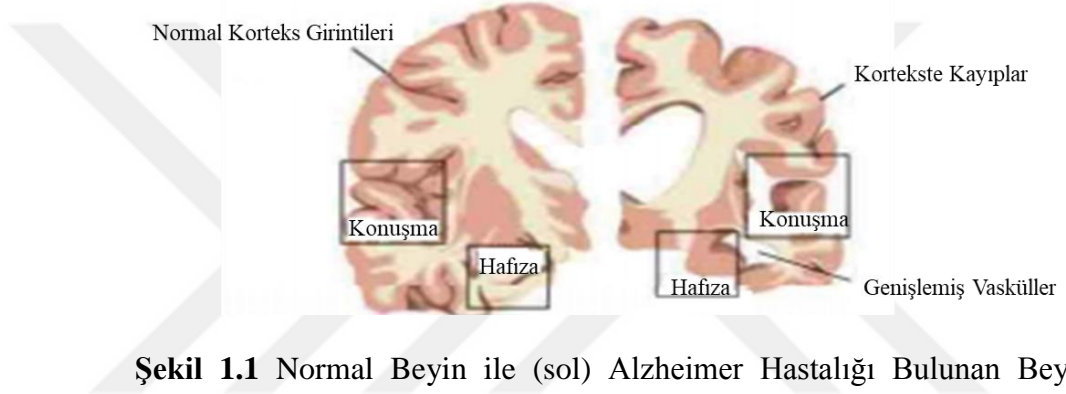
ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 AH İçin Muhtemel Risk Faktörleri	11
Çizelge 3.1 Araştırmada Kullanılan Kit ve Kimyasal Listesi	23
Çizelge 3.2 Araştırmada Kullanılan Cihaz Listesi	24
Çizelge 3.3 Metal Şelatlama Deney Düzenegi.....	29
Çizelge 3.4 Çalışma Grupları ve Hayvan Sayıları	29
Çizelge 3.5 RT-PZR'de Kullanılan Primer Sekansları	35
Çizelge 4.1 Farklılaştırılmış SH-SY5Y Hücrelerinde AlCl ₃ ' ün Sitotoksitesi Verileri	37
Çizelge 4.2 Deney Öncesi ve Sonrası Ratların Vücut Ağırlıkları.....	42
Çizelge 4.3 Bütün Deney Gruplarına Ait Hematolojik Bulgular	42
Çizelge 4.4 Bütün Deney Gruplarına Ait Biyokimyasal Bulgular	44
Çizelge 4.5 Sarkozin ve AlCl ₃ ' ün Beyin Dokusunun Ağırlığı Üzerindeki Etkileri.....	46
Çizelge 4.6 Bütün Deney Gruplarına Ait Ratların Kan Smear Örneklerinde Gözlenen Mikroçekirdek Sıklıkları	48
Çizelge 4.7 <i>In Vivo</i> Beyin Dokusunda Deney Gruplarının TAK Seviyesine Etkileri.....	49
Çizelge 4.8 <i>In Vivo</i> Beyin Dokusunda Deney Gruplarının TOS Seviyesine Etkileri	50

1. GİRİŞ

1.1 Alzheimer Hastalığının Tanımı

Alzheimer hastalığı (AH); merkezi sinir sisteminin (MSS) bazı bölgelerinde geri dönüşümü olmayan nöron ve sinaps kayıpları ile ortaya çıkan; hafıza ve bilişsel işlevlerin kaybolması ile karakterize progresif nörodejeneratif bir hastalıktır (Özkay et al. 2011). Alzheimer hastalığında nöronal kayıp beyin ağırlığının %20'si kadardır (Reddy et al. 2008) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 Normal Beyin ile (sol) Alzheimer Hastalığı Bulunan Beyin (sağ) Arasındaki Karşılaştırma (Öber et al. 2008).

AH'de depresyon, huzursuzluk, sanrı ve halüsinasyon gibi davranışsal değişikliklerin görülme oranının %80 olduğu bildirilmekte ve depresyonun AH'nin ilk belirtisi olduğu düşünülmektedir. Hastalığın ilerleyen zamanlarında, bireyler sürekli bakıma ihtiyaç duymaktadırlar. Hastalar kendilerini, aile üyelerini ve bakıcılarını tanıyamaz, yardımsız yürüyemez ve yatağa bağımlı hale gelmektedir (Method et al. 2015).

1.2 Alzheimer Hastalığının Tarihçesi

Alman psikiyatristi ve nöropatologu olan Dr. Alois Alzheimer bellek bozukluğu, öz bakım yetersizliği, halüsinasyon, okuma ve yazma zorluğu şikayetleri ile hastaneye yatırılan 51 yaşındaki kadın hasta ile karşılaşmış ve hastanın ölümünden sonra yapılan beyin otopsisinde amiloid plaklar ve nörofibriler yumakları gözlemlemiştir. Alois

1. GİRİŞ

Alzheimer bu gözlemlerini 1906 yılında “Serebral Korteksin Özgün Bir Hastalığı” adında ilk kez yayınlamış ve daha sonra bu hastalık psikiyatrist Emil Kraepelin tarafından “Alzheimer hastalığı” olarak adlandırılmıştır (Selekler et al. 2010).

1.3. Alzheimer Hastalığının Epidemiyolojisi

Yapılan araştırmalar sonucunda 24,2 milyon insanda bunama bulunduğu ve her yıl 4,6 milyon yeni vakanın ortaya çıktığı gözlemlenmiştir (Ferri et al. 2005). Dünya Sağlık Örgütü’nün raporuna göre AH bütün bunama vakalarının en yaygın olanıdır (tüm vakaların% 60-80'i) ve dünya üzerinde yaklaşık 47 milyon insan bu hastalıktan etkilenmektedir (Messages et al. 2015). Türkiye’de ise Alzheimer hastalarının sayısı yaklaşık 300.000’dir (Taşci et al. 2012). AH'nin 2006 yılında yaygınlığı 26,6 milyon iken, bu sayının 2050 yılında dört kat artması beklenmektedir (Brookmeyer et al. 2007).

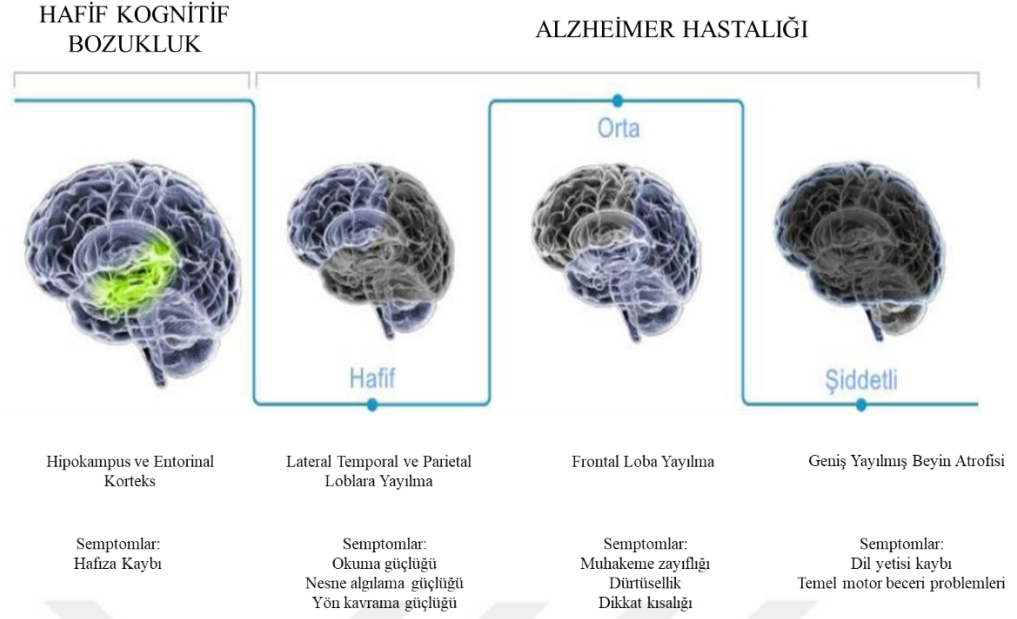
AH’nin sıklığı yaşla birlikte artmaktadır ve 60 yaşından sonra hasta sayısı her 5 yılda bir iki kat daha fazladır (Brookmeyer et al. 2004). 65 yaş üstü insanların % 12'sinin ve 85 yaş üstü insanların %50’sinden fazlasının Alzheimer hastası olduğu belirtilmektedir (Alzheimer’s Association 2008).

1.4. Alzheimer Hastalığının Belirti ve Evreleri

Alzheimer, sinsi başlayan ve yavaş ilerleyen bir hastalıktır. Tanı sonrası ortalama yaşam süresi 9-10 yıldır. İleri evrelerde hasta tamamen yatağa bağımlı hale gelir ve genelde aspirasyon pnömonisi, üresepsis, akciğer embolisi gibi enfeksiyonlar nedeniyle hayatını kaybetmektedir.

Alzheimer hastalığının başlıca klinik bulgusu bellek bozukluğudur. Hastalık ilerledikçe düşünce ve davranış, okuma ve yazma becerisi, görsel fonksiyonlar, dikkat ve yürütücü işlevlerde de bozukluklar meydana gelmektedir (Özkay et al. 2011).

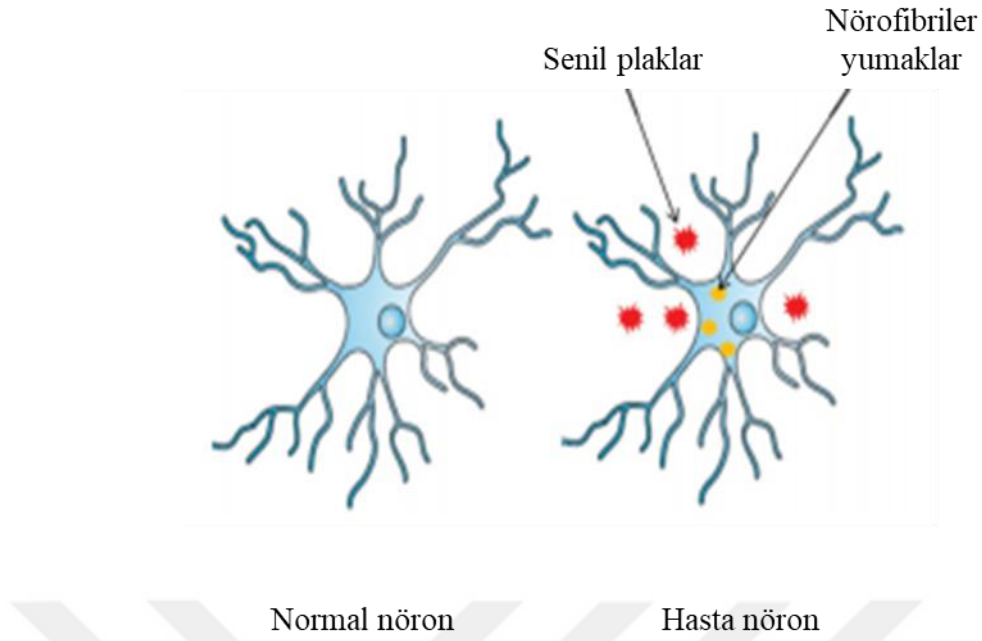
Alzheimer hastalığı, hafif, orta ve ileri olmak üzere üç evreye ayrılabilir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2 Alzheimer Hastalığının Evreleri (Med et al. 2016).

1.5. Alzheimer Hastalığının Patofizyolojisi

AH'li beyinde senil amiloid plak (SP), nörofibriler yumak (NFY) ve belirgin bir atrofi oluşumu söz konusudur (Şekil 1.3). AH kesin tanısı için NFY ve SP'lerin saptanması gereklidir ancak bu saptama yeterli değildir. Bu lezyonlar hem yaşlanmada hem de bazı nörodejeneratif hastalıklarda görülebilir (Öztürk et al. 2004). AH bulunan beyinler makroskopik olarak incelendiğinde tüm beyinde atrofi, sulkuslarda genişleme, giruslarda küçülme (en belirgin frontotemporal alanlarda ve parahipokampal girusta) ve doku kaybına bağlı olarak ventrikül genişlemesi gözlemlenmiştir. Elektron mikroskopu ile incelenen bulgularda hücre içine yerleşmiş NFY'ler, hücre dışı yerleşimli SP'ler, granülovaküoler dejenerasyon, nöron ve dolayısıyla sinaps kaybı ve amiloid anjiopatiler bulunmuştur. Bu nedenle AH'nin kesin tanısı ancak nöropatolojik inceleme ile konabilir (Eker et al. 2008).



Şekil 1.3 Hasta Nöronda Görülen SP'ler ve NFY'ler (Chen et al. 2013).

1.5.1. A β Plakları

Amiloid plaklar, Amiloid Prekürsör Protein (APP)'nin α -, β - ve γ - sekretazlarla proteolizi sonucunda oluşmaktadır (Office et al. 2010). APP'nin kesin fizyolojik fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir ancak yapılan çalışmalar sonucunda APP'nin aşırı ifadesinin hücre sağlığı ve büyümesi üzerinde olumlu bir etki gösterdiği belirtilmiştir (O'Brien et al. 2012).

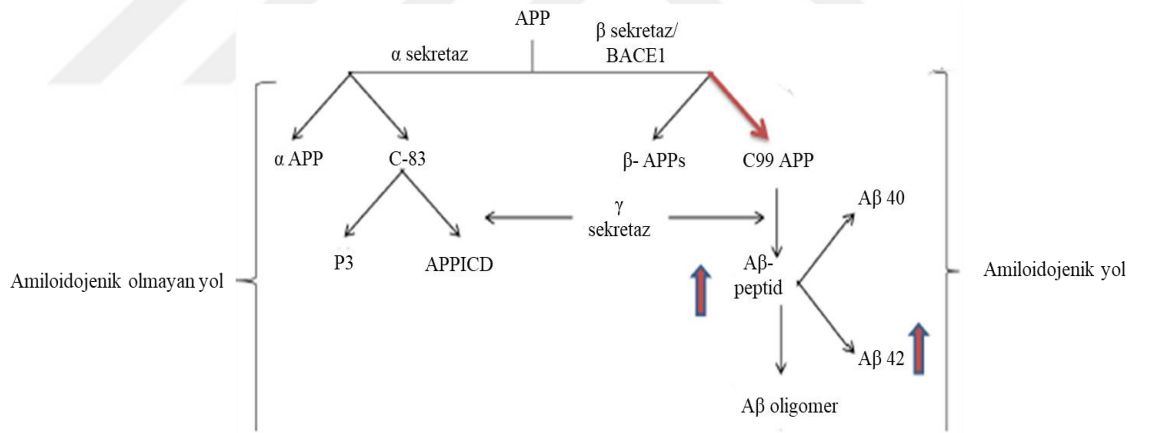
α -sekretaz enzimi APP'yi transmembran bölgesinden 12 aminoasit uzaklıktaki noktadan keser ve α -APPs fragmanı oluşur. Fragman ekstraselüler aralığa salınır. β -sekretaz enzimi ile de, APP amino terminaline 16 aminoasit daha yakın bölgeden kesilir. Bu durumda ise β -APPs oluşur. İkinci kesme işlemi γ -sekretaz tarafından gerçekleştirilir. İlk kesilme α -sekretaz tarafından gerçekleşti ise p3 fragmanı, β -sekretaz tarafından gerçekleşti ise A β peptidi oluşur (Esen et al. 2010).

Amiloid plakların temel bileşeni olan A β peptidlerin beyinde agregasyonu AH'nin nöropatolojik mekanizmasında ana olay olarak kabul edilmiştir (Dominicé et al. 1995). APP iki yol ile metabolize olmaktadır. Bu metabolik yollar amiloidojenik yol ve amiloidojenik olmayan yoldur. Amiloidojenik olmayan yolda α -sekretaz enzimi ile

1. GİRİŞ

APP transmembran bölgesinde 687. pozisyonundan kesilir. Proteinin amino ucunda amiloid prekürsör protein alfa ($APP\alpha$) ve karboksil uca membrana bağlı 83 amino asitlik C terminal α fragmanı (α -CTF) oluşur (Thinakaran et al. 2008). Oluşan bu ürünler toksik değildir. Amiloidojenik yolda ise APP β - ve γ - sekretaz enzimleri tarafından proteoliz edilir ve beyinde nörotoksik agregatlar oluşur (Hooper et al. 2005). APP proteinini önce membrana bağlı bir β -sekretaz enzimi ile kesilir ve proteinin C terminalinde 99 aminoasitlik rezidü (C99) oluşur. Daha sonra γ -sekretaz ile ikinci kesme işlemi gerçekleşir ve transmembran domainine $A\beta$ peptidleri salınır (Cummings et al. 2004). Bu kesimler sonucunda iki varyant ($A\beta 40$ ve $A\beta 42$) meydana gelir. Üretilen $A\beta$ 'nin yaklaşık % 90'ı $A\beta 40$ 'dır ancak $A\beta 42$ toksik agregat oluşturmaya daha eğilimlidir ve amiloid fibrillerinin ana bileşenidir (Lanari et al. 2006) (Şekil 1.4).

Sonuç olarak, $A\beta$ peptidleri kendiliğinden toplanarak oligomere dönüşür, çözünmeyen fibriller β -tabaka konformasyonunu oluşturmak için birleşir ve senil plaklar birikmeye başlar (Sun et al. 2011).



Şekil 1.4 APP İşleme Yollarının Şematik Gösterimi (Kumar et al. 2015).

1.5.2. Nörofibriler yumaklar

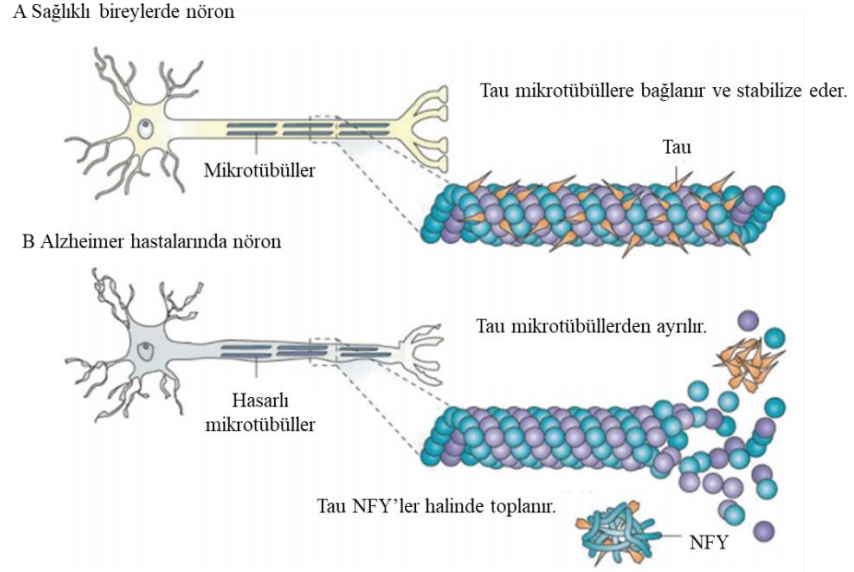
NFY'ler fosforilize tau proteinden oluşmaktadır. Tau 17. kromozom tarafından kodlanan mikrotübül asosiye proteinler (MAP) ailesinden bir proteindir. Tau proteinini mikrotübüllere bağlıdır ve mikrotübüllerin stabile olmasında, hücre iskeletinin bütünlüğünün korunmasında, aksonal iletimde önemli rol oynamaktadır. NFY'ler hücre iskeletinde değişikliğe, aksonal taşımada ve nöronal işlevlerde bozukluğa yol

açmaktadırlar. Belirli bir sürecin sonunda NFY'ler nöronların ölümünü tetiklemektedirler (Eker et al. 2008).

AH'nin bir diğer nedenin de NFY'ler olduğu düşünülmektedir. AH sürecinde tau proteini çok fazla fosforile olmakta ve bu proteinin mikrotübüllere bağlanma kapasitesi azalmaktadır. Bağlanmayan tau proteini, çift sarmallı lifler halinde hücre içine çökerek NFY'leri oluşturmaktadır (Şekil 1.5).

NFY sayıları ve demansın şiddeti arasında bir ilişki olmasına rağmen AH patogenezinde tau'nun kesin rolü hala tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak tau proteininin normal lokalizasyonu ve mikrotübüllerin stabilize edilmesindeki rolü aksonlardaki tau disfonksiyonunun AH'nin gelişmesine önemli ölçüde katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir (Adalbert et al. 2007).

Yapılan araştırmalar sonucunda amiloid fibrilleri ile tau hiperfosforilasyonlarını tetikleyen moleküler sinyal kaskadı arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir. İki ana protein kinazın anormal işlevinin tau fosforilasyonlarında rol oynadığı düşünülmektedir: sikline bağımlı kinaz (Cdk5) ve glikojen sintaz kinaz (GSK3). Cdk5 beyin gelişiminde kritik bir rol oynar ve nörojenez ile ilişkilidir. Ekstraselüler amiloid artışı ile indüklenen bu protein kinazın deregülasyonu, tau hiperfosforilasyonları ile sonuçlanmakta ve böylece nöronal dejenerasyona yol açan bir dizi moleküler olayın tetiklenmesi sağlanmaktadır (Ricardo B. Maccioni et al. 2001).



Şekil 1.5 Sağlıklı Nöronlarda ve AH Bulunan Nöronlarda Tau Proteini (Chen et al. 2013).

1.5.3. Amiloid kaskad hipotezi

Amiloid kaskad hipotezine göre A β plak oluşumu AH patolojisinin başlangıç olayı olarak kabul edilmektedir. Hastalık sürecinin patolojik kaskadı öncelikle amiloid birikimi ile başlamakta daha sonra tau fosforilasyonu gerçekleşmekte ve nöronal ölüm ile sonuçlanmaktadır (Hardy et al. 1991). *APP* geninin 21. kromozomda bulunması ve trizomi 21 (Down Sendromu) hastalarında ilerleyen yaşlarda AH semptomlarının görülmesi bu hipoteze kanıt oluşturmaktadır (Nistor et al. 2007). Ayrıca tau'da NFY gelişmesine neden olan genetik anormalliklerin AH oluşmasına neden olabilecek etkiye sahip olmaması bu hipotezi doğrulamaktadır (Holtzman et al. 2011). Yapılan araştırmalar sonucunda erken başlangıçlı AH' nın tau'dan önce A β anormallikleri ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Buchhave et al. 2012; Prestia et al. 2013; Villemagne et al. 2013; Fagan et al. 2014).

A β , *in vivo* ve *in vitro* olarak oksidatif strese neden olmaktadır (Murakami et al. 2005) ve oksidatif stres, A β üretimini arttırmaktadır (Tamagno et al. 2002). Ayrıca, oksidatif stres toksik A β üretiminde önemli rol oynayan β sekretaz 1 (*BACE1*) geninin ekspresyonunu ve aktivitesini de arttırmaktadır (Tong et al. 2005). A β nedeniyle artan oksidatif stres, tau hiperfosforilasyonunu da uyarak fosfataz ve kinazların işlevsel

bozukluğuna neden olmaktadır (Haass et al. 2007). Yapılan bu çalışmalar da A β ' nin AH nropatolojisinde temel oluşum olduğunu desteklemektedir.

1.6. Alzheimer hastalığının genetik yapısı

AH'nin nedeni kesin olarak anlaşılmamış olsa da hem genetik hem de çevresel faktörlerin hastalığın gelişiminde etkili olduğu ve bu faktörlerin birbiri ile yüksek oranda etkileşimde olduğu düşünülmektedir (Bird et al. 1993). Yapılan alışmaları sonucunda hastalığın genetik kalıtımının %49-%79 oranında olduğu bulunmuştur (Wilson et al. 2011). Genetik açıdan bakıldığında Alzheimer hastalığı, ailesel form ve sporadik form olmak üzere iki temel başlıkta incelenebilir.

1.6.1. Ailesel alzheimer hastalığı

Bir ailenin birkaç yesi 65 yaştan önce AH vakası olarak teşhis edilirse, erken başlangıçlı ailevi AH (EBAAH) olarak adlandırılır. Ailesel Alzheimer hastalığı erken yaşlarda başlayan otozomal dominant bir bozukluktur. Tüm AH'nin % 1 -% 6'sına tekabül eden erken başlangıçlı AH vakalarının yaklaşık % 60'ı aileseldir (Campion et al. 1999). Hastalığın ailesel formuna neden olan ilk mutasyon 21. kromozomda bulunan *APP* geninde tanımlanmıştır (Goate et al. 1991).

APP genine ek olarak presenilin 1 (*PSEN1*) ve presenilin 2 (*PSEN2*) genlerindeki mutasyonlar da ailesel hastalığın çoğu vakasını oluşurmaktadır (Kaj Blennow et al. 2006). EBAAH' de 30'dan fazla *APP* geninde, 179 tane *PSEN1* geninde ve 14 tane *PSEN2* geninde mutasyon keşfedilmiştir (O'Brien et al. 2011). *PSEN1* geni 14. Kromozom ve *PSEN2* geni 1. kromozom üzerinde bulunmaktadır ve *PSEN2* genindeki mutasyonlar nadir olsa da *PSEN1* genindeki mutasyonlar EBAAH'de çok sık gözlemlenmektedir. EBAAH'nin yaklaşık % 2-3'ünün *APP* geni mutasyonuna, % 20'sinin *PSEN2* geni mutasyonuna ve % 70-80'inin ise *PSEN1* geni mutasyonuna bağlı olarak ortaya çıktığı bildirilmiştir (Edelberg et al. 1996; Gilman et al. 1997). *PSEN1* ve *PSEN2* proteinleri integral membran proteini olan γ -sekretaz ile kompleks oluşurmaktadırlar (Vetrivel et al. 2006). *PSEN1* ve *PSEN2* genlerindeki mutasyonlar, γ -sekretazın proteolitik aktivitesini değiştirir ve A β 42 miktarının A β 40'a oranla daha fazla

olmasına neden olur (Cruts et al. 1998). AH ile ilişkili bu mutasyonlar otozomal dominanttır ve bu nedenle tek bir alleldeki mutasyon AH'nin erken yaşlarda gelişmesi için yeterli olacaktır. Ayrıca *PSEN1* ve *PSEN2* genlerinin, mutasyonlar sonucu fonksiyonlarını tamamen kaybetmeleri halinde ciddi rahatsızlıklar oluşabileceği fakat bu fonksiyon kaybının nörodejenerasyon veya AH ile hiçbir ilişkisi olmadığı bulunmuştur (Wang et al. 2010).

Bununla birlikte, hastalığın ailesel formu verilen bu üç genden ayrı başka genlerin mutasyonu sonucunda da oluşmaktadır aynı zamanda bu form çok düşük bir prevalansa sahiptir ve AH genellikle 65 yaşından sonra ortaya çıkmaktadır (Harvey et al. 2003).

1.6.2. Sporadik alzheimer hastalığı

Klinik olarak, AH 65 yaşından sonra başlamakta ve AH'nin oranı yaşla birlikte artmaktadır. Bu vakalara genellikle “sporadik” veya “geç başlangıçlı” AH (GBAH) denilmektedir. Bu AH formu tüm vakaların yaklaşık % 99'unu oluşturmaktadır ve belirli genlerdeki mutasyonlar EBAAH genetiğine ek olarak GBAH gelişimi için de risk oluşturmaktadır (Holtzman et al. 2011).

Apolipoprotein E (*APOE*), lipoprotein partiküllerinin lipidler ve kolesteroller ile taşınmalarına aracılık etmekte (Shi et al. 2018) ve ayrıca beyinde *APOE* en bol üretilen apolipoprotein olup esas olarak astrositler ve daha az olarak mikroglia tarafından sentezlenmektedir (Boyles et al. 1985; Uchihara et al. 1995).

APOE geni, GBAH için en güçlü risk faktörüdür (Karch et al. 2015) ve *APOE*'nin üç alleli bulunmaktadır ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$). *APOE* allellerinin varlığı GBAH gelişmesine neden olmaktadır (Corder et al. 1993; Strittmatter et al. 1993) çünkü $\epsilon 4$ 'ün bir kopyası AH riskini 3 kat, iki kopyası ise AH riskini 12 kat arttırmaktadır (<http://www.alzgene.org/> n.d.). $\epsilon 4$ 'ün Alzheimer hastalarında miktarının artması, erken dönemdeki Alzheimer hastalarına göre beyinde daha ağır amiloid β plak yükü, daha büyük beyin atrofisi ve daha hızlı hastalık progresyonu göstermelerine neden olmaktadır (Schmechel et al. 1993; Agosta et al. 2009). Öte yandan, ApoE, A β birikimi için gereklidir, bu da muhtemelen *APOE*'nin bir patolojik şaperon gibi davranarak A β fibrillizasyonunu ve plak oluşumunu teşvik

ettiğini göstermektedir (Holtzman et al. 2000). Sonuç olarak *APOE* ϵ 4 allelinin, sporadik Alzheimer hastalığındaki genetik riski yüksektir ve diğer genlerin katkısı muhtemelen daha azdır (Raber et al. 2004). Çünkü GBAH homojen bir hastalık değildir ve hastalıkla ilişkili her bir gen çevresel faktörlerle de karmaşık bir etkileşim içindedir.

Yapılan çalışmalarda, spesifik olarak hücrelerden tümör nekroz faktörü α (*TNF α*) salınımını sağlayan bir metalloproteinaz disintegrin proteini (*ADAM*) tanımlanmıştır (Black et al. 1997; Moss et al. 1997). Bu enzim, bir metaloproteaz ve disintegrin domaini, sisteince zengin bir bölge ve epidermal büyüme faktör tekrarı dahil olmak üzere birkaç farklı protein domaininden oluşan membrana bağlı bir glikoprotein ailesine aittir. *ADAM* ailesinin üyeleri hücre füzyonu dahil olmak üzere birçok hücre etkileşim olayında rol almaktadır (Yagami-Hiromasa et al. 1995). *ADAM9*, *ADAM10* ve *ADAM17* dahil olmak üzere birçok *ADAM* ailesi proteazının, *in vitro* koşullarda α -sekretaz aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca yeni kanıtlar *ADAM10* geninin fare beynindeki APP'nin kesilmesinden başlıca sorumlu enzim alfa sekretaz olduğunu göstermektedir (Postina et al. 2004; Jorissen et al. 2010; Kuhn et al. 2010). Bununla birlikte *ADAM10* genin çeşitli varyantlarının *in vitro* A β seviyesini arttırdığı ve α -sekretaz enziminin aktivitesini bozarak APP işlenmesini amiloidojenik yola doğru kaydıracağı belirtilmiştir. Bu nedenle *ADAM10* genin de hem EBAAH hem de GBAH gelişmesine neden olabileceği düşünülmektedir (Karch et al. 2015).

1.7. Alzheimer hastalığında etkili risk faktörleri

AH için yaş, genetik faktörler ve kafa travması potansiyel risk faktörleridir ve bu konu hakkında birçok çalışma mevcuttur. Eğitim, meslek ve zihinsel faaliyetlerin (Valenzuela et al. 2006), fiziksel aktivite ve egzersizlerin (Hamer et al. 2009), orta yaştaki şişmanlığın (Beydoun et al. 2008), alkol alınımının (Anstey et al. 2009), sigara içmenin (Lee et al. 2010) ve Down Sendromu'nun AH için en önemli risk faktörlerinden olduğuna dair önemli kanıtlar vardır. Ayrıca inme (Savva et al. 2010), diyabet (Lu et al. 2009), hipertansiyon (Qiu et al. 2005) ve hiperkolesterol (Anstey et al. 2008) gibi tedavi edilebilir hastalıkların da AH riskini arttırdığı bulunmuştur (Çizelge 1.1).

1. GİRİŞ

Oksidatif stresin de, AH ve vasküler demans etiyolojisinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Antioksidan desteği (E vitamini, C vitamini veya β karoten gibi) yoluyla oksidatif stresin azaltılması demans riskini düşürmek için potansiyel bir önleyici olmasına rağmen diyet veya ek antioksidan vitaminlerin ilerlemekte olan demansa karşı koruma sağlayıp sağlamadığı tam olarak bulunamamıştır (Gray et al. 2008). Epidemiyolojik çalışmalarda antioksidanlar ya da B vitaminleri ile demans riski arasındaki ilişki araştırılmıştır ama bu konu henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Laurin et al. 2004).

Çizelge 1.1 AH İçin Muhtemel Risk Faktörleri.

Atrial fibrilasyon	Alkol alışkanlığı
Cinsiyet	Diyabet
Depresyon	B12 vitamin eksikliği
Down sendromu	Antioksidan düzeyi
Düşük eğitim seviyesi	Aile öyküsü
Folat eksikliği	Menopoz
Genetik faktörler	Hiperkolesterolemi
Hipotiroidizm	Herpes Virüsü (Balin et al. 2018)
İleri yaş	Hipertansiyon
Kafa travması	Enfeksiyon

1.8. Alzheimer Hastalığının Tanı ve Tedavisi

AH tanısı için en yaygın olarak kullanılan klinik kriterler Diagnostik ve İstatistik El Kitabı, Dördüncü Revizyon (DSM-IV) (Carmassi et al. 2013) veya Ulusal Nörolojik, İletişimsel Bozukluklar ve İnme/Alzheimer Hastalığı ve İlişkili Hastalıklar Derneği çalışma grubu (McKhann et al. 1984) tarafından belirlenmiştir. Alzheimer tipinin demansı için bu kurumların kriterleri, afazi, apraksi, agnozi veya yönetici işlev bozukluğu gibi bir veya daha fazla bilişsel alanın bozulması ile birlikte bellek kaybı gelişimini içermektedir.

Amerikan Nöroloji Akademisi, parametrelerin güvenilir olması için bilişsel bozuklukların aşamalı olarak ilerlemesi, fonksiyonel yetenekleri bozmaya yetecek kadar şiddetli olması ve diğer nörolojik veya psikiyatrik rahatsızlıklarla açıklanamaz olması gerektiğini vurgulamıştır (Knopman et al. 2001). Demans tanısı koymak için hastayı iyi bir şekilde tanıyan bir yakınının gözlemlerini almak önemlidir çünkü hastanın günlük yaşam aktivitelerini gerçekleştirme becerisindeki değişikliklerle ilgili basit sorgulama, bilişsel bozukluğun ciddiyetinin değerli bir göstergesidir. Muhtemel AH tanısı bilgisayarlı tomografi (BT), manyetik rezonans (MR) görüntüleme, pozitron emisyon tomografi (PET) ya da tek foton emisyon tomografi (SPECT) gibi çeşitli görüntüleme yöntemlerinden yararlanılarak konulabilir (Kelley et al. 2007) fakat kesin tanı biyopsi ya da otopsiyle elde edilen histopatolojik kanıtlar ile konulmaktadır.

AH'nin kesin tedavisi henüz bulunmamaktadır ve uygulanan tedaviler hastalığın belirtilerini ortadan kaldırmaya yöneliktir. Kolinerjik sistemdeki azalma ve glutamat toksisitesinin artışı sonucunda oluşan geri dönüşümsüz nöron kaybı hastalığın ana sorunudur. Bu nedenle AH'nin tedavisi için kullanılan ilaçlar iki temel mekanizma ile etki göstermektedirler. Bu ilaçlar ya hastaların beyinde zayıflamış olan kolinerjik nörotransmisyonu güçlendirmekte ya da artmış olan glutaminerjik nörotransmisyonu azaltmaktadırlar (Lleó et al. 2006; Bassil et al. 2009).

1.8.1. Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan antikolinerjik ilaçlar

Bazal önbeyinde kolinerjik nöronların dejenerasyonunun ve serebral kortekste kolinerjik nörotransmisyonun kaybedilmesinin, AH vakalarında görülen bilişsel işlevdeki bozulmaya önemli ölçüde katkıda bulunduğu yapılan çalışmalar sonucunda gösterilmiştir (Bartus et al. 1982) ve böylece kolinerjik hipotezi oluşturulmuştur. Bu hipoteze göre, kolinerjik (Parasempatik) sistemde, ileti aktarımından, bellek ve öğrenmeden sorumlu önemli bir nörotransmitter olan asetilkolinin (ACh) düşük seviyelerinin Alzheimer hastalığına neden olduğu düşünülmektedir (Harel et al. 1992). Kalp kasında ve düz kaslarda bulunan muskarinik reseptörler ile iskelet kaslarında ve nöronlar arasındaki sinapslarda bulunan nikotinik reseptörler, kolinerjik reseptör gruplarıdır. Asetilkolin bu kolinerjik reseptörlerden ayrıldığı zaman ACh'yi hidroliz eden ve kolinerjik sinaptik iletimi sonlandıran bir hidrolaz olan asetilkolinesteraz enzimi (AChE) tarafından hızlıca

1. GİRİŞ

hidroliz edilir (Savini et al. 2003). Alzheimer hastalığında, kolinerjik sistemle ilgili nörotransmisyon yetmezliği, hastalığın tedavisi için hedefleri oluşturmaktadır. Bu kolinerjik yetmezlik sonucunda amiloid plakların ve nörofibriler yumakların meydana geldiği belirtilmektedir. Bu nedenle kolinesteraz inhibitörleri sentezlenmiştir ve asetilkolinin intrasınaptik yıkımının geciktirilmesi ve etkisinin uzatılması hedeflenmiştir (Cankurtaran et al. 2002). Yapılan çalışmalarda ayrıca beyinde bulunan başka bir kolinesteraz olan butirilkolinesterazın (BuChE) da ACh'nin hidrolizinden sorumlu olduğu ve bu enzimin inhibisyonunun AH'de kolinerjik iletimi daha da arttırabileceği gösterilmiştir (Mesulam et al. 2002; Eskander et al. 2005). Bu nedenle, asetilkolinesteraz inhibitörleri (AChEIs) ve butirilkolinesteraz inhibitörlerinin (BuChEIs) kullanımı AH'nin tedavisi için temel oluşturmuştur (M.-M. Mesulam et al. 2002).

AChEIs hafif ve orta derecede Alzheimer hastalığının tedavisi için ilk kullanılan ajanlardır. Bu ilaçlar kolinerjik sinapslardaki ACh miktarlarını yükselterek kolinerjik nörotransmisyonu güçlendirmektedirler (Friedlander et al. 2006). Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onayı almış, AH'nin tedavisinde kullanılan takrin, donepezil, rivastigmin ve galantamin ilaçları AChEIs'dir (Bassil et al. 2009).

1.8.2. Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan glutamat antagonistleri

Glutamat, glutamik asidin anyonudur ve sinir sisteminde nörotransmitter olarak görev almaktadır. Bir sinir hücresinin başka hücrelere sinyal olarak gönderdiği kimyasallardan biridir. Omurgalı sinir sistemi içerisinde en fazla bulunan nörotransmitterdir (Meldrum et al. 2000). Glutamat biyokimyasal reseptörleri, α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolpropionik asit (AMPA) reseptörleri, N-metil-d-aspartat (NMDA) reseptörleri ve metabolik glutamat reseptörleri olarak üç ana sınıfa ayrılmaktadır. AMPA reseptörleri, çabuk uyarma için uzmanlaşmış iyonotropik reseptörlerdir ve pek çok sinapsta uyarıldıktan çok kısa süre sonra uyarıcı elektriksel yanıt üretmektedirler. NMDA reseptörleri de iyonotropiktir, ama onlar AMPA reseptörlerinden farklı olarak aktive olduklarında kalsiyum geçirgenlerdir. Onların bu özellikleri bilhassa öğrenme ve bellekte onları önemli kılmaktadır. Metabotropik reseptörler ikinci haberci sistemleri ile çalışmaktadırlar ve hedefleri üzerinde yavaş ve sürekli etki oluşturmaktadırlar.

1. GİRİŞ

Sinaptik plastisitedeki rolü sebebiyle glutamat beyinde öğrenme ve hafıza gibi bilişsel işlevlerde görev almakta ve ayrıca glutamat, beyin gelişimi sırasında büyüme konileri ve sinaptogenezin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Mcentee et al. 1993). Ayrıca glutamaterjik nöronlar, beyindeki uyarıcı sistemi oluşturmakta ve birçok fizyolojik fonksiyonda yer almaktadırlar. (Parsons et al. 2017).

Glutamat taşıyıcıları, nöronal ve gliyal membranlarda bulunurlar ve glutamatu hızlıca ekstrasellüler alana aktarmaktadırlar (Shigeri et al. 2004). Beyin yaralanmaları veya hastalıklarında, genelde ters çalışmaktadırlar ve bu nedenle aşırı glutamat hücre dışında birikmektedir. Bu işlem, kalsiyum (Ca^{+2}) iyonlarının NMDA reseptör kanalları vasıtasıyla hücre içine girmesine, sinir hasarına ve sonucunda hücre ölümüne sebebiyet vermektedir.

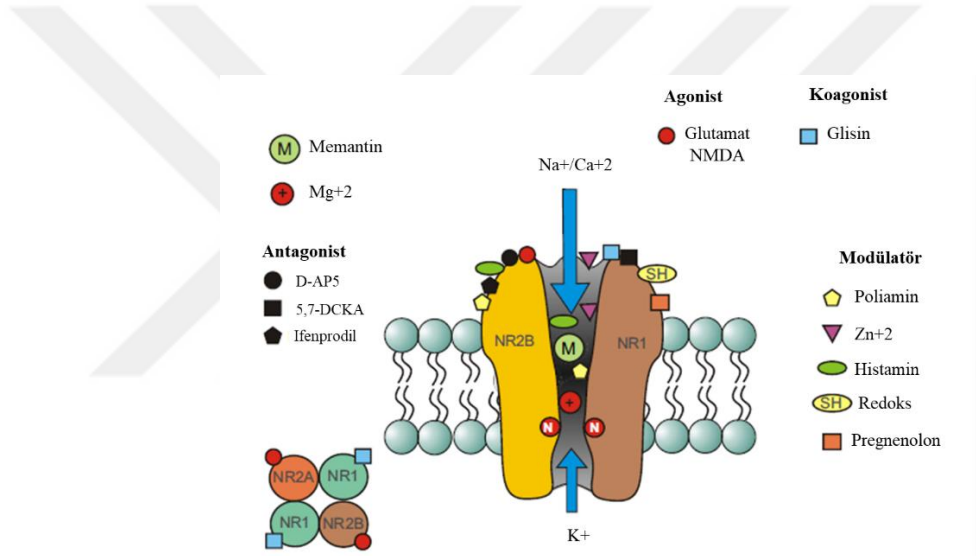
Glutamaterjik aşırı uyarım, eksitotoksisite olarak adlandırılan nöronal hasara yol açmaktadır. Eksitotoksisite, NMDA reseptörleri nedeniyle, reseptörle ilişkili iyon kanalı üzerinden aşırı Ca^{+2} akışına izin verdiği için ortaya çıkmaktadır (Lipton et al. 2006). Bu eksitotoksisite, nöronal Ca^{+2} aşırı yüklenmesine yol açmakta ve nörodejeneratif hastalıklara neden olmaktadır (Epstein et al. 1994). Ayrıca aşırı glutamat salınımı ve bozulmuş geri alım nedeniyle oluşan eksitotoksisite iskemik kaskadın bir parçası olarak meydana gelmektedir ve inme, otizm, amiyotrofik lateral skleroz, latirizm ve Alzheimer hastalığı (Hynd et al. 2004) gibi bazı hastalıklarla ilişkilendirilmektedir. Bu nedenle NMDA reseptör antagonisti olan ve FDA tarafından onaylanan memantin, Alzheimer hastalığının tedavisinde önemli bir değere sahip olabilmektedir (Danysz et al. 2000).

NMDA reseptörleri, sinaptik iletimde önemli rolleri olan ligand bağımlı katyon kanallarıdır (Dalmau et al. 2008). Reseptörler, glisin bağlayan NR1 altbirimleri ve glutamat bağlayan NR2 altbirimlerinin heteromerleridir. NR1 ve NR2, farklı farmakolojik özellikleri, lokalizasyonu ve hücre içi habercilerle etkileşime girme kabiliyetine sahip reseptör alt türleri oluşturmak için kombinasyon yapmaktadırlar (Waxman et al. 2005). NR2 dört alt grup içermektedir: NR2A, NR2B, NR2C, NR2D. NMDA reseptörü ise altı bölgeden oluşmaktadır (McMillian et al. 1990; Scatton et al. 1991; Wong et al. 1991) (Şekil 1.6) ;

1. GİRİŞ

1. Katyon bağlanma bölgesi
2. NMDA ve diğer agonist tanıma bölgesi
3. Poliamin bağlanma bölgesi
4. Çinko bağlanma bölgesi
5. Glisin bağlanma bölgesi
6. Kanal antagonist bağlanma bölgesi

Eksitotoksisiteye neden olan NMDA reseptörlerinin, aşırı aktivitesinin epilepsi, demans ve inmeye neden olan mekanizmaların temelinde olduğu ve düşük aktivitesinin ise şizofreni semptomlarını ortaya çıkardığı düşünülmektedir (Coyle et al. 2006; Lau et al. 2007).



Şekil 1.6 NMDA Reseptörlerinin Topoloji ve Farmakolojik Tanıma Alanlarının Şematik Gösterimi (Parsons et al. 2007).

1.9. Alüminyum ile İndüklenen Alzheimer Rat Modelleri

Alüminyum (Al) çevrede en yaygın bulunan toksik metaldir ve günümüzde birçok ürünün üretiminde kullanılmaktadır. Al'nin insan vücudunda bilinen herhangi bir fizyolojik rolü olmamasına rağmen, vücuttaki diğer yararlı iyonların düzenlenmesini değiştirmektedir ve proteinlerin veya lipidlerin çeşitli yapısal ve fonksiyonel değişikliklerine neden olmaktadır (Lin et al. 2008; Kawahara et al. 2011). Al kaynaklı nörodejenerasyonda çeşitli mekanizmalar yer almıştır. Genel olarak Al;

- Vücuttaki metallerin veya iyonların homeostazisinin değişmesine
- Reaktif oksijen türlerinin üretiminin hızlanmasına
- İnflamatuar sitokinlerin harekete geçmesine
- Oksidatif strese
- Apoptoza
- Kolinerjik aktivitenin disfonksiyonuna
- Glutamat taşıyıcılarının bozulmasına
- Glutamat eksitotoksitesine
- Mitokondriyal disfonksiyona
- Mikroglial aktivasyona
- Protein agregasyonuna
- Nörofibriler yumak oluşumuna
- Hipokampusta prostaglandin A1 ve tromboksan A2'de artışa neden olmaktadır (Maya et al. 2018).

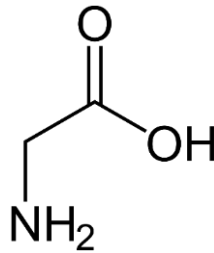
Al maruziyeti son derece yüksek olduğunda Al toksisitesi oluşmakta (Han et al. 2013; Nampoothiri et al. 2015) ve Al birikiminin, bunama, yaşlılık kaynaklı demans ve AH gibi çeşitli nörolojik bozukluklarla ilişkili olduğu belirtilmektedir. AH olan hastaların beynindeki nöronları taşıyan hem senil plaklarda hem de nörofibriler yumaklarda alüminyum tespit edilmiştir (Abd El-Rahman et al. 2003) ve bu da Al' ye maruz kalmanın hastalığın nedenselleşmesinde önemli olabileceğini düşündürmektedir.

Öğrenme ve hafıza dahil olmak üzere birçok fizyolojik sistemler ratlarda çok kapsamlı olarak incelendiği için bu hayvanlar diğer model organizmalara göre biliş ve hafıza çalışmalarında daha fazla kullanılmaktadırlar. Ratlar, farelerden daha zekidirler ve bilişsel bir araştırma için gerekli olan çok çeşitli görevleri öğrenebilmektedirler (Iannaccone et al. 2009). Ayrıca yapılan çalışmalarda Al'nin deneysel hayvanlara intraserebral olarak verilmesinin, nörofibriler dejenerasyona ve AH hastalarının NFY'lerinde bulunan yapılara benzer NFY oluşumu olduğu gösterilmiştir (Kawahara et al. 2011). Bu nedenlerden dolayı Al indüklemesi ile oluşturulan modellerde genellikle ratlar kullanılmaktadır.

Çalışmalar da Al'ye maruz kalan ratların, beyinlerinin çeşitli bölgelerinde 5-hidroksitriptamin ve onun metaboliti olan 5-hidroksindol asetik asit seviyesinin arttığı gösterilmiştir (Kumar et al. 2002). Al maruziyeti ratlarda çeşitli enzimleri inhibe ederek oksitadif stresi arttırmaktadır (Stevanović et al. 2009; Majumdar et al. 2014). Al ayrıca rat beyninin tüm bölgelerinde glutatyon, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, Na⁺ K⁺ ATPaz ve Mg⁺² ATPaz seviyesini azaltmakta, lipid peroksidasyon seviyesini ve alkalın fosfataz, asit fosfataz, alanin transaminaz ve aspartat transaminaz aktivitelerini arttırmaktadır (Sumathi et al. 2015). Beyindeki aşırı Al birikimi β-amiloid proteininin agregasyonuna ve asetilkolinesteraz aktivitesinin artmasına neden olmakta böylece hayvanların davranış ve uzun süreli bellekleri değişmektedir. Bu nedenle Al rat beyninde nörotoksisite ve serebral hasara yol açmaktadır (Kuroda et al. 1994; Lin et al. 2015). Al ile indüklenerek oluşturulan modellerin beyin yapısında meydana gelen bu değişiklikler, AH'li beyin patofizyolojisini taklit ettiği için AH çalışmalarında önemli bir yer kaplamaktadır.

1.10. Sarkozin

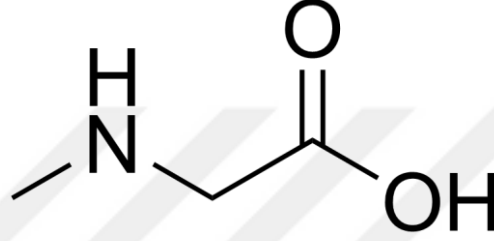
Glisin, glutamat ile birlikte bir agonist gibi davranmaktadır ve NMDA kanal aktivasyonu için mutlak gerekmektedir. Glisin, MSS' de, özellikle omurilikte ve beyin sapında önemli bir nörotransmitter olarak rol oynamaktadır (Socala et al. 2010) (Şekil 1.7). Sinapslar içindeki glisin konsantrasyonu, esas olarak glisin taşıyıcıları (GlyT) içeren hızlı bir geri alım mekanizması ile etkili bir şekilde düzenlenmektedir ve GlyT tip 1 (GlyT1) ve GlyT tip 2 (GlyT2) olmak üzere iki tip GlyT tanımlanmaktadır (Lechner et al. 2006). GlyT1, NMDA reseptörleri ile lokalize olmaktadır ve NMDA reseptörlerinin işlevlerini modüle etmektedir (Smith et al. 1992).



Şekil 1.7 Glisin'in Yapısı

1. GİRİŞ

Sarkozin, glisin-N-metil türevidir (Şekil 1.8) ve glikozin dehidrojenaz enzimi tarafından glisin metabolize olurken, glisin-N-metil-transferaz enzimi glisinden sarkozin üretir. Yani glisinin sentezinde ve bozunmasında bir yan üründür. Sarkozin, kaslarda ve diğer vücut dokularında bulunan doğal bir amino asittir. Sarkozin, sinaptik boşluk içindeki glisin konsantrasyonunu arttıran, NMDA reseptör fonksiyonunu güçlendiren ve doğal olarak oluşan bir GlyT1 inhibitörüdür (Lechner et al. 2006). Sarkozin, NMDA reseptör fonksiyonunu artırabilmekte ve aynı anda nöbet eşiğini azaltarak antipsikotik etkiye neden olabilmektedir. Sarkozin tarafından sinapslarda glisin birikmesi, beynin bazı bölgelerinde nörotransmisyonu güçlendirebilmektedir (Socafá et al. 2010).



Şekil 1.8 Sarkozin'in Yapısı

Bahsedilen literatür bilgilerinden hareketle bu tez çalışmasında alüminyum klorür ($AlCl_3$) ile indüklenen AH deneysel hayvan modelinde nöroprotektif etkiye sahip olduğu düşünülen sarkozin aminoasitinin bu koruyucu potansiyeli *in vitro* sitotoksisite testleri ile, *in vivo* ortamda ise biyokimyasal, hematolojik, histopatolojik ve moleküler genetik parametreler ile ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu sayede henüz kesin bir tedavisi bulunamayan AH için yeni bir terapötik yaklaşım hedeflenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Li et al. (2017)' e göre ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) dünya çapında en yaygın kullanılan bitkisel ilaçlardan biridir ve yaptıkları çalışmada, ginseng proteininin (GP) nöroprotektif etkilerini ve AH'nin hücrel ve hayvan modelindeki olası mekanizmalarını değerlendirmişlerdir. GP'nin, hücrelerde hidrojen peroksit (H₂O₂) tarafından indüklenen Alzheimer benzeri patofizyolojik değişiklikleri veya hayvanlarda D-gal / Al tarafından indüklenenleri önemli ölçüde inhibe ettiğini göstermişlerdir. Sonuçlarda, GP' nin (10-100 ug / mL) nöronların hayatta kalma oranını önemli ölçüde geliştirdiğini ve hücrelerin apoptozunu, kaspaz-3 ve Bax / Bcl-2'nin mRNA ekspresyonunu azalttığını belirtmişlerdir.

Zaky et al (2017), yaptıkları çalışmada, alüminyum kaynaklı nöroinflamasyonun azaltılması için resveratrol ve kurkumin kombinasyonunun yararlı etkisini araştırmışlardır. Hem in vivo alüminyum kaynaklı nöroinflamasyon modelini hem de in vitro alüminyum uyarılmış kültürlenmiş PC-12 hücrelerini kullanmışlardır. Nörokoruyucu Apuridik / apuridik endonükleaz 1 (APE1) protein ve let-7c mikroRNA'nın ekspresyon profillerini ölçmüşlerdir. Resveratrol-kurkumin uygulanmış ratlarda, enflamatuar markerların genel olarak anlamlı bir zayıflaması ve amiloidojenik mediyatörlerde bir azalma gözlemlenmiştir. APE1, resveratrol-kurkumin kombinasyonu ile önemli ölçüde uyarılmış, hem in vivo hem de in vitro çalışmalar, Let-7c ifadesinin, Al stimülasyonundan sonra önemli ölçüde azaldığını göstermişlerdir. Bu, resveratrol veya kurkumin'in birlikte eklenmesiyle kısmen bastırılmış ve bunların kombinasyonu ile tamamen normal seviyeye getirilmiştir. Bu çalışmada, bir resveratrol-kurkumin kombinasyonunun sinerjistik ve terapötik etkisini açıkça göstermişlerdir. Ayrıca, her iki bileşiğin de, Al kaynaklı nöroinflamasyona karşı kooperatif olarak veya farklı moleküler mekanizmalar yoluyla yararlı etki gösterdiklerini açıklamışlardır.

Gupta et al. (2017), yaptıkları çalışmada Çin tıbbında *Morus alba* nöroprotektif bir bitki olarak kullanılmaktadır ve bu çalışmada ratlarda koruyucu etkisinin biyokimyasal mekanizmasının yanı sıra, AlCl₃ ile indüklenen hafıza bozukluğuna karşı morusin iyileştirici etkisini keşfetmeyi amaçlamışlardır. Deney hayvanlarında bellek kaybını AlCl₃ (100 mg / kg; p.o.) ile indüklemişlerdir. Öğrenme ve hafıza aktivitesi

Morris su labirent test modelini kullanılarak ölçmüşlerdir. Santral kolinerjik aktivite, beyin AChE aktivitesinin ölçümü ile değerlendirilmiş ve ek olarak, beyin tiyobarbitürik asit-reaktif türlerin (TBARS) ve glutasyon (GSH) düzeylerinin saptanmasıyla oksidatif stresi gözlemlemişlerdir. Sonuçta morusin ile tedavi (5.0 ve 10.0 mg / kg, oral yoldan), AlCl₃'ün neden olduğu AChE aktivitesinde ve beyin oksidatif stres seviyelerinde azalma olmasını sağlamıştır. Bu nedenle morusin, çeşitli aktiviteleri ile farelerin belleklerinde koruyucu bir etkisi olduğu sonucuna varılabilir.

Nampoothiri et al. (2017), kemirgenlerde insülinin ve bunun glikoz ile kombinasyonunun AlCl₃ ile indüklenmiş bilişsel işlev bozukluğu modelinde koruyucu rolünün değerlendirilmesini amaçladıkları bu çalışmada erkek Wistar ratlar 60 gün boyunca AlCl₃'e (oral olarak 175 mg / kg) maruz bırakmış ve insülini (0.5 IU / kg), glikoz (200 mg / kg) ve rivastigmin (1 mg / kg) ile kombinasyon halinde, 60 gün boyunca AlCl₃ uygulamasından 45 dakika önce intraperitoneal olarak uygulamışlardır. Hafıza testleri Morris su-labirent testi kullanılarak değerlendirmişler, 60 günlük tedaviden sonra hipokampus ve frontal korteksi toplayarak asetilkolinesteraz aktivitesi ve antioksidan enzim seviyesi için analiz etmişlerdir. Ayrıca kan glikoz seviyelerine de bakmışlardır. Standart ilaçla tedavi, rivastigmin (1 mg / kg), AlCl₃ ile tedavi edilen gruba kıyasla moris su labirentinde hedef kadranda harcanan süreyi artırmıştır ama insülin ve bunun glikoz ile kombinasyonu, Al'ye maruz bırakılan ratlarda davranış bozukluklarını inhibe edemediğini gözlemlemişlerdir. Ayrıca tek başına insülin ve glikoz ile kombinasyonunun, hipokampus ve frontal korteks bölgelerinde Al kaynaklı oksidatif stres ve bozulmuş kolinerjik iletimi engelleyemediğini belirtmişlerdir. Çalışma, hipokampusta ve frontal kortekste çevresel toksinin (AlCl₃) neden olduğu bilişsel işlev bozukluğuna karşı insülin uygulamasının koruyuculuğunun yetersizliğini göstermektedir.

Singh et al. (2018), ise bu çalışmalarında, epigallokatekin-gallat (EGCG) yüklü nanoparçacıkların AlCl₃ ile oluşturulan AH'li ratlarda nörodavranış ve patolojik değişikliklere karşı nöroprotektif rolünün değerlendirilmesini amaçlamışlardır. 100 mg / kg vücut ağırlığı olan ratlara, AlCl₃'ü 60 gün boyunca oral yoldan vermişler ve bunun ardından 30 gün boyunca 10 mg / kg vücut ağırlığı olan ratlara EGCG ve nanoEGCG tedavisi uygulamışlardır. Ratların nörodavranışsal değerlendirmesi için Morris su labirenti, açık alan ve yeni nesne tanıma testlerini kullanmışlardır. Rat beynindeki korteks ve hipokampusun histopatolojik değerlendirmesini izlemişlerdir ve daha fazla doğrulama

için biyokimyasal, immünohistokimya ve western blot testlerini gerçekleştirmişlerdir. Al maruziyeti olan ratlarda, açık alandaki keşif ve motor aktivitelerinin, Morris su labirentinde ve yeni nesne tanıma testlerinde hafıza ve öğrenme eğrisinin önemli ölçüde azalmış olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu nörodavranış bozuklukların, nanoEGCG ile tedavi edilen ratlarda ise önemli ölçüde zayıflatıldığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca $AlCl_3$ 'ün indüklediği rat beyinlerinin korteks ve hipokampusünün histopatolojik değerlendirmesi hem nevritik plakların hem de nörofibriler yumakların varlığını göstermiş ama NanoEGCG ile tedavi edilen sıçanlarda bu patolojinin olmadığını belirtmişlerdir. $AlCl_3$ ile indüklenen sıçanlarda biyokimyasal, immünohistokimyasal ve protein düzeylerinde anlamlı artışlar kaydedilmiş fakat bu seviyeler nanoEGCG ile tedavi edilen sıçanlarda büyük ölçüde azalmış olduğunu gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak, bu çalışma EGCG nanopartiküllerinin hafıza kaybını, nöritik plak ve nörofibriler yumak oluşumunu tersine çevirebileceği hipotezini güçlendirmektedir.

Alghamdi et al. (2018), yaptıkları deneysel çalışmada, işlenmemiş hindistancevizi yağı (VCO) antioksidan ve anti-inflamatuar doğal bileşik olarak iyi bilinir olduğundan, VCO'nun ratlarda $AlCl_3$ ile indüklenen AH üzerindeki olası koruyucu etkisini değerlendirmişlerdir. 45 gün boyunca (40 ml / kg / gün) $AlCl_3$ intraperitoneal enjeksiyon ile AH modelini indüklemişlerdir ve $AlCl_3$ uygulamasından önce VCO'yu oral yoldan vermişlerdir (30 gün boyunca günde 5 ml). VCO, hem hipokampus hem de kortekste GSH düzeyini önemli ölçüde arttırdığını ve VCO içermeyen bir $AlCl_3$ ile indüklenen AH rat modeline kıyasla $AlCl_3$ ile indüklenen AH rat modelinin korteksinde malondialdehit (MDA) seviyesini önemli ölçüde azaldığını gözlemlemişlerdir. Bu veriler ışığında VCO'nun, AH modelinde hafıza geliştirme, anti eksitotoksisite ve antioksidanlar için potansiyel koruyucu bir etkiye sahip olduğu sonucuna varmışlardır.

Chiroma et al. (2018), yaptıkları biyodenedeyde farklı dozlarda D-galaktoz ve $AlCl_3$ etkilerini karşılaştırarak kognitif bozukluğu olan bir hayvan modelini ortaya çıkarmak istemişlerdir. Erkek albino wistar ratlara 60 mg / kg.başında intra peritoneal (İP) enjekte edilmiş ve $AlCl_3$ (100, 200 veya 300 mg / kg.bwt.) oral yoldan 10 hafta üst üste günde bir kez uygulamıştır. Ratların davranışsal performansları Morris su labirent ve açık saha testleri ile, hipokampusteki değişimler histopatolojik incelemeler ile ayrıca AChE ve hiper fosforile tau proteinleri biyokimyasal ölçümlerle incelemişlerdir. Deneyin

2. KAYNAK ÖZETLERİ

sonucunda ideal bilişsel bozukluğa yakın bir model oluşturulmuştur ve bunun AH patogenezi için çok önemli olduğu vurgulanmıştır.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyaller

Çalışmada kullanılan kitler ve diğer kimyasal malzemeler Çizelge 3.1’de, cihazlar ise Çizelge 3.2’de gösterilmektedir.

Çizelge 3.1 Araştırmada Kullanılan Kit ve Kimyasal Listesi.

Kitler ve Kimyasallar	Alındığı Firmalar
AlCl ₃	Sigma-Aldrich®
cDNA Sentez Kiti	Applied Biosystems™®
CVDK-8 Kit	Ecotech Biotechnology®
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™®
Sarkozin	Sigma-Aldrich®
Sybr Green Master Mix	Applied Biosystems™®
TAK Kiti	Rel Assay Diagnostics®
TOS Kiti	Rel Assay Diagnostics®
Tripan Blue	Sigma-Aldrich®
Trypsin/EDTA	Sigma-Aldrich®

Çizelge 3.2 Araştırmada Kullanılan Cihaz Listesi.

Cihazın Adı	Cihazın Modeli
-20 Soğutucu	J.P. Selecta
+4 Soğutucu	J.P. Selecta
Analitik Terazı (0,0001)	Shimadzu ATX 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 ve farklılaşma

Tez çalışması kapsamında kullanılan SH-SY5Y hücreleri insan nöroblastomasından köken almaktadır. Hücreler flasklar içerisinde %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin, %1 L-glutamin içeren Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM): F12 besiyeri eklenerek büyütülmüştür. Flasklar, sıcaklığı 37°C olan ve %5 CO₂ içeren inkübatör cihazı içerisinde deney süresi boyunca muhafaza edilmiştir. %70-80 oranında flask içerisine yayılan ve büyüyen hücreler için haftada en az iki kere pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için;

- Besiyeri, PBS ve tripsin-EDTA su banyosunda 37°C'ye ısıtılmıştır.

- Hücreler inkübatörden alınmış ve ışık mikroskobu ile incelenmiştir.
- Flaskta bulunan besiyeri döküldükten sonra PBS ile flaslara birkaç kez yıkama işlemi yapılmış ve besiyerinin uzaklaştığından emin olunmuştur.
- % 0,1 tripsin ve %0,04 EDTA solüsyonu flaslara eklenmiştir.
- Tripsin muamelesinden sonra flaslklar inkübatöre kaldırılarak 5 dk beklenmiştir.
- Bu sürenin sonunda mikroskopta hücrelerin flask tabanından tamamen ayrıldığı kontrol edilmiş ve besiyeri eklenerek tripsin inhibe edilmiştir.
- Hücreler 15 ml'lik santrifüj tüplerinde toplanarak 1500 rpm'de 3 dakika santrifüj yapılmıştır.
- Supernatant kısmı tüpün tabanında 1 mL kadar bırakılacak şekilde dökülmüş ve yeniden besiyeri eklenmiştir.
- Daha sonra çoğalan SH-SY5Y hücrelerinin farklılaştırılması amacıyla Bittencourt Pasquali et al. (2016) tarafından önerilen prosedür uygulanmıştır. Buna prosedüre göre ;
- Hücrelerin 75 cm²'lik flaslklarda 1,5 x 10⁴ hücre / cm² olacak şekilde ekimi yapılmıştır.
- Hücreler tutunduktan sonra farklılaştırılması için besiyeri Fetal sığır serumu (%1 FBS) ve 10 µM retinoik asit (RA) içeren DMEM:F12 besiyeri ile değiştirilmiştir.
- Hücrelerin besiyeri 3 günde bir %1 FBS ve 10 µM RA içeren besiyeri ile yenilenmiştir.
- Hücrelerin farklılaşma süreci ışık mikroskobu ile 11 gün boyunca gözlemlenmiştir.

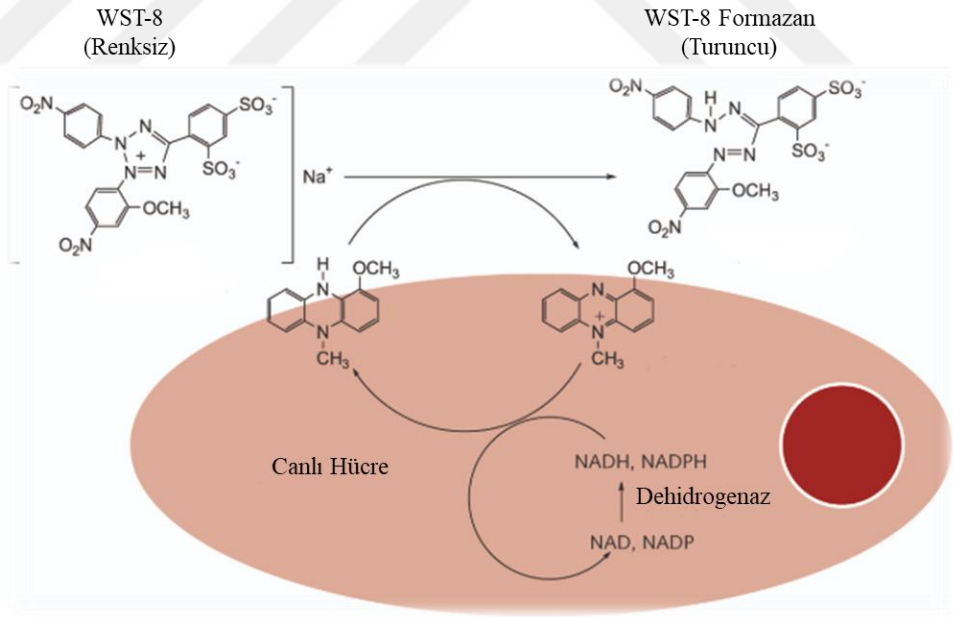
3.2.1.2. WST-8 Testi

Tetrazolyum tuzları, heterosiklik organik yapıdaki bileşiklerdir. Bu tuzlar elektron alarak indirgenmekte ve formazan denilen yapıya dönüşmekte böylece renk değişikliği meydana gelmektedir. Tetrazolyum halkasını sadece aktif halde olan mitokondri kırmaktadır ve bu nedenle renk reaksiyonunu yalnızca canlı hücreler meydana getirebilmektedir (Mosmann et al. 1983). Ölü hücreler ise tetrazolyum bileşiklerini indirgeme yeteneklerini kaybettikleri için herhangi bir renk değişimine neden olmamaktadırlar (Riss et al. 2004). Bu nedenle hücrelerdeki dehidrogenazların aktiviteleri ile üretilen formazan boyasının miktarı, canlı hücrelerin sayısı ile doğru

3. MATERYAL VE YÖNTEM

orantılıdır (Şekil 3.1). Bu amaçla bir tetrazolyum tuzu olan WST-8 analizi yapmak için ticari olarak satılan Ecotech Biotechnology® CVDK-8 kiti kullanılmıştır. Bu kitin prosedürüne göre;

- RA eklenmesi ile farklılaştırılan SH-SY5Y hücreleri, 96 kuyulu plakalara ekilmiş ve 24 saat boyunca bekletildikten sonra hücrelerin bu plakalara tutunmaları sağlanmıştır.
- Daha sonra toksik doz olarak belirlenen $AlCl_3$ (200 μM) ile birlikte 10 farklı konsantrasyonlarda (0-800 mg/L) sarkozin aminoasiti uygulandıktan sonra 96 kuyulu plakalar 24 saat boyunca inkübatör cihazı içerisinde bekletilmiştir.
- İnkübasyondan sonra hücre canlılığı kitte belirtilen esaslara göre belirlenmiştir.
- Sarkozin ile muamele edilmiş hücrelerin üzerine 10 μl CVDK-8 reaktifi eklenmiş ve hücreler 2 saat inkübatöre alınmıştır.
- Deney tamamlandıktan sonra her bir örneğin absorbansı için 450 nm'de ölçüm yapılmış ve % canlılık oranları hesaplanmıştır.

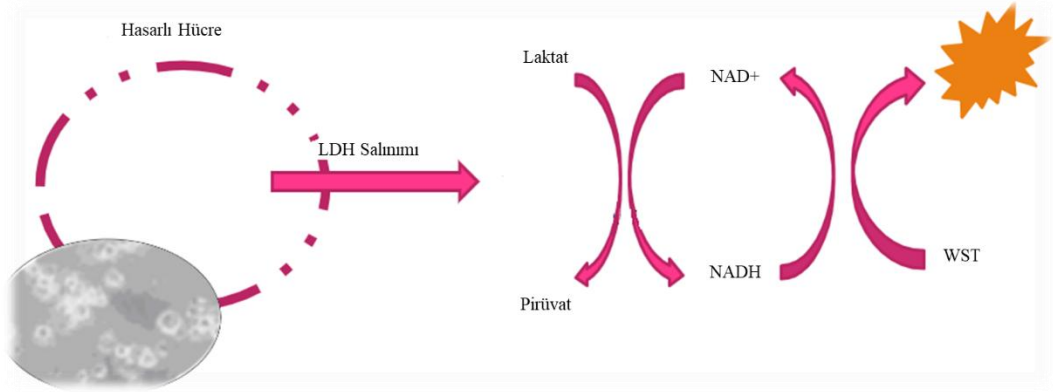


Şekil 3.1 WST-8 ile Hücre Canlılığı Tespiti Prensibi
(<https://www.promocell.com/product/colorimetric-cell-viability-kit-i-wst-8/>).

3.2.1.3. LDH Testi

Laktat Dehidrogenaz (LDH) hemen hemen her hücrede bulunan sitozolik bir enzimdir ve hücre membran bütünlüğü bozulduğu durumlarda ise ekstrasellüler ortama salınmaktadır (Şekil 3.2). Hücre sitotoksitesinin belirlenmesi amacıyla ticari olarak satılan Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit kullanılmıştır. Bu kitin prosedürüne göre;

- RA eklenmesi ile farklılaştırılan SH-SY5Y hücreleri, 96 kuyulu plakalara ekilmiş ve 24 saat boyunca bekletildikten sonra hücrelerin bu plakalara tutunmaları sağlanmıştır.
- Daha sonra toksik doz olarak belirlenen $AlCl_3$ (200 μM) ile birlikte 10 farklı konsantrasyonlarda (0-800 mg/L) sarkozin aminoasiti uygulandıktan sonra 96 kuyulu plakalar 24 saat boyunca inkübatör cihazı içerisinde bekletilmiştir.
- İnkübasyondan sonra hücre canlılığı kitte belirtilen esaslara göre belirlenmiştir.
- Her bir örnekten 50 μl serum yeni bir 96 kuyulu plakaya aktarılmış ve üzerine 50 μl reaksiyon karışımı eklenmiştir.
- Plaka oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildikten sonra kuyuların içerisine 50 μl reaksiyon durdurma solüsyonu eklenmiştir.
- Deney tamamlandıktan sonra her bir örnek için 490 nm dalga boyunda absorban ölçümü alınmıştır.
- 680 nm dalga boyu referans olarak kabul edilmiştir.
- En yüksek LDH aktivitesini belirlemek için kit içerisinde bulunan lizis tamponu (10X) kullanılmıştır.
- Spontan LDH aktivitesi için ise distile su kullanılmıştır.



Şekil 3.2 LDH ile Sitotoksisite Tespit Prensipli

(<https://neu.edu.tr/wp-content/uploads/2016/06/Sitotoksite-Analizleri-DESAM.pdf>).

3.2.1.4. Metal şelatlama

Metal şelatlama deneyi için;

- Sarkozin 200 $\mu\text{mol/L}$ olacak şekilde tek başına ve ayrıca her biri 200 $\mu\text{mol/L}$ olan CuSO_4 , AlCl_3 , FeCl_3 , ve ZnCl_2 geçiş metalleri ile birlikte 48 kuyulu plakalara alınmıştır.
- Önce sarkozin daha sonra metaller eklenecek şekilde 30 dakika boyunca oda sıcaklığında plaka bekletilmiştir.
- Bekleme süresi tamamlandıktan sonra Biotek EPOCH spektrofotometre cihazı kullanılarak 200-500 nm arasında değişen dalga boyu ile sarkozin' in emilim spektrumu belirlenmiştir.
- Test edilen metallerin ve aminoasitin son konsantrasyonları 200 $\mu\text{mol/L}$, reaksiyon karışımının son hacmi ise 1 mL olacak şekilde düzenlenmiştir.
- Sarkozin ve metaller plaka üzerindeki kuyulara Çizelge 3.3'de gösterildiği gibi eklenmiştir.

Çizelge 3.3 Metal Şelatlama Deney Düzenegi.

A	Sarkozin + H ₂ O
B	Sarkozin + AlCl ₃
C	Sarkozin + ZnCl ₂
D	Sarkozin + FeCl ₃
E	Sarkozin + CuSO ₄
F	H ₂ O

3.2.2. *In Vivo* çalışmalar

3.2.2.1. Rat modelleri

Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinden (ATADEM) alınan ratlar tez çalışması için kullanılmıştır. Tez çalışması bu merkezde tamamlanmıştır. Tez çalışması deneyleri için, 200-300 gram ağırlığındaki yetişkin Sprague Dawley ırkı toplam 16 adet dişi rat kullanılmış ve çalışma sürecinde herhangi bir kayıp yaşanmamıştır. Bütün deney hayvanları, 12 saat standart ışık aydınlık ve 12 saat karanlık altında, 25 °C ısıda, yeteri kadar su ve yem verilerek plastik kafeslerde deney çalışmaları tamamlanana kadar bekletilmiştir. Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel 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. Hayvanlar aşağıdaki gibi gruplandırılarak deneyler sürdürülmüştür (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4 Çalışma Grupları ve Hayvan Sayıları.

Çalışma Grupları	Hayvan Sayısı (n)	Uygulama Süresi	Doz
Kontrol	4	4 Hafta	-
Alzheimer	4	4 Hafta	5 mg/kg/gün
Sarkozin	4	4 Hafta	3,6 mg/kg/gün
Alzheimer +Sarkozin	4	4 Hafta	5 mg/kg/gün 3,6 mg/kg/gün

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Kontrol Grubu (n=4): Ratlara herhangi bir işlem uygulanmamış ve günlük yaşamları normal koşullar altında korunmuştur.

Alzheimer Grubu (n=4): $AlCl_3$, distile su ile çözülmüştür ve Alzheimer hastalığının oluşturulması için nörotoksik ajan olarak 5 mg/kg/gün intraperitoneal (i.p.) yolla ratlara enjekte edilmiştir.

Sarkozin Grubu (n=4): Sarkozin distile su ile çözülmüştür ve ratlara 4 hafta boyunca i.p. olarak 3,6 mg/kg/gün verilmiştir.

$AlCl_3$ + Sarkozin (n=4): 4 hafta boyunca, 3,6 mg/kg/gün Sarkozin ve 5 mg/kg/gün $AlCl_3$ i.p. olarak birlikte ratlara verilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 İntraperitoneal Enjeksiyon Uygulaması.

3.2.2.2. Vücut ağırlığı

Deneye başlamadan önce bütün gruptaki ratların vücut ağırlık ölçümleri alınmış ve yine bütün deney hayvanlarının vücut ağırlıkları deney süresi boyunca takip edilmiştir. $AlCl_3$ ve sarkozin amino asiti uygulamalarından sonra tekrar ağırlık ölçümleri alınarak başlangıca göre oluşan farklılıklar belirlenmiştir.

3.2.2.3. Hematolojik analizler

Bütün deney gruplarındaki ratlara üretan anestezisi verildikten sonra batınından intrakardiyak yöntem ile yaklaşık 5 ml kan alınmış ve heparinli tüplere konulmuştur. Atatürk Üniversitesi Araştırma Hastanesi laboratuvarlarında hizmet alımı ile örneklerin hemotolojik analizleri yapılmıştır.

3.2.2.4. Biyokimyasal analizler

Bütün deney gruplarındaki ratlara üretan anestezisi verildikten sonra batınından intrakardiyak yöntem ile yaklaşık 5 ml kan alınmış ve EDTA'lı tüplere konulmuştur. Atatürk Üniversitesi Araştırma Hastanesi laboratuvarlarından hizmet alımı ile örneklerin biyokimyasal analizleri yapılmıştır.

3.2.2.5. Patolojik inceleme

Bütün deney gruplarındaki ratların beyin dokuları üretan anestezisi altında çıkarılmıştır. Dokular çıkarıldıktan sonra PBS ile yıkanmış, %10'luk formaldehite konulmuş ve histopatolojik tanı için dokulardan kesit alınarak hemotoksilen-eozin boyaması yapılmıştır.

3.2.2.6. Mikroçekirdek Testi

AH'nin erken aşamasında olan bireyleri tanımlayabilen biyobelirteçlerin, hastalığa zamanında önleyici müdahaleye izin vereceğinden yararlı olacağı düşünülmektedir. Bu nedenle de nörodejenerasyon bulunan hastaların, somatik hücrelerinde kromozom hasarının değerlendirilmesine yardımcı olan belirteçlere ilgi artmaktadır (Migliore et al. 1997; Petrozzi et al. 2002). Genom hasarı, değişmiş gen dozajına ve gen ifadesine yol açabilmektedir. Ayrıca nöronal dokuda hızlandırılmış hücre ölümü riskine de katkıda bulunabilmektedir (Thomas et al. 2006). Kromozomların anormal ayrılması ve kromozom kırılmalarının biyobelirteçleri olan mikroçekirdekler gibi genomik instabilite markörlerinin, Alzheimer hastalarının periferik kan lenfositleri ve fibroblastlarında yükseldiği gösterilmiştir (Trippi et al. 2001).

Literatür bilgileri ışığında deney gruplarındaki ratlarda mikroçekirdek oluşum sıklığını ölçmek için;

- Heparinli şırınga yardımıyla bütün ratlardan alınan taze kan örnekleri yağsız, temiz ve buzlu olan cam slaytlara yayılarak preparatlar şeklinde hazırlanmıştır.
- Kan örneklerinin bulunduğu cam slaytlar 10 dakika boyunca metanol içerisinde sabitlenmiş ve 12 saat oda sıcaklığında gece boyunca kurumaya bırakılmıştır.
- Daha sonra slaytlar 10 dakika boyunca Giemsa (%5) ile boyanmıştır.
- Slaytlar dikey konumda hava teması ile kurutulduktan sonra lamel kullanılarak kapatılmış ve ışık mikroskobu altında incelenmiştir.
- Her bir deney grubu için, her bir hayvandan iki tane slayt hazırlanmıştır.
- Kan hücrelerinde toksik madde maruziyeti sonucunda oluşan mikronükleusları ve nükleer lezyonları belirlemek amacıyla her slayt için 1000 çekirdek oranlanmıştır.

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

Oksidan ve antioksidan aktivitenin belirlenmesi için ticari olarak satılan Rel Assay Diagnostics®, Gaziantep, Türkiye firmasının TOS ve TAK kitleri kullanılmış ve firmanın önerdiği yol takip edilerek deneyler gerçekleştirilmiştir.

TOS kitinin protokolüne göre;

- 75 µl beyin homojenat örneği ile 500 µl reaktif1 karıştırılmış ve 30 saniye bekletildikten sonra Biotek EPOCH spektrofotometresinde 530 nm dalga boyunda absorbans ölçümü alınmıştır.
- Daha sonra 25 µl reaktif2 eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- İnkübasyon sonunda 530 nm dalga boyunda Biotek EPOCH spektrofotometresinde tekrardan absorbans ölçümü alınmıştır.
- Standart olarak H₂O₂ (20 mmol/L) kullanılmıştır.
- Sonuçlar µmol H₂O₂ Equiv./L olarak verilmiştir.

TAK kitinin protokolüne göre ise;

- 30 µl beyin homojenat örneği ile 500 µl reaktif1 karıştırılmış ve 30 saniye bekletildikten sonra Biotek EPOCH spektrofotometre cihazında 660 nm dalga boyunda absorbans ölçümü alınmıştır.
- Daha sonra 75 µl reaktif2 eklenmiş ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- İnkübasyondan sonra Biotek EPOCH spektrofotometre cihazında 660 nm dalga boyunda tekrar absorbans ölçümü alınmıştır.
- Aynı prosedür örnekler haricinde deiyonize su ve standart olarak bir vitamin E analogu olan Trolox ekivalenti (1mmol/L) kullanılarak da gerçekleştirilmiştir.
- Sonuçlar mmol/L olarak verilmiştir.

3.2.2.8. Moleküler genetik analizler

3.2.2.8.1. Dokudan RNA izolasyonu

Deney başlangıcı için Beyin dokusundan 100-200 mg ependorf tüp içine alınmıştır. Ependorf tüpüne metal boncuk eklenmiş ve bu sayede homojenizatörde 40 rpm'de 4 dakikada homojenizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Daha sonra Invitrogen™® kiti kullanılarak beyin dokularından RNA izolasyonu yapılmıştır. Kitin protokolüne göre;

- Homojenatların olduğu tüplerden boncuklar çıkarıldıktan sonra oda sıcaklığında 12.000xg'de 2 dk santrifüj yapılmıştır.
- RNA içeren sıvı fazın hepsi yeni bir ependorf tüpüne alınmış ve üzerine 500 µl %70'lik etanol eklenerek homojen görüntü elde edilene kadar tüplere vorteks yapılmıştır.
- Örneklerden 700 µl alınarak kit içerisindeki kolonlara yüklenmiştir.
- Oda sıcaklığında 12.000x g'de 15 saniye (sn) boyunca örnekler santrifüj edilmiştir.
- Kalan örneklerin tamamı da kolonlara yüklenmiş ve aynı şekilde santrifüj edilerek kolondan geçmeleri sağlanmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

- Yıkama işlemleri için kitin içindeki Wash I solüsyonu kolondaki örneklere 700 µl eklenmiş ve ardından 12.000xg' de 15 sn santrifüj yapılmıştır.
- Daha sonra örneklere 500 µl Wash II eklenmiş ve 12.000xg' de 15 sn santrifüj edilmiş, aynı işlem bir kere daha yapılmıştır.
- Santrifüj sonrası tüpün alt kısmında kalan sıvı boşaltılarak herhangi bir ekleme yapılmadan boş tüp 12.000xg'de 2 dk santrifüj edilmiştir.
- Kolon çıkarılarak yeni ependorf tüplere takılmış ve üzerine 30 µl RNase içermeyen su eklenerek oda sıcaklığında 1 dk inkübe edilmiştir.
- Daha sonra 12.000xg'de 2 dk oda sıcaklığında santrifüj edilmiş ve RNA örnekleri ependorf tüpte toplanmıştır.
- Beyin dokusundan izole edilen RNA örneklerinin miktar ve saflığı Epoch cihazı yardımı ile belirlenmiştir.
- RNA miktarı µg/ml olarak ölçülmüştür ve cDNA sentezi için RNA miktarlarının eşitlenmesi amacıyla okunan en düşük RNA değeri standart kabul edilmiştir.
- Eğer deney çalışması hemen yapılmayacaksa RNA örnekleri kullanılıncaya kadar -80°C' de saklanmıştır.

3.2.2.8.2. cDNA sentezi

cDNA sentezi için “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” (Applied Biosystems™) kullanılmış ve üreticinin önerdiği yol izlenmiştir. Bu prosedüre göre;

- 10µl RNA örneği
- 2 µl 10XRT random primer
- 2 µl 10XRT buffer
- 0,8 µl 25XdNTP mix,
- 4,2 µl nükleaz içermeyen H₂O
- 1µl MultiScribe™Reverse Transkriptaz enzimi kullanılmıştır.

Hazırlanan örnekler termal döngü cihazına yerleştirilerek;

- 25°C'de 10 dk,

3. MATERYAL VE YÖNTEM

- 37°C’de 120 dk,
- 85°C’de 5 dk
- 4°C’de ∞ olacak şekilde adımlar programlanmış ve elde edilen cDNA örnekleri

-20°C’de saklanmıştır.

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

cDNA’ların Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) ile çoğaltılması için Çizelge 3.5’de gösterilen genlere ait primerler kullanılmıştır. Deney çalışması için seçilen genlere ait mRNA seviyelerinin belirlenmesi amacıyla elde edilen cDNA’lar spesifik primerlerin varlığında Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) ile çoğaltılmıştır.

Çizelge 3.5 RT-PZR’de Kullanılan Primer Sekansları.

Gen Sembolü	Forward	Reverse
<i>ACTB</i>	ATCGCTGACAGGATGCAGAAG	AGAGCCACCAATCCACACAGA
<i>ADAM10</i>	TGCCTCCCAAAGTCTCTCAT	AGACGTTGCTCTCGCATAACA
<i>APH1A</i>	GTGTTTTTCGGATGCACCTT	CTGATCGGTCTGTACATGG
<i>APOE</i>	AACCGCTTCTGGGATTACCT	AGCTGTTCCTCCAGTCCTT
<i>APP</i>	GGAGGAGAGCGACAGCATC	CTCCACATCCTCGTCATCCT
<i>BACE1</i>	ACTGTGCGTGCCAACATT	GCTTCACCAGGGAGTCAAAA
<i>BDNF</i>	ACAGTATTAGCGAGTGGGTCAC	GAACATACGATTGGGTAGTTTCG
<i>DAXX</i>	AGCCTCTGGTCCCTCTGAGT	GCTGCAGTTTGTGGAGGAAC
<i>EGFR</i>	TCATCAGGGGAAATGCTCTC	GAGGATGGGGTTGTTGCTAA
<i>MAPT</i>	CAGAAAGGCACATCCAATGC	GTTGGTAGGGATGGGGTACG
<i>NCSTN</i>	ATTGTGTGGGGGAAACTCAG	CCGTCAATACCCATTTTCAGG
<i>PSENI</i>	TGCACAGATGTCTGAGGACAG	TGCTCTATCACCTGCCTGGTA
<i>PSENE2</i>	TGCCTTTTCTTTGGTTGGTC	TGATCCAGGTGGTGAGAACA
<i>TNF-α</i>	TGCCTCAGCCTCTTCTCATT	CCCATTTGGGAACCTTCTCCT
<i>VEGFA</i>	TCAGTTCGAGGAAAGGGAAA	GCGAGTCTGTGTTTTTGCAG

Real Time-PZR her bir deney grubu için üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiş ve her bir örnek için;

- 2 µl cDNA,
- 5 µl Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems™)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

- 2,0 µl nükleaz içermeyen H₂O
- 0.5 µl Forward primer
- 0.5 µl Reverse Primer olacak şekilde RT-PZR reaksiyon karışımı hazırlanmıştır.

Hazırlanan karışımlar vortekslenmiş ve mini spin cihazında 1 dakika santrifüj edilmiştir. Rraltime PCR reaksiyonu için Qiagen Rotor-Gene Q cihazı kullanılmış ve koşullar;

- 50°C'de 2 dakika,
- 95°C'de 10 dakika X 40 siklüs,
- 95°C'de 15 saniye
- 60°C'de 1 dakika olacak şekilde programlanmıştır..

Çalışmada Actb kontrol gen (housekeeping) olarak kullanılmış ve RT-PZR analizleri sonucunda gen ekspresyonundaki farklılıkların hesaplanmasında 2- $\Delta\Delta CT$ metodu esas alınmıştır.

3.2.3. İstatistiksel Analizler

Çalışmalar sonucunda elde edilen verilen istatistiksel analizi, SPSS® versiyon 21.0 ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. İstatistiksel değerlendirme için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile post-hoc olarak Duncan's testi kullanılmış ve istatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. *In Vitro* AlCl₃ Toksikite Sonuçları

SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinin nöronal benzeri hücrelere farklılaşmasını sağlayabilmek için RA kullanılmıştır. Anti-Alzheimer potansiyel değerlendirmeleri için en uygun AlCl₃ konsantrasyonunu belirleyebilmek amacıyla geniş bir AlCl₃ doz aralığı (1.25, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 400 ve 800 µM) 24 saat süre ile farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerine uygulanmıştır (n = 6). WST-8 analizi ile hücrelerin % canlılık oranları belirlenmiştir. Bu analiz ile elde edilen sonuçlar, konsantrasyona bağlı AlCl₃ toksisitesini göstermiştir (Çizelge 4.1). En yüksek AlCl₃ konsantrasyonu (800 µM), kültürlerin canlılık oranını %16,35'e düşürmüştü ve en düşük AlCl₃ konsantrasyonu (1,25 µM) ise, kontrol gruba kıyasla %3,76 oranında hücre ölümüne neden olmuştur. %53,02 canlılık oranı 200 µM AlCl₃ uygulanmış hücrelerde görülmüştür. Bu nedenle sonraki *in vivo* çalışmalarda 200 µM AlCl₃ kullanılması tercih edilmiştir.

Çizelge 4.1 Farklılaştırılmış SH-SY5Y Hücrelerinde AlCl₃'ün Sitotoksitesisi Verileri.

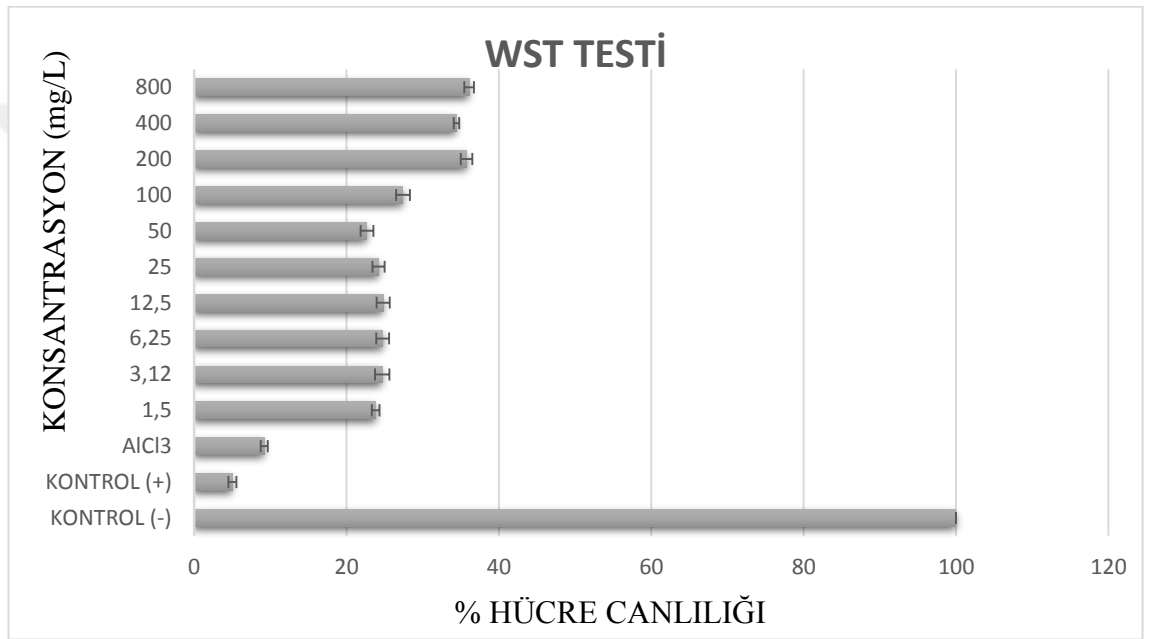
AlCl ₃ Konsantrasyonu (µM)	Hücre Canlılığı (%)
1,25	96,24 ± 4,23
2,5	92,12 ± 5,01
5	83,54 ± 7,24
10	76,21 ± 8,32
25	73,24 ± 6,58
50	64,36 ± 4,32
100	61,27 ± 8,47
200	53,02 ± 7,06
400	33,25 ± 7,39
800	16,35 ± 6,21
Kontrol	100

4.2. *In Vitro* Sarkozin'in Nöroprotektif Potansiyeli

RA ile farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerine 200 µM konsantrasyonunda AlCl₃ uygulanarak oluşturulan Alzheimer modelinde sarkozin aminoasitinin (10 farklı dozda)

nöroprotektif etkisi WST-8 ve LDH yöntemleri ile kantitatif olarak saptanmıştır. Sarkozin aminoasitinin bulunmadığı hücreler negatif kontrol grubu olarak kullanılmış ve pozitif

kontrol grubu olarak ise kültür ortamına lizis tamponu (10X) eklenmiştir. Yalnızca farklı konsantrasyonlardaki sarkozin aminoasiti (1,5-800 mg/L) hücre kültürlerine uygulandığında kontrol grubuna göre hücre canlılığı oranlarında değişiklik meydana gelmemiş, üstelik konsantrasyona bağlı olarak sarkozin aminoasiti *in vitro* ortamda Al toksisitesine karşı sitoprotektif etki göstermiştir (Şekil 4.1).



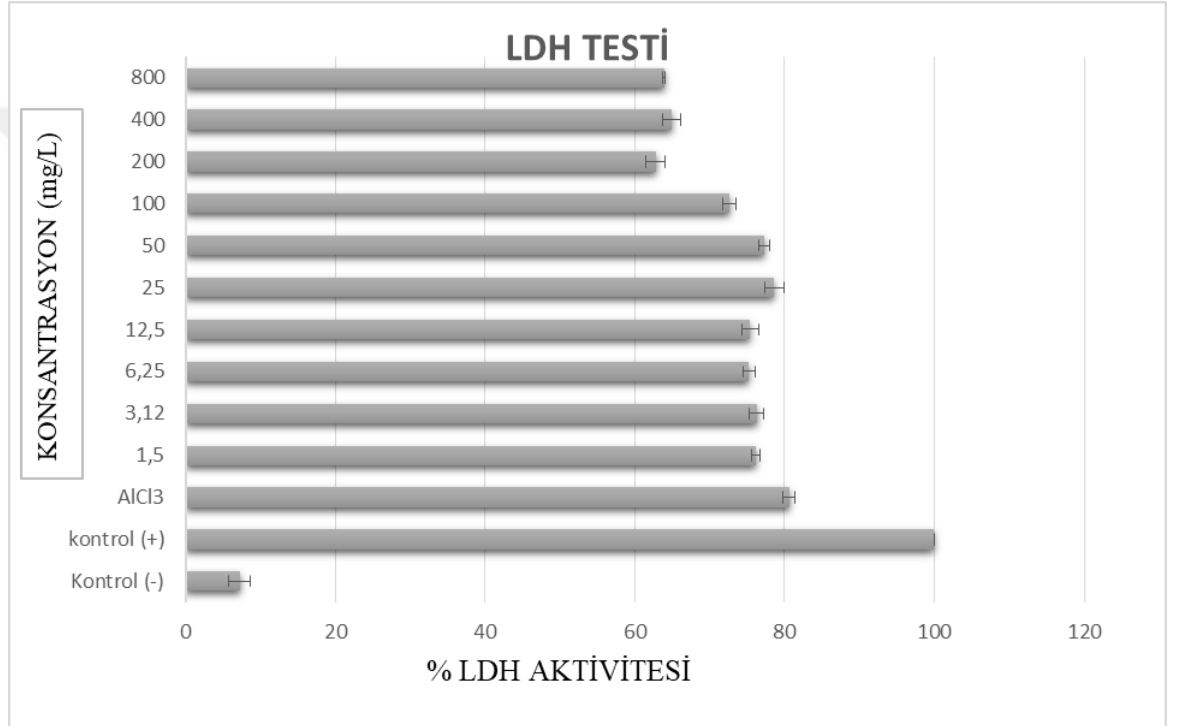
Şekil 4.1 SH-SY5Y Hücrelerinde AlCl₃ Toksisitesine Karşı Sarkozin'in Koruyucu Etkisi.

In vitro sitotoksikite testleri, ilaç niteliği taşıyan ya da toksik özelliği araştırılan maddelerin hücre kültür ortamında etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla yapılmaktadır. Çalışmamızda WST-8 testi ile AlCl₃'ün hücre ölümüne neden olduğu ve sarkozin uygulamasının 200 mg/L konsantrasyonda %35,74 oranında hücre canlılığını artırdığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle hem AlCl₃'ün sitotoksik bir madde olduğu hem de sarkozin aminoasitinin bu sitotoksikiteyi koruyucu özellikte olduğu kanıtlanmıştır.

Hücreler, toksik maddelere maruz kaldığı zaman plazma membran bütünlükleri bozulmakta ve LDH enzimi hücrelerden sızmaktadır. Böylece toksik madde maruziyetinden sonra LDH enzim aktivitesi ölçülerek hücrede oluşan hasar

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

belirlenmektedir. Bu amaçla hücelere uygulanan $AlCl_3$ sonrası LDH analizi ile apoptotik veya nekrotik SH-SY5Y hücrelerinden ortam içine salınan LDH enziminin aktivitesi ölçülmüştür. Sonuçlara göre 24 saat boyunca 200 μM $AlCl_3$ uygulaması, SH-SY5Y hücreleri tarafından salınan LDH enziminin düzeyini, negatif kontrol grubuna kıyasla yükseltmiştir (Şekil 4.2). Ayrıca LDH sonuçlarına göre sarkozin uygulamasındaki azalış, SH-SY5Y hücre membranını $AlCl_3$ ile indüklenen nörotoksositeye karşı koruduğunu göstermektedir. Sarkozin, $AlCl_3$ uygulamasının olumsuz etkisini inhibe ederek, 200 μM konsantrasyonda hücre canlılığında artış sağlamıştır.



Şekil 4.2 SH-SY5Y Hücrelerinde $AlCl_3$ Toksisitesine Karşı Sarkozin'in LDH Aktivitesine Koruyucu Etkisi.

Yapılan birçok araştırma ile Sarkozin aminoasitinin nöroprotektif özellikte olduğu ortaya konulmuştur. Özellikle çalışmalarda, şizofreninin patogeneze glutamaterjik sistemin dahil olduğu ve sarkozinin hipokampustaki bu metabolizma üzerindeki yararlı etkileri gösterilmiştir. Ayrıca sarkozinin epilepsi için bir tedavi seçeneği olarak kullanılmasının olanaklı olduğu düşünülmektedir (Strzelecki et al. 2015). Ek olarak, atipik antipsikotik risperidon alan hastalarda sarkozin tedavisinin faydalı olabileceği gösterilmiştir. Bununla uyumlu olarak, atipik antipsikotik, klozapin ve olanzapin alan

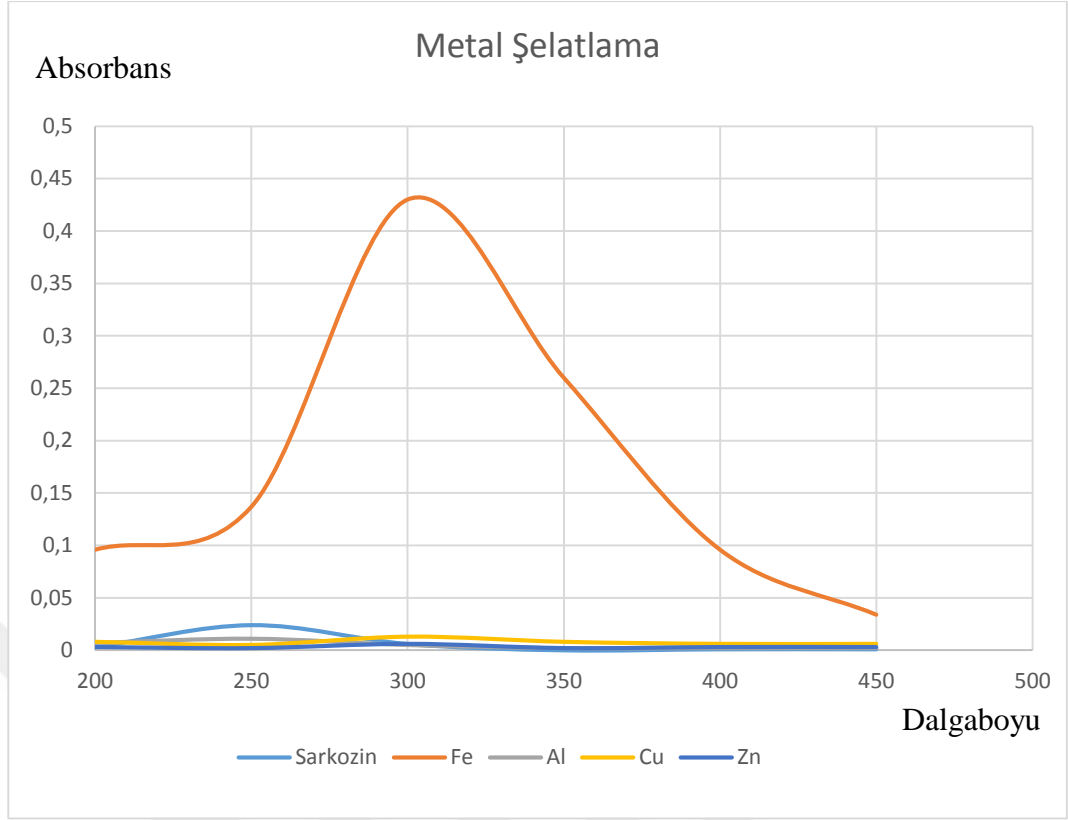
hastalarda yüksek doz glisin tedavisi ile önemli klinik etkiler gözlemlendiği rapor edilmiştir (Lane et al. 2006).

4.3. Metal Şelatlama

Bakır (Cu) ve çinko (Zn)' nun sinaptik fonksiyonu düzenlemede kilit rol oynadığı bildirilmiştir. Cu'nun A β 'nin nöronal hücre kültürlerinde toksisitesini arttırdığı (Fodero-Tavoletti et al. 2010) ve Zn ile indüklenen A β oligomerlerinin, NMDA reseptörleri ile etkileşerek hipokampal beyin dilimlerindeki toksik tepkileri ortaya çıkardığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Deshpande et al. 2009).

A β , geçiş metali iyonlarını koordine etmeyi mümkün kılan 6, 13 ve 14. konumlarında histidin kalıntılara sahiptir ve çeşitli spektroskopik çalışmalar, histidin kalıntılarının, metal koordinasyonunun ana yerlerini oluşturduğunu doğrulamıştır. A β -metal etkileşimlerinin peptit agregasyonuna ve çökmesine yol açtığı düşünülmektedir. Bu nedenle AH için potansiyel ilaçları geliştirmeye yönelik bir yaklaşım, amiloid birikimi ve oksidatif stres gibi AH'nin patolojik özelliklerini harekete geçiren A β ve metaller arasındaki etkileşimleri inhibe etmektir (Kanche et al. 2011). Bu yaklaşım ile metal şelatlayıcı özellikteki bileşikler AH için umut verici ilaçlar haline gelmiştir.

Bu çalışma ile sarkozin aminoasitinin Al⁺³, Fe⁺³, Cu⁺² ve Zn⁺² metalleri varlığında şelatlama potansiyeli UV-Vis spektrometrisi ile incelenmiştir. Elde edilen bulgulara göre sarkozin aminoasiti absorbans spektrumları Fe⁺³ ilavesinden sonra belirgin bir artış oluşturmuştur. Bu artış, kompleks oluşumu sonucunda sarkozin ile Fe⁺³ iyonu arasında bir etkileşim olduğunu işaret etmektedir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 Sarkozin'in Şelatlama Potansiyeli.

Nöronlardaki demir homeostazı ağırlıklı olarak transferrin ve ferritin ile korunmaktadır. AH beyinde ise, değişmiş demir homeostazının olduğu rapor edilmiştir. Yüksek demir konsantrasyonuna ek olarak, amiloid plaklar genellikle oligodendrositlerde bulunan transferrin içermektedir. Ayrıca AH'de anormal bir ferritin dağılımı olduğu da bildirilmiştir (Honda et al. 2004). Bu bilgiler ışığında, sarkozin'in Fe^{+3} ile oluşturduğu kompleks, bu aminoasitin şelatör özellikle olabileceğini de göstermiştir ve nükleik asitlerin oksidasyonunu önlemek için metal şelatörlerin sitoplazmaya ve nükleusa hedeflenmesini temel alan terapötik yaklaşımlarda kullanılabileceğini göstermiştir.

4.4. Vücut Ağırlık Ölçümleri

4 haftalık deney süresi boyunca kontrol, $AlCl_3$, sarkozin ve hem $AlCl_3$ hem de sarkozin ile muamele edilen hayvanların canlı vücut ağırlıkları takip edilerek, değişimler kaydedilmiştir (Çizelge 4.2). Yapılan analizler sonucunda, $AlCl_3$ uygulanan deney grubunun ağırlığı azalırken, sarkozin ve $AlCl_3$ 'ün birlikte uygulandığı deney grubunun ağırlığı artmış ve kontrole yaklaşmıştır. Fakat vücut ağırlıklarının gruplar arasında

anlamli farklılık göstermediği tespit edilmiştir. Ayrıca grupların hiçbirinde deney süreci boyunca tüy dökümü gözlenmemiştir.

Çizelge 4.2 Deney Öncesi ve Sonrası Ratların Vücut Ağırlıkları.

Deney Grupları	Başlangıç (gr)	Deney Sonu (gr)
Kontrol	293,50 ± 11,18	298,18 ± 12,72
Alzheimer	284,20 ± 13,82	280,80 ± 19,50
Sarkozin	273,50 ± 10,08	288,50 ± 11,67
Alzheimer + Sarkozin	277,50 ± 12,08	280,00 ± 10,42

(p<0,05)

4.5. *In Vivo* Hematolojik Bulgular

Kontrol ve deney gruplarındaki ratlardan alınan kan örneklerinde hematolojik değişimlerin değerlendirilmesi sonrasında edilen bulgulara göre beyaz kan hücreleri (WBC) ve kırmızı kan hücreleri dağılım genişliği (RDW-SD) verileri istatistiki açıdan anlamlı sonuçlar vermiştir (Çizelge 4.3). AlCl₃ maruziyeti WBC ve RDW-SD düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı oranda artmasına neden olmuştur. Sarkozin uygulaması bu hematolojik bulgular üzerinde kontrole kıyasla anlamlı değişiklik oluşturmamış ve AlCl₃ ile sarkozin' in birlikte uygulandığı deney grubunda ise WBC ve RDW-SD düzeyleri AlCl₃ maruziyetine kıyasla anlamlı azalış göstermiştir.

Çizelge 4.3 Bütün Deney Gruplarına Ait Hematolojik Bulgular.

Parametre	Kontrol	AlCl ₃	Sarkozin	AlCl ₃ +Sarkozin
WBC	3,93 ± 0,29 ^a	6,32 ± 0,44 ^c	3,90 ± 0,08 ^a	5,82 ± 0,18 ^b
RBC	5,52 ± 1,12 ^a	6,82 ± 0,86 ^a	5,71 ± 0,35 ^a	6,53 ± 0,79 ^a
HGB	10,60 ± 0,71 ^a	12,63 ± 1,16 ^b	10,87 ± 0,85 ^a	12,52 ± 0,33 ^b
HCT	46,45 ± 2,10 ^b	39,56 ± 1,65 ^a	45,75 ± 2,35 ^b	41,72 ± 3,53 ^a
MCH	21,50 ± 0,57 ^b	17,55 ± 1,60 ^a	18,35 ± 0,56 ^a	17,04 ± 1,36 ^a
MCV	61,25 ± 1,89 ^b	56,11 ± 2,75 ^a	59,77 ± 2,70 ^b	54,50 ± 1,29 ^a
MCHC	31,65 ± 0,75 ^a	30,00 ± 1,92 ^a	30,75 ± 0,57 ^a	31,05 ± 0,47 ^a
RDW-SD	29,12 ± 2,01 ^a	48,83 ± 4,70 ^c	32,25 ± 2,06 ^a	41,37 ± 2,80 ^b
RDW-CV	15,50 ± 0,57 ^a	23,54 ± 2,31 ^b	17,46 ± 1,04 ^a	21,97 ± 1,32 ^b

(p<0,05)

Diğer adı lökosit olan beyaz kan hücreleri bağışıklık sistemin önemli bir parçasıdır. İnflamasyon, AH olan beynin patolojik olarak bazı bölgelerinde açıkça görülür ve bunu, lokal periferik inflamatuvar yanıtların karmaşıklığı ile yapar. Çevresinde, dejeneratif doku ve yüksek derecede çözünmeyen anormal materyallerin birikmesi, klasik inflamasyon uyarıcılarıdır (Akiyama et al. 2000). Bu nedenle WBC seviyelerindeki artış, kronik inflamasyonun belirteci olduğu düşünülmekte ve doğal immün hücrelerinin AH patogenezi katkıda bulunduğu araştırmalar sonucunda gösterilmektedir. (Zenaro et al. 2015). Çalışmamızda, AH için model olan deney grubumuzun $AlCl_3$ uygulaması nedeniyle WBC seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı artış göstererek inflamasyonu başlatmakta olduğu ve Sarkozin uygulamasının WBC seviyesini anlamlı derecede düşürerek hastalık için koruyucu etki gösterdiği sonucuna varılmaktadır.

Eritrosit dağılım genişliği olarak da bilinen RDW değerleri kandaki alyuvarların büyüklükleri arasındaki fark hakkında bize bilgi vermektedir. RDW değerlerinin yüksek olması B12 vitamini ve folat eksikliği ile karakterizedir. Yapılan bazı çalışmalarda B12 vitamini eksikliği AH'li hastalarda, diğer demanslarda ve bilişsel kusurlu kişilerde, kontrollere kıyasla daha yüksek bulunmuştur (Wang et al. 2001). Ayrıca düşük serum folat düzeyleri AH ile ilişkilidir ve folat tedavisinin hafıza sorunları için olumlu etkisini gösteren çalışmalar da vardır (Fioravanti et al. 1997; La Rue et al. 1997). Artan RDW değeri genellikle yeni bir inflamasyon biyobelirteci olarak kabul edilirken, AH' nin patofizyolojisinde inflamasyonun rolünü destekleyebileceği düşünülmektedir. Ayrıca, RDW' nin zayıf biliş durumu ile olan ilişkisi, AH şiddetinin bir göstergesi olarak kullanılabilmesi rapor edilmiştir (Öztürk et al. 2013). Hemotolojik bulgularımızın sonucunda $AlCl_3$ ile indüklenen deneysel AH grubunda RDW-SD değeri anlamlı artış göstermekte ve sarkozin uygulaması kontrol grubuna yakın olacak şekilde bu değerde anlamlı azalış sağlamaktadır. Literatür bilgileri doğrultusunda, $AlCl_3$ ile AH modeline uygun deney grubumuzun oluştuğunu ve sarkozinin inflamasyonu azaltarak AH modelinde koruyucu etki gösterdiği sonucuna varılmaktadır.

4.6. *In Vivo* Biyokimyasal Bulgular

Kontrol ve deney gruplarındaki ratlardan alınan kan örneklerinde biyokimyasal değişimlerin değerlendirilmesi sonrasında edilen bulgulara göre kreatin kinaz (CK),

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

magnezyum (Mg), kreatin ve ürik asit düzeylerinde gruplar arasında istatistiki açıdan anlamlı sonuçlar tespit edilmiştir (Çizelge 4.4). AlCl₃, CK düzeyini kontrol grubuna göre anlamlı oranda azaltırken, sarkozin verilen grupta CK düzeyi kontrol grubuyla anlamlı değişiklik göstermemiş ve AlCl₃ ile birlikte sarkozin verilen deney grubunda AlCl₃ maruziyetine göre anlamlı artış tespit edilmiştir. Mg, kreatin ve ürik asit düzeylerinde AlCl₃ maruziyeti, kontrol grubuna göre anlamlı azalışa neden olmuştur.

Çizelge 4.4 Bütün Deney Gruplarına Ait Biyokimyasal Bulgular.

Parametre	Kontrol	AlCl ₃	Sarkozin	AlCl ₃ +Sarkozin
CK	656,25 ± 65,74 ^c	424,93 ± 50,73 ^a	635,00 ± 65,44 ^c	545,25 ± 21,07 ^b
AST	256,25 ± 11,08 ^a	263,00 ± 7,21 ^a	255,00 ± 4,08 ^a	262,00 ± 5,71 ^a
ALT	76,25 ± 1,70 ^a	85,50 ± 2,88 ^b	77,50 ± 2,08 ^a	79,00 ± 1,82 ^a
LDH	438,75 ± 38,99 ^a	699,66 ± 51,04 ^b	480,00 ± 46,90 ^a	656,00 ± 37,69 ^b
Trigliserid	85,25 ± 5,18 ^a	75,50 ± 8,11 ^a	80,00 ± 4,39 ^a	79,50 ± 5,50 ^a
Total	77,25 ± 3,20 ^a	74,66 ± 3,07 ^a	75,50 ± 2,88 ^a	76,25 ± 5,85 ^a
Kolesterol				
Ca	10,75 ± 0,58 ^b	9,70 ± 0,08 ^a	9,87 ± 0,76 ^a	9,68 ± 0,05 ^a
P	8,27 ± 0,61 ^a	7,81 ± 0,60 ^a	7,95 ± 0,54 ^a	7,82 ± 0,22 ^a
Mg	3,08 ± 0,28 ^b	2,30 ± 0,14 ^a	2,31 ± 0,14 ^a	2,30 ± 0,20 ^a
Krea.	0,41 ± 0,06 ^b	0,25 ± 0,05 ^a	0,33 ± 0,03 ^{ab}	0,28 ± 0,08 ^a
Ürik Asit	7,20 ± 0,81 ^b	3,04 ± 0,91 ^a	6,32 ± 0,22 ^b	3,55 ± 0,36 ^a
BUN	22,64 ± 1,96 ^a	20,38 ± 0,70 ^a	20,75 ± 2,02 ^a	20,63 ± 1,54 ^a

(p<0,05)

CK, iskelet kası, beyin, retinanın fotoreseptör hücreleri, spermatozoa ve düz kas gibi ATP'yi hızla tüketen hücrelerde ve dokularda bulunmaktadır. Aynı zamanda ATP'nin hızlı tamponlanması ve rejenerasyonu için bir enerji kaynağı gibi görev görür (Wallimann et al. 1992). CK'nın beyin aktivitesi ile korele olduğu ve hipoksi veya kimyasal yolla oluşan mitokondriyal disfonksiyon sırasında ATP azalmasını sağlayarak hücreyi toksisiteden koruduğu gösterilmiştir (Holtzman et al. 1998). Bu bilgi ışığında çalışmamızda AlCl₃ ile indüklenen deneysel AH modelinde CK seviyesi, kontrol grubuna göre düşmüş olduğu gözlemlenmekte ve ayrıca yapılan bazı çalışmalarda Alzheimer hastalığında, CK'nın daha düşük bir aktiviteye sahip olduğunun (Smith et al. 1991; Pettegrew et al. 1994) gösterilmiş olması bu bulgumuzu desteklemektedir. Ayrıca sarkozin uygulamasının, AH model grubuna göre CK seviyesinde anlamlı artış gösterdiği verilen bulgularda görülmektedir.

Mg, miyelin tabakanın oluşması için gereklidir ve hücre zarı geçirgenliğini artırarak nöronların besin alınımını kolaylaştırmaktadır. Ca iyonları beyin hücrelerinin ölümüne neden olmaktadır ve Mg, Ca iyonlarının beyindeki oluşumunu engellemektedir. Çeşitli çalışmalarda AH vakalarında Ca'nın Mg'ye oranının çok yüksek olduğu ortaya çıkmıştır. AH modeli deney grubumuzda Mg değeri kontrol grubuna göre anlamlı azalma göstermiştir ama sarkozin aminoasiti bu değişikliği anlamlı oranda iyileştirme etkisi gösterememiştir.

Beyin ile böbrek hasarı arasında güçlü ve karmaşık bir patofizyolojik bağlantı olduğu bilinmektedir (Ulus et al. 2015). Protein ve nükleotid metabolizmalarının toksik, suda çözünebilir azotlu bileşiklerinin idrarla ekstraksiyon yoluyla giderilmesi, beyin normal nörolojik işlevi için çok önemlidir. Azalan bir böbrek fonksiyonu, AH'li beyin için daha fazla yük oluşturabilir. Önceki çalışmalar bu karmaşık, birbirine bağlı patofizyolojik bağlantıya değinmeye çalışmış ve kronik böbrek hastalığının demans ve kognitif bozukluk için risk faktörlerinden biri olduğunu belirtmişlerdir (De Ferrari et al. 2000; Yu et al. 2011). Bu nedenle böbrek yetmezliği AH'nin ortaya çıkışının kanıtı olabilmektedir. Çalışmamızda AH model grubunda kreatin ve ürik asit değerleri kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma göstermiştir. Bu nedenle $AlCl_3$ ile indüklenen deney grubundaki ratlarda böbrek ve karaciğer hasarı olduğu söylenebilir. Bu bulgular, AH ve böbrek hasarı arasındaki literatür bilgisine paralellik göstermektedir. Sarkozin aminoasitinin uygulandığı grup ise bu azalışı düzelterek seviyede anlamlı farklılık gösteremediği saptanmıştır.

4.7. Patolojik İnceleme

Sarkozin ve $AlCl_3$ ' ün beyin dokusunun nispi ağırlığı üzerindeki etkileri analiz edilmiştir. Bu bulgulara göre, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $AlCl_3$ ile indüklenen AH model deney grubunun beyin dokusunda önemli oranda büzülme oluşmuş ve metalimizin bu büzülmeye neden olduğu gösterilmiştir. AH patofizyolojisinin en belirgin özelliklerinden biri de nöron kaybı nedeniyle beyin hacminin küçülmesidir ve elde ettiğimiz sonuçlar bu bilgiyi doğrulamaktadır (Çizelge 4.5). Sarkozin eklenen deney grubumuzun nispi beyin ağırlığı kontrol grubundaki örneklerle yakındır ve $AlCl_3$

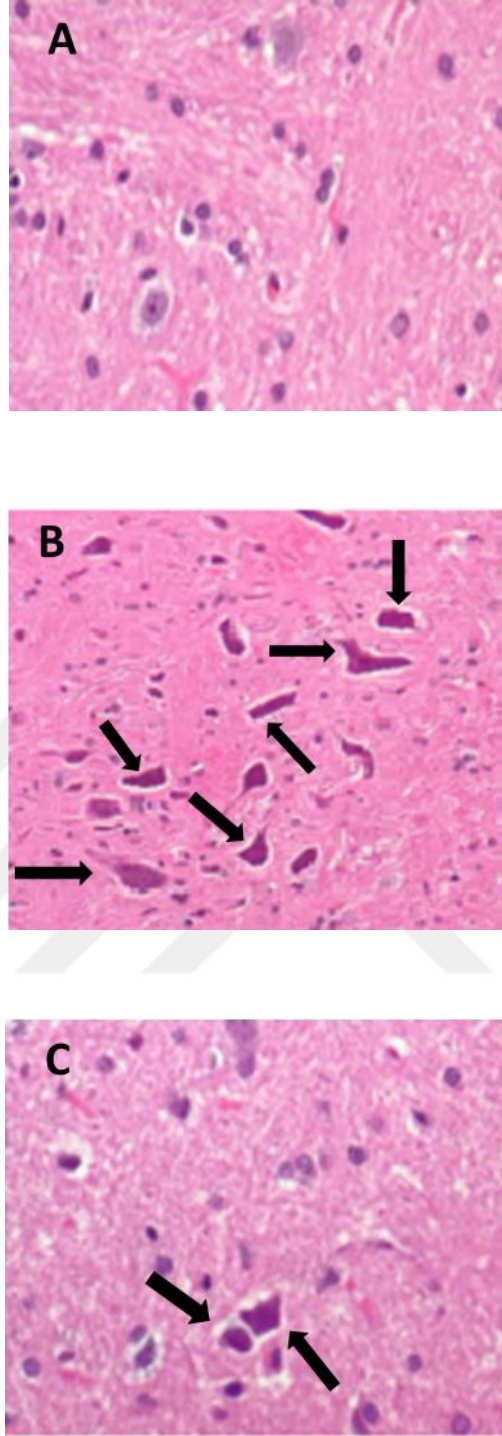
maruziyetinin oluşturduğu beyin hacmi hasarına karşı koruma sağlayabildiği anlamlı artış değerleriyle kanıtlanmıştır.

Çizelge 4.5 Sarkozin ve AlCl₃'ün Beyin Dokusunun Ağırlığı Üzerindeki Etkileri.

Deney Grupları	Beyin ağırlığı(gr)
Kontrol	2,16 ± 0,12 ^b
Alzheimer	1,85 ± 0,13 ^a
Sarkozin	2,07 ± 0,03 ^b
Alzheimer + Sarkozin	2,02 ± 0,06 ^b

(p<0,05)

Ratlardan elde edilen beyin kortekslerinin Hematoksilen-eosin (H-E) ile boyanmış kesitlerinin analizinde AlCl₃ maruziyeti olan grup dokusunda mikroskopik düzeyde histopatolojik bulgular saptanmıştır ve hipokampal nöronlarda belirgin dejeneratif değişiklikler gösterdiği gözlenmiştir. Hücresel hasarın göstergesi olarak; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, sitoplazmik ve nükleer büzüşme nedeniyle piknotik bir görünüm kazanan AlCl₃ grubundaki nöronların yoğun boyanması şekilde gösterilmiştir. Ayrıca AlCl₃ ve sarkozinin birlikte uygulandığı deney grubundaki doku kesitlerinde ise NFY sayısının azaldığı görülmekte ve bu görüntüler sarkozinin nöroprotektif etkisini kanıtlar niteliktedir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 Deney Gruplarına Ait Beyin Dokularının Işık Mikroskobu Görüntüleri.
A: Kontrol grubu; B: AlCl₃ grubu; C: AlCl₃ + Sarkozin (NFY'ler oklar ile gösterilmiştir.)
(H&E) x 40

4.8. Mikroçekirdek Bulguları

Yapılan birçok araştırma ile Al'nin genotoksik bir madde olduğu belirtilmiştir. Al genotoksisitesinin üç mekanizma yoluyla olduğu gösterilmiştir: Kromatin yapısının modifikasyonu, ROS indüksiyonu ve DNaz'ın lizozomlardan serbest bırakılması (Banasik et al. 2005). İlk mekanizmanın, Al'nin kromatin yapısını etkileyebileceği ve DNA hasarına yol açabileceği bulgularıyla desteklenmektedir (Hanas et al. 1996 ; Bharathi et al. 2003). İkinci mekanizma, hücrelerin Al ile etkileşiminin ROS oluşumuna yol açabileceği gözlemleriyle kanıtlanmaktadır (Anane et al. 2001; Moumen et al. 2001). Bazı çalışmalarla ise, Al'nin lizozomal membranın geçirgenliğini artırarak ve lizozomal proton pompasını engelleyerek, DNaz'ın sitoplazmaya serbest bırakılmasına ve böylece DNA'yı keseceği çekirdeğe geçişine yol açabilecek son mekanizmayı oluşturduğu doğrulanmaktadır (van der Voet et al. 1992; Zatta et al. 2000).

Deney süresince AlCl₃ maruziyeti olan ratlara ait kan smear örneklerinde gözlenen MÇ/1000 hücre sıklıkları kontrol grubu değerlerinden belirgin bir şekilde (p<0,05) farklı olduğu gösterilmiştir (Çizelge 4.6) ve bu veri analizleri literatürde bulunan çalışmalar tarafından doğrulanır niteliktedir. Böylece AlCl₃'ün genetik materyale zarar veren toksik bir ajan olduğu kanıtlanmıştır. Sarkozin uygulamasının kontrol grubuyla karşılaştırıldığı zaman anlamlı değişiklik oluşturmamış olması ise bu aminoasitin genotoksik bir etkisi olmadığını göstermektedir. Fakat AlCl₃ ve sarkozin' in birlikte uygulandığı deney grubu, AlCl₃ maruziyetine göre mikroçekirdek sıklığında azalma göstermesine rağmen bu değişiklik anlamlı oranda değildir.

Çizelge 4.6 Bütün Deney Gruplarına Ait Ratların Kan Smear Örneklerinde Gözlenen Mikroçekirdek Sıklıkları.

Deney Grupları	Mikroçekirdek sıklığı (MnPKE/ 1000 PKE)
Kontrol	13,62 ± 2,32 ^a
Alzheimer	26,85 ± 2,06 ^b
Sarkozin	13,83 ± 2,35 ^a
Alzheimer + Sarkozin	23,86 ± 1,40 ^b

(p<0,05)

4.9. TAK ve TOS Testleri

Sarkozin ve AlCl₃ maruziyeti ile indüklenmiş deneysel AH modeli rat gruplarından alınan beyin dokuları üzerinde TAK ve TOS seviyeleri üzerindeki etkileri analiz edilmiştir (Çizelge 4.7 ve 4.8).

Beyin, enerji kullanımını fazla olan bir organdır ve bu nedenle oksijene ihtiyacı da fazladır. Yüksek düzeyde enerji üretimi reaktif oksijen türleri (ROS) üretimini de artırmaktadır. Serebral doku, düşük antioksidan içeriği, nöronal membranların çoklu doymamış yağ asitleri içeriği ve metabolizması için yüksek oksijen gereksinimleri nedeniyle serbest radikal hasarlarına karşı özellikle savunmasız kalmaktadır (Christen et al. 2000). Artan oksidatif stres normal yaşlanma ile ilişkilidir, ancak AH dahil olmak üzere çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda daha da artmaktadır (Jomova et al. 2011). Çünkü AH ilerlemesinde başlangıç olayı olarak, ROS üretimini kolaylaştıran metal etkileşimlerin oksidatif strese neden olduğu düşünülmekte ve beynin bazı bölgelerinde bu geçiş metal iyonları yüksek oranda bulunmaktadır (Greenough et al. 2013). Bu nedenlerden dolayı oksidatif stres, AH patogenezinin anahtar molekülleri olan A β agregasyonu ve tau hiperfosforilasyonunu teşvik ederek nöron kaybına neden olmaktadır (Dias-Santagata et al. 2007). Yapılan bu çalışmalar sonucunda AH tedavisinde antioksidanların yararlı olabileceği düşünülmektedir. A, C, E vitamini ve selenyum gibi antioksidanların AH tedavisi için büyük önem taşıdığı ve ayrıca E vitamini desteği alınmasının AH riskini azaltabileceği belirtilmiştir (Canbolat et al. 2016).

Çizelge 4.7 *In Vivo* Beyin Dokusunda Deney Gruplarının TAK Seviyesine Etkileri.

Deney Grupları	TAK Seviyesi (mmol Trolox E/L)
Kontrol	2,23 ± 0,24 ^b
Alzheimer	1,40 ± 0,30 ^a
Sarkozin	2,11 ± 0,08 ^b
Alzheimer + Sarkozin	1,67 ± 0,10 ^a

(p<0,05)

Araştırma bulgularına göre $AlCl_3$ maruziyeti TAK seviyesi üzerinde anlamlı ($p < 0,05$) azalışa neden olurken, sarkozin uygulaması $AlCl_3$ ' ün bu olumsuz etkisini hafifletebildiği halde anlamlı oranda artış sağlayamamıştır.

Çizelge 4.8 *In Vivo* Beyin Dokusunda Deney Gruplarının TOS Seviyesine Etkileri

Deney Grupları	TOS Seviyesi (mmol H_2O_2 E/L)
Kontrol	$2,38 \pm 0,25^a$
Alzheimer	$2,93 \pm 0,15^b$
Sarkozin	$2,46 \pm 0,12^a$
Alzheimer + Sarkozin	$2,80 \pm 0,13^b$

($p < 0,05$)

TOS analiz sonuçlarına göre, $AlCl_3$ literatür bilgilerine paralel olarak oksidatif stres oluşturmuş ve kontrol grubuna kıyasla anlamlı artış ($p < 0,05$) göstermiştir. Sarkozin uygulaması, $AlCl_3$ ' ün oluşturduğu bu olumsuz etkiyi, TAK seviyesi üzerinde olduğu gibi, hafifletebildiği halde anlamlı oranda azalma sağlayamamıştır. Fakat sadece sarkozin uygulanan deney grubunun, kontrol grubuna göre TOS seviyesi üzerinde anlamlı oranda artış göstermemiş olması bu aminoasitin herhangi bir stres oluşturmadığını da işaret etmektedir. Sonuç olarak sarkozin aminoasitinin pro-oksidatif değişikliklere yol açmadığı ama nöroprotektif etkisini antioksidan kapasite üzerinden göstermediği sonucuna varılmaktadır.

4.10. Moleküler Genetik Yanıtlar

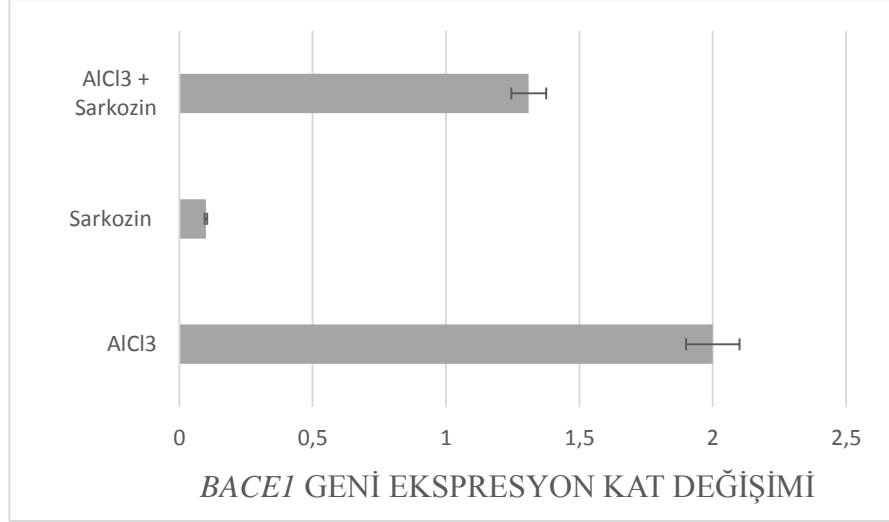
Çalışmamızda yapılan analizlere göre, sarkozinin *in vivo* ortamda $AlCl_3$ tarafından indüklenen nörotoksositeye karşı nöroprotektif etki gösterdiği sonucuna varılmıştır. Bu nöroprotektif etkinin altında yatan moleküler mekanizmaları bulabilmek için ise seçilen 14 adet genin ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır. Bu amaçla her gruptaki hayvanın beyin dokusundan RNA izole edilmiş ve elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentezlenmiştir. Bu cDNA örnekleri belirlenen genlere ait spesifik primerler ile kantitatif PZR ile çoğaltılmıştır.

$AlCl_3$ maruziyeti ile indüklenen deneysel AH model grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığı zaman *APP*, *BACE1*, *TNF- α* , *APH1A* ve *PSENN* genlerinin ekspresyon seviyelerinde anlamlı farklılık gözlemlenmiştir (Şekil 4.5- 4.9).



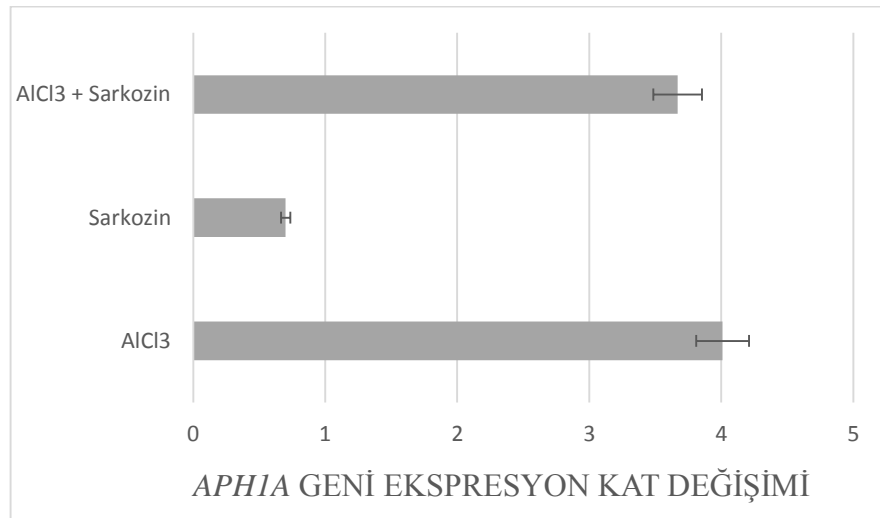
Şekil 4.5 Deney Gruplarına Ait Beyin Örneklerindeki *APP* Ekspresyon Düzeyi.

APP, β ve γ sekretaz kompleksi tarafından işlenen $A\beta$ prekürsör proteinini kodlamakta ve bu da AH patojenisinde önemli bir olay olan $A\beta$ peptidinin üretimine yol açmaktadır. Proteinin $A\beta$ 1-43 bölgesi içinde bulunan veya $A\beta$ sekansının N veya C terminaline bitişik olan *APP* mutasyonları, $A\beta$ 'nin aşırı üretimi olaylarının art arda meydana gelmesine katkıda bulunabilmekte ve AH'ye yol açabilmektedir. Tipik olarak, $A\beta$ sekansının N terminaline bitişik mutasyonlar, tüm $A\beta$ türlerinin üretiminin artmasına neden olurken, karboksil terminaline yakın olanlar, $A\beta$ 42 / $A\beta$ 40 oranında bir artışa neden olmuştur (Van giau et al. 2018).

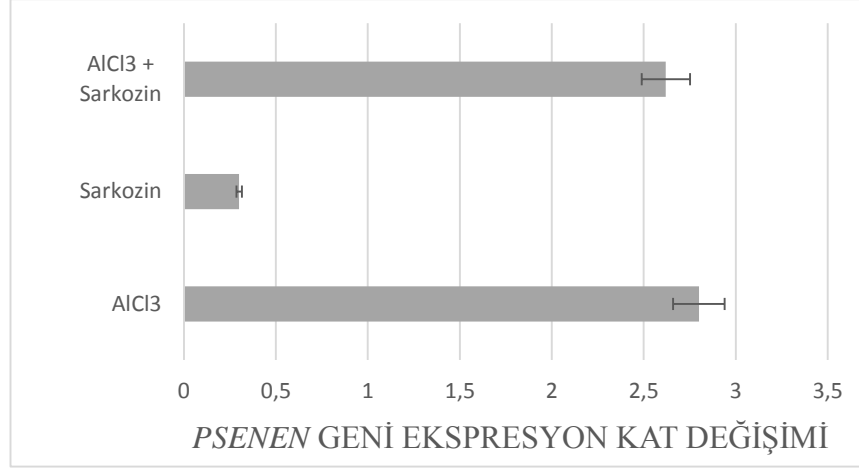


Şekil 4.6 Deney Gruplarına Ait Beyin Örneklerindeki *BACE1* Ekspresyon Düzeyi.

Önemli bir nöronal β -sekretaz olan *BACE1*, transmembran aspartil proteazdır ve *BACE1* ile bölünme, $A\beta$ 'nin N terminalini oluşturmaktadır (Thinakaran et al. 2008). *BACE1*, *APP*'yi aşırı eksprese eden hücre hatlarında β sekretaz aktivitesinde artışa neden olmaktadır. *BACE1* enziminin ana ürünleri olan $APPs\beta$ ve C99 oluşumu hücrelerde birkaç kat artmakta ve buna paralel olarak $A\beta$ üretimi de artış göstermektedir. *APP*'yi aşırı eksprese eden hücrelerin *BACE1* antisens oligonükleotitleri ile işlenmesi *BACE1* mRNA seviyelerini azaltmakta ve β sekretaz aktivitesini inhibe etmektedir. *BACE1* antisens inhibisyonu, hücrelerde $APPs\beta$, C99 ve $A\beta$ üretimini azaltırken, aksine $APPs\alpha$ ve C83 üretimi yükseltmiştir (Cole et al. a2007).

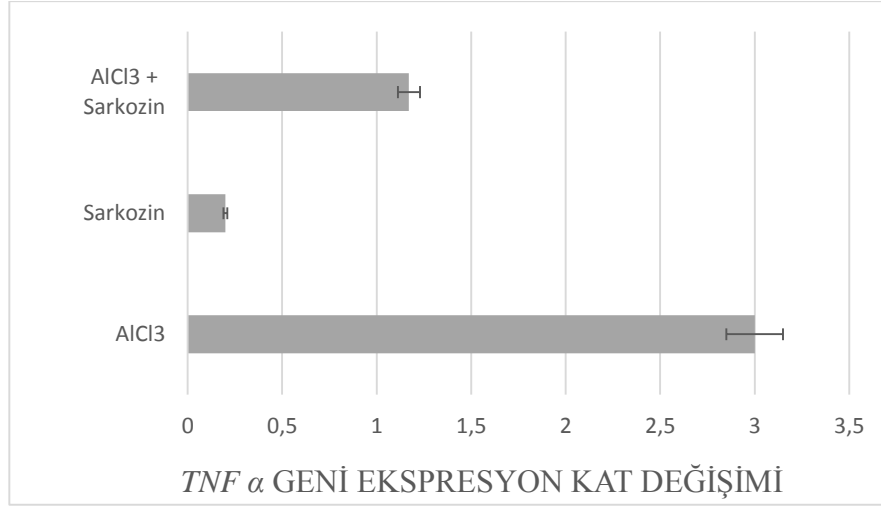


Şekil 4.7 Deney Gruplarına Ait Beyin Örneklerindeki *APH1A* Ekspresyon Düzeyi.



Şekil 4.8 Deney Gruplarına Ait Beyin Örneklerindeki *PSENEK* Ekspresyon Düzeyi.

Multimoleküler kompleks γ -sekretaz, transmembran bölgelerinde proteinleri parçalamaktadır ve bu kompleks Presenilin (*Psen*), Nicastrin (*Nct*), *Pen2* ve *Aph1* olarak adlandırılan en az dört alt birimden oluşmaktadır (Lutgarde Serneels et al 2004). AH'de, amiloidojenik yolak, APP'nin β -sekretaz ve ardından γ -sekretaz kompleksin APH1a alt-birimi tarafından bölünmesiyle A β 'nin üretilmesine yol açmaktadır. Bununla birlikte, α sekretaz, amiloidojenik olmayan çözünür amiloid öncü proteini α (sAPP α) üretmektedir (El Halawany et al. 2017). Ayrıca Aph1A kompleksleri embriyogenez sırasında Notch sinyali için de çok önemlidir (Serneels et al. 2016). *PEN-2* genindeki sekans değişimlerinin ise γ -sekretaz aktivitesini etkileyebileceği ve ailesel veya sporadik AH riskini artırabileceği çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir (Frigerio et al. 2005). *PEN2*, disfonksiyonu γ -sekretaz oluşumunu etkilemekte ve nicastrin olgunlaşmasını bozabilmektedir. *PEN-2*, γ -sekretaz kompleksinin önemli bir kofaktörüdür. Bu nedenle, *PEN2* anormalliğinin AH patolojisini hızlandırabilir olduğu düşünülmektedir (Jia et al. 2007).



Şekil 4.9 Deney Gruplarına Ait Beyin Örneklerindeki $TNF-\alpha$ Ekspresyon Düzeyi.

TNF 'nin, inflamatuvar yanıt sırasında sitokin kaskadı başlatılmasında ve düzenlenmesinde merkezi rol oynayan ana proinflamatuvar sitokinlerden biri olduğu belirtilmiştir. TNF 'nin kronik inflamatuvara ve serbest radikal hasarına yol açtığı bildirilmiştir. Bu nedenle sporadik AH için TNF risk oluşturmaktadır (Rodney T. et al 2001). Ayrıca yapılan bazı çalışmalar ile $TNF-\alpha$ ve interlökin-1 β (IL-1 β)'nin artmasının öğrenme ve hafızada zararlı olduğu gösterilmiştir (Le et al. 2014).

Moleküler genetik bulgularımızın sonucunda, AICl₃ uygulanan deney grubunda AH patogenezinde esas olay olan *APP* gen ekspresyon artışı gerçekleşmiş ve amiloidojenik yolakla ilişkili olan *BACE1*, *APHIA* ve *Psenen* genlerinde de artış gözlemlenmiştir. Bu nedenle Al'nin, β -sekretaz ve γ -sekretaz aktivitelerinde artışa neden olurken α -sekretaz aktivitesini azalttığı söylenebilir. Ayrıca $TNF-\alpha$ genindeki artışın çeşitli çalışmalar ile hafıza ve bilişsel bozukluk ile ilişkili olduğunun belirtilmesi, AH patofizyolojisinin karakteristik özelliği olan bellek bozukluğunu işaret etmektedir. Bu nedenle Al maruziyeti olan deney grubundaki $TNF-\alpha$ genindeki artış AH modeline uymaktadır. Analiz sonuçlarına göre Al'nin AH ile ilişkili patogeneze neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca sarkozin aminoasitinin analiz edilen genler üzerinde olumsuz etki oluşturmamış olması ve aksine bu aminoasitin uygulanmasından sonra AH modeli olan deney grubuna göre anlamlı azalış göstermesi nöroprotektif etkisini kanıtlamaktadır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Araştırma sonucunda, $AlCl_3$ 'ün beyin hücrelerinde oluşturduğu nöronal hasara karşı glisin türevi olan sarkozin aminoasitinin uygulama dozlarında koruyucu rolü tespit edilmiştir. Öncelikle bu aminoasitin *in vitro* ortamda nöroprotektif etkisi olduğu gösterilmiştir. Daha sonra rat kan örnekleri ile *in vivo* ortamda hematotoksik, nefrotokik ve hepatotoksik etkisinin olmadığı ilk kez rapor edilmiştir. Sarkozinin $AlCl_3$ uygulamasıyla oluşan oksidatif stresi azaltması, $AlCl_3$ 'ün neden olduğu nörodejenerasyonu hemotolojik, biyokimyasal ve genetik açıdan inhibe edici etkiye sahip olması aynı zamanda da inflamasyon süreci üzerinde olumlu etki göstermesi bu aminoasitin Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılabileceğine işaret etmektedir. Araştırma bulgularına göre sarkozinin genotoksik ve sitotoksik etkisinin bulunmamış olması bu aminoasitin güvenilirliğini de artırmaktadır. Ayrıca şelatör özelliğinin de gösterilmiş olması farmokokinetik yaklaşımlar için de katkı sağlayabilecektir. Araştırma sonuçlarımıza göre henüz tedavisi kesin olarak bulunamayan ve progresif nörodejeneratif bir hastalık olan AH için ilaç tasarım çalışmalarında sarkozin aminoasitinin koruyucu özelliğinin yeni yaklaşımlar oluşturabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Abd El-Rahman, S.S., 2003. Neuropathology of Aluminum Toxicity in Rats (Glutamate and GABA Impairment). *Pharmacological Research*, 47(3):189–94.
- Adalbert, R., Gilley, J., Coleman, M.P., 2007. A β , Tau and ApoE4 in Alzheimer's Disease: The Axonal Connection. *Trends in Molecular Medicine*, 13(4):135–42.
- Agosta, F., Vessel, K.A., Miller, B.L., Migliaccio, R., Bonasera, S.J., Filippi, M., Boxer, A.L., Karydas, A., Possin, K.L., Gorno-Tempini, M.L., 2009. Apolipoprotein E Epsilon4 Is Associated with Disease-Specific Effects on Brain Atrophy in Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(6):2018–22.
- Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G.M., Cooper, N.R., Eikelenboom, P., Emmerling, M., Fiebich, B.L., Finch, C.E., Frautschy, S., Griffin, W. S., Hampel, H., Hull, M., Landreth, G., Lue, L., Mrazek, R., Mackenzie, I.R., McGeer, P.L., O'Banion, M.K., Pachter, J., Pasinetti, G., Salamek, C.P., Rogers, J., Rydel, R., Shen, Y., Streit, W., Strohmeyer, R., Tooyama, I., Muiswinkel, F.L.V., Veerhuis, R., Walker, D., Webster, S., Wegrzyniak, B., Wenk, G., Coray, T.W., 2000. Inflammation and Alzheimer's Disease. *Neurobiology of Aging*, 21(3):383–421.
- Alzheimer's Association. 2008. 2008 Alzheimer's Disease Facts and Figures. *Alzheimer's & Dementia*, 4(2):110–33.
- Anane, R., Creppy, E. E., 2001. Lipid Peroxidation as Pathway of Aluminium Cytotoxicity in Human Skin Fibroblast Cultures: Prevention by Superoxide Dismutase+catalase and Vitamins E and C. *Human & Experimental Toxicology*, 20(9):477–81.
- Anstey, Kaarin J., Darren M. Lipnicki, Lee-Fay Low. 2008. Cholesterol as a Risk Factor for Dementia and Cognitive Decline: A Systematic Review of Prospective Studies With Meta-Analysis. *The American Journal of Geriatric Psychiatry*, 16(5):343–54.
- Anstey, K.J., Mack, H.A., Cherbuin, N., 2009. Alcohol Consumption as a Risk Factor for Dementia and Cognitive Decline: Meta-Analysis of Prospective Studies. *The American Journal of Geriatric Psychiatry: Official Journal of the American Association for Geriatric Psychiatry*, 17(7):542–55.
- Balin, B.J., Hudson, A.P., 2018. Herpes Viruses and Alzheimer's Disease: New Evidence in the Debate. *The Lancet. Neurology*, 17(10):839–41.
- Banasik, A., Lankoff, A., Piskulak, A., Adamowska, K., Lisowska, H., Wojcik, A., 2005. Aluminum-Induced Micronuclei and Apoptosis in Human Peripheral-Blood Lymphocytes Treated during Different Phases of the Cell Cycle. *Environmental Toxicology*, 20(4):402–6.
- Bartus, R.T., Dean, R.L., Beer, B., Lippa, A.S., 1982. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunctions. *Science* 217: 408-417

- Bassil, N., Grossberg, G.T., 2009. Novel Regimens and Delivery Systems in the Pharmacological Treatment of Alzheimer's Disease. *CNS Drugs*, 23(4):293–307.
- Beydoun, M. A., Beydoun, H. A., Wang, Y., 2008. Obesity and Central Obesity as Risk Factors for Incident Dementia and Its Subtypes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Obesity Reviews : An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 9(3):204–18.
- Bharathi, K.S., Rao, J., Stein, R., 2003. First Evidence on Induced Topological Changes in Supercoiled DNA by an Aluminium D-Aspartate Complex. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 8(8):823–30.
- Bird, T.D., 1993. Alzheimer Disease Overview. University of Washington, Seattle.
- Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J. N., Johnson, R. S., Paxton, R. J., March, C. J., Cerretti, D. P., 1997. A Metalloproteinase Disintegrin That Releases Tumour-Necrosis Factor-Alpha from Cells. *Nature*, 385(6618):729–33.
- Boyles, J. K., Pitas, R. E., Wilson, E., Mahley, R.W., Taylor, J. M., 1985. Apolipoprotein E Associated with Astrocytic Glia of the Central Nervous System and with Nonmyelinating Glia of the Peripheral Nervous System. *The Journal of Clinical Investigation*, 76(4):1501–13.
- Brookmeyer, Ron, Sarah Gray, Claudia Kawas. 2004. IT Papier Und M-Real Mit VIP Event in St. Wolfgang: Printers Club. *Papier Und Druck* 110(4):18–19.
- Brookmeyer, R., Johnson, E., Graham, K.Z., Arrighi, H.M., 2007. Forecasting the Global Burden of Alzheimer's Disease. *Alzheimer's and Dementia*, 3(3):186–91.
- Buchhave, P., Minthon, L., Zetterberg, H., Wallin, A.K., Blennow, K., Hansson, O., 2012. Cerebrospinal Fluid Levels Of β -Amyloid 1-42, but Not of Tau, Are Fully Changed Already 5 to 10 Years Before the Onset of Alzheimer Dementia. *Archives of General Psychiatry*, 69(1):98.
- Campion, D., Dumanchin, C., Hannequin, D., Dubois, B., Belliard, S., Puel, M., Anterion, C.T., Michon, A., Martin, C., Charbonnier, F., Raux, G., Camuzat, A., Penet, C., Mesnage, V., Martinez, M., Darpoux, F.C., Brice, A., Frebourg, T., 1999. Early-Onset Autosomal Dominant Alzheimer Disease: Prevalence, Genetic Heterogeneity, and Mutation Spectrum. *The American Journal of Human Genetics*, 65(3):664–70.
- Canbolat, E., Yardimci, H., 2016. Alzheimer Hastalığı ve Koruyucu Besin Öğeleri. 6(2):139–45.
- Cankurtaran, M., Arioğulu, S., 2002. Alzheimer Hastalığı ve Demans Tedavisinde Yenilikler. 9(3):128–36.
- Carmassi, C., Shear, M.K., Socci, C., Corsi, M., Dell'osso, L., First, M.B., 2013. Complicated Grief and Manic Comorbidity in the Aftermath of the Loss of a Son. *Journal of Psychiatric Practice*, 19(5):419–28.

- Chen, S., Ge, X., Chen, Y., Lv, N., Liu, Z., Yuan, W., 2013. Advances with RNA Interference in Alzheimer's Disease Research. *Drug Design, Development and Therapy*, 7:117–25.
- Christen, Y., 2000. Oxidative Stress and Alzheimer Disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71(2):621S–629S.
- Cole, S.L., Vassar, Robert., 2007. The Alzheimer's Disease β -Secretase Enzyme, BACE1. *Molecular Neurodegeneration*, 2(1):1–25.
- Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G.W., Roses, A. D., Haines, J. L., 1993. Referencia 2 APOE. 8(14):41–43.
- Coyle, Joseph T. 2006. Glutamate and Schizophrenia: Beyond the Dopamine Hypothesis. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 26(4–6):365–84.
- Cruts, M. C., Broeckhoven, Van., 1998. Presenilin Mutations in Alzheimer's Disease. *Human Mutation*, 11(3):183–90.
- Cummings, J.L., 2004. Alzheimer's Disease edited by A. J. J. Wood. *New England Journal of Medicine*, 351(1):56–67.
- Dalmau, J., Gleichman, A.J., Hughes, E.G., Rossi, J.E., Peng, X., Lai, M., Dessain, S.K., Rosenfeld, M.R., Gordon, R.B., Lynch, David R., 2008. Anti-NMDA-Receptor Encephalitis: Case Series and Analysis of the Effects of Antibodies. *The Lancet Neurology*, 7(12):1091–98.
- Danysz, W., Parsons, C.G., Möbius, H.J., Stöffler, A., Quack, G., 2000. Neuroprotective and Symptomatological Action of Memantine Relevant for Alzheimer's Disease — a Unified Glutamatergic Hypothesis on the Mechanism of Action. *Neurotoxicity Research*, 2(2–3):85–97.
- Deshpande, A., Kawai, H., Metharate, R., Glabe, C.G., Busciglio, J., 2009. A Role for Synaptic Zinc in Activity-Dependent A β Oligomer Formation and Accumulation at Excitatory Synapses. *Journal of Neuroscience*, 29(13):4004–15.
- Dias-Santagata, D., Fulga, T.A., Duttaroy, A., Feany, M.B., 2007. Oxidative Stress Mediates Tau-Induced Neurodegeneration in *Drosophila*. *The Journal of Clinical Investigation* 117(1):236–45.
- Edelberg, H. K., Wei, J. Y., 1996. The Biology of Alzheimer's Disease. *Mechanisms of Ageing and Development*, 91(2):95–114.
- Eker, E., 2008. Alzheimer Hastalığı. (62):85–109.
- Epstein, F.H., Lipton, S.A., Rosenberg, P.A., 1994. Excitatory Amino Acids as a Final Common Pathway for Neurologic Disorders. *New England Journal of Medicine*, 330(9):613–22.
- Esen, S. 2010. Alzheimer Hastalığı Patofizyolojisi: Deneysel ve Genetik Bulgular. *Türk Geriatri Dergisi*, 3:21–26.

- Eskander, M.F., Nagykerly, N.G., Leung, E.Y., Khelghati, B., Geula, C., 2005. Rivastigmine Is a Potent Inhibitor of Acetyl- and Butyrylcholinesterase in Alzheimer's Plaques and Tangles. *Brain Research*, 1060(1–2):144–52.
- Fagan, A.M., Xiong, C., Jasielc, M.S., Bateman, R.J., Goate, A.M., Benzinger, T.L.S., Ghetti, B., Martins, R.N., Masters, C.L., Mayeux, R., Ringman, J.M., Rossor, M.N., Salloway, S., Schofield, P.R., Sperling, R.A., Marcus, D., Cairns, N.J., Buckles, V.D., Ladenson, J.H., Morris, J.C., Holtzman, D.M., 2014. The Dominantly Inherited Alzheimer Dominantly Inherited Alzheimer Network. Longitudinal Change in CSF Biomarkers in Autosomal-Dominant Alzheimer's Disease. *Science Translational Medicine*, 6(226):226ra30.
- De Ferrari, G.V., Inestrosa, N.C., 2000. Wnt Signaling Function in Alzheimer's Disease. *Brain Research Reviews* 33(1):1–12.
- Ferri, C.P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H., Paulo, S., Paulo, S., 2005. Articles. 366.
- Fioravanti, M., Ferrario, E., Massaia, M., Cappa, G., Rivolta, G., Grossi, E., Buckley, A., 1997. Low Folate Levels in the Cognitive Decline of Elderly Patients and the Efficacy of Folate as a Treatment for Improving Memory Deficits. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 26(1):1–13.
- Fodero-Tavoletti, M.T., Villemagne, V.L., Paterson, B.M., White, A.R., Li, Q.X., Camakaris, J., O'Keefe, G., Cappai, R., Barnham, K.J., Donnelly, P.S., 2010. Bis (Thiosemicarbazonato) Cu-64 Complexes for Positron Emission Tomography Imaging of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 20(1):49–55.
- Friedlander, A.H., Norman, D.C., Mahler, M.E., Norman, K.M., Yagiela, J.A., 2006. Alzheimer's Disease: Psychopathology, Medical Management and Dental Implications. *Journal of the American Dental Association* (1939), 137(9):1240–51.
- Frigerio, C.S., Piscopo, P., Calabrese, E., Crestini, A., Campeggi, L.M., Di Fava, R. C., Fogliarino, S., Albani, D., Marcon, G., Cherchi, R., Piras, R., Forloni, G., Annamaria Confaloni. 2005. PEN-2 Gene Mutation in a Familial Alzheimer's Disease Case. *Journal of Neurology*, 252(9):1033–36.
- Gilman, S. 1997. Alzheimer's Disease. *Perspectives in Biology and Medicine*, 40(2):230–45.
- Goate, A., Harlin, M.C.C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., Mant, R., Newton, P., Rooke, K., Roques P., Talbot, C., Vance, M.P., Roses, A., Williamson, R., Rossor, M., Owen, M., Hardy, J., 1991. Segregation of a Missense Mutation in the Amyloid Precursor Protein Gene with Familial Alzheimer's Disease. *Nature*, 349(6311):704–6.
- Gray, S.L., Anderson, M.L., Crane, P.K., Breitner, J.C. S., McCormick, W., Bowen, J.D., Teri, L., Larson, E., 2008. Antioxidant Vitamin Supplement Use and Risk of Dementia or Alzheimer's Disease in Older Adults. *Journal of the American Geriatrics Society*, 56(2):291–95.
- Greenough, M.A., Camakaris, J., Bush, A.I., 2013. Metal Dyshomeostasis and Oxidative

- Stress in Alzheimer's Disease. *Neurochemistry International*, 62(5):540–55.
- Haass, C., Selkoe, D.J., 2007. Soluble Protein Oligomers in Neurodegeneration: Lessons from the Alzheimer's Amyloid β -Peptide. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(2):101–12.
- Halawany, A.M., Sayed, N.S.E., Abdallah, H.M., El Dine, R.S., 2017. Protective Effects of Gingerol on Streptozotocin-Induced Sporadic Alzheimer's Disease: Emphasis on Inhibition of β -Amyloid, COX-2, Alpha-, Beta - Secretases and A β 1a. *Scientific Reports*, 7(1):1–11.
- Hamer, M., Chida, Y., 2009. Physical Activity and Risk of Neurodegenerative Disease: A Systematic Review of Prospective Evidence. *Psychological Medicine*, 39(1):3–11.
- Han, S., Lemire, J., Appanna, V. P., Auger, C., Castonguay, Z., Appanna, V.D., 2013. How Aluminum, an Intracellular ROS Generator Promotes Hepatic and Neurological Diseases: The Metabolic Tale. *Cell Biology and Toxicology*, 29(2):75–84.
- Hanas, J. S., Gunn, C. G., 1996. Inhibition of Transcription Factor IIIA-DNA Interactions by Xenobiotic Metal Ions. *Nucleic Acids Research*, 24(5):924–30.
- Hardy, J., Allsop, D., 1991. Amyloid Deposition as the Central Event in the Aetiology of Alzheimer's Disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 12:383–88.
- Hardy, J., Allsop, D., 1991. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 12(9): 90609-V
- Harel, M., Sussman, J. L., Krejci, E., Bon, S., Chanal, P., Massoulié, J., Silman, I., 1992. Conversion of Acetylcholinesterase to Butyrylcholinesterase: Modeling and Mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(22):10827–31.
- Harvey, R. J., Skelton-Robinson, M., Rossor, M. N., 2003. The Prevalence and Causes of Dementia in People under the Age of 65 Years. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 74(9):1206–9.
- Holtzman, D., Brown, M., O'Gorman, E., Allred, E., Wallimann, T., 1998. Brain ATP Metabolism in Hypoxia Resistant Mice Fed Guanidinopropionic Acid. *Developmental Neuroscience*, 20(4–5):469–77.
- Holtzman, D. M., Bales, K. R., Tenkova, T., Fagan, A. M., Parsadonian, M., Sartorius, L. J., Mackey, B., Olney, J., McKeel, D., Wozniak, D., Paul, S. M., 2000. Apolipoprotein E Isoform-Dependent Amyloid Deposition and Neuritic Degeneration in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(6):2892–97.
- Holtzman, D.M., Morris, J.C., Goate, A.M., 2011. Alzheimer's Disease: The Challenge of the Second Century. *Science Translational Medicine*, 3(77):77sr1.
- Honda, K., Casadesus, G., Petersen, R.B., Perry, G., Smith, M.A., 2004. Oxidative Stress

and Redox-Active Iron in Alzheimer's Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1012:179–82.

Hooper, N. M., 2005. Roles of Proteolysis and Lipid Rafts in the Processing of the Amyloid Precursor Protein and Prion Protein. *Biochemical Society Transactions*, 33(2):335–38.

<http://www.alzgene.org/>. n.d. AlzGene. Retrieved December 7, 2018 (<http://www.alzgene.org/>).

<https://neu.edu.tr/wp-content/uploads/2016/06/Sitotoksite-Analizleri-DESAM.pdf>

Hynd, M.R., Scott, H.L., Dodd, P.R., 2004. Glutamate-Mediated Excitotoxicity and Neurodegeneration in Alzheimer's Disease. *Neurochemistry International*, 45(5):583–95.

Iannaccone, P.M., Howard J. J., 2009. Rats! Disease Models & Mechanisms, 2(5–6):206–10.

Jia, L., Ye, J., Haiyan L.V., Wang, W., Zhou, C., Zhang, X., Xu, J., Wang, L., Jia J., 2007. Genetic Association between Polymorphisms of Pen2 Gene and Late Onset Alzheimer's Disease in the North Chinese Population. *Brain Research*, 1141(1):10–14.

Jomova, K., Valko, M., 2011. Advances in Metal-Induced Oxidative Stress and Human Disease. *Toxicology*, 283(2–3):65–87.

Jorissen, E., Prox, J., Bernreuther, C., Weber, S., Schwanbeck, R., Serneels, L., Snellinx, A., Craessaerts, K., Thathiah, A., Tesseur, I., Bartsch, U., Weskamp, G., Blobel, C. P., Glatzel, M., De Strooper, B., Saftig, P., 2010. The Disintegrin/Metalloproteinase ADAM10 Is Essential for the Establishment of the Brain Cortex. *Journal of Neuroscience*, 30(14):4833–44.

Kaj B., de Leon, M.J., Zetterberg, H., 2006. Alzheimer's Disease. *Neuroscience*, 32(48):387–403.

Karch, C.M., Goate, A.M., 2015. Alzheimer's Disease Risk Genes and Mechanisms of Disease Pathogenesis. *Biological Psychiatry*, 77(1):43–51.

Kawahara, M., Negishi, M.K., 2011. 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.

Kelley, B.J., Petersen, R.C., 2007. Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment. *Neurologic Clinics*, 25(3):577–609, v.

Kenche, V.B., Barnham, K.J., 2011. Alzheimer's Disease & Metals: Therapeutic Opportunities. *British Journal of Pharmacology*, 163(2):211–19.

Knopman, D. S., DeKosky, S. T., Cummings, J. L., Chui, H., Corey-Bloom, J., Relkin, N., Small, G. W., Miller, B., Stevens, J. C.. 2001. Practice Parameter: Diagnosis of Dementia (an Evidence-Based Review). *Neurology*, 56(9):1143 LP-1153.

- 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.
- Kumar, A., Singh, A., 2015. A Review on Alzheimer's Disease Pathophysiology and Its Management: An Update. *Pharmacological Reports*, 67(2):195–203.
- Kumar, S., 2002. Aluminium-Induced Changes in the Rat Brain Serotonin System. *Food and Chemical Toxicology*, 40(12):1875–80.
- Kuroda, Y., Kawahara, M., 1994. Aggregation of Amyloid β -Protein and Its Neurotoxicity: Enhancement by Aluminum and Other Metals. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 174(3):263–68.
- Lanari, A., 2006. Treatment of Alzheimer's Disease: From Pharmacology to a Better Understanding of Disease Pathophysiology. *Proceedings of the IRE*, 41(9):1172–77.
- Lane, H.Y., Huang, C.L., Wu, P.L., Liu, Y.C., Chang, Y.C., Lin, P.Y., Chen, P.W., Tsai, G., 2006. Glycine Transporter I Inhibitor, N-Methylglycine (Sarcosine), Added to Clozapine for the Treatment of Schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 60(6):645–49.
- Lau, C. G., Zukin, R. S., 2007. NMDA Receptor Trafficking in Synaptic Plasticity and Neuropsychiatric Disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(6):413–26.
- Laurin, D., Masaki, K.H., Foley, D.J., White, L.R., Launer, L.J., 2004. Midlife Dietary Intake of Antioxidants and Risk of Late-Life Incident Dementia: The Honolulu-Asia Aging Study. *American Journal of Epidemiology*, 159(10):959–67.
- Le, Y., Liu, S., Peng, M., Tan, C., Liao, Q., Duan, K., Ouyang, W., Tong, J., 2014. Aging Differentially Affects the Loss of Neuronal Dendritic Spine, Neuroinflammation and Memory Impairment at Rats after Surgery edited by Z. Xie. *PLoS ONE*, 9(9):e106837.
- Lechner, S.M., 2006. Glutamate-Based Therapeutic Approaches: Inhibitors of Glycine Transport. *Current Opinion in Pharmacology*, 6(1):75–81.
- Lee, Y., Back, J.H., Kim, J., Kim, S.H., Na, D.L., Cheong, H.K., Hong, C.H., Kim, Y.G., 2010. Systematic Review of Health Behavioral Risks and Cognitive Health in Older Adults. *International Psychogeriatrics*, 22(2):174–87.
- Lin, R., Chen, X., Li, W., Han, Y., Liu, P., Pi, R., 2008. Exposure to Metal Ions Regulates MRNA Levels of APP and BACE1 in PC12 Cells: Blockage by Curcumin. *Neuroscience Letters*, 440(3):344–47.
- Lin, W.T., Chen, R.C., Lu, W.W., Liu, S.H., Yang, F.Y., 2015. Protective Effects of Low-Intensity Pulsed Ultrasound on Aluminum-Induced Cerebral Damage in Alzheimer's Disease Rat Model. *Scientific Reports*, 5:1–7.
- Lipton, S.A., 2006. Paradigm Shift in Neuroprotection by NMDA Receptor Blockade: Memantine and Beyond. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(2):160–70.

- Lleó, A., Greenberg, S. M., Growdon, J. H., 2006. Current Pharmacotherapy for Alzheimer's Disease. *Annual Review of Medicine*, 57(1):513–33.
- Lu, F.P., Lin, K.P., Kuo, H.K., 2009. Diabetes and the Risk of Multi-System Aging Phenotypes: A Systematic Review and Meta-Analysis edited by C. Zhang. *PLoS ONE*, 4(1):e4144.
- Lutgarde S., Dejaegere, T., Craessaerts, K., Horre, K., Jorissen, E., Tousseyn, T., Hebert, S., Coolen, M., Martens, G., Zwijsen, A., Annaert, W., Hartmann, D., De Strooper, B., 2004. Differential Contribution of the Three Aph1 Genes to α -Secretase Activity in Vivo. *102(5):1719–24*.
- Majumdar, A.S., Nirwane, A.T, Kamble, R., 2014. Coenzyme Q10 Abrogated the 28 Days Aluminium Chloride Induced Oxidative Changes in Rat Cerebral Cortex. *Toxicology International*, 21(2):214–21.
- Maya, S., Prakas, T., Goli, D., 2018. Evaluation of Neuroprotective Effects of Wedelolactone and Gallic Acid on Aluminium-Induced Neurodegeneration: Relevance to Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *European Journal of Pharmacology*, 835:41–51.
- Mcentee, W.J., Crook, T.H., 1993. Psychopharmacology Glutamate: Its Role in Learning, Memory, and The. *Psychopharmacology*, 111.
- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., Stadlan, E. M., 1984. Clinical Diagnosis of Alzheimer's Disease: Report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the Auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*, 34(7):939–44.
- McMillian, M., Pritchard, G.A., Miller, L.G., 1990. Characterization of Ca²⁺-Mobilizing Excitatory Amino Acid Receptors in Cultured Chick Cortical Cells. *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology*, 189(4–5):253–66.
- Meldrum, B.S., 2000. Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain: Review of Physiology and Pathology. *The Journal of Nutrition*, 130(4):1007S–1015S.
- Mesulam, M. M., Guillozet, A., Shaw, P., Levey, A., Duysen, E. G., Lockridge, O., 2002. Acetylcholinesterase Knockouts Establish Central Cholinergic Pathways and Can Use Butyrylcholinesterase to Hydrolyze Acetylcholine. *Neuroscience*, 110(4):627–39.
- Mesulam, M., Guillozet, A., Shaw, P., Quinn, B., 2002. Widely Spread Butyrylcholinesterase Can Hydrolyze Acetylcholine in the Normal and Alzheimer Brain. *Neurobiology of Disease*, 9(1):88–93.
- Method, An Effective, Behavioral Problems, Alzheimer Patients, and Reminiscence Therapy. 2015. Alzheimer Hastalarının Bilişsel ve Davranışsal Sorunları Üzerine Etkili Bir Yöntem : Anımsama Terapisi An Effective Method on Cognitive and Behavioral Problems of Alzheimer Patients : Reminiscence Therapy.
- Migliore, L., Testa, A., Scarpato, R., Pavese, N., Petrozzi, L., Bonuccelli, U., 1997. Spontaneous and Induced Aneuploidy in Peripheral Blood Lymphocytes of Patients with Alzheimer's Disease. *Human Genetics*, 101(3):299–305.

- Mosmann, T., 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2):55-63.
- Moss, M. L., Jin, S. L., Milla, M. E., Bickett, D. M., Burkhart, W., Carter, H. L., Chen, W. J., Clay, W. C., Didsbury, J. R., Hassler, D., Hoffman, C. R., Kost, T. A., Lambert, M. H., Leesnitzer, M. A., McCauley, P., McGeehan, G., Mitchell, J., Moyer, M., Pahel, G., Rocque, W., Overton, L. K., Schoenen, F., Seaton, T., Su, J. L., Becherer, J. D., Becherer, J.D., 1997. Cloning of a Disintegrin Metalloproteinase That Processes Precursor Tumour-Necrosis Factor-Alpha. *Nature*, 385(6618):733-36.
- Moumen, R., Oukhatar, N.A., Bureau, F., Fleury, C., Bouglé, D., Arhan, P., Neuville, D., Viader, F., 2001. Aluminium Increases Xanthine Oxidase Activity and Disturbs Antioxidant Status in the Rat. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 15(2-3):89-93.
- Murakami, K., Irie, K., Ohigashi, H., Hara, H., Nagao, M., Shimizu, T., Shirasawa, T., 2005. Formation and Stabilization Model of the 42-Mer A β Radical: Implications for the Long-Lasting Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. *Journal of the American Chemical Society*, 127(43):15168-74.
- Nampoothiri, M., John, J., Kumar, N., Mudgal, J., Nampurath, G.K., Chamallamudi, M.R., 2015. Modulatory Role of Simvastatin against Aluminium Chloride-Induced Behavioural and Biochemical Changes in Rats. *Behavioural Neurology*, 2015:210169.
- Nistor, M., Don, M., Parekh, M., Sarsoza, F., Goodus, M., Lopez, G. E., Kawas, C., Leverenz, J., Doran, E., Lott, I. T., Hill, M., Head, E., 2007. Alpha- and Beta-Secretase Activity as a Function of Age and Beta-Amyloid in Down Syndrome and Normal Brain. *Neurobiology of Aging*, 28(10):1493-1506.
- O'Brien, R. J., Wong, P.C., 2011. Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. *Annual Review of Neuroscience*, 34(1):185-204.
- O'Brien, R.J., Wong, P.C.. 2012. Pathological Cascade. *Archives of Medical Research*, 12(3):173-89.
- Öber, A., 2008. Alzheimer Hastalığında Moleküllerin Rolü The Role of Molecules During Alzheimer Disease. 1(1):23-31.
- Özkay, Ü.D., Öztürk, Y. Can, Ö.D., 2011. Yaşlanan Dünyanın Hastalığı: Alzheimer Hastalığı. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 18(1):35-42.
- Öztürk, Z.A., Ünal, A., Yiğiter, R., Yesil, Y., Kuyumcu, M.E., Neyal, M., Kepekçi, Y., 2013. Is Increased Red Cell Distribution Width (RDW) Indicating the Inflammation in Alzheimer's Disease (AD)? *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 56(1):50-54.
- Öztürk, G.B., Karan, M.A., 2004. Alzheimer Hastalığının Fizyopatolojisi. (11):30-34.
- Parsons, Chris G., Wojciech Danysz, Chris G. Parsons. 2017. The NMDA Receptor

Antagonist Memantine as a Symptomatological and Neuroprotective Treatment for Alzheimer ' s Disease ... The NMDA Receptor Antagonist Memantine as a Symptomatological and Neuroprotective Treatment for Alzheimer ' s Disease : Preclinical E. *International Journal of Geriatric Psychiatry* 18(September 2003):S23–32.

Parsons, C.G., Stöffler, A., Danysz, W., 2007. Memantine: A NMDA Receptor Antagonist That Improves Memory by Restoration of Homeostasis in the Glutamatergic System - Too Little Activation Is Bad, Too Much Is Even Worse. *Neuropharmacology*, 53(6):699–723.

Petrozzi, L., Lucetti, C., Scarpato, R., Gambaccini, G., Trippi, F., Bernardini, S., Del Dotto, P., Migliore, L., Bonuccelli, U., 2002. Cytogenetic Alterations in Lymphocytes of Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease Patients. *Neurological Sciences*, 23(0):s97–98.

Pettegrew, J.W., Panchalingam, K., Klunk, W.E., McClure, R.J., Muenz, L.R., 1994. Alterations of Cerebral Metabolism in Probable Alzheimer's Disease: A Preliminary Study. *Neurobiology of Aging*, 15(1):117–32.

Postina, R., Schroeder, A., Dewachter, I., Bohl, J., Schmitt, U., Kojro, E., Prinzen, C., Endres, K., Hiemke, C., Blessing, M., Flamez, P., Dequenue, A., Godaux, E., 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*, 113(10):1456–64.

Prestia, A., Caroli, A., van der Flier, W.M., Ossenkoppele, R., Berckel, B.V., Barkhof, F., Teunissen, C.E., Wall, A.E., Carter, S.F., Schöll, M., Choo, I.H., Nordberg, A., Scheltens, P., Frisoni, G.B., 2013. Prediction of Dementia in MCI Patients Based on Core Diagnostic Markers for Alzheimer Disease. *Neurology*, 80(11):1048–56.

Qiu, C., Winblad, B., Fratiglioni, L., 2005. The Age-Dependent Relation of Blood Pressure to Cognitive Function and Dementia. *The Lancet Neurology*, 4(8):487–99.

Raber, J., Huang, Y., Ashford, J.W., 2004. ApoE Genotype Accounts for the Vast Majority of AD Risk and AD Pathology. *Neurobiology of Aging*, 25(5):641–50.

Reddy, P. H., Beal, M.F., 2008. Amyloid Beta, Mitochondrial Dysfunction and Synaptic Damage: Implications for Cognitive Decline in Aging and Alzheimer's Disease. *Trends in Molecular Medicine*, 14(2):45–53.

Ricardo B. M., Muñoz, J.P., Barbeito, L., 2001. The Molecular Bases of Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders Ricardo. *International Surgery*, 46(6):573–77.

Riss, T. L., Moravec, R. A., 2004. Use of Multiple Assay Endpoints to Investigate the Effects of Incubation Time, Dose of Toxin, and Plating Density in Cell-Based Cytotoxicity Assays. *Assay and Drug Development Technologies*, 2(1):51–62.

Rodney T. P., Collinsb, J.S., Wienera, H., Goa, R.C.P., Actonc, R., 2001. The Role of TNF and Its Receptors in Alzheimer's Disease. 22:873–83.

- Rue, A., Koehler, K. M., Wayne, S. J., Chiulli, S. J., Haaland, K. Y., Garry, P. J.. 1997. Nutritional Status and Cognitive Functioning in a Normally Aging Sample: A 6-y Reassessment. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 65(1):20–29.
- Savini, L., Gaeta, A., Fattorusso, C., Catalanotti, B., Campiani, G., Chiasserini, L., Pellerano, C., Novellino, E., McKissic, D., Saxena, A., 2003. Specific Targeting of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Recognition Sites. Rational Design of Novel, Selective, and Highly Potent Cholinesterase Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46(1):1–4.
- Savva, G.M., Stephan, B.C.M., 2010. Epidemiological Studies of the Effect of Stroke on Incident Dementia. *Stroke*, 41(1).
- Scatton, B., Carter, C., Benavides, J., Giroux, C., 1991. N-Methyl-D-Aspartate Receptor Antagonists: A Novel Therapeutic Perspective for the Treatment of Ischemic Brain Injury. *Cerebrovascular Diseases*, 1(3):121–35.
- Schmechel, D. E., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Crain, B. J., Hulette, C. M., Joo, S. H., Pericak-Vance, M. A., Goldgaber, D., Roses, A. D., 1993. Increased Amyloid Beta-Peptide Deposition in Cerebral Cortex as a Consequence of Apolipoprotein E Genotype in Late-Onset Alzheimer Disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(20):9649–53.
- Selekler, Kaynak. 2010. Derleme Alois Alzheimer ve Alzheimer hastalığı Review Article Alois Alzheimer and Alzheimer's Disease. 2010(May):9–14.
- Serneels, L., Biervliet, J.V., Craessaerts, K., Dejaegere, T., Horr , K., Houtvin, T.V., Esselmann, H., Paul, S., Sch fer, M.K., Berezovska, O., Hyman, B.T., Sprangers, B., Sciot, R., Moons, L., Yang, Z., May, P.C., Karran, E., Wiltfang, J., Hooge, R.D., Serneels, L., Biervliet, W.V., Craessaerts, K., Dejaegere, T., Horr, K., Houtvin, T.V., Esselmann, H., Paul, S., Schafer, M.K., Berezovska, O., Hyman, B.T., Sprangers, B., Sciot, R., Moons, L., Jucker, M., Yang, Z., 2016. Alzheimer ' s Disease 7-Secretase Heterogeneity in the Aph1 Subunit : Relevance For. 3–7.
- Shi, Y., Holtzman, D.M., 2018. Interplay between Innate Immunity and Alzheimer Disease: APOE and TREM2 in the Spotlight. *Nature Reviews Immunology*.
- Shigeri, Yasushi, Rebecca P. Seal, Keiko Shimamoto. 2004. Molecular Pharmacology of Glutamate Transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Research Reviews*, 45(3):250–65.
- 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.
- Smith, K.E., Borden, L.A., Hartig, P.R., Branchek, T., Weinshank, R.L., 1992. Cloning and Expression of a Glycine Transporter Reveal Colocalization with NMDA Receptors. *Neuron*, 8(5):927–35.
- Soc la, K., Nieoczym, D, Rundfeldt, C., Wla , P., 2010. Effects of Sarcosine, a Glycine Transporter Type 1 Inhibitor, in Two Mouse Seizure Models. *Pharmacological*

Reports, 62(2):392–97.

- Stevanović, I.D., Jovanović, M.D., Jelenković, A., Ninković, M., Dukić, M., Stojanović, I., Čolić, M., 2009. The Effect of Inhibition of Nitric Oxide Synthase on Aluminium-Induced Toxicity in the Rat Brain. *General Physiology and Biophysics*, 28(SPECIAL ISSUES):235–42.
- Strittmatter, W. J., Saunders, A. M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G. S., Roses, A. D., 1993. Apolipoprotein E: High-Avidity Binding to Beta-Amyloid and Increased Frequency of Type 4 Allele in Late-Onset Familial Alzheimer Disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(5):1977–81.
- Strzelecki, D., Podgórski, M., Kałużyńska, O., Kotelnicka, O.G., Stefańczyk, L., Antczak, M.K., Gmitrowicz, A., Grzelak, P., 2015. Supplementation of Antipsychotic Treatment with Sarcosine - GlyT1 Inhibitor - Causes Changes of Glutamatergic fNMR Spectroscopy Parameters in the Left Hippocampus in Patients with Stable Schizophrenia. *Neuroscience Letters*, 606:7–12.
- Sumathi, T., Shobana, C., Thangarajeswari, M., Usha, R., 2015. Protective Effect of L-Theanine against Aluminium Induced Neurotoxicity in Cerebral Cortex, Hippocampus and Cerebellum of Rat Brain – Histopathological, and Biochemical Approach. *Drug and Chemical Toxicology*, 38(1):22–31.
- Sun, X., Zhang, Y., 2011. Amyloid Hypothesis and Alzheimer's Disease. *Laboratory of Neurobiology and State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, College of Life Sciences, Peking University, Beijing, China*
- Tamagno, E., Bardini, P., Obbili, A., Vitali, A., Borghi, R., Zaccheo, D., Pronzato, M.A., Danni, O., Smith, M.A., Perry, G., Tabaton, M., 2002. Oxidative Stress Increases Expression and Activity of BACE in NT2neurons. *Neurobiology of Disease*, 10(3):279–88.
- Taşci, S., Kartın, P.T., Ceyhan, Ö., Sungur, G., Göriş, S., 2012. Living with an Alzheimer Patient in Turkey. *Journal of Neuroscience Nursing*, 44(4):228–34.
- Thinakaran, G., Koo, E.H., 2008. Amyloid Precursor Protein Trafficking, Processing, and Function. *Journal of Biological Chemistry*, 283(44):29615–19.
- Thomas, P., Fenech, M., 2006. A Review of Genome Mutation and Alzheimer's Disease. *Mutagenesis*, 22(1):15–33.
- Tong, Y., Zhou, W., Fung, V., Christensen, M. A., Qing, H., Sun, X., Song, W., 2005. Oxidative Stress Potentiates BACE1 Gene Expression and A β Generation. *Journal of Neural Transmission*, 112(3):455–69.
- Trippi, F., Botto, N., Scarpato, R., Petrozzi, L., Bonuccelli, U., Latorraca, S., Sorbi, S., Migliore, L., 2001. Spontaneous and Induced Chromosome Damage in Somatic Cells of Sporadic and Familial Alzheimer's Disease Patients. *Mutagenesis*, 16(4):323–27.

- Uchihara, T., Duyckaerts, C., He, Y., Kobayashi, K., Seilhean, D., Amouyel, P., Hauw, J. J., 1995. ApoE Immunoreactivity and Microglial Cells in Alzheimer's Disease Brain. *Neuroscience Letters*, 195(1):5–8.
- Ulusu, N. N., 2015. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency and Alzheimer's Disease : Partners in Crime ? The Hypothesis. *Medical Hypotheses*, 85(2):219–23.
- Valenzuela, M.J., Sachdev, P., 2006. Brain Reserve and Dementia: A Systematic Review. *Psychological Medicine*, 36(4):441–54.
- Vetrivel, K.S., Zhang, Y., Xu, H., Thinakaran, G., 2006. Pathological and Physiological Functions of Presenilins. *Molecular Neurodegeneration*, 1(1):4.
- Villemagne, V.L., Burnham, S., Bourgeat, P., Brown, B., Ellis, K.A., Salvado, O., Szoeki, C., Macaulay, S.L., Martins, R., Maruff, P., Ames, D., Rowe, C.C., Masters, C.L., 2013. Amyloid β Deposition, Neurodegeneration, and Cognitive Decline in Sporadic Alzheimer's Disease: A Prospective Cohort Study. *The Lancet Neurology*, 12(4):357–67.
- van der V., Gijsbert B., Brandsma, A.E., Heijink, E., de Wolff, F.A., 1992. Accumulation of Aluminium in Rat Liver: Association with Constituents of the Cytosol. *Pharmacology & Toxicology*, 70(3):173–76.
- Van giau, V., Vorapun S., Bagyinszky, E., Limwongse, C., Seong, S., Kim, S.Y., 2018. Neuropsychiatric Disease and Treatment Dovepress Identification of a Novel Mutation in APP Gene in a Thai Subject with Early-Onset Alzheimer's Disease.
- 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)(Pt 1):21–40.
- Wang, B., Yang, W., Wen, W., Sun, J., Su, B., Liu, B., Ma, D., Lv, D., Wen, Y., Qu, T., Chen, M., Sun, M., Shen, Y., Zhang, X., 2010. Gamma-Secretase Gene Mutations in Familial Acne Inversa. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6007):1065.
- Wang, H.X., Wahlin, Å., Basun, H., Fastbom, J., Winblad, B., Fratiglioni, L., 2001. Vitamin B12 and Folate in Relation to the Development of Alzheimer's Disease. *Neurology*, 56(9):1188–94.
- Waxman, E.A., Lynch, D.R., 2005. N-Methyl-D-Aspartate Receptor Subtypes: Multiple Roles in Excitotoxicity and Neurological Disease. *Neuroscientist*, 11(1):37–49.
- Wilson, R.S., Barral, S., Lee, J.H., Leurgans, S.E., Foroud, T.M., Sweet, R.A., Radford, N.G., Bird, T.D., Mayeux, R., Bennett, D.A., 2011. Heritability of Different Forms of Memory in the Late Onset Alzheimer's Disease Family Study. *Journal of Alzheimer's Disease*, 23(2):249–55.
- Wong, E. H. F., Kemp, J. A., 1991. Sites for Antagonism on the N-Methyl-D-Aspartate Receptor Channel Complex. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 31(1):401–25.

- Yagami-Hiromasa, T., Sato, T., Kurisaki, T., Kamijo, K., Nabeshima, Y., Fujisawa-Sehara, A., 1995. A Metalloprotease-Disintegrin Participating in Myoblast Fusion. *Nature*, 377(6550):652–56.
- Yu, J., Celli, M.G., Zhu, H., Bhat, N.R., Sambamurti, K., Celli, S.G., Kindy, M.S., 2011. Vitamin D3-Enriched Diet Correlates with a Decrease of Amyloid Plaques in the Brain of A β PP Transgenic Mice. *Journal of Alzheimer's Disease*, 25(2):295–307.
- Zatta, P., Taylor, A., Zambenedetti, P., Milacic, R., dell'Antone, P., 2000. Aluminum Inhibits the Lysosomal Proton Pump from Rat Liver. *Life Sciences*, 66(23):2261–66.
- Zenaro, E., Pietronigro, E., Bianca, V.D., Piacentino, G., Marongiu, L., Budui, S., Turano, E., Rossi, B., Angiari, S., Dusi, S., Montesor, A., Carlucci, T., Nani, S., Tosadori, G., Calciano, L., Catalucci, D., Berton, G., Bonetti, B., Constantin G., 2015. Neutrophils Promote Alzheimer's Disease-like Pathology and Cognitive Decline via LFA-1 Integrin. *Nature Medicine*, 21(8):880–86.

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 yazımız; 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 karar 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, Triptofan, 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 görüldü.

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/bizim-veteriner-fakultesi
Kop Adresi: atanni@koll.kop.tr

Bilgi: Mehmet EÖCA
Faks: +90 442 2317246
E-Posta: vethko@atauni.edu.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 : Somuç Raporu. 1 Adet.

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi 25240 Erzurum
Tel: +90 442 2317222
Elektronik Ađ: <http://www.atauni.edu.tr/birim=veteriner-fakultesi>
Kop Adresi: atauni@ho1.kop.tr

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



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı-Soyadı : Arzugül TANAS
Uyruğu : T.C. / TUR
Doğum Tarihi ve Yeri : 24.07.1993 / ERZURUM
Medeni Hali : Bekar
Telefon : +905370414279
e-mail : arzugultns07@gmail.com

Eğitim

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