



**SERİN DİYET UYGULAMALARININ
DENEYSEL ALZHEIMER MODELİNDE
NÖROPROTEKTİF ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Özlem ÖZDEMİR TOZLU

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

**2018
Her hakkı saklıdır.**



FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZİ

**SERİN DİYET UYGULAMALARININ
DENEYSEL ALZHEIMER MODELİNDE
NÖROPROTEKTİF ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Özlem ÖZDEMİR TOZLU

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Erzurum

2018

Her hakkı saklıdır

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

**SERİN DİYET UYGULAMALARININ DENEYSEL ALZHEIMER
MODELİNDE NÖROPROTEKTİF ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ danışmanlığında, Özlem ÖZDEMİR TOZLU tarafından hazırlanan bu çalışma 19 / 10 / 2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **Oy birliği / Oy çokluğu ile (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Abdulgani TATAR *İmza* :

Üye : Prof. Dr. Lokman UZUN *İmza* :

Üye : Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ *İmza* :

Üye : Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ *İmza* :

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Elanur AYDIN KARATAŞ *İmza* :

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.

19 / 10 / 2018

Özlem ÖZDEMİR TOZLU

ÖZET

DOKTORA TEZİ

SERİN DİYET UYGULAMALARININ DENEYSEL ALZHEIMER MODELİNDE NÖROPROTEKTİF ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖZLEM ÖZDEMİR TOZLU

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ

Alzheimer hastalığı (AH), sinaptik işlev bozukluğu ve nörodejenerasyonun eşlik ettiği amiloid- β ($A\beta$) plakların ve beyinde nörofibriler yumakların birikmesi ile karakterize edilen nörodejeneratif bir hastalıktır. Hastalığın ilerlemesini yavaşlatacak etkin bir tedavi henüz bulunamamıştır. Bu nedenle deneysel hayvan modelleri kullanılarak yapılan terapötik çalışmalar oldukça önemli hale gelmiştir. Çalışmamızda nöroprotektif etkileri bilinen D-sikloserin ve L-serin aminoasitleri kullanılmıştır. D-sikloserin ve L-serin aminoasitlerinin potansiyel etkileri $AlCl_3$ maruziyeti ile deneysel AH modeli oluşturulan ratlarda davranış testleri ile biyokimyasal, hematolojik ve histopatolojik değerlendirmelerin yanısıra moleküler genetik analizler ile belirlenmiştir. Çalışmada 30 adet dişi Sprague-Dawley rat kullanılarak 6 grup oluşturulmuştur: Grup 1 Kontrol grubu ($n=5$), Grup 2 $AlCl_3$ uygulaması ile deneysel AH oluşturulan grup ($n=5$), Grup 3 Tedavi amaçlı D-sikloserin verilen grup ($n=5$), Grup 4 Tedavi amaçlı L-serin verilen grup ($n=5$), Grup 5 D-sikloserin grubu (Sadece D-sikloserin $n=5$), Grup 6 L-serin grubu (Sadece L-serin $n=5$). $AlCl_3$ maruziyeti ile AH oluşturulan ratlarda oksidatif stres ve nörodejenerasyon görülmüş olup davranış testleri ile de $AlCl_3$ ile oluşturulan deneysel AH modeli doğrulanmıştır. Ayrıca moleküler genetik analizler ile alüminyumun β -sekretaz ve γ -sekretaz aktivitelerini artırırken α -sekretaz aktivitesini azalttığı bulunmuştur. D-sikloserin ve L-serin uygulaması ile alüminyum toksisitesi nedeniyle oluşan nörodejenerasyonda iyileşme sağlanırken oksidatif hasar engellenmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen bulguların $AlCl_3$ 'e bağlı nörodejenerasyon ve bilişsel bozukluğa karşı iyileştirici potansiyele sahip yeni bileşiklerin sentezlenmesine ve ilaç geliştirme araştırmalarına katkı sağlayacağına inanılmaktadır.

2018, 86 sayfa

Anahtar Kelimeler: Alzheimer hastalığı, $AlCl_3$, D-sikloserin, L-serin, Nöroprotektif

ABSTRACT

Ph.D

EVALUATION OF THE NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF SERINE DIET APPLICATIONS ON EXPERIMENTAL ALZHEIMER'S DISEASE MODEL

ÖZLEM ÖZDEMİR TOZLU

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 the accumulation of amyloid- β ($A\beta$) plaques and neurofibrillary tangles in the brain accompanied by synaptic dysfunction and neurodegeneration. No effective treatment has been found to slow the progression of the disease. Therapeutic studies using experimental animal models have therefore become very important. In our study, D-cycloserine and L-serine with neuroprotective effects were used. The potential effects of D-cycloserine and L-serine in $AlCl_3$ induced experimental rat model of AD were determined by behavioral tests, pathological examination, biochemical and hematological evaluation and molecular genetics analyses. In this study, 6 groups of female Sprague-Dawley rats were used: Group 1 Control group (n = 5), Group 2 Experimental AD group with administration of $AlCl_3$ (n = 5), Group 3 Treatment with D-cycloserine (n = 5), Group 4 Treatment with L-serine (n = 5), Group 5 D-cycloserine group (only D-cycloserine n = 5), Group 6 L-serine group (only L-serine n = 5). Oxidative stress and neurodegeneration were observed in $AlCl_3$ induced experimental rat model of AD and the experimental AD rat model was confirmed by behavioral tests. In addition, it has been found that aluminum decreases α -secretase activity while increasing β -secretase and γ -secretase activities by molecular genetic analysis. D-cycloserine and L-serine application resulted in an improvement in neurodegeneration and oxidative damage caused by aluminum toxicity. It is believed that the results of this study will contribute to the synthesis of new compounds with improved potential against $AlCl_3$ -induced neurodegeneration and cognitive impairment and to the research of drug development.

2018, 86 pages

Keywords: Alzheimer's disease, $AlCl_3$, D-cycloserine, L-serine, Neuroprotective

TEŞEKKÜR

Tüm doktora eğitimim ve tez çalışmam boyunca daima cesaret verici ve yol gösterici olan, katkılarını ve yardımlarını benden esirgemeyen danışmanım ve kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ'e,

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

Tez çalışması sırasında davranış testlerinin uygulanmasında yardımlarını esirgemeyen Atatürk Üniversitesi Farmakoloji Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Ufuk Okkay'a, dokuların patolojik incelemesinde destek olan Atatürk Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi Dr. Öğr. Üyesi Onur Ceylan'a,

Tez çalışmamın uygulama kısımlarında yardımcı olan Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencileri Arzugül TANAS ve Tuğba GEZMİŞ'e,

Destegini her zaman hissettiğim, üzerimde yadsınamaz bir emeği olan çalışma arkadaşım Arş. Gör. Fatma Necmiye KACI'ya,

Bu günlere gelmemde en büyük pay sahibi olan, destegini ve sevgisini hiçbir zaman esirgemeyen aileme ve çok sevgili eşim Ufuk TOZLU'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Özlem ÖZDEMİR TOZLU

19 / 10 / 2018

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Alzheimer Hastalığı	1
1.2. Alzheimer Hastalığının Patofizyolojisi.....	2
1.2.1. Aβ Plakları.....	3
1.2.2. Nörofibriler Yumaklar	4
1.2.3. Amiloid Kaskad Hipotezi	5
1.3. Alzheimer Hastalığı Türleri.....	6
1.3.1. Erken Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı.....	7
1.3.2. Geç Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı.....	7
1.3.2.1. Genetik.....	8
1.3.2.2. Epigenetik	10
1.3.2.3. Çevre.....	10
1.4. İşaretler ve Belirtiler	12
1.5. Tedavi	13
1.6. N-metil D-aspartat Reseptörü	15
2. KAYNAK ÖZETLERİ	19
3. MATERYAL ve YÖNTEM	23
3.1. Materyaller.....	23
3.1.1. Kimyasallar.....	23
3.1.2. Cihazlar.....	23
3.2. Yöntem	24
3.2.1. <i>In vitro</i> Çalışmalar	24
3.2.1.1. Hücre kültürü	24
3.2.1.2. SH-SY5Y Hücrelerinin Farklılaştırılması	25
3.2.1.3. WST-8 Testi.....	25

3.2.1.4. LDH Testi	26
3.2.1.5. Metal Şelatlama Çalışması.....	27
3.2.2. <i>In vivo</i> Çalışmalar	27
3.2.2.1. Deney Hayvanları	27
3.2.2.2. Vücut Ağırlığı.....	29
3.2.2.3. Davranış Testleri.....	29
3.2.2.4. Biyokimyasal Analizler	32
3.2.2.5. Hematolojik Analizler	32
3.2.2.6. Toplam Antioksidan Kapasite (TAK) Analizi.....	33
3.2.2.7. Toplam Oksidatif Stres (TOS) Analizi	33
3.2.2.8. Mikroçekirdek Testi.....	33
3.2.2.9. Patolojik İnceleme	34
3.2.2.10. Moleküler Genetik Analizler	34
3.2.2.10.1. Dokudan RNA İzolasyonu.....	34
3.2.2.10.2. Spektrofotometrik RNA Ölçümü.....	35
3.2.2.10.3. cDNA Sentezi	35
3.2.2.10.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PZR)	36
3.2.3. İstatistiksel Analizler	37
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	38
4.1. <i>In vitro</i> AlCl ₃ Toksikite Sonuçları	38
4.2. <i>In vitro</i> Hücrel AH Modelinin AlCl ₃ İle İndüklenen Sitotoksitesinde DCS ve LS'nin Nöroprotektif Potansiyelleri	39
4.3. Metal şelatlama	43
4.4. Vücut Ağırlığı Değişimi	44
4.5. Davranış Testi Bulguları.....	45
4.5.1. Morris Su Tankı Bulguları.....	45
4.5.2. Pasif Sakınma Testi Bulguları	49
4.6. Biyokimyasal Bulgular	51
4.7. Hematolojik Bulgular	52
4.8. TAK ve TOS Testleri.....	54
4.9. Mikroçekirdek Testi.....	56
4.10. Patolojik Değerlendirme	57
4.11. <i>In vivo</i> Deneysel AH Rat Modelinde Moleküler Genetik Yanıtlar	59
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	67
KAYNAKLAR	68

EKLER	81
EK-1 Etik Kurul Onayı.....	81
ÖZGEÇMİŞ	83



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
°	Derece
mg	Miligram
L	Litre
g	Gram
mM	Milimolar
cm	Santimetre
dk	Dakika

Kısaltmalar

AChE	Asetilkolin Esteraz
ADAM	Disintegrin ve metalloproteinaz
AH	Alzheimer Hastalığı
Al	Alüminyum
AlCl ₃	Alüminyum Klorür
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amiloid Prekürsör Protein
APP	Amiloid Prekürsör Protein
A β	Amiloid beta
BACE	β Sekretaz Enzimi
BDNF	Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör
cAMP	Siklik Adenozin Mono Fosfat
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
CTF- α	C-terminal fragmanı- α
DCS	D-sikloserin
EBAH	Erken Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı
GBAH	Geç Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı
i.p	İntraperitoneal
LDH	Laktat Dehidrogenaz
LS	L-serin

MSS	Merkezi sinir sistemi
MTT	4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolyum bromür
MWM	Morris su tankı
NF- κ B.	Nükleer Faktör Kappa B
NFT	Nörofilament kümeleri
NFY	Nörofibriler Yumaklar
NMDA	N-metil D-aspartat
PS1	Presenilin 1 geni
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
RT-PCR	Ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu
TAK	Toplam Antioksidan Kapasite
TNF- α	Tümör Nekrozu Faktörü α
TOD	Toplam Oksidatif Stress
α -CTF	C terminal fragman alfa
β -CTF	C terminal fragman beta
γ -sekretaz	Gama sekretaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Sağlıklı Beyin ve Alzheimer Hastalığı Olan Beyin Arasındaki Karşılaştırma	1
Şekil 1.2. Sağlıklı Bir Nöronal Hücre ve AH Patolojisi Olan Bir Nöronal Hücre	3
Şekil 1.3. Amiloid Prekürsör Protein (APP) Proteolizi ve İki Alternatif Yol	4
Şekil 1.4. Tau Metabolik Yolu ve Nörofibriler Yumak Oluşumu.....	5
Şekil 1.5. Amiloid Kaskad Hipotezi.....	6
Şekil 1.6. Alzheimer Hastalığı Riskine Katkıda Bulunan Nadir ve Yaygın Varyantlar ..	9
Şekil 1.7. DCS Yapısı.....	17
Şekil 1.8. LS Yapısı.....	18
Şekil 3.1. A) WST ve WST-8 Yapısı B) WST-8 ile Hücre Canlılığı Tespiti Prensibi...	26
Şekil 3.2. LDH ile Sitotoksitesite Tespiti Prensibi.....	27
Şekil 3.3. İntraperitoneal Enjeksiyon	29
Şekil 3.4. Morris Su Tankı Deney Düzenegi.....	30
Şekil 3.5. Morris Su Tankı Görünümü	31
Şekil 3.6. Pasif Sakınma Testi Görünümü.....	32
Şekil 4.1. (A) Farklılaşmamış SH-SY5Y Hücreleri, (B) RA Kullanılarak Farklılaşmış SH-SY5Y Hücreleri.....	39
Şekil 4.2. Farklılaşmış SH-SY5Y Hücrelerinde AlCl ₃ Toksisitesine Karşı DCS'nin Etkisi	40
Şekil 4.3. Farklılaşmış SH-SY5Y Hücrelerinde AlCl ₃ Toksisitesine Karşı LS'nin Etkisi	41
Şekil 4.4. Farklılaşmış SH-SY5Y Hücrelerinde AlCl ₃ Toksisitesine Karşı DCS'nin LDH Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	41
Şekil 4.5. Farklılaşmış SH-SY5Y Hücrelerinde AlCl ₃ Toksisitesine Karşı LS'nin LDH Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	42
Şekil 4.6. DCS'nin Al ³⁺ , Fe ³⁺ , Cu ²⁺ ve Zn ²⁺ Varlığında UV-Vis Spektrumu	44
Şekil 4.7. LS'nin Al ³⁺ , Fe ³⁺ , Cu ²⁺ ve Zn ²⁺ Varlığında UV-Vis Spektrumu	44
Şekil 4.8. 5.Günde Kontrol Grubundan Bir Hayvanın Platformun Önceki Günlerde Bulunduğu Kadrandaki (Kuzey-Batı) Geçirdiği Süreyi Gösteren Sıcaklık Haritası	46
Şekil 4.9. 5.Günde AlCl ₃ Grubundan Bir Hayvanın Platformun Önceki Günlerde Bulunduğu Kadrandaki (Kuzey-Batı) Geçirdiği Süreyi Gösteren Sıcaklık Haritası	46
Şekil 4.10. 5.Günde DCS Grubundan Bir Hayvanın Platformun Önceki Günlerde Bulunduğu Kadrandaki (Kuzey-Batı) Geçirdiği Süreyi Gösteren Sıcaklık Haritası	47

Şekil 4.11. 5.Günde LS Grubundan Bir Hayvanın Platformun Önceki Günlerde Bulunduğu Kadrandan (Kuzey-Batı) Geçirdiği Süreyi Gösteren Sıcaklık Haritası	47
Şekil 4.12. 5.Günde $AlCl_3+DCS$ Grubundan Bir Hayvanın Platformun Önceki Günlerde Bulunduğu Kadrandan (Kuzey-Batı) Geçirdiği Süreyi Gösteren Sıcaklık Haritası	48
Şekil 4.13. 5.Günde $AlCl_3+LS$ Grubundan Bir Hayvanın Platformun Önceki Günlerde Bulunduğu Kadrandan (Kuzey-Batı) Geçirdiği Süreyi Gösteren Sıcaklık Haritası	48
Şekil 4.14. <i>In vivo</i> Beyin Dokusunda DCS, LS ve $AlCl_3$ 'ün TAK Düzeyi Üzerine Etkileri	55
Şekil 4.15. <i>In vivo</i> Beyin Dokusunda DCS, LS ve $AlCl_3$ 'ün TOS Düzeyi Üzerine Etkileri	56
Şekil 4.16. <i>In vivo</i> Şartlarda DCS, LS ve $AlCl_3$ İle Muamele Edilen Ratların Kan Smear Örneğinde Gözlenen Mikroçekirdek Sıklıkları	57
Şekil 4.17. Tüm Deney Gruplarına Ait Beyin Dokularının Işık Mikroskobu Görüntüleri	58
Şekil 4.18. Tüm Gruplara Ait Beyin Örneklerindeki APP Ekspresyon Düzeylerinin Dağılımı	62
Şekil 4.19. Tüm Gruplara Ait Beyin Örneklerindeki BACE1 Ekspresyon Düzeylerinin Dağılımı	62
Şekil 4.20. Tüm Gruplara Ait Beyin Örneklerindeki ADAM10 Ekspresyon Düzeylerinin Dağılımı	63
Şekil 4.21. Tüm Gruplara Ait Beyin Örneklerindeki NCTSN, APH1A, PSENEN ve PSEN1 Ekspresyon Düzeylerinin Dağılımı	63
Şekil 4.22. Tüm Gruplara Ait Beyin Örneklerindeki TNF- α Ekspresyon Düzeylerinin Dağılımı	64
Şekil 4.23. Tüm Gruplara Ait Beyin Örneklerindeki BDNF Ekspresyon Düzeylerinin Dağılımı	65
Şekil 4.24. Tüm Gruplara Ait Beyin Örneklerindeki DAXX Ekspresyon Düzeylerinin Dağılımı	66

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Araştırmada Kullanılan Kit ve Kimyasal Listesi.	23
Çizelge 3.2. Araştırmada Kullanılan Cihaz Listesi	24
Çizelge 3.3. Çalışmada Kullanılan Hayvan Sayısı ve Gruplar	28
Çizelge 3.4. cDNA Karışım Miktarı.....	35
Çizelge 3.5. cDNA Sentezi İçin Uygulanan PZR Programı.....	35
Çizelge 3.6. RT-PZR' de Kullanılan Primerler	36
Çizelge 3.7. RT-PZR İçin Her Bir Tüpe Konan Bileşikler	37
Çizelge 3.8. Uygulanan RT-PZR Programı.....	37
Çizelge 4.1. Farklılaşmış SH-SY5Y Hücrelerinde AlCl ₃ 'ün Sitotoksitesi.....	39
Çizelge 4.2. Ratların Uygulama Öncesi ve Sonrası Vücut Ağırlıkları	45
Çizelge 4.3. Morris Su Tankı Testi Beşinci Gün Sonuçları	45
Çizelge 4.4. Pasif Sakınma Testi İlk Gün Sonuçları	49
Çizelge 4.5. Pasif Sakınma Testi İkinci Gün Sonuçları	50
Çizelge 4.6. Tüm Deney Gruplarına Ait Biyokimyasal Bulgular	51
Çizelge 4.7. Tüm Deney Gruplarına Ait Hematolojik Bulgular.....	53
Çizelge 4.8. . DCS, LS ve AlCl ₃ 'ün Beyin Dokusunun Nispi Ağırlığı Üzerindeki Etkileri	58
Çizelge 4.9. Tüm Gruplara Ait Beyin Örneklerindeki Genlerin Ekspresyon Değişiklikleri	60

1. GİRİŞ

1.1. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı (AH) ilk kez 1906 yılında Doktor Alois Alzheimer tarafından bilişsel bozukluk, sanrılar ve bozulmuş sosyal fonksiyon belirtileri gösteren 51 yaşındaki bir hastada tanımlanmıştır. Post-mortem muayenesinde, şu anda bu hastalığın ayırt edici özellikleri olarak bilinen nörolojik amiloid plaklar ve nörofibriler yumaklar saptanmıştır (Alzheimer et al. 1995). AH'nin bu nöropatolojik belirleyicilerinin, nörotoksisite, inflamasyon ve nöronal disfonksiyona neden olduğu, dolayısıyla bilişsel bozukluğa neden olduğu düşünülmektedir (Eikelenboom et al. 2006). Nöronal ve sinaptik hasar başlangıçta beyindeki yeni anıların oluşmasından sorumlu olan parahipokampal bölgelerdedir. Ancak, daha sonra patoloji yayılmakta ve kortikal atrofi ile ventriküler genişlemeye neden olmaktadır. Bu durum Şekil 1.1'de gösterildiği gibi toplam beyin kitlesini %35'e kadar azaltmaktadır (Farfara et al. 2008; Alves et al. 2012).



Şekil 1.1. Sağlıklı Beyin ve Alzheimer Hastalığı Olan Beyin Arasındaki Karşılaştırma (https://www.alz.org/braintour/images/alzheimer_brain.jpg).

AH, demansın en sık nedeni olarak görülmekte ve demanslı populasyonun %77'sini oluşturmaktadır (Alzheimer's Association 2015). 2015 yılına ait verilere göre Dünya genelinde 46,8 milyon demans hastası bulunmaktadır (Wimo et al. 2017). Bu rakamın her 20 yılda bir ikiye katlanması ve 2050 yılına kadar dünya genelinde 131,5

1. GİRİŞ

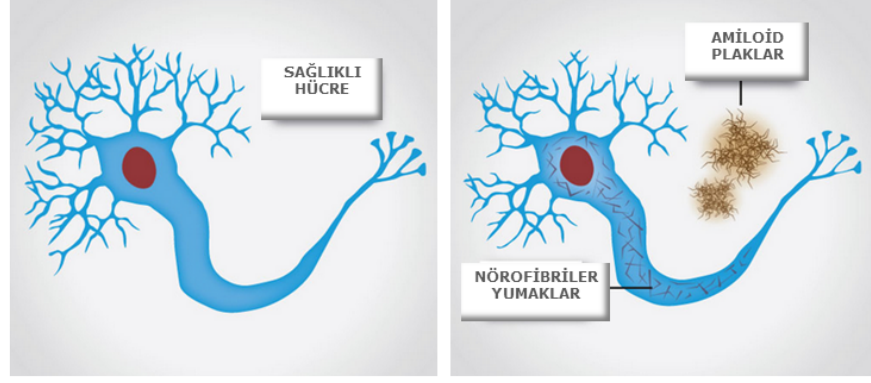
milyona ulaşması öngörülmektedir (Ferri et al. 2005; Alzheimer's Association 2015; Lewis and Torgerson 2016).

AH'nin küresel maliyetinin 2018 yılına kadar 1 trilyon ABD dolarını geçmesi öngörülmektedir (Wimo et al. 2017). Bu, AH'nin sadece bu hastalara bakan aile üyeleri üzerinde değil, aynı zamanda ulusal ve uluslararası ekonomi üzerinde de büyük bir etkisi olduğunu göstermektedir. Kalp hastalıkları ve inme gibi diğer hastalıklara bağlı ölüm sayısı önemli ölçüde azalırken AH'ye bağlı ölümler 2000 ve 2013 yılları arasında %71 oranında artmıştır. Bununla birlikte, diğer hastalıklarla kıyaslandığında terapötik uygulama seviyesine gelmiş en düşük bileşik sayısına sahip olan bu hastalığın tedavisine yönelik başarılı farmasötik araştırmaların yetersiz olduğu bilinmektedir. (Alzheimer's Association 2015; Lewis and Torgerson 2016).

1.2. Alzheimer Hastalığının Patofizyolojisi

AH'nin klinik olarak diğer demans formlarından ayırt edilmesi çok zordur ve beyindeki amiloid plaklar ve nörofibriler yumaklar post mortem tanımlanana kadar AH kesin olarak teşhis edilememektedir (Şekil 1.2). Bu nedenle, semptomlar ve bilişsel değerlendirmelere dayanarak, hastaya sadece muhtemel AH tanısı konulabilmektedir. Bu durumda, şüpheli AH'yi teşhis etmek, tedavi etmek ve yönetmek son derece sorunlu hale gelmektedir. Bu sebeple devam etmekte olan araştırmaların büyük çoğunluğu, yaşayan hastalarda bu belirleyicilerin ve diğer belirteçlerin görüntülenmesi üzerine kurulmuştur.

AH, birçok nörodejeneratif hastalık gibi, bazı yanlış katlanmış proteinlerin agregasyonu ile karakterize edilmektedir. AH'nin temel belirteçleri olan iki protein, amiloid plaklar ve nörofibriler yumaklar, Şekil 1. 2' de gösterilmiştir.



Şekil 1.2. Sağlıklı Bir Nöronal Hücre (Sol) ve AH Patolojisi Olan Bir Nöronal Hücre (Sağ) ([http: www.alzheimersresearchuk.org brain-tour](http://www.alzheimersresearchuk.org/brain-tour)).

1.2.1. A β Plakları

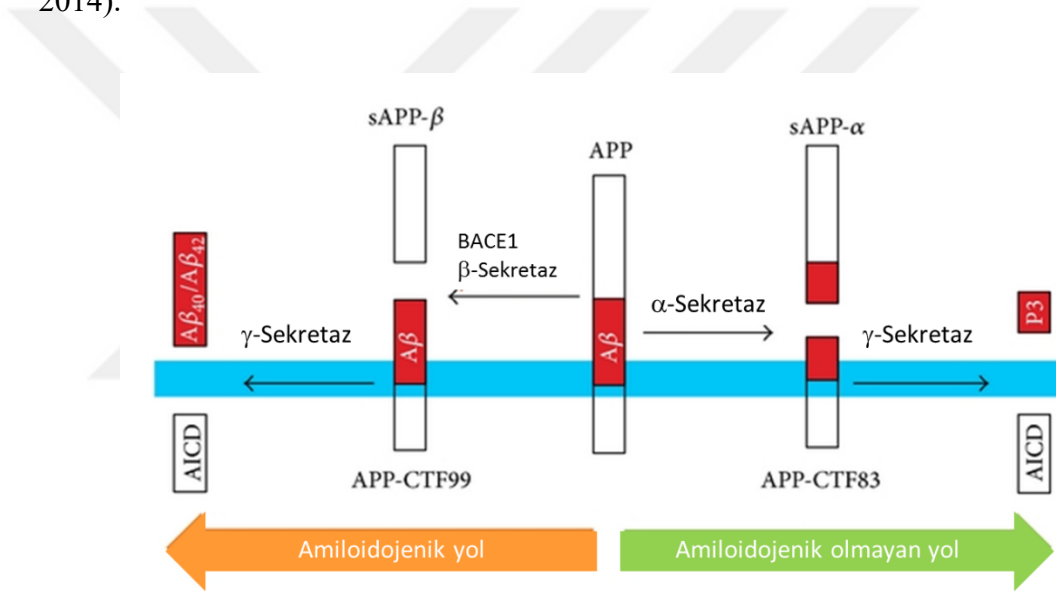
Amiloid plakların temel bileşeni olan A β peptid birikimi AH'nin nöropatolojik mekanizmasında birincil olay olarak kabul edilmiştir (Hardy and Allsop 1991). Nörofibriller yumakların nöron ölümü ve vasküler hasarın amiloid birikimi sonucunda ikincil olarak geliştiği öne sürülmüştür (Hardy and Higgins 1992).

Amiloid plaklar, Amiloid Prekürsör Protein (APP) 'nin α -, β - ve γ - sekretazlarla proteolizi sonucunda oluşmaktadır (Bu 2009). APP, çeşitli dokularda özellikle nöronal sinapslarda eksprese edilen ve hücrel membranlarda bulunan bir proteindir. APP'nin birincil işlevi hala bilinmemekle birlikte, en iyi tanımlanmış rolü, sinaps oluşumu ve aktarımıdır (Turner et al. 2003; Priller et al. 2006). APP proteoliz, hangi sekretaz enzimlerinin rol oynadığına bağlı olarak iki şekilde gerçekleşmektedir: 1) amiloidojenik yol, 2) amiloidojenik olmayan yol (Thinakaran and Koo 2008) (Şekil 1.3). Amiloidojenik olmayan yolda α -sekretaz enzimi APP'yi transmembran bölgesinde 687. pozisyondan kesmekte ve amino ucunda nörotrofik etkileri ile bilinen çözülebilir amiloid prekürsör protein alfa (APPs α) ve karboksil uca membrana bağlı 83 aa'lık C terminal alfa fragmanı (α -CTF) oluşmaktadır. İlk kesimini takiben bir aspartil proteaz kompleksi olan γ -sekretaz ile ikinci kesilme işlemi gerçekleşmektedir ve sonucunda inert p3 fragmanı ve 49-50 aa'lık APP intraselüler domain (AICD) isimli fragman oluşmaktadır. Amiloidojenik yolda ise APP, ilk olarak β -sekretaz enzimi ile proteinin amino terminaline 16 aminoasit daha yakın bir bölgeden kesilmektedir. Bu durumda ise çözülebilir amiloid prekürsör protein beta (APPs β) ve C terminal fragman beta (β -CTF) oluşmaktadır. β -sekretazla kesimin ardından, γ -sekretaz ile ikinci kesilme sonucunda stabil A β peptidi ile AICD

1. GİRİŞ

oluşmaktadır. Amiloidojenik yolda $A\beta$ peptidinin uzunluğu γ -sekretaz enzimi ile belirlenmektedir (Thinakaran and Koo 2008) ve γ -sekretazın APP'yi kestiği yere göre $A\beta_{1-40}$ veya $A\beta_{1-42}$ oluşmaktadır. Oluşan $A\beta$ peptidlerinin yaklaşık olarak %90'ı $A\beta_{1-40}$ 'dır. Ancak amiloid birikiminin ana sorumlusu $A\beta_{1-42}$ 'dir. Molekül, çok hidrofobiktir ve agregasyon gösterme eğilimindedir.

Yüksek β -sekretaz seviyelerinin amiloidojenik yolun olasılığını arttırdığı da bilinmektedir. $A\beta$, çoğunlukla sinapsların post-sinaptik kompartmanında birikerek hem sinaptik hem de dendritik kayba yol açmaktadır (Shankar et al. 2008; Minati et al. 2009). $A\beta_{42}$ 'nin bazı genlerin ekspresyonunu değiştirerek gen transkripsiyonunda da yer aldığı ve bu mekanizma yoluyla AH patolojisinde rol oynadığı bilinmektedir (Barucker et al. 2014).



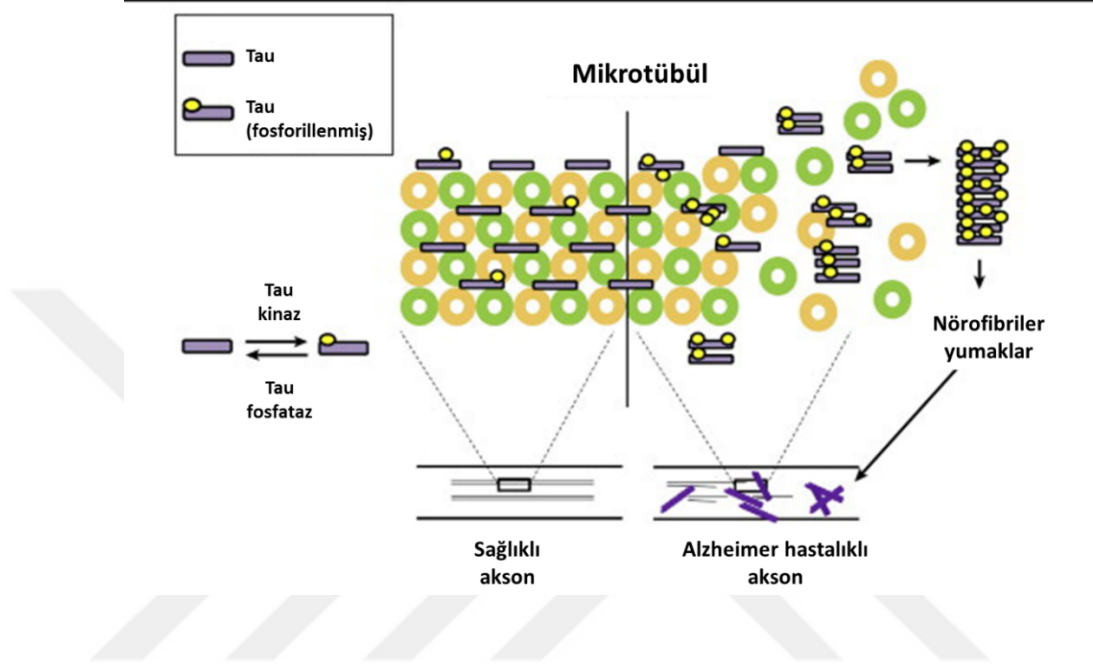
Şekil 1.3. Amiloid Prekürsör Protein (APP) Proteolizi ve İki Alternatif Yol (Thinakaran and Koo 2008).

1.2.2. Nörofibriler Yumaklar

Nörofibriler yumakların (NFY) ana bileşeni olan Tau, mikrotübül bağlayıcı bir proteindir ve hücrelerde nöronal mikrotübüllerin stabilize edilmesinde, aksonal büyüme ve gelişmede oldukça önemlidir (Roy et al. 2005). Mikrotübül ilişkili tau (*MAPT*) geni tarafından kodlanmaktadır. NFY'de yer alan tau proteinleri hiperfosforillenmiş proteinlerdir ve bu da çift sarmal filamanların birikmesine ve oluşmasına neden olmaktadır. Bunlar, hücre sitoplazması içinde toplanan, besin aktarımını bloke eden ve

1. GİRİŞ

nörotoksik düğümleri oluşturan β -katlı levhalar oluşturmaktadırlar (Mandelkow and Mandelkow 1998). Bir AH beynindeki NFY'lerin miktarı hastalığın derecesi ile ilişkiliyken, A β birikiminin doğrudan bir ilişkisi gösterilmemiştir (Arriagada et al. 1992). Nöronal çalışmalar ayrıca, A β plaklarının nörotoksik olması için NFY'lerin mevcut olması gerektiğini göstermiştir (Rapoport et al. 2002).

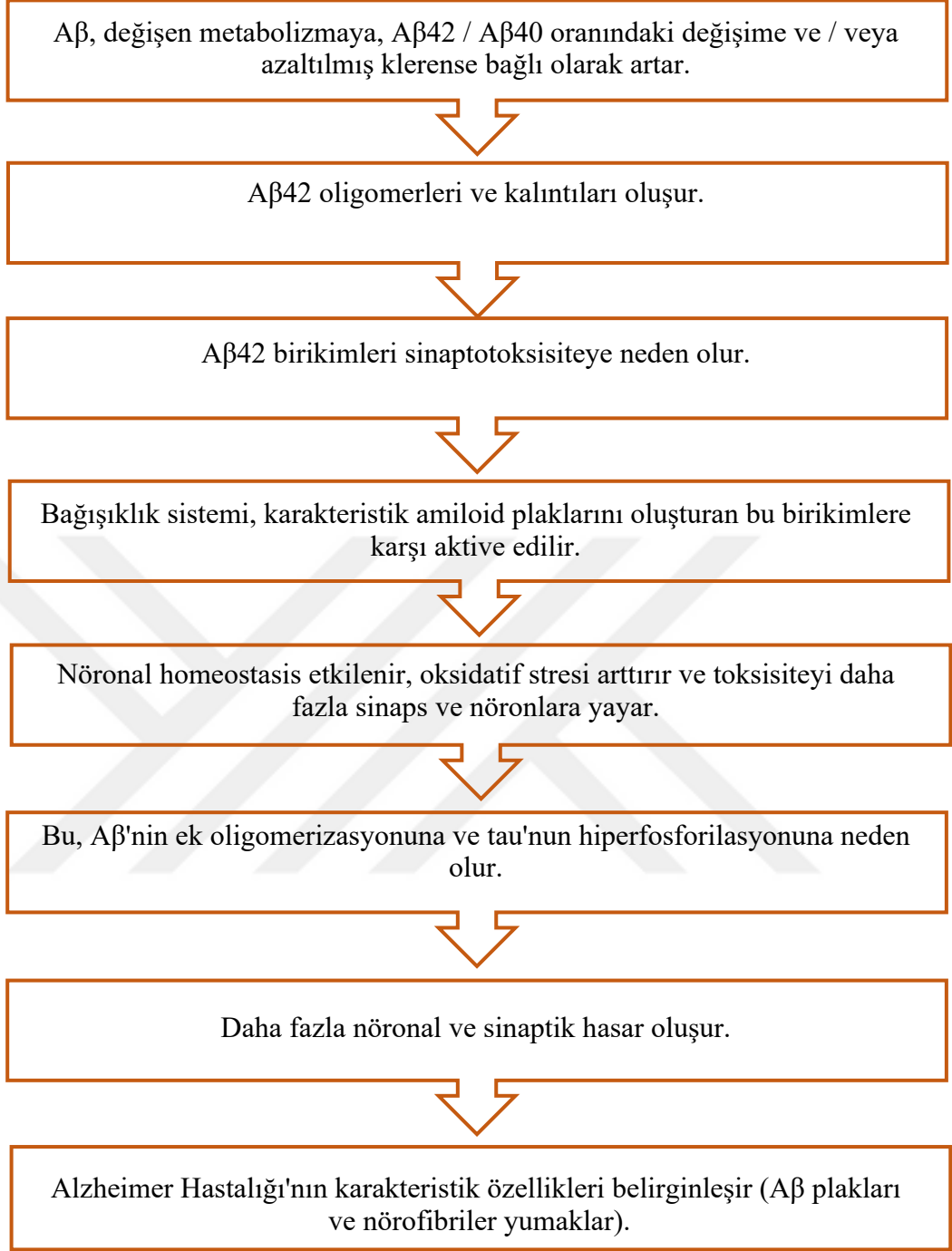


Şekil 1.4. Tau Metabolik Yolu ve Nörofibriler Yumak Oluşumu (Joshi et al. 2015).

1.2.3. Amiloid Kaskad Hipotezi

Amiloid kaskad hipotezi A β plakların oluşumunun AH patolojisinde başlangıç olayı olarak kabul edilmesidir. Yapılan çalışmalar, *APP* genindeki değişikliklerin AH'nin ciddi, erken başlangıçlı bir formuna neden olduğunu gösterirken, *MAPT* genindeki benzer değişikliklerin aynı etkiyi oluşturmadığını ortaya koymuştur. Bu bulgular da bu hipotezin doğruluğunu desteklemektedir (Hardy and Allsop 1991; Lee et al. 2014). Ayrıca *APP* geninin 21. kromozom üzerinde yer alması ve Down sendromu olarak bilinen trizomi 21'li bireylerde yaşa bağlı olarak A β plakların gelişmesi de hipotezin doğruluğuna katkı sağlamaktadır (Hartley et al. 2014; Musiek and Holtzman 2015).

A β tarafından bozulan oksidatif stres ve iyonik homeostazın, tau hiperfosforilasyonunu uyarak fosfataz ve kinazların dengesizliğine de neden olabileceği öne sürülmüştür (Haass and Selkoe 2007).



Şekil 1.5. Amiloid Kaskad Hipotezi (Haass and Selkoe 2007).

1.3. Alzheimer Hastalığı Türleri

AH, semptomların 65 yaşından önce veya sonra görülmesine göre erken başlangıçlı veya geç başlangıçlı AH olarak ikiye ayrılır.

1.3.1. Erken Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı

Erken başlangıçlı AH'nin (EBAH) sadece toplam AH vakalarının % 1 veya daha azına neden olduğu düşünülmektedir (Alzheimer's Association 2015) ve kendi içinde Erken Başlangıçlı Ailesel AH (EBAAH) ve Erken Başlangıçlı Sporadik AH (EBSAH)'ye ayrılabilir (Antonell et al. 2013).

Fenotipik ve patolojik olarak EBAAH ve geç başlangıçlı AH çok benzerdir. Ancak EBAAH hastalarının %80'inde görülen *APP*, presenilin (*PSEN*) 1 ve 2'yi kodlayan genlerdeki mutasyonlar EBAAH'nin genetik nedenleri olarak tanımlanmıştır ve bu mutasyonlar otozomal dominant bir şekilde kalıtılmaktadır (Goldman et al. 2011). Tüm bu proteinler *APP* metabolizmasında yer almaktadır: *PSEN* 1 ve 2, aktive γ -sekretaz kompleksinin bir parçasıdır (Alves et al. 2012) ve $A\beta$ miktarını arttırmakta veya $A\beta_{42}:A\beta_{40}$ oranını değiştirmektedir. Her ikisi de daha erken yaşlarda biriken plaklarla sonuçlanmaktadır. *APP*'deki mutasyonların çoğunluğu α -, β - ve γ -sekretaz kesim bölgeleri etrafında kümelenmiştir (Shewale 2012). Toplamda 24 *APP*, 185 *PSEN1* ve 15 *PSEN2* mutasyonu haritalanmıştır (Tanzi and Bertram 2005; Schellenberg and Montine 2012) ve *MAPT* ve progranulin (*GRN*) mutasyonları da EBAAH ile bağlantılıdır (Jin et al. 2012). Ayrıca, *APP* 21. kromozom üzerinde yer almakta ve bu da trizomi 21 hastalarının EBAH olma riskini %70 oranında arttırmaktadır (Hardy and Higgins 1992). Semptomlar, bu ekstra *APP* genini taşımanın sonucunda artan $A\beta$ üretimine bağlı olarak erken yaşlarda ortaya çıkmaktadır (Hartley et al. 2014). Öte yandan, EBAH olgularının %40'ı daha önce hiç aile öyküsü olmayan bireylerde sporadik olarak görülmekte ve bunların nedenleri büyük ölçüde bilinmemektedir. Bu durum, hastalığın oluşmasında genetik ve çevresel faktörlerin karmaşık bir etkileşim içinde olduğunu ya da henüz tanımlanmamış genetik risk lokusları olabileceğini göstermektedir (Campion et al. 1999; Alves et al. 2012).

1.3.2. Geç Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı

Geç başlangıçlı AH (GBAH) çevresel etkileşimlere bağlı olarak ortaya çıkabilen karmaşık bir bozukluktur. Bu yüzden çok daha yaygın olmasına rağmen hastalığın nedenleri yeteri kadar tanımlanamamıştır (Buil et al. 2014). 2013 yılında Shewale et al. GBAH 'nin nedenlerini genetik, epigenetik ve çevre olmak üzere üç alana ayırmışlardır.

1. GİRİŞ

Bu faktörlerin her biri fenotipik ifadeyi ve dolayısıyla AH'nin patolojisini değiştirebilmektedir (Shewale 2013).

1.3.2.1. Genetik

Hem monozigotik ve dizigotik ikiz çalışmaları hem de sekanslama projeleri GBAH'nin %37 ile %80 arasında kalıtsal olduğunu göstermiştir. Bu nedenle de genetik, hastalığın karmaşık kalıtım paterninde büyük bir rol oynamaktadır (Morgan 2011; Ebbert et al. 2014; Medway and Morgan 2014). 1990'larda apolipoprotein E'yi (*APOE*) kodlayan genin $\epsilon 4$ allelinin taşıyıcılarının GBAH oluşumunda daha yüksek risk taşıırken, $\epsilon 2$ allelinin taşıyıcılarının ise çok daha düşük risk taşıdığı bulunması ile GBAH'nin ardındaki genetiği çözenin ilk adımı atılmıştır (Saunders et al. 1993; Farrer et al. 1997). *APOE* haplotipleri ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ veya $\epsilon 4$ haplotipleri) iki non-sinonim varyantla (112 ve 158. pozisyonlarında aminoasit) tanımlanmaktadır. Bu bağlantı ailesel genetik bağlantı çalışmalarında görülmüştür ve *APOE* knock-out farelerde de tekrarlanmıştır (Roses and Saunders 2006). Oldukça nadir diğer varyantların da olduğu bilinmektedir. Bunlardan bazıları haplotipleri daha fazla tanımlamakta ve yine GBAH hastalık riskini değiştirmektedir (Medway et al. 2014).

$\epsilon 4$ *APOE* haplotipinin taşıyıcılarının ek risk taşıdığı ve taşınan her ek $\epsilon 4$ ile birlikte 2,84'lük bir olasılık oranıyla GBAH riskinin arttığı tespit edilmiştir. Bu haplotip aynı zamanda hastalığın başlangıç yaşını ve ortalama sağ kalım süresini azaltmakta, ayrıca nörolojik olarak postmortem boyanan A β miktarını da iki katına çıkartmaktadır (Corder et al. 1993; Strittmatter et al. 1993). $\epsilon 4$ izoformunun, herhangi bir klinik semptom ortaya çıkmadan çok daha önce taşıyıcının nörolojik ve metabolik fonksiyonunda değişikliğe, anatomik farklılığa yol açtığı ve beyin fonksiyonunu da etkilediği bilinmektedir (Filippini et al. 2009; Michaelson, 2014).

GBAH tanısı konmuş kişilerin %40 ila %60'ının *APOE* $\epsilon 4$ geninin en az bir kopyasını taşıdığı düşünülmektedir. Fakat $\epsilon 4$ haplotipin taşınması, bireyin GBAH geliştireceğini garanti etmemektedir (Alzheimer's Association 2015).

İnsan *APOE*'si, beyinde astrositlerde ve mikroglia da eksprese edildiği gibi karaciğerde de yüksek oranda eksprese edilen 299 amino asit uzunluğunda bir glikoproteindir. Lipoprotein partiküllerinin endositozu sırasında bir reseptör olarak işlev gördüğü ve kolesterol salınımına dahil olduğu bilinmektedir. Bu nedenle nörolojik

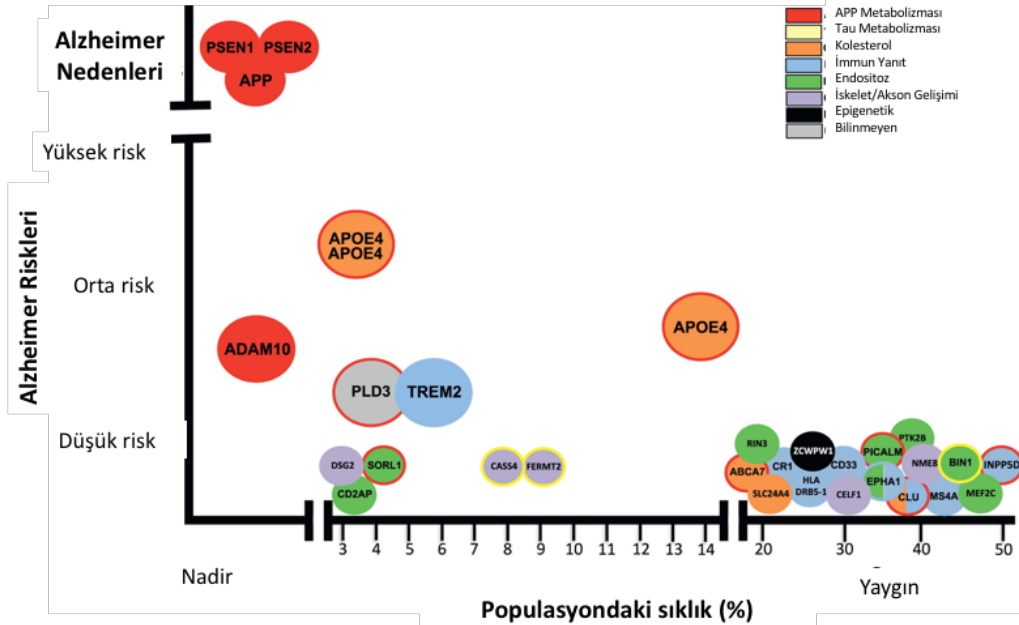
1. GİRİŞ

sinaptik bakımda rol oynamaktadır. Aynı zamanda Merkezi Sinir Sistemi (MSS) içindeki temel apolipoproteindir (Kim et al. 2009).

APOE'nin AH ile olan ilişkisinin çeşitli nedenleri öne sürülmüştür, ana teoriler farklı *APOE* haplotipleri ile aşağıdaki kategorilere ayrılmıştır:

- i) Sinaptik plastisite ve onarımı etkiler (Teter 2004).
- ii) Kolesterol taşınmasını ve lipit bağlama özelliklerini değiştirir (Hirsch-Reinshagen et al. 2008; Martins et al. 2009).
- iii) A β 'nin farklı bir şekilde işlenmesi klerans, birikme veya kümelenme ile sonuçlanır (Bales et al. 1999; Shibata et al. 2000).
- iv) APP işlenme sürecinin farklılaşmasına bağlı olarak A β 'nin üretimi değişir (Bu 2009; Kim et al. 2009) ya da NFY oluşumu değişir (Holtzman et al. 2012).

APOE'nin izoformunu etkileyen varyantlar proteinin yapısının ve fonksiyonunun değişmesine neden olmaktadır. Ancak, değişmiş protein fonksiyonunun GBAH patolojisini nasıl etkilediği keşfedilmesi gereken bir konu olarak kalmaktadır. *APOE*'nin, GBAH için nüfusa ilişkin riskin %27,3'ünü oluşturduğu tahmin edilmektedir ve en güçlü genetik risk faktörü olarak görülmesine rağmen, yine de geriye kalan yüksek orandaki kısım diğer risk faktörlerinden oluşmaktadır (Medway and Morgan 2014).



Şekil 1.6. Alzheimer Hastalığı Riskine Katkıda Bulunan Nadir ve Yaygın Varyantlar (Guerreiro et al. 2013).

1.3.2.2. Epigenetik

Epigenetik genellikle DNA dizisinde değişim olmadan gen ekspresyonunda ya da fenotipte meydana gelen kalıtsal değişiklik anlamına gelmektedir (Laird 2010). Bu değişikliklerden biri DNA'nın, özellikle de CpG adaları olarak bilinen ve genomun sitozin guanin dinükleotid tekrarları zengin bölgelerinin metilasyonudur (Bock et al. 2006). Metilasyonun, genlerin ekspresyonu ve susturulmasında, kromozom stabilitesinde, farklılaşmada ve sonuç olarak insan hastalıklarında önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Roadmap Epigenomics Consortium et al. 2015). AH'de rol oynayan bazı genler (*APP*, *PSENI* ve *BACE1*) orantısız olarak yüksek bir GC içeriğine sahiptir ve bu nedenle metilasyon için potansiyel hedeflerdir (Shewale 2012).

Son zamanlarda, epigenetiğin fenotipik değişikliklere neden olabileceği düşüncesi ilgi çekmekte ve bu alanda giderek artan sayıda çalışma yapılmaktadır. AH hastalarında AH ile ilişkili bazı genlerin hipermetilasyon paternleri (özellikle CpG metilasyonu) görülmüştür (Yu et al. 2015). Bu bulgular metilasyon değişikliklerinin GBAH patolojisiyle ilişkili olduğu düşüncesini güçlendirmektedir (Chouliaras et al. 2013).

Yakın zamanda yayınlanan bir raporda, GBAH ile ilişkili olduğu bilinen *ABCA7* ve *BINI* genlerinin CpG adalarındaki metilasyon seviyesi ile nörolojik patolojinin düzeyi arasında anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir (De Jager et al. 2014; Lord and Cruchaga 2014). Bu çalışma, *SORL1*, *ABCA7*, *BINI*, *HLA-DRB5* ve *SLC24A4* genlerinde de tekrarlanmış, bu genlerdeki patolojik AH ile ilişkili nörolojik DNA metilasyonu değişmiştir (Yu et al. 2015). *APP* geninin, AH hastalarında hipermetilasyona uğradığı ve transkripsiyon faktörleri ile birlikte gen ekspresyonunu değiştirdiği de gösterilmiştir (Lunnon et al. 2014). Bu durum, epigenetik değişikliklerin hastalık patolojisini de etkilediğini göstermektedir ve çalışmalar bu epigenetik değişikliklerin kavramada ve özellikle bellek oluşumunda bir farklılık olarak ortaya çıkabileceğini göstermiştir (Day and Sweatt 2011; Zovkic et al. 2013).

1.3.2.3. Çevre

GBAH riskini artıran birçok çevresel faktör vardır. Oksidatif stresörlerin (travmatik beyin hasarı, inflamasyon, uyku apnesi vb.) AH'nin patogenezini etkileyen epigenetik değişikliklere neden olabileceği bilinmektedir. Bununla birlikte, diyet, kimyasal

1. GİRİŞ

maruziyet, sigara içme, vücut kitle indeksi, folat alımı ve egzersiz eksikliği gibi birçok başka çevresel faktör de GBAH riskini artırmaktadır. Bunun nedeninin epigenetik değişikliklerden kaynaklandığı düşünülmekte ancak kesin olarak bilinmemektedir (Shewale 2012).

GBAH'ye neden olan en büyük risk faktörü yaştır ve hastalık riski 65 yaşından sonra her 5 yılda bir ikiye katlanmaktadır (Schellenberg and Montine 2012). Genetik, özellikle de yukarıda tartışıldığı gibi apolipoprotein $\epsilon 4$ allelinin taşıyıcılarında bir sonraki en büyük risk faktörü olarak görülmektedir (Martins et al. 2009). Bununla birlikte, diğer birçok hormonal ve çevresel faktörlerin de artan GBAH riskine katkıda bulunduğu tespit edilmiştir. Vasküler ve metabolik bozukluklar, hipertansiyon, özellikle değişken sistolik kan basıncı, hiperkolesterolemi, koroner arter hastalığı ve obezite AH'nin ileri yaşlarda ortaya çıkma riskini artırmaktadır (Skoog et al. 1996; Kivipelto et al. 2005). Ateroskleroz hastalığının ve özellikle ekstrakraniyal karotid arterlerde görülen aterosklerotik plakların kronik veya epizodik serebral hipoperfüzyona neden olduğu ve bilişsel gerileme riskini arttırdığı düşünülmektedir (Hofman et al. 1997). İnme, atriyal fibrilasyon ve travmatik beyin hasarı öyküsü de GBAH'ye neden olan risk faktörleri olarak bilinmektedir ve benzer şekilde duyarlı beyin alanlarının hipoperfüzyonuna neden oldukları bulunmuştur (Ott et al. 1997; Honig et al. 2003). Hiperkolesteroleminin, A β metabolizmasını, kesimini ve taşınmasını değiştirerek nörolojik amiloid plaklarının gelişimini değiştirdiği düşünülmektedir (Kuller and Lopez 2011). Obezite, diabetes mellitus ve bozulmuş glukoz metabolizması da hormon etkilerinden veya glikoz toksisitesinin amiloid metabolizması üzerindeki etkilerinden dolayı GBAH yönündeki duyarlılığı artırmaktadır (Kivipelto et al. 2005).

Tüm bunların yanında D vitamini eksikliği (Pogge 2010), depresyon öyküsü (Geerlings et al. 2008), yüksek miktarda doymuş yağ alımı (Luchsinger and Mayeux 2004), periferik enflamasyon (Engelhart et al. 2004) ve yüksek serum homosistein ve fibrinojen konsantrasyonları (Bots et al. 1998; Kalmijn et al. 1999) da diğer risk faktörleri olarak bildirilmiştir. Ayrıca, eğitim seviyesinin, AH nöropatolojisinin fenotipik olarak ifade edildiği dereceyi modüle ettiği de bilinmektedir. Bununla birlikte yapılan çalışmalar, daha yüksek eğitim düzeyine sahip kişilerde bilişsel rezervin artması sebebiyle hafif AH semptomlarının maskelenbildiğini ancak, AH nöropatolojisi daha ileri düzeyde olduğunda bilişsel işlevde bir farklılık olmadığını göstermektedir (Koepsell et al. 2008).

Alzheimer Derneği'nin Dünya Demans Konseyi ile bağlantılı olarak verdiği son önerilerinde, bireylerin bilişsel gerileme ve bunama risklerini azaltmak için düzenli fiziksel aktiviteye katılmalarını ve bunama ile ilişkili kardiyovasküler risk faktörlerine (diyabet, obezite, sigara ve hipertansiyon) dikkat etmeleri gerektiği belirtilmektedir. Bununla birlikte hastalık riskini azaltmak için sağlıklı bir diyet (Akdeniz diyeti gibi) ve hayat boyu öğrenme ya da bilişsel eğitim de önerilmektedir (Baumgart et al. 2015).

1.4. İşaretler ve Belirtiler

Demans, genellikle zihinsel işlevlerin yaygın kaybı ile giderek kötüleşen ve çoğunlukla geri döndürülemez bir durumdur. Bununla birlikte, AH özellikle günlük yaşam aktivitelerinin kaybı ile birlikte hafıza kaybı olarak tanımlanmaktadır (Alves et al. 2012). AH'nin patofizyolojisi aslında semptomların ortaya çıkmaya başlamasından 20 yıl önce başlayabilmektedir ve AH, tanı konulduktan ortalama olarak dört ila sekiz yıl sonra ölümcül olabilmektedir (Holtzman et al. 2012; Alzheimer's Association 2015).

Hastalık ilerledikçe, hastalar aşağıdakilerin bazılarını veya hepsini deneyimleyebilmektedir: Hafıza kaybı, dil bozukluğu, kaybolma, planlama ve problem çözmede zorluklar, kişilikteki değişiklikler, günlük yaşam aktiviteleri ile ilgili zorluklar, kendini ihmal, psikiyatrik belirtiler veya genellikle karakter dışı davranışlar. Hastalığın ilerleme oranı bireyden bireye değişmekte ve bu semptomların çoğu, hastalar kendileri için büyük ölçüde bakım sağlayamadıkça daha da kötüleşebilmektedir. Bu nedenle, günlük yaşam aktivitelerini tamamlamak için tam zamanlı bakıma gereksinim duymaktadırlar (Alzheimer's Association 2015).

Patolojinin ortaya çıkması ile semptomların ortaya çıkması arasında geçen sürenin nedeninin "bilişsel yedek" fikri olduğu düşünülmektedir. Bu, daha yüksek sayıda nöron hücrelerine sahip hastaların, daha yüksek sayıdaki "yedek" nöronlardan dolayı, biliş kaybından önce daha yüksek nörolojik A β plak seviyesine karşı koyabildiği anlamına gelmektedir. Bu, olası bir erken tanı aracı sunarak, mevcut A β plaklarının miktarı ile orantılı olarak nörolojik fonksiyonlarını (fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme (fMRI) üzerinde değerlendirilebilir) artıracaklarını göstermektedir (Beecham et al. 2014; Elman et al. 2014).

1. GİRİŞ

AH'nin ilerlemesi, genellikle bireyin hareket etmesine engel olmakta, onları enfeksiyonlara, çoğu kez de pnömoniye karşı savunmasız bırakmaktadır. Bu ve diğer akut durumlar, sıklıkla AH ile ilişkili ölümlere, “demans ile ölüm” ile “demans nedeniyle ölüm” arasındaki çok bulanık bir ayrımın katkısında bulunan faktörlerdir (Alzheimer's Association 2015).

1.5. Tedavi

AH'nin asıl nedeni hâlâ büyük bir gizem olduğundan, başarılı tedaviler geliştirmek zordur. AH, tedavisi bulunmayan ilk on ölüm nedeni arasında yer almaktadır (Ridge et al. 2016). Birçok güncel tedavi, hastalığın ilerleyişini geciktirmek amacıyla, öncelikle nörolojik olarak mevcut olan nörotransmitterlerin miktarını artırmak yoluyla, hastalığın semptomlarını hedeflemektedir. Mevcut Ulusal Sağlık ve Bakım Enstitüsü (NICE) kılavuzlarında (2014), hafif ve orta dereceli AH hastaları için asetilkolinesteraz (AChE) inhibitörlerini önermektedir. AH'de yaygın olarak kullanılan üç AChE inhibitörü donepezil, galantamin ve rivastigmine iken, daha şiddetli vakalarda veya hastanın AChE inhibitörlerini tolere edemediği durumlarda N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonisti olan memantin önerilmektedir. Bununla birlikte, bu tedavi dizilerinin her ikisi de hastalığın nedenini hedeflemekte ve patolojinin ilerlemesini değiştirmemektedir, sadece semptomatik rahatlama sağlamaktadır. AChE inhibitörleri, AH hastalarında bazal önbeyinde karakteristik bir kolinerjik nöron kaybı olduğundan, degradasyonu inhibe ederek sinapslarda bulunan asetilkolin (ACh) miktarını arttırmayı amaçlamaktadır (Davies and Maloney 1976). Alternatif olarak, memantin, AH hastalarında artmış olduğu görülen ve nöronal disfonksiyona katkıda bulunduğu düşünülen glutaminin etkisini bloke ederek çalışmaktadır (Reisberg et al. 2003). Bununla birlikte, bu ilaçlar sadece AH hastalarının bilişsel işlevlerinde hafif bir iyileşme sağlamakta ve hastalığın ilerlemesi üzerinde hiçbir etki göstermemektedir (Rang 2008).

Daha önce de belirtildiği gibi, bu tedavilerin tümü sadece semptomatik rahatlama sağlarken, ideal AH tedavisi nörodejenerasyonu önleyen, AH'deki patolojik yolları, amiloid kaskadı ve tau hiperfosforilasyonu hedefleyen yaklaşımlardır (Hananberg et al. 2014).

Hem β - hem de γ -sekretaz inhibitörleri geliştirilmiştir. β -sekretaz inhibitörlerine (*BACE1* inhibitörleri) örnek olarak Faz I klinik denemelerinde başarılı olan CTS-21166

1. GİRİŞ

ve AH model farelerde hem *BACE1* ekspresyonunu inhibe eden hem de tau fosforilasyonunu azaltan nilvadipine (yerleşik bir anti-hipertansif ilaç) ilaçları verilebilir (Panza et al. 2009; Paris et al. 2014). 2014'ün sonlarında, başka bir *BACE1* inhibitörü olan AZD3293, Mayıs 2019'da tamamlanması planlanan Faz II / III klinik çalışmalarda test edilmeye başlanmıştır. Ancak *BACE1* inhibitörlerinin aksine semagacestat gibi γ -sekretaz inhibitörleri başarılı sonuçlar vermemiştir. Faz III klinik deneme seviyesine ulaşan Semagacestat kontrol grubuna göre daha kötü bilişsel işlev bozukluğu göstermesi sebebiyle durdurulmuştur (Samson 2010). γ -sekretaz, A β oluşum mekanizmasının yanı sıra diğer sinyal yollarında da rol oynadığı için umut verici bir terapötik hedef olarak düşünülmemektedir.

İlk kez 1999 yılında A β aşılması fikri önerilmiştir. A β proteini ile aşılınmış AH fare modellerine A β plak oluşumu tersine dönmüştür. Ancak, her ne kadar insanlaştırılmış anti-amiloid IgG monoklonal antikoru Solanezumab ile tedavi klinik çalışmalarda başarılı sonuçlar ortaya koysa da insanlarda nöroinflamatuvar etkileri olduğu için bu çalışma insan denemelerinde tekrarlanamamıştır (Schenk et al. 1999). 2015 yılında sunulan bir ön faz II sonuçlarına göre, daha önce Solanezumab tedavisine başlamış olan hafif AH bireylerde hem kognitif hem de fonksiyonel düşüşün yavaşladığı görülmüştür (sırasıyla %34 ve %18) (Liu-Seifert et al. 2015; Siemers et al. 2015). Ancak, Kasım 2016'da hafif AH olgularında plasebo grubuna göre anlamlı bir yavaşlama ve hafıza kaybı yaşamayan Faz III çalışma sonuçları bildirilmiştir (McCartney 2015). 2021 yılında sonuçları beklenen prodromal AH hastalarını içeren bir Faz III çalışması planlanmıştır. Bu gerilemelere rağmen, Solanezumab bugüne kadar AH için en umut verici, hastalık değiştirici tedavi olmaya devam etmektedir.

Tau'ya karşı immünoterapi yöntemi de fare modellerinde önerilmiş ve test edilmiştir. Bu tedavilerin geliştirilmesi, tau'nun hücre içinde yer almasından dolayı antikörlerin erişmesi kolay olmamakta ve bu nedenle daha problemli olmaktadır (Mably et al. 2014). Bununla birlikte, 2015 yılında, tau'ya karşı üç monoklonal antikörün farelerde tau patolojisini azalttığı, hücre hatlarında tau hücre alımını modifiye ettiği ve mikrogliya hücreleri yoluyla temizlenmesini sağladığı bildirilmiştir (Funk et al. 2015). Terapötik antikörler bu nedenle gelecekte potansiyel bir tedavi olarak görülmektedir. Bununla birlikte, bunların tam işlevselliği ve *in vivo* şartlarda terapötik olarak aktif olup olmadıkları belirlenmelidir.

Ayrıca, AH risk faktörlerinin modifiye edilmesine odaklanan çeşitli çalışmalar da bulunmaktadır. Örneğin diğer hastalıklar için alınan steroid olmayan anti-inflamatuar ilaçlar (NSAİİ'ler) AH'ye yakalanma riskini azaltmaktadır (Stewart et al. 1997). Benzer şekilde kolesterol düşürücü etkiye sahip statinler de AH oluşma riskini düşürmektedir (Zamrini et al. 2004). NSAİİ'lerin, nöronal inflamasyonu azalttığı, negatif geri besleme döngülerinden dolayı hem *MAPT* ve *APP* ekspresyonunu azalttığı hem de α -sekretaz yerine β -sekretaz ile kesilmiş APP miktarını arttırdığı gösterilmiştir (Lee et al. 2014).

Farmakolojik olmayan terapilerle ilgili çalışmalar da yakın zamanda umut vaat etse de AH'nin seyrini değiştirdiği henüz gösterilmemiştir. Egzersiz ve bilişsel aktivite yaklaşımları, yaşam kalitesini iyileştirme konusunda umut vermektedir (Sink et al. 2015). Bununla birlikte, bu tedavilerin etkinliğini daha iyi değerlendirmek için ek araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Alzheimer's Association 2015).

Şimdiye kadar, AH için önerilen ilaçlar çeşitli yan etkiler veya önemsiz bulgular nedeniyle klinik denemeleri tamamlayamamıştır, ancak en azından umut verici bir Faz III çalışması devam etmektedir (Siemers et al. 2015). NSAİİ'leri içerenler de dahil olmak üzere bugüne kadar yapılan tüm çalışmalar, ilaçların semptomlar ortaya çıkmadan yıllar önce alınması gerektiğini ve AH tedavisinin ciddi bir sorun olarak kaldığını göstermiştir. Sonuç olarak şu anda yapılabilecek en iyi yöntem AChE inhibitörleri ve NMDA antagonisti memantin ile bu hastalığın semptomatik olarak tedavi edilmesidir.

1.6. N-metil D-aspartat Reseptörü

NMDA reseptörleri, normal beyin fonksiyonlarını düzenleyen iyonotropik glutamaterjik reseptörlerdir. NMDA reseptörleri, iki zorunlu GluN1 alt birimi ile GluN2 veya GluN3 alt biriminden ikisi olmak üzere dört heteromerik alt birimden oluşmaktadır. Her GluN1 alt birimi, glisin için bir bağlanma alanına sahiptir (Bonhaus et al. 1987) ve her GluN2 alt birimi, glutamat için bir bağlanma alanı içermektedir (Laube et al. 1997; Anson et al. 1998). GluN2 içeren NMDA reseptörleri için aktivasyon hem glisin hem de glutamat bağlanma alanlarının işgal edilmesini gerektirmektedir. Bu durum kalsiyum, sodyum ve potasyumun akışına ve hücrenin depolarize olmasına neden olmaktadır (Voglis and Tavernarakis 2006).

NMDA reseptörlerinin önemli özelliklerinden biri, merkezi etkideki magnezyum iyonları tarafından, bir agonistin yokluğundan veya varlığından bağımsız olarak kanal aktivitesini inhibe eden, fizyolojik voltaj bağımlı bir blokajın varlığıdır (Sacaan and Johnson 1991; Calabresi et al. 1992; Voglis and Tavernarakis 2006). Yeterli membran depolarizasyonu sırasında magnezyum iyonları kanal kompleksinden elektrostatik olarak itilmekte, NMDA reseptörlerinin blokajı ortadan kaldırılarak glutamat ile aktive olmalarına izin verilmektedir. NMDA reseptör aktivasyonu, nöronal plastisiteye imkan veren kritik bir olgudur (Aroniadou and Teyler 1991; Debanne 1996; Shipton and Paulsen 2014).

NMDA reseptörleri sinaptik plastisite, öğrenme ve hafızaya aracılık etmede kritik rollere sahiptir ve birçok nörolojik hastalıkta rol oynamaktadır (Morris 1989; Aroniadou and Teyler 1991; Olney et al. 1999; Berman et al. 2000; Newcomer et al. 2000; Koutsilieri and Riederer 2007). Yapılan pek çok çalışma NMDA reseptöründe görülen nörotransmisyon fonksiyon bozukluğunun AH patofizyolojisinde rol oynadığını göstermiştir (Kornhuber and Weller 1997; Olney et al. 1997; Newcomer and Krystal 2001; Loftis and Janowsky 2003). NMDA reseptörünün AH'li beyin bölgelerinde seçici ve farklı şekilde azaldığı bildirilmiştir (Maragos et al. 1987; Procter et al. 1989; Sze et al. 2001). Bu durum, AH ile beynin bazı bölgelerinde NMDA reseptörlerinin kaybı arasında ilişki olabileceğini düşündürmektedir.

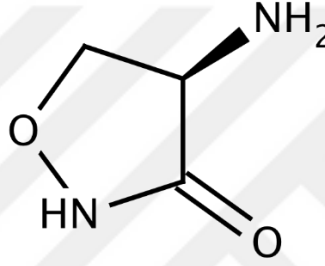
NMDA reseptör fonksiyonunun terapötik bir strateji olarak güçlendirilmesine yönelik çok sayıda araştırma yapılmıştır. NMDA reseptörlerinin özgül ve doğrudan pozitif modülatörlerine yönelik yeterli çalışma olmadığından araştırma konuları glutamatın NMDA reseptör duyarlılığını artırma aracı olarak glisin bağlama bölgesinin modülasyonuna odaklanmıştır.

NMDA reseptör aktivasyonu hem glisin hem de glutamatın bağlanmasını gerektirdiğinden, her iki koagonistin de arttırılması, doyunluğa ulaşılmadığı sürece, reseptörü diğeri tarafından aktivasyona karşı daha duyarlı hale getirmektedir. Önceki çalışmalarda, *in vivo* glisin seviyelerinin, NMDA reseptörlerini doyurmak için yeterince yüksek bir seviyeye ulaşmadığı ve glisin ile NMDA reseptör aktivitesinin modülasyonuna olanak sağladığı bulunmuştur (Monaghan and Jane 2009; Collingridge et al. 2013). Bununla birlikte, glisinin zayıf kan-beyin bariyeri (BBB) penetrasyonu nedeniyle (Pollay 1976), sürekli ve yüksek dozlar halinde uygulanması gerektiğinden zayıf bir ilaç seçimi

1. GİRİŞ

olarak düşünölmektedir. Bu nedenle glisin yerine glisin-mimetik ilaçlar NMDA reseptörünün kuvvetlendiricileri olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. D-serin ve sikloserin sıklıkla kullanılan glisin-mimetik ilaçlardandır.

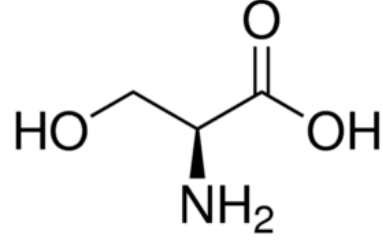
D-alanin (D-Ala) 'nin bir siklik yapısal analogu olan D-sikloserin (D-4-amino-3-izoksazolidon) anti-tüberküloz ajan olarak tasarlanmasına rağmen daha sonra demans ve şizofrenide negatif belirtiler için potansiyel bir tedavi olarak kullanılmıştır (Noda et al. 2004; Hofmann et al. 2013). NMDA reseptörünün glisin bölgesinin bir kısmi agonisti olan D-sikloserin (DCS)'in, AH'li hastalarda bellekle ilişkili görevlerin performansını arttırdığı bildirilmiştir (Schwartz et al. 1996; Tsai et al. 1999).



Şekil 1.7. DCS Yapısı.

Esansiyel olmayan aminoasitlerden biri olan L-serin (LS), hücrel metabolizma ve nörolojik gelişim ve işlev için kritik olan bir polar aminoasittir. LS, pürin nükleotitleri ve deoksitimidin monofosfatın sentezi için tek karbonlu grupların baskın kaynağıdır. İnsan serebral omurilik sıvısı (CSF) ve kan plazmasında bulunan LS konsantrasyonları genellikle yaşla birlikte azalır, bu da yaşam boyu bu aminoasite bir ihtiyaç olduğuna işaret etmektedir (Crabben et al. 2013). LS kaynakları arasında hücrel alımı, *de novo* sentezi ve LS'nin hücrel protein yıkımı yoluyla geri dönüşümü yer almaktadır (Koning et al. 2003).

Esansiyel olmayan bir aminoasit olduğu düşünölse de LS'nin şartlı olmayan bir esansiyel aminoasit olarak sınıflandırılması daha uygun olabilir, çünkü belirli koşullar altında omurgalılar gerekli hücrel talepleri karşılayacak miktarda sentezleyememektedir (Koning et al. 2003). Bu nedenle, sağlıklı bireylerde bile diyetle birlikte LS alımı nöroprotektif destek olarak önemlidir.



Şekil 1.8. LS Yapısı.

Tüm bu literatür bilgilerinin ışığında bu tez çalışmasında alüminyum klorür (AlCl_3) ile indüklenen AH deneysel hayvan modelinde antioksidan ve nöroprotektif özelliklere sahip olduğu düşünülen DCS ve LS aminoasitlerinin nöroprotektif potansiyellerinin biyokimyasal, hematolojik, histopatolojik, davranışsal ve moleküler genetik parametreler ile ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu sayede henüz etkin bir tedavisi bulunmayan AH için yeni bir terapötik yaklaşımın etkinliğinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Walton (2007), ileri yaşlardaki ratlara kronik olarak 1,6 mg/kg vücut ağırlığı/gün alüminyum vererek yaptığı çalışmada ratlarda bellek bozulma ve AH benzeri davranışlar geliştiğini ortaya koymuştur. Histolojik boyama sonuçlarına göre bazı yaşlı rat nöronlarında alüminyum birikmesi, oksidatif hasar, hiperfosforile tau, nöropil iplikleri ve granulo vakuolar dejenerasyon gözlemlenmiştir. Ancak incelenen tüm rat beyin bölümlerinde amiloid plaklar ve nörofibriler yumaklar tespit edilememiştir.

Erazi et al. (2011), hem yetişkinlikte 4 ay boyunca %0,3 alüminyum içeren içme suyu maruziyetinin hem de rahim içi yaştan beri alüminyum maruziyetinin etkilerini immunohistokimyasal olarak inceledikleri çalışmada alüminyum ile tedavi edilen ratlarda, TH (tirozin hidroksilaz, dopamin sentezinin hız sınırlayıcı enzimi) 'ye karşı antikor ile işaretlenen hücrelerin sayısında, kontrollere kıyasla anlamlı bir düşüş olduğunu ortaya koymuşlardır. Rahim içi yaştan beri alüminyuma maruz kalan rat grubunda alüminyum tedavisini takiben TH-immünoreaktif düşüş gözlenmiştir. Her iki tedavi grubunda da alüminyum maruziyeti lokomotor performansında önemli bir düşüşe neden olmuştur. Alüminyum tarafından indüklenen TH değişikliklerinin, alüminyum kaynaklı nörotoksisitenin nedenlerinden biri olduğu öne sürülmüştür.

Khan et al. (2013), Alzheimer hastalığının deneysel modelinde kafeik asitin rolünü araştırmayı amaçladıkları çalışmalarında $AlCl_3$ ile indüklenen AH rat modeli kullanmışlardır. Kafeik asitin anti-demans aktivitesini ortaya koymak amacıyla davranışsal (Morris su labirent testi) ve beyin biyokimyasal parametreleri (asetilkolinesteraz (AChE), katalaz, glutatyon-S-transferaz (GST) aktivitesi, glutatyon (GSH) ve nitrit seviyeleri) araştırmışlardır ve bulgular kafeik asitle tedavi edilen ratların Morris su labirent testinde daha iyi bilişsel işlev sergilediğini göstermiştir. Kafeik asidin anti-demans aktivitesi, beyin AChE aktivitesindeki ve nitrit seviyelerindeki azalmayla doğrulanmıştır. Ayrıca, kafeik asit beyinde katalaz, GSH ve GST gibi antioksidan enzimlerin azalmış seviyesini düzeltmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Zhang et al. (2014), yaptıkları çalışmada subkronik alüminyum tedavisinin uzun süreli bellek ve hipokampal ultra-yapı üzerindeki etkilerini gözlemlemiş ve aynı zamanda farelerin hipokampusünde olası bir mekanizmayı (cAMP-PKA-CREB sinyal yolağı) araştırmışlardır. Bu çalışmada hamile ratlar 4 gruba ayrılmıştır ve yenidoğan ratlar 3 hafta boyunca anneyi emerek daha sonraki 3 ay boyunca ise %0, %0,2, %0,4 veya %0,6 AlCl₃ içeren su ile besleme yoluyla alüminyuma maruz bırakılmıştır. Kandaki ve hipokampusdaki alüminyum düzeyleri, atomik absorpsiyon spektrofotometresiyle ölçülmüştür. Mekik kutusu testi, uzun süreli hafızayı tespit etmek için yapılmıştır. Hipokampus ultra-yapı gözlemi için toplanmış ve cAMP-PKA-CREB sinyalleme seviyesi incelenmiştir. Sonuçlar AlCl₃ ile muamele edilen ratların kan ve hipokampusundaki alüminyum konsantrasyonlarının kontrol ratlarından daha yüksek olduğunu göstermiştir. Hipokampal cAMP, cPKA, pCREB, BDNF ve c-jun ekspresyonu anlamlı olarak azalmış ve nöronal ve sinaptik ultra-yapı alüminyum uygulamasından sonra patolojik değişiklikler göstermiştir. Bu sonuçlar, ratlarda alüminyumun cAMP-PKA-CREB sinyalinin inhibe ederek ve hipokampusteki sinaptik ve nöronal ultra-yapıyı değiştirerek uzun süreli hafıza hasarına neden olabileceğini göstermiştir.

Thenmozhi et al. (2015), çalışmalarında ratlarda hesperidin (Hes) 'in AlCl₃ kaynaklı nörodavranış ve patolojik değişiklikler üzerindeki koruyucu etkisinin değerlendirilmesini amaçlamışlardır. Ratlara AlCl₃'ün (100 mg/kg vücut ağırlığı) 60 gün boyunca intraperitoneal enjeksiyonu sonucunda beynin hipokampus ve korteks bölgelerinde alüminyum düzeylerinin ve asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesinin önemli derecede arttığını bulmuşlardır. Ayrıca amiloid prekürsör proteininin (APP), β amyloid (A β 1-42), β ve γ sekretazların ifadelerinin önemli ölçüde artmış olduğunu göstermişlerdir. 60 gün boyunca AlCl₃ enjeksiyonu ile birlikte oral olarak Hes uygulanması, çalışılan beyin bölgelerinde alüminyum konsantrasyonu, AChE aktivitesi ve A β senteziyle ilişkili molekülleri önemli ölçüde geri döndürmüştür. Ek olarak alüminyum maruziyetinin öğrenme ve hafıza bozukluklarını arttırdığı açık alan testi ve Morris su tankı testi ile gösterilmiş, alüminyumun neden olduğu davranış bozuklukları, Hes tarafından önemli ölçüde azaltılmıştır. Bu sonuçlardan, hesperidinin AChE aktivitesinin ve amiloidojenik yolun hafifletilmesi yoluyla alüminyum zehirlenmesinden kaynaklanan hafıza kaybını tersine çevirebileceği sonucuna varılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Lin et al. (2015), Alzheimer hastalığı rat modelinde LIPUS (low-intensity pulsed ultrasound) stimülasyonunun alüminyum kaynaklı beyin hasarına karşı koruyucu etkisini göstermeyi amaçlamışlardır. LIPUS, AlCl₃ uygulamasından 7 gün önce uygulanmaya başlanmış ve eş zamanlı olarak 6 hafta boyunca AlCl₃ (100 mg/kg; oral uygulama) ile birlikte verilmeye devam edilmiştir. Hipokampuste nörotrofik faktörler western blot analizi ile ölçülmüştür. Davranış değişiklikleri Morris su labirenti ve yükseltilmiş artı labirent ile incelenmiştir. AlCl₃ ile muamele edilmiş ratlarda alüminyum konsantrasyonu, asetilkolinesteraz aktivitesi ve A β birikiminde önemli bir artışa neden olmuştur. LIPUS uyarımı, AlCl₃ ile tedavi edilen ratlarda alüminyum konsantrasyonu, asetilkolinesteraz aktivitesi, A β birikimini önemli ölçüde azaltmıştır. Ayrıca, LIPUS, AlCl₃ ile indüklenen hafıza bozukluğunda hafıza tutulumunu önemli ölçüde iyileştirmiştir. Bu deneysel sonuçlar, LIPUS'un AlCl₃'ün neden olduğu serebral hasarlara ve bilişsel işlev bozukluğuna karşı nöroprotektif etkilere sahip olduğunu göstermektedir.

Thenmozhi et al. (2015), gerçekleştirdikleri çalışmalarında ratlarda AlCl₃ ile indüklenen AH'ye karşı biyokimyasal, anatomik, davranışsal ve moleküler düzeyde *E.officinalis* (EoT) 'un hafızayı güçlendirici etkisini araştırmayı amaçlamışlardır. Çalışmada erkek Wistar ratlar kontrol, AlCl₃ (100 mg/kg), AlCl₃ (100 mg/kg) + EoT (50, 100 ve 200 mg/kg) ve tek başına EoT (200 mg/kg) olmak üzere 6 gruba ayrılmıştır. Kontrol ve deneysel ratlarda alüminyum miktarı belirlenmesi, asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesi ve amiloidojenik proteinlerin ekspresyonu ile davranış testleri (su labirenti ve açık alan testi) gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre AlCl₃'ün 60 gün boyunca intraperitoneal enjeksiyonu, alüminyum konsantrasyonunu, AChE aktivitesini ve APP, A β 1-42, β - ve γ -sekretazların protein ifadelerini önemli ölçüde arttırmıştır. 60 gün boyunca ratlara AlCl₃ ile birlikte oral olarak EoT'nin uygulanması, çalışılan beyin bölgelerindeki alüminyum konsantrasyonunu, AChE aktivitesini ve A β senteziyle ilişkili molekülleri önemli ölçüde geri döndürmüştür. AlCl₃ ile tedavi edilen ratlarda gözlemlenen uzamsal öğrenme, bellek ve lokomotor bozukluklar, EoT ile önemli ölçüde zayıflatılmıştır. Bu nedenle, EoT alüminyumun nörotoksitesini iyileştirmede ümit verici bir tedavi olabileceği öne sürülmüştür.

Alawdi et al. (2016), çalışmalarında adamantin bazlı nanoparçacıkların, nanodiamond (ND), deneysel AH model ratlarda alüminyum kaynaklı bilişsel bozuklukta nöroprotektif etkilerini araştırmışlardır. Ratlara 6 hafta boyunca oral yolla 17 mg/kg

2. KAYNAK ÖZETLERİ

AlCl₃ verilerek AH indüklenmiştir ve Morris su tankı testi ve Y-labirenti davranış testleri ile doğrulanmıştır. Alüminyuma maruz kalan ratlar, AH ile ilişkili davranışsal, biyokimyasal ve histolojik değişiklikler göstermiştir. ND tedavisi sonrasında ise, öğrenme ve belleğin geliştiği, histolojik değişiklikleri tersine döndüğü ortaya konmuştur. ND, fosforlanmış tau proteininin ekspresyonunu azaltmış, hipokampal Aβ42 ve BACE1 enziminin artışı hafifletmiştir. ND, BDNF ve mitokondriyal transkripsiyon faktörü-A (TFAM)'nın artmasını sağlayarak, TNF-α ve interlökin-6 (IL-6)'yı baskılamıştır. Ayrıca p-STAT3 ve anti-apoptotik protein Bcl-2 seviyelerini artırırken nuklear faktör kappa B (NF-κB) ve kaspaz-3 (casp-3) seviyelerini azaltmıştır. Bu bulgular ND'nin NF-κB ve STAT3 sinyal yoluyla AH ile ilişkili patolojik değişikliklere karşı koruyucu etkisini göstermektedir.

Cao et al. (2017), yaptıkları çalışmada AlCl₃ ile indüklenen AH ratları üzerinde nöroprotektif bir ajan olan *Hypericum perforatum* (HPE)'nin potansiyel etkilerini tanımlamayı amaçlamışlardır. AH'ye benzer davranışsal ve biyokimyasal özellikleri indüklemek için ratlara 90 gün boyunca AlCl₃ uygulaması gerçekleştirilmiştir. 31. günden itibaren, ratlar 60 gün boyunca HPE ile tedavi edilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre HPE, AlCl₃ ile indüklenen AH ratlarında bilişsel işlevi iyileştirmiştir. Asetilkolinesteraz aktivitesinde ve glutamik asit seviyesinde AlCl₃ ile indüklenen artışı azaltmış ve ayrıca noradrenalin ve dopamin seviyesini de azaltmıştır. Ek olarak, HPE, AlCl₃ kaynaklı hipokampal patolojiyi (amiloid-beta birikimi, oksidatif stres, nöroinflamatuvar) tersine çevirmiştir.

Rather et al. (2018), doğal bir triterpen olan asiat asitin (AA) nöroprotektif potansiyelini araştırdıkları çalışmalarında ratlara oral yolla 42 gün boyunca AlCl₃ (100 mg/kg) uygulayarak indüklenmiş AH modeli oluşturmuşlardır. Deney sonunda alüminyum hipokampüs ve korteksteki asetil kolinesteraz aktivitesini ve amiloid öncü proteini, amiloid beta1-42, beta ve gama sekretazların ve tümör nekrozis faktör alfa'nın ifadelerini kontrol grubuna kıyasla önemli derecede arttırmıştır. Ayrıca AA tedavisinin AlCl₃ tarafından indüklenen AH ile ilişkili patolojileri azalttığını göstermişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyaller

3.1.1. Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan kitler ve kimyasalların listesi aşağıda çizelge halinde verilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Araştırmada Kullanılan Kit ve Kimyasal Listesi.

Kitler	Alındığı Firma
AlCl ₃	Sigma-Aldrich®
cDNA Sentez Kiti	Applied Biosystems™®
CVDK-8 Kit	Ecotech Biotechnology®
D-Sikloserin	Sigma-Aldrich®
DMEM-F12	Gibco®
DMSO	Sigma-Aldrich®
Etanol	Sigma-Aldrich®
FBS (Fetal Bovine Serum)	Gibco®
Giemsa	Sigma-Aldrich®
L-serin	Sigma-Aldrich®
LDH Assay Kit	Thermo Scientific™®
PBS	Sigma-Aldrich®
Retinoik asit	Sigma-Aldrich®
RNA İzolasyon Kiti	Invitrogen™®
Sybr Green Master Mix	Applied Biosystems™®
TAK Kiti	Rel Assay Diagnostics®
TOS Kiti	Rel Assay Diagnostics®
Tripan Blue	Sigma-Aldrich®
Tripsin/EDTA	Sigma-Aldrich®

3.1.2. Cihazlar

Tez çalışması süresince kullanılan cihazların listesi aşağıda çizelge halinde verilmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Araştırmada Kullanılan Cihaz Listesi.

Cihazın Adı	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
Isıtılıcı 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

Çalışmada insan nöroblastomadan köken alan SH-SY5Y hücreleri kullanılmıştır. Hücreler flasklarda tek katman olacak şekilde %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin, %1 L-glutamin içeren Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM): F12 besiyeri içinde 37°C'de pH dengesinin korunması için %5 CO₂ içeren ortamda büyütülmüştür. %70-80 konfluense ulaşan hücreler haftada en az iki kere pasajlanarak çoğaltılmıştır. Pasajlama işlemi için flasktaki besiyeri uzaklaştırılarak PBS ile birkaç kez yıkanmış ve %0,1 tripsin ve %0,04 EDTA solüsyonu eklenmiştir. Flasklar inkübatöre kaldırılarak 5 dk beklenmiştir. Hücreler flask tabanından tamamen ayrılınca tripsini inhibe etmek amacıyla besiyeri eklenmiştir. Hücreler 15 ml'lik santrifüj tüplerine alınarak 1500 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek süpernatant atılmış ve besiyeriyle yeniden süspanse edilmiştir.

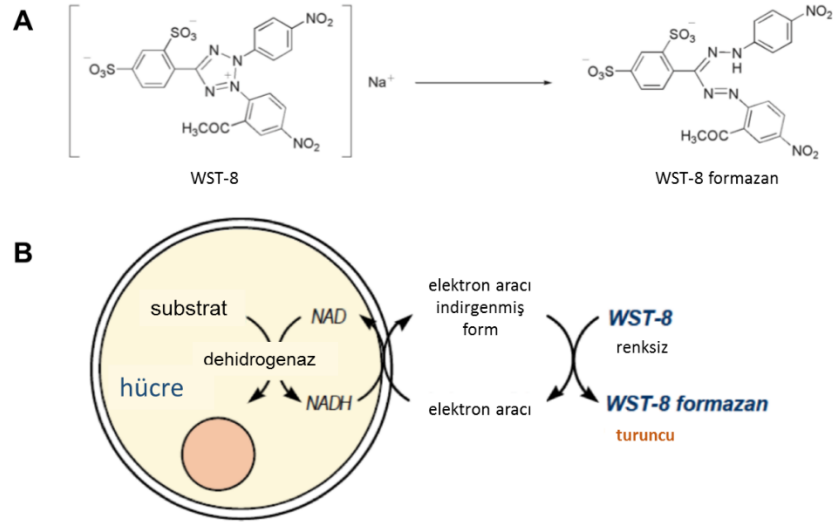
Hücre sayısını saptamak amacı ile hemositometre kullanılmıştır. Hemositometrede, ortama ilave edilen tripan mavisi (vital boya) ile süspansiyondaki hücrelerin hem sayısı hem de canlılık oranları belirlenmiştir. 25 cm² flasklara 1x10⁵ hücre olacak şekilde ekim yapılmış ve 2 günde bir besiyeri değiştirilmiştir.

3.2.1.2. SH-SY5Y Hücrelerinin Farklılaştırılması

Farklılaşma süreci için Bittencourt Pasquali et al. (2016) tarafından belirtilen yöntem esas alınmıştır. Buna göre hücreler başlangıçta 75cm²lik flasklarda 1,5 x 10⁴ hücre / cm² olacak şekilde ekilmiştir. Hücrelerin tutunması için 24 saat bekledikten sonra, hücrelerin bulunduğu besiyeri ısıyla inaktif hale getirilmiş fetal sığır serumu (%1 FBS) ve 10 µM retinoik asit (RA) içeren DMEM:F12 besiyeri ile değiştirilerek farklılaşma süreci başlatılmıştır. Kültür ortamı her 3 günde bir değiştirilmiştir. 11 gün boyunca hücrelerin morfolojisi ve farklılaşma süreci ışık mikroskobu ile izlenmiştir.

3.2.1.3. WST-8 Testi

WST-8, hücrelerdeki dehidrogenaz enzim aktiviteleri ile indirgenir ve hücre kültürü ortamında çözünür olan sarı renkli bir formazan boyasına dönüşür. Hücrelerdeki dehidrogenazların aktiviteleri ile üretilen formazan boyasının miktarı, canlı hücrelerin sayısı ile doğru orantılıdır. WST-8'in saptama hassasiyeti, MTT, XTT, MTS veya WST-1 gibi diğer tetrazolyum tuzlarından daha yüksektir. Bu amaçla WST-8 miktarı ölçülmesi için ticari olarak satılan CVDK-8 kiti kullanılmıştır. Farklılaşmış SH-SY5Y hücreleri 96 kuyulu plakalara ekilerek 24 saat tutunmaları için beklenmiştir. Ardından toksik doz olarak belirlenen AlCl₃ (200 µM) ile birlikte DCS ve LS aminoasitleri çeşitli konsantrasyonlarda (0-800 mg/L) uygulanarak 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücre canlılığı kitte belirtilen prosedür takip edilerek belirlenmiştir. Kısaca, DCS veya LS ile muamele edilmiş hücrelerin üzerine 10 µl CVDK-8 reaktifi eklenmiş ve 2 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Süre sonunda her bir örneğin absorbansı 450 nm'de okutulmuş ve % canlılık değerleri hesaplanmıştır.

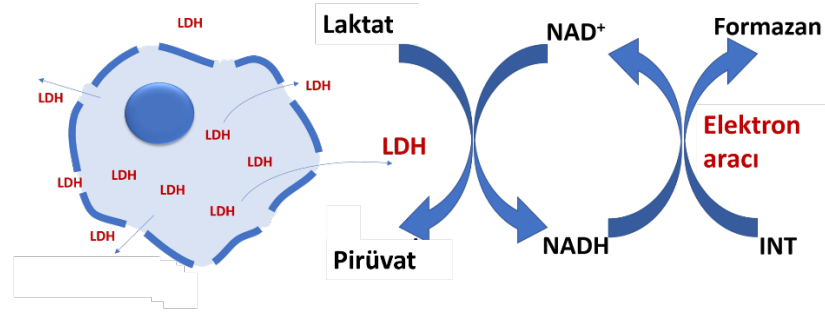


Şekil 3.1. A) WST ve WST-8 Yapısı B) WST-8 ile Hücre Canlılığı Tespiti Prensibi.

3.2.1.4. LDH Testi

Hücre sitotoksitesinin belirlenmesi amacıyla ticari olarak satılan Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit kullanılmıştır. Farklılaşmış SH-SY5Y hücreleri 96 kuyulu plakalara ekilerek 24 saat tutunmaları için beklenmiştir. Ardından toksik doz olarak belirlenen $AlCl_3$ (200 μM) ile birlikte DCS ve LS aminoasitleri çeşitli konsantrasyonlarda (0-800 mg/L) uygulanarak 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda üretici tarafından belirtilen prosedür takip edilerek sitotoksiste belirlenmiştir. Kısaca, her bir örnekten 50 μl serum yeni bir 96 kuyulu plakaya aktarılmış ve 50 μl reaksiyon karışımı ile karıştırılmıştır. Plaka oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildikten sonra 50 μl reaksiyon durdurma solüsyonu eklenerek karıştırılmıştır. Her bir örneğin absorbanı 490 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Referans dalga boyu olarak 680 nm dalga boyu kullanılmıştır. Maksimum LDH aktivitesi için kitte bulunan lizis tamponu (10X) kullanılmıştır. Spontan LDH aktivitesi için ise distile su kullanılmıştır. % Sitotoksiste değerleri aşağıda verilen formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Sitotoksiste} = \frac{\text{Örneğin LDH aktivitesi} - \text{Spontan LDH aktivitesi}}{\text{Maksimum LDH aktivitesi} - \text{Spontan LDH aktivitesi}} \times 100$$



Şekil 3.2. LDH ile Sitotoksosite Tespiti Prensibi.

3.2.1.5. Metal Şelatlama Çalışması

Şelatlama çalışmaları bir UV-Vis spektrofotometresi (Biotek EPOCH) kullanılarak suda yapılmıştır. DCS ve LS (200 µmol/L) tek başına veya $AlCl_3$, $FeCl_3$, $CuSO_4$ veya $ZnCl_2$ (200 µmol/L) varlığında oda sıcaklığında 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, DCS ve LS'nin emilim spektrumu 200 ila 500 nm arasında değişen dalga boyu ile kaydedilmiştir. Son reaksiyon karışım hacmi 1 mL ve test edilen aminoasit ve metallerin son konsantrasyonları 200 µmol/L olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.2.2. *In vivo* Çalışmalar

3.2.2.1. Deney Hayvanları

Tez çalışmasında kullanılan ratlar Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinden (ATADEM) temin edilmiştir. Deneylerde yetişkin 200-300 gram ağırlığında Sprague Dawley ırkı toplam 30 adet dişi rat kullanılmış ve kayıpsız olarak yine 30 adet rat ile çalışma tamamlanmıştır. Tüm hayvanlar standart ışık 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ve 25°C ısıda, yeteri kadar su ve yem verilerek standart plastik kafeslerde çalışmanın sonuna kadar bekletilmiştir. Çalışmanın tüm uygulamaları 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 onaylanmıştır. Çalışma grupları ve hayvan sayıları aşağıda belirtildiği şekilde planlanmıştır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Çalışmada Kullanılan Hayvan Sayısı ve Gruplar.

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

Alzheimer Grubu (n=5): Alzheimer hastalığının ratlarda oluşturulması için nörotoksik ajan olarak intraperitoneal (i.p.) yolla AlCl₃ enjekte edilmiştir. AlCl₃ distile su ile çözülmüştür.

DCS Grubu (n=5): Ratlara 4 hafta süre ile i.p. olarak 3,6 mg/kg/gün DCS verilmiştir. DCS distile su ile çözülmüştür.

LS Grubu (n=5): Ratlara 4 hafta süre ile i.p. olarak 3,6 mg/kg/gün LS verilmiştir. LS distile su ile çözülmüştür.

AlCl₃ + DCS Grubu (n=5): Ratlara 4 hafta süre ile i.p. AlCl₃ uygulamasına ek olarak 4 hafta süre ile i.p. olarak 3,6 mg/kg/gün DCS verilmiştir.

AlCl₃ + LS Grubu (n=5): Ratlara 4 hafta süre ile i.p. AlCl₃ uygulamasına ek olarak 4 hafta süre ile i.p. olarak 3,6 mg/kg/gün LS verilmiştir.

Kontrol Grubu (n=5): Ratlara herhangi bir işlem uygulanmamış olup normal günlük yaşamları korunmuştur.

Tüm ratlara son uygulamadan 24 saat sonra davranış testleri uygulanmıştır. Davranış testlerinin ardından ratlara i.p. olarak üretan enjekte edilmiştir. Batın açılıp heparinli enjektörle yaklaşık 5 ml kan intrakardiyak yöntemle alınarak heparinli tüplere konulduktan sonra ratlar dekapite edilmiştir.



Şekil 3.3. İntraperitoneal Enjeksiyon.

3.2.2.2. Vücut Ağırlığı

Tüm gruptaki ratların $AlCl_3$ ve aminoasit uygulamaları öncesinde vücut ağırlıkları ölçülmüştür. Vücut ağırlıkları haftalık olarak takip edilmiştir ve uygulamalar sonunda tekrar ölçülerek başlangıç ağırlıklarına göre farklılıklar belirlenmiştir.

3.2.2.3. Davranış Testleri

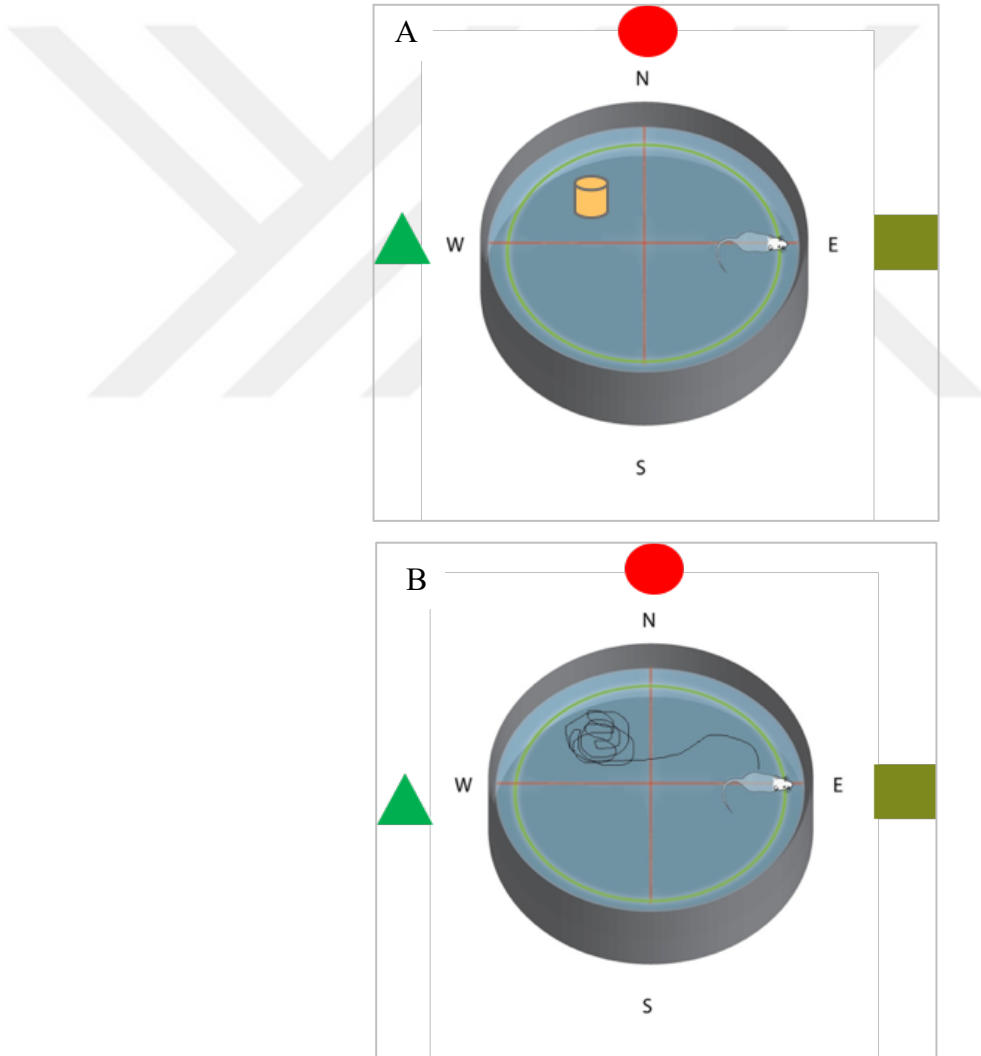
Morris'in Su Tankı Testi

Morris'in su tankı deneyi, ilk kez Morris tarafından 1984 yılında önerilmiş olan (Morris 1984) ve uzamsal belleği test etmek amacıyla sıklıkla kullanılan bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Su tankı, 150 cm çapında ve 50 cm yüksekliğinde büyük daire şeklinde bir havuzdan oluşmaktadır. Tankın içerisinde 35 cm yüksekliğinde, 25 ± 1 °C sıcaklığında ve siyah renge boyanmış su bulunmaktadır. Teorik olarak tank tabandan 4 eşit çeyrek daireye bölünmüş ve yönlerine göre isimlendirilmiştir (kuzeydoğu, kuzeybatı, güneydoğu, güneybatı). Her bir kenar uzunluğu 12,5 cm olan ve siyaha boyanmış olan kaçma platformu suyun 1 cm altında kalacak şekilde tankın kuzeybatı bölümüne yerleştirilmiştir. Kaçma platformu tank içerisinde hep aynı çeyrek daireye (kuzeybatı) yerleştirilmiştir. Tankın üç köşesine farklı renkte ve geometrik şekilde işaretler

3. MATERYAL ve YÖNTEM

konumlandırılmıştır. Dördüncü köşede ise araştırmacı her gün yerini almıştır. Ratlar 4 gün süre ile ve günde 4 kez her seferinde farklı bir köşeden bırakılmak suretiyle tankta yüzdürülmüştür. Denemelerde, hayvanların kaçma platformunu bulma süreleri kaydedilmiştir.

Hayvanların platformu bulmaları için 90 saniye süre tanınmıştır. Süre sonunda platformu bulamayan ratlar platformun üzerine elle yerleştirilmiş ve 20 saniye kalmaları sağlanmıştır. Beşinci günde ise su tankındaki kaçma platformu kaldırılmış ve ratlar platformsuz su tankında 5 dakika boyunca yüzdürülmüştür. Ratların 4 gün boyunca aynı yerde bulunan platformun yer aldığı çeyrekte (kuzeybatı) ne kadar süre geçirdiği kaydedilmiştir.



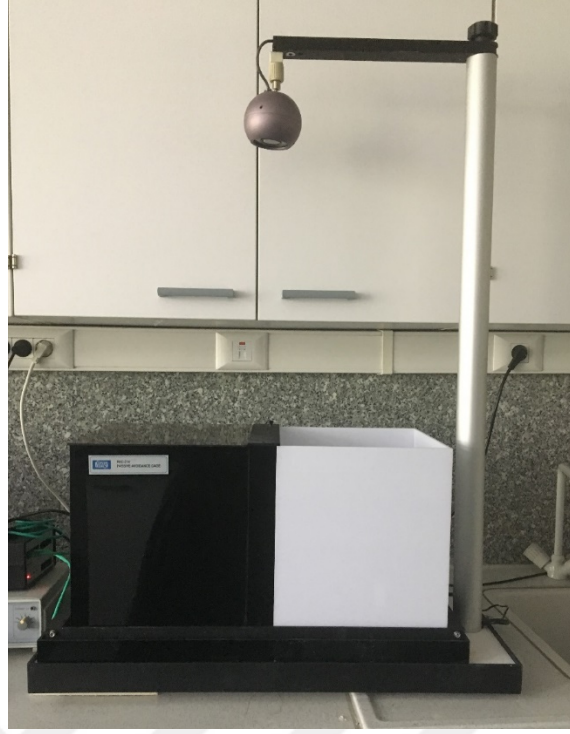
Şekil 3.4. Morris Su Tankı Deney Düzenek. A) İlk 4 Güne Ait Düzenek B) 5.Güne Ait Düzenek.



Şekil 3.5. Morris Su Tankı Görünümü.

Pasif Sakınma Testi

Pasif sakınma testi, küçük laboratuvar hayvanlarında kısa süreli veya uzun süreli belleği değerlendirmek için klasik olarak kullanılan korku-güdümlü testlerden biridir. Düzenek, biri aydınlık diğeri ise karanlık oda olmak üzere iki bölmeden oluşmaktadır. Bu bölmeler arasında otomatik olarak açılıp kapanma özelliğine sahip bir kapı bulunmaktadır. Test düzeneğinde ratların ayaklarına elektroşok verebilecek iletken yüzey yer almaktadır. Deneyin ilk günü ratlar aydınlık bölmeye bırakılmış ve 20 saniye alışma süresinin ardından kapı otomatik olarak açılmıştır. Kapının açılmasıyla ratlar içgüdüsel olarak karanlık bölmeye geçmiş ve kapı kapanmıştır. Karanlık bölmede bulunan rata 3 saniye süre ile 0,5 mA olacak şekilde elektroşok verilmiştir. İkinci gün, aynı test tekrar edilmiştir ve ratların karanlık bölmeye geçme süreleri kaydedilmiştir. Eğer 5 dakika içerisinde rat karanlık bölmeye geçmemiş ise deney sonlandırılmış ve bu ratlarda öğrenmenin bozulmadığı gösterilmiştir. Karanlık bölmeye geçen ratlar ise tekrar elektroşoka maruz kalmış dolayısıyla ratlarda öğrenmenin bozulmuş olduğu gösterilmiştir.



Şekil 3.6. Pasif Sakınma Testi Görünümü.

3.2.2.4. Biyokimyasal Analizler

Davranış testlerini takiben, ürethan anestezisi altında tüm gruptaki ratların batını açılıp yaklaşık 5 ml kan intrakardiyak yöntemle alınarak EDTA'lı tüplere konulmuştur. Örneklerin biyokimyasal analizleri Atatürk Üniversitesi Araştırma Hastanesi laboratuvarlarında hizmet alımı yapılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.5. Hematolojik Analizler

Davranış testlerini takiben, ürethan anestezisi altında tüm gruptaki ratların batını açılıp heparinli enjektörle yaklaşık 5 ml kan intrakardiyak yöntemle alınarak heparinli tüplere konulmuştur. Örneklerin hematolojik analizleri Atatürk Üniversitesi Araştırma Hastanesi laboratuvarlarında hizmet alımı yapılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.6. Toplam Antioksidan Kapasite (TAK) Analizi

Beyin doku örneklerindeki toplam antioksidan kapasitenin belirlenmesi amacıyla TAK (Rel Assay Diagnostics®, Gaziantep, Türkiye) kullanılmıştır ve üreticinin önerdiği prosedür takip edilmiştir. Buna göre 30 µl beyin homojenat örneği ile 500 µl reaktif 1 karıştırılmış ve 30 saniye sonra 660 nm dalgaboyunda spektrofotometre ile absorbans ölçülmüştür. Daha sonra 75 µl reaktif 2 eklenmiş ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyonun ardından 660 nm dalgaboyunda spektrofotometre ile absorbans ölçülmüştür. Aynı prosedür örneklerin yanı sıra deiyonize su ve standart kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Standart olarak bir vitamin E analogu olan Trolox ekivalenti (1mmol/L) kullanılmıştır. Sonuçlar mmol/L olarak ifade edilmiştir.

3.2.2.7. Toplam Oksidatif Stres (TOS) Analizi

Toplam oksidatif durumun belirlenmesi ticari olarak satılan TOS kitleri (Rel Assay Diagnostics®, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak ve üreticinin önerdiği prosedür takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Buna göre 75 µl beyin homojenat örneği ile 500 µl reaktif 1 karıştırılmış ve 30 saniye sonra spektrofotometre cihazında 530 nm dalgaboyunda absorbans ölçülmüştür. Daha sonra 25 µl reaktif 2 eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyon sonunda 530 nm dalgaboyunda spektrofotometre ile ikinci absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir. Standart olarak hidrojen peroksit (20 mmol/L) kullanılmıştır. Sonuçlar µmol H₂O₂ Equiv./L olarak ifade edilmiştir.

3.2.2.8. Mikroçekirdek Testi

Mikroçekirdek (MÇ) testi, Tolbert et al. (1992) ve Al-sabti et al. (1995)'in belirttiği yöntemlere göre gerçekleştirilmiştir. Heparinli şırıngaya toplanan taze kan örnekleri temiz, yağsız buzlu cam slaytlara yayılarak preparatlar hazırlanmıştır. Slaytlar, 10 dakika boyunca metanol içinde sabitlenmiş, 12 saat süre ile oda sıcaklığında gece kurumaya bırakılmıştır. Sabitlemeden sonra, aynı slaytlar 10 dakika Giemsa (%5) ile boyanmıştır (Palhares and Grisola 2002). Slaytlar dikey konumda havada kurutulduktan sonra lamel ile kapatılarak ışık mikroskopunda incelenmiştir. Her bir grup için, her bir

hayvandan iki mikroskopik slayt hazırlanmıştır. Eritrositlerde nükleer lezyonları ve mikronükleusları belirlemek için slayt başına 1000 çekirdek skorlanmıştır.

3.2.2.9. Patolojik İnceleme

Davranış testlerini takiben, ürethan anestezisi altında tüm gruplardaki ratların beyin dokuları çıkarılmıştır. Çıkarılan dokular PBS ile yıkandıktan sonra hızlıca %10'luk formaldehit içine alınarak histolojik değerlendirme için hazırlanmıştır.

3.2.2.10. Moleküler Genetik Analizler

3.2.2.10.1. Dokudan RNA İzolasyonu

Davranış testlerini takiben, ürethan anestezisi altında çıkarılan beyin dokuları sıvı azot içerisinde hızlıca dondurulduktan sonra metal boncuk kullanılarak homojenizatörde 40 rpm'de 4 dakika parçalama işlemi yapılmıştır. Elde edilen doku homojenatlarından RNA izolasyonu için PureLink™ RNA Mini Kiti (Invitrogen™) kullanılmıştır ve üreticinin önerdiği prosedür takip edilmiştir. Buna göre, örnekler oda sıcaklığında 12.000xg'de 2 dk santrifüj edilmiştir. RNA içeren sıvı fazın hepsi yeni bir ependorf tüpüne alınarak üzerine 500 µl %70'lik etanol eklenmiş ve vortekslenmiştir. Örneklerden 700 µl alınarak kit içerisindeki kolonlara aktarılmış ve oda sıcaklığında 12.000xg'de 15 saniye(sn) santrifüj edilmiştir. Kalan örneklerde kolonlara aktararak aynı şekilde santrifüj edilerek kolondan geçmeleri sağlanmıştır. Yıkama işlemleri için kitin içindeki Wash I ve Wash II solüsyonları kullanılmıştır. Kolondaki örneklere 700 µl Wash I eklenerek 12.000xg'de 15 sn santrifüj edilmiştir. Daha sonra örneklere 500 µl Wash II eklenerek 12.000xg'de 15 sn santrifüj edilmiş ve bu işlem bir kere daha tekrarlanmıştır. Tüpün altındaki sıvı boşaltılarak hiçbir şey eklenmeden 12.000xg'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Kolon çıkarılarak yeni ependorf tüplere takılmış ve üstüne 30 µl RNase içermeyen su eklenerek oda sıcaklığında 1 dk bekletilmiştir. Daha sonra 12.000xg'de 2 dk oda sıcaklığında santrifüj edilerek RNA örnekleri ependorf tüpte toplanmıştır. RNA örnekleri kullanılmaya kadar -80°C'de saklanmıştır.

3.2.2.10.2. Spektrofotometrik RNA Ölçümü

İzole edilen RNA örneklerinin miktar ve saflığı Epoch cihazı ile belirlenmiştir. RNA miktarı $\mu\text{g/ml}$ olarak ölçülmüştür. cDNA sentezi için RNA miktarlarının eşitlenmesi amacıyla okunan en düşük RNA değeri standart alınmıştır.

3.2.2.10.3. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” (Applied Biosystems™) kullanılmış ve üreticinin önerdiği prosedür izlenmiştir. Buna göre cDNA sentezi için $10\mu\text{l}$ RNA örneği, $2\mu\text{l}$ 10XRT random primer, $2\mu\text{l}$ 10XRT buffer, $0,8\mu\text{l}$ 25XdNTP mix, $4,2\mu\text{l}$ nükleaz içermeyen su ve en son olarak $1\mu\text{l}$ MultiScribe™ Reverse Transkriptaz enzimi kullanılmıştır. Hazırlanan örnekler termal döngü cihazına yerleştirilerek 25°C 'de 10 dk, 37°C 'de 120 dk, 85°C 'de 5 dk ve 4°C 'de ∞ olacak şekilde programlanmıştır. Elde edilen cDNA örnekleri -20°C 'de saklanmıştır.

Çizelge 3.4. cDNA Reaksiyonu.

Bileşik	Hacim (μl)
10X RT Tamponu	2,0
25X dNTP karışımı (100mM)	0,8
MultiScribe™ Revers Transkriptaz	1,0
10XRT Random Primer	2,0
Nükleaz içermeyen H ₂ O	4,2
Reaksiyon Toplamı	10,0

Çizelge 3.5. cDNA Sentezi İçin Uygulanan PZR Programı.

PZR	1.Adım	2. Adım	3. Adım	4. Adım
Sıcaklık	25°C	37°C	85°C	4°C
Zaman	10 dk	120 dk	5 dk	∞

3.2.2.10.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PZR)

Seçilen genlere ait mRNA seviyelerinin belirlenmesi için revers transkripsiyon ile elde edilen cDNA'lar spesifik primerlerin varlığında Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) ile amplifiye edilmiştir. Amplifiye edilen genlere ait primerlerin sekansları aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

Çizelge 3.6. RT-PZR' de Kullanılan Primerler.

Gen Sembolü	Forward	Reverse
<i>PSENI</i>	TGCACAGATGTCTGAGGACAG	TGCTCTATCACCTGCCTGGTA
<i>MAPT</i>	CAGAAAGGCACATCCAATGC	GTTGGTAGGGATGGGGTACG
<i>APP</i>	GGAGGAGAGCGACAGCATC	CTCCACATCCTCGTCATCCT
<i>ADAMI0</i>	TGCCTCCCAAAGTCTCTCAT	AGACGTTGCTCTCGCATACA
<i>BACE1</i>	ACTGTGCGTGCCAACATT	GCTTCACCAGGGAGTCAAAA
<i>PSENE1</i>	TGCCTTTTCTTTGGTTGGTC	TGATCCAGGTGGTGAGAACA
<i>EGFR</i>	TCATCAGGGGAAATGCTCTC	GAGGATGGGGTTGTTGCTAA
<i>APOE</i>	AACCGCTTCTGGGATTACCT	AGCTGTTCCCTCCAGCTCCTT
<i>BDNF</i>	ACAGTATTAGCGAGTGGGTCAC	GAACATACGATTGGGTAGTTCCG
<i>DAXX</i>	AGCCTCTGGTCCCTCTGAGT	GCTGCAGTTTGTGGAGGAAC
<i>VEGFA</i>	TCAGTTCGAGGAAAGGGAAA	GCGAGTCTGTGTTTTTGCAG
<i>APH1A</i>	GTGTTTTTCGGATGCACCTT	CTGATCGGTCTGTCCACATGG
<i>TNF-α</i>	TGCCTCAGCCTCTTCTCATT	CCCATTGTTGGAACTTCTCCT
<i>NCSTN</i>	ATTGTGTGGGGGAAACTCAG	CCGTCAATACCCATTTTCAGG
<i>ACTB</i>	ATCGCTGACAGGATGCAGAAG	AGAGCCACCAATCCACACAGA

Real Time-PZR üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Her bir örnek için 2 μ l cDNA, 5 μ l Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems™), 2,0 μ l nükleaz içermeyen su ve 0.5 μ l primer olacak şekilde RT-PZR reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım vortekslenmiş ve örneklerin tamamen dibe çökmesi ve oluşan kabarcıkların yok edilmesi amacıyla Mini spin cihazında 1 dakika santrifüj edilmiştir.

Çizelge 3.7. RT-PZR İçin Her Bir Tüpe Konan Bileşikler.

Bileşik	Hacim (µl)
cDNA	2,0
Forward Primer	0,5
Reverse Primer	0,5
Sybr Green Mix	5,0
Nükleaz içermeyen H ₂ O	2,0
Reaksiyon Toplamı	10,0

Hazırlanan örnekler Qiagen Rotor-Gene Q Real-Time PZR cihazına yerleştirilmiştir. Isı koşulları 50°C’de 2 dakika, 95°C’de 10 dakika X 40 siklüs, 95°C’de 15 saniye ve 60°C’de 1 dakika olacak şekilde ayarlanmıştır. Çalışmada Actb kontrol gen (housekeeping) olarak kullanılmıştır. RT-PZR analizleri sonucunda gen ekspresyonundaki farklılıkların hesaplanmasında 2- ΔΔCT metodu kullanılmıştır.

Çizelge 3.8. Uygulanan RT-PZR Programı.

RT-PZR X 40 döngü				
	1. Adım	2.Adım	3.Adım	4.Adım
Sıcaklık	50°C	95°C	95°C	60°C
Zaman	2dk	10dk	15sn	1dk

3.2.3. İstatistiksel Analizler

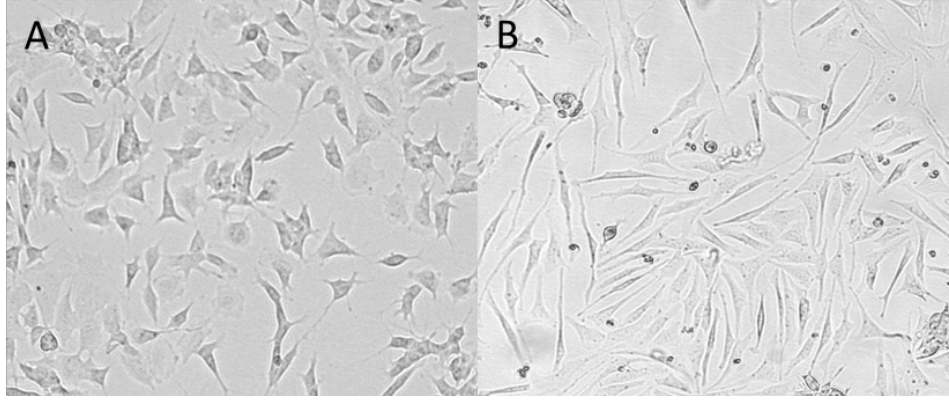
Çalışmalar sonucunda elde edilen verilen istatistiksel analizi, SPSS® versiyon 20.0 ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. İstatistiksel değerlendirme için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile post-hoc olarak Duncan’s testi kullanılmış ve istatistiksel anlamlılık 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 farklılaşma süreci için RA kullanılmıştır (Şekil 4.1). Anti-Alzheimer potansiyel değerlendirmeleri için en uygun AlCl₃ konsantrasyonunu belirleyebilmek için 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). Hücrelerinin % canlılık oranları WST-8 analizi ile belirlenmiştir. WST-8 analizi ile elde edilen sonuçlar, konsantrasyona bağlı AlCl₃ toksisitesini göstermiştir (Çizelge 4.1). En yüksek AlCl₃ konsantrasyonu (800 µM), kültürlerin canlılık oranını %14,35'e düşürmüştür. En düşük AlCl₃ konsantrasyonu (1,25 µM) ise, kontrol gruba kıyasla %5,76 oranında hücre ölümüne neden olmuştur. %51,02 canlılık oranı 200 µM AlCl₃ uygulanmış hücrelerde görülmüştür. Bu nedenle sonraki *in vitro* çalışmalarda 200 µM AlCl₃ uygulaması tercih edilmiştir.

Mevcut sonuçlar, AlCl₃'ün kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığı üzerinde önemli azalmalara yol açtığını göstermiştir. Bu bulguya paralel olarak, Rizvi et al. (2014) 24 saat boyunca 400 µM alüminyum klorür-maltol (Al(mal)₃) ile inkübe edilmiş SH-SY5Y hücrelerinin canlılık oranının %54,6'ya düştüğünü göstermiştir. Alüminyum tarafından indüklenen nörotoksisitenin altında yatan mekanizmalar arasında DNA onarım enzimi inhibisyonunu, ROS üretiminin artması (Exley 2004), antioksidan enzimlerin ve etkilerinin azaltılması (Halliwell and Gutteride 2007), NF-kB, JNK, DNA bağlanması gibi yolların değişimi (Lukiw et al. 1987; Alexandrov et al. 2005), hücre içi kalsiyum ve amiloid β seviyelerinin artması (Walton 2012) yer almaktadır.



Şekil 4.1. (A) Farklılaşmamış SH-SY5Y Hücreleri, (B) RA Kullanılarak Farklılaştırılmış SH-SY5Y Hücreleri.

Çizelge 4.1. Farklılaşmış SH-SY5Y Hücrelerinde $AlCl_3$ 'ün Sitotoksitesisi.

	Gruplar	Hücre Canlılığı (%)
	Kontrol	100
AlCl ₃ Konsantrasyonu (µ M)	1,25	94,24 ± 4,21
	2,5	90,12 ± 3,01
	5	81,54 ± 5,24
	10	74,21 ± 6,32
	25	71,24 ± 4,58
	50	62,36 ± 2,32
	100	59,27 ± 6,47
	200	51,02 ± 5,06
	400	31,25 ± 5,39
	800	14,35 ± 4,21

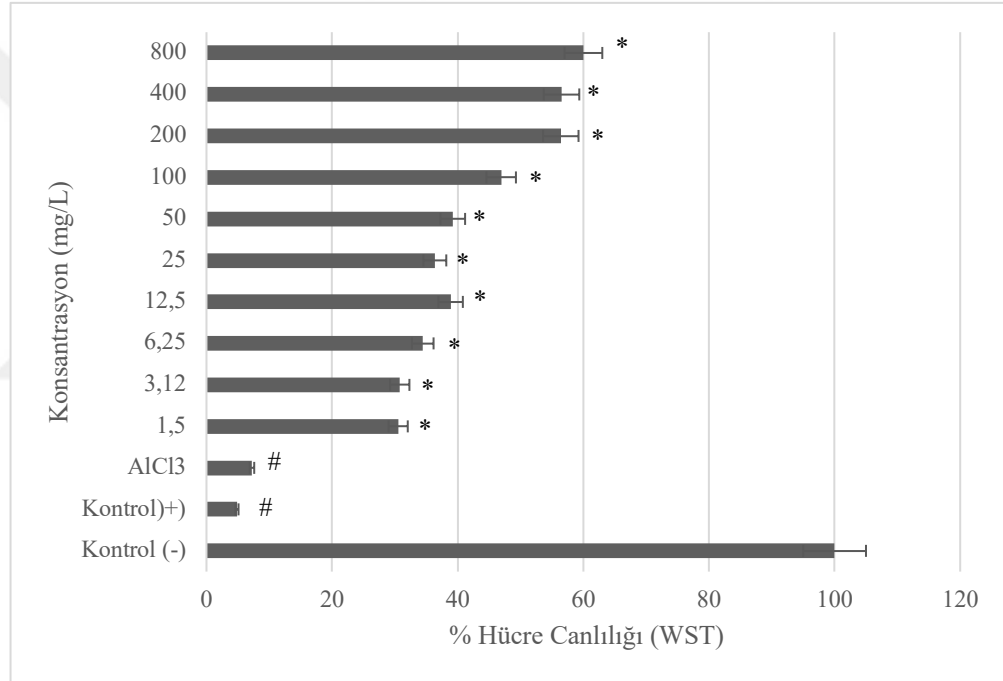
4.2. *In vitro* Hücresel AH Modelinin $AlCl_3$ İle İndüklenen Sitotoksitesinde DCS ve LS'nin Nöroprotektif Potansiyelleri

Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerine 200 µM konsantrasyonunda $AlCl_3$ uygulanarak oluşturulan Alzheimer modelinde DCS ve LS aminoasitlerinin (10 farklı dozda) nöroprotektif etkileri WST-8 ve LDH yöntemleri ile kolorimetrik ve kantitatif olarak saptanmıştır. Mitokondriyal fonksiyonun (WST-8 indirgenmesi) ve membran

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

hasarının (LDH salınımı) belirlenmesi hücre kültürü sistemlerinde yeni ilaçların etkinliğini belirlemek için sıklıkla kullanılan parametrelerdir (Briest et al. 2015; Kim et al. 2016). DCS ve LS aminoasitlerinin bulunmadığı hücreler negatif kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Pozitif kontrol grubu olarak ise kültür ortamına lizis tamponu (10X) eklenmiştir.

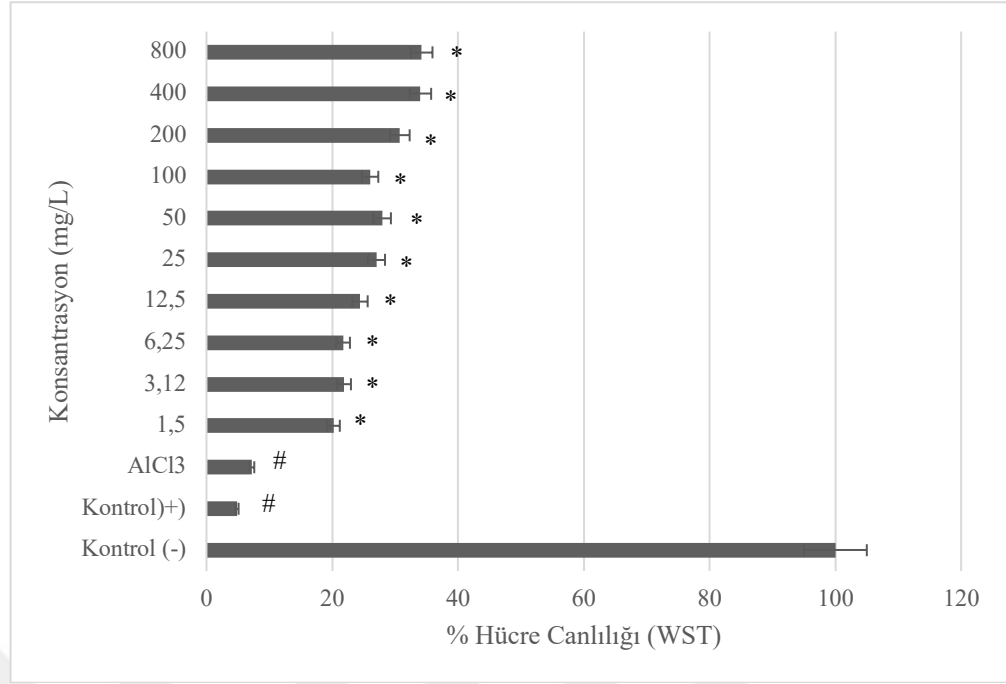
Farklı DCS ve LS konsantrasyonları (1,5-800 mg/L) tek başına hücre kültürlerine uygulandığında kontrol gruba göre hücre canlılığı oranlarını değiştirmemiştir. Ayrıca, DCS ve LS doza bağlı olarak alüminyum toksisitesine karşı farklı seviyelerde koruma sağlamıştır. *In vitro* nörotoksisite araştırmalardan elde edilen sonuçlar aşağıda grafikler halinde gösterilmiştir (Şekil 4.2 ve Şekil 4.3).



Şekil 4.2. Farklılaşmış SH-SY5Y Hücrelerinde AlCl₃ Toksisitesine Karşı DCS'nin Etkisi.

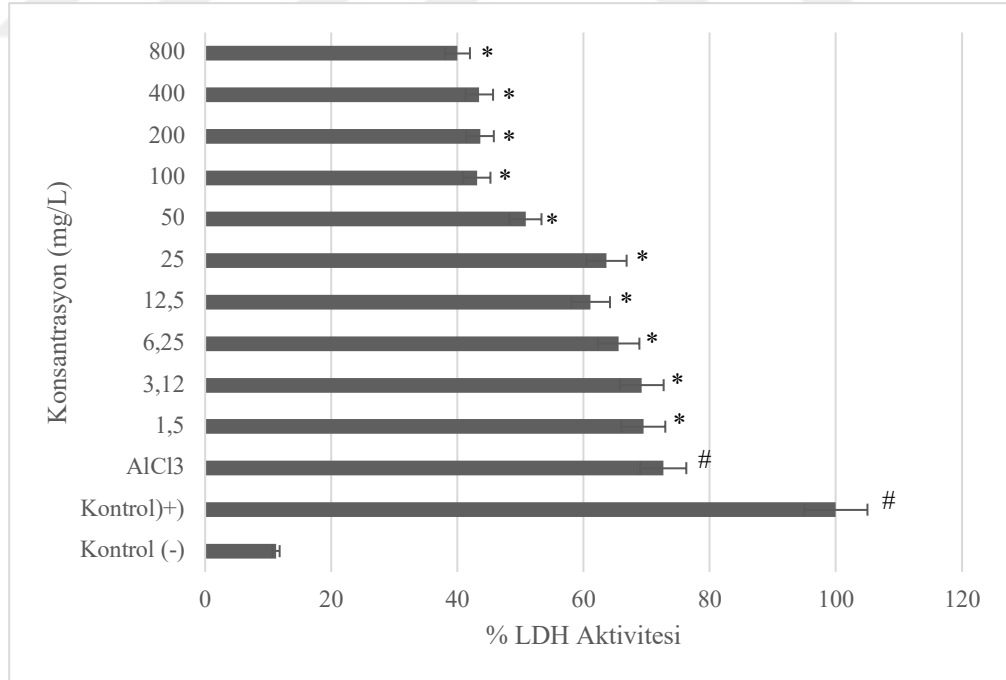
*AlCl₃ grubu ile AlCl₃'e karşı koruyucu amaçlı verilen DCS grubu arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir. # AlCl₃ grubu ile negatif kontrol grubu arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA



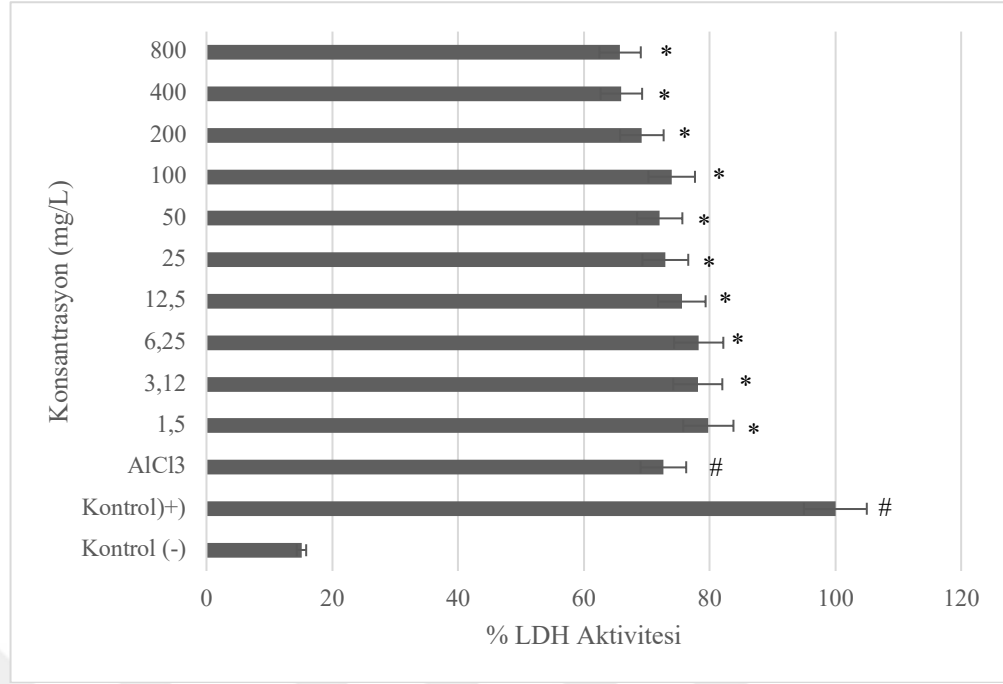
Şekil 4.3 Farklılaşmış SH-SY5Y Hücrelerinde AlCl₃ Toksisitesine Karşı LS'nin Etkisi.

*AlCl₃ grubu ile AlCl₃'e karşı koruyucu amaçlı verilen LS grubu arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir. # AlCl₃ grubu ile negatif kontrol grubu arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir.



Şekil 4.4 Farklılaşmış SH-SY5Y Hücrelerinde AlCl₃ Toksisitesine Karşı DCS'nin LDH Aktivitesi Üzerine Etkisi.

*AlCl₃ grubu ile AlCl₃'e karşı koruyucu amaçlı verilen DCS grubu arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir. # AlCl₃ grubu ile negatif kontrol grubu arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir.



Şekil 4.5. Farklılaşmış SH-SY5Y Hücrelerinde AlCl₃ Toksisitesine Karşı LS'nin LDH Aktivitesi Üzerine Etkisi.

*AlCl₃ grubu ile AlCl₃'e karşı koruyucu amaçlı verilen LS grubu arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir. # AlCl₃ grubu ile negatif kontrol grubu arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir.

LDH salınım testi ile elde edilen sonuçlar WST-8 analizine benzer sonuçlar ortaya koymuştur. Elde edilen bulgular Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'de gösterilmiştir.

WST-8 testi, esas olarak, canlı hücrelerin mitokondriyal metabolik kapasitesini ve hücre içi redoks durumunu yansıtır. SH-SY5Y hücreleri 24 saat boyunca AlCl₃ ile muamele edilerek nörotoksisite potansiyeli WST-8 testi izlenmiştir. AlCl₃ uygulaması hücre canlılığında önemli bir azalmaya yol açmıştır (200 µM; yaklaşık %49). Farklı konsantrasyonlarda DCS veya LS uygulamalarının AlCl₃ kaynaklı sitotoksisiteyi iyileştirdiği gösterilmiştir. DCS ve LS, AlCl₃ maruziyetinin neden olduğu hücre ölümünü inhibe ederek, 200 mg/L konsantrasyonda hücre canlılığında sırasıyla %56,41 ve %30,76 oranında bir artışa neden olmuştur.

AlCl₃ kaynaklı membran hasarını değerlendirmek için LDH analizi kullanılmıştır. LDH analizi ile apoptotik veya nekrotik SH-SY5Y hücrelerinden ortam içine salınan bu stabil enzimin aktivitesi ölçülmüştür. 24 saat süresince 200 µM AlCl₃ uygulaması SH-SY5Y hücreleri tarafından salınan LDH enziminin düzeyini, negatif kontrol grubuna

kıyasla %54,23 oranına yükseltmiştir. LDH sonuçları, DCS ve LS uygulamalarının, SH-SY5Y hücre membranı $AlCl_3$ ile indüklenen nörotoksositeye karşı koruduğunu göstermektedir. DCS ve LS, $AlCl_3$ maruziyetinin neden olduğu hücre ölümünü inhibe ederek, 200 μM konsantrasyonda hücre canlılığında sırasıyla %52,5 ve %31,8 oranında bir artışa neden olmuştur.

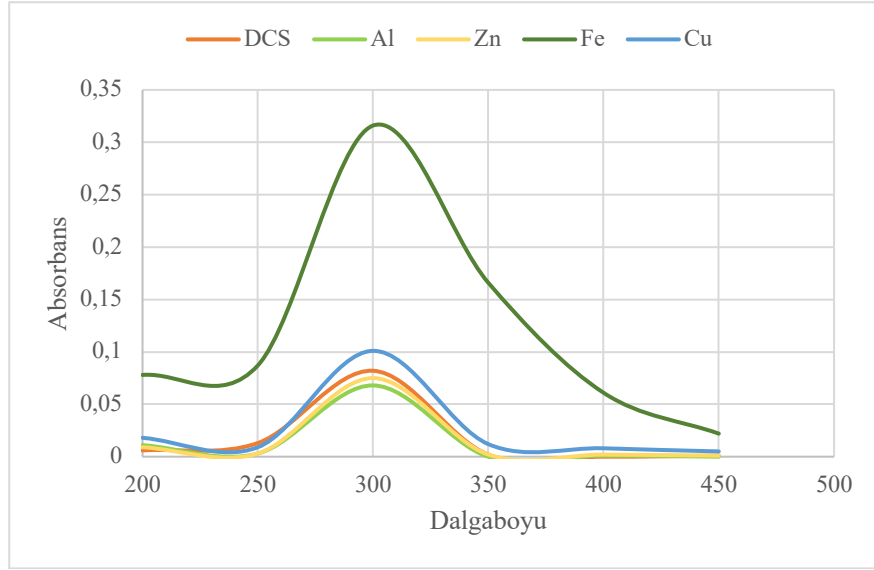
DCS ve LS'nin nöroprotektif etkilerini gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. DCS'nin motor ve kognitif fonksiyonun kolaylaştırılmasında yardımcı olmasının yanı sıra hipokampal uzun süreli potansiyeli (LTP) ve *BDNF* ekspresyonu indüklediği gösterilmiştir (Yaka et al. 2007; Adeleye et al. 2010). DCS ayrıca iskemik inme modelinde bilişsel sonuçları iyileştirmiştir (Dhawan et al. 2010).

LS'nin nöroprotektif olabileceğine dair ilk bulgular insan nöron hücre kültürü çalışmalarından elde edilmiştir. Bu çalışma, *in vitro* olarak LS içeriğinin artırılmasının, insan nöronal hücre kültüründe protein agregasyonunu ve apoptozu azalttığını göstermektedir (Dunlop et al. 2013). İnsan dışı primatlarda yapılan çalışmalar ile LS uygulanan hayvanlarda nörofibriler yumakların yoğunluğunun %50-80 oranında azaldığı gözlemlenmiştir (Cox et al. 2016). Ayrıca 20 ALS hastasında yapılan FDA onaylı faz I klinik çalışması ile günde 5 g ve 15 g LS takviyesinin ALS hastalarının fonksiyonel gerilemesini %22 oranında azaltırken günde 30 g LS takviyesinin ALS hastalarının fonksiyonel gerilemesini %85 oranında azalttığı gösterilmiştir (Levine et al. 2016). Bu veriler LS'in nöroprotektif olduğu hipotezini desteklemektedir.

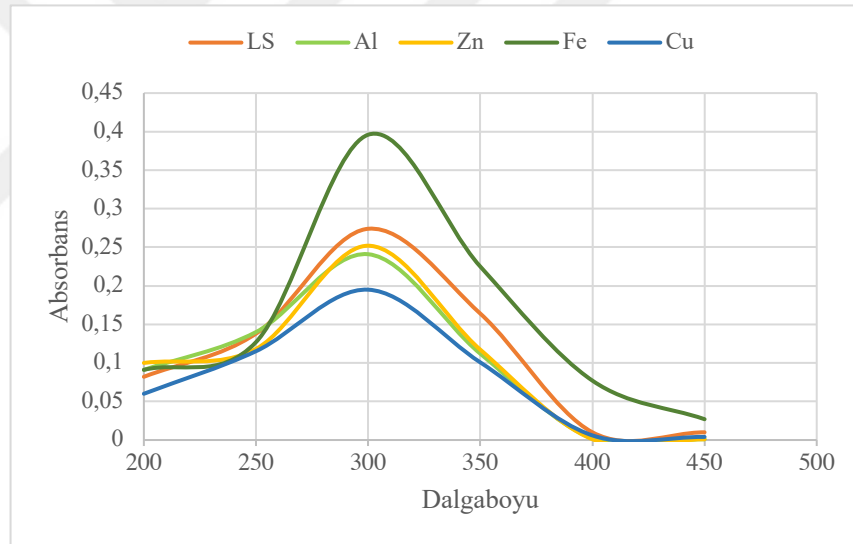
4.3. Metal şelatlama

Beynin etkilenen bölgelerindeki anormal derecede yüksek seviyedeki biyometal seviyeleri, β -amiloid oluşumuna katkıda bulunan oksidatif stresi daha da şiddetlendiren reaktif oksijen türlerinin oluşumunu katalize etmektedir. Bu etkiler, metal şelatlayıcı özellikteki bileşikler AH için umut verici ilaçlar haline getirmiştir (Zhanget al. 2015).

Bu çalışma ile DCS ve LS'nin biyometal Al^{3+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} ve Zn^{2+} varlığında şelatlama potansiyelleri, UV-Vis spektrometrisi ile incelenmiştir. Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'deki sonuçlar, DCS ve LS'nin absorban spektrumlarının Fe^{3+} ilavesinden sonra belirgin bir artış oluşturduğunu göstermiştir. Bu sonuç, kompleks oluşumu nedeniyle DCS ve LS ile Fe^{3+} iyon arasında bir etkileşim olduğunu ortaya koymuştur.



Şekil 4.6. DCS'nin 200 µmol/L Al³⁺, Fe³⁺, Cu²⁺ ve Zn²⁺ Varlığında (200 µmol/L) UV-Vis Spektrumu.



Şekil 4.7. LS'nin 200 µmol/L Al³⁺, Fe³⁺, Cu²⁺ ve Zn²⁺ Varlığında (200 µmol/L) UV-Vis Spektrumu.

4.4. Vücut Ağırlığı Değişimi

4 hafta süresince AlCl₃, DCS ve LS ile muamele edilen hayvanların canlı vücut ağırlıkları ve tüy dökme durumları haftalık olarak takip edilerek, değişimler kaydedilmiştir. Yapılan gözlemler neticesinde tespit edilen vücut ağırlıklarının gruplar arasında anlamlı farklılık göstermediği tespit edilmiştir. Ayrıca deney gruplarının

hiçbirinde tüy dökümü gözlenmemiştir. *In vivo* araştırmalar için oluşturulan deney gruplarının uygulama başlangıcında ve sonunda vücut ağırlıkları aşağıda çizelge halinde gösterilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Ratların Uygulama Öncesi ve Sonrası Vücut Ağırlıkları.

Deney Grupları	Başlangıç (gr)	Deney Sonu (gr)
Kontrol	283,75±2,32	301,54±4,25
Alzheimer	277,00±3,08	265,01±5,47
DCS	278,80±5,65	282,35±3,69
LS	278,40±7,01	279,54±2,41
Alzheimer + DCS	276,40±2,36	281,21±4,02
Alzheimer + LS	287,50±3,24	285,36±2,96

4.5. Davranış Testi Bulguları

4.5.1. Morris Su Tankı Bulguları

Çalışmada kullanılan Morris su tankı testi bulguları 5. Güne ait platform yokken platformun önceki günlerde bulunduğu kadranda geçirilen süreler şeklinde verilmiştir

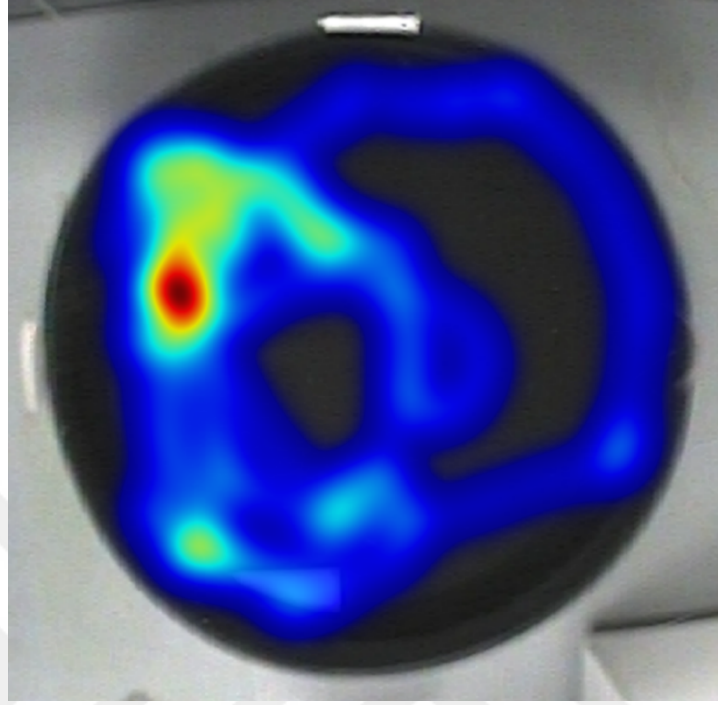
Çizelge 4.3. Morris Su Tankı Testi Beşinci Gün Sonuçları.

Deney Grupları	5.gün (sn)
Kontrol	32,60±2,47
Alzheimer	18,60±3,78 [#]
DCS	23,40±5,21
LS	22,28±3,48
Alzheimer + DCS	25,75±6,01 [*]
Alzheimer + LS	27,20±4,12 [*]

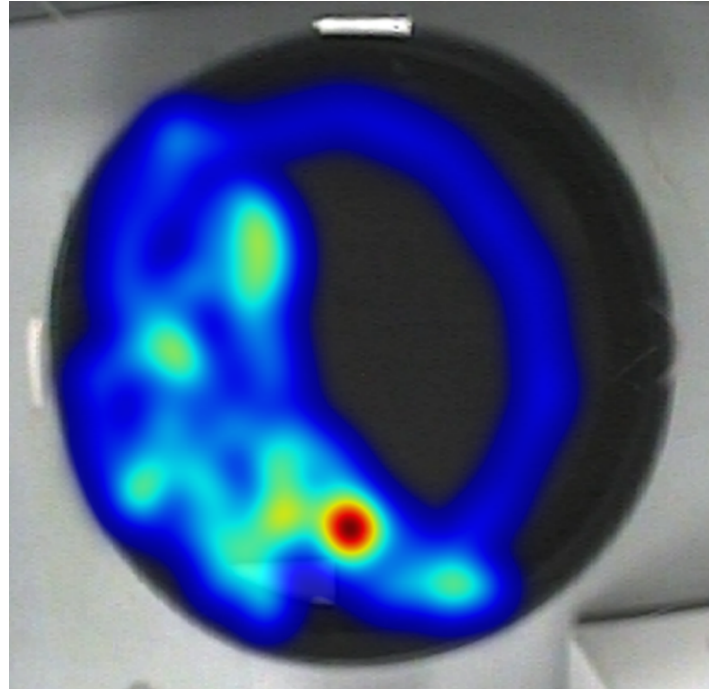
*Alzheimer grubu ile koruyucu amaçlı verilen serin grupları arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir. # Alzheimer grubu ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

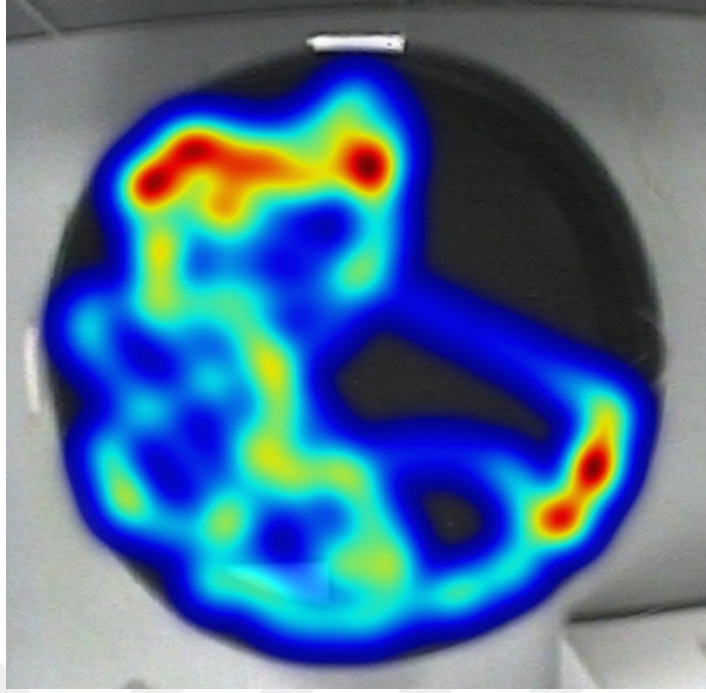
Ayrıca her gruptan birer hayvanın 5.güne ait platform yokluğunda su tankında buldukları alanları gösteren sıcaklık harita örneği aşağıda gösterilmiştir.



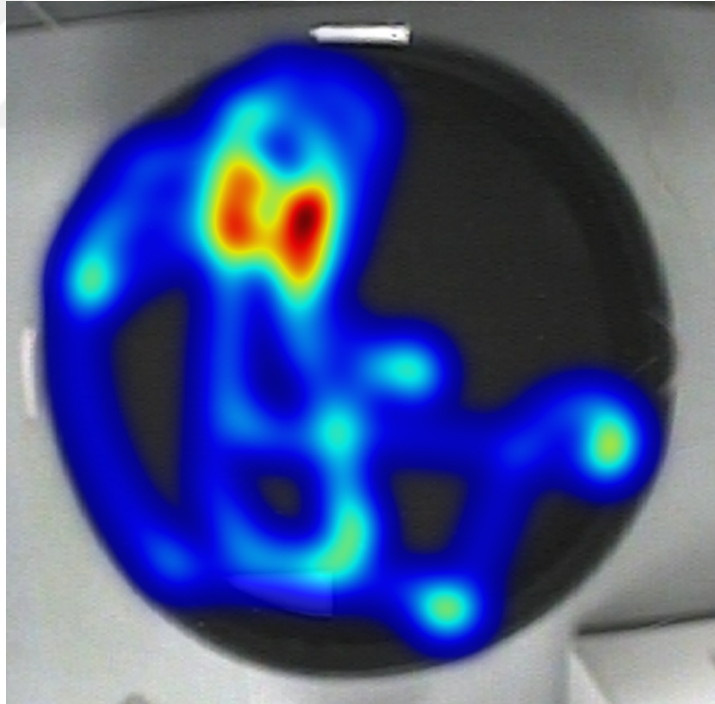
Şekil 4.8. 5.Günde Kontrol Grubundan Bir Hayvanın Platformun Önceki Günlerde Bulduğu Kadrandaki (Kuzey-Batı) Geçirdiği Süreyi Gösteren Sıcaklık Haritası.



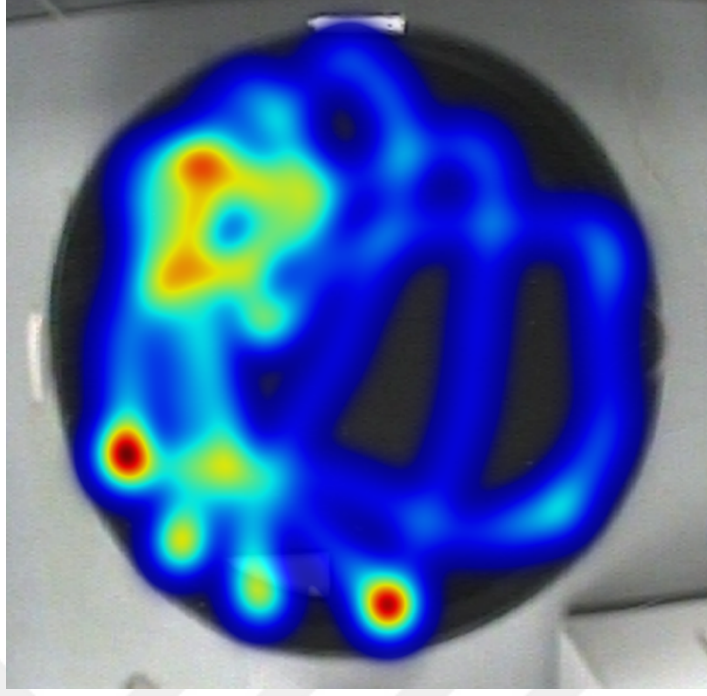
Şekil 4.9. 5.Günde AlCl₃ Grubundan Bir Hayvanın Platformun Önceki Günlerde Bulduğu Kadrandaki (Kuzey-Batı) Geçirdiği Süreyi Gösteren Sıcaklık Haritası.



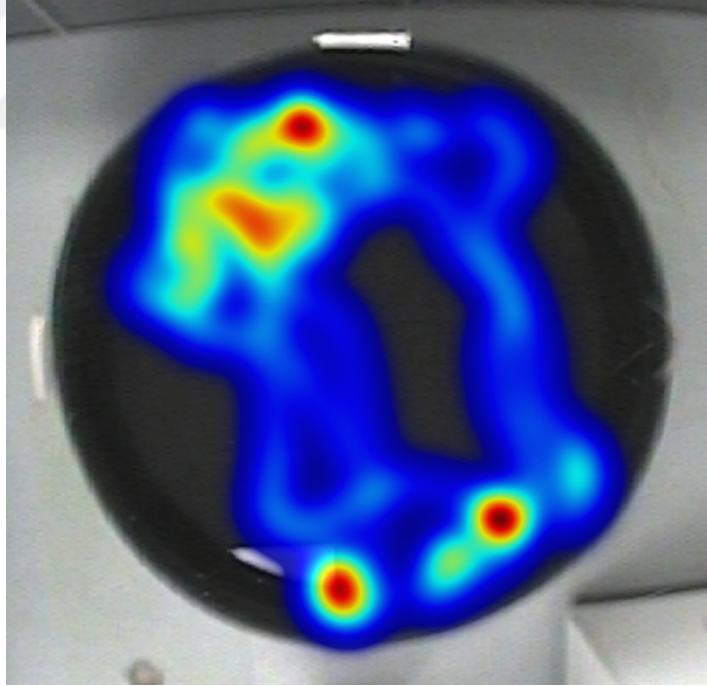
Şekil 4.10. 5.Günde DCS Grubundan Bir Hayvanın Platformun Önceki GŐnlerde Bulunduğu Kadrandaki (Kuzey-Batı) Geçirdiği SŐreyi GÖsteren Sıcaklık Haritası.



Şekil 4.11. 5.Günde LS Grubundan Bir Hayvanın Platformun Önceki GŐnlerde Bulunduğu Kadrandaki (Kuzey-Batı) Geçirdiği SŐreyi GÖsteren Sıcaklık Haritası.



Şekil 4.12. 5.Günde $AlCl_3$ +DCS Grubundan Bir Hayvanın Platformun Önceki GŐnlerde Bulunduğu Kadranda (Kuzey-Batı) Geçirdiği SŐreyi GÖsteren Sıcaklık Haritası.



Şekil 4.13. 5.Günde $AlCl_3$ +LS Grubundan Bir Hayvanın Platformun Önceki GŐnlerde Bulunduğu Kadranda (Kuzey-Batı) Geçirdiği SŐreyi GÖsteren Sıcaklık Haritası.

İstatistiksel değerlendirme sonuçları $AlCl_3$ ile maruziyet sonrası oluşturulan deneysel Alzheimer modeli ratların Morris su tankı deneylerindeki hatırlama sŐrelerinin kontrol grubundan anlamlı derecede daha uzun olduğunu göstermiştir. DCS ve LS

uygulaması deneysel Alzheimer grubunda uzamış olan hatırlama sürelerini anlamlı ölçüde kısaltmıştır (Çizelge 4.3).

4.5.2. Pasif Sakınma Testi Bulguları

Çalışmada ratlarda kısa süreli belleğin değerlendirilmesi amacıyla pasif sakınma testi uygulanmıştır.

1.gün: Pasif sakınma testine ait ilk gün sonuçları Çizelge 4.4’de verilmiştir. İstatiksel analizler gruplar arasında anlamlı bir farklılık olmadığını göstermiştir.

Çizelge 4.4. Pasif Sakınma Testi İlk Gün Sonuçları.

Deney Grupları	1.gün (sn)
Kontrol	46,08±4,07
Alzheimer	63,50±3,78
DCS	40,80±7,21
LS	56,00±2,65
Alzheimer + DCS	45,80±3,09
Alzheimer + LS	54,20±3,01

2. gün: Pasif sakınma testine ait 2. gün sonuçları Çizelge 4.5’de verilmiştir. İstatiksel analizler AlCl₃ ile kontrol grubu ve AlCl₃ ile LS ve AlCl₃ ile DCS grupları arasında anlamlı bir farklılık olduğunu göstermiştir.

Çizelge 4.5. Pasif Sakınma Testi İkinci Gün Sonuçları.

Deney Grupları	2.gün (sn)
Kontrol	300,00±0,00
Alzheimer	57,66±3,08 [#]
DCS	199,33±5,63
LS Grubu	286,66±9,14
Alzheimer + DCS	66,20±5,21 [*]
Alzheimer + LS	234,00±4,20 [*]

*Alzheimer grubu ile koruyucu amaçlı verilen serin grupları arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir. # Alzheimer grubu ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir.

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, deneysel Alzheimer'lı sıçanların aktif öğrenme deneylerinde kaydedilen sakınma sürelerinin kontrol grubuna göre uzadığı, sakınma sayılarının ise azaldığı saptanmıştır. Dolayısı ile DCS ve LS aminoasitlerinin deneysel Alzheimer modeli ratların hatırlama sürelerini kısaltmış olması, söz konusu aminoasitlerin *in vivo* deneysel Alzheimer modeli hayvanlarda öğrenme ve bellek fonksiyonlarını artırdığını ortaya koymaktadır. Yapılan hayvan çalışmaları, DCS'nin sıçanlarda öğrenmeyi (Lelong et al. 2001; Hughes 2004), belleği (Monahan et al. 1989), bilişsel işlevi kolaylaştırdığını ve uzamsal yön ve öğrenme bozukluklarını iyileştirdiğini göstermiştir (Flood et al. 1992). DCS'nin ko-agonist olarak görev alarak NMDA reseptörünün aktivasyonunu sağladığı, böylelikle hayvanlarda ve insanlarda hafıza fonksiyonunu geliştirdiğine dair bol miktarda kanıt vardır (Temple and Hamm 1996; Schneider et al. 2000; Lelong et al. 2001; Andersen et al. 2002; Rouaud and Billard 2003).

Hem *in vitro* hem de *in vivo* deneylerden elde edilen çeşitli kanıtlar LS'nin merkezi sinir sisteminde nöronal gelişim ve işlevinde önemli bir rol oynadığını işaret etmektedir (de Koning and Klomp 2004; Yoshida et al. 2004). LS'nin, hipokampal nöronların morfolojik ilerlemesi için gerekli olduğu ve MSS için güçlü bir sağkalımı destekleyici faktör olarak işlev gördüğü gösterilmiştir (Mitoma et al. 1998; Furuya et al. 2000). Ayrıca LS'nin nöroprotektif potansiyeli hücre kültürünün yanı sıra insan dışı primatlarda gerçekleştirilen çalışmalarla da ortaya konmuştur (Dunlop et al. 2013; Cox et al. 2016).

Test edilen aminoasitlerin davranış testlerindeki etkinlikleri karşılaştırıldığında; LS'nin deneysel Alzheimer modeli ratların uzamış olan hatırlama sürelerini kısaltmakta DCS'ye göre daha etkili olduğu saptanmıştır.

4.6. Biyokimyasal Bulgular

Ratlardan alınan kan örnekleri kullanılarak biyokimyasal analizler yapılmıştır. Her bir gruba ait biyokimyasal veriler Çizelge 4.6'de verilmiştir. Elde edilen bulgulara göre istatistiki açıdan anlamlı sonuçlar CK (kreatin kinaz), AST (Aspartat aminotransferaz), ALT (Alanin aminotransferaz) ve ürik asit değerlerinde gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.6. Tüm Deney Gruplarına Ait Biyokimyasal Bulgular.

	Kontrol	AlCl ₃	DCS	LS	AlCl ₃ + DCS	AlCl ₃ + LS
Parametre						
CK	682,00	277,00*	570,00	580,00	443,00*	351,00*
AST	139,00	168,00*	132,00	160,00	156,00	140,00
ALT	48,00	62,00*	51,00	54,00	54,00*	48,00*
LDH	469,00	598,00	419,00	463,00	412,00	400,00
Trigliserid	61,00	60,00	66,00	62,00	64,00	70,00
Total						
Kolesterol	68,00	64,00	77,00	80,00	71,00	62,00
Ca	11,20	9,80	8,90	10,3	10,70	8,10
P	8,00	7,90	6,70	7,80	8,90	7,80
Mg	3,25	2,26	2,81	2,45	2,49	2,73
Total Bilirubin	0,31	0,01*	0,54	0,45	0,05*	0,06 *
Krea.	0,50	0,30	0,20	0,30	0,30	0,50
Na	135,00	125,00	125,00	126,00	129,00	130,00
K	12,45	18,48	12,36	14,25	13,82	14,84
Ürik Asit	7,50	4,50*	6,30	6,70	5,00	6,10
BUN	24,77	21,03	24,49	21,50	21,16	23,36

İstatistiki olarak anlamlı olan sonuçlar * ile belirtilmiştir.

CK'nın beynin hücrel enerjisinde temel bir rol oynadığı gösterilmiştir ve AH bireylerde oksidasyon ile önemli ölçüde inaktive edilmektedir (Jost et al. 2002). Çalışma sonunda gözlemlendiğimiz AlCl₃ ile oluşturulan deneysel AH grubun beynindeki anormal CK aktivitesi, literatürdeki bir dizi raporla desteklenmektedir. Burbaeva et al. (1992) AH beynindeki nörofibriler yumaklarda CK varlığını bildirmiştir. Ayrıca Alzheimer hastalığında kreatin kinazın daha düşük bir aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Smith et al. 1991; Pettegrew et al. 1994) Bu, CK'nin doğrudan nörotransmisyona dahil olduğunu

ve CK fonksiyonundaki bozulmanın AH beyninde gözlenen nörotransmisyon ve nöronal kaybın azalmasına katkıda bulunabileceğini göstermektedir. Ayrıca elde edilen verilen bulgular, DCS ve LS'nin $AlCl_3$ tarafından azaltılan CK aktivitesinde anlamlı artışa yol açtığını göstermiştir.

Aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT) başlıca karaciğerde bulunan enzimlerdir, fakat kırmızı kan hücrelerinde, kalp hücrelerinde, kas dokusunda ve pankreas, böbrek gibi diğer organlarda da bulunabilmektedir. AST veya ALT seviyelerindeki değişiklikler, esas olarak karaciğer rahatsızlıklarının seyrini izlemek için kullanılmaktadır (Schwartz 1971; Giannini and Testa 2005). $AlCl_3$ ile muamele edilen ratların serum AST ve ALT seviyelerinin artışı karaciğer hasarını göstermektedir. Bu sonuçlar karaciğer hasarı ile Alzheimer hastalığı arasında bir ilişki olabileceğini savunan çalışmalar ile paralellik göstermektedir (Sutcliffe et al. 2011; Kim et al. 2016). DCS ve LS uygulaması $AlCl_3$ ile indüklenen AH grubunda artmış ALT seviyelerini azaltarak iyileştirici bir etki gösterdikleri söylenebilmektedir. Her iki aminoasit de $AlCl_3$ ile indüklenen AH ratların AST seviyelerinde bir değişikliğe yol açmamıştır.

Alzheimer hastalığının patogeneğinde oksidatif hasarın önemli rol oynadığı bilinmektedir (Zhu et al. 2004). Bu nedenle, serum bilirubin ve ürik asit gibi spesifik antioksidanların düşük seviyeleri AH hastalarında oksidatif strese dair bazı kanıtlar sağlayabilmektedir (Kim et al. 2006). Bu çalışmada, doğal antioksidanlardan bilirubin ve ürik asitin AH'li ratlarda kontrol gruba göre anlamlı derecede düşük olduğunu gösterilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, bilirubin ve ürik asit gibi bazı oksidatif stres belirteçlerinin $AlCl_3$ ile indüklenen AH ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. $AlCl_3$ ile indüklenen AH ratlarda, DCS veya LS ile muamele düşük bilirubin seviyesinde anlamlı bir artışa neden olurken ürik asit seviyesinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır.

4.7. Hematolojik Bulgular

Ratlardan alınan kan örneklerinin hematolojik analizleri yapılmıştır ve her bir gruba ait hematolojik veriler Çizelge 4.7'de verilmiştir. Elde edilen bulgulara göre istatistiki açıdan anlamlı sonuçlar nötrofil ve bazofil değerlerinde gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.7. Tüm Deney Gruplarına Ait Hematolojik Bulgular.

Parametre	Kontrol	AlCl ₃	DCS	LS	AlCl ₃ + DCS	AlCl ₃ + LS
WBC	4,34	4,74	4,21	5,78	5,10	4,77
LYMPH	80,30	81,00	82,50	81,50	80,50	82,50
NEUT	12,60	123,00*	11,14	9,35	74,25*	117,00
MONO	1,50	1,40	1,00	1,21	1,20	1,60
EO	5,40	6,30	3,50	4,22	4,80	4,25
BASO	3,20	0,54*	2,25	2,10	1,20*	0,47*
RBC	5,41	6,91	5,95	6,07	6,41	4,37
HGB	9,60	11,40	10,50	11,50	11,50	8,20
HCT	32,40	30,39	33,70	31,57	39,70	32,25
MCH	17,70	16,50	17,60	18,00	17,20	18,80
MCV	59,90	57,60	56,60	56,60	59,10	58,80
MCHC	29,60	28,60	31,20	31,70	29,20	31,90
RDW-SD	26,10	21,10	24,90	23,50	25,20	23,10
RDW-CV	15,90	18,90	13,00	14,60	16,50	16,80
MPV	8,00	8,00	7,70	8,40	8,10	8,70
PLT	767,00	506,00	565,00	712,00	726,00	734,00
PCT	0,60	0,40	0,40	0,60	0,70	0,50
PDW	7,80	8,70	7,40	8,20	9,20	9,40
NRBC	1,50	1,00	1,01	1,70	1,20	1,60
P-LCR	9,20	11,50	7,10	14,10	11,40	16,20
MACROR	1,50	1,50	1,30	1,08	1,20	1,01
MICROR	71,40	66,70	78,10	77,80	69,20	70,61

İstatistiki olarak anlamlı olan sonuçlar * ile belirtilmiştir.

İnflamasyon, Alzheimer hastalığının ayırt edici bir özelliklerinden biridir ve doğal immün hücrelerin hastalık patogeneziye katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Wyss-Coray 2006; Schwartz et al. 2013). Nötrofil seviyelerindeki artış, kronik inflamasyonun belirteçidir ve AH ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Nötrofillerin Alzheimer hastalığı patogeneziye ve bilişsel bozukluğa katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Vitte et al. 2004; Zenaro et al. 2015). Bizim sonuçlarımız da AlCl₃'ün nötrofil seviyesinde artışa yol açarak inflamasyona neden olduğunu göstermektedir. Ayrıca AlCl₃'ün etkisine karşı DCS uygulamasının nötrofil seviyesinde anlamlı bir düşüşe yol açarak inflamasyon üzerinde etkili olduğu sonucuna varılmıştır. LS uygulamasında ise anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.

Düşük bazofil düzeyleri ise kronik alerjik inflamatuvar duruma bağlı olarak aşırı kullanımlarını göstermektedir. Önceki çalışmalarda da azalmış bazofil sayısı ile AH

arasındaki ilişki gösterilmiştir (Shad et al. 2013; Chen et al. 2017). Elde edilen bulgular $AlCl_3$ muamelesinin bazofil seviyesinde azalmaya yol açtığını ve bu azalmanın DCS ve LS uygulamaları ile anlamlı şekilde düzeldiğini göstermiştir.

4.8. TAK ve TOS Testleri

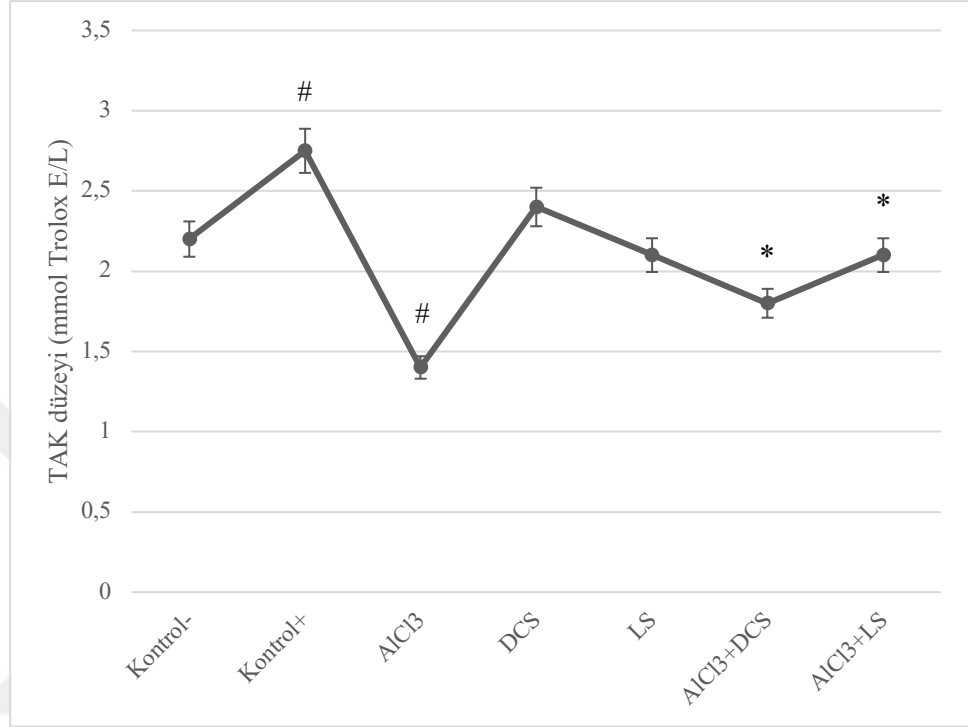
DCS, LS ve $AlCl_3$ ile indüklenmiş deneysel AH modeli rat gruplarından alınan beyin dokuları üzerinde toplam antioksidan kapasitesi (TAK) ve toplam oksidatif stres (TOS) seviyeleri üzerindeki etkileri Şekil 4.14 ve Şekil 4.15’de gösterilmektedir. Sonuçlar her iki aminoasitin de TAK seviyelerini desteklediğini ortaya çıkarmıştır. DCS, LS ve pozitif kontrol olarak kullanılan askorbik asit ($10 \mu M$) TAK düzeylerinde sırasıyla yaklaşık olarak 2,37; 2,16 ve 2,75 kat artışa yol açmıştır. TOS düzeyinde ise pozitif kontrol olarak hidrojen peroksit ($25 \mu M$) yaklaşık 3,12 kat artışa neden olurken $AlCl_3$ ile 2,8 kat artışa neden olmuştur. Bununla birlikte, DCS ve LS uygulanmış gruplar hiçbir uygulama yapılmamış kontrollere kıyasla TOS seviyelerini değiştirmemiştir. Elde edilen sonuçlar $AlCl_3$ maruziyetinin TAK düzeyinde anlamlı ($p < 0,05$) azalışa ve TOS düzeylerinin artışına neden olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu olumsuz değişimlerin DCS ve LS uygulamaları ile hafifletildiği gösterilmiştir (Şekil 4.14 ve Şekil 4.15). LS’nin, DCS’ye göre $AlCl_3$ tarafından indüklenmiş oksidatif stresin hafifletilmesinde daha etkili olduğu bulunmuştur.

Çok sayıda çalışma ile oksidatif stresin Alzheimer hastalığının başlangıcından sorumlu olduğu ve patogenezinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Beyin, diğer organlara göre oksidatif strese karşı daha savunmasızdır ve nöronların bileşenlerinin çoğu (lipidler, proteinler ve nükleik asitler) mitokondriyal disfonksiyon (Federico et al. 2012), artmış metal seviyeleri (Ayton et al. 2013), inflamasyon (Candore et al.2010; Lee et al. 2010) ve birikmiş β -amiloid ($A\beta$) (Zhao and Zhao 2013; Yan et al. 2013) nedeniyle oksitlenebilmektedir. Oksidatif stres, $A\beta$ ’nin birikmesini, tau hiperfosforilasyonunu ve daha sonra sinapsların ve nöronların kaybını teşvik ederek AH’nin ilerlemesine neden olmaktadır (Dias-Santagata et al. 2007). Oksidatif stres ile AH arasındaki bu ilişki, oksidatif stresin AH’nin patolojik sürecinin önemli bir parçası olduğunu ve AH tedavisinde antioksidanların yararlı olabileceğini düşündürmektedir.

Mevcut sonuçlar DCS ve LS’nin pro-oksidatif değişikliklere yol açmadan farklı derecelerde antioksidatif potansiyele sahip olduklarını göstermiştir. Ayrıca, DCS ve LS

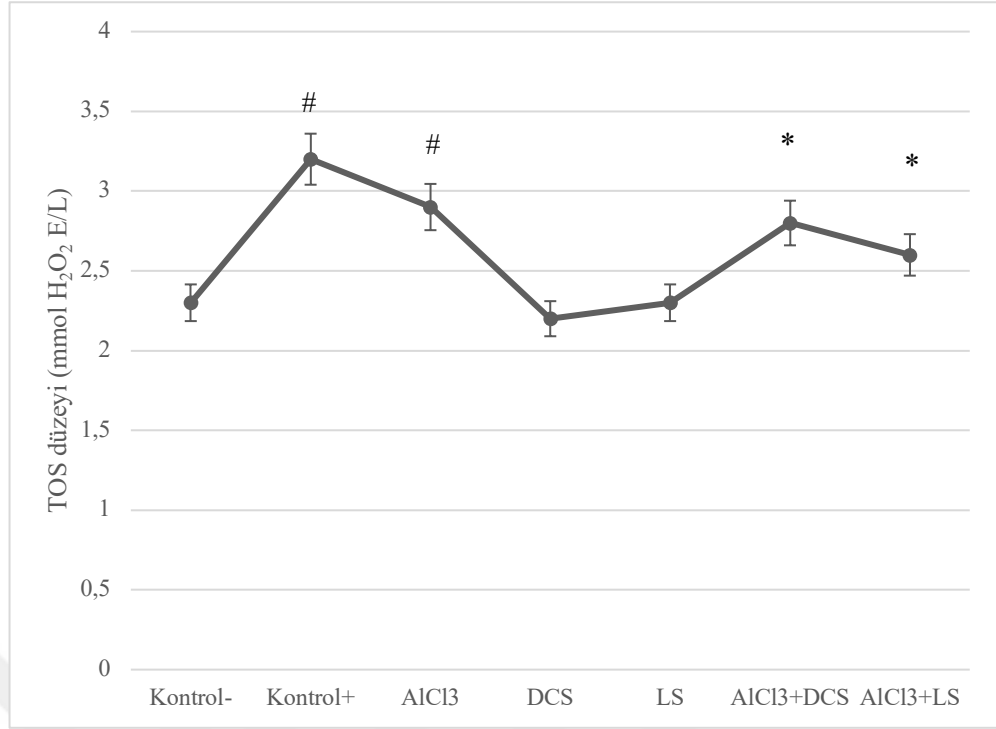
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

ile yapılan uygulama, $AlCl_3$ ile muamele edilen gruba kıyasla TOS düzeyini azaltmış ve TAK seviyelerini arttırmıştır. Bu sonuçlar DCS ve LS'nin oksidatif strese karşı koruyucu bir rol oynadığını göstermektedir, bu da söz konusu aminoasitlerin antioksidan etkilerinin nöronal koruma mekanizmasında etkili olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.14. *In vivo* Beyin Dokusunda DCS, LS ve $AlCl_3$ 'ün TAK Düzeyi Üzerine Etkileri.

* $AlCl_3$ grubu ile koruyucu amaçlı verilen serin grupları arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir. # $AlCl_3$ grubu ile negatif kontrol grubu arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir.



Şekil 4.15. *In vivo* Beyin Dokusunda DCS, LS ve AlCl₃'ün TOS Düzeyi Üzerine Etkileri.

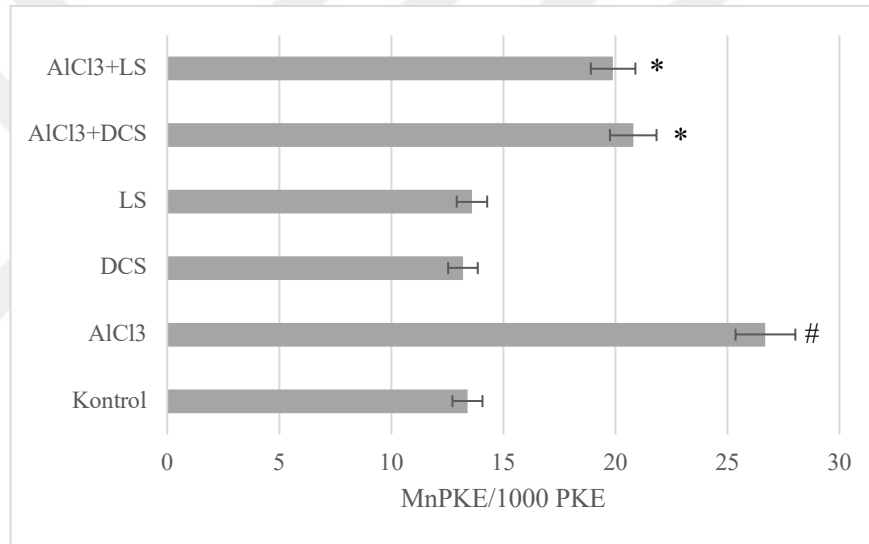
*AlCl₃ grubu ile koruyucu amaçlı verilen serin grupları arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir. # AlCl₃ grubu ile negatif kontrol grubu arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir.

4.9. Mikroçekirdek Testi

Sıçan tam kan örneklerinden hazırlanan mikroçekirdek (MÇ) preparatlarının analizleri sonrasında elde edilen sonuçlar Şekil 4.16'de gösterilmiştir. DCS ve LS ile muamele edilmiş ratlara ait örneklerin MÇ frekanslarının negatif kontrol değerlerinden istatistiksel olarak farklı olmadığı gösterilmiştir. Dolayısıyla, DCS ve LS aminoasitlerinin genotoksikite potansiyellerinin bulunmadığı açıkça ortaya konulmuştur. 28 gün süresince AlCl₃ ile muamele edilmiş ratlara ait örneklerde gözlenen MÇ/1000 hücre değerlerinin kontrol grubu değerlerinden belirgin bir şekilde ($p < 0,05$) farklı olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar literatürde bulunan önceki raporlar ile paralellik göstermekte ve Al'nin DNA molekülünde hasar oluşturma kapasitesine sahip bir metal olduğunu kanıtlamıştır. Al'nin, kromozom kırıklarına yol açarak veya mitotik iğlerin oluşumuna müdahale ederek hücre bölünme sırasında kromozomların dengeli dağılımını değiştiren genotoksik bir madde olduğu belirtilmiştir. Al tedavilerinin, düşük konsantrasyonlarda bile ($5 \mu\text{M}$ *in*

vitro ve 49 mg/kg *in vivo*) genetik materyale zarar vererek MÇ oluşumuna neden olduğunu göstermişlerdir (Leticia et al. 2017).

Kamalov et al. (2011), alüminyumun düşük konsantrasyonlarda (10 µM) mikroçekirdek testi ile saptanabilen DNA hasarını indüklediğini göstermişlerdir. Al tarafından üretilen genotoksisite farklı mekanizmalarla ortaya çıkmaktadır: kromatik yapının değiştirilmesi (Lima et al. 2007), serbest radikal oksijen (ROS) indüklenmesi (Kumar and Gill 2009), lizozimden salınan serbest DNaz (Banasik et al. 2005) ve fonksiyonel gen sinyalinin bozulması (Pogue and Lukiw 2016). Alüminyumun bu mekanizmaların biri veya tamamı aracılığı ile genotoksik olduğu düşünülmektedir (Balasubramanyam et al. 2009).



Şekil 4.16. *In vivo* Şartlarda DCS, LS ve AlCl₃ İle Muamele Edilen Ratların Kan Smear Örneğinde Gözlenen Mikroçekirdek Sıklıkları.

*AlCl₃ grubu ile koruyucu amaçlı verilen serin grupları arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir. # AlCl₃ grubu ile negatif kontrol grubu arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir.

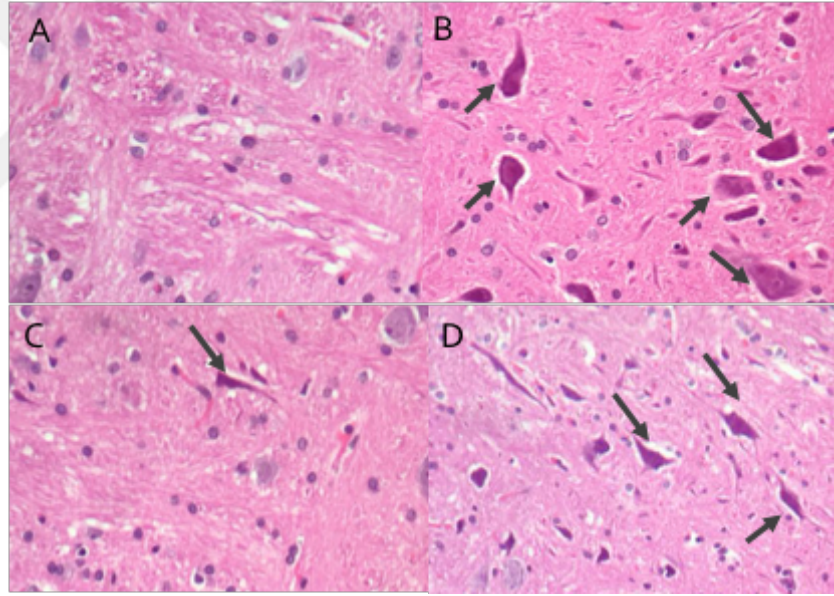
4.10. Patolojik Değerlendirme

DCS, LS ve AlCl₃'ün beyin dokusunun nispi ağırlığı üzerindeki etkileri Çizelge 4.8'de gösterilmiştir. Bu parametreye göre, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, söz konusu metal AlCl₃ grubunun beyin dokusunda önemli oranda büzülmeye neden olmuştur.

Çizelge 4.8. DCS, LS ve $AlCl_3$ 'ün Beyin Dokusunun Nispi Ağırlığı Üzerindeki Etkileri.

Deney Grupları	Beyin ağırlığı
Kontrol	32,60±2,47
Alzheimer	18,60±3,78 [#]
DCS	23,40±5,21
LS	22,28±3,48
Alzheimer + DCS	25,75±6,01 [*]
Alzheimer + LS	27,20±4,12 [*]

*Alzheimer grubu ile koruyucu amaçlı verilen serin grupları arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir. # Alzheimer grubu ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir.



Şekil 4.17. Tüm Deney Gruplarına Ait Beyin Dokularının Işık Mikroskopu Görüntüleri. A: Kontrol grubu; B: $AlCl_3$ grubu; C: $AlCl_3$ +DCS grubu; D: $AlCl_3$ +LS grubu. (NFY'ler oklar ile gösterilmiştir.)

Kontrol grubu ratlardan elde edilen beyin kortekslerinin Hematoksilen-eosin (H-E) ile boyanmış kesitleri ile kıyaslandığında, alüminyum uygulanmış grubun doku kesitlerinde mikroskopik düzeyde histopatolojik bulgular saptanmıştır (Şekil 4.17). Hipokampal nöronlarda belirgin dejeneratif değişiklikler gözlenmiştir. Hüresel hasarın

göstergesi olarak; sitoplazmik ve nükleer büzüŐme nedeniyle piknotik bir görünüm kazanan nöronlarda yoğun boyanma dikkat çekmektedir.

4.11. *In vivo* Deneysel AH Rat Modelinde Moleküler Genetik Yanıtlar

Yapılan araştırma sonuçlarına göre DCS ve LS'nin *in vivo* olarak AlCl₃ tarafından indüklenen nörotoksisiteye karşı nöroprotektif etki gösterdiği sonucuna varılmıştır. Bu nöroprotektif etkinin altında yatan moleküler mekanizmaları bulabilmek için seçilen 14 adet genin ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır. Bu amaçla her gruptaki hayvanın beyin dokusundan RNA izole edilmiş ve elde edilen RNA örneklerinden ters transkripsiyon ile cDNA sentezlenmiştir. Bu cDNA örnekleri belirlenen genlere ait spesifik primerler varlığında kantitatif PZR ile çoğaltılmıştır. Gruplar arasında gözlenen gen ekspresyonu seviyelerindeki farklar Çizelge 4.9'da sunulmuştur.

AlCl₃ ile oluşturulan deneysel Alzheimer modelinde kontrol grup ile kıyaslandığında *APP*, *BACE 1*, *NCTSN*, *PSENI*, *DAXX* ve *TNF-α* genlerinde ekspresyon düzeylerinde anlamlı artış gözlenirken *ADAM10* ve *BDNF* genlerinin ekspresyonlarında anlamlı bir azalma bulunmuştur ($P < 0,05$).

Çizelge 4.9. Tüm Gruplara Ait Beyin Örneklerindeki Genlerin Ekspresyon Değişiklikleri. (Sunulan değerler kat değişimi olarak verilmiştir.)

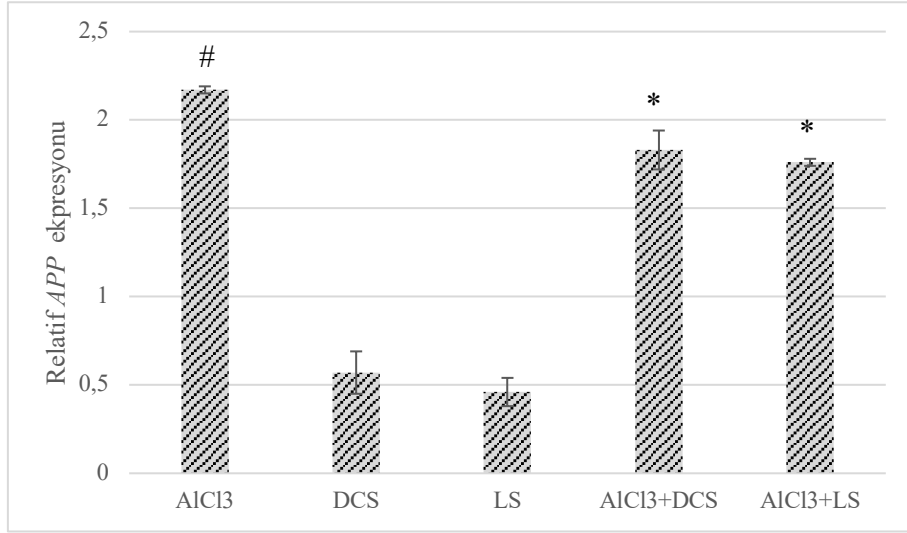
Gen	AlCl ₃	DCS	LS	AlCl ₃ +DCS	AlCl ₃ +LS
<i>ADAM10</i>	-1,54±0,21	1,6±0,35	1,66±0,24	0,23±0,09	0,42±0,32
<i>APH1A</i>	0,91±0,35	0,98±0,65	0,56±0,42	0,61±0,32	0,63±0,64
<i>APOE</i>	1,26±0,32	0,97±0,12	1,32±0,39	1,21±0,68	1,50±0,89
<i>APP</i>	2,17±0,02	0,57±0,12	0,46±0,10	1,83±0,11	1,76±0,02
<i>BACE1</i>	2,04±0,40	0,80±0,23	0,78±0,32	1,42±0,11	1,94±0,22
<i>BDNF</i>	-1,24±0,03	1,19±0,27	1,35±0,09	0,10±0,01	0,49±0,03
<i>DAXX</i>	3,32±0,22	1,14±0,35	0,94±0,63	1,54±0,63	2,48±0,50
<i>EGFR</i>	-0,12±0,01	1,21±0,35	0,86±0,24	-0,35±0,35	0,93±0,63
<i>MAPT</i>	1,02±0,25	0,73±0,01	0,24±0,02	1,32±0,24	1,41±0,32
<i>NCTSN</i>	3,51±0,84	1,05±0,24	1,08±0,36	1,47±0,42	1,21±0,51
<i>PSENI</i>	2,07±0,2	1,10±0,14	1,05±0,25	0,89±0,34	1,01±0,42
<i>PSENE1</i>	0,93±0,21	1,10±0,25	1,13±0,63	0,86±0,51	1,03±0,36
<i>TNF-α</i>	5,65±0,82	1,07±0,21	1,26±0,24	2,21±0,45	1,74±0,51
<i>VEGFA</i>	0,98±0,54	0,96±0,21	1,25±0,69	1,41±0,36	1,17±0,28

Amiloid plakların birincil bileşeni olan amiloid-β, APP'nin β- ve γ-sekretazlar tarafından kesilmesi ile üretilir (Castorina et al. 2010). APP ayrıca, α -sekretazlar ile de kesilmekte ve amiloid-β oluşumunu engelleyen sAPPα ve C83 üretilmektedir (Allinson et al. 2003; Deuss et al. 2008). α-sekretaz, APP'nin ilk kesimi için β-sekretaz ile rekabet etmektedir. Her iki enzim de Aβ oluşumu üzerinde zıt etki göstermektedir (Lichtenthaler 2011). Bu nedenle, bu enzimlerin ekspresyonu ve aktivitesi, Aβ seviyesini etkilemektedir. ADAM10 en iyi çalışılan α-sekretazlardan biridir, APP'nin amiloidojenik olmayan yolla işlenmesine aracılık etmektedir (Delarasse et al. 2011)

BACE1, β -sekretaz olarak iş gören ve pepsin ile retroviral aspartik proteaz aileleri ile ilişkili tip 1 transmembran aspartik proteazdır. APP'nin amiloidojenik yolla işlenmesinde görev almaktadır.

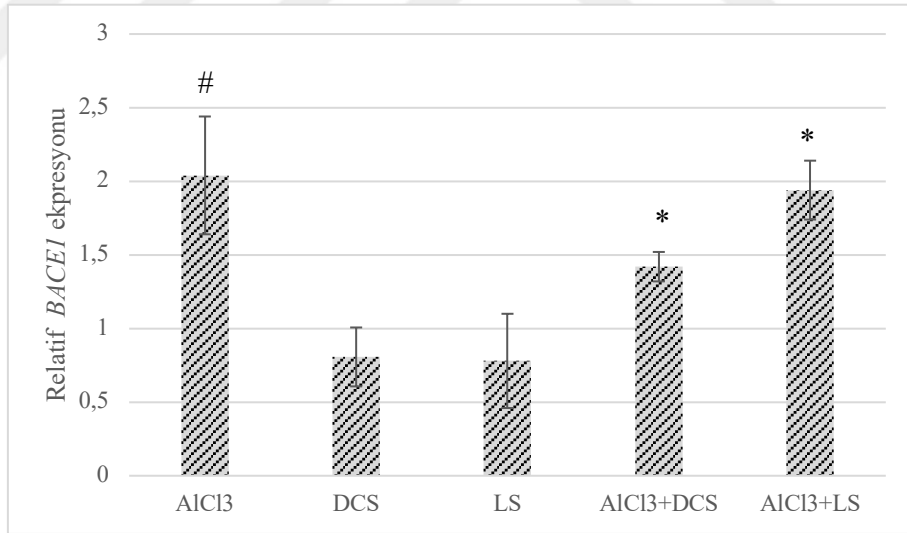
γ -sekretaz; Presenilin (PSEN1), nicastrin (NCTSN), anterior farinks defekt-1 (APH-1) ve presenilin artefaktörü-2 (PSENEN-2) olmak üzere dört proteinden oluşan bir intramembranöz protein kompleksidir (Frykman et al. 2010). Presenilin, γ -sekretaz kompleksinin merkezi ve çeşitli protein substratlarının intramembran parçalanmasını indükleyen katalitik bir bileşendir (Smolarkiewicz et al. 2013). Nicastrin, tek bir transmembran alanı içeren büyük bir proteindir. NCTSN'nin kendisi katalitik olarak aktif değildir, bunun yerine γ -sekretaz kompleksinin diğer bileşenlerinin olgunlaşmasını ve doğru taşınmasını teşvik etmektedir. 101 amino asit içeren PSENEN-2, γ -sekretaz kompleksinin en küçük alt birimidir (Dries and Yu 2008). APH-1 proteininin yedi transmembran bölgesi vardır ve kompleksin uygun şekilde birleştirilmesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. γ -sekretaz, A β oluşumu sırasında görev alan son proteazdır, miktarı ve aktivitesi, A β 'nin üretimini ve toplanmasını etkileyebilmektedir.

Elde edilen sonuçlar alüminyumun *APP*'nin ifadesini arttırdığını göstermiştir. Ayrıca A β metabolizmasına katılan enzimlerin ifadesinin açıkça değiştiği de ortaya konulmuştur: (1) *ADAM10* ekspresyonu azalmıştır; (2) *BACE1* ekspresyonu artmıştır ve (3) *PS1* ve *NCT* ekspresyonu artmıştır. Bu bulgular *ADAM10*, *BACE1*, *PS1* ve *NCT* gibi A β metabolizması ile ilişkili genlerin alüminyum tarafından indüklenen nörotoksisite de yer aldığını göstermiştir. Alüminyumun β -sekretaz ve γ -sekretaz aktivitelerini artırırken α -sekretaz aktivitesini azalttığı söylenebilir. Literatürde yer alan çalışmalarda da bu bulgulara benzer şekilde alüminyumun, A β üretimi ve toplanmasını hızlandırdığı, A β yapısal değişikliklerini indüklediği ve A β oligomerlerinin oluşumunu artırdığı belirtilmiştir (Ricchelli et al. 2005; Drago et al. 2007; Zaky et al 2013).



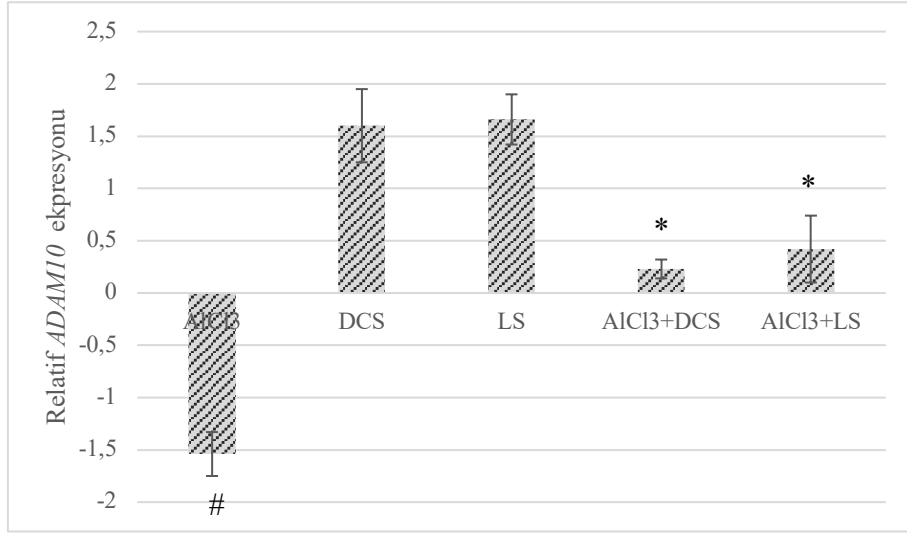
Şekil 4.18. Tüm Gruplara Ait Beyin Örneklerindeki *APP* Ekspresyon Düzeylerinin Dağılımı.

*AICl₃ grubu ile koruyucu amaçlı verilen serin grupları arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir.
AICl₃ grubu ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir.



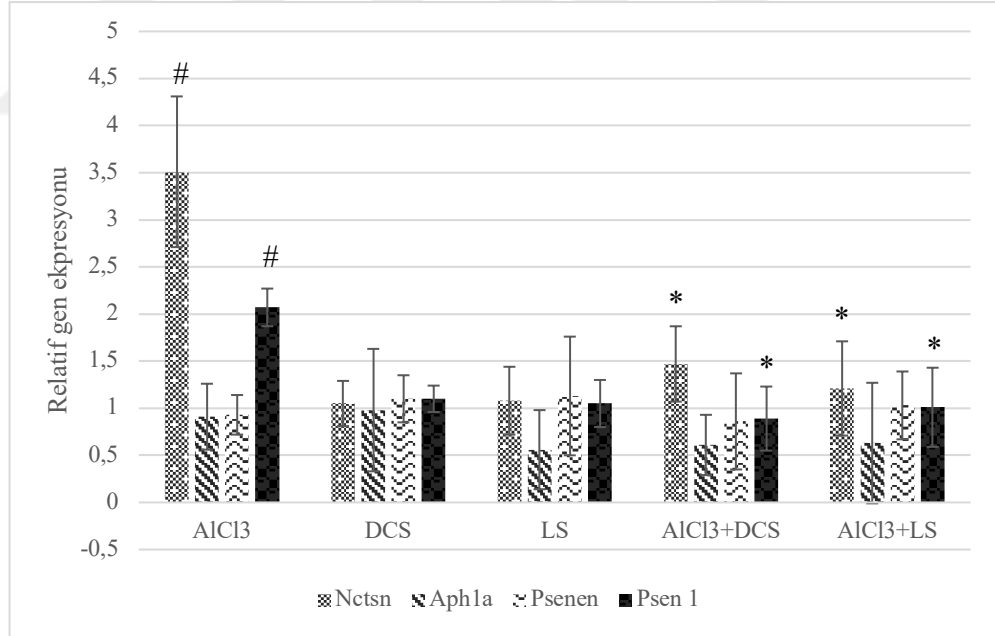
Şekil 4.19. Tüm Gruplara Ait Beyin Örneklerindeki *BACE1* Ekspresyon Düzeylerinin Dağılımı.

*AICl₃ grubu ile koruyucu amaçlı verilen serin grupları arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir.
AICl₃ grubu ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir.



Şekil 4.20. Tüm Gruplara Ait Beyin Örneklerindeki *ADAM10* Ekspresyon Düzeylerinin Dağılımı.

*AICl₃ grubu ile koruyucu amaçlı verilen serin grupları arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir.
AICl₃ grubu ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir.

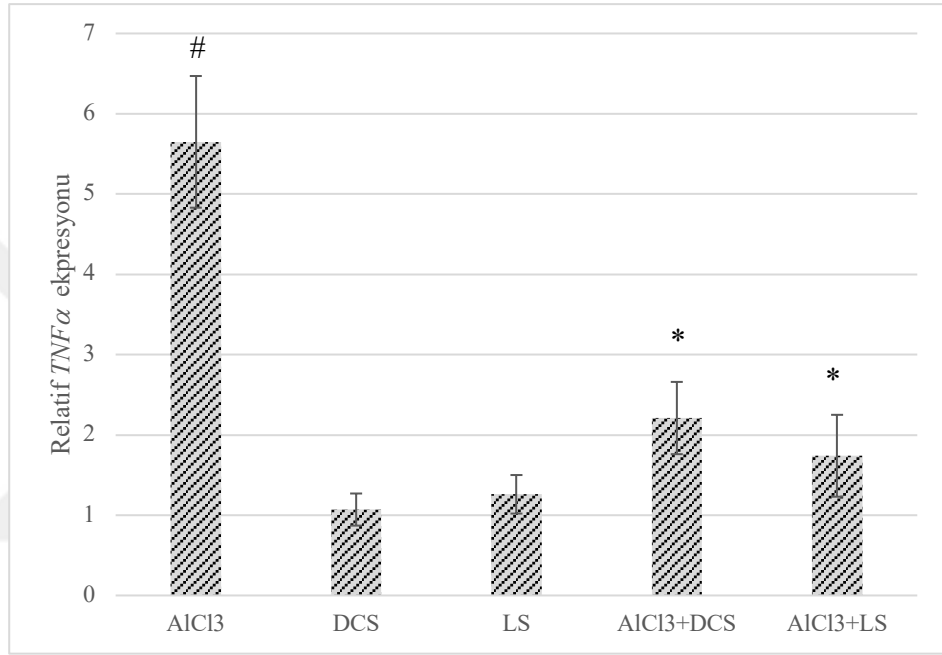


Şekil 4.21. Tüm Gruplara Ait Beyin Örneklerindeki *NCTSN*, *APHIA*, *PSENEEN* VE *PSENI* Ekspresyon Düzeylerinin Dağılımı.

*AICl₃ grubu ile koruyucu amaçlı verilen serin grupları arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir.
AICl₃ grubu ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir.

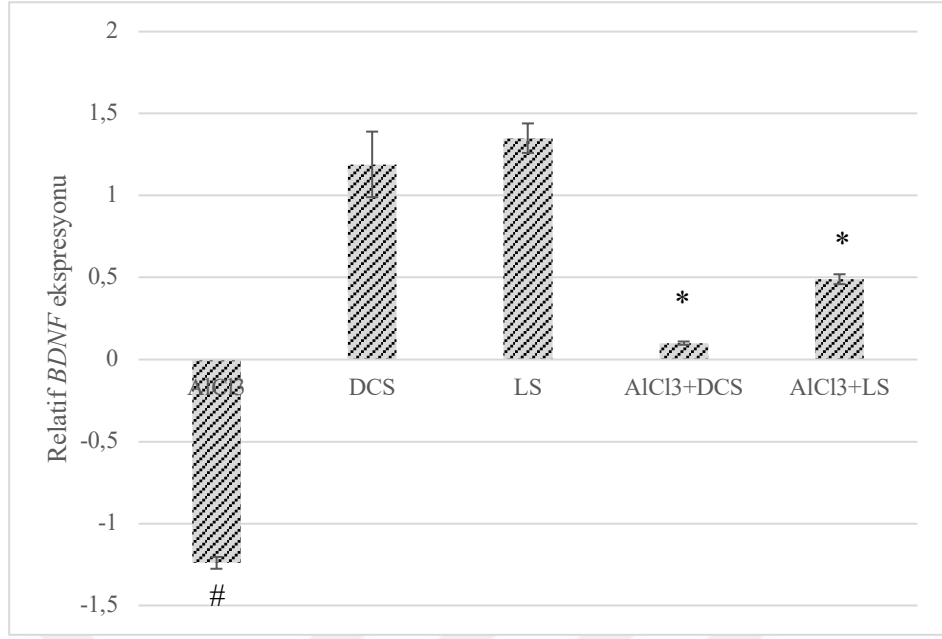
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

TNF- α , beyindeki en yaygın olarak araştırılan proinflamasyon sitokinleri arasındadır (Capuron and Miller 2011) ve yaşlanma, demans, epilepsi, ameliyat ve nörotoksin maruziyeti sonrasında gelişen öğrenme ile hafıza bozukluğu ile ilişkili patogeneze neden olmaktadır. (Annamaria and Tiziana 2005, Richwine et al. 2008, Fonken et al. 2011, Le et al. 2014). Bu nedenle, elde edilen bu sonuçlar nöroinflamasyonun AlCl₃ ile muamele edilen sıçanlarda öğrenme ve hafıza bozuluklarında rol oynadığını göstermektedir.



Şekil 4.22. Tüm Gruplara Ait Beyin Örneklerindeki *TNF- α* Ekspresyon Düzeylerinin Dağılımı.

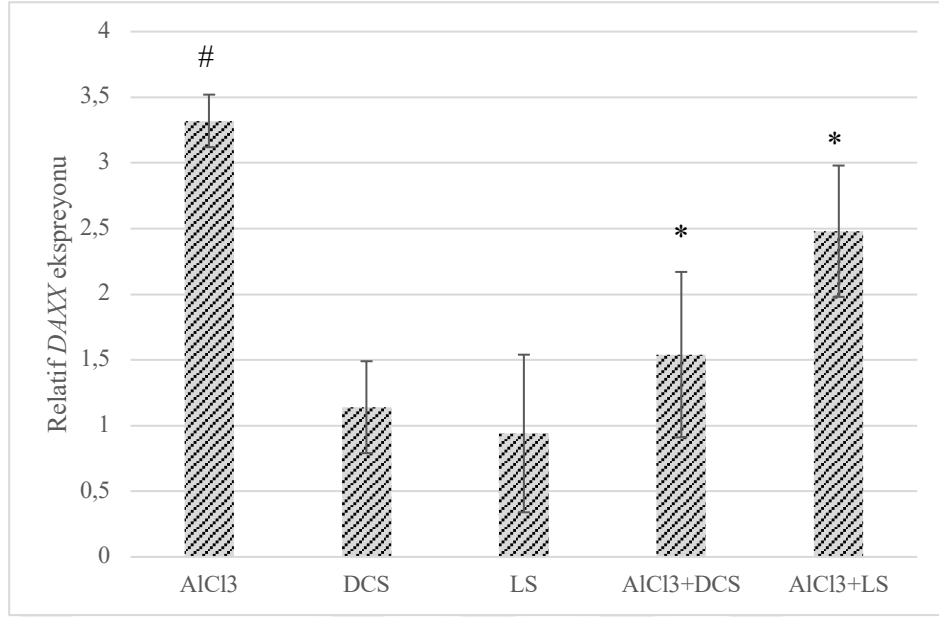
*AlCl₃ grubu ile koruyucu amaçlı verilen serin grupları arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir. # AlCl₃ grubu ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir.



Şekil 4.23. Tüm Gruplara Ait Beyin Örneklerindeki *BDNF* Ekspresyon Düzeylerinin Dağılımı.

*AlCl₃ grubu ile koruyucu amaçlı verilen serin grupları arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir. # AlCl₃ grubu ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir.

Proinflamatuvar sitokinler, *NF-κB* aktivasyonu yoluyla iNOS gen ekspresyonunu indükleyerek oksido-nitrozatif stresi arttırmaktadır. Oksido-nitrozatif stres, nöroplastisite gibi beyin fonksiyonlarında rol oynayan bir nörotrofin olan BDNF'in daha da azalmasına neden olmaktadır. Önceki çalışmalar, bilişsel bozukluğun hipokampal *BDNF* seviyesinde azalmaya eşlik ettiğini göstermiştir (Bekinschtein et al. 2008). Ayrıca, alüminyum beyinde proinflamatuvar sitokin/nörotrofin dengesinin bozulmasına yol açmaktadır (Johnson and Sharma 2003). Önceki bir çalışmada BDNF'nin alüminyum maltolat kaynaklı hipokampal nöronal ölümlere karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu öne sürülmüştür (Kawahara et al. 2003). Bu nedenle, *BDNF*'nin alüminyum kaynaklı nörotoksisitede önemli bir rol oynadığı açıktır. Biz de çalışmamızda *BDNF* seviyesinin, kontrol grubuna kıyasla AlCl₃ ile muamele edilen hayvanda önemli ölçüde azaldığını gözlemledik. Ek olarak, DCS ve LS uygulanan gruplarda beyin *BDNF* seviyesinde belirgin bir artış görülmüştür. Daha önceki testlerle de oksidatif hasara karşı koruyucu olduğu gösterilen DCS ve LS'nin AlCl₃ kaynaklı nörotoksisitede önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir.



Şekil 4.24. Tüm Gruplara Ait Beyin Örneklerindeki *DAXX* Ekspresyon Düzeylerinin Dağılımı.

*AICl₃ grubu ile koruyucu amaçlı verilen serin grupları arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir.
AICl₃ grubu ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir.

DAXX proteini, tümör nekroz faktörü reseptör süper ailesine ait olan FAS proteini ile ilişkilidir ve apoptotik sinyalleme için kritik olan ölüm domain alanı içermektedir. *DAXX*'ın aşırı ekspresyonu apoptozu indüklemekte ve önceki çalışmalarda AH beyinde ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (Lukiw 2004). Şekil 4.21'de açıkça görüldüğü gibi, AICl₃ ile indüklenen grupta kontrole kıyasla *DAXX* ekspresyonu artmıştır. Ayrıca *DAXX* ekspresyonu, DCS ve LS uygulamaları sonucunda anlamlı şekilde azalmıştır. Bu bulgu alüminyumun apoptoza neden olarak AH ile ilişkili patogeneze neden olduğunu, DCS ve LS'nin AICl₃ ile indüklenen apoptoza karşı koruyucu olduğunu göstermektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak, bu araştırma ile beyin dokularında ilk defa kronik $AlCl_3$ 'ün patolojik etkilerine karşı glisin-mimetik aminoasitlerin (DCS ve LS) koruyucu rolü tespit edilmiştir. *In vitro* nöroprotektif potansiyellerinin yanı sıra *in vivo* rat kan örneklerinde de söz konusu aminoasitlerin genotoksik etkilerinin bulunmadığı da ilk kez rapor edilmiştir. Tez çalışmaları bulguları ışığında düşük dozlarda (3,6 mg/kg) DCS ve LS diyeti ile başta Alzheimer olmak üzere çeşitli nörodejeneratif hastalıkların ortaya çıkmasının engellenebileceğini önermekteyiz. Üstelik söz konusu dozlarda sitotoksik ve genotoksik etkilerinin bulunmayışı bu aminoasitlerin koruma amaçlı olarak kullanılmasını daha da güvenli hale getirmektedir. Böylece araştırma sonuçlarımızın söz konusu aminoasitlerin farmakolojik açıdan değerlendirilmesine yönelik yeni çalışmalara önemli katkılar sağlayacağı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

- Adeleye, A., Shohami, E., Nachman, D., Alexandrovich, A., Trembovler, V., Yaka, R., Shoshan, Y., Dhawan, J., Biegon, A., 2010. D-cycloserine improves functional outcome after traumatic brain injury with wide therapeutic window. *Eur J Pharmacol* 629(1–3):25–30
- Ai-Sabti, K., Metcalfe, C.D. 1995.. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mut. Res/Genetic Toxicol.*, 343: 121-135.
- Alexandrov, P.N., Zhao, Y., Pogue, A.I., Tarr, M.A., Kruck, T.P., Percy, M.E., Cui, J.G., Lukiw, W.J., 2005. Synergistic effects of iron and aluminum on stress related gene expression in primary human neural cells. *J. Alzheimer's Dis.* 8, 117– 127.
- Allinson, T.M., Parkin, E.T., Turner, A.J., Hooper, N.M., 2003. ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J Neurosci Res* 74:342–352.
- Alves, L., Correia, A.S.A., Miguel, R., Alegria, P., Bugalho, P., 2012. Alzheimer's disease: a clinical practice-oriented review. *Front. Neurol.* 3, 63.
- Alzheimer, A., Stelzmann, R.A., Schnitzlein, H.N., Murtagh, F.R., 1995. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde." *Clin. Anat. N. Y. N* 8, 429–431.
- Alzheimer's Association, 2015. 2015 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 11, 332–384.
- Andersen, J.M., Lindberg, V., Myhrer, T., 2002. Effects of scopolamine and D-cycloserine on non-spatial reference memory in rats. *Behav Brain Res* 129(1–2):211–216.
- Annamaria, V., Tiziana, G., 2005. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia* 11, 1724e1743.
- Anson, L.C., Chen, P.E., Wyllie, D.J., Colquhoun, D., Schoepfer, R. 1998. Identification of amino acid residues of the NR2A subunit that control glutamate potency in recombinant NR1/NR2A NMDA receptors. *J Neurosci.*, 18:581-589
- Antonell, A., Lladó, A., Altirriba, J., Botta-Orfila, T., Balasa, M., Fernández, M., Ferrer, I., Sánchez-Valle, R., Molinuevo, J.L., 2013. A preliminary study of the whole-genome expression profile of sporadic and monogenic early-onset Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 34, 1772–1778.
- Aroniadou, V.A., Teyler, T.J. 1991. The role of NMDA receptors in long-term potentiation (LTP) and depression (LTD) in rat visual cortex. *Brain Res.*, 562:136-143.
- Arriagada, P.V., Growdon, J.H., Hedley-Whyte, E.T., Hyman, B.T., 1992. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 42, 631–639
- Ayton, S., Lei, P., Bush, A.I., 2013. Metallostasis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 62: 76–89.
- Balasubramanyam, N., Sailaja, M., Mahboob, M.F., Rahman, S., Misra, S.M., Hussain, P., 2009. Grover Evaluation of genotoxic effects of oral exposure to aluminum oxide nanomaterials in rat bone marrow *Mutat. Res.* 676 (1–2), pp. 41-47.
- Bales, K.R., Verina, T., Cummins, D.J., Du, Y., Dodel, R.C., Saura, J., Fishman, C.E., DeLong, C.A., Piccardo, P., Petegnief, V., Ghetti, B., Paul, S.M., 1999. Apolipoprotein E is essential for amyloid deposition in the APP(V717F) transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 15233–15238.

- Banasik, A., Lankoff, A., Piskulak, K., Adamowska, H., Lisowska, A., 2005. Aluminum-induced micronuclei and apoptosis in human peripheral-blood lymphocytes treated during different phases of the cell cycle *Environ. Toxicol.* 20 (4), pp. 402-406.
- Barucker, C., Harmeier, A., Weiske, J., Fauler, B., Albring, K.F., Prokop, S., Hildebrand, P., Lurz, R., Heppner, F.L., Huber, O., Multhaup, G., 2014. Nuclear translocation Unravels the Amyloid Peptide A β 42 as a Regulator of Gene Transcription. *J. Biol. Chem.* 289, 20182–20191.
- Baumgart, M., Snyder, H.M., Carrillo, M.C., Fazio, S., Kim, H., Johns, H., 2015. Summary of the evidence on modifiable risk factors for cognitive decline and dementia: A population-based perspective. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 11, 718–726.
- Beecham, G.W., Hamilton, K., Naj, A.C., Martin, E.R., Huentelman, M., Myers, A.J., Corneveaux, J.J., Hardy, J., Vonsattel, J.-P., Younkin, S.G., Bennett, D.A., De Jager, P.L., Larson, E.B., Crane, P.K., Kamboh, M.I., Kofler, J.K., Mash, D.C., Duque, L., Gilbert, J.R., Gwirtsman, H., Buxbaum, J.D., Kramer, P., Dickson, D.W., Farrer, L.A., Frosch, M.P., Ghetti, B., Haines, J.L., Hyman, B.T., Kukull, W.A., Mayeux, R.P., Pericak-Vance, M.A., Schneider, J.A., Trojanowski, J.Q., Reiman, E.M., the Alzheimer's Disease Genetics Consortium (ADGC), Schellenberg, G.D., Montine, T.J., 2014. Genome-Wide Association Meta-analysis of Neuropathologic Features of Alzheimer's Disease and Related Dementias. *PLoS Genet.* 10, e1004606.
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Izquierdo, I., Medina, J.H., 2008. BDNF and memory formation and storage. *Neuroscientist* 14:147-156.
- Berman, R.M., Cappiello, A., Anand, A., Oren, D.A., Heninger, G.R., Charney, D.S., Krystal, J.H. 2000. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry*, 47:351-354.
- Bittencourt Pasquali, M.A., de Ramos, V.M., Albanus, R.D. et al. 2016. Gene Expression Profile of NF- κ B, Nrf2, Glycolytic, and p53 Pathways During the SH-SY5Y Neuronal Differentiation Mediated by Retinoic Acid. *de Mol Neurobiol.*, 53:423.
- Blennow, K., Hampel, H., Weiner, M., Zetterberg, H., 2010. Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* 6, 131–144.
- Bock, C., Paulsen, M., Tierling, S., Mikeska, T., Lengauer, T., Walter, J., 2006. CpG Island Methylation in Human Lymphocytes Is Highly Correlated with DNA Sequence, Repeats, and Predicted DNA Structure. *PLoS Genet* 2, e26.
- Bonhaus, D.W., Burge, B.C., McNamara, J.O. 1987. Biochemical evidence that glycine allosterically regulates an NMDA receptor-coupled ion channel. *Eur J Pharmacol.*, 142:489-490
- Bots, M.L., Breteler, M.M., van Kooten, F., Haverkate, F., Meijer, P., Koudstaal, P.J., Grobbee, D.E., Kluft, C., 1998. Coagulation and fibrinolysis markers and risk of dementia. The Dutch Vascular Factors in Dementia Study. *Haemostasis* 28, 216–222.
- Briest, F., Berg, E., Grass, I., Freitag, H., Kaemmerer, D., Lewens, F., Grabowski, P., 2015. FOXM1: A novel drug target in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Oncotarget* 6(10), 8185–8199.
- Bu, G., 2009. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 333–344.
- Buil, A., Brown, A.A., Lappalainen, T., Viñuela, A., Davies, M.N., Zheng, H.-F., Richards, J.B., Glass, D., Small, K.S., Durbin, R., Spector, T.D., Dermitzakis, E.T., 2014. Gene-gene and gene-environment interactions detected by transcriptome sequence analysis in twins. *Nat. Genet.*
- Burbaeva, G.S., Aksenova, M.V., Makarenko, I.G., 1992. Decreased level of creatine kinase BB in the frontal cortex of Alzheimer patients. *Dementia* 3, 91–94.

- Calabresi, P., Pisani, A., Mercuri, N.B., Bernardi, G. 1992. Long-term Potentiation in the Striatum is Unmasked by Removing the Voltage-dependent Magnesium Block of NMDA Receptor Channels. *Eur J Neurosci.*, 4:929-935.
- Campion, D., Dumanchin, C., Hannequin, D., Dubois, B., Belliard, S., Puel, M., Thomas Anterion, C., Michon, A., Martin, C., Charbonnier, F., Raux, G., Camuzat, A., Penet, C., Mesnage, V., Martinez, M., Clerget-Darpoux, F., Brice, A., Frebourg, T., 1999. Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am. J. Hum. Genet.* 65, 664–670.
- Candore, G., Bulati, M., Caruso, C., Castiglia, L., Colonna-Romano, G., Di Bona, D., et al., 2010. Inflammation, cytokines, immune response, apolipoprotein E, cholesterol, and oxidative stress in Alzheimer disease: therapeutic implications. *Rejuvenation Res* 13, 301–313.
- Capuron, L., Miller, A.H., 2011. Immune system to brain signaling: neuropsychopharmacological implications. *Pharmacol. Ther.* 130, 226e238.
- Castorina, A., Tiralongo, A., Giunta, S., Carnazza, M.L., Scapagnini, G, D'Agata, V., 2010. Early effects of aluminum chloride on betasecretase mRNA expression in a neuronal model of beta-amyloid toxicity. *Cell Biol Toxicol* 26:367–377.
- Chen, S.H., Bu, X.L., Jin, W.S., Shen, L.L., Wang, J., Zhuang, Z.-Q., Wang, Y.J., 2017. Altered peripheral profile of blood cells in Alzheimer disease: A hospital-based case-control study. *Medicine* 96(21), e6843.
- Chouliaras, L., Mastroeni, D., Delvaux, E., Grover, A., Kenis, G., Hof, P.R., Steinbusch, H.W.M., Coleman, P.D., Rutten, B.P.F., van den Hove, D.L.A., 2013. Consistent decrease in global DNA methylation and hydroxymethylation in the hippocampus of Alzheimer's disease patients. *Neurobiol. Aging* 34, 2091–2099.
- Collingridge, G.L., Volianskis, A., Bannister, N., France, G., Hanna, L., Mercier, M., Tidball, P., Fang, G., Irvine, M.W., Costa, B.M., Monaghan, D.T., Bortolotto, Z.A., Molnar, E., Lodge, D., Jane, D.E. 2013. The NMDA receptor as a target for cognitive enhancement. *Neuropharmacology.*, 64:13-26.
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A., 1993. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261, 921–923.
- Cox, P.A., Davis, D.A., Mash, D.C., Metcalf, J.S., Banack, S.A., 2016. Dietary exposure to an environmental toxin triggers neurofibrillary tangles and amyloid deposits in the brain. *Proc R Soc B.* 283:20152397.
- Davies, P., Maloney, A.J., 1976. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 2, 1403.
- Day, J.J., Sweatt, J.D., 2011. Epigenetic mechanisms in cognition. *Neuron* 70, 813–829.
- De Jager, P.L., Srivastava, G., Lunnon, K., Burgess, J., Schalkwyk, L.C., Yu, L., Eaton, M.L., Keenan, B.T., Ernst, J., McCabe, C., Tang, A., Raj, T., Replogle, J., Brodeur, W., Gabriel, S., Chai, H.S., Younkin, C., Younkin, S.G., Zou, F., Szyf, M., Epstein, C.B., Schneider, J.A., Bernstein, B.E., Meissner, A., Ertekin-Taner, N., Chibnik, L.B., Kellis, M., Mill, J., Bennett, D.A., 2014. Alzheimer's disease: early alterations in brain DNA methylation at ANK1, BIN1, RHBDF2 and other loci. *Nat. Neurosci.* advance online publication.
- de Koning, T.J., Klomp, L.W., 2004. Serine-deficiency syndromes. *Curr Opin Neurol* 17: 197–204.
- de Koning, T.J., Snell, K., Duran, M. et al. 2003. L-serine in disease and development. *Biochem J*, 371:653–661.
- Debanne, D. 1996. Associative synaptic plasticity in hippocampus and visual cortex: cellular mechanisms and functional implications. *Rev Neurosci.*, 7:29-46.

- Delarasse, C., Auger, R., Gonnord, P., Fontaine, B., Kanellopoulos, J.M., 2011. The purinergic receptor P2X7 triggers alpha-secretase-dependent processing of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 286:2596–2606.
- Deuss, M., Reiss, K., Hartmann, D., 2008. Part-time alpha-secretases: the functional biology of ADAM 9, 10 and 17. *Curr Alzheimer Res* 5:187–201.
- Dhawan, J., Benveniste, H., Nawrocky, M., Smith, S.D., Biegon, A., 2010. Transient focal ischemia results in persistent and widespread neuroinflammation and loss of glutamate NMDA receptors. *Neuroimage* 51(2):599–605
- Dias-Santagata, D., Fulga, T.A., Duttaroy, A., Feany, M.B., 2007. Oxidative stress mediates tau-induced neurodegeneration in *Drosophila*. *J Clin Invest* 117: 236–245.
- Drago, D., Folin, M., Baiguera, S., Tognon, G., Ricchelli, F., Zatta, P., 2007. Comparative effects of Aβ(1-42)-A1 complex from rat and human amyloid on rat endothelial cell cultures. *J Alzheimers Dis* 11:33–44.
- Dries, D.R., Yu, G., 2008. Assembly, maturation, and trafficking of the gamma-secretase complex in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 5:132–146.
- Dunlop, R.A., Cox, P.A., Banack, S.A., Rodgers, K.J., 2013. The non-protein amino acid BMAA is misincorporated into human proteins in place of L-serine causing protein misfolding and aggregation. *PLoS One*. 8, 753-76.
- Ebbert, M.T.W., Ridge, P.G., Wilson, A.R., Sharp, A.R., Bailey, M., Norton, M.C., Tschanz, J.T., Munger, R.G., Corcoran, C.D., Kauwe, J.S.K., 2014. Population-based Analysis of Alzheimer's Disease Risk Alleles Implicates Genetic Interactions. *Biol. Psychiatry, Mechanisms of Aging and Cognition* 75, 732–737.
- Eikelenboom, P., Veerhuis, R., Scheper, W., Rozemuller, A.J.M., van Gool, W.A., Hoozemans, J.J.M., 2006. The significance of neuroinflammation in understanding Alzheimer's disease. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 1996 113, 1685–1695.
- Elman, J.A., Oh, H., Madison, C.M., Baker, S.L., Vogel, J.W., Marks, S.M., Crowley, S., O'Neil, J.P., Jagust, W.J., 2014. Neural compensation in older people with brain amyloid deposition. *Nat. Neurosci.* 17, 1316–1318.
- Engelhart, M.J., Geerlings, M.I., Meijer, J., Kiliaan, A., Ruitenbergh, A., van Swieten, J.C., Stijnen, T., Hofman, A., Witteman, J.C.M., Breteler, M.M.B., 2004. Inflammatory proteins in plasma and the risk of dementia: the Rotterdam study. *Arch. Neurol.* 61, 668–672.
- Exley, C., 2004. The pro-oxidant activity of aluminum. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 380–387.
- Farfara, D., Lifshitz, V., Frenkel, D., 2008. Neuroprotective and neurotoxic properties of glial cells in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Cell. Mol. Med.* 12, 762–780.
- Farrer, L.A., 2015. Expanding the genomic roadmap of Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 14, 783–785.
- Federico, A., Cardaioli, E., Da Pozzo, P., Formichi, P., Gallus, G.N., Radi, E., 2012. Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *J Neurol Sci* 322, 254–262.
- Ferri, C.P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H., Huang, Y., Jorm, A., Mathers, C., Menezes, P.R., Rimmer, E., Scazufca, M., Alzheimer's Disease International, 2005. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366, 2112–2117.
- Filippini, N., MacIntosh, B.J., Hough, M.G., Goodwin, G.M., Frisoni, G.B., Smith, S.M., Matthews, P.M., Beckmann, C.F., Mackay, C.E., 2009. Distinct patterns of brain activity in young carriers of the APOE-epsilon4 allele. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 7209–7214.
- Flood, J.F., Morley, J.E., Lanthorn, T.H., 1992. Effect on memory processing by D-cycloserine, an agonist of the NMDA/glycine receptor. *Eur J Pharmacol* 221:249e54.

- Fonken, L.K., Xu, X., Weil, Z.M., Chen, G., Sun, Q., Rajagopalan, S., Nelson, R.J., 2011. Air pollution impairs cognition, provokes depressive-like behaviors and alters hippocampal cytokine expression and morphology. *Mol. Psychiatr.* 16, 987e995.
- Frykman, S., Hur, J.Y., Franberg, J., Aoki, M., Winblad, B., Nahalkova, J., Behbahani, H., Tjernberg, L.O., 2010. Synaptic and endosomal localization of active gamma-secretase in rat brain. *PLoS One* 5:e8948.
- Funk, K.E., Mirbaha, H., Jiang, H., Holtzman, D.M., Diamond, M.I., 2015. Distinct therapeutic mechanisms of Tau antibodies: promoting microglial clearance vs. blocking neuronal uptake. *J. Biol. Chem.* jbc.M115.657924.
- Furuya, S., Tabata, T., Mitoma, J., et al., 2000. L-Serine and glycine serve as major astroglia-derived trophic factors for cerebellar Purkinje neurons, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 11528–11533.
- Geerlings, M.I., den Heijer, T., Koudstaal, P.J., Hofman, A., Breteler, M.M.B., 2008. History of depression, depressive symptoms, and medial temporal lobe atrophy and the risk of Alzheimer disease. *Neurology* 70, 1258–1264.
- Giannini, E.G., Testa, R., Savarino, V., 2005. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *Canadian medical association journal* 172(3):367–379.
- Goldman, J.S., Hahn, S.E., Catania, J.W., LaRusse-Eckert, S., Butson, M.B., Rumbaugh, M., Strecker, M.N., Roberts, J.S., Burke, W., Mayeux, R., Bird, T., 2011. Genetic counseling and testing for Alzheimer disease: Joint practice guidelines of the American College of Medical Genetics and the National Society of Genetic Counselors. *Genet. Med.* 13, 597–605.
- Haass, C., Selkoe, D.J., 2007. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 101–112.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*, fourth ed., Oxford University Press, New York.
- Hanenberg, M., McAfoose, J., Kulic, L., Welt, T., Wirth, F., Parizek, P., Strobel, L., Cattepoel, S., Spani, C., Derungs, R., Maier, M., Pluckthun, A., Nitsch, R.M., 2014. Amyloid- Peptide specific DARPins as a Novel Class of Potential Therapeutics for Alzheimer Disease. *J. Biol. Chem.* 289, 27080–27089.
- Hardy, J., Allsop, D., 1991. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *rends Pharmacol. Sci.* 12, 33–388
- Hardy, J.A., Higgins, G.A., 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184–185.
- Hartley, D., Blumenthal, T., Carrillo, M., DiPaolo, G., Esralew, L., Gardiner, K., Granholm, A.-C., Iqbal, K., Krams, M., Lemere, C., Lott, I., Mobley, W., Ness, S., Nixon, R., Potter, H., Reeves, R., Sabbagh, M., Silverman, W., Tycko, B., Whitten, M., Wisniewski, T., 2014. Down syndrome and Alzheimer's disease: Common pathways, common goals. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 0.
- Hirsch-Reinshagen, V., Burgess, B.L., Wellington, C.L., 2008. Why lipids are important for Alzheimer disease? *Mol. Cell. Biochem.* 326, 121–129.
- Hofman, A., Ott, A., Breteler, M.M., Bots, M.L., Slooter, A.J., van Harskamp, F., van Duijn, C.N., Van Broeckhoven, C., Grobbee, D.E., 1997. Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in the Rotterdam Study. *Lancet* 349, 151–154.
- Hofmann, S.G., Wu, J.Q., Boettcher, H. 2013. D-Cycloserine as an augmentation strategy for cognitive behavioral therapy of anxiety disorders. *Biology of Mood Anxiety Disorder*, 3: 11.
- Holtzman, D.M., Herz, J., Bu, G., 2012. Apolipoprotein E and Apolipoprotein E Receptors: Normal Biology and Roles in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2.

- Honig, L.S., Tang, M.-X., Albert, S., Costa, R., Luchsinger, J., Manly, J., Stern, Y., Mayeux, R., 2003. Stroke and the risk of Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 60, 1707–1712.
- Hughes, R.N., 2004. Responsiveness to brightness change in male and female rats following treatment with the partial agonist of the N-methyl-D-aspartate receptor, D-cycloserine. *Behav Brain Res* 152:199e207.
- Jin, S.C., Pastor, P., Cooper, B., Cervantes, S., Benitez, B.A., Razquin, C., Goate, A., Ibero American Alzheimer Disease Genetics Group Researchers, Cruchaga, C., 2012. Pooled-DNA sequencing identifies novel causative variants in PSEN1, GRN and MAPT in a clinical early onset and familial Alzheimer's disease Ibero-American cohort. *Alzheimers Res. Ther.* 4, 34.
- Johnson, V.J., Sharma, R.P., 2003. Aluminum disrupts the pro-inflammatory cytokine/neurotrophin balance in primary brain rotation-mediated aggregate cultures: possible role in neurodegeneration. *Neurotoxicology* 24:261-268.
- Joshi, Y.B., Giannopoulos, P.F., Praticò, D., 2015. The 12/15-lipoxygenase as an emerging therapeutic target for Alzheimer's disease, *Trends in Pharmacological Sciences*, Volume 36:3, 181-186.
- Jost, C.R., Van der Zee, C.E., In 't Zandt, H.J., et al., 2002. Creatine kinase B-driven energy transfer in the brain is important for habituation and spatial learning behaviour, mossy fibre field size and determination of seizure susceptibility. *The European Journal of Neuroscience* 15:1692–1706
- Kalhan, S.C., Hanson, R.W. 2012. Resurgence of serine: an often neglected but indispensable amino acid. *J Biol Chem.*, 287:19786–19791.
- Kalmijn, S., Launer, L.J., Lindemans, J., Bots, M.L., Hofman, A., Breteler, M.M., 1999. Total homocysteine and cognitive decline in a community-based sample of elderly subjects: the Rotterdam Study. *Am. J. Epidemiol.* 150, 283–289.
- Kawahara, M., Kato-Negishi, M., Hosoda, R., Imamura, L., Tsuda, M., Kuroda, Y., 2003. Brain-derived neurotrophic factor protects cultured rat hippocampal neurons from aluminum maltolate neurotoxicity. *J Inorg Biochem* 97:124-131.
- Kim, D.G., Krenz, A., Toussaint, L. E., Maurer, K. J., Robinson, S.-A., Yan, A., Bynoe, M. S., 2016. Non-alcoholic fatty liver disease induces signs of Alzheimer's disease (AD) in wild-type mice and accelerates pathological signs of AD in an AD model. *Journal of Neuroinflammation* 13, 1.
- Kim, D.Y., Park, E.Y., Chang, E., Kang, H.G., Koo, Y., Lee, E.J., Park, J.H., 2016. A novel miR-34a target, protein kinase D1, stimulates cancer stemness and drug resistance through GSK3/β-catenin signaling in breast cancer. *Oncotarget* 7(12), 14791–14802.
- Kim, J., Basak, J.M., Holtzman, D.M., 2009. The Role of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease. *Neuron* 63, 27–303.
- Kim, T. , Pae, C. , Yoon, S. , Jang, W. , Lee, N. J., Kim, J. , Lee, S. , Lee, C. , Paik, I. and Lee, C., 2006. Decreased plasma antioxidants in patients with Alzheimer's disease. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 21: 344-348.
- Kivipelto, M., Ngandu, T., Fratiglioni, L., Viitanen, M., Kåreholt, I., Winblad, B., Helkala, E. L., Tuomilehto, J., Soininen, H., Nissinen, A., 2005. Obesity and vascular risk factors at midlife and the risk of dementia and Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 62, 1556–1560.
- Koepsell, T.D., Kurland, B.F., Harel, O., Johnson, E.A., Zhou, X.-H., Kukull, W.A., 2008. Education, cognitive function, and severity of neuropathology in Alzheimer disease. *Neurology* 70, 1732–1739.
- Kornhuber, J., Weller, M., 1997. Psychotogenicity and N-methyl-daspartate receptor antagonism: implications for neurodegenerative pharmacotherapy. *Biol. Psychiatry*, 41, 135– 144.

- Koutsilieri, E., Riederer, P. 2007. Excitotoxicity and new antigitamatergic strategies in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Parkinsonism Relat Disord.*, 13 Suppl 3:S329-331.
- Kuller, L.H., Lopez, O.L., 2011. Dementia and Alzheimer's disease: A new direction. The 2010 Jay L. Foster Memorial Lecture. *Alzheimers Dement.* 7, 540–550.
- Kumar, V., Gill, K.D., 2009. Aluminium neurotoxicity: neurobehavioural and oxidative aspects *Arch. Toxicol.* 83 (11), pp. 965-978.
- Laird, P.W., 2010. Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis. *Nat. Rev. Genet.* 11, 191–203.
- Laube, B., Hirai, H., Sturgess, M., Betz, H., Kuhse, J. 1997. Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit. *Neuron.*, 18:493-503.
- 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. *PLoS One* 9, e106837.
- Lee, M., McGeer, E., McGeer, P.L., 2014. Activated human microglia stimulate neuroblastoma cells to upregulate production of beta amyloid protein and tau: implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurobiol. Aging.*
- Lee, Y.J., Han, S.B., Nam, S.Y., Oh, K.W., Hong, J.T., 2010. Inflammation and Alzheimer's disease. *Arch Pharm Res* 33: 1539–1556.
- Lelong, V., Dauphin, F., Boulouard, M., 2001. RS 67333 and D-cycloserine accelerate learning acquisition in the rat. *Neuropharmacology* 41(4): 517–522.
- Lelong, V., Dauphin, F., Boulouard, M.R.S., 2001. 67333 and D-cycloserine accelerate learning acquisition in the rat. *Neuropharmacology* 41:517e22.
- Levine, T.D., Miller, R.G., Bradley, W.G., Moore, D.H., Saperstein, D.S., Flynn, L.E., et al., 2016. Phase I clinical trial of safety of L-serine for ALS patients. *Amyotroph Lateral Scler.* 25:1–5.
- Lewis, F.I., Torgerson, P.R., 2016. The current and future burden of late-onset dementia in the United Kingdom: Estimates and interventions. *Alzheimers Dement.*
- Lichtenthaler, S.F., 2011. Alpha-secretase in Alzheimer's disease: molecular identity, regulation and therapeutic potential. *J Neurochem* 116:10–21.
- Lima, P.D., Leite, D.S., Vasconcellos, M.C., Cavalcanti, B.C., Santos, R.A., Costa-Lotufo, L.V., Pessoa, C., Moraes, M.O., Burbano, R.R., 2007. Genotoxic effects of aluminum chloride in cultured human lymphocytes treated in different phases of cell cycle *Food Chem. Toxicol.* 45 (7), pp. 1154-1159.
- Liu-Seifert, H., Siemers, E., Holdridge, K.C., Andersen, S.W., Lipkovich, I., Carlson, C., Sethuraman, G., Hoog, S., Hayduk, R., Doody, R., Aisen, P., 2015. Delayed-start analysis: Mild Alzheimer's disease patients in solanezumab trials, 3.5 years. *Alzheimers Dement. Transl. Res. Clin. Interv.*
- Loftis, J.M., Janowsky, A., 2003. The N-methyl-d-aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation, and clinical implications. *Pharmacol. Ther.*, 97, 55–85.
- Lord, J., Cruchaga, C., 2014. The epigenetic landscape of Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.* 17, 1138–1140.
- Luchsinger, J.A., Mayeux, R., 2004. Dietary factors and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 3, 579–587.
- Lukiw, W.J., Kruck, T.P., McLachlan, D.R., 1987. Alterations in human linker histone-DNA binding in the presence of aluminum salts in vitro and in Alzheimer's disease. *Neurotoxicology* 8 291–301.
- Lukiw, W.J., 2004. Gene expression profiling in fetal, aged, and Alzheimer hippocampus: a continuum of stress-related signaling. *Neurochem Res* 29(6): 1287– 1297.

- Lunnon, K., Smith, R., Hannon, E., De Jager, P.L., Srivastava, G., Volta, M., Troakes, C., Al Sarraj, S., Burrage, J., Macdonald, R., Condliffe, D., Harries, L.W., Katsel, P., Haroutunian, V., Kaminsky, Z., Joachim, C., Powell, J., Lovestone, S., Bennett, D.A., Schalkwyk, L.C., Mill, J., 2014. Methylomic profiling implicates cortical deregulation of ANK1 in Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.* 17, 1164–1170.
- Mably, A.J., Kanmert, D., Mc Donald, J.M., Liu, W., Caldarone, B.J., Lemere, C.A., O'Nuallain, B., Kosik, K.S., Walsh, D.M., 2014. Tau immunization: a cautionary tale? *Neurobiol. Aging.*
- Mandelkow, E.-M., Mandelkow, E., 1998. Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol.* 8, 425–427.
- Maragos, W.F., Chu, D.C., Young, A.B., D'Amato, C.J., Penney Jr., J.B. 1987. Loss of hippocampal [3H]TCP binding in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.*, 74, 371–376.
- Martins, I.J., Berger, T., Sharman, M.J., Verdile, G., Fuller, S.J., Martins, R.N., 2009. Cholesterol metabolism and transport in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 111, 1275–1308.
- McCartney, M., 2015. Margaret McCartney: the “breakthrough” drug that's not been shown to help in Alzheimer's disease. *BMJ* 351, h4064
- Medway, C., Morgan, K., 2014. Review: The genetics of Alzheimer's disease; putting flesh on the bones: the genetics of Alzheimer's disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 40, 97–105.
- Medway, C.W., Abdul-Hay, S., Mims, T., Ma, L., Bisceglia, G., Zou, F., Pankratz, S., Sando, S.B., Aasly, J.O., Barcikowska, M., Siuda, J., Wszolek, Z.K., Ross, O.A., Carrasquillo, M., Dickson, D.W., Graff-Radford, N., Petersen, R.C., Ertekin-Taner, N., Morgan, K., Bu, G., Younkin, S.G., 2014. ApoE variant p.V236E is associated with markedly reduced risk of Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.* 9, 11.
- Michaelson, D.M., 2014. ApoE4: The most prevalent yet understudied risk factor for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.*
- Minati, L., Edginton, T., Bruzzone, M.G., Giaccone, G., 2009. Current concepts in Alzheimer's disease: a multidisciplinary review. *Am. J. Alzheimers Dis. Other Dement.* 24, 95–121.
- Mitoma, J., Furuya, S., Hirabayashi, Y., 1998. A novel metabolic communication between neurons and astrocytes: non-essential amino acid L-serine released from astrocytes is essential for developing hippocampal neurons, *Neurosci. Res.* 30, 195–199.
- Monaghan, D.T., Jane, D.E. 2009. Pharmacology of NMDA Receptors. In: *Biology of the NMDA Receptor* (Van Dongen AM, ed). Boca Raton (FL).
- Monahan, J.B., Handelmann, G.E., Hood, W.F., Cordi A.A., 1989. D-cycloserine, a positive modulator of the N-methyl-D-aspartate receptor, enhances performance of learning tasks in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 34:649e53.
- Morgan, K., 2011. The three new pathways leading to Alzheimer's disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 37, 353–357.
- Morris, R.G. 1989. Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *J Neurosci.*, 9:3040-3057.
- Newcomer, J.W., Farber, N.B., Olney, J.W. 2000. NMDA receptor function, memory, and brain aging. *Dialogues Clin Neurosci.*, 2:219-232.
- Newcomer, J.W., Krystal, J.H., 2001. NMDA receptor regulation of memory and behavior in humans. *Hippocampus*, 11, 529–542.
- Noda, M., Kawahara, Y., Ichikawa, A., Matoba, Y., Matsuo, H., et al. 2004. Self-protection mechanism in D-cycloserine-producing *Streptomyces lavendulae*. Gene cloning, characterization, and kinetics of its alanine racemase and D-alanyl-D-

- alanine ligase, which are target enzymes of D-cycloserine. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 46143–46152.
- Olney, J.W., Newcomer, J.W., Farber, N.B. 1999. NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. *J Psychiatr Res.*, 33:523-533
- Olney, J.W., Wozniak, D.F., Farber, N.B., 1997. Excitotoxic neurodegeneration in Alzheimer disease. New hypothesis and new therapeutic strategies. *Arch. Neurol.*, 54, 1234– 1240.
- Ott, A., Breteler, M.M.B., Bruyne, M.C. de, Harskamp, F. van, Grobbee, D.E., Hofman, A., 1997. Atrial Fibrillation and Dementia in a Population-Based Study The Rotterdam Study. *Stroke* 28, 316–321.
- Panza, F., Solfrizzi, V., Frisardi, V., Capurso, C., D’Introno, A., Colacicco, A.M., Vendemiale, G., Capurso, A., Imbimbo, B.P., 2009. Disease-modifying approach to the treatment of Alzheimer’s disease: from alpha-secretase activators to gamma-secretase inhibitors and modulators. *Drugs Aging* 26, 537–555.
- Paris, D., Ait-Ghezala, G., Bachmeier, C., Laco, G., Beaulieu-Abdelahad, D., Lin, Y., Jin, C., Crawford, F., Mullan, M., 2014. The Spleen Tyrosine Kinase (Syk) Regulates Alzheimer Amyloid- Production and Tau Hyperphosphorylation. *J. Biol. Chem.* 289, 33927–33944.
- Paz, L.N.F., Moura, L.M., Feio, D.C., Cardoso, M.G.C., Ximenes, W.L.O., Montenegro, R.C., Alves, A.P., Burbano, R.R., Lima, P.D., 2017. Evaluation of in vivo and in vitro toxicological and genotoxic potential of aluminum chloride, *Chemosphere* 175, 130-137.
- Pettegrew, J.W., Panchalingam, K., Klunk, W.E., McLure, R.J., Muenz, L.R., 1994. Alterations of cerebral metabolism in probable Alzheimer’s disease: A preliminary study. *Neurobiol. Aging* 15, 117–132.
- Pogge, E., 2010. Vitamin D and Alzheimer’s disease: is there a link? *Consult. Pharm. J. Am. Soc. Consult. Pharm.* 25, 440–450.
- Pogue, A.I., Lukiw, W.J., 2016. Aluminum, the genetic apparatus of the human CNS and Alzheimer’s disease (AD) *Morphologie* 100 (329), pp. 56-64.
- Pollay, M. 1976. Movement of glycine across the blood-brain barrier of the rabbit. *J Neurobiol.*, 7:123-128.
- Priller, C., Bauer, T., Mitteregger, G., Krebs, B., Kretschmar, H.A., Herms, J., 2006. Synapse Formation and Function Is Modulated by the Amyloid Precursor Protein. *J. Neurosci.* 26, 7212–7221.
- Procter, A.W., Wong, E.H., Stratmann, G.C., Lowe, S.L., Bowen, D.M., 1989. Reduced glycine stimulation of [3H]MK-801 binding in Alzheimer’s disease. *J. Neurochem.*, 53, 698–704.
- Rang, M.M.D.J.M.R., R.J. Fowler H.P., 200 . Rang and Dale’s Pharmacology. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Rapoport, M., Dawson, H.N., Binder, L.I., Vitek, M.P., Ferreira, A., 2002. Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 6364–6369.
- Reisberg, B., Doody, R., Stöffler, A., Schmitt, F., Ferris, S., Möbius, H.J., 2003. Memantine in Moderate-to-Severe Alzheimer’s Disease. *N. Engl. J. Med.* 348, 1333–1341.
- Ricchelli, F., Drago, D., Filippi, B., Tognon, G., Zatta, P., 2005. Aluminum- triggered structural modifications and aggregation of beta-amyloids. *Cell Mol Life Sci* 62:1724–1733.
- Richwine, A.F., Parkin, A.O., Buchanan, J.B., Chen, J., Markham, J.A., Juraska, J.M., Johnson, R.W., 2008. Architectural changes to CA1 pyramidal neurons in adult and aged mice after peripheral immune stimulation. *Psychoneuroendocrinology* 33, 1369e1377.

- Ridge, P.G., Hoyt, K.B., Boehme, K., Mukherjee, S., Crane, P.K., Haines, J.L., Mayeux, R., Farrer, L.A., Pericak-Vance, M.A., Schellenberg, G.D., Kauwe, J.S.K., 2016. Assessment of the genetic variance of late-onset Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 41, 200.e13-200.e20.
- Roadmap Epigenomics Consortium, Kundaje, A., Meuleman, W., Ernst, J., Bilenky, M., Yen, A., Heravi-Moussavi, A., Kheradpour, P., Zhang, Z., Wang, J., Ziller, M.J., Amin, V., Whitaker, J.W., Schultz, M.D., Ward, L.D., Sarkar, A., Quon, G., Sandstrom, R.S., Eaton, M.L., Wu, Y.-C., Pfenning, A.R., Wang, X., Claussnitzer, M., Liu, Y., Coarfa, C., Harris, R.A., Shores, N., Epstein, C.B., Gjoneska, E., Leung, D., Xie, W., Hawkins, R.D., Lister, R., Hong, C., Gascard, P., Mungall, A.J., Moore, R., Chuah, E., Tam, A., Canfield, T.K., Hansen, R.S., Kaul, R., Sabo, P.J., Bansal, M.S., Carles, A., Dixon, J.R., Farh, K.-H., Feizi, S., Karlic, R., Kim, A.-R., Kulkarni, A., Li, D., Lowdon, R., Elliott, G., Mercer, T.R., Neph, S.J., Onuchic, V., Polak, P., Rajagopal, N., Ray, P., Sallari, R.C., Siebenthal, K.T., Sinnott-Armstrong, N.A., Stevens, M., Thurman, R.E., Wu, J., Zhang, B., Zhou, X., Beaudet, A.E., Boyer, L.A., De Jager, P.L., Farnham, P.J., Fisher, S.J., Haussler, D., Jones, S.J.M., Li, W., Marra, M.A., McManus, M.T., Sunyaev, S., Thomson, J.A., Tlsty, T.D., Tsai, L.-H., Wang, W., Waterland, R.A., Zhang, M.Q., Chadwick, L.H., Bernstein, B.E., Costello, J.F., Ecker, J.R., Hirst, M., Meissner, A., Milosavljevic, A., Ren, B., Stamatoyannopoulos, J.A., Wang, T., Kellis, M., 2015. Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature* 518, 317–330.
- Roses, A.D., Saunders, A.M., 2006. Perspective on a pathogenesis and treatment of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 2, 59–70.
- Rouaud, E., Billard, J.M., 2003. D-cycloserine facilitates synaptic plasticity but impairs glutamatergic neurotransmission in rat hippocampal slices. *Br J Pharmacol* 140(6):1051–1056.
- Roy, S., Zhang, B., Lee, V.M.-Y., Trojanowski, J.Q., 2005. Axonal transport defects: a common theme in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 109, 5–13.
- Sacaan, A.I., Johnson, K.M. 1991. Regulation of polyamine and magnesium inhibition of the Nmethyl- D-aspartate (NMDA) receptor ionophore complex. *Neurosci Lett.*, 121:219-222.
- Samson, K., 2010. NerveCenter: Phase III Alzheimer trial halted: Search for therapeutic biomarkers continues. *Ann. Neurol.* 68, A9–A12.
- Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D., George-Hyslop, P.H.S., Pericak-Vance, M.A., Joo, S.H., Rosi, B.L., Gusella, J.F., Crapper-MacLachlan, D.R., Alberts, M.J., Hulette, C., Crain, B., Goldgaber, D., Roses, A.D., 1993. Association of apolipoprotein E allele ϵ 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 43, 1467–1467.
- Schellenberg, G.D., Montine, T.J., 2012. The genetics and neuropathology of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 124, 305–323.
- Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vandeventer, C., Walker, S., Wogulis, M., Yednock, T., Games, D., Seubert, P., 1999. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400, 173–177.
- Schneider, J.S., Tinker, J.P., Van Velson, M., Giardiniere, M., 2000. Effects of the partial glycine agonist D-cycloserine on cognitive functioning in chronic low dose MPTP-treated monkeys. *Brain Res* 860(1–2):190–194.

- Schwartz, B.L., Hashtroudi, S., Herting, R.L., Schwartz, P., Deutsch, S.I. 1996. d-Cycloserine enhances implicit memory in Alzheimer patients. *Neurology*, 46: 420–424.
- Schwartz, M., Kipnis, J., Rivest, S. & Prat, A., 2013. How do immune cells support and shape the brain in health, disease, and aging? *J. Neurosci.* 33, 17587–17596.
- Schwartz, M.K., 1971. Clinical aspects of aspartate and alanine aminotransferases. *Methods in enzymology* 17, 866–875.
- Shad, K.F., Aghazadeh, Y., Ahmad, S., Kress, B., 2013. Peripheral markers of Alzheimer's disease: surveillance of white blood cells. *Synapse* 67(8):541-3.
- Shankar, G.M., Li, S., Mehta, T.H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N.E., Smith, I., Brett, F.M., Farrell, M.A., Rowan, M.J., Lemere, C.A., Regan, C.M., Walsh, D.M., Sabatini, B.L., Selkoe, D.J., 2008. Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat. Med.* 14, 837–842.
- Shewale, S.J., 2012. The Potential Role of Epigenetics in Alzheimer's Disease Etiology. *Biol. Syst. Open Access* 02.
- Shibata, M., Yamada, S., Kumar, S.R., Calero, M., Bading, J., Frangione, B., Holtzman, D.M., Miller, C.A., Strickland, D.K., Ghiso, J., Zlokovic, B.V., 2000. Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J. Clin. Invest.* 106, 1489–1499.
- Shipton, O.A., Paulsen, O. 2014. GluN2A and GluN2B subunit-containing NMDA receptors in hippocampal plasticity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 369:20,130-163.
- Siemers, E.R., Sundell, K.L., Carlson, C., Case, M., Sethuraman, G., Liu-Seifert, H., Dowsett, S.A., Pontecorvo, M.J., Dean, R.A., Demattos, R., 2015. Phase 3 solanezumab trials: Secondary outcomes in mild Alzheimer's disease patients. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 0.
- Sink KM, Espeland MA, Castro CM, et al, 2015. Effect of a 24-month physical activity intervention vs health education on cognitive outcomes in sedentary older adults: The life randomized trial. *JAMA* 314, 781–790.
- Skoog, I., Nilsson, L., Persson, G., Lernfelt, B., Landahl, S., Palmertz, B., Andreasson, L.-A., Odén, A., Svanborg, A., 1996. 15-year longitudinal study of blood pressure and dementia. *The Lancet* 347, 1141–1145.
- Smith, C.D., Carney, J.M., Stark-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's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci* 10540–10543.
- Smolarkiewicz, M., Skrzypczak, T., Wojtaszek, P., 2013. The very many faces of presenilins and the c-secretase complex. *Protoplasma* 250:997–1011.
- Stewart, W.F., Kawas, C., Corrada, M., Metter, E.J., 1997. Risk of Alzheimer's disease and duration of NSAID use. *Neurology* 48, 626–632.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 1977–1981.
- Sutcliffe, J.G., Hedlund, P.B., Thomas, E.A., Bloom, F.E., Hilbush, B.S., 2011. Peripheral reduction of β -amyloid is sufficient to reduce brain β -amyloid: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 89(6):808-14.
- Sze, C., Bi, H., Kleinschmidt-DeMasters, B.K., Filley, C.M., Martin, L.J., 2001. N-Methyl-d aspartate receptor subunit proteins and their phosphorylation status are altered selectively in Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.*, 182, 151– 159.
- Tanzi, R.E., Bertram, L., 2005. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell* 120, 545–555.

- Temple, M.D., Hamm, R.J., 1996. Chronic, post-injury administration of Dcycloserine, an NMDA partial agonist, enhances cognitive performance following experimental brain injury. *Brain Res* 741(1–2): 246–251.
- Teter, B., 2004. ApoE-dependent plasticity in Alzheimer’s disease. *J. Mol. Neurosci.* MN 23, 167–179.
- Thinakaran, G., Koo, E.H., 2008. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J. Biol. Chem.* 283, 29615–29619.
- Tolbert, P.E., Shy, C.M., Allen, J.W. 1992. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutation Research*, 271 69-77
- Tsai, G.E., Falk, W.E., Gunther, J., Coyle, J.T. 1999. Improved cognition in Alzheimer’s disease with short-term D-cycloserine treatment. *Am J Psychiatry*, 156: 467–469.
- Turner, P.R., O’Connor, K., Tate, W.P., Abraham, W.C., 2003. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog. Neurobiol.* 70, 1–32.
- van der Crabben, S.N., Verhoeven-Duif, N.M., Brilstra, E.H. et al. 2013. An update on serine deficiency disorders. *J Inherit Metab Dis.*, 36:613– 619.
- Vitte, J., Michel, B.F., Bongrand, P. et al., 2004. Oxidative Stress Level in Circulating Neutrophils Is Linked to Neurodegenerative Diseases *J Clin Immunol* 24: 683.
- Voglis, G., Tavernarakis, N. 2006. The role of synaptic ion channels in synaptic plasticity. *EMBO Rep* 7:1104-1110.
- Walton, J.R., 2012. Aluminium disruption of calcium homeostasis and signal transduction resembles change that occurs in aging and Alzheimer’s disease. *J. Alzheimer’s Dis.* 29,255–273.
- Wimo, A., Guerchet, M., Ali, G.-C., Wu, Y.-T., Prina, A.M., Winblad, B., Jönsson, L., Liu, Z., Prince, M., 2017. The worldwide costs of dementia 2015 and comparisons with 2010. *Alzheimers Dement.* 13, 1-7.
- Wyss-Coray, T., 2006. Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat. Med.* 12, 1005–1015.
- Yaka, R., Biegon, A., Grigoriadis, N., Simeonidou, C., Grigoriadis, S., Alexandrovich, A.G., Matzner, H., Schumann, J., Trembovler, V., Tsenter, J., Shohami, E., 2007. D-Cycloserine improves functional recovery and reinstates long-term potentiation (LTP) in a mouse model of closed head injury. *Faseb J* 21(9):2033–2041
- Yan, M.H., Wang, X., Zhu, X., 2013. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radic Biol Med* 62: 90–101.
- Yoshida, K., Furuya, S., Osuka, S., et al., 2004. Targeted disruption of the mouse 3-phosphoglycerate dehydrogenase gene causes severe neurodevelopmental defects and results in embryonic lethality, *J. Biol. Chem.* 279, 3573–3577.
- Yu, L., Chibnik, L.B., Srivastava, G.P., Pochet, N., Yang, J., Xu, J., Kozubek, J., Obholzer, N., Leurgans, S.E., Schneider, J.A., Meissner, A., De Jager, P.L., Bennett, D.A., 2015. Association of Brain DNA Methylation in SORL1, ABCA7, HLA-DRB5, SLC24A4, and BIN1 With Pathological Diagnosis of Alzheimer Disease. *JAMA Neurol.* 72, 15.
- Yuyama, K., Sun, H., Sakai, S., Mitsutake, S., Okada, M., Tahara, H., Furukawa, J. -i., Fujitani, N., Shinohara, Y., Igarashi, Y., 2014. Decreased Amyloid-Pathologies by Intracerebral Loading of Glycosphingolipid-enriched Exosomes in Alzheimer Model Mice. *J. Biol. Chem.* 289, 24488–24498.
- Zaky, A., Mohammad, B., Moftah, M., Kandeel, K.M., Bassiouny, A.R., 2013. Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 is a key modulator of aluminum-induced neuroinflammation. *BMC Neurosci* 14:26.
- Zamrini, E., McGwin, G., Roseman, J.M., 2004. Association between statin use and Alzheimer’s disease. *Neuroepidemiology* 23, 4–98.

- Zenaro, E., Pietronigro, E., Della Bianca, V., Piacentino, G., Marongiu, L., Budui, S., Turano, E., Rossi, B., Angiari, S., Dusi, S., Montresor, 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. *Nat Med.* 21(8):880-6.
- Zhao, Y., Zhao, B., 2013. Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Oxid Med Cell Longev* 2013:316523.
- Zhang, X., Wang, J., Hong, C., Luo, W., & Wang, C., 2015. Design, synthesis and evaluation of genistein-polyamine conjugates as multi-functional anti-Alzheimer agents. *Acta Pharmaceutica Sinica. B*, 5(1), 67–73.
- Zhu, X., Raina, A.K., Perry, G., Smith, M.A., 2004. Alzheimer's disease: the two-hit hypothesis. *Lancet Neurol* 3: 219–226.
- Zovkic, I.B., Guzman-Karlsson, M.C., Sweatt, J.D., 2013. Epigenetic regulation of memory formation and maintenance. *Learn. Mem. Cold Spring Harb.* N 20, 61–74.



EKLER

EK-1 Etik Kurul Onayı



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

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

04.05.2018

HUKUK MÜŞAVİRLİĞİNE

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

İlgide kayıtlı yazınız, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 27.04.2018 tarih ve 5 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 121 no'lu 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 TÜRKİZ'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 görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi 25240 Erzurum
Tel: +90 442 2317222
Elektronik Ad: <http://www.atauni.edu.tr/birim-veteriner-fakultesi>
Kep Adresi: atauni@ho11.kep.tr

Bilgi: Mehmet EÖCA
Faks: +90 442 2317244
E-Posta: vetfak@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 HACİMÜFTÜOĞLU, görüşmeye katılmadı ve oy kullanmadı). karar verildi.

Ek : Sonuç Raporu. 1 Adet.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı-Soyadı : Özlem ÖZDEMİR TOZLU
Uyruğu : T.C.
Doğum Tarihi ve Yeri : 13.07.1989/ Adana
Medeni Hali : Evli
Telefon : +90 541 592 75 73
e-mail : ozdemirozlem1@gmail.com

Eğitim

Derece	Üniversite	Mezuniyet Yılı
Doktora	Erzurum Teknik Üniversitesi	2018
Yüksek Lisans	Erzurum Teknik Üniversitesi	2015
Lisans	İstanbul Üniversitesi	2012
Lise	Seyhan Anadolu Lisesi	2007

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Erzurum Teknik Üniversitesi/ 2013 - Halen

Yayınlar (SCI, SCI-Expanded)

1. da Nóbrega F, Ozdemir O, Nascimento Sousa S, Barboza J, Turkez H, de Sousa D. Piplartine Analogues and Cytotoxic Evaluation against Glioblastoma. *Molecules* 2018;23(6):1382. doi:10.3390/molecules23061382.
2. Koc K, Ozdemir O, Ozdemir A, Dogru U, Turkez H. Antioxidant and anticancer activities of extract of *Inula helenium* (L.) in human U-87 MG glioblastoma cell line. *J. Cancer Res. Ther.* 2018;14(3):658. doi:10.4103/0973-1482.187289.
3. Turkez H, Tozlu OO, Lima TC, de Brito AEM, de Sousa DP. A Comparative Evaluation of the Cytotoxic and Antioxidant Activity of *Mentha crispa* Essential Oil, Its Major Constituent Rotundifolone, and Analogues on Human Glioblastoma. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018;2018:1-12. doi:10.1155/2018/2083923.
4. Cacciatore I, Fornasari E, Marinelli L, Özdemir Ö et al. Memantine-derived drugs as potential antitumor agents for the treatment of glioblastoma. *Eur. J. Pharm. Sci.*

2017;109:402-411. doi:10.1016/j.ejps.2017.08.030.

5. Turkez H, Arslan ME, Ozdemir O. Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2017;13(10):1089-1098. doi:10.1080/17425255.2017.1375097.
6. Akbas E, Celikezen FC, Turkez H, Özdemir Ö et al. Synthesis of the 3,5-diphenyl-1H-pyrazole and cytogenetic and oxidative alterations after exposure of cultured human whole blood cells. Mehellou Y, ed. *Cogent Chem.* 2017;3(1). doi:10.1080/23312009.2017.1344115.
7. Özgeriş B, Akbaba Y, Özdemir Ö, Türkez H, Göksu S. Synthesis and Anticancer Activity of Novel Ureas and Sulfamides Incorporating 1-Aminotetralins. *Arch. Med. Res.* 2017;48(6):513-519. doi:10.1016/j.arcmed.2017.12.002.
8. Koc K, Ozdemir O, Kizilkaya F, Sengul M, Turkez H. Cytotoxic activity of the aqueous extract of *Micromeria fruticosa* (L.) Druce subsp. *serpyllifolia* on human U-87 MG cell lines. *Arch. Biol. Sci.* 2017;69(3):449-453. doi:10.2298/ABS160504119K.

Hakemli Dergiler

1. Arslan ME, Türkez H, Özdemir Ö, Chikha O. Ameliorative effect of boric acid against nicotine-induced cytotoxicity on cultured human primary alveolar epithelial cells. *Bor Dergisi* 2016;1(2), 104-109

Ulusal Kongre Sunum

1. Kenan Çadircı, Özlem Özdemir, Hasan Türkez (2017). Oral tatlandırıcı aspartam'ın *in vitro* sitotoksosite, genotoksosite ve oksidatif hasar potansiyeli. 19. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi, 11--15 Ekim 2017, Belek, Antalya.
2. Kenan Çadircı, Özlem Özdemir, Hasan Türkez (2017). Oral sglt2 inhibitörü olan empagliflozin'in *in vitro* sitotoksosite, genotoksosite ve oksidatif hasar potansiyeli. 19. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi, 11--15 Ekim 2017, Belek, Antalya.
3. Akbaş E, Çelikezen FÇ, Hasan TÜRKEZ, Özdemir Ö, Şahin E, Rüzga rA, Ergana E. Tek Basamakta 3,5--Difenil--1H--Pirazol Bileşiğinin Sentezi ve In vitro Sitotoksik ve Oksidatif Etkilerinin Belirlenmesi. 4. İlaç Kimyası: İlaç Etkin Maddesi Tasarımı, Sentezi, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi, 17--20 Mart 2016, Aydın.
4. M.Enes Arslan, Aysenur Özdemir, Özlem Özdemir, Erdal Sönmez, Ahmet Hacımüftüoğlu, Elanur Aydın, Hasan TÜRKEZ (2014) Hidroksiapatit Nanopartiküllerinin İn Vitro Nörotoksosite Potansiyellerinin Değerlendirilmesi. 8. Hücrel Sinir Bilim Günleri, 28-29 Kasım 2014 Sakarya.

Uluslararası Kongre Sunum (Sunum tarihleri dikkate alınmalıdır)

1. Elanur AYDIN KARATAŞ, Hasan Türkez, Özlem Özdemir Tozlu, Ayşenur Yazıcı. İtiryum oksit nanopartikülünün insan U87MG glioma ve PC3 prostat kanser hücrelerinde apoptoz, nekroz ve sitokrom p450 metabolizması üzerine etkilerinin moleküler düzeyde aydınlatılması. 7. Multidisipliner Kanser Araştırma ve 1. Temel Onkoloji Kongresi, Sözlü Sunum 11-14 Ekim 2018 Antalya, Türkiye.
2. Özlem Özdemir, Lisa Marinelli, Ivana Cacciatore, Antonio Di Stefano, Hasan Türkez. Yeni sentezlenmiş NSAİİ türevlerinin glioblastoma ve prostat kanseri hücrelerinde gen ekspresyon profillerinin belirlenmesi , 5. İlaç Kimyası: İlaç Etkin Maddesi Tasarımı, Sentezi, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi, Antalya, Turkey (Poster Sunum)
3. Özlem Özdemir, Elanur Aydın, Erdal Sönmez, Elif Öztetik, Hasan Türkez. Periferik insan kan, alveolar epitel ve primer insan karaciğer hepatosit hücrelerinde ZnO katkılı kobalt (Co-ZnO) nanopartiküllerinin oluşturduğu moleküler yanıtların araştırılması. 5. İlaç Kimyası: İlaç Etkin Maddesi Tasarımı, Sentezi, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi, Antalya, Turkey (Poster Sunum)
4. Hasan TÜRKEZ, Özlem ÖZDEMİR, Abdulgani TATAR. An Effective Dietary Supplement Against Imazalil Induced Genotoxic Damage in Human Lymphocytes: Alpha-Lipoic Acid. VI. International Conference of Molecular Medicine, Istanbul,Turkey (Poster Sunum)
5. Özlem ÖZDEMİR, Hasan TÜRKEZ, Abdulgani TATAR, Ivana CACCIATORE, Antonio DI STEFANO. Evaluation of the Hepatoprotective Effect of Lipoic Acid Upon Exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin in Rat Hepatocyte Cultures. VI. International Conference of Molecular Medicine, Istanbul,Turkey (Sözlü Sunum)
6. Özlem Özdemir, Hasan Türkez, Ümit İncekara, Zeynep Aydoğan. Evaluation of Cytotoxic, Oxidative Stress and Genotoxic Responses of Commercial Edible *Pygoplatys auropunctatus* Nymphs on Human Blood Cells. International Ecology Symposium 2017: Kayseri, Turkey (Poster Sunum)
7. Özlem Özdemir Tozlu, Hasan Türkez, Elvan Özbek, Fadime Geyikoğlu, Sait Keleş, Ahmet Hacımüftüoğlu, Abdulgani Tatar. In vivo ameliorating effects of boric acid against aluminum-induced genotoxicity in rats. 5th MacroTrend Conference on Health and Medicine: Paris 2017 (sözlü sunum)

8. Hasan Türkez, Özlem Özdemir Tozlu, Elvan Özbek, Fadime Geyikoğlu, Sait Keleş, Abdulgani Tatar, Ahmet Hacımüftüoğlu. Protective effect of ulexite on aluminum induced DNA and oxidative damages in cultured human blood cells. 5th MacroTrend Conference on Health and Medicine: Paris 2017 (sözlü sunum)
9. Hasan TÜRKEZ, M. E. Arslan, Ö. Özdemir, E. Sönmez, M. Açıkyıldız, A. Tatar. Expression profiling and pathway analysis of iron oxide (Fe₂O₃) nanoparticles toxicity on human lung alveolar epithelial cell line (hpaepic) using microarray analysis. 1st International Cell Death Research Congress, 04---07 May 2016, Izmir, TURKEY.
10. Hasan TÜRKEZ, Özlem Özdemir, Abdulgani Tatar (2016) Boron Compounds Ameliorates the Human Alveolar Epithelial Cell Death Induced by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin. 1st International Mediterranean Science and Engineering Congress (IMSEC 2016), 26---28 October 2016, Adana, TURKEY.
11. Hasan TÜRKEZ, Fazıl Hacımüftüoğlu, Özlem Özdemir (2016) Anti---mutagenic Action of Propolis Against Aluminum Induced Damage in DNA of Human Alveolar Epithelial Cells In vitro. 1st International Mediterranean Science and Engineering Congress (IMSEC 2016), 26---28 October 2016, Adana, TURKEY.
12. Ozdemir, O., Marinelli, L., Hasan TURKEZ, Stefano, A.D., "Synthesis, Characterization of Novel NSAIDs and Their Cytotoxic Effects on Human Glioblastoma Cell Line," Second Congress of the Serbian Association for Cancer Research, 2---3 Oct., 2015, Belgrade, Serbia.