

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ECZACILIK FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DPP-4 İNHİBİTÖRÜ VİLDAGLIPTİN VE
SAKSAGLIPTİN' İN SH-SY5Y HÜCRELERİNDE
KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
ALİM HÜSEYİN DOKUMACI**

**Danışman
Doç. Dr. M. Betül AYCAN**

Doktora Tezi

**MART 2018
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ECZACILIK FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DPP-4 İNHİBİTÖRÜ VİLDAGLIPTİN VE
SAKSAGLIPTİN'İN SH-SY5Y HÜCRELERİNDE
KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

(Doktora Tezi)

**Hazırlayan
Alim Hüseyin DOKUMACI**

**Danışman
Doç. Dr. M. Betül AYCAN**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TDK-5824 numaralı proje ile desteklenmiştir.**

**Mart 2018
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Alim Hüseyin DOKUMACI

İmza:



YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“DPP-4 İnhibitörü Vildagliptin ve Saksagliptin’in SH-SY5Y Hücrelerinde Koruyucu Etkilerinin Araştırılması” adlı Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.




Tezi Hazırlayan

Alim Hüseyin DOKUMACI



Danışman

Doç. Dr. M. Betül Aycan



Eczacılık Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı

Doç. Dr. M. Betül Aycan

Doç. Dr. M. Betül AYCAN danışmanlığında **Alim Hüseyin DOKUMACI** tarafından hazırlanan ‘‘**DPP-4 İnhibitörü Vildagliptin ve Saxagliptin’in SH-SY5Y Hücrelerinde Koruyucu Etkilerinin Araştırılması**’’ adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Farmakoloji** Anabilim Dalında **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

28.03/2018

JÜRİ

İmza

Danışman : Doç. Dr. M. Betül AYCAN
(Farmakoloji ABD)

.....


Üye : Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
(Farmakoloji ABD)

.....


Üye :Doç. Dr. Alper Okyar
(Farmakoloji ABD)

.....


Üye :Dr. Öğr. Üyesi İ. İpek BOŞGELMEZ
(Toksikoloji ABD)

.....


Üye :Dr. Öğr. Üyesi Perihan GÜRBÜZ
(Farmakognozi ABD)

.....


ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../2018

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez sürecim boyunca bana destek olup değerli bilgilerini benimle paylaşan ve araştıma faaliyetlerimde bana yol gösteren anabilim dalı başkanımız ve tez danışmanım Doç. Dr. M. Betül Aycan'a, fakültemizdeki laboratuvar imkanlarının oluşturulmasını ve kullanmamızı sağlayan Prof. Dr. Müberra Koşar'a; deneylerim boyunca bana maddi ve manevi destek olan Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim elemanları Dr. Öğr. Üyesi Eren Demirpolat, Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Kübra Karaboğa-Arslan ve Arş. Gör. Ebru Öztürk'e; laboratuvar çalışmalarımnda bana deneyimlerini aktaran ve aynı zamanda tez izleme komitemdeki Dr. Öğr. Üyesi Perihan Gürbüz ve Dr. Öğr. Üyesi İ. İpek Boşgelmez'e; laboratuvar çalışmalarımnda desteği olan Doç. Dr. Ahmet Cumaoglu ve Dr. Öğr. Üyesi Gökçe Şeker Karatoprak'a, etken madde temininde bize yardımcı olan Zentiva firmasına; doktora sürecimde bana her türlü maddi ve manevi desteği veren aileme teşekkür ederim.

DPP-4 İNHİBİTÖRÜ VILDAGLIPTİN VE SAXAGLIPTİN' İN SH-SY5Y HÜCRELERİNDE KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Alim Hüseyin DOKUMACI

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Eczacılık Farmakoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi, 2018
Danışman: Doç. Dr. M. Betül AYCAN

ÖZET

Bu tez çalışmasında Dipeptidil peptidaz-4 (DPP-4) enzim inhibitörü antidiyabetik ilaç olarak kullanılan vildagliptin ve saksagliptinin amiloid-beta (A β) uygulamasına karşı SH-SY5Y hücrelerinde koruyucu etkisi hücresel bazı yollar üzerinden araştırılmıştır.

Deney grupları: Kontrol; vildagliptin (250, 100, 50 μ M); saksagliptin (200, 100, 50 μ M); memantin (100 μ M); A β (5 μ M) olarak belirlenmiştir. Etkin maddelerin tek başlarına ve A β varlığında gerçek zamanlı hücre analizi yöntemi (GZHA), (3-(4,5-Dimetil-2-tiyazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromid) MTT ve suforodamin B (SRB) yöntemleri ile SH-SY5Y hücrelerine olan etkileri incelenmiştir. Western blot tekniği ile 24. saatteki p-tau, kaspaz-3, kaspaz-9, kaspaz-12 protein ekspresyon düzeyleri analiz edilmiştir. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile Amiloid prekürsör protein (APP), presenilin1 (PSEN1) ve presenilin2 (PSEN2) gen ekspresyon düzeyleri ölçülmüştür. Mitokondrial membran potansiyeli (MMP) ve nitrik oksit (NO) düzeyleri de yine hücrelere etken maddeler ve A β uygulandıktan sonra 24. saatte ölçülmüştür.

A β uygulanan gruplarda kontrole göre canlılık istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,001$) azalmıştır. 250 μ M vildagliptin ($p < 0,001$), 100 μ M saksagliptin ($p < 0,01$) ve 100 μ M memantin ($p < 0,001$) uygulanan gruplar da canlılığı A β uygulanan gruba göre anlamlı arttırmıştır. MMP düzeyinde ise, vildagliptinin 250 ve 100 μ M uygulanan grup ile saksagliptinin 100 μ M uygulanan gruplarda kontrole yakın grafik alınmıştır.

A β uygulanan gruplarda kontrole göre kaspaz-3 ($p < 0,01$) ve kaspaz-12 ($p < 0,001$) artmıştır. Vildagliptinin 250 μ M kaspaz-3 ($p < 0,05$) ve kaspaz-9'u ($p < 0,001$) A β uygulanan gruba göre anlamlı azaltmıştır. Fosforile tau proteini A β uygulanan gruplarda kontrole göre artmış ($p < 0,01$), vildagliptin ve saksagliptin konsantrasyona bağımlı p-

tau'yu A β grubuna göre azaltmıştır. Memantin ise p-tau'yu A β grubuna göre anlamlı ($p<0,05$) azaltmıştır.

APP mRNA düzeyi saksagliptinin 200 μ M konsantrasyonu uygulanan grupta kontrole kıyasla düşmüştür. PSEN1 mRNA düzeyi vildagliptinin tüm konsantrasyonlarda, 100 μ M memantin uygulanan grupta ve saksagliptinin 100 ve 50 μ M konsantrasyonu uygulanan gruplarda kontrole göre anlamlı ($p<0,001$) düşmüştür. PSEN2 mRNA düzeyi 100 μ M vildagliptin ve 50 μ M saksagliptin uygulanan gruplarda kontrole göre anlamlı ($p<0,01$) düşmüştür.

DPP-4 inhibitörü oral antidiyabetik ilaçlardan olan vildagliptin ve saksagliptinin SH-SY5Y hücrelerinde A β toksisitesine karşı ve yalnız başlarına gösterdikleri etkilerin ilk kez incelendiği bu tezden elde edilen veriler ışığında vildagliptin ve saksagliptinin Alzheimer hastalığı (AH) tedavisinde temel stratejilerden olan nörodejenerasyon ve apoptozu önlemede daha ileri çalışmalarla da desteklenmek kaydıyla etkili olabileceği çıktısı elde edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Vildagliptin, saksagliptin, memantin, amiloid beta, Alzheimer, SH-SY5Y.

**INVESTIGATION OF PROTECTIVE EFFECTS OF DPP-4 INHIBITORS
VILDAGLIPTINE AND SAXAGLIPTINE ON SH-SY5Y CELL LINE**

Alim Hüseyin DOKUMACI

**Erciyes University, Institute of Health Sciences
Department of Pharmacology**

Doctorate Thesis, 2018

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. M. Betül AYCAN

ABSTRACT

In this thesis, we investigated possible protective effect of vildagliptine and saxagliptine, which are being used for their oral anti-diabetic effect as DPP-4 enzyme inhibitors, against A β toxicity on SH-SY5Y cell line.

Experimental groups are assigned as control; vildagliptine (250, 100, 50 μ M); saxagliptine (200, 100, 50 μ M); memantine 100 μ M; A β 5 μ M. Drug's cell response profiles elucidated with xCELLigence, SRB and MTT assay. Than optimum doses of drugs used for advanced analysis. Caspase-3, caspase-9, caspase-12 and p-tau protein levels were investigated after 24 hours post treatment of drugs and A β with Western blot assay. APP, PSEN1 and PSEN2 mRNA levels were measured after 24 hours post treatment of drugs with RT-PCR technique. Also MMP and NO levels were measured at the same time.

Cell viability was decreased by A β treated group significantly ($p < 0.001$). Viability was increased by vildagliptine (250 μ M), saxagliptine (100 μ M) and memantine (100 μ M) comparing to A β treated group significantly $p < 0.001$, $p < 0.01$, $p < 0.001$, respectively. MMP values decreased by A β treatment. Furthermore vildagliptine (250, 100 μ M) and saxagliptine (100 μ M) recovered MMP to nearby control group.

Caspase-3 and caspase-12 protein levels were increased ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively) by A β treated group comparing to control. Vildagliptine decreased caspase-3 and caspase-9 levels comparing to A β treated group ($p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively). Phosphorylated tau protein was increased comparing to control ($p < 0.01$), vildagliptine and saxagliptine decreased p-tau in a dose dependent manner comparing to A β treated group. Memantine also decreased p-tau level comparing to A β treated group ($p < 0.05$).

APP mRNA level was decreased by saxagliptine (200 μ M) comparing to control group. PSEN1 mRNA level was decreased by vildagliptine (250, 100, 50 μ M), saxagliptine (100, 50 μ M) and memantine (100 μ M) comparing to control ($p < 0.01$). PSEN2 mRNA level was decreased by vildagliptine (100 μ M) and saxagliptine (50 μ M) comparing to control.

In this thesis, we investigated the oral anti-diabetic drugs; vildagliptine and saxagliptine, whether they have any effects to above parameters on SH-SY5Y cell line or not first time.

Vildagliptine and saxagliptine decreased the p-tau protein, PSEN1 and PSEN2 mRNA levels which are playing important role in Alzheimer's disease. Caspase-3 and caspase-9 protein levels, play critical role on apoptosis, decreasing by vildagliptine comparing to A β treated group. In addition vildagliptine and saxagliptine protected SH-SY5Y cells against A β toxicity. This effect obtained with real time cell response profiles and MTT assay and for the first time have been showed in this thesis.

Keywords: Vildagliptine, saxagliptine, memantine, amyloid beta, Alzheimer's disease, SH-SY5Y.

İÇİNDEKİLER

DPP-4 İNHİBİTÖRÜ VİLDAGLİPTİN VE SAXAGLİPTİN' İN SH-SY5Y HÜCRELERİNDE KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI	ii
ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
<u>2.1.Demans ve Alzheimer</u>	6
<u>2.1.1.Epidemiyoloji</u>	7
<u>2.1.2.Etiyoloji</u>	8
<u>2.1.3.Nöropatoloji</u>	9
<u>2.1.3.1.Nörofibriler Yumaklar</u>	10
<u>2.1.3.2. Amiloid Plaklar</u>	11
<u>2.1.3.3. Fosforile Tau</u>	12
<u>2.1.3.4. Nörodejenerasyon ve nöron kaybı</u>	13
<u>2.1.3.5. Kolinerjik Yolakta Değişmeler</u>	14
<u>2.1.3.6. Sinaptik Yolakların Deaktivasyonu, Sinaps Kaybı ve Nöroplastisite</u>	15
<u>2.1.4.Alzheimer Hastalığında Genetik Risk Faktörleri</u>	15
<u>2.1.4.1.Amiloid Prekürsör Proteini Geni</u>	16
<u>2.1.4.2.Presenilin 1 Geni</u>	16

2.1.4.3.Presenilin 2 Geni	18
2.2.Alzheimer Hastalığında Tedavi.....	19
2.2.1.Semptomları Giderici Tedavi	20
2.2.2.Yeni Tedavi Yaklaşımları	21
2.2.3.Diyabet ve Alzheimer Hastalığında Ortak Patolojiler	23
2.2.3.1.İnflamasyon.....	23
2.2.3.2.Oksidatif Stres.....	23
2.2.3.3.Vasküler Disfonksiyonlar ve Yol Açtığı Durumlar	24
2.2.3.4.Glukoz Toksisitesi.....	24
2.2.3.5.İnsülin Yetmezliği ve İnsülin Direnci	25
2.2.3.6.Mitokondriyal Disfonksiyon	25
2.2.3.7.ATP Üretimi Üzerine Etkiler	26
2.2.3.8.Mitokondriyal Membran Potansiyeli	26
2.3.Dipeptidil Peptidaz-4 İnhibitörleri	26
2.3.1.Vildagliptin Etki Mekanizması ve Kimyasal Yapısı.....	27
2.3.2.Saksagliptin Etki Mekanizması ve Kimyasal Yapısı	28
2.3.3.Glukagon Benzeri Peptid-1 ve Glukoza Bağımlı İnsülotropik Polipeptid	29
2.4.SH-SY5Y Hücre Morfolojisi ve Alzheimer Modelinde Kullanım Öncelikleri ..	30
2.5.Programlı Hücre Ölümü (Apoptozis) ve Nörodejeneratif Hastalıklarla İlişkisi ..	31
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	32
3.1.Deneylerde Kullanılan Cihazlar	32
3.2.Kimyasal Malzemeler	33
3.3.Hücre Kültürü.....	34
3.4.Sulforhodamine B Deneyi.....	35
3.5.MTT Canlılık Analizi Deneyi	36
3.6.xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Canlılık Analizi	37
3.7.JC-1 Mitokondriyal Membran Potansiyeli Ölçüm Deneyi	38

3.8. Western Blot Deneyi	39
3.8.1. Lowry protein miktar tayini için çözeltiler;	39
3.8.2. Western blot analizi için hazırlanan çözeltiler;	39
3.8.3. Jel Hazırlanması	41
3.8.4. Elektroforetik Yürütme/Elektroforez	42
3.8.5. Transfer	43
3.8.6. Bloklama	43
3.8.7. Birincil antikor ile inkübasyon	43
3.8.8. İkincil antikor ile inkübasyon	44
3.8.9. ECL ile görüntüleme	44
3.8.10. Elde edilen görüntünün analizi	44
3.9. RNA İzolasyonu ve Gerçek Zamanlı-PCR Deneyi	44
3.9.1. RNA İzolasyonu	44
3.9.2. cDNA Sentezi	45
3.9.3. Kantitatif RT- PCR	45
3.10. Nitrik Oksit Ölçüm Deneyi	46
3.11. İstatistiksel Analiz	47
4. BULGULAR	48
4.1. SRB Deneyi Sonuçları	48
4.2. MTT Canlılık Analizi Deneyi	49
4.3. Gerçek Zamanlı Hücre Analizi Deney Sonuçları	50
4.4. Mitokondriyal Membran Potansiyeli Deney Sonuçları	52
4.5. Western Blot Deneyi Sonuçları	53
4.5.1. Kaspaz-3	53
4.5.2. Kaspaz-9	54
4.5.3. Kaspaz12	56
4.5.4. Fosforile tau	57

4.6.qRT-PCR Deneyi Sonuçları.....	58
4.6.1.APP mRNA.....	58
4.6.2.PSEN1 mRNA	59
4.6.3.PSEN2 mRNA	60
4.7.Nitrik Oksit Ölçümü Deney Sonuçları.....	61
5.TARTIŞMA ve SONUÇ	62
6.KAYNAKLAR	68
ÖZGEÇMİŞ.....	81



KISALTMALAR

°C	:Santigrat derece
µL	: Mikrolitre
Aβ	: Amiloid beta
AH	: Alzheimer Hastalığı
AGBAH	: Ailesel geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı
AEBAH	: Ailesel erken başlangıçlı Alzheimer hastalığı
Akt	: Protein kinaz B
ANOVA	: Varyans analizi
APS	: Amonyum persülfat
ATCC	: Amerikan tipi kültür koleksiyonu
BDNF	: Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
BSA	: Sığır serum albumini
BV-2	: Microglial Cell Line
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik asit
DSM-IV	:Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition
DMEM:F12	: Dulbecco'nun modifiye edilmiş eagle besiyeri
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPP-4	:Dipeptidil peptidaz-4
dNTP	: Deoksinükleotit Karışımı
Dsh	: Parçalanmış
EBAH	: Erken başlangıçlı Alzheimer hastalığı
ELISA	: Enzyme linked immunosorbent assay
FBS	: Fetal sığır serum
g	: Gram
GABA	:Gama amino bütirik asit
GSK3β	: Glikojen sentaz kinaz β
GZHA	: Gerçek zamanlı hücre analizi
HSP	: Isı şok proteinleri
kDa	: Kilodalton
kg	: Kilogram
mA	: Miliamper

mg	: Miligram
mm³	: Milimetreküp
mmHg	: Milimetre civa
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik asit
MMP	: Mitokondriyal Membran Potansiyeli
N	: Normalite

NINCDS-ADRDA: National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association

nm	: Nanometre
NMDA	: N-metil D- aspartat
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
O₂⁻	: Süperoksit anyonu
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pg	: Pikogram
PVDF	: Polivinilidenflorür
qRT-PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik Asit
RNAaz	: Ribonükleik Asit Sentaz
RT-PCR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
TBS	: Tris-Buffered Saline
TBST	: Tris-Buffered Saline-Tween
TEB	: Türk Eczacılar Birliği
TEMED	: N,N,N,N'-Tetramethyl-etilendiamin
V	: Volt

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1. Alzheimer hastalığında rolü olan genler ve lokasyon bölgeleri.....	15
Tablo 2.2. Alzheimer hastalığında klinik ve prelinik aşamada olan ilaçlar ve etki mekanizmaları.....	21
Tablo 3.3. Western Blot deneyinde kullanılan primer antikorlar.....	34
Tablo 3.4. cDNA sentezi deneyinin aşamaları.....	45
Tablo 3.5. PCR deneyinde kullanılan karışımın oranları.....	46



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. 1900-2050 yılları arasında A.B.D de gözlenen ve beklenen Alzheimer hastalığı vaka sayısı.....	7
Şekil 2.2. Alzheimer hastalığı nedenlerinden ailesel erken başlangıçlı AH, Ailesel geç başlangıçlı AH, sebebi bilinmeyenler.....	8
Şekil 2.3. Sinir hücresi üzerinde amiloid plaklar ve nörofibriler yumakların görünümü.....	9
Şekil 2.4. Mikrotübül deformasyonu ve nörofibriler yumak oluşmasında gözlenen olaylar.....	11
Şekil 2.5. Tau proteinlerinin fosforilasyonu ve mikrotübül stabilitesindeki rolü.....	13
Şekil 2.6. Amiloid prekürsör proteininin parçalanma bölgeleri.....	16
Şekil 2.7. Erken başlangıçlı ve geç başlangıçlı Alzheimer hastalığında presenilin 1, presenilin 2, Amiloid prekürsör protein ve ApoE nin rolleri.....	17
Şekil 2.8. Presenilin 1'in biyolojik, moleküler ve hücresel işlevleri.....	18
Şekil 2.9. Presenilin gen mutasyonlarına örnekler.....	19
Şekil 2.10. Alzheimer hastalığında tedavi stratejileri.....	20
Şekil 2.11. Vildagliptinin kimyasal yapısı.....	27
Şekil 2.12. Saksagliptinin kimyasal formülü.....	28
Şekil 3.13. SRB deneyi aşamalarından bazı fotoğraflar.....	36
Şekil 3.14. (a)RTCA cihaz ve yazılımı, (b) özet olarak yöntemin esası,(c) hücre indeksi hesaplama formülü.....	37
Şekil 3.15. BSA standart eğrisi.....	41
Şekil 3.16. Proteinlerin elektroforez ile yürütülmesi ile elde edilen jeldeki yürüme görüntüleri.....	42
Şekil 3.17. Elektroforez ve Transfer düzenekleri.....	43
Şekil 3.18. Nitrik oksit deneyinin esasını özetleyen kimyasal reaksiyonlar.....	46
Şekil 4.19. SRB canlılık analizi sonuçları.....	47
Şekil 4.20. MTT deneyi ile elde edilen % canlılık sonuçları.....	49
Şekil 4.21. Vildagliptin (250, 100, 50 µM), saksagliptin (200, 100, 50 µM) ve memantin (100µM) gerçek zamanlı elde edilen hücre indeksi üzerine etkileri.....	50

- Şekil 4.22.** A β (5 μ M) ve A β (5 μ M) varlığında vildagliptin (250, 100, 50 μ M), saksagliptin (200, 100, 50 μ M), memantin (100 μ M)' in gerçek zamanlı elde edilen hücre indeksi üzerine etkileri.....51
- Şekil 4.23.** A β (5 μ M) ve A β (5 μ M) varlığında vildagliptin (250, 100, 50 μ M), saksagliptin (200, 100, 50 μ M), memantin (100 μ M)' in gerçek zamanlı elde edilen hücre indeksi üzerine sırasıyla 24. ve 48. saatteki etkileri.....51
- Şekil 4.24.** Mitokondriyal membran potansiyeli üzerine A β (5 μ M) eklenmiş ve eklenmemiş vildagliptin (250, 100, 50 μ M), saksagliptin (200, 100, 50 μ M) ve memantin (100 μ M) etkileri.52
- Şekil 4.25.** Kaspaz-3 protein ekspresyonu bulguları. a: kontrole göre p<0,05; b: kontrole p<0,01; d:A β grubuna göre p<0,05; f: A β grubuna göre p<0,00154
- Şekil 4.26.** Kaspaz-9 protein ekspresyon sonuçları. a: kontrole göre p<0,05; f: A β grubuna göre p<0,00155
- Şekil 4.27.** Kaspaz-12 protein ekspresyon sonuçları. c: kontrole göre p<0,001.....56
- Şekil 4.28.** p-Tau protein ekspresyon sonuçları. a: kontrole göre p<0,05; d:A β grubuna göre p<0,05.....57
- Şekil 4.29.** Vildagliptin, saksagliptin, memantin ve A β 'nın APP mRNA düzeyi üzerine etkileri. b: kontrole göre p<0,01; d:A β grubuna göre p<0,0558
- Şekil 4.30.** Vildagliptin, saksagliptin, memantin ve A β 'nın PSEN1 mRNA düzeyi üzerine etkileri. b: kontrole göre p<0,01; c: kontrole göre p<0,00159
- Şekil 4.31.** Vildagliptin, saksagliptin, memantin ve A β 'nın PSEN2 mRNA düzeyi üzerine etkileri. b: kontrole göre p<0,0160
- Şekil 4.32.** Vildagliptin, saksagliptin, memantin ve A β 'nın nitrik oksit düzeyi üzerine etkileri. c: kontrole göre p<0,001; f: A β grubuna göre p<0,00161

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Alzheimer hastalığı (AH) düşünme, konuşma, çevreye uyum, yargılama, anlama, öğrenme ve hafıza fonksiyonlarında gerileme ile karakterize; özellikle yaşlı nüfusta insidansı yüksek olan bir hastalıktır. Tüm demans olgularının %50-70 'ini AH oluşturmaktadır. AH'nın başlıca semptomları arasında hafıza kaybı, düşünme, bilişsel fonksiyonlarda gerileme ve hastalığın ilerleyen dönemlerinde günlük yaşamsal aktivitelerin dahi yerine getirilmesinde yetersizlikler yer almaktadır (1).

AH'nın 65 yaşından sonra yaşlanma ile paralel artış gösterdiği ve her 5 yılda bir bu riskin katlandığı gösterilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (World Health Organization, WHO) 2012 verilerine göre dünyada yaklaşık 35,6 milyon Alzheimer hastası vardır. Bu rakamın 2030 da iki katına çıkması beklenirken, 2050 de 115,4 milyon civarı Alzheimer vakası beklenmektedir. Amerika Birleşik Devletlerinde 2016 verilerine göre 5,4 milyon Alzheimer hastası vardır ve 2050 de bu rakamın 13,8 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir ve her yıl 1 milyon kadar kişiye yeni Alzheimer teşhisi konulacağı öngörülmektedir (2). WHO, Türkiye nüfusunun 1997 de %4,5 inin 65 yaş üzeri olduğunu ve bu rakamın 2050 de %20 leri geçeceğini bildirmiştir (3). TÜİK verilerine göre ülkemizde AH'dan hayatını kaybeden yaşlıların oranı 2010 yılında %2,7 iken bu oran 2014'te yılında %4'e yükselmiştir. AH'dan ölen yaşlıların oranı 2010 yılında erkeklerde %2,2, kadınlarda %3,3 iken; bu oranlar 2014 yılında sırasıyla %3,2 ve %4,7'ye ulaşmıştır. Yaşlı nüfusun artmasıyla AH ve orta dereceli kognitif bozukluk da artmaktadır.

AH'nın patolojik tanısındaki güçlüklerden dolayı, bulguların varlığı ve nöroanatomik dağılımları da önemlidir. Beyinde gözlenen nörofibriler yumaklar, amiloid plaklar, fosforile tau, nörodejenerasyon ve nöron kaybı, kolinerjik yolakta değişmeler ve sinaptik yolaktaki disfonksiyonlar AH'da öne çıkan patolojilerdir (1).

FDA (Food and Drug Administration) ve ülkemizde de Sağlık Bakanlığı tarafından onaylanmış AH tedavisinde endike ilaç yalnızca 5 tanedir. Bunlardan dördü kolinestereaz inhibitörü (rivastigmin, galantamin, takrin, donepezil) diğeri de N-metil D- aspartat (NMDA) inhibitörü (memantin) ilaç kategorisindedir. Bu ilaçların tümü de hastalığın radikal tedavisinde henüz başarı sağlayamamıştır. Ayrıca monoamin oksidaz tip-B inhibitörü Parkinson tedavisinde kullanılan selejilin de AH'de tedaviye yardımcı olarak kullanılabilir (1).

Memantin yarışmasız NMDA reseptör antagonistidir ve bu reseptörlere düşük-orta dereceli afinite gösterir ancak yüksek konsantrasyonda sinaptik plastisiteyi inhibe edebilir. Memantin glutamat aracılı eksitotoksisteden nöronları koruduğu bunu yaparken de kognitif fonksiyon için gerekli fizyolojik NMDA reseptör aktivasyonunu önlemediği düşünülmektedir. Ancak diğer antagonistler gibi yüksek konsantrasyonlarında sinaptik plastisiteyi inhibe edebilir. Asetilkolinesteraz inhibitörleri ile karşılaştırıldığında memantin sadece hafif-orta demanslarda değil şiddetli evrede de yararlı olabileceği düşünülmektedir (4, 5).

Kolinerjik nöronlar AH'nın patojenezinde önemli rol üstlenmektedir. Eğer kolinerjik kayıp varsa iyi fark edilmeli ve tedavi stratejisi kolinerjik aktivitenin artırılmasına yönelik olmalıdır. Kolinerjik nöronlar kortikal aktivite, bilişsel fonksiyonlar, öğrenme, bellek gibi hayati fonksiyonları yerine getirmede rol oynamaktadır (6). AH'da kolinerjik sistemde; kolin asetil transferaz eksikliği, kolinin sinaptik boşluktan geri alımında azalma, asetilkolin sentezinde azalma ve bunlara ek olarak asetilkolin reseptörlerinde değişimler söz konusudur (7).

AH'nın tedavisinde FDA ve Sağlık Bakanlığımızca onaylı ilaçlardan rivastigmin, donepezil ve galantamin etkilerini kolinerjik sistemde göstermektedir. Hastalığın patojenezinde rol oynayan amiloid beta ($A\beta$), p-Tau, nörofibriler yumaklar gibi parametreleri doğrudan hedef alan ilaçlar henüz tedaviye sunulmamıştır. Ancak NMDA antagonisti memantin $A\beta$ 'yi düşürdüğüne dair *in vitro* ve *in vivo* prelinik çalışmalar mevcuttur (8, 9).

AH' da beyinde mikrogial aktivasyon ve enflamatuvar yanıtın arttığı *in vivo* prelinik çalışmalarda gösterilmiştir (10). Klinik olarak ise 2015 yılında Alzheimer hastası olan ve sağlıklı kişilerin katıldığı bir çalışmada; AH olan kişilerde mikrogial aktivitenin arttığı

gösterilmiştir. Aynı çalışmada AH olan kişilerde glukoz metabolizmasında düşme de rapor edilmiştir (10).

A β (amiloid beta) 40'ın nöron kaybı, nöron ve nöritlerin dejenerasyonunu da kapsayan nörodejenaratif etkilerini değerlendirmek için yapılan bir *in vivo* çalışmada A β sıçan beynine enjekte edildiğinde nörotoksik etkiler oluşturduğu görülmüştür. Ayrıca A β 40, A β 42 ve A β 25-35 gibi farklı A β fragmanlarının sıçan ve farelerde öğrenme ve belleği bozduğu ve nörotoksik etkileri olduğu bildirilmiştir (11, 12).

Nöron hücrelerinin programlı ölümü AH' da görülen ve hastalığın tedavisi için önlenmesi gerekenler arasında ilk sıralardadır. Programlı hücre ölümü; oksidatif stres, glutamat toksisitesi, büyüme faktörlerinin azalması, genetik mutasyonlar gibi faktörlerin etkisiyle başlatılır. Hücrede Ca⁺⁺ iyonlarının aşırı birikmesi sonucu proapoptotik protein-4 (PAR-4) aktive olur ve diğer proapoptotik bir protein olan Bax'ın mitokondri membranında apoptoz sürecini başlatmasına neden olmaktadır (13). Mitokondri ise sitokrom c salgılar. Sitokrom c kaspaz-9 u, kaspaz 9 da kaspaz-3 ü aktiveleştirerek apoptoza neden olur (13, 14). Kaspaz-12 ise endoplazmik retikulumda meydana gelen stresden dolayı aktive olur ve hücreyi apoptoza sürükleyebilir (15). Glutamat reseptör proteinleri de hücre içine Ca⁺⁺ girişini ve kinazların aktivitesini arttırarak proapaptotik olarak rol oynayabilmektedir (14).

Mitokondriyal disfonksiyon, hücreyi apoptoza kaspazların tetiklemesi ile götürebilmektedir. Hücre içine aşırı miktarda kalsiyum girişi olursa nöronal nitrik oksit sentetaz (nNOS) ve indüklenebilir NOS miktarı artar ve bunun sonucu olarak da kaspaz 3 proteini aktive olur ve apoptoz süreci başlar. Alzheimer hastalarının beyinlerinde mitokondri sayısında azalma ve mitokondri organellerinin morfolojik yapısında normale göre değişimler gözlenmiştir (16).

Nitrik oksit (NO⁻) hücreler arası ve hücre içi mesaj yolağında, immünitede ve vasküler kas kasılmasında önemli bir rol oynayan kısa yarı ömürlü ve kolay difüze olabilen bir moleküldür. NO⁻ 3 farklı enzim tarafından (iNOS, nNOS, eNOS) sentezlenir. NO⁻ öğrenme ve belleğin sürdürülebilmesinde, nöronal plastisitede de rol oynamaktadır (17).

Dipeptidil peptidaz-4 (DPP-4), membrana bağlı bir serin dipeptidazdır. DPP-4, glukagon benzeri polipeptid 1 (GLP-1) ve gastrik inhibitör polipeptidin (GIP) yıkılmasını sağlar. Adenozin deaminaz kompleks protein-2 ve CD26 (cluster of differentiation 26) olarak da

bilinen DPP-4, DPP-4 geni tarafından kodlanmaktadır (18). Vildagliptin güçlü ve seçici DPP-4 inhibitörü bir ilaç olup oral antihiperlipidemik olarak diyabet tedavisinde kullanılmaktadır. Vildagliptin DPP-4 enzimini inhibe ederek GLP-1 ve GIP yıkılmasını önler (19). Saksagliptin FDA tarafından 2010 yılında onaylanan ikinci oral dipeptidil-peptidaz-4 (DPP-4) inhibitörüdür ve tip 2 diyabet hastalığında kullanılmaktadır. Saksagliptin glukoza bağımlı olarak insülin salıverilmesini artırır ve dolaşımdaki glukagon düzeyinin azalmasına neden olur (20).

Epidemiyolojik çalışmalarda tip 2 diyabet ile AH arasında bir bağlantı olduğu rapor edilmiştir (21). DPP-4 inhibisyonu GLP-1 ve GIP yıkımını azaltarak bu inkretin hormonların düzeylerini artırmaktadır. GLP-1 ve GIP reseptörleri beyinde de eksprese edilmektedir. GLP-1 ve GIP analoglarının beyinde $A\beta$ kaynaklı sinaptik plastisite azalmasına karşı plastisiteyi geri artırma yönünde etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Ayrıca GLP-1 ve GIP'in sıçanlarda nöronal kök hücre proliferasyonunu artırıcı etkisi olduğu bildirilmiştir (22).

Bu tez çalışmasında 4 yaşındaki bir kız çocuğunun kemik iliğinden elde edilen ve daha alt klonları elde edilerek nöron hücresi ile asetilkolinergik, adenozerjik ve glutamerjik aktiviteler bakımından benzer özellik taşıyan ve *in vitro* birçok çalışmada nöron hücresi morfolojisi ve anatomisi bakımından benzer özellik gösterdiği için kullanılan ticari SH-SY5Y hücreleri kültür edilmiştir. Öncelikle vildagliptin ve saksagliptinin SH-SY5Y hücreleri üzerinde logaritmik konsantrasyon taraması yapılmıştır. Daha sonra ise xCELLigence deneyi ile $A\beta$ toksisitesine karşı farklı konsantrasyonlarda vildagliptin ve saksagliptinin hücre indeksine olan etkisi gerçek zamanlı olarak kaydedilmiştir. Hücre canlılığı Alzheimer hastalığında çok önemli olan bir parametredir ve canlılığı koruyucu etki hastalığın ilerlemesi açısından kayda değer bir faktördür.

Memantin, vildagliptin ve saksagliptinin SH-SY5Y hücrelerinde kaspaz-3, kaspaz-9, kaspaz-12 ve fosforile tau (p-tau) 'yu nasıl etkilediği western blot deneyi ile semi kantitatif olarak tespit edilmiştir. Ayrıca amiloid prekürsör protein (APP), PSEN1 ve PSEN2' nin mRNA düzeyinde ifadeleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile incelenmiştir. Memantin, vildagliptin ve saksagliptinin mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) ve NO üzerine etkisi de floresan ışımının multifonksiyonel mikropate okuyucu ile okunması ile tespit edilmiştir.

Bu tezde AH tedavisinde 2003 yılından beri NMDA antagonisti olarak kullanılan ve hastalığın patolojisinde rol oynayan p-tau ve $A\beta$ gibi parametreler üzerine de etkileri olduğu gösterilen memantin ile sırasıyla 2009 ve 2011 yılında DPP-4 inhibitörü olarak diyabet tedavisinde kullanıma giren vildagliptin ve saksagliptinin yukarıda anlatılan parametreler üzerinden AH yolağındaki etkisi ve etki mekanizması araştırılmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Demans ve Alzheimer

Demans terimi latince zihin anlamına gelen “mens” kelimesinin önüne bir olumsuzluk eki getirilmesiyle oluşturulmuştur ve beyni etkileyen bozuklukların neden olduğu belirtiler bütünü tanımlamaktadır. Demans; hafıza, konuşma, düşünme, çevreye uyum, yargılama, anlama, öğrenme ve hesaplama gibi bilişsel fonksiyonlarda gerileme ile karakterize bir durumdur (23). Demansın en sık görülen formları Alzheimer hastalığı (AH), vasküler demans, Lewy cisimciği hastalığı ve ön şakak demansıdır.

1906 yılında Alman bilim adamı Alois Alzheimer'in adını verdiği AH'nın patolojik karakteristikleri olarak kabul edilen beyinde amiloid beta ($A\beta$) plakları ve nörofibriler yumakları (NFY) ilk defa postmortem beyinde tanımlamıştır (24). Alzheimer, 51 yaşında ölen hastasında 5 yıl boyunca ilerleyici hafıza kaybı, halüsinasyon, delüzyon, konuşma ve davranış bozuklukları gözlemlemiştir (25).

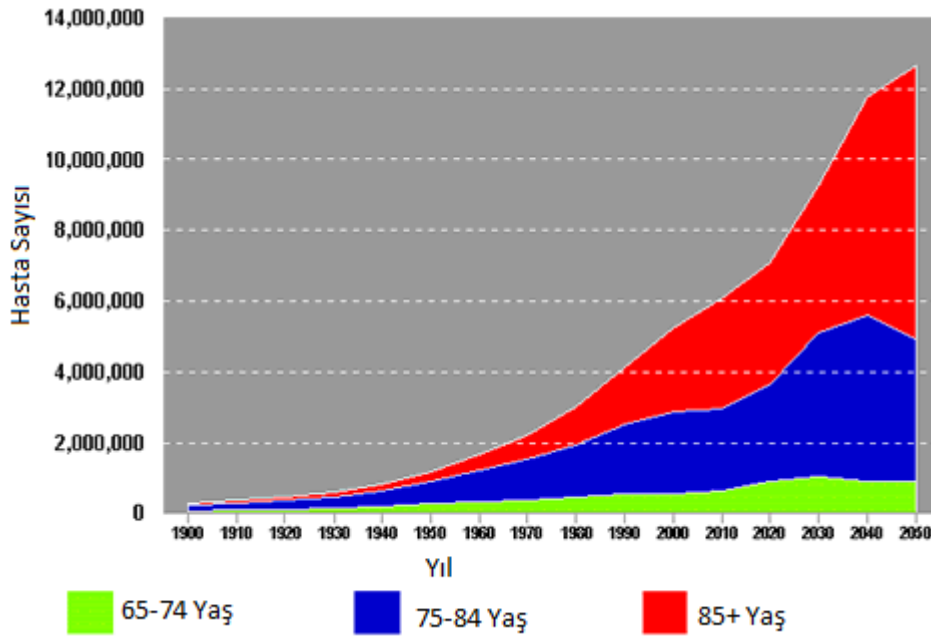
AH düşünme yeteneğinin kaybı olarak da ifade edilen yaşlılık demansının en sık görülen sebebidir. Tüm demans olgularının %50-70 'ini Alzheimer hastalığı (AH) oluşturmaktadır. AH'nın başlıca semptomları arasında hafıza kaybı, düşünme ve bilişsel fonksiyonlarda gerileme ve hastalığın ilerleyen dönemlerinde günlük yaşamsal aktivitelerin dahi yerine getirilmesinde yetersizlikler yer almaktadır (23). Erken (65 yaş altı) ve geç (65 yaş üstü) başlangıçlı olmak üzere iki AH formunda da beyinde $A\beta$, p-tau proteini gibi moleküllerin birikmesi, ayrıca kronik oksidatif strese maruziyet, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, nörofibriler yumakların birikmesi, hormon dengesinde bozulmalar, enflamasyon, kalsiyum miktarında dengesizlikler ve genetik bazı parametrelerin rol oynadığı bildirilmiştir (26).

AH'nın etiolojisi tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte genetik ve çevresel etmenlerin rolü hastalığın ortaya çıkmasında önemli bir yerdedir (27). İlerleyici ve yaygın

bir nörodejeneratif hastalık olmasına rağmen henüz ilerlemeyi önleyici ve patolojik tabloyu geri çeviren etkili bir radikal tedavi bulunamamıştır.

2.1.1. Epidemiyoloji

AH' nın 65 yaşından sonra yaşlanma ile paralel artış gösterdiği ve her 5 yılda bir bu riskin katlandığı gösterilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (World Health Organization, WHO) 2012 verilerine göre dünyada yaklaşık 35,6 milyon Alzheimer hastası vardır. Bu rakamın 2030 da iki katına çıkması beklenirken, 2050 de 115,4 milyon civarı Alzheimer vakası beklenmektedir (23). 2016 verilerine göre Amerika Birleşik Devletlerinde (A.B.D) 5,4 milyon Alzheimer hastası vardır ve 2050 de bu rakamın 13,8 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir ve her yıl 1 milyon civarı kişiye yeni Alzheimer teşhisi konulacağı öngörülmektedir (2).



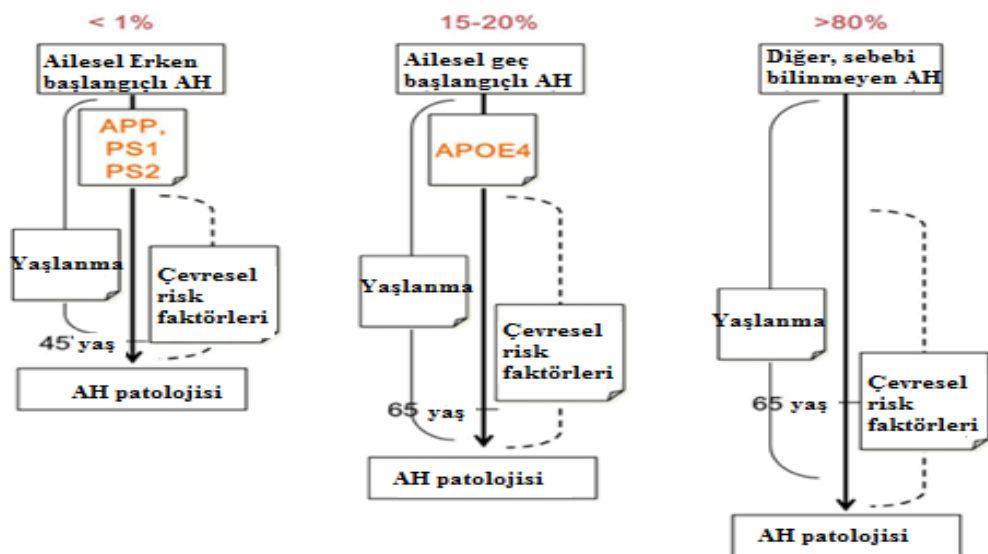
Şekil 2.1.1900-2050 yılları arasında A.B.D de gözlenen ve beklenen Alzheimer hastalığı vaka sayısı (2).

TÜİK verilerine göre ülkemizde AH'dan hayatını kaybeden yaşlıların oranı 2010 yılında %2,7 iken bu oran 2014'te yılında %4'e yükselmiştir. AH'dan ölen yaşlıların oranı 2010 yılında erkeklerde %2,2, kadınlarda %3,3 iken; bu oranlar 2014 yılında sırasıyla %3,2 ve %4,7'ye ulaşmıştır (28) .

2.1.2. Etiyoloji

AH patolojisinde NFY, $A\beta$ ve senil plakların saptanması kesin tanı için yeterli değildir. Çünkü bu parametreler hem fizyolojik yaşlanmada, hem de AH dışında diğer dejeneratif hastalıklarda da görülebilmektedir. Bunların yanı sıra nöron ve sinaps kayıpları, nöritlerde (aksonal ve dendritik) morfolojik değişiklikler, kortikal kolinerjik aktivite ve diğer nörotransmitter sistemlerinde görülen kayıplar AH'nın nedenlerini oluşturmaktadır (23).

AH; mendelyan kalıtıma uygun genetik geçişli tiplerinin yanında, hastalık yolağındaki birçok etkenin doğrudan ve dolaylı olarak etkilerinin olması sebebiyle kompleks bir hastalıktır. AH'nın klinik tanısı için yayınlanmış olan ve bugün yaygın biçimde kullanılan NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association) ve DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition) kıstaslarına göre hastalığın semptomları arasında bellek bozukluğu, afazi, öğrenilmiş davranışları yapmada gerileme, algılamada bozukluk bulunmaktadır (29). Son yıllarda hastalık patojenezini aydınlatmaya yönelik birçok çalışma yapılmış ve tüm genom analizleriyle aday genler bulunmaya çalışılmıştır. AH genetik açıdan çeşitlilik gösteren poligenetik bir hastalıktır. PSEN1, PSEN2 ve APP genlerindeki mutasyonlar hastalığın otozomal dominant (OD) geçişinden sorumludur (30).



Şekil 2.2. Alzheimer hastalığı nedenlerinden ailesel erken başlangıçlı AH, Ailesel geç başlangıçlı AH, sebebi bilinmeyenler (31)

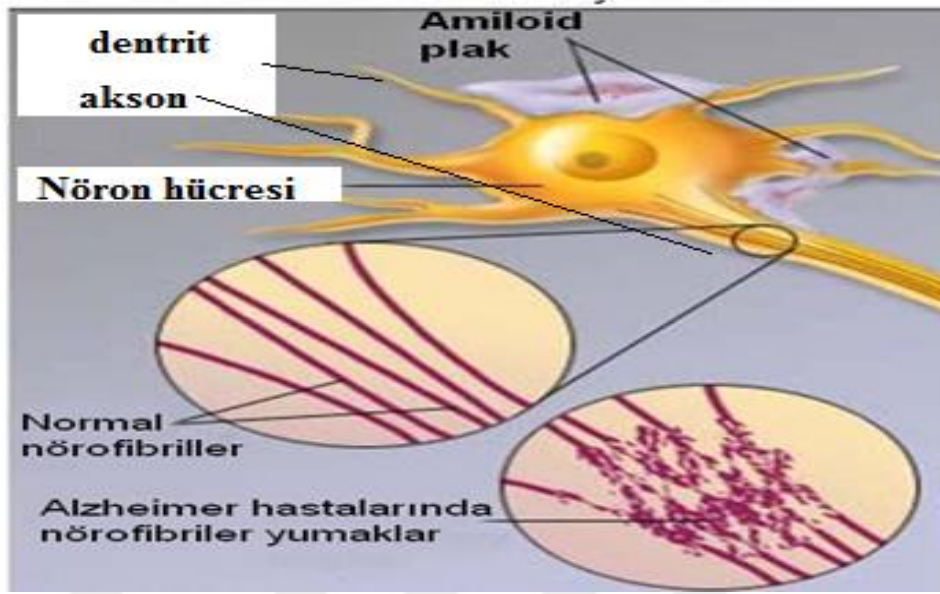
Cinsiyet AH' da tartışmalı bir risk faktörüdür. AH prevalansının kadınlarda erkeklere göre daha fazla olduğu yönünde bildirilen epidemiyolojik çalışmalar vardır (32). AH riskinin kadınlarda erkeklerden daha yüksek olmasının nedeni kadınların ömürlerinin erkeklere göre daha uzun olmasından kaynaklanabilir. Bununla birlikte beyinde nörotrofik faktör olarak da işlev gören östrojenin kadınlarda menopoz sonrası üretilmemesine karşın, erkeklerde yaşam boyunca testosteronun östrojene çevrilmesi, AH'nın erkeklerdeki prevalansının az olmasının sebebi olabilmektedir. Epidemiyolojik çalışmalarda post-menopozal dönemde östrojen replasmanı kullanan kadınlarda kullanmayanlara göre demans prevalansının daha düşük olması bu tezi desteklemektedir (32).

2.1.3. Nöropatoloji

AH da hipokampüsten başlayan, pariyetal ve frontal loblara doğru ilerleyen ve son aşamada tüm beyni etkileyen atrofi ve nöron kaybı görülür. Fizyolojik yaşlanmada amiloid plak hipokampusta bulunurken, AH da neokortekste nörofibriler yumaklar görülmektedir (33).

AH'da klinik bulgular tanı ve tedavide önemli bir yer tutsa da tek başına tedavi stratejisini belirlemede yeterli değildir. Aynı zamanda bulguların nöroanatomik dağılımları ve saptanan düzeylerine bağlı klinik değerlendirmeler de göz önünde bulundurulur. Nörofibriler yumaklar, amiloid plaklar, p-tau, nörodejenerasyon ve nöron kaybı, kolinerjik yolakta değişmeler ve sinaptik yolaktaki disfonksiyonlar AH'da öne çıkan patolojilerdir (24).

Nöron iskeletinin sağkalımı açısından kritik role sahip tau proteini, nöroplasisitede de görev almaktadır. Tau'nun hiperfosforile olması nörodejenerasyona ve patolojinin gelişmesine neden olabilmektedir (34).

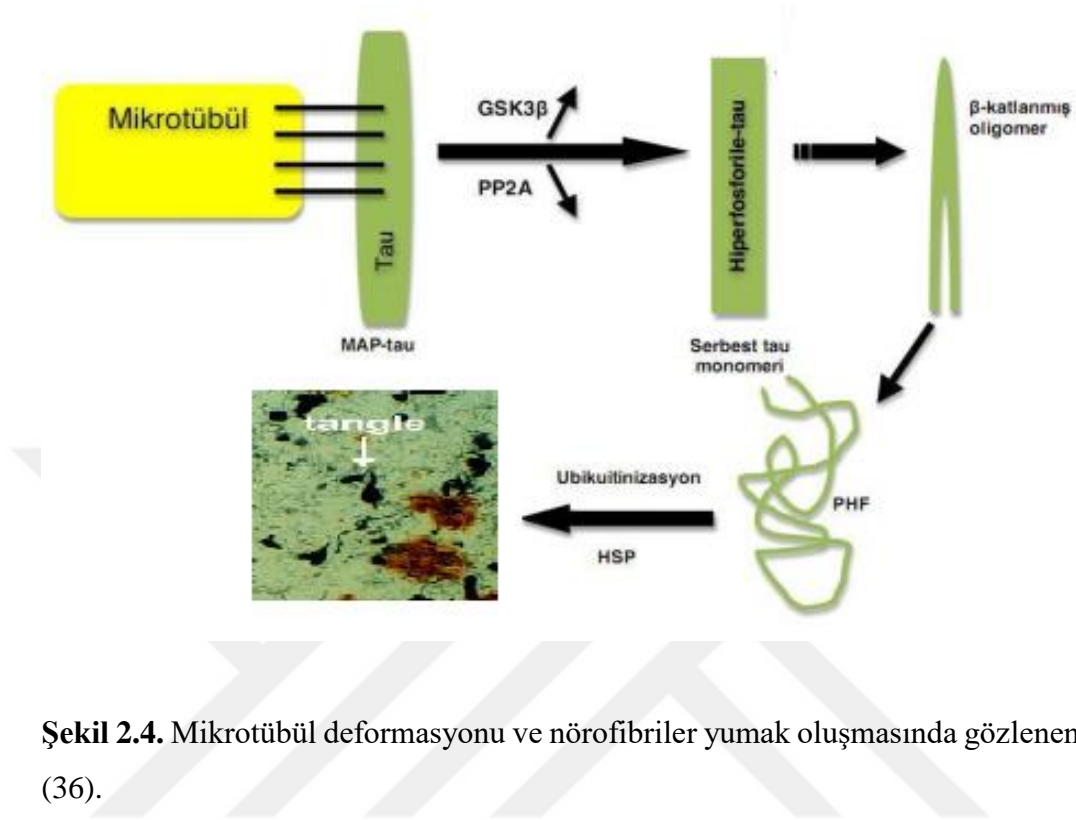


Şekil 2.3. Sinir hücresi üzerinde amiloid plaklar ve nörofibriler yumakların görünümü (33)

2.1.3.1. Nörofibriler Yumaklar

AH'da nöron kaybı entorinal korteksten başlar ve limbik sistemi terkettiğinde superior temporal sulkusta tespit edilebilir. Nöron kaybı hastalıkta ilerleyici biçimde devam ederken genel anlamda NFY artışı ile nöron sayılarının azalması arasında anlamlı bağlantı saptanmıştır. Ancak nöron ölümü tek başına NFY'den sorumlu tutulamaz. Subkortikal çekirdekler gibi NFY'lerin bulunduğu bölgelerde nöron kaybı olmayabilirken, NFY'lerin az sayıda olduğu ya da hiç bulunmadığı bölgelerde de ağır nöron kaybı görülebilmektedir (35).

Mikrotübüle bağlı olan tau proteini hiperaktif kinazlar (özellikle glikojen sentaz kinaz 3β (GSK3 β)) ve/veya hipoaktif fosfatazların (özellikle protein fosfotaz 2A (PP2A)) varlığında hiperfosforile olarak mikrotübüllerden serbestlenir. Serbest tau patolojik olarak katlanarak oligomerleşir. Oligomerler çift sarmallı ipliklere (*paired helical filament*, PHF), PHF ise ısı şoku proteinleri (*heat shock proteins*, HSP) ve proteozomal ubiquitinizasyon sistemi aracılığıyla NFY'lere hapsolurlar. Çift sarmallı iplikler ısı şoku proteinleri ve başlıca ubiquitin proteozom sistemlerinin devreye girmesiyle giderek intranöronal NFY'lere dönüşürler. Hücre ölümüyle ortaya çıkan ekstraselüler NFY'ye "hayalet yumak" adı verilir. Nörofibriler yumaklardan hayalet yumağa geçişin uzun bir sürede olduğu düşünülmektedir (36).



Şekil 2.4. Mikrotübül deformasyonu ve nörofibriler yumak oluşmasında gözlenen olaylar (36).

2.1.3.2. Amiloid Plaklar

$A\beta$ 21. kromozomda kodlanan bir transmembran protein olan APP' den proteolitik kesimi ile oluşur. $A\beta$ beyinde fizyolojik şartlarda üretilen ve patolojik formlarına nasıl dönüştüğü henüz tam olarak kanıtlanmamış uzun zincirli bir peptittir. $A\beta$ ' nın fibril, monomer ve oligomer formları normal fizyolojik şartlarda denge halindedir. Ancak oligomer formu diğerlerine göre daha nörotoksik olduğundan oligomer formunda oluşabilecek bir artış nörodejenerasyonla sonuçlanabilmektedir (37). $A\beta$ 'nın beyine akut enjeksiyonu ya da devamlı infüzyonu öğrenme, bellek bozulması ve nörodejenerasyona neden olduğu prelinik çalışmalarda gösterilmiştir (12). Ayrıca Alzheimer hastalarının beyinlerindeki nöropatolojik değişikliklere benzer şekilde mikroglial aktivasyon ve enflamatuvar yanıt gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda da $A\beta$ 40, $A\beta$ 42 ve $A\beta$ 25-35 gibi farklı $A\beta$ fragmanlarının sıçan ve farelerde öğrenme ve belleği bozduğu ve nörotoksik etkileri olduğu gösterilmiştir. $A\beta$ fragmanlarının nörotoksitesinin yaşa bağlı olduğu da

bildirilmiştir (11, 12). AH'deki amiloid plaklar farklı morfoloji gösterebilir ancak ana bileşeni amiloid beta peptittir.

APP knock-out farelerde önemli bir morbidite ya da mortalite gözlenmemekle birlikte, APP'nin nörotrofik ve nöroprotektif aktivitesi olabileceğini belirten çalışmalar mevcuttur (38). 770 aminoasit içeren APP'nin hücre içi karboksi ucu, membran içerisinde seyreden 28 amino asitlik bölümü ve hücre dışı amino ucu vardır. $A\beta$, APP'nin membran içi 28 amino asitlik bölgesini de içeren bir parçasıdır. APP bir dizi proteolitik enzimle kesilerek metabolize edilir. Alfa sekretaz, APP'yi keser ve bu kesim sonucunda sAPP adı verilen hücre-dışı yeni bir protein meydana gelir. Bu molekülün hücre kültürlerinde nöronlar üzerine nörotrofik olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir (34, 39). APP'yi amino ucundan β -sekretaz ve karboksi ucundan γ -sekretaz böler ve ürün olarak $A\beta$ oluşur.

SH-SY5Y hücreleri üzerinde yapılan bir *in vitro* çalışmada; $A\beta$ 1-42 oligomerleri hücre canlılığını konsantrasyona bağımlı olarak uygulama sonrası 24. saatte düşürmüştür. Bu çalışmada $A\beta$ 1-42 oligomerleri 25 μ M olarak hücrelere uygulanmış ve hücre canlılığını kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde %50 civarında düşürmüştür (40)

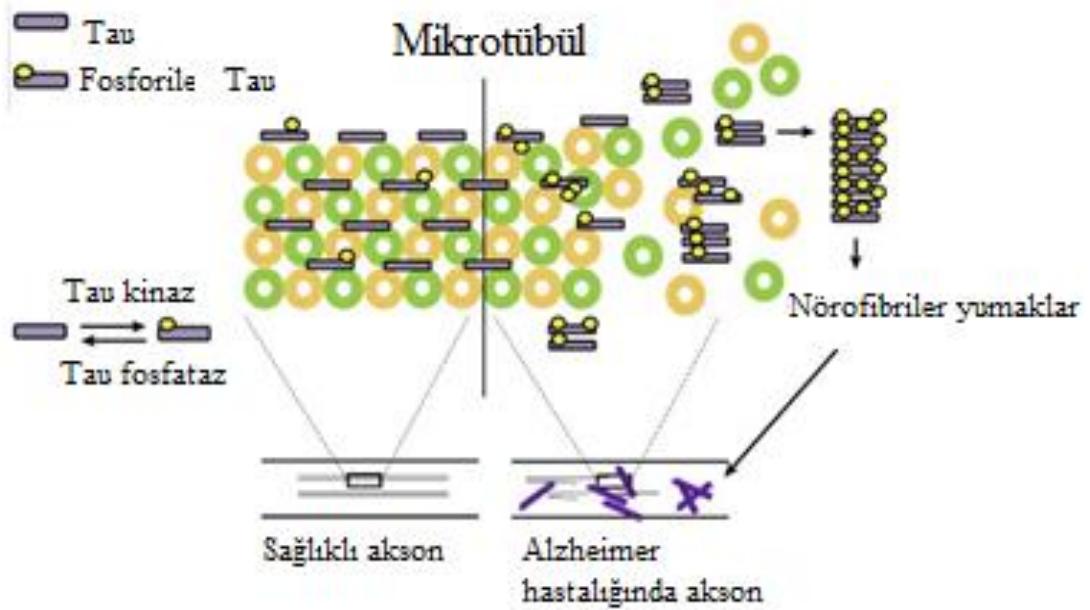
2.1.3.3. Fosforile Tau

Mikrotübül stabilitesinin sağlanması ve bu stabilitenin devamında tau proteini; aksonal morfoloji, büyüme ve polaritede kritik bir rol oynar (41). Birçok fosforillenme bölgesi içeren tau proteini hiperfosforile olduğunda mikrotübüllere yeterli oranda bağlanamaz ve birikip agregatlar halinde PHF lere dönüşür ve ardından nörodejenerasyon sürecine katkıda bulunur (42).

Transgenik farelerde lityumun GSK3 α ve GSK3 β ' yi inhibe ettiği ve tau patolojisini azalttığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada araştırmacılar fosforile (Ser-9) GSK3 β ve fosforile (Ser-473) Akt düzeylerini de ölçmüş ve lityumun bu proteinlerin ekspresyonunu azalttığını tespit etmişlerdir (43, 44). Fosfodiesteraz enzim inhibitörü aktivitesi olan kafein ise GSK3 β yi inhibe ederek $A\beta$ transgenik hayvanlarda $A\beta$ üretimini azaltmaktadır (45). Bu çalışmaları yüksek miktarda kafein tüketen kişilerde AH insidansının düşük bulunduğu yönünde bildirilen epidemiyolojik araştırmalar desteklemektedir (46).

Prelinik çalışmalarda intranasal insülin kullanımının sıçanlarda $GSK3\beta$ aktivitesini azalttığı gösterilmiş ve aynı zamanda fosforile tau'nun da azaldığı da gözlenmiştir (47). 2012 de yürütölen bir klinik çalışmada intranasal insülin kullanımının kognitif fonksiyonları olumlu etkilediğini rapor etmiştir (48).

İkincil mesajcıların uyarımı post sinaptik nörondaki tüm intraselöler proteinleri olduğu gibi tau'yu da protein kinazların aktivitesiyle fosforile eder ve fosforile tau mikrotübölden ayrılır. Tau proteini, nöronal aktivitenin devamında fosforile formundan fosfatazlar aracılığıyla defosforile edilmelidir. Çünkü yeniden mikrotüböle bağlanarak mikrotüböl stabilitesine katkıda bulunabilmesi için defosforile halde olmalıdır (34). Bağlanmamış hiperfosforile tau monomerleri fiziksel durumlarını değiştirerek kendi üzerlerine katlanırlar (patolojik katlanma) ve toksik oligomere dönüşörlö. Tau oligomerleri bir sonraki aşamada yine toksik çözünemeyen çift sarmallı ipliklere polimerize olurlar ve sonrasında HSP ve başlıca ubikutin proteozom sistemlerinin devreye girmesiyle giderek intranöronal NFY'lere dönüşörlö (41).



Şekil 2.5. Tau proteinlerinin fosforilasyonu ve mikrotüböl stabilitesindeki rolü (41)

2.1.3.4. Nörodejenerasyon ve nöron kaybı

AH da nörodejenerasyon ve nöron kaybı hastalığın gelişmesinde hem nedendir hem de $A\beta$ birikimi (49), p-Tau artışı (50), nörofibriler yumaklar (35), apoptozda rol oynayan

peptidlerin artışı (51), glukoz toksitesi (52) gibi parametrelerin oluşturduğu sonuçtur. Nörodejenerasyon ve nöron kaybına neden olan yukarıda sayılan parametreler tezin diğer bölümlerinde başlıklar halinde ele alınmıştır.

2.1.3.5. Kolinerjik Yolakta Değişmeler

AH'da kolinerjik nöronlar ana nörotransmitter sağlayıcı rol üstlendikleri için hastalığın patojenezinde kolinerjik kayıp iyi fark edilerek tedavi stratejisi ona göre yürütülmelidir. Bu nöronlar kortikal aktivite, bilişsel fonksiyonlar, öğrenme, bellek, uyku-uyanıklık döngüsü gibi hayati fonksiyonları yerine getirmede rol oynamaktadır (6). AH'da kolinerjik sistemde; kolin asetil transferaz eksikliği, kolinin sinaptik boşluktan geri alınımında azalma, asetilkolin sentezinde azalma ve bunlara ek olarak asetilkolin reseptörlerinde morfolojik değişmeler söz konusudur (7).

Hipokampus ve neokortikal yolakta eksitator olarak NMDA reseptörleri üzerinden uyarıcı rol oynayan glutamat; kognisyon, öğrenme ve bellek üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. AH'da ekstraselüler sıvıda glutamat artışı meydana gelmekte ve bu artışın da eksitotoksositeye neden olduğu varsayılmaktadır (53). Bozulmuş insülin sinyali ile birlikte mitokondriyal disfonksiyon ve reseptör anomalileri glutamatın fizyolojik konsantrasyonda bile eksitotoksosite göstermesine neden olabilmektedir (54).

Gama amino bütirik asit (GABA), histamin ve serotonin sistemindeki değişmeler de Alzheimer patolojisine neden olmakta, tedavi ise bu nörotransmitterlerin modülasyonu ile ancak semptomatik olabilmektedir (55).

FDA tarafından 4 adet asetilkolin esterase (AChE) inhibitörü ilaç (takrin, donepezil, rivastigmin, galantamin) onay almış ve asetilkolin yıkımını inhibe ederek AH tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak bu ilaçlardan takrin hepatotoksik olduğu için kullanımı kısıtlıdır (56). Kolinerjik transmisyon aynı zamanda nörojenezde de rol oynamaktadır ve klinik çalışmalarda ve deneysel hayvan araştırmalarında asetilkolin esterase inhibitörü ilaç kullanımının oksidatif stresi azalttığı bildirilmiştir (57).

Doğal bir alkaloid olan ve *Huperzia serrata* dan elde edilen huperizin A asetilkolin esterase inhibitörü etkisinin yanı sıra APP metabolizması üzerine de etkili bulunmuş ve nöroprotektif etkisinin olabileceği rapor edilmiştir (58).

2.1.3.6. Sinaptik Yolakların Deaktivasyonu, Sinaps Kaybı ve Nöroplastisite

Sinaps kaybı, kortikal biyopsi örneklerinde klinik demans vakalarında, nöron kaybından daha kuvvetli ilişki gösteren yapısal değişikliklerin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Sinaptofizin gibi sinaptik proteinlerin miktarlarının da AH ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Primer hasarın özellikle de intraselüler çözülebilir $A\beta$ oligomeri aracılığıyla sinapslarda olması ve bozukluğun retrograd olarak hücre gövdesine taşınarak, NFY oluşumu ve sonuçta hücre ölümüne yol açtığı düşünülmektedir (59-61).

Apo-E'nin nöronal plastisite, yenilenme ve onarımda rol oynadığı, bu işlevlerde $\epsilon 4$ allelinin, $\epsilon 2$ ve $\epsilon 3$ allellere göre daha başarısız olduğuna ilişkin kanıtlar da mevcuttur. Kafa travması, serebrovasküler hastalık gibi beyin hasarlarından sonra $\epsilon 4$ taşıyıcıları daha kötü prognoz gösterirler. APOE $\epsilon 4$ varlığı aynı zamanda, AH patolojisine katkıda bulunabilecek hücre iskelet bozuklukları, düşük glukoz kullanımı, mitokondriyal disfonksiyonlar ile de ilişkilidir (62, 63).

2.1.4. Alzheimer Hastalığında Genetik Risk Faktörleri

AH karmaşık bir hastalıktır ve farklı kromozomlarda bulunan birçok gen hastalığın seyrinde rol oynamaktadır. Moleküler tanı koymada AH'da rolü olan genlerin araştırılması ve yeni genlerin tanımlanması önemli bir yer tutmaktadır. Çünkü nörodejenerasyon ve hastalığın semptomlarının gelişmesinde bu genlerin kodladıkları proteinler rol oynamaktadır. EBAH'da APP, PSEN1 ve PSEN2 genlerinde mutasyonlar hastalık için önemli risk faktörlerinden olan $A\beta 1-42$ oluşmasını tetiklemekte ve sonrasında nörodejenerasyon ve apoptozis süreci başlamaktadır (64-67).

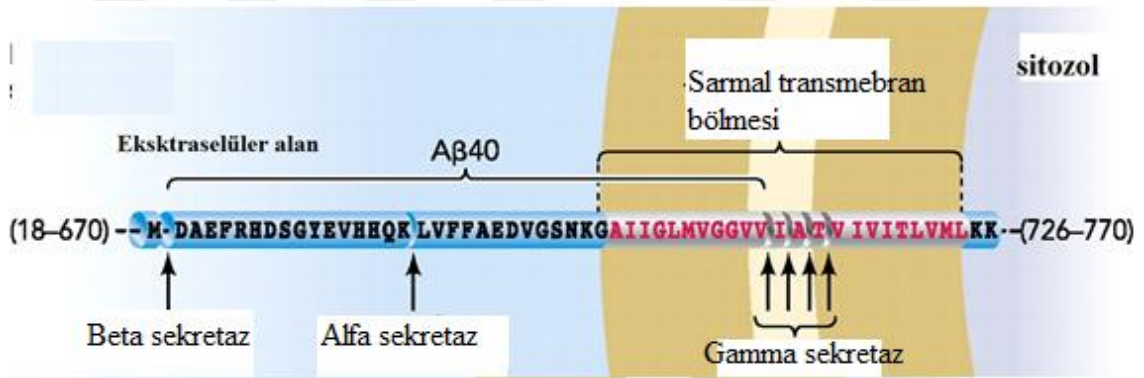
Tablo 2.1. Alzheimer hastalığında rolü olan genler ve lokasyon bölgeleri (64)

Gen adı	Gen sembolü	Kalıtım	Gen lokasyonu
Amiloid Prekürsör Protein	APP	Otozomal dominant	21q21.3
Presenilin 1	PSEN1	Otozomal dominant	14q24.2
Presenilin 2	PSEN2	Otozomal dominant	1q42.13

2.1.4.1. Amiloid Prekürsör Proteini Geni

AH patolojisinde önemli bir yeri olan APP, PSEN1 ve PSEN2 ile ilişkili olup programlı hücre ölümünde rol almaktadır. 21. kromozomda bulunan APP geninin fazla miktarda ekspresyonunun $A\beta$ 1-42 miktarını arttırdığı düşünülmektedir. Down sendromlu hastaların Alzheimer patolojisi bulguları (senil plaklar, nörofibriler yumaklar) down sendromlu olmayanlara göre daha fazla rapor edilmiştir (68). Bu bulgular APP geninin fazla miktarda ekspresyonunun AH ile bağlantılı olabileceğini düşündürmüştür. Çünkü Down sendromlu kişilerde 21. kromozom anomalisi (21. kromozom 3 adet) mevcuttur ve APP' nin yüksek düzeyde üretildiği rapor edilmiştir (69).

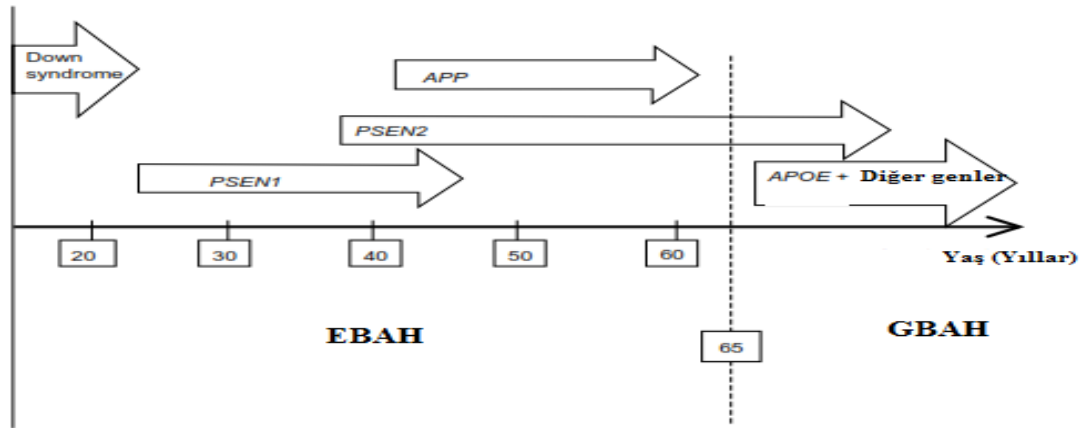
APP geni APP proteinini kodlayan 19 ekzon bulundurur. Transkripsiyon ve alternatif birleşmeleri takiben en az 5 $A\beta$ sekansı içeren APP izoformu tanımlanmıştır (70). Ancak 3 ve 17. ekzonda 21 mutasyon olsa bile APP' nin AH için düşük risk faktörü oluşturmaktadır (12). Çünkü APP artması AH' nın gelişmesinde tek etken değildir ve ayrıca APP proteolizinde rol oynayan alfa, beta ve gamma sekretaz enzimlerinde görülen patojenik mutasyonların rolü de göz ardı edilmemelidir (71).



Şekil 2.6. Amiloid prekürsör proteininin parçalanma bölgeleri (72)

2.1.4.2. Presenilin 1 Geni

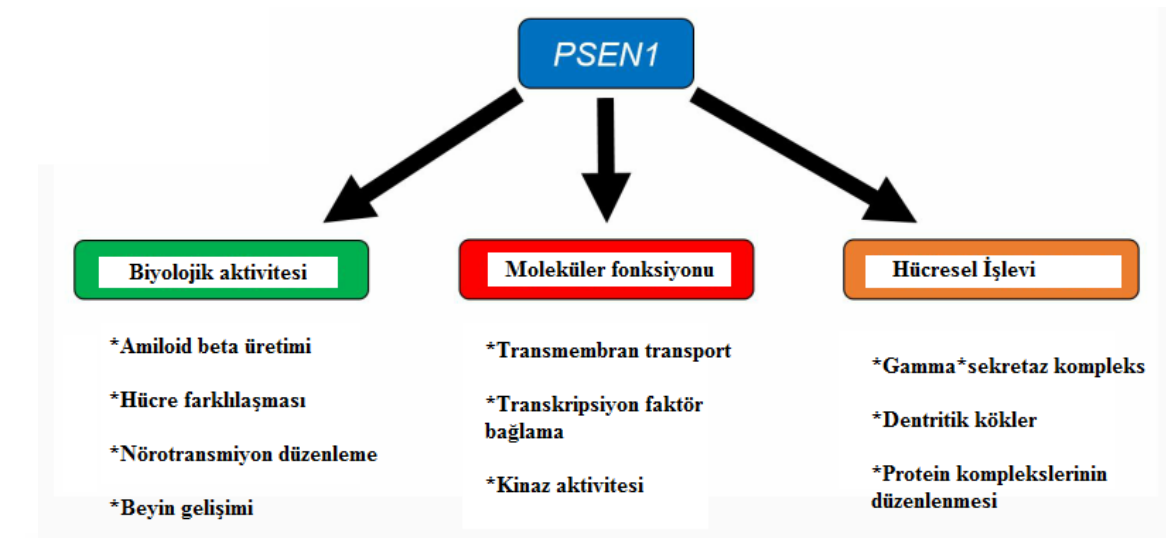
PSEN1 geni 14. kromozomda lokalizedir ve zar proteini olan 467 amino asit içeren PSEN1' i kodlamaktadır. PSEN1 geninde 180 den fazla mutasyon gözlenmiş ve AEBAH' da risk faktörü olarak kabul edilmektedir (71). PSEN1 geni mutasyonu olan kişilerde Alzheimer semptomları 40-50 yaşlarında ortaya çıkmaktadır ve bu kişilerde amiloid beta 1-42 formu ve 1-40 formu artmıştır. Bir başka veri de $A\beta$ 1-42 formunun arttığı, 1-40 formunun azaldığı yönündedir (73).



Şekil 2.7. Erken başlangıçlı ve geç başlangıçlı Alzheimer hastalığında presenilin 1, presenilin 2, Amiloid prekürsör protein ve ApoE nin rolleri (71)

Preseniline bağlı hücre ölümünün beta katenin sinyal yolağıyla da ilişkili olduğuna dair çalışmalar mevcuttur. Primer nöron hücre kültüründe azalmış beta katenin sinyalinin $A\beta$ 'ya bağlı apoptozu tetiklediği gösterilmiştir. Ayrıca PSEN1 mutasyonu olan Alzheimer hastalarının beyinlerinde beta katenin degradasyonunun belirgin bir artış göstermesi de bu hipotezi desteklemektedir. PSEN1 geni susturulan transgenik Alzheimer modeli oluşturulmuş farelerde de beta katenin degradasyonunda artma gözlenmiş, bunun da hücresel dayanıklılığı azaltıp hücreyi apoptoza götürdüğü düşünülmüştür (74). $A\beta$ 1-42'nin nöron dayanıklılığını azalttığı bilinmektedir (75). Beta katenin protein düzeyi düşüşü primer rat hipokampus hücre kültüründe araştırılmış, sonuçta beta katenin proteini inhibe edildiğinde $A\beta$ 1-42 fibrillerinin hücreyi apoptoza sürüklemesi beta katenin proteini inhibe edilmeyen yabancı tip gruba göre anlamlı bir artış göstermiştir (74).

Wnt sinyal yolağı ve diğer sinyal yollarında beta katenin degradasyonu hücre sağkalımı açısından kritik bir role sahip olduğu (76) göz önüne alındığında PSEN1 geninin beta katenin degradasyonunu düzenlediğinin kanıtlanması AH'nın tedavi stratejisi açısından önemli olduğunu düşündürmektedir.



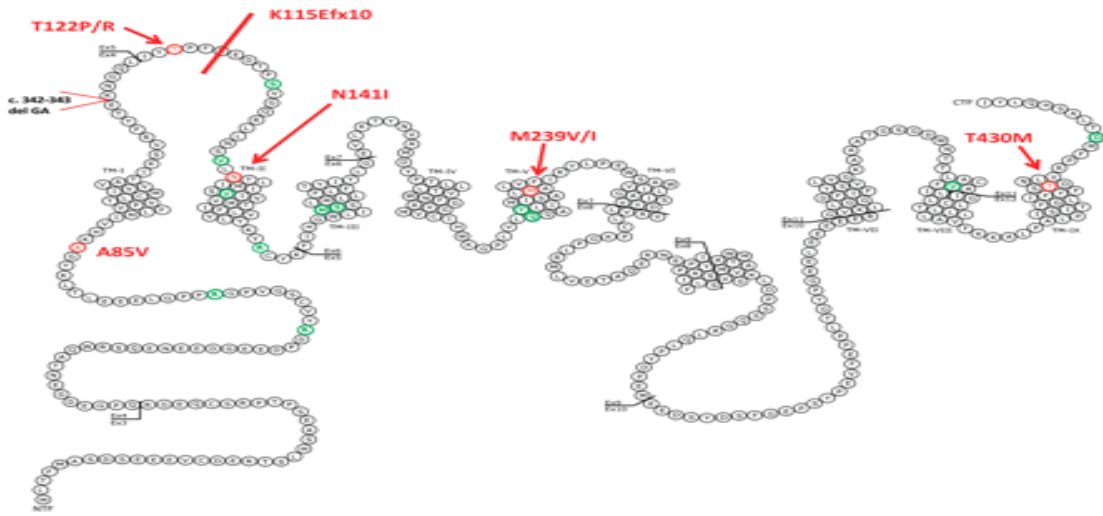
Şekil 2.8. Presenilin 1'in biyolojik, moleküler ve hücresel işlevleri (77)

2.1.4.3.Presenilin 2 Geni

PSEN2 geni, 448 amino asit taşıyan membran proteinini kodlamaktadır. Bu protein gamma sekretaz enziminin fizyolojik çalışmasına katkıda bulunmaktadır. PSEN2 gen mutasyonu PSEN1 e göre daha seyrek görülmektedir. Her iki gende de oluşabilecek mutasyonlar gamma sekretaz enzimini etkiler ve APP proteinden toksik $A\beta_{1-42}$ ve $A\beta_{1-40}$ ürünlerinin oluşmasına neden olabilmektedir (30).

PSEN2 geninde bir kodonu değiştirerek farklı bir amino asit kodlanmasına neden olan mutasyon (missense) saptanan kişilerde bu mutasyonu gelecek nesillere aktarma görülebilmektedir. PSEN2 gen mutasyonu olan kişilerde ailesel AH sık görülmemektedir. Frontotemporal demans, meme kanseri, demans ile birlikte görülen Parkinson hastalığı, Lewy cisimsikli demans, dilate kardiyomiopati hastalıklarında PSEN2 mutasyonu saptanmıştır (78). PSEN2 mutasyonunun bu hastalıklarda görülmesinin nedeni henüz tam aydınlatılmamış ancak hastalıkların bir birleriyle bağlantılı olup olmadığı sorusunu akla getirmiştir.

PSEN2 mutasyonu taşıyan bireylerde AH, PSEN1 mutasyonu olan kişilere göre daha geç yıllarda ortaya çıkmakta (39-83 yaş), fakat ortaya çıkma zamanı da aile içindeki bireylerde değişkenlik göstermektedir (65, 79, 80).



Şekil 2.9.Presenilin gen mutasyonlarına örnekler (81)

2.2. Alzheimer Hastalığında Tedavi

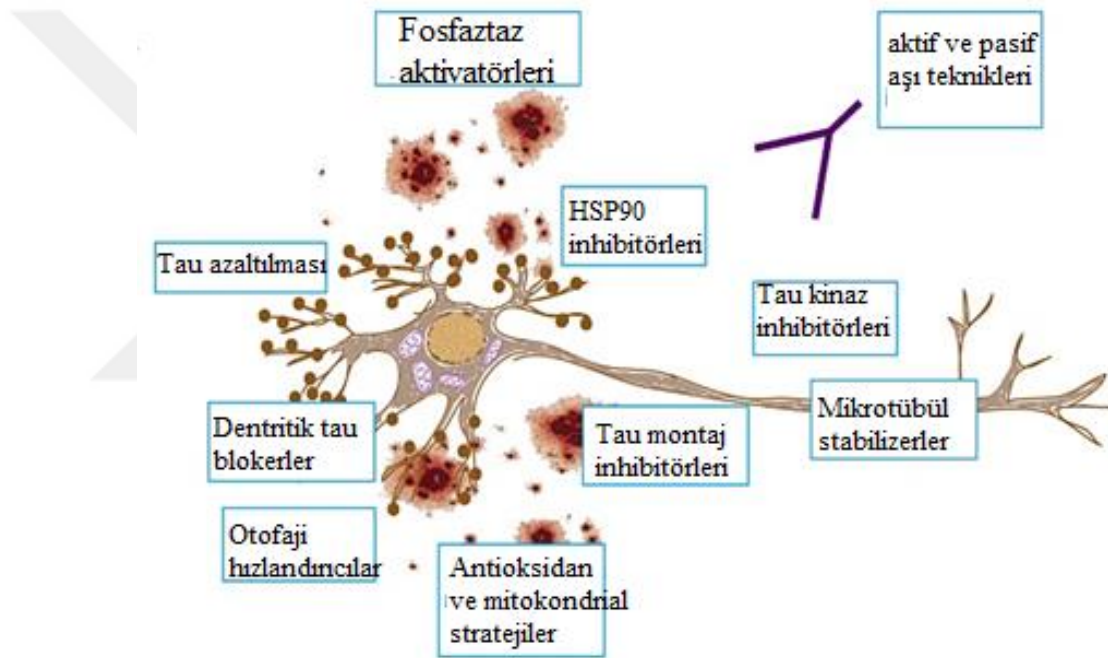
AH tedavisinde, hastalığı tamamen yok edecek veya ilerlemesini tamamen durduracak, nörodejenerasyonu patolojik sınırlardan uzaklaştıracak bir yöntem henüz geliştirilememiştir. 2002-2012 yılları arasında AH da endike olabilecek 244 adet ilaç adayı klinik çalışmalarla test edilmiş ancak bu ilaçlardan yalnızca bir tanesi testleri geçmeyi başarmıştır. İlaç geliştirmede karşılaşılan; yüksek maliyetler, uzun zamana yayılan araştırmalar, beynin anatomik yapısı (örneğin kan beyin bariyeri) gibi durumlar tedaviye yeni bir ilacın kazandırılmasında şüphesiz aşılması gereken güçlüklerdir.

FDA ve ülkemizde de Sağlık Bakanlığı tarafından onaylanmış AH tedavisinde kullanılan ilaç yalnızca 5 tanedir. Bunlardan 4 ü kolinesteraz inhibitörü (rivastigmin, galantamin, takrin, donepezil) diğeri de NMDA reseptör antagonisti (memantin) ilaç kategorisindedir. Bu ilaçların tümü de hastalığın radikal tedavisinde henüz tam başarı sağlayamamıştır (1). Ayrıca monoamin oksidaz tip-B inhibitörü Parkinson tedavisinde kullanılan selejilinin de AH'de tedaviye yardımcı olarak kullanılabilir (82).

Memantin non-kompetitif NMDA-reseptör antagonistidir ve bu reseptörlere düşük-orta dereceli afinite gösterir ancak yüksek konsantrasyonda sinaptik plastisiteyi inhibe edebilir. Memantin glutamat aracılı eksitotoksisiteden nöronları koruyacağı bunu yaparken de kognitif fonksiyon için gerekli fizyolojik NMDA reseptör aktivasyonunu önlemediği düşünülmektedir. Asetilkolinesteraz inhibitörleri ile karşılaştırıldığında

memantinin sadece hafif-orta demanslarda değil şiddetli evrede de yararlı olabileceği değerlendirilmektedir (4, 5).

Alternatif tıp yöntemlerinden AH'da *Ginkgo biloba* L., alfa tokoferol (E vitamini), L-karnitin gibi maddeler en çok araştırılan ve kullanılan seçenekler arasındadır. (83-85). Son yıllarda beyin proteolizati da yurt dışında AH'da endike ilaç kategorisinde yer almaktadır. Ülkemizde ise Yurt Dışı İlaç Fiyat Listesi'nde bu bileşim yer almakta ve hekim reçetesi ile Türk Eczacılar Birliği (TEB) tarafından hastalara temin edilebilmektedir (86).



Şekil 2.10. Alzheimer hastalığında tedavi stratejileri (3)

2.2.1. Semptomları Giderici Tedavi

AH semptomlarından en yaygın olanlar unutkanlık, konuşma bozukluğu, düşünme ve karar vermede güçlük sayılabilir. Hastalığın ilerleyen dönemlerinde ise bu semptomlar daha da belirginleşerek günlük kişisel bakımında bile yardıma muhtaç hale gelinebilir. Bazal ön beyinde kolinerjik nöronların dejenerasyonu hipokampus ve neokorteksteki presinaptik kolinerjik terminallerde bozukluğa neden olmaktadır. Tedavide kolinerjik aktiviteyi arttırmak amaçlanır ve bunun için de sinaptik aralıkta asetilkolini parçalayan AChE inhibe edilir. AChE inhibitörleri olan donapezil, rivastigmin ve galantamin Alzheimer hastalığında hafif-orta evre için klinik kullanımı Sağlık Bakanlığı ve FDA

tarafından onaylanan ilaçlardır. Donapezil, rivastigmin ve galantamin selektif AChE inhibitörleridir (1).

2.2.2. Yeni Tedavi Yaklaşımları

Alzheimer hastalığında FDA tarafından onaylanan ve ülkemizde de hekimler tarafından reçete edilebilen ilaç sayısı çok kısıtlıdır. Yaşlanan dünya nüfusuyla birlikte artan Alzheimer hastalığına karşı yeni ve güncel tedavi seçenekleri araştırılmaktadır. Aşağıdaki tabloda prelinik ve klinik aşamada olan moleküllerin listesi verilmiştir. Listede moleküllerin etki mekanizmaları ve güncel olarak bildirilen klinik faz aşaması da verilmiştir. Moleküllerin etki mekanizmasının referans alındığı kaynaklar son sütunda belirtilmiştir.

Tablo 2.2. Alzheimer hastalığında klinik ve prelinik aşamada olan ilaçlar ve etki mekanizması

Molekül	Etki Mekanizması	Hangi aşamada	Kaynak
SGS742	GABAerjik modülasyon	Faz I	(87)
Etazolate	GABAerjik modülasyon Alfa sekretaz artışı PDE-4 inhibitörü	Faz IV	(88)
Lecozotan	Serotonin reseptör modülasyonu	Faz I	(89)
Velusetrag	Serotonin reseptör modülasyonu üzerinden $A\beta$ üzerine etki	Prelinik	(90)
SB-742457	Serotonin reseptör modülasyonu	Faz II	(91)
Ro-4368554 SB-258585 SB-399885	Serotonin reseptör modülasyonu	Prelinik	(92-94)
MK-0249	Histamin reseptör modülasyonu	Faz II	(95)
SCH58261	Adenozin reseptör modülasyonu	Prelinik	(96)
Silostazol (anti platelet etkili-FazIV)	Adenozin reseptör modülasyonu	Faz III	(97)
Melatonin	Nöropsikiyatrik düzenleme	Araştırma aşamasında	(98)

Lityum Valproat	Tau proteini modülasyonu	Prelinik	(99, 100)
Kafein	GSK3 β protein deaktivasyonu ve A β modülasyonu	Prelinik	(101)
Tideglusib(NP031112)	GSK3 β protein deaktivasyonu	Faz II	(102)
SRN-003-556	GSK3 β protein deaktivasyonu	Prelinik	(103)
SB216763	GSK3 β protein deaktivasyonu ve tau proteini defosforilasyonu	Prelinik	(104)
Bezafibrat	Tau proteini defosforilasyonu	Prelinik	(105)
İntranazal insülin	Kognitif fonksiyon modülatörü	Klinik araştırma	(106)
Sodyum selenit (Ve-015)	Protein fosfataz 2Aaktivasyonu	Faz II	(107)
Paklitaksel	Mikrotübül stabilizasyonu, aksonal transport ve motor fonksiyon modülasyonu	Prelinik	(108)
Epothilone D	Mikrotübül stabilizasyonu	Araştırma aşamasında	(109)
Astemizole Lansoprazol	Tau proteinine bağlanarak tau-tau etkileşimini önler	Prelinik	(110)
Semagacestat	Gama sekretaz modülasyonu	Faz III de yasaklandı	(111)
Kurkumin	HSP 90 inhibisyonu	Prelinik	(112)
AADvac1	tau peptide-KLH-konjugatı (immünoterapi)	Araştırma aşamasında	(113)
Etazolat	Alfa sekretaz aktivasyonu	Araştırma aşamasında	(114)
Epigallokateşin-gallat	Alfa sekretaz aktivasyonu	Araştırma aşamasında	(115)
Epigallokateşin-gallat	Antioksidan	Faz II	(116)
Bryostatin 1	Protein kinaz C aktivasyonu	Faz II	(117)
Flurbiprofen	Gama sekretaz modülasyonu	Prelinik	(118)

2.2.3. Diyabet ve Alzheimer Hastalığında Ortak Patolojiler

2.2.3.1. İnflamasyon

Mikroglia hücrelerinin aktive olması ile sitokinlerin salgılanması; kompleman sistemin aktive olması ile inflamasyon sistemi devreye girer. $A\beta$ oligomerinin ileri glikasyon son ürünleri, reseptörü (RAGE) ile bağlanarak merkezi sinir sistemi (MSS) içerisinde yer alan başlıca pro-inflamatuar sinyalleme sistemi olan aktive B hücrelerinin kappa hafif zincir güçlendiricisi nükleer faktörünü (NF- κ B) tetiklemesinin AH'da inflamasyona yol açtığı bildirilmektedir. Ayrıca AH da görülen nöron ölümü sonucu inflamasyon sürecinin tetiklenmesi de bir diğer faktördür (119).

Post mortem beyin otopsisinde proinflatuar sitokinler ve kompleman aktivasyon ürünleri gibi enflamasyon mediyatörlerinin arttığı gözlenmiştir. AH ile ilişkili bulunan sitokinler; dönüştürücü büyüme faktörü β (TGF- β), tümör nekrozan faktör α (TNF- α), interlökin-1, 2, 6, 10 ve 12'dir. Histopatolojik incelemelerde aktif mikroglia ve astrosit hücrelerinin sayısının arttığı gösterilmiştir (120).

2.2.3.2. Oksidatif Stres

Alzheimer hastalığının başlangıcında ve ilerlemesinde oksidatif stresin önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Hastalığını ilerlemesi sırasında lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA oksidasyonu görülebilmektedir (121).

Oksidatif stres; hidroksil radikali, superoksit radikali ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türleri (reactive oxygen species, ROS) tarafından biyolojik moleküllerin aşırı oksidasyonudur. ROS'lar hücrel metabolizmanın yan ürünleridir. Belirli koşullar altında oluşumları ve detoksifikasyonları arasındaki denge bozulursa oksidatif stres meydana gelebilir ve sonrasında hücre hasarına sebep olabilirler.

Oksijen kullanımının fazla olması nedeniyle beynin oksidatif strese duyarlılığı diğer organlara göre fazladır. Nöronların metabolik hızı diğer beyin hücrelerinden yaklaşık 5 kat fazla olduğundan özellikle oksidatif strese karşı daha kırılgandır. Nöron hücreleri yüksek miktarda çoklu doymamış yağ asitleri içerirler, bu yağ asitleri ROS'la etkileşerek lipid peroksidasyonuna ve moleküler yıkıma neden olur. Ayrıca nöronlarda sitozolik peroksitlerin eliminasyonundan sorumlu olan major antioksidan kabul edilen glutatyon miktarı düşüktür (122).

Smith vd. yaptığı prelinik çalışmada APP'nin aşırı eksprese edildiği farelerde beyin A β kümelerinin oksidatif stres biyobelirteçleri olan hem oksijenaz-1, demir, hidroksinonenal ve pentosidin birlikte bulunduğu gözlenmiştir. Bu bulgular oksidatif stres ile A β birikimi arasında yakın bir ilişkinin olduğunu düşündürmektedir (123).

A β , ROS oluşumuna ve nöronlarda metal iyonlarını indirgediği için oksidatif hasara sebep olabilmektedir (124). AH'dan sorumlu çevresel faktörlerden biri olan alüminyum biyolojik sistemlerde oksidatif strese ve lipid peroksidasyonuna sebep olur. Bu nedenle alüminyum ve alüminyum bileşikleri AH'da nörodejenarasyona katkıda bulunduğu düşünülmektedir ve hayvanlarda Alzheimer modeli oluşturmada kullanılmaktadır (125).

2.2.3.3.Vasküler Disfonksiyonlar ve Yol Açtığı Durumlar

AH ve serebrovasküler hastalık birlikte görülebilmekte ve serebrovasküler rahatsızlıkların AH'na neden olabileceği düşünülmektedir. Beyinde mikro damarlanma kaybı, beyin kan akımının azalmasına neden olmaktadır. Kan damarlarında meydana gelen fonksiyonel bozukluk nöronların beslenmesini ve oksijenlenmesini bozarak beyinde A β birikmesine neden olabilmektedir (126).

Vasküler endotelyal büyüme faktör (VEGF) geni özellikle de genin promotor bölgesindeki polimorfizm AH'nın sporadik formuyla ilişkili bulunmuştur. Hem klinik hem de deneysel çalışmalar iskemiyle oluşan serebral patolojinin, APP ekspresyonunu arttırdığı ve bunun sonucu olarak da A β birikmesine neden olduğu gözlenmiştir (127).

2.2.3.4.Glukoz Toksisitesi

AH'da serebral glukoz metabolizması hipokampus, singulat girus, superior ve orta temporal giruslarda azalmakta, frontal lobda ise artmaktadır. Glukozun hücrelere girişi ve metabolizması insülin tarafından kontrol edildiği çok önceden bilirse de kolinerjik nöronlar tarafından innerve edilen insülin benzeri reseptörlerin beyindeki keşfi son yıllarda yapılmıştır (128).

Deneysel hayvanlarında Alzheimer modeli oluşturmada sıkça kullanılan bir yöntem olan lateral ventriküllere streptozotosin (STZ) enjekte edilmesi sıçanların beyinlerinde glukoz kullanımını bozarak Alzheimer semptomlarından olan kognitif disfonksiyon, A β

birikimi, oksidatif stres artışı gibi sonuçlara yol açmaktadır. STZ DNA hasarı yapan alkilleyici bir ajandır. STZ aynı zamanda mikroglia hücrelerini aktive ederek ROS oluşumuna neden olur. STZ'nin oksidatif stresi indüklediği beyinde malondialdehit (MDA) artışı ve glutatyon düşüşünün gösterilmesiyle dolaylı yoldan kanıtlanmıştır. MDA lipid peroksidasyon ürünüdür ve serbest radikal oluşumunun göstergesi olarak kullanılır. Glutatyon ise endojen bir antioksidan ve oksidatif hasara karşı koruma sağlar (129).

2.2.3.5.İnsülin Yetmezliği ve İnsülin Direnci

Beyindeki insülinin özellikle bilişsel fonksiyonların düzenlenmesinde sinyal transdüksiyon yollarında yer aldığı varsayılmaktadır. Çünkü beyindeki öğrenme ve hafıza alanlarında insülin ve insülin reseptörlerinin varlığı normal dokulara göre daha fazladır (130). İnsülin resistansı ve glukoz intoleransı olan tip 2 diyabet hastalarında yapılan epidemiyolojik çalışmalarda AH ile diyabet arasında bir ilişki olabileceği saptanmıştır. Diyabetli ve insülin direnci olan hastalarda demans ve bozulmuş bilişsel aktivite için risk artmaktadır (131).

2.2.3.6.Mitokondriyal Disfonksiyon

Alzheimer hastalarının beyinlerinde mitokondri sayısında azalma ve mitokondri organellerinin morfolojik yapısında normale göre değişme gözlenmiştir. Mitokondriyal disfonksiyonun AH ile ilişkisi tam olarak aydınlatılamamakla birlikte $A\beta$ moleküllerinin mitokondri membranında birikme eğiliminde olduğu gösterilmiştir (132). AH olan kişilerde mitokondri kütlesi normale göre düşmekte ve sitoplazmik mitokondriyal DNA artmaktadır (133). β sekretaz ve $A\beta$, sitokrom oksidazı bakır varlığında inhibe etmektedir bu olay mitokondri aktivitesinde doğrudan etkili olup mitokondriyal elektron transferini olumsuz etkilemektedir (134). Sitokrom oksidaz aktivitesinde azalma ve mitokondriyal elektron transfer disfonksiyonu AH ile ilişkili parametrelerdir (135).

Mitokondriyal disfonksiyon aynı zamanda kaspazların tetiklediği programlı hücre ölümü ile sonuçlanabilen bir süreçtir. Hücre içine aşırı miktarda kalsiyum girişi olursa nöronal NOS ve indüklenebilir NOS miktarı artar ve bunun sonucu olarak da kaspaz 3 proteini aktive olur ve apoptoz süreci başlar(16).

2.2.3.7.ATP Üretimi Üzerine Etkiler

Mitokondriyal disfonksiyon ATP üretimini doğrudan etkiler. Normal hücrel fonksiyonların yerine getirilmesi için gerekli ATP üretiminde azalma nöral sağkalımı olumsuz etkilemekte ve nörodejenerasyona neden olabilmektedir. Mitokondriye aşırı kalsiyum girişi ROS birikimine bu da ATP sentezinin azalmasına neden olmaktadır. Ayrıca nörofibriler yumakların patolojik düzeyde beyinde birikmesi kalsiyum homeostazisini bozar ve nöron hücrelerinde kalsiyum bağımlı proteazların artmasına neden olur (136, 137). Tau proteininin birikmesini ve katlanmasını tetikleyen transglutaminaz enzimi de kalsiyum artışına bağlı hiperaktif olmaktadır (138).

2.2.3.8.Mitokondriyal Membran Potansiyeli

Mitokondri, hücrenin enerji üretiminde rol alan ve hücre canlılığının sürdürülmesinde fonksiyonu hayati olan organeldir. Apoptoz sürecinde MMP düşmektedir fakat bu düşüşün apoptoz süreciyle bağlantısı tam olarak aydınlatılamamıştır. Mitokondri zarının transmembran potansiyeli ($\Delta\psi_m$) mitokondri canlılığı için optimum düzeyde sürdürülmelidir. MMP hücrede birçok mekanizma ile bağlantılıdır.

Sitokrom c salımında artış MMP düşüşü ile bağlantılı bulunmuştur ve sitokrom salımının hücrenin apoptoz sürecine girmesinde rol oynadığı *in vitro* deneylerde gösterilmiştir. Aynı zamanda mitokondri zarında depolarizasyon gerçekleşirse apoptojenik sinyal yolağı aktive olarak hücrede kaspaz proteinlerinin tetiklediği ölüme neden olabilmektedir (139).

2.3.Dipeptidil Peptidaz-4 İnhibitörleri

DPP-4, membrana bağlı bir serin dipeptidazdır ve plazmada da çözünür bir formu vardır. Adenozin deaminaz kompleks protein-2 ve CD26 (cluster of differentiation 26) olarak da bilinen DPP-4, DPP-4 geni tarafından kodlanmaktadır (18).

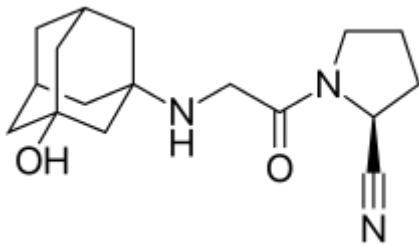
Deneysel diyabet oluşturulmuş hayvan modellerinde DPP-4 inhibisyonu, glukoz homeostazını olumlu etkilemekte ve endojen inkretin aktivitesini arttırmaktadır (140). DPP-4 inhibitörü ilaçlardan olan vildagliptin ve saksagliptin endojen aktif GLP-1 düzeylerini ve insülin salınımını arttırmaktadır ve aynı zamanda glukagon seviyelerini azaltmaktadır (141).

DPP-4 enzimi sadece inkretin hormonların yıkımına özgü olmadığı için uzun dönemdeki etkileri halen araştırılmaktadır. Çünkü DPP-4 enzimi peptid YY, nöropeptid Y ve büyüme hormonu salıverici hormonu da içeren birçok peptidin metabolizmasından sorumludur. DPP-4, T hücresi aktivasyonuna katılır ve lenfositlerde CD26 olarak eksprese edilir (142). DPP-4 inhibisyonunun henüz uzun süreli etkileri nörolojik ve immünolojik açıdan netlik kazanmamıştır.

FDA tarafından onaylanan DPP-4 inhibitörü ilaçlar; vildagliptin, saksagliptin, linagliptin, sitagliptin ve alogliptindir.

2.3.1. Vildagliptin Etki Mekanizması ve Kimyasal Yapısı

Vildagliptin güçlü ve seçici DPP-4 inhibitörü bir ilaç olup oral antihiperглиsemik olarak diyabet tedavisinde kullanılmaktadır. Ülkemizde 2011 yılında Sağlık Bakanlığı tarafından tip 2 diyabet tedavisinde kullanıma sunulan vildagliptinin metformin ile kombine preparatları da vardır (19). Vildagliptin DPP-4 enzimini inhibe ederek gGLP ve GIP yıkılmasını önler. Böylece pankreasın beta hücrelerinden insülin salımı artarken, alfa hücrelerinden glukagon salımı azalır (143).



Şekil 2.11. Vildagliptinin kimyasal yapısı (140)

Klinik çalışmalarda vildagliptin kullanımının HbA1C düzeyini düşürdüğü gözlenmiştir. HbA1C düzeyi normalden çok daha yüksek olan kişilerde bu düşüş daha belirgin gözlenmiştir (144). Oral yoldan kullanılan vildagliptin aç karnına alındığında yaklaşık 2 saatte plazma doruk konsantrasyonuna ulaşır (145).

Vildagliptinin ratlarda streptozotosin (STZ) ile oluşturulan Alzheimer modeli üzerine yapılan bir çalışmada GLP-1, A β 1-42, p-tau, TNF α düzeyleri incelenmiş ayrıca davranış deneylerinden radyal labirent kol (Radial arm maze, RAM) ve Hole board ile kognitif fonksiyonlar değerlendirilmiştir. STZ ile kontrole göre artan inflamasyon parametreleri, p-tau ve A β miktarı vildagliptinin 2.5, 5 ve 10 mg/kg dozları uygulanan hayvanlarda doza

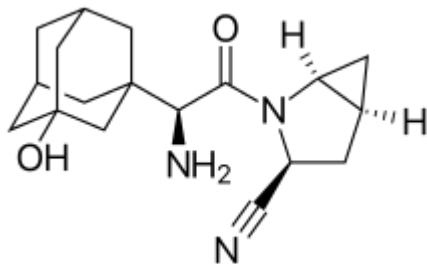
bağımlı bir şekilde azalmıştır. Ayrıca GLP-1 düzeyi de doza bağımlı bir şekilde artmıştır (146). Başka bir çalışmada ise vildagliptinin ratlarda MMP, ROS ve oksidatif stres üzerine etkisi araştırılmıştır. Yüksek yağlı diyet (High fat diet, HFD) ile indüklenen hastalık modelinde insülin duyarlılığı, öğrenme ve bellek düşmüş; plazma ve beyin MDA düzeyi ile kolesterol düzeyi yükselmiştir. Vildagliptinin 3mg/kg uygulaması insülin direncini düşürmüş, oksidatif stresi azaltmış, öğrenme ve belleği de olumlu etkilemiştir. Aynı zamanda bu çalışmada vildagliptinin LDL düzeyini de düşürdüğü gözlenmiştir (147).

Yukarıdaki çalışmalar vildagliptinin beyinde öğrenme ve bellek üzerinde olumlu etkileri olabileceğini göstermektedir. Aynı zamanda beyin fonksiyonlarının düzenlenmesinde etkili biyokimyasal parametreler üzerine de etkileri gösterilmiştir. Bu sonuçlar vildagliptinin nöral sağkalıma olumlu etkileri olabileceği ve nörodejenerasyonu önlemede olumlu etkileri olabileceği tezine katkı sağlamaktadır.

2.3.2. Saksagliptin Etki Mekanizması ve Kimyasal Yapısı

Saksagliptin FDA tarafından onaylanan ikinci oral DPP-4 inhibitörüdür ve tip 2 diyabet hastalığı tedavisinde kullanılmaktadır. Saksagliptin glukoza bağımlı olarak insülin salıverilmesini artırır ve dolaşımdaki glukagon düzeyinin azalmasına neden olmaktadır (20).

Saksagliptin diğer DPP-4 inhibitörü antidiyabetik ajanlardan farklı olarak CYP3A4/A5 enzimi ile metabolize olurken diğerleri böbrekten ekstraksiyona uğrar (148). Saksagliptin yan etkileri arasında en dikkat çekici olarak kalp krizi yer almaktadır. Çünkü saksagliptin kullanan hastalarda yapılan faz 2 ve faz 3 çalışmalarında kalp krizinden dolayı hastaneye yatma oranında ortalama %27 oranında artış gözlenmiştir (149).



Şekil 2.12. Saksagliptinin kimyasal formülü (150)

2013 yılında yapılan preklinik bir çalışmada STZ ile oluşturulan hayvan modelinde $A\beta$ -42, GLP-1, p-tau, IL-1 β , TNF α düzeylerini araştırmıştır. Aynı zamanda davranış deneylerinden RAM ve hole board ile biyokimyasal verilerin uyumluluğu araştırılmıştır. Negatif kontrol olan STZ grubunda kontrole göre $A\beta$ -42, p-tau, IL-1 β ve TNF α düzeyleri artmış; saksagliptin doza bağımlı bu parametreleri azaltarak kontrole yaklaştırmıştır. Saksagliptin hipokampüsteki GLP-1 düzeyini de kontrol grubuna göre doza bağımlı arttırmıştır. Davranış deneylerinden elde edilen veriler de saksagliptinin öğrenme-bellek üzerine olumlu etkilerinin doza bağımlı olduğunu desteklemektedir(151).

Saksagliptinin AH patolojisinde önemli olan parametrelerden $A\beta$ ve p-tau proteinlerinde hastalık açısından olumlu etkisi, üzerinde ileri çalışmalar yapmaya değer bulgulardır. Bu bulgulara ek bazı araştırmalarla da saksagliptinin AH üzerine olumlu etkisinin araştırılması bilimsel yönden kayda değer olacaktır.

2.3.3. Glukagon Benzeri Peptid-1 ve Glukoza Bağımlı İnsülotropik Polipeptid

Epidemiyolojik çalışmalarda tip 2 diyabet ile AH arasında bir bağlantı olduğu rapor edilmiştir (21). Bu çalışmalar diyabet tedavisinde kullanılan DPP-4 inhibitörü ilaçlar AH'da hastalığın sağaltımı ve ilerlemesini yavaşlatıcı/durdurucu yönde etkili olabilir mi sorusunu düşündürmektedir.

GLP-1 ve GIP reseptörleri beyinde de eksprese edilmektedir. GLP-1 ve GIP analoglarının beyinde $A\beta$ kaynaklı sinaptik plastisite azalmasına karşı plastisiteyi geri artırma yönünde etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Ayrıca GLP-1 ve GIP'in sıçanlarda nöronal kök hücre proliferasyonunu arttırıcı etkisi olduğu bildirilmiştir (22).

GLP-1 inkretin bir hormon olup insülin sekresyonunu arttıran bir bağırsak faktörüdür. Aynı zamanda GLP-1 metabolizmada başka rollerde de görev almakta ve son yıllarda üzerinde araştırmaların devam ettiği bir hormondur. GLP-1 agonistleri ve GLP-1 yıkımını önleyici ilaçlar diyabet tedavisinde yeni stratejilerden biri olarak güncelliğini korumaktadır. GLP-1 insülin sekresyonunu arttırırken, glukogon salımını azaltır ve gastrik boşalmayı geciktirir. Sonuç olarak GLP-1 postprandiyal hiperglisemiye de önlemektedir (152).

GIP, duodenum ve proksimal jejunumdaki K-hücrelerinden sentez edilen 42 aminoasitli polipeptiddir. Karbonhidrat, yağ ve protein alımı ile sentez ve sekresyonu artmaktadır (153, 154). GIP glukozu bağımlı akut insülotropik etkilerini pankreasın β hücrelerinin yüzey reseptörlerine bağlanıp cAMP artışı ile göstermektedir. Uzun dönemde ise insülin sentezinde artış ve hücre kitlesinde artışa yol açmaktadırlar (143).

GLP1 ile GIP arasındaki temel farklardan başlıcaları;

*GLP-1 somatostatin ve glukagon süpresyonu salgılanmasını azaltırken, GIP etkilemez.

*GLP-1 gastrik boşalmayı GIP e göre daha fazla geciktirir.

*GLP-1 in doyumluğu artırıcı ve vücut ağırlığını azaltıcı etkisi vardır.

GLP-1 ile GIP in ortak etkileri de plazma glukozunu azaltma, glukozu bağımlı insülin sekresyonunu artırma, pankreas beta hücresinin glukozu cevabını ve ömrünü arttırmadır (155).

2.4.SH-SY5Y Hücre Morfolojisi ve Alzheimer Modelinde Kullanım Öncelikleri

SH-SY5Y hücresi 4 yaşındaki nöroblastomalı bir kız çocuğunun kemik iliği biyopsisinden 1973 yılında SK-N-SH hücresi olarak izole edilmiştir. Daha sonra SK-N-SH hücresinin nöroblastoma benzeri subklonu elde edilmiş ve SH-SY olarak adlandırılmıştır (156). SH-SY hücresinden de 3 defa subklon elde edilmiş ve SH-SY5Y hücresi tanımlanmıştır. SH-SY5Y hücresi, nöronal fonksiyonların *in vitro* incelenmesinde kullanılan hücre hattıdır. Adrenerjik fenotipe sahip SH-SY5Y hücreleri aynı zamanda dopaminerjik belirteçleri de eksprese etmektedir(157).

SH-SY5Y hücresinin morfolojik incelenmesinde anormal kromozom-1(trisomy 1q) e sahip olduğu gözlenmiştir. Hücre asetilkolinerjik, adenozerjik ve glutamerjik aktivitelere sahiptir. Retinoik asit, beyin türevli nörotrofik faktör (BDNF) muamelesi SH-SY5Y hücrelerinin aksonal dentritik bağlantılarının gelişmesine ve bölünme hızlarının azalmasına neden olarak kanser hücresinden çok nöron hücresi davranışını modellemektedir (158).

2.5.Programlı Hücre Ölümü (Apoptozis) ve Nörodejeneratif Hastalıklarla İlişkisi

Nöron hücrelerinin programlı ölümü; oksidatif stres, glutamat toksisitesi, büyüme faktörlerinin azalması, genetik mutasyonlar gibi faktörlerin etkisiyle başlatılır. Hücrede Ca^{++} iyonlarının aşırı birikmesi sonucu proapoptotik protein (PAR-4) aktive olur ve diğer proapoptotik bir protein olan Bax'ın mitokondri membranında apoptoz sürecini başlatmasına neden olur (13). Mitokondri ise sitokrom c salgılar. Sitokrom c, apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apoptotic protease activating factor 1, Apaf-1) ile birleşerek kaspaz-9 u, kaspaz 9 da kaspaz-3 ü aktifleştirerek apoptoza neden olur (13, 14).

Glutamat reseptör proteinleri de hücre içine Ca^{++} girişini ve kinazların aktivitesini arttırarak proapoptotik olarak rol oynar (14).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1.Deneylerde Kullanılan Cihazlar

- -20 ° C dondurucu ve +2/+8 ° C (Siemens)
- -80 ° C dondurucu (OPERON)
- DS-11 Spektrofotometre(DeNovix®)
- Etüv(EcoCell)
- Güç kaynağı(PowerPac™Basic-BioRad)
- Hassas Terazı (Adventurer, OHAUS)
- Isıtıcı ve Magnetik Karıştırıcı(Hei-Standart, Heidolph MR),
- Isıtıcı ve Soğutucu Blok(CHB-202,Bioer)
- İnkübatör (Biosan)
- Mikropipet ve Multipipet(Eppendorf)
- Multifonksiyonel Mikroplaka Okuyucu (Biotek synergy HT)
- PCR cihazı (Lightcycler®480 Roche)
- Santrifüj (Nüve NF 1200R, Nüve Mikro200R)
- Spin Capsulefuge(GmClab,GILSON®)
- T100™Termal Döngüleyici (Bio-Rad)
- Vorteks (UM-10,Wisemix)
- Görüntüleme Cihazı (Biorad, ChemiDoc MP)

- Western blot cihazı(Mini-Protean®Tetra System-BioRad) kullanıldı.

3.2.Kimyasal Malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler gerekli ortam sıcaklıklarında saklandı. Deneyleerde kullanılan çözelti ve tamponlar deiyonize su ile hazırlandı. Kimyasal maddeler;

- 1-Butanol(Fluka, 19430)
- 2-Merkaptoetanol (Sigma, M3148-100 ml)
- 2-Propanol (Riedel-de Haen, 24137)
- Bakır (II) sülfat pentahidrat (Sigma, 12849- 1 kg)
- Bisakrilamid AppliChem, A3636-50 g)
- Dimetil sülfoksit (Sigma, D8418- 250 ml)
- Etanol absölü(AppliChem, A3678-500 ml)
- Folin&Ciocalteu's fenol (Sigma, F9252-500 ml)
- Fosfataz inhibitörü (A.G. Scientific, B1352)
- Gliserol (Merck, K42347192)
- Glisin (Sigma, G8898-500 g)
- Metanol (Merck, I690709)
- N,N,N,N'-Tetrametil-etilendiamin (Sigma, T9281-50 ml)
- N,N'-Metilenbisakrilamid (Sigma, M7256- 50 g)
- Potasyum sodyum tartarat tetrahidrat(Merck, A0270087-1 kg)
- Sığır serum albümini (Santa Cruz, SC2323-50 g)
- Sodyum karbonat (Merck, A0250292-1 kg)
- Sodyum klorür (AppliChem, A4256-1 kg)

- Sodyum dodesil sülfat (Sigma, 71725-500 mg)
- Süper Signal®West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific)
- Süt tozu(Fluka, 70166- 500 g)
- Trikloro asetik asit (Sigma, T6399-1 kg)
- Tris Hidroklorür (Amresco, 0234-1 kg)
- Trizma Baz (Sigma, T6066- 1 kg)
- Tween®20 (Sigma, P5927-100 ml)

Kullanılan kitler: MMP (Cayman item no:10009172), Griess reagent (Sigma G4410), Roche cell lysis kit, Roche cDNA synthesis kit, Roche APP primer, Roche PSEN1 primer, Roche PSEN2 primer.

Tablo 3.3. Western Blot deneyinde kullanılan primer antikorlar;

Primer antikorlar	KDa	Marka (Model)
Caspase 12	39	Abcam (Ab62463)
Caspase 9	32-35, 10 (cleaved)	Biovision (3016-100)
Caspase 3	32, 17 (cleaved)	Biovision (3138-100)
p- Tau (Ser202)	50-80	Cell Signalling (11834S)
β -actin	45	Cell Signalling (4967S)

3.3.Hücre Kültürü

SH SY5Y nöroblastoma hücreleri ATCC den satın alındı. SH SY5Y hücreleri DMEM - F12 besi yerlerinde çoğaltıldı. Besi yerine %10 fetal sığır serumu (Fetal bovine serum, FBS) , 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin eklendi. Hücreler flaskda yaklaşık %80 doluluğa ulaştığında sayılarak 96 lık plakalara hücre canlılık analizi, MMP, PCR ve Nitrik oksit tayini için ekildi. Hücre canlılık analizi için Sulforhodamine B (SRB) gerçek zamanlı hücre analizi (GZHA) ve 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium

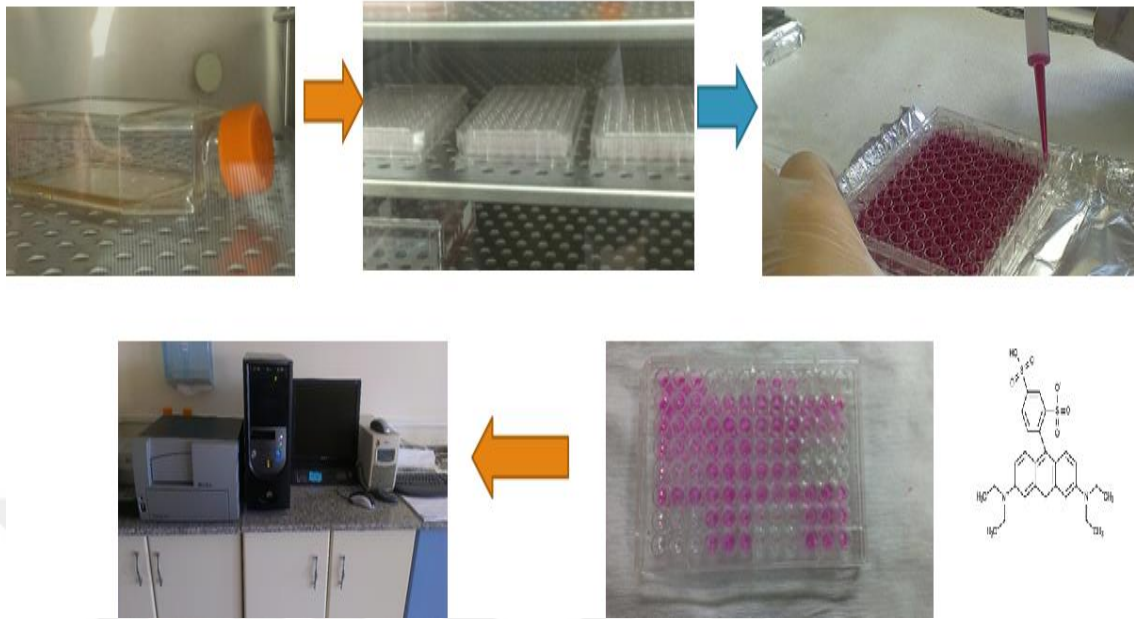
bromide (MTT) metodları kullanıldı. Western blot için 6 kuyucuklu plakalara 1 milyon hücre ekildi.

Hücelere vildagliptin (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} M ve 250, 100, 50 μ M), saksagliptin (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} M ve 200, 100, 50 μ M), memantin (200, 100 μ M), A β 1-42(20 μ M) uygulandı ve 37 °C , % 5 CO₂ ortam şartlarında 24 saat inkübe edildi.

3.4.Sulforhodamine B Deneyi

SRB hücre canlılığının ölçülmesi için kullanılan ve Trikloroasetik asit (TCA) ile fikse edilmiş aminoasitlere zayıf asidik ortam koşullarında bağlanıp daha sonra zayıf bazik şartlarda ayrışması ile oluşan pembe rengin absorbansının ölçülmesi ile kolorimetrik hücre tayini esasına dayanan bir yöntemdir.

- SH SY5Y hücreleri 96 lık plaka kullanılarak her kuyuda 12500 hücre olacak şekilde dağıtıldı.
- 24 saat inkübasyondan sonra canlılığa etkisi araştırılan maddeler (vildagliptin, saksagliptin, memantin, A β 1-42) uygulandı ve tekrar inkübatöre yerleştirildi.
- 24 saat inkübasyondan sonra +4 °C de bekletilen trikloroasetik asit (TCA) son konsantrasyon % 10 olacak şekilde eklendi ve +4 °C de 1 saat bekletilerek fiksasyon sağlandı.
- TCA ile fikse edilen hücreler 5 defa distile su ile yıkandı ve kurutuldu.
- %1 asetik asit çözeltisinde hazırlanan % 0,4 SRB boyası her kuyuya 50 μ L eklendi.
- Bağlanmayan SRB %1 asetik asit ile 5 defa yıkanarak plakalardan uzaklaştırıldı ve daha sonra tekrar kurutuldu.
- 10 mM Tris bazı her kuyuya 100 μ L eklenerek 5 dakika çalkalayıcıda çalkalandı ve 492 nm de absorbans ölçüldü.



Şekil 3.13. SRB deneyi aşamalarından bazı fotoğraflar

3.5.MTT Canlılık Analizi Deneyi

MTT hücre canlılığını ölçmede sıkça kullanılan bir yöntemdir. Hücrenin mitokondriyal aktivitesi üzerinden canlılığı hakkında fikir veren bu yöntem; çözünebilir halde (sarı renkli) olan MTT molekülünün hücre canlılığıyla doğru orantılı olarak formazan tuzuna (mor renkli)dönüşmesi ve mor rengin şiddetinin okunması olarak özetlenebilir. Mor rengin şiddetinin artması canlılığın artması demektir ve 562 nm de absorban ölçülerek saptanır.

MTT deneyinde sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı;

- SH SY5Y hücreleri 96 lık plaka kullanılarak her kuyuda 12500 hücre olacak şekilde dağıtıldı.
- 24 saat inkübasyondan sonra canlılığa etkisi araştırılan maddeler (vildagliptin, saksagliptin, memantin, $A\beta$ 1-42) uygulandı ve tekrar inkübatöre yerleştirildi.
- 24 saat inkübasyondan sonra MTT boyası distile suda çözünerek 0,22 μ M' lik filtreden geçirildi ve son konsantrasyon 0,5mg/mL olacak şekilde kuyucuklara eklendi ve inkübatörde 2 saat bekletildi.
- İnkübasyon sonunda kuyucukların üzerindeki süpernatant uzaklaştırıldı.
- Formazan tuzu %100 lük DMSO ile çözüldü ve 562 nm de absorban ölçüldü.

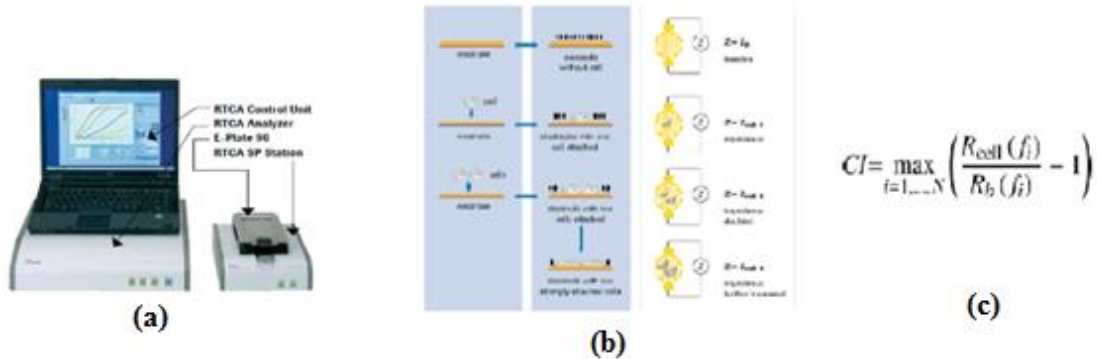
3.6.xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Canlılık Analizi

xCELLigence gerçek zamanlı hücre analizi (Real time cell monitoring, RTCA, GZHA) cihazı özel elektrot kaplı plakası sayesinde impedans ölçerek hücrenin canlılığı, plakaya yapışma hız ve yetisi, proliferasyonu hakkında yazılımı sayesinde bilgisayara anlık bilgi aktarır.

xCELLigence deneyi ile;

- Gerçek zamanlı ölçüm yapılmasına olanak sağlar.
- Diğer sitotoksosite ölçüm yöntemlerine göre araştırıcı hatası ve deney manipülasyon daha düşüktür.
- Etkisi araştırılan kimyasal bileşiğin deney boyunca belirlenen frekans aralığında hücre indeksi ölçülebilir.
- Etkisi incelenen bileşiğin hangi zaman aralığında beklenen etkiyi gösterdiği saptanabilir.
- Araştırılan bileşiğin akut ve kronik etkileri (kısa ve uzun sürede görülen etkileri) saptanabilir.
- IC 50 ve EC 50 değerleri xCELLigence yazılımı ile belirlenen zaman veya zaman aralığında hesaplanabilir.
- Araştırılan bileşiğin etkisi farklı zaman dilimlerinde bakılacaksa zamandan ve kimyasal madde harcama bakımından avantaj sağlar.

Bu test ile uygulanan maddelerin hücre canlılığı, hücre proliferasyonu, hücrelerin plaka tabanına tutunma yetisi ve üzerine yaptıkları etki gerçek zamanlı olarak izlendi.



Şekil 3.14. (a) GZHA cihaz ve yazılımı, (b) özet olarak yöntemin esası, (c) hücre indeksi hesaplama formülü

Elektronik plakaya hücreler ekildikten sonra plaka cihaza yerleştirildi. Deney başlatılır cihaz yazılımı sayesinde her 15 dakikada bir impedans ölçerek hücre indeksi (CI) hesaplar ve bilgisayara verileri anlık aktarır. Elektrotlar arasına yerleşen her hücre alternatif akım direncini artırarak hücre indeksini artırır.

3.7.JC-1 Mitokondriyal Membran Potansiyeli Ölçüm Deneyi

Mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) ölçüm deneyi hücrelerin enerji metabolizmasında rol oynayan mitokondrinin sağlıklı bir şekilde çalışıp çalışmadığı hakkında fikir vermektedir. Deney Cayman firmasından alınana MMP kit prosedürüne göre yapıldı.

- 96 lık siyah hücre kültürü plakalarında 50 000- 500 000 arası hücre/ml ekildi. Biz 96 lık plakada her kuyuya 12 500/100 hücre ektik.
- Hücreler 1 gece yapışıp çoğalması için bekledikten sonra etkisi araştırılan madde belirli konsantrasyonlarda kuyulara eklendi ve 24 saat inkübe edildi.
- Her kuyuya 100 µL besiyeri içindeki 5 µL JC-1 solüsyonu eklendi ve hafifçe çalkalandı. 15-30 dk (15 dk) inkübatörde bekletildi.
- 5 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
- 200 µL assay buffer her kuyuya eklendi ve 5 dk 400 g de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
- 200 µL assay buffer her kuyuya eklendi ve 5 dk 400 g de santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
- Her kuyuya 100 µL assay buffer eklendi.

*Sağlıklı hücreler güçlü ışımayı JC-1 in agregatlarına dönüştürerek yaptıkları için 560 nm'de eksitasyon, 595 nm'de emisyon değerlerinde floresan ışıma ölçüldü.

*Apoptotik veya sağlıksız hücreler güçlü ışımayı JC-1 i monomerlerine dönüştürerek yaptıkları için 485 nm'de eksitasyon, 535 nm'de emisyon değerlerinde floresan ışıma ölçüldü.

- Deney öncesi solüsyonların hazırlanması; 3 cell based assay buffer tableti 300 ml distile suda çözüldü. Bu çözelti 1 yıl oda sıcaklığında saklanabilir.

3.8. Western Blot Deneyi

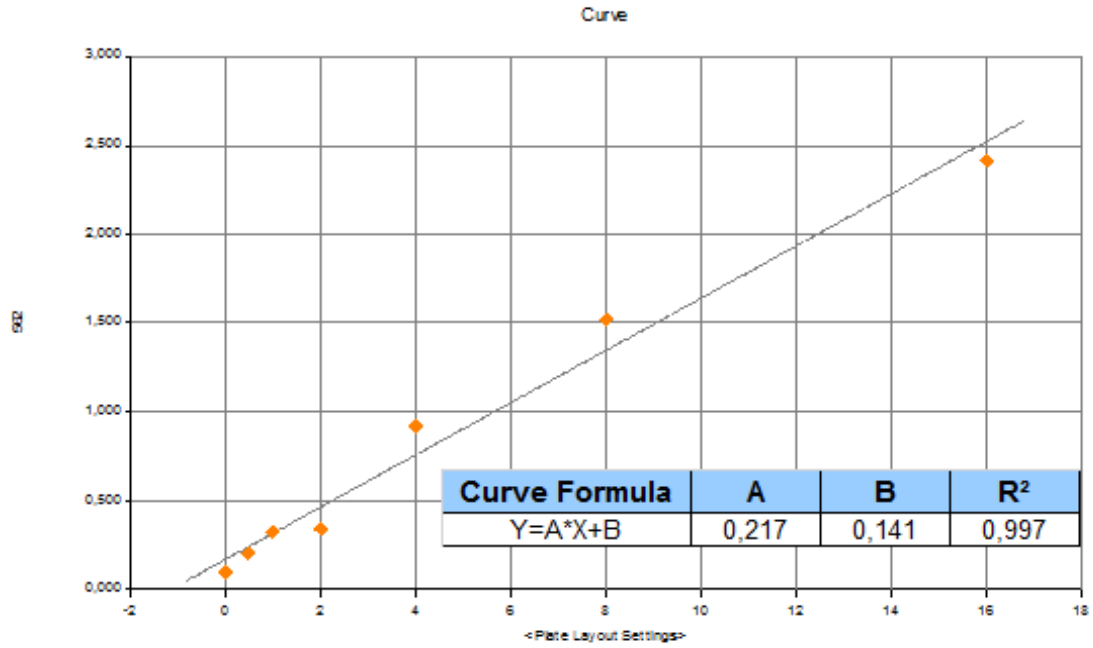
3.8.1. Lowry protein miktar tayini için çözeltiler;

- Çözelti A: 1.42 g CuSO₄ (bakır II sülfat) bir miktar su içinde çözüldü ve 100 ml' ye deiyonize su ile tamamlandı.
- Çözelti B: 2 g C₄H₄Na₂O₆ (sodyum tartarat) bir miktar su içinde çözüldü ve 100 ml' ye deiyonize su ile tamamlandı.
- Çözelti C: 14.30 g Na₂CO₃ (sodyum karbonat) ve 2.85 g NaOH (sodyum hidroksit) bir miktar su içinde çözüldü ve 500 ml' ye deiyonize su ile tamamlandı.
- 1N Folin çözeltisi: 2N Ticari çözeltidir. 1:1 oranında deiyonize su ile dilüe edildi ve ışıktan korundu.
- BSA standart eğri çözeltisi: Bovine Serum Albumin'in standart eğri oluşturmak için 15 µg/µL olacak şekilde deiyonize su ile stok çözeltisi hazırlandı ve seri dilüsyon yapıldı.

3.8.2. Western blot analizi için hazırlanan çözeltiler;

- 6X Yükleme tamponu(sample buffer): 7 ml 4X yığınlama jeli çözeltisi, 3,6 ml gliserol, 1 g SDS, 1,2 mg bromofenol mavisi deiyonize su ile 10 ml'ye tamamlandı. 5-10 dakika kaynatıldı.
- 6X Protein yükleme tamponu: 100 µL tampon içine 4 µL β-merkapt etanol eklendi.
- %10 SDS çözeltisi: 10 g sodyum dodesil sülfat (SDS) tartılarak hafifçe ısıtılan 100 ml deiyonize su ile çözüldü.
- %30 Akrilamid-Bisakrilamid çözeltisi: 29 g bisaklamit ve 1g akrilamid tartılarak deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlandı.
- %10 Amonyum persülfat çözeltisi: 100 mg amonyum persülfat (APS) tartılarak deiyonize su ile 1 ml'ye tamamlandı.
- 4X Yığınlama(Stacking) jeli çözeltisi: 3,0275 g Tris baz, 0,2 g SDS tartılarak deiyonize su ile 50 ml'ye tamamlandı. pH: 6,8 e ayarlandı.

- 4X Ayırma(Separating) jeli çözeltisi: 9,09 g Tris baz, 0,2 g SDS tartılarak deiyonize su ile 50 ml'ye tamamlandı. pH: 8,8 e ayarlandı.
- 10X Elektroforez stok yürütme çözeltisi: 6,055 g Tris baz 28,82 g glisin tartılarak deiyonize su ile 200 ml'ye tamamlandı.
- 1X Elektroforez yürütme çözeltisi: 100 ml 10X Elektroforez stok yürütme çözeltisine 10 ml %10 SDS eklendi ve deiyonize su ile 1 litreye tamamlandı.
- Transfer çözeltisi: 100 ml 10X Elektroforez stok yürütme çözeltisine 200 ml metanol eklendi ve hacim deiyonize su ile 1 litreye tamamlandı.
- TBS çözeltisi: 2,42 g tris baz, 9 g NaCl (sodyum klorür) tartılıp deiyonize su ile 1 litreye tamamlandı. pH 7,4'e ayarlandı.
- TBST blotlama çözeltisi: 1 litre TBS içerisine 1000 µL Tween 20 eklenir. 10 dk magnetik karıştırıcı ile karıştırıldı.
- %5 Bloklama çözeltisi: 500 mg süt tozu tartılarak 10 ml TBST içinde çözüldü.
- Film banyosunda kullanılan developer çözeltisi: Developer karışımı A(hidrokinon), B(%77.5 asetik asit) ve C(glutaraldehit) şeklinde üç ayrı çözeltilerden oluşmaktadır. 5 L'lik karışım için; 1400 ml A, 50 ml B,50 ml C, 3500 ml distile su kullanıldı. Developer güneş ışığından korunmalıdır.
- Film banyosunda kullanılan fixer çözeltisi: Fixer karışımı A(hidrokinon) ve B(%77.5 asetik asit) olmak üzere iki çözeltilerden oluşmaktadır. 5 L' lik karışım için, 3500 ml distile su, 1250 ml A, 250 ml B. Karışımın güneş ışığından korunmasına gerek yoktur.



Şekil 3.15.:BSA standart eğrisi

3.8.3. Jel Hazırlanması

Jel hazırlama işlemi 2 aşamada gerçekleştirildi. Öncelikle ayırma jel çözeltisi hazırlanıp döküldü daha sonra yığınlama jel çözeltisi döküldü. Ayırma jel çözeltisi döküldükten sonra n-butanol eklenerek jelin üstünün düzleşmesi sağlandı. Daha sonra n-butanol çözeltisi uzaklaştırıldı ve distile su ile jelin üstü yıkandı. Jel katılaştıktan sonra yığınlama jel çözeltisi hazırlanarak ayırma jelinin üzerine eklendi ve ayırma tarağı ile jelin üstü kapatıldı.

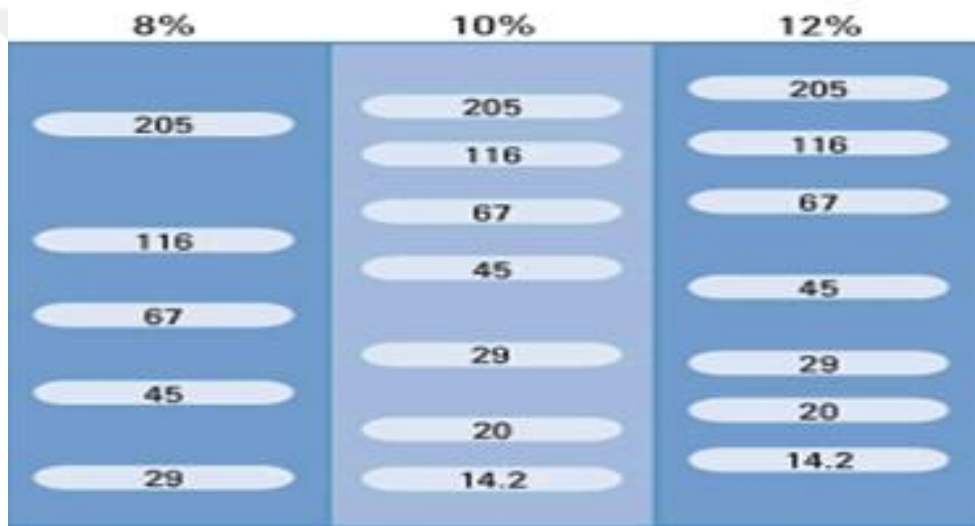
Western blot deneyinde kullanılacak jel çözeltisi %10 olarak belirlendi. Membranda primeri eklenecek proteinler 80 ile 17 kDA aralığında olduğu için optimum jel konsantrasyonunun %10 olmasına karar verildi.

% 10 luk ayırma jeli hazırlamak için (yaklaşık 10 mL için);

- 4,1 mL distile su
- 3,3 mL akrilamid-bisakrilamid çözeltisi
- 2,5 mL ayırma jel tamponu (1.5 M Tris HCl, pH 8,8)
- 0,1 mL% 10 SDS çözeltisi
- 0,05 mL APS çözeltisi
- 0,005 mL TEMED

%10 luk yığınlama jeli hazırlamak için (yaklaşık 5 mL için);

- 2,05 mL distile su
- 1,65 mL akrilamid-bisakrilamid çözeltisi
- 1,25 mL yığınlama jel tamponu(0.5 M Tris HCl, pH 6,8)
- 0,1 mL %10 SDS çözeltisi
- 0,05 mL APS çözeltisi
- 0,010 mL N,N,N,N'-Tetrametil-etilendiamin (TEMED)



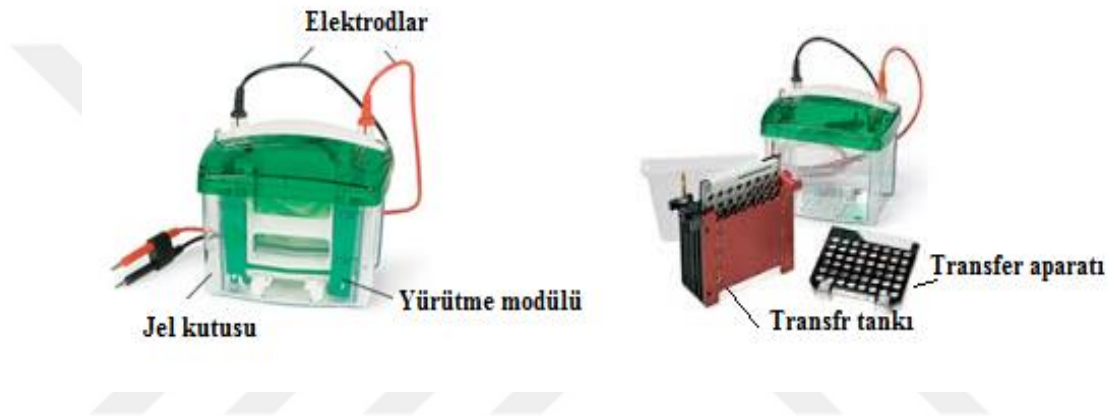
Şekil 3.16. Proteinlerin elektroforez ile yürütülmesi ile elde edilen jeldeki yürüme görüntüleri

3.8.4. Elektroforetik Yürütme/Elektroforez

- Örnekler kuyucuklara yüklendikten hemen sonra sistem kapatıldı ve elektrotlar bağlandı.
- Örnekler ayırıcı jele girinceye kadar düşük akımda 70 V gerilim uygulandı.
- Örnek ayırıcı jele geçtikten sonra ise gerilim 100 V'a çıkarıldı.
- İlk denemelerde voltaj değişimleri izlendi.
- Brom fenol mavisi jelin alt ucuna ulaşınca akım kesilerek jel tanktan uzaklaştırıldı.

3.8.5. Transfer

- Elektroforez işleminden sonra jel alınarak transfer işlemine geçilmeden önce transfer çözeltisi içinde pozitif kutuptan negatif kutuba doğru sırasıyla; transfer kağıdı, jel, membran, transfer kağıdı yerleştirilerek sandviç yapıldı.
- Transfer çözeltisi tanka doldurularak 100 V da transfer yapıldı.
- Transfer esnasında transfer çözeltisi sınır bu ısınma volt düşmesine neden olur bunu önlemek için tankın içine ve etrafına buz aküsü desteği yapıldı.
- 80 dakika taransfer işleminden sonra sandviç açıldı ve bloklama işlemine geçildi.



Şekil 3.17. Elektroforez ve Transfer düzenekleri

3.8.6. Bloklama

- Transfer sonrası proteinleri bağlanmış olan membran 1 saat %5'lik süt tozu ve %0.1'lik Tween 20 içeren Phosphate Buffered Saline (PBS) çözeltisi (bloklama çözeltisi) içinde çalkalamaya bırakıldı.
- Bu süre sonunda membran 3 kez %0.1'lik Tween 20 içeren PBS çözeltisi ile 5 dakika süre ile yıkandı.

3.8.7. Birincil antikor ile inkübasyon

- Membran bloklama çözeltisi içinde dilüe edilmiş birincil antikorlar ile ayrı günlerde gece boyu +4°C de çalkalayıcıya konarak düşük genlikte inkübe edildi. İnkübasyon süresi her antikor için ortalama 12 saat belirlendi.
- Bu süre sonunda membran 3 kez %0.1'lik Tween 20 içeren PBS çözeltisi ile 5 dakika süre ile yıkandı.

3.8.8. İkincil antikor ile inkübasyon

Membran bloklama çözeltisi içinde dilüe edilmiş horseradish peroksidaz bağlı ikincil antikor (birincil antikor tanıyan bir antikordur ve standarttır) ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda çalkalanarak birincil antikora bağlanması sağlandı.

- Bu süre sonunda membran 3 kez %0.1'lik Tween 20 içeren PBS çözeltisi ile 5 dakika süre ile yıkandı.

3.8.9. ECL ile görüntüleme

- İkincil antikora bağlı bulunan horseradish peroksidaz enzimi, ECL çözeltisi içinde bulunan Lumigen PS-3 substratını katalizler. Bu reaksiyon sonucu açığa çıkan luminol ışımaya yol açar. Bu ışıma, Western blota özel filmler ile saptandı.
- Görüntüleme işlemi aynı zamanda Erciyes Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Laboratuvarında bulunan görüntüleme cihazı (Chemi Doc MP) ile de yapıldı

3.8.10. Elde edilen görüntünün analizi

Western blot tekniği ile elde edilen proteinlerin görüntüleri Image J programı ile analiz edildi. Bu program, proteinlerin yaptığı kemilüminesan ışımının şiddetine göre farklılık arz eden görüntülerin koyuluğunu analiz eder. Daha koyu bantlar daha fazla miktarda protein olduğunu gösterir ve Image J programı bantların koyuluğunu sayısal verilere dönüştürerek analiz etmemize yardımcı olur.

3.9.RNA İzolasyonu ve Gerçek Zamanlı-PCR Deneyi

3.9.1. RNA İzolasyonu

96 lık plakaya ekilen hücrelerin etkisini araştırdığımız moleküllerle muamele süresi bittiğinde plakadaki besiyeri uzaklaştırıldı ve 100 µL soğuk PBS ile tüm kuyular yıkandı. Roche cell lysis kiti prosedürüne göre hücreler parçalandı. Her bir kuyu için 39,5 µL RealTime ready Lysis Buffer ve 0,5µL protector RNaz inhibitör karıştırılıp hücrelerin üzerine eklendi. 5 dk oda sıcaklığında beklendi ve lizatlar hazırlanarak cDNA sentezi yapıldı.

3.9.2. cDNA Sentezi

cDNA sentezi Roche cDNA sentez kiti ile yapıldı. Kitin cDNA sentez prosedürüne göre Tablo 3.4. deki işlemler sırasıyla uygulandı. cDNA sentezlendikten sonra gerçek zamanlı PCR deneyine vakit kaybetmeden geçildi.

Tablo 3.4.cDNA sentezi deneyinin aşamaları.

cDNA sentezi için eklenen madde;	Miktarı;
RNA	5 µL
Random hekzamer	2 µL
Su	4,4 µL
10 dk 65 °C de denatürasyon ve ardından;	
Revers transkriptaz reaksiyon çözeltisi (5x konsantasyon)	4 µL
RNA az inhibitörü	0,5 µL
Deoksinükleotid karışımı	2 µL
Revers transkriptaz	1,1 µL
10 dk 29 °Cde, + 60 dk 48 °C + 5 dk 85 °C de PCR cihazında bekletilerek cDNA hazırlanmış olur.	

3.9.3. Kantitatif RT- PCR

Real-time PCR kantitatif analizinde, diziye özgün olmayan floresan boyalardan ya da diziye özgün problardan yararlanılmaktadır. Böylece sonuçlar anında alınmakta ve tüm işlemler sıcaklık döngüleri başlayınca otomatik olarak devam etmektedir.

Tablo 3.5. PCR deneyinde kullanılan karışımın oranları;

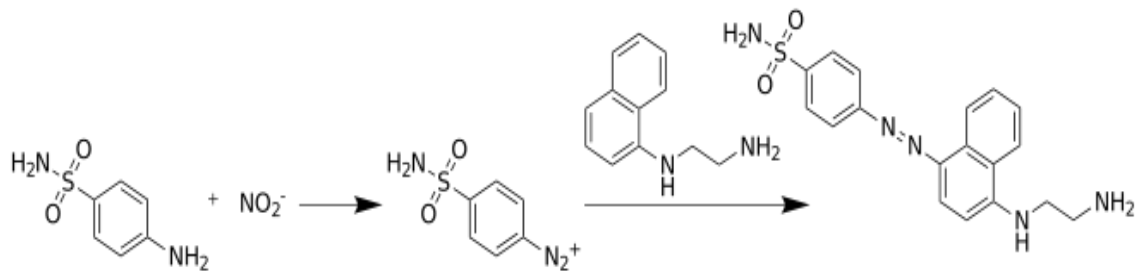
Mix	μL
cDNA	5
480 prob master	10
Su	4
Primer (Gen)	1

Deney sonunda elde edilen Ct (veya Cp) değerleri aşağıdaki formül kullanılarak % değişim olarak kontrole kıyaslanarak hesaplandı.

$$\% \text{ değişim} = 2^{-\text{Ct hedef} - \text{Ct hedef referans}} / 2^{-\text{Ct kontrol} - \text{Ct hedef referans}} \times 100$$

3.10. Nitrik Oksit Ölçüm Deneyi

Nitrik oksit (NO^-) miktarı ölçümü için 1858 yılında Peter Griess tarafından keşfedilen Griess deneyi yapıldı. Yöntemin esası şekil3.18 de özetlendiği gibi; nitrik oksitin sülfanilamid ile diazonyum tuzu oluşturması ve sonrasında diazonyum tuzunun naftiletildiamin ile birleşerek pembe renkli bir kompleks oluşturmasına dayanmaktadır. Oluşan pembe rengin şiddeti spektrofotometre ile ölçülür (540 nm) ve nitrik oksit hakkında bilgi verir.

**Şekil 3.18.:** Nitrik oksit deneyinin esasını özetleyen kimyasal reaksiyonlar.

3.11. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz her deney için ayrı ayrı değerlendirilmiş ve uygun istatistik analiz yöntemi belirlenmiştir. Tek Faktörlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) ve post hoc olarak da Tukey testi yapılmıştır. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz için Graphpad Prism 7.0 istatistik programı kullanılmıştır. Verilerin karşılaştırılmasında $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Gruplar arası farklar istatistiksel olarak;

a: kontrole göre $p < 0,05$

b: kontrole göre $p < 0,01$

c: kontrole göre $p < 0,001$

d: $A\beta$ grubuna göre $p < 0,05$

e: $A\beta$ grubuna göre $p < 0,01$

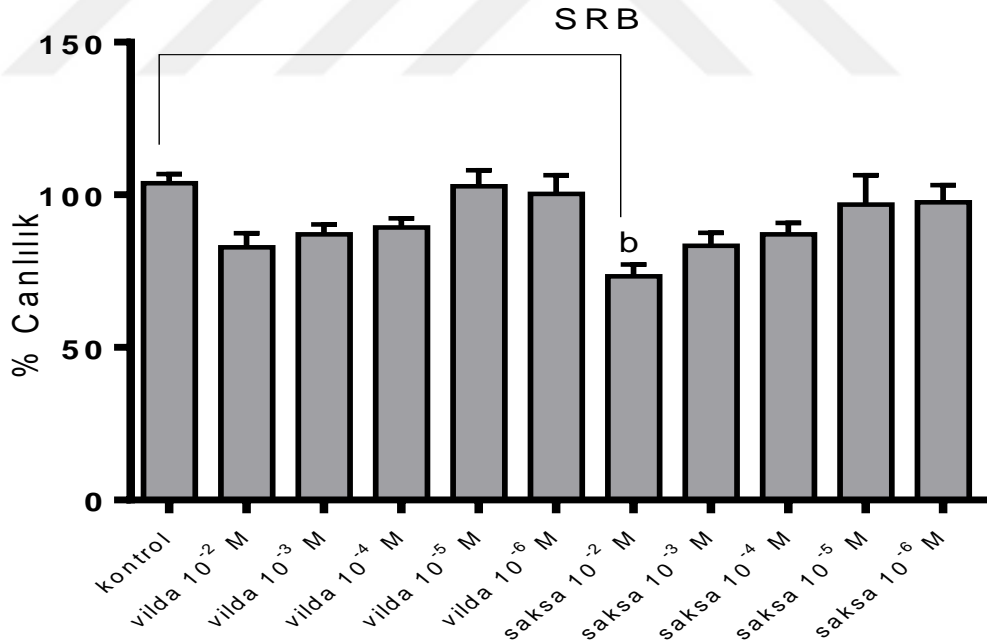
f: $A\beta$ grubuna göre $p < 0,001$

şeklinde gösterilmiştir.

4. BULGULAR

4.1.SRB Deneyi Sonuçları

Literatürde vildagliptin ve saksagliptin etken maddelerinin SH-SY5Y hücrelerinde yapılmış bir deney bulunmadığı için SRB deneyi ile ilk olarak logaritmik konsantrasyon taraması yapıldı ve hücre canlılığına etkisini araştırıldı. Bu amaçla 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} Molar (M) konsantrasyonda vildagliptin ve saksagliptin SH-SY5Y hücrelerine uygulanmıştır.



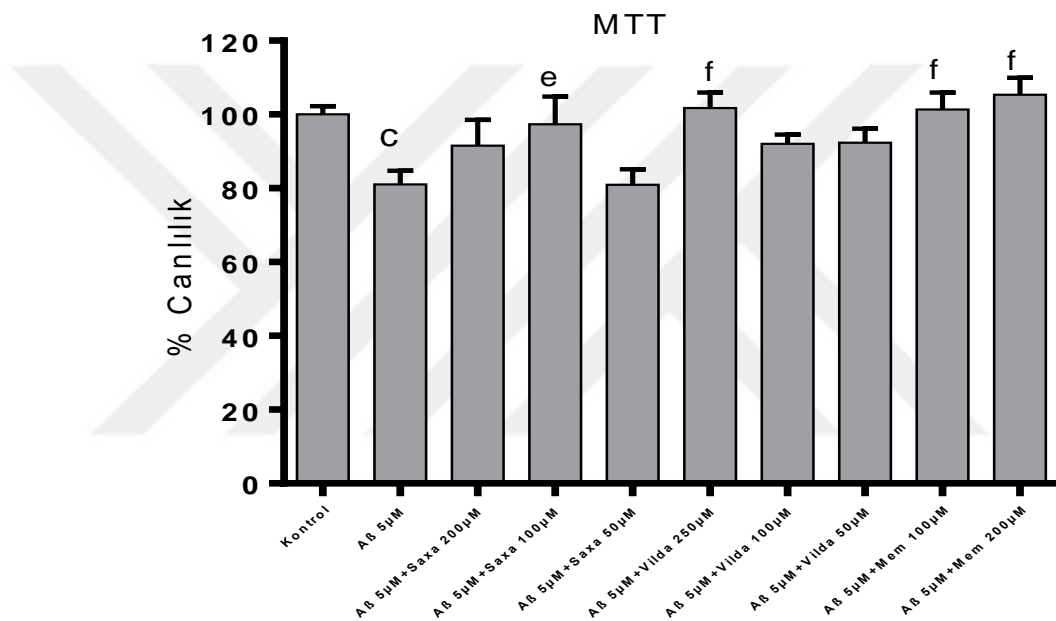
Şekil 4.19. SRB canlılık analizi sonuçları.b: kontrole göre $p < 0,01$

Deneyden elde edilen bulgularda kontrole göre canlılık sadece saksagliptinin en yüksek konsantrasyonunda anlamlı (a) bir şekilde azalmıştır. Diğer konsantrasyonlarda ise konsantrasyona bağımlı bir şekilde canlılık düşmüş fakat bu düşüş anlamlı

bulunamamıştır. Vidagliptinin yüksek konsantrasyonu canlılığı kontrole göre düşürmüş fakat bu düşüş anlamlı bulunamamıştır.

4.2.MTT Canlılık Analizi Deneyi

MTT deneyi ile vildagliptin (250, 100, 50 μ M) ve saksagliptinin (200, 100, 50 μ M) daha düşük konsantrasyonlarda canlılığa etkileri araştırılmıştır. Pozitif kontrol olan memantin literatürde önceden SH-SY5Y hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar değerlendirilerek 100 ve 200 μ M konsantrasyonu uygulanmıştır.



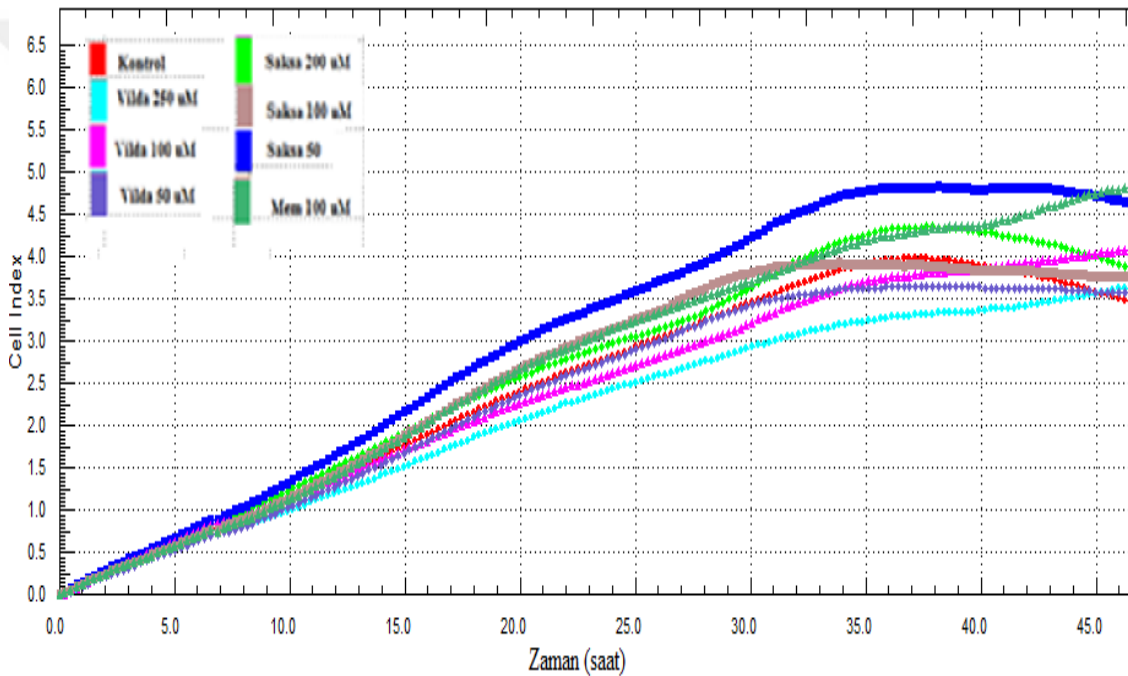
Şekil 4.20. MTT deneyi ile elde edilen % canlılık sonuçları. c: kontrole göre $p < 0,001$; e: A β grubuna göre $p < 0,01$; f: A β grubuna göre $p < 0,001$.

MTT canlılık analizi sonuçlarına göre A β (5 μ M) uygulaması canlılığı kontrole göre anlamlı bir şekilde düşürmüştür ($p < 0,05$). A β fibriler formunun canlılığı anlamlı düşürmesi literatürde de gösterilmiştir (159). Saksagliptinin 100 μ M konsantrasyonu ile vildagliptinin en yüksek konsantrasyonu olan 250 μ M, A β uygulanan gruba göre canlılığı anlamlı (sırasıyla $p < 0,01$, $p < 0,001$) bir şekilde arttırmıştır. Pozitif kontrol olan memantin de 200, 100 μ M konsantrasyonları canlılığı A β uygulanan gruba göre anlamlı ($p < 0,001$) bir şekilde arttırmıştır.

4.3. Gerçek Zamanlı Hücre Analizi Deney Sonuçları

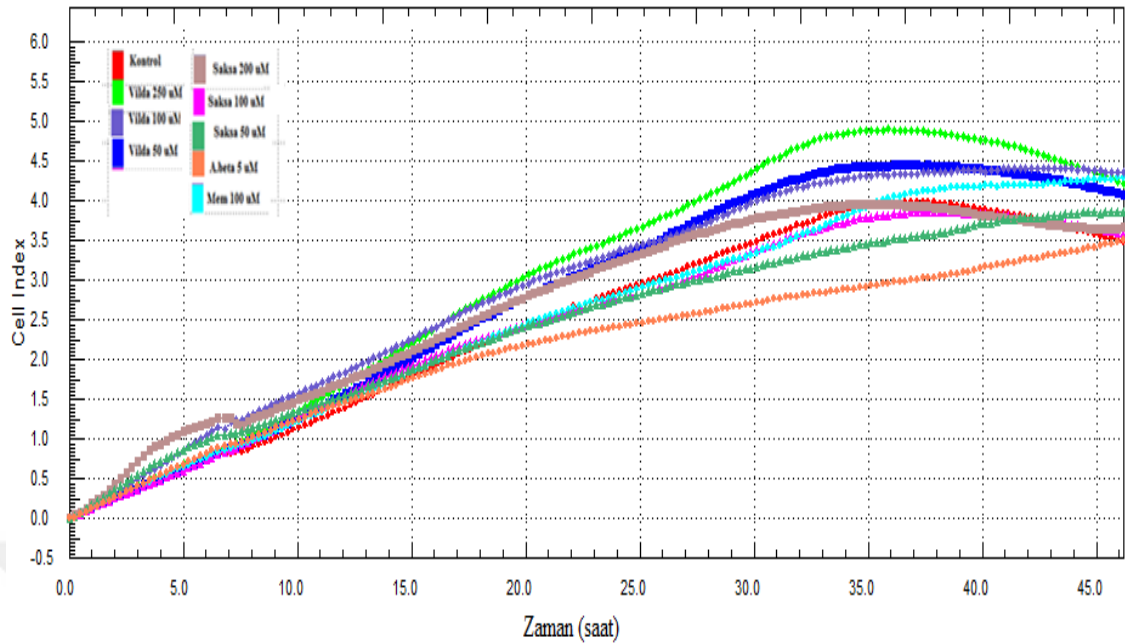
Gerçek zamanlı hücre analizi (GZHA) ile MTT deneyinde olduğu gibi vildagliptin (250, 100, 50 μM), saksagliptin (200, 100, 50 μM) ve memantinin (100 μM) $A\beta$ ile birlikte ve tek başlarına etkileri incelenmiştir. Bu yöntemde sadece 24. saatteki etki değil deney başladıktan sonraki her 15 dakikada bir alınan hücre indeksi verileri elde edilmiştir.

Etken maddeler hücre indeksinin 1'e yaklaştığı ve kararlı yükselme gösterdiği 6. saatte uygulanmıştır. Daha sonrasında ise 142 saat boyunca hücre indeksi her 15 dakikada bir kaydedilerek xCELLigence cihazı yazılımı ile bilgisayara aktarıldı.

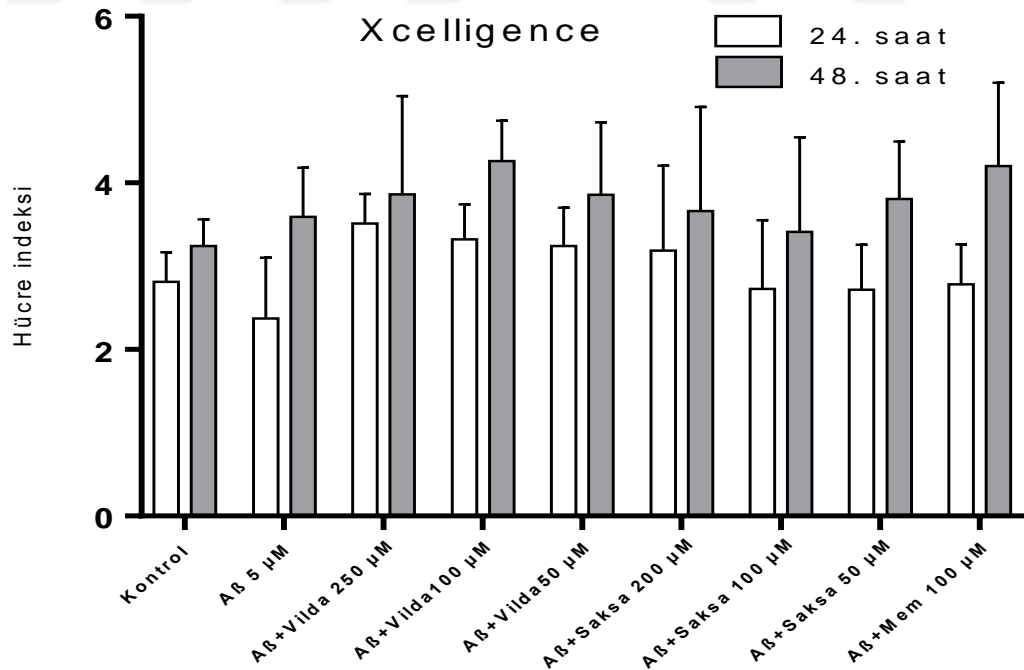


Şekil 4.21. Vildagliptin (250, 100, 50 μM), saksagliptin (200, 100, 50 μM) ve memantinin (100 μM) gerçek zamanlı elde edilen hücre indeksi üzerine etkileri.

GZHA verilerine göre saksagliptinin 50 μM konsantrasyonu hücre indeksini kontrolün üzerine çıkarmış ve 40. saatten sonra (kontrolün de düşmeye başladığı saat) hücre indeksi düşmeye başlamıştır. Kontrol grubunun hücre indeksinin düşmeye başladığı 40. saatten sonra memantin, vildagliptin (250, 100, 50 μM) ve saksagliptin (50 μM) hücre indeksi plato çizmiş ve kontrol gibi hemen düşmemiştir.



Şekil 4.23. $A\beta$ ($5 \mu\text{M}$) ve $A\beta$ ($5 \mu\text{M}$) ile vildagliptin ($250, 100, 50 \mu\text{M}$), saksagliptin ($200, 100, 50 \mu\text{M}$), memantin ($100 \mu\text{M}$)' in gerçek zamanlı elde edilen hücre indeksi üzerine sırasıyla 24. ve 48. saatteki etkileri.



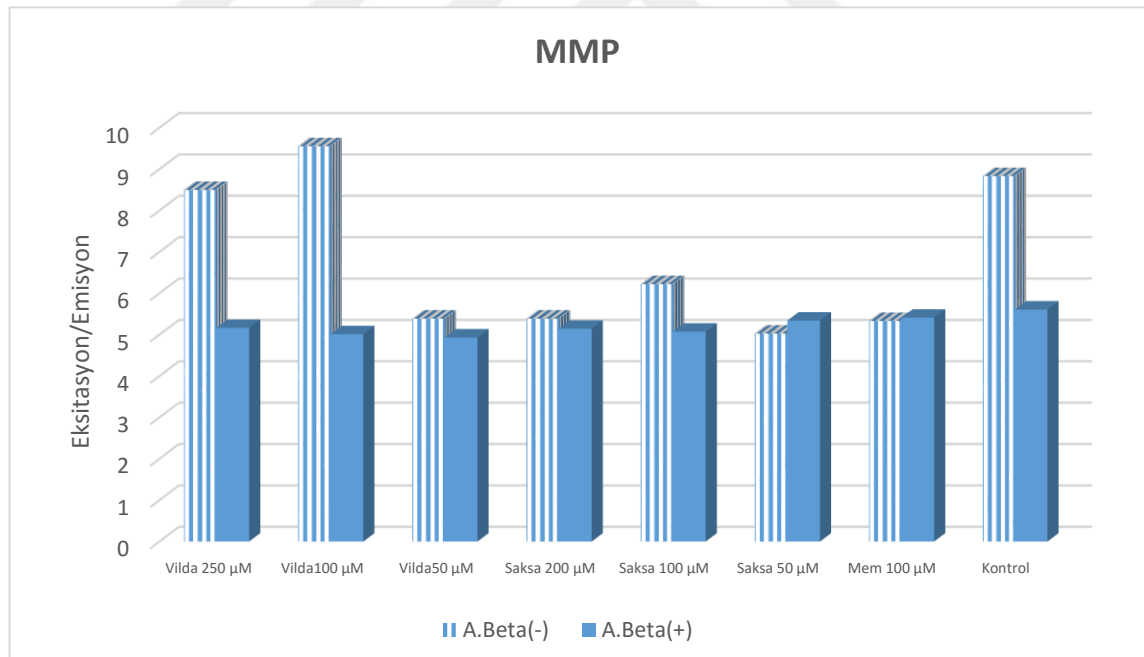
Şekil 4.22. $A\beta$ ($5 \mu\text{M}$) varlığında vildagliptin ($250, 100, 50 \mu\text{M}$), saksagliptin ($200, 100, 50 \mu\text{M}$), memantin ($100 \mu\text{M}$)' in gerçek zamanlı elde edilen hücre indeksi üzerine etkileri.

GZHA verilerine göre $A\beta$ uygulanan grubun hücre indeksi uygulama zamanından yaklaşık 12 saat sonra kontrole göre belirgin bir şekilde düşmüştür. Vildagliptin konsantrasyona bağımlı bir şekilde hücre indeksini arttırmıştır. Saksagliptinin 200 ve 50 μM konsantrasyonları hücre indeksini 35. saatlere kadar kontrole yakın bir şekilde etkilemiş, 35. saatten sonra daha farklı bir profil çizerek kontrolün düşmeye başladığı 40. saatten itibaren hücre indeksi artmaya devam etmiştir. Bütün grupların hücre indeksi 80. saatten sonra düşmeye başlamıştır.

Memantin hücre indeksini $A\beta$ 'nın düşmeye başladığı saatlerde yükseltmeye devam ettirmiştir.

4.4.Mitokondriyal Membran Potansiyeli Deney Sonuçları

MMP deneyinde $A\beta$ ile ve tek başlarına vildagliptin, saksagliptin ve memantin etkisi araştırılmıştır.



Şekil 4.24. Mitokondriyal membran potansiyeli üzerine $A\beta$ (5 μM) eklenmiş ve eklenmemiş vildagliptin (250, 100, 50 μM), saksagliptin (200, 100, 50 μM) ve memantin (100 μM) etkileri.

Vildagliptinin 250, 100, 50 μM ; saksagliptinin 200, 100, 50 μM ve memantin 100 μM konsantrasyonları ile $A\beta$ 'nın 5 μM konsantrasyonu MMP üzerine etkileri araştırılmıştır. Sonuçlar kırmızı/yeşil floresan ışımının saptanması ile kontrole göre kıyaslanmıştır.

MMP deneyi sonuçlarına göre $A\beta$, MMP düzeyini düşürmüştür. Vildagliptinin 250 ve 100 μ M konsantrasyonlarında tek başına kontrole yakın MMP düzeyi saptanmıştır. Pozitif kontrol olan memantin MMP'yi kontrol düzeyine çıkartamamıştır. $A\beta$ uygulanan gruplardan hiçbiri uygulanan konsantrasyonlarda $A\beta$ 'nin düşürdüğü MMP'yi kontrol düzeyine çıkartamamıştır.

4.5. Western Blot Deneyi Sonuçları

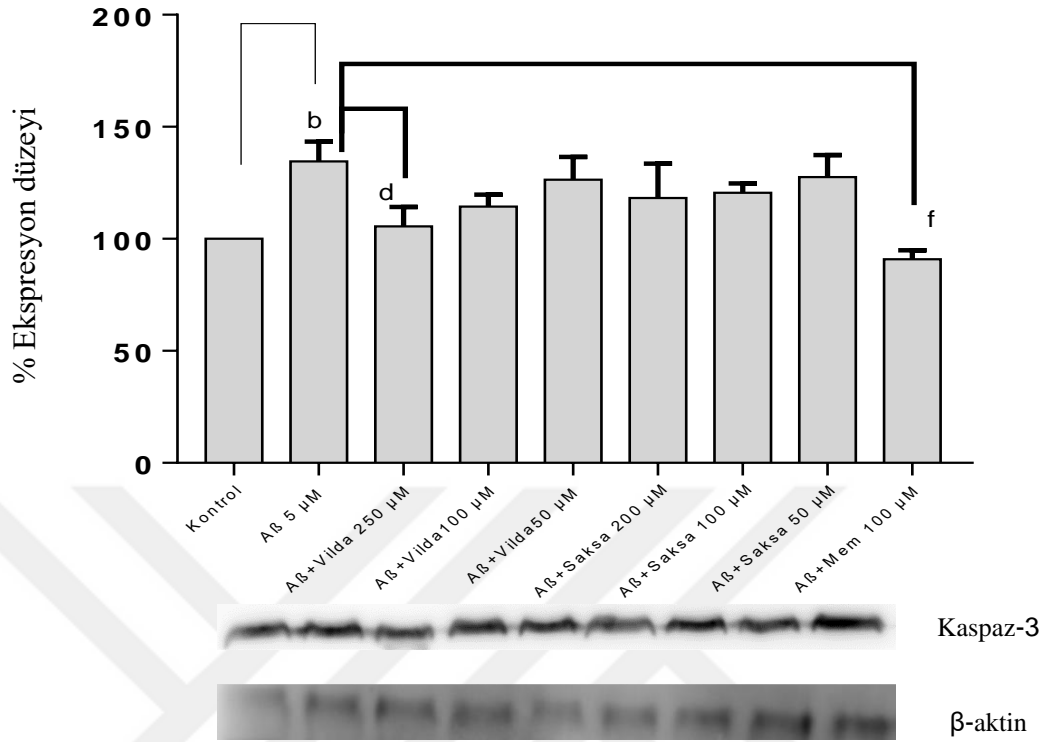
Western blot deneyi ile apoptozda rol oynayan kaspaz-3, kaspaz-9, kaspaz-12 proteini ile p-tau proteininin semi-kantitatif ölçümü yapılmıştır. Normalizasyon proteini olarak β -aktinin de düzeyi aynı yöntemle ölçülmüştür. Apoptoz yolağında rol alan kaspaz proteinleri ve hücre iskeletinin fizyolojik fonksiyonlarının yerine getirilmesinde rol alan tau proteini ekspresyon düzeyleri β -aktin protein ekspresyon düzeyi ile normalize edilmiştir.

4.5.1. Kaspaz-3

Kaspaz-3 protein ekspresyonu western blot tekniği ile belirlendi. Yarı-kantitatif bir analiz olan bu teknikte $A\beta$ (5 μ M), vildagliptin (250, 100, 50 μ M), saksagliptin (200, 100, 50 μ M) ve memantin (100 μ M) hücrelere uygulandıktan 24 saat sonra kaspaz-3 proteini üzerine etkileri araştırılmıştır.

Kaspaz-3 proteini $A\beta$ uygulanan grupta kontrole göre anlamlı ($p < 0,01$) bir şekilde artmıştır. Vildagliptin ile birlikte uygulanan $A\beta$ gruplarda; Vildagliptin'in konsantrasyona bağımlı olarak $A\beta$ 'nin Kaspaz-3 üzerine etkisini azalttığı ve kontrol değerlerine yaklaştırdığı gözlenmiştir. Memantin 100 μ M konsantrasyonu ile vildagliptin'in 250 μ M uygulanan gruplar $A\beta$ uygulanan gruba göre kaspaz-3 proteinini benzer bir şekilde düşürmüştür ve bu düşüş istatistiksel olarak da anlamlı (sırasıyla $p < 0,05$, $p < 0,001$) bulunmuştur.

Vildagliptinin diğer iki konsantrasyonu (100, 50 μ M) da kaspaz-3'ü $A\beta$ uygulanan gruba göre düşürdüğü fakat bu düşüşün anlamlı olmadığı görülmüştür. Saksagliptinin kaspaz-3 proteinine etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ancak konsantrasyona bağımlı hafif bir düşme gözlenmiştir.

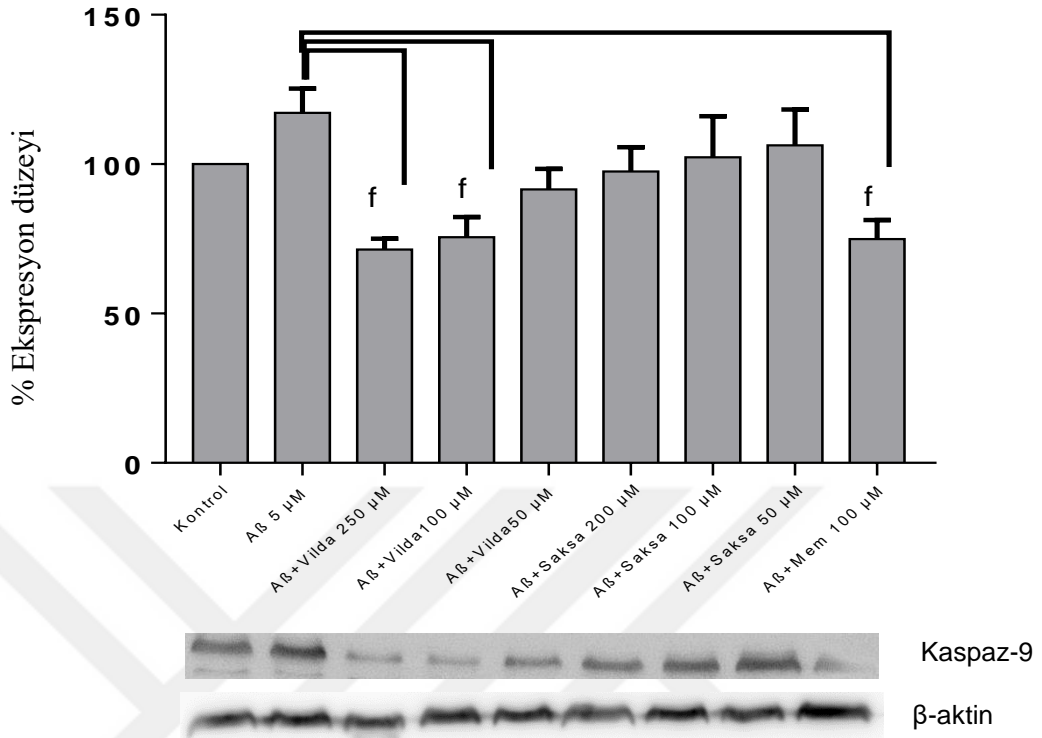


Şekil 4.25. Kaspaz-3 protein ekspresyonu bulguları. b: kontrole $p < 0,01$; d: $A\beta$ grubuna göre $p < 0,05$; f: $A\beta$ grubuna göre $p < 0,001$.

Saksagliptin kaspaz-3 proteinini kontrol ve $A\beta$ grubuna göre anlamlı bir şekilde değiştirmemiştir. Memantin ise kaspaz 3'ü $A\beta$ grubuna göre anlamlı bir şekilde azaltmıştır.

4.5.2. Kaspaz-9

Kaspaz-9 protein ekspresyonu western blot tekniği ile belirlendi. $A\beta$ (5 μ M), vildagliptin (250, 100, 50 μ M), saksagliptin (200, 100, 50 μ M) ve memantin (100 μ M) hücelere uygulandıktan 24 saat sonra kaspaz-9 proteinini üzerine etkileri araştırılmıştır.

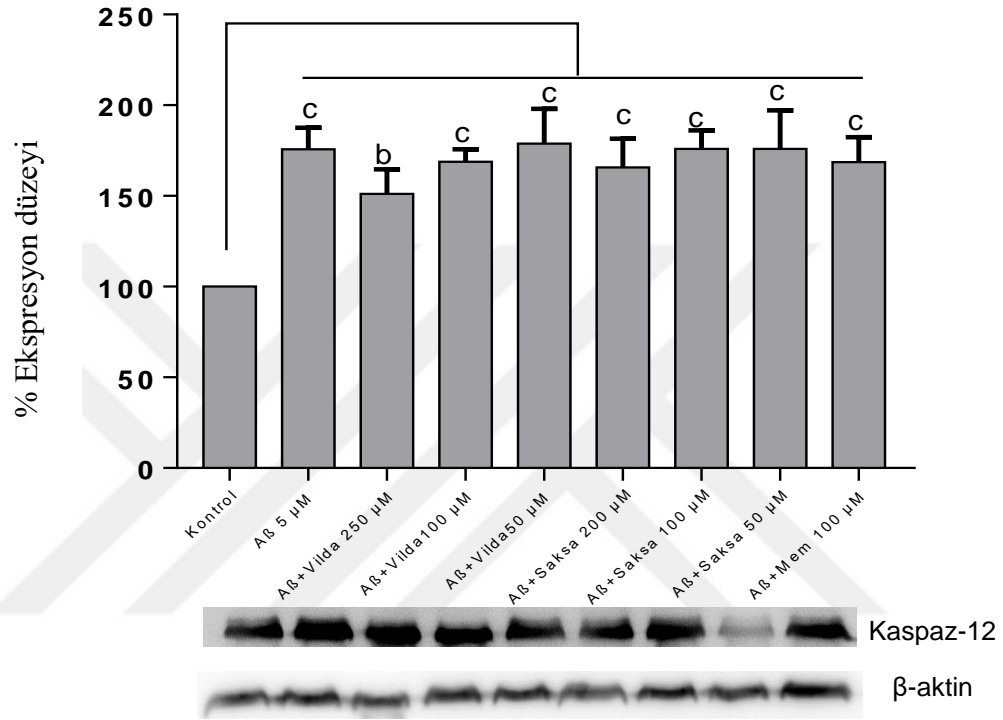


Şekil 4.26.: Kaspaz-9 protein ekspresyon sonuçları. f: A β grubuna göre p<0,001.

Kaspaz-9 proteini ekspresyonu sonuçlarına göre A β uygulanan grupta kontrole göre bir kaspaz-9 protein artışı gözlenmiştir ancak bu artış anlamlı değildir. A β uygulanan gruba göre vildagliptinin 250 ve 100 μ M konsantrasyonu ile memantinin 100 μ M konsantrasyonu kaspaz-9'u anlamlı bir şekilde azaltmıştır. Saksagliptin ise kaspaz-9 u konsantrasyona bağımlı bir şekilde azaltmıştır fakat bu azalış A β ve kontrol grubuna göre anlamlı bulunamamıştır.

4.5.3. Kaspaz12

Kaspaz-12 protein ekspresyonu western blot tekniği ile belirlendi. $A\beta$ ($5\mu\text{M}$), vildagliptin (250, 100, 50 μM), saksagliptin (200, 100, 50 μM) ve memantin hücrelere uygulandıktan 24 saat sonra ($100\mu\text{M}$) kaspaz-12 proteini üzerine etkileri araştırılmıştır.

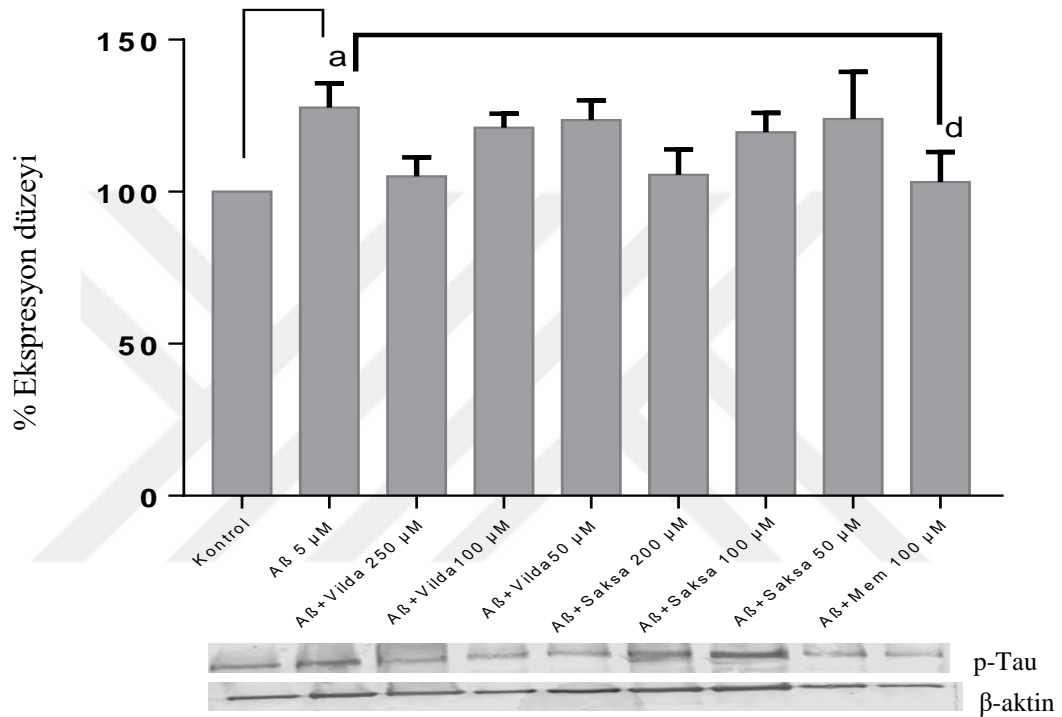


Şekil 4.27. Kaspaz-12 protein ekspresyon sonuçları. b:kontrolle göre $p<0,01$; c: kontrolle göre $p<0,001$.

Kaspaz-12 protein ekspresyonu kontrole göre tüm gruplarda anlamlı bir şekilde artmıştır. $A\beta$ uygulanan gruba göre vildagliptin, saksagliptin ve memantin gruplarında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Vildagliptin konsantrasyona bağımlı bir şekilde kaspaz-12'yi düşürmüştür. Ayrıca saksagliptinin yüksek konsantrasyonu olan 200 μM da kaspaz-12 yi $A\beta$ uygulanan gruba göre düşürmüştür. Fakat bu düşüşler anlamlı bulunamamıştır.

4.5.4. Fosforile tau

p-Tau protein ekspresyonu western blot tekniği ile belirlendi. $A\beta$ ($5\mu\text{M}$), vildagliptin ($250, 100, 50\ \mu\text{M}$), saksagliptin ($200, 100, 50\ \mu\text{M}$) ve memantin hücrelere uygulandıktan 24 saat sonra ($100\ \mu\text{M}$) kaspaz-12 proteini üzerine etkileri araştırılmıştır.



Şekil 4.28. p-Tau protein ekspresyon sonuçları. a: kontrole göre $p < 0,05$; d: $A\beta$ grubuna göre $p < 0,05$.

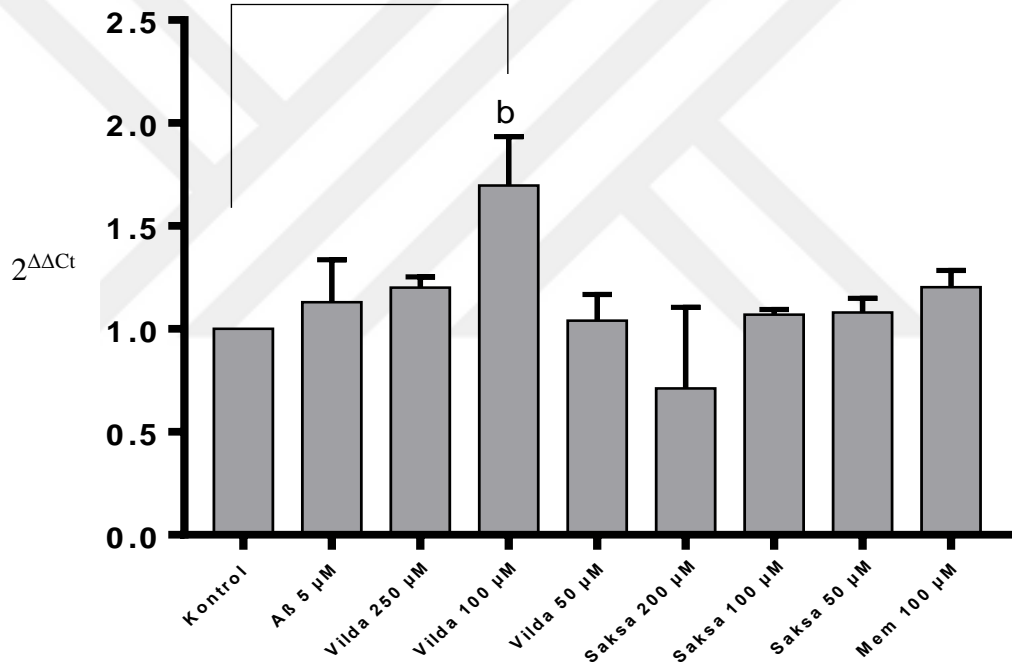
p-Tau proteini ekspresyonu $A\beta$ uygulanan grupta kontrole göre anlamlı bir artışa neden olmuştur (Şekil 4.28). Vildagliptin ve saksagliptin yüksek konsantrasyonunda daha fazla olmak üzere konsantrasyona bağımlı bir şekilde p-tau'yu $A\beta$ grubuna göre düşürmüştür. Fakat bu düşüşler anlamlı bulunamamıştır. Memantin uygulaması $A\beta$ ile artan p-tau protein ekspresyonunu anlamlı bir şekilde azaltmıştır.

4.6.qRT-PCR Deneyi Sonuçları

PCR deneyi ile APP, PSEN1, PSEN2 genlerinin mRNA düzeyinde ekspresyonları incelendi.

4.6.1. APP mRNA

$A\beta$ (5 μ M), vildagliptin (250, 100, 50 μ M), saksagliptin (200, 100, 50 μ M) ve memantinin (100 μ M) hücrelere uygulandıktan 24 saat sonraki APP mRNA ekspresyonu üzerine etkileri araştırılmıştır.

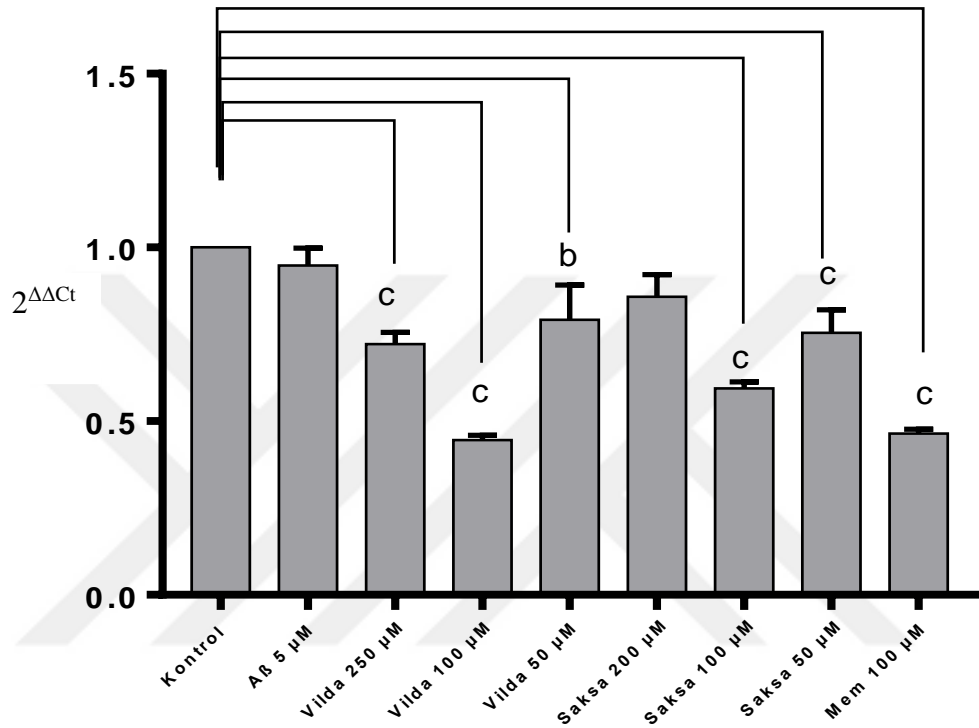


Şekil 4.29. Vildagliptin, saksagliptin, memantin ve $A\beta$ 'nin APP mRNA düzeyi üzerine etkileri. b: kontrole göre $p < 0,01$; d: $A\beta$ grubuna göre $p < 0,05$.

PCR deneyinden elde edilen sonuçlara göre APP mRNA düzeyinde 100 μ M vildagliptin dışında 24. saatte anlamlı bir değişiklik olmamıştır. Kontrole göre sadece vildagliptinin 100 μ M konsantrasyonunda anlamlı bir artış gözlenmiştir. Saksagliptinin yüksek konsantrasyonu olan 200 μ M uygulanan grupta ise kontrole göre bir düşüş gözlenmiştir. Ancak bu düşüş anlamlı bulunamamıştır. Memantinde ise kontrole göre APP' ye anlamlı bir etki gözlenmemiştir (Şekil 4.28).

4.6.2. PSEN1 mRNA

$A\beta$ ($5\mu\text{M}$), vildagliptin (250, 100, 50 μM), saksagliptin (200, 100, 50 μM) ve memantinin (100 μM) hücrelere uygulandıktan 24 saat sonraki PSEN1 mRNA ekspresyonu üzerine etkileri araştırılmıştır.

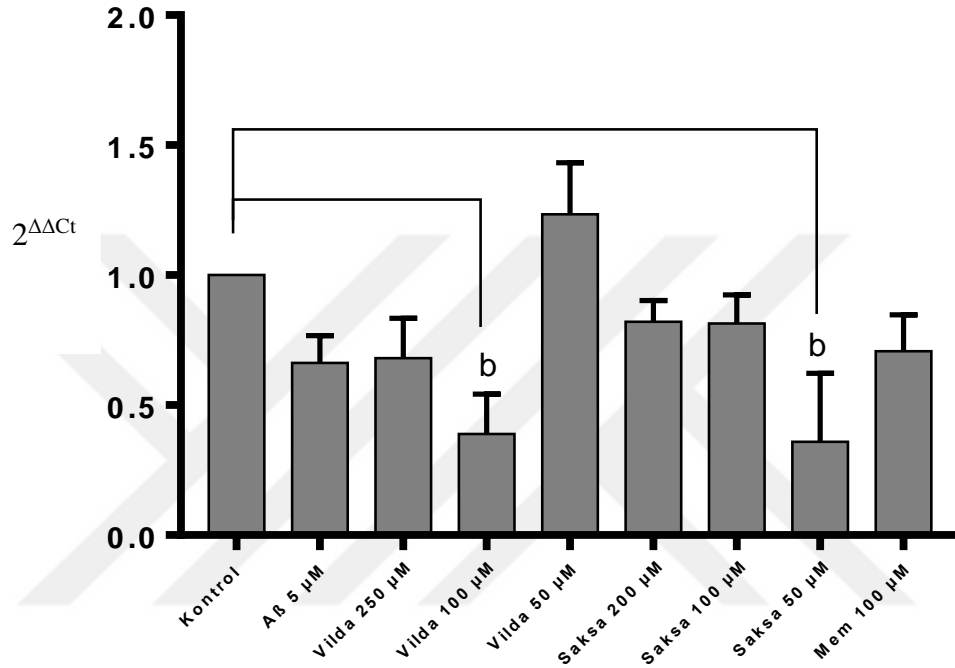


Şekil 4.30. Vildagliptin, saksagliptin, memantin ve $A\beta$ 'nin PSEN1 mRNA düzeyi üzerine etkileri. b: kontrole göre $p < 0,01$; c: kontrole göre $p < 0,001$.

PSEN1 mRNA düzeyi kontrole göre vildagliptinin özellikle 100 μM ' da olmak üzere incelenen tüm konsantrasyonlarında, saksagliptin ise 50 μM ve 100 μM , memantin 100 μM uygulanan gruplarda anlamlı (vildagliptin 50 μM için konsantrasyonu $p < 0,01$ diğer gruplar için $p < 0,001$) bir şekilde düşmüştür. Saksagliptinin yüksek konsantrasyonu olan 200 μM uygulanan grupta kontrole göre anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Memantin PSEN1' i kontrole göre anlamlı ($p < 0,001$) bir şekilde düşürmüştür.

4.6.3. PSEN2 mRNA

$A\beta$ (5 μ M), vildagliptin (250, 100, 50 μ M), saksagliptin (200, 100, 50 μ M) ve memantinin (100 μ M) hücelere uygulandıktan 24 saat sonraki PSEN2 mRNA ekspresyonu üzerine etkileri araştırılmıştır.

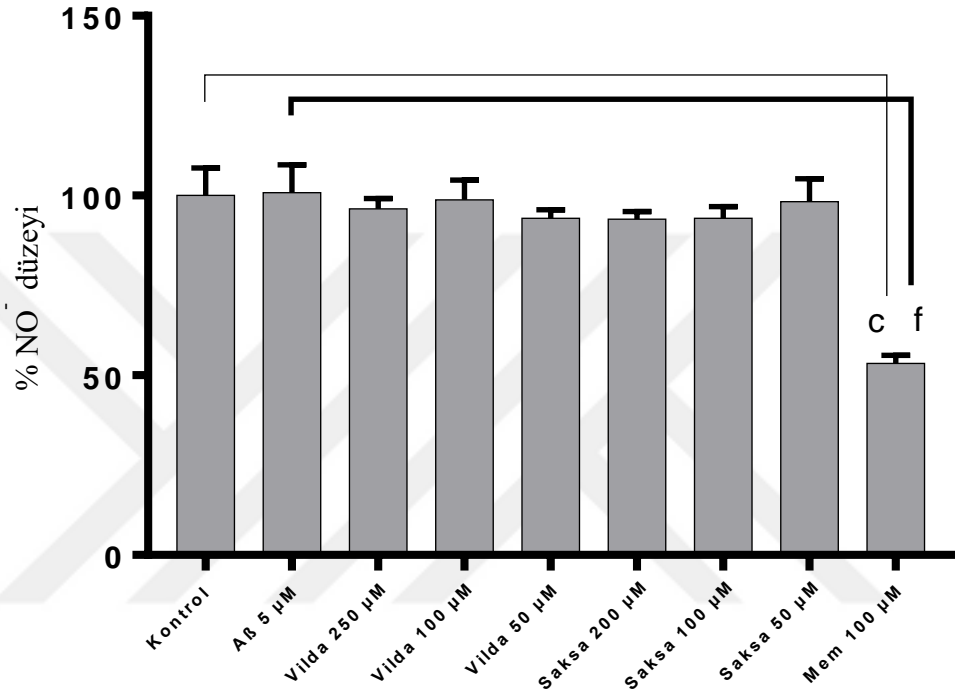


Şekil 4.31. Vildagliptin, saksagliptin, memantin ve $A\beta$ 'nin PSEN2 mRNA düzeyi üzerine etkileri. b: kontrole göre $p < 0,01$.

PSEN2 mRNA düzeyi kontrole göre vildagliptin 100 μ M ve saksagliptin 50 μ M uygulanan konsantrasyonlarında anlamlı bir şekilde düşmüştür. Ancak her iki madde için de 24. saatte PSEN2 geni üzerine etkileri konsantrasyona bağımlı bulunamamıştır. Memantin PSEN2'yi kontrole göre azaltmıştır fakat bu azalma anlamlı bulunamamıştır.

4.7.Nitrik Oksit Ölçümü Deney Sonuçları

Griess deneyi ile $A\beta$ (5 μ M), vildagliptin (250, 100, 50 μ M), saksagliptin (200, 100, 50 μ M) ve memantin (100 μ M) hücrelere uygulandıktan 24 saat sonraki nitrik oksit üzerine etkileri araştırılmıştır.



Şekil 4.32.Vildagliptin, saksagliptin, memantin ve $A\beta$ 'nin nitrik oksit düzeyi üzerine etkileri. c: kontrole göre $p<0,00$; f: $A\beta$ grubuna göre $p<0,001$.

Griess deneyi ile elde edilen sonuçlara göre NO⁻ memantin 100 μ M uygulanan grupta kontrole göre anlamlı bir şekilde düşmüştür. Diğer gruplarda kontrole göre anlamlı bir değişme olmamıştır.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

WHO, Türkiye nüfusunun 1997 de %4,5 inin 65 yaş üzeri olduğunu ve bu rakamın 2050 de %20 leri geçeceğini bildirmiştir (3). Yaşlı nüfusun artmasıyla AH ve orta dereceli kognitif bozukluk da artmaktadır. Beyinde gözlenen nörofibriler yumaklar, amiloid plaklar, fosforile tau, nörodejenerasyon ve nöron kaybı, kolinerjik yolakta değişmeler ve sinaptik yolaktaki disfonksiyonlar AH'da öne çıkan patolojilerdir.

FDA ve ülkemizde de Sağlık Bakanlığı tarafından onaylanmış AH tedavisinde kullanılan ilaç yalnızca 5 tanedir. Bunlardan 4 ü kolinesteraz inhibitörü (rivastigmin, galantamin, takrin, donepezil) diğeri de N-metil D- aspartat inhibitörü (memantin) ilaç kategorisindedir. Bu ilaçların tümü de hastalığın radikal tedavisinde henüz başarı sağlayamamıştır. (1). NMDA reseptör antagonisti memantin deneysel çalışmalarda beyinde $A\beta$ ve p-tau'yu azalttığı saptanmıştır(8).

Son yıllarda diyabet ve Alzheimer hastalığı üzerinde yapılan epidemiyolojik çalışmalar diyabetin bazı komplikasyonlarının AH'nı tetikleyebileceğini düşündürmüştür. Çünkü diyabet hastalarının AH'na yakalanma riski diyabet olmayan kişilere göre daha fazla bulunmuştur. Diyabet tedavisinde kullanılan vildagliptin ve saksagliptin prelinik 2 çalışmada $A\beta$, p-tau, oksidatif stres gibi parametreler üzerinde etkili bulunmuş ve AH patolojisinde önemli rolü olan bu parametreleri konsantrasyona bağımlı olarak düşürmüştür(146, 151).

Tez çalışması kapsamındaki hücre canlılığı analizlerinde SH-SY5Y hücrelerine etken maddeler uygulandıktan 24 saat sonra elde edilen MTT canlılık analizi verileri; $A\beta$ toksisitesine karşı saksagliptinin 50 ve 100 μ M, vildagliptinin 250 μ M, memantin 200 ve 100 μ M konsantrasyonlarının hücre canlılığını $A\beta$ grubuna kıyasla anlamlı koruduğu sonucu elde edilmiştir. Memantin SH-SY5Y hücrelerinde hücre canlılığını apoptozu

önleyerek koruduğu önceden gösterilmiştir (160). Memantin uygulanan pozitif kontrol grubuna ek olarak vildagliptin ve saksagliptinin de SH-SY5Y hücrelerinde canlılığı koruması ilk kez bu tezde ortaya konmuştur. Ayrıca 2017 yılında yapılan prelinik bir çalışmada bir diğer DPP-4 inhibitörü ilaç olan linagliptinin kognitif fonksiyonları olumlu etkilediği gösterilmiştir (161). DPP-4 inhibitörü ilaçlar üzerinde yapılan bu çalışmalar, AH'da hastalığın progresyonunda önemli bir faktör olan hücre canlılığının korunması üzerindeki etkileri dikkate alındığında kayda değer bir bulgudur. Bu bulgunun AH'da hücre ölümü ile sonuçlanan yolaktaki etkileri de apoptoz proteinleri üzerinden bu tezde ayrıca incelenmiştir.

GZHA yöntemi ile elde edilen veriler $A\beta$ toksisitesinin SH-SY5Y hücrelerine uygulandıktan yaklaşık 12 saat sonra canlılığı kontrole göre düşürdüğünü göstermiştir. SH-SY5Y hücrelerinde daha önceden GZHA yöntemi ile bir etken madde araştırılmamıştır. Ancak mikroglia hücreleri ve SH-SY5Y üzerinde pentazosin etken maddesinin etkilerinin incelendiği bir çalışmada GZHA, mikroglia migrasyon aktivitesini değerlendirmek için kullanılmıştır (162).

GZHA ile elde edilen veriler hücrelerin $A\beta$ 'nin fibril formuna maruz kaldıktan sonra MTT analizinde olduğu gibi canlılığın azalması yönünde sonuçlanmıştır. Vildagliptin konsantrasyona bağımlı hücre indeksini $A\beta$ grubunun üzerine çıkarmıştır. Yaklaşık 18. saatte $A\beta$ 'nin hücre indeksi düşmeye başlamıştır fakat vildagliptin uygulanan grupların hücre indeksi kontrole yakın bir profil çizmiştir. Gerçek zamanlı elde edilen bu sonuç vildagliptinin SH-SY5Y hücrelerini $A\beta$ toksisitesinden koruduğunu göstermiştir ancak istatistiksel olarak 24. ve 48. saatteki hücre indeksleri karşılaştırıldığında anlamlı bir değişim saptanamamıştır.

Saksagliptin uygulanan grubun hücre indeksi 18. saatten sonra $A\beta$ grubunun hücre indeksinin üzerinde kaydedilmiştir. Ayrıca kontrol grubunun hücre indeksinin düşmeye başladığı 40. saatten sonra saksagliptinin 200 ve 50 μ M konsantrasyonları uygulanan grupların hücre indeksi 60. saatlere kadar artmaya devam etmiştir. Bu sonuç saksagliptinin hücre proliferasyonu, adezyonu ve morfolojisini olumlu yönde değiştirebileceğini düşündürmüştür. Kontrol grubunun hücre indeksinin düşmeye başladığı saatler, besiyerinin artık hücrelere yeterli gelmediğinin bir göstergesidir. Aynı durum saksagliptin uygulanan grup için de düşünüldüğünde hücre indeksinin kontrolün düşmeye başladığı saatlerde düşmemesi üzerinde ileri çalışmalar yapmaya değer bir

bulgudur. Saksagliptinin 100 μ M konsantrasyonu yaklaşık 48. saatlere kadar kontrole yakın bir profil çizmiştir. 48. saatten sonra da kontrol gibi hücre indeksi düşmüştür fakat kontrole göre daha yavaş bir düşüş gözlenmiştir.

$A\beta$, 21. kromozomda kodlanan bir transmembran protein olan APP'nin proteolitik kesimi ile oluşur. APP'nin proteolitik kesimi α , β , γ sekretazlar tarafından kontrol edilmektedir. β ve γ sekretazlar tarafından kesim sonucu $A\beta$ molekülleri oluşmakta, α sekretazlar tarafından kesimde ise $A\beta$ molekülleri oluşmamaktadır. Dolayısıyla APP artmış olması demek direkt $A\beta$ sonucunu doğurmaz. Aynı zamanda γ sekretazların yapısına katılan PSEN1 ve PSEN2 proteinleri AEB4H da risk faktörleri arasında değerlendirilmektedir (64-67).

Vildagliptinin 100 μ M konsantrasyonu APP'nin mRNA miktarını kontrole göre anlamlı arttırmıştır. Saksagliptinin en yüksek konsantrasyonu olan 200 μ M uygulanan grupta ise APP mRNA miktarı azalmıştır. Bu sonuç saksagliptinin APP ekspresyonunu azaltabileceğini göstermekle birlikte yine de APP protein miktarına bakılmadan kesin yorum yapılamamaktadır. Memantin uygulanan grupta APP mRNA miktarını kontrole yakın çıkmıştır. Memantin APP düzeyini SK-N-SH nöroblastoma hücrelerinde düşürdüğü ve aynı zamanda $A\beta$ düzeyini de azalttığı önceden gösterilmiştir (163).

Vildagliptin APP mRNA düzeyini arttırmış olması AH'da beklenmeyen bir durum olmakla birlikte hastalığın patogenezinde esas önemli olan APP proteininin proteolitik yıkım ürünü $A\beta$ miktarında meydana gelebilecek değişimlerdir. Ayrıca APP'nin nörotrofik ve nöroprotektif etkilerinin olduğuna dair çalışmalar da vardır (38).

PSEN1 geni mutasyonu olan kişilerde amiloid beta 1-42 formu artmaktadır. Çünkü PSEN1 gama sekretazın yapısına katılır, gama sekretaz da $A\beta$ oluşmasında etkin rol oynar. PSEN1' in aşırı aktivasyonu veya ekspresyonu AH patolojisi bakımından istenmeyen bir durumdur (73). Vildagliptin PSEN1 mRNA ekspresyonunu kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde azaltmıştır. En fazla düşüş 100 μ M uygulanan grupta oluşur. Vildagliptinin tüm konsantrasyonları PSEN1'i azaltmıştır fakat 100 μ M uygulanan grubun PSEN1 mRNA ekspresyonu memantine yakın bulunmuştur. Literatürde memantin PSEN1 mRNA ekspresyonunu nasıl etkilediğine dair henüz bir çalışma yoktur. Hem vildagliptinin hem de memantin PSEN1 mRNA miktarını anlamlı

düşürmesi önemli bir sonuçtur. Çünkü özellikle EBAH'da PSEN1 geni hastalığın patogeneğinde önemli faktörlerdendir.

PSEN2 gen mutasyonu (18 adet bildirilmiş) PSEN1 e göre daha seyrek görülmektedir. Her iki gende de oluşabilecek mutasyonlar gamma sekretaz enzimini etkiler ve APP 'den toksik $A\beta$ 1-42 ve $A\beta$ 1-40 ürünlerinin oluşmasına neden olur (30). Aynı zamanda notch reseptör sinyal mekanizması da gama sekretazın aktivitesinde rol oynamaktadır.

Vildagliptin PSEN2 mRNA ekspresyonunu aynen PSEN1 de olduğu gibi azaltmıştır. Hatta PSEN1 de olduğu gibi 100 μ M uygulanan grup daha fazla gen ekspresyonunu düşürmüştür. Memantin PSEN2'yi vildagliptinin 250 μ M konsantrasyonuna yakın bir şekilde düşürmüştür. Saksagliptinin en düşük konsantrasyonu olan 50 μ M uygulanan grup PSEN2 yi kontrole göre anlamlı düşürmüş diğer iki konsantrasyonda anlamlı bir değişme olmamakla birlikte hafif bir düşme gözlenmiştir. Bu sonuçlar PSEN2 protein ekspresyonu ile de desteklenirse AH patolojisinde önem açısından ilk sıralarda yer alan $A\beta$ üretimini azaltacak bir sonucu düşündürecektir. PSEN2 proteininin aşırı aktivasyonu ve ekspresyonu AH'da istenmeyen bir durum olduğu göze alındığında; bu proteini kodlayan PSEN2 geni ekspresyonunda azalmaya yol açan vildagliptin ve saksagliptinin SH-SY5Y hücrelerindeki etkisi ileri çalışmalar için umut vericidir.

Mitokondriyal disfonksiyon hücrede apoptoza kaspazların tetiklediği programlı hücre ölümü ile yol açabilmektedir. Alzheimer hastalarının beyinlerinde mitokondri sayısında azalma ve mitokondri organellerinin morfolojik yapısında normale göre değişme gözlenmiştir (16). MMP $A\beta$ uygulanan gruplarda kontrole kıyasla düşmüştür. $A\beta$ ' nın MMP' yi düşürmesi prelinik çalışmalarda da gösterilmiştir (164). Vildagliptinin 250 ve 100 μ M konsantrasyonu ile saksagliptinin 100 μ M konsantrasyonu MMP' yi kontrole yaklaştırmıştır. Bu ilaçların diğer konsantrasyonlarında $A\beta$ 'nın düşürdüğü MMP' yi yükseltme yönünde (kontrole yaklaştırma) bir sonuç elde edilememiştir. Memantin de $A\beta$ 'nın düşürdüğü MMP'yi arttıramamıştır.

Nitrik oksit hücreler arası ve hücre içi mesaj yolağında, immünitede ve vasküler kasılmasında önemli bir rol oynayan kısa yarı ömürlü ve kolay difüze olabilen bir moleküldür. NO⁻ öğrenme ve belleğin sürdürülebilmesinde, nöronal plastisitede de rol oynamaktadır (17). Çalışmamızda sadece memantin uygulamasında NO⁻ düzeyinde kontrole göre ve $A\beta$ uygulanan gruba göre anlamlı düşüş saptanmıştır. Diğer gruplarda

ise anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu sonuçlar vildagliptin ve saksagliptinin tezde uygulanan konsantrasyonlarında NO⁻ düzeyini değiştirecek bir etkisinin olmadığını göstermiştir. NO⁻ düzeyinin optimum düzeyden daha yukarı çıkması eksitotoksositeye neden olabilmektedir. Literatürde memantin hücreyi bu aşırı uyarılmadan koruyabileceği henüz tam aydınlatılmamakla birlikte üzerinde tartışılan bir konudur (165, 166).

Nöron hücrelerinin programlı ölümü; oksidatif stres, glutamat toksisitesi, büyüme faktörlerinin azalması, genetik mutasyonlar gibi faktörlerin etkisiyle başlatılabilir (13). Mitokondriden salınan sitokrom C, apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apoptotic protease activating factor 1, Apaf-1) ile birleşerek kaspaz-9 u, kaspaz 9 da kaspaz-3 ü aktifleştirerek apoptoza neden olur (13, 14). Deneylerimizden elde ettiğimiz SH-SY5Y hücrelerinin vildagliptin, saksagliptin ve memantin uygulamasına karşı verdikleri kaspaz-3 ve kaspaz-9 ekspresyon cevapları kontrol ve A β gruplarına göre kıyaslanmıştır. A β uygulanan grupta kaspaz-3 ve kaspaz-9 ekspresyonu kontrole göre artmıştır ve literatürde de A β 'nın bu apoptotik proteinleri arttırdığı yer almaktadır (167). Pozitif kontrol olan memantin kaspaz-3 ve kaspaz-9'u düşürmesi literatürde hayvan deneylerinde gösterilmiştir (168); fakat SH-SY5Y hücrelerinde A β uygulanan gruba göre bu proteinleri anlamlı düşürmesi ilk defa bizim çalışmamızda elde edilen bir bulgudur.

Vildagliptin konsantrasyona bağımlı bir şekilde kaspaz-3 ekspresyonunu azaltmıştır. 2018 yılında yapılan bir *in vivo* çalışmada vildagliptin Alzheimer modeli oluşturulmuş ratlarda apoptoz yolağında anahtar rolü olan kaspaz-3 protein ekspresyonunu düşürdüğü rapor edilmiştir (169). Bu sonuç aynı zamanda vildagliptin uygulanan gruplarda canlılığın A β uygulanan gruba göre daha yüksek bulunduğu MTT canlılık analizi ve GZHA verileri ile desteklenmiştir. Apoptoz sürecinde artan kaspaz-3 ve kaspaz-9 hücre ölümü ile sonuçlanan bir dizi reaksiyona sebep olmaktadır (167). A β ile artan bu proteinlerin ekspresyonunun vildagliptin uygulaması ile azalması ve bu sonucun canlılık testleri ile desteklenmiş olması literatürde önceden gösterilmemiştir ve bu tezin orijinal bulgularından biridir.

Saksagliptin de kaspaz-3 ve kaspaz-9'u konsantrasyona bağımlı azaltmıştır fakat bu azalma vildagliptindeki gibi belirgin değildir. Ancak yine de 24. saatte kaspaz3 ü konsantrasyona bağımlı azaltması üzerinde ileri çalışmalar yapmaya değer bir bulgudur.

Kaspaz-12 endoplazmik retikulumda meydana gelen stresden dolayı aktive olur ve hücreyi apoptoza sürükleyebilir (15). Kaspaz-12 A β uygulanan grupta kontrole göre anlamlı bir şekilde artmıştır ve bu bulgu literatürde hayvan deneyleri ile de gösterilmiştir (15, 170). Memantin ve diğer iki DPP-4 inhibitörü ilaç uygulanan gruplar kaspaz-12 yi A β uygulanan gruba göre anlamlı düşürmemiştir. Vildagliptin konsantrasyona bağımlı hafif bir şekilde kaspaz-12'yi düşürmekle birlikte bu apoptotik proteinin miktarı kontrolün üzerinde bulunmuştur. Kontrole göre bu gruplar kıyaslandığında kaspaz-12 tüm gruplarda anlamlı artmıştır. Saksagliptinin en yüksek konsantrasyonu kaspaz-12 yi A β uygulanan gruba göre azaltmışsa da bu azalma anlamlı değildir.

Denelerimizde pozitif kontrol grup olarak kullanılan memantin p- tau'yu düşürdüğü 11 kişinin katıldığı bir klinik çalışmada gösterilmiştir (171). Bu tez çalışmasında da memantin 100 μ M uygulanan konsantrasyonu p-Tau ekspresyonunu anlamlı azaltmıştır. Vildagliptin ve saksagliptin de p-Tau' yu konsantrasyona bağımlı azaltmış; fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Amiloid betanın tau fosforilasyonunu tetiklediği literatürde daha önceden gösterilmiş (172) ve bu tez çalışmasında da amiloid beta uygulanan grubun p-Tau' yu anlamlı arttırdığı sonucu elde edilmiştir. Saksagliptinin p-Tau üzerindeki bu etkisi daha önceden gösterilmemiştir. Vildagliptinin ise 2018 yılında yapılan bir prelinik çalışmada p-Tau miktarını düşürdüğü gösterilmiştir (169). Memantin uygulanan grupta ise literatürü destekleyici bir veri elde edilmesi üzerinde ileri çalışmalar yapmaya değer bir bulgudur.

Bu bulgular genel olarak değerlendirildiğinde; tez çalışması kapsamında SH- SY5Y hücreleri üzerine etkileri incelenen DPP-4 inhibitörleri olan vildagliptin ve saksagliptinin, özellikle hücre canlılığı, apoptozis ve AH'da rolü olan PSEN1 gen ekspresyonu bakımından umut vaat ettiği tespit edilmiş olup sonraki çalışmalarımızda bu etkilerin transgenik Alzheimer modeli oluşturulmuş hayvanlarda da araştırılması planlanmaktadır.

6. KAYNAKLAR

1. Anand R, Gill KD, Mahdi AA. Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology*. 2014;76:27-50.
2. Association As. 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*. 2016;12(4):459-509.
3. Petersen PE. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century—the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dentistry and oral epidemiology*. 2003;31(s1):3-24.
4. Reisberg B, Doody R, Stöffler A, Schmitt F, Ferris S, Möbius HJ. Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*. 2003;348(14):1333-41.
5. Danysz W, Parsons CG. The NMDA receptor antagonist memantine as a symptomatological and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease: preclinical evidence. *Int J Geriatr Psych*. 2003;18(S1):S23-S32.
6. Berger-Sweeney J. The cholinergic basal forebrain system during development and its influence on cognitive processes: important questions and potential answers. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2003;27(4):401-11.
7. Slotkin TA, Seidler FJ, Crain B, Bell J, Bissette G, Nemeroff C. Regulatory changes in presynaptic cholinergic function assessed in rapid autopsy material from patients with Alzheimer disease: implications for etiology and therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1990;87(7):2452-5.
8. Alley GM, Bailey JA, Chen D, Ray B, Puli LK, Tanila H, et al. Memantine lowers amyloid- β peptide levels in neuronal cultures and in APP/PS1 transgenic mice. *Journal of neuroscience research*. 2010;88(1):143-54.
9. Scholtzova H, Wadghiri YZ, Douadi M, Sigurdsson EM, Li YS, Quartermain D, et al. Memantine leads to behavioral improvement and amyloid reduction in Alzheimer's-disease-model transgenic mice shown as by micromagnetic resonance imaging. *Journal of neuroscience research*. 2008;86(12):2784-91.
10. Fan Z, Okello AA, Brooks DJ, Edison P. Longitudinal influence of microglial activation and amyloid on neuronal function in Alzheimer's disease. *Brain*. 2015:awv288.
11. Yamada K, Nabeshima T. Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. *Pharmacology & therapeutics*. 2000;88(2):93-113.

12. De Jonghe C, Esselens C, Kumar-Singh S, Craessaerts K, Serneels S, Checler F, et al. Pathogenic APP mutations near the γ -secretase cleavage site differentially affect A β secretion and APP C-terminal fragment stability. *Hum Mol Genet.* 2001;10(16):1665-71.
13. Oppenheim RW. Cell death during development of the nervous system. *Annual review of neuroscience.* 1991;14(1):453-501.
14. Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, et al. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron.* 1995;15(4):961-73.
15. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β . *Nature.* 2000;403(6765):98-103.
16. Chung C-W, Song Y-H, Kim I-K, Yoon W-J, Ryu B-R, Jo D-G, et al. Proapoptotic effects of tau cleavage product generated by caspase-3. *Neurobiology of disease.* 2001;8(1):162-72.
17. Chapman PF, Atkins CM, Allen MT, Haley JE, Steinmetz JE. Inhibition of nitric oxide synthesis impairs two different forms of learning. *Neuroreport.* 1992;3(7):567-70.
18. Kameoka J, Tanaka T, Nojima Y, Schlossman SF, Morimoto C. Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26. *Science.* 1993;261(5120):466-9.
19. Tahrani AA, Piya MK, Barnett AH. Drug evaluation: vildagliptin-metformin single-tablet combination. *Advances in therapy.* 2009;26(2):138-54.
20. Deacon CF, Holst JJ. Saxagliptin: a new dipeptidyl peptidase-4 inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *Advances in therapy.* 2009;26(5):488-99.
21. Haan MN. Therapy Insight: type 2 diabetes mellitus and the risk of late-onset Alzheimer's disease. *Nature clinical practice Neurology.* 2006;2(3):159-66.
22. Nyberg J, Anderson MF, Meister B, Alborn A-M, Ström A-K, Brederlau A, et al. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide is expressed in adult hippocampus and induces progenitor cell proliferation. *The Journal of neuroscience.* 2005;25(7):1816-25.
23. Organization WH. Dementia: a public health priority: World Health Organization; 2012.
24. Kumar A, Singh A, Ekavali. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacol Rep.* 2015;67(2):195-203.
25. Jellinger K. Alzheimer 100—highlights in the history of Alzheimer research. *J Neural Transm.* 2006;113(11):1603-23.
26. Kumar A, Singh A. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacol Rep.* 2015;67(2):195-203.
27. Pratico D. Alzheimer's Disease and the Quest for its Biological Measures. *J Alzheimers Dis.* 2013;33:S237-S41.
28. WEB.<http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=21520>. Erişim tarihi:2016
29. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Kawas CH, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia.* 2011;7(3):263-9.
30. Van Cauwenberghe C, Van Broeckhoven C, Sleegers K. The genetic landscape of Alzheimer disease: clinical implications and perspectives. *Genetics in Medicine.* 2015.
31. Hardy J. Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends in neurosciences.* 1997;20(4):154-9.

32. Tang M-X, Jacobs D, Stern Y, Marder K, Schofield P, Gurland B, et al. Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *The Lancet*. 1996;348(9025):429-32.
33. Arnold SE, Hyman BT, Flory J, Damasio AR, Van Hoesen GW. The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cerebral cortex*. 1991;1(1):103-16.
34. Selkoe DJ. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature*. 1999;399:A23-A31.
35. Goedert M, Spillantini M, Jakes R, Rutherford D, Crowther R. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron*. 1989;3(4):519-26.
36. Takashima A. GSK-3 is essential in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2006;9(3 Supplement):309-17.
37. Jan A, Adolfsson O, Allaman I, Buccarello A-L, Magistretti PJ, Pfeifer A, et al. A β 242 neurotoxicity is mediated by ongoing nucleated polymerization process rather than by discrete A β 242 species. *J Biol Chem*. 2011;286(10):8585-96.
38. Koike MA, Lin AJ, Pham J, Nguyen E, Yeh JJ, Rahimian R, et al. APP knockout mice experience acute mortality as the result of ischemia. *Plos One*. 2012;7(8):e42665.
39. Furukawa K, Sopher BL, Rydel RE, Begley JG, Pham DG, Martin GM, et al. Increased Activity-Regulating and Neuroprotective Efficacy of α -Secretase-Derived Secreted Amyloid Precursor Protein Conferred by a C-Terminal Heparin-Binding Domain. *J Neurochem*. 1996;67(5):1882-96.
40. Kim M, Choi SY, Kim K-T, Rhee YK, Hur J. Ginsenoside Rg18 suppresses lipopolysaccharide-induced neuroinflammation in BV2 microglia and amyloid- β -induced oxidative stress in SH-SY5Y neurons via nuclear factor erythroid 2-related factor 2/heme oxygenase-1 induction. *Journal of Functional Foods*. 2017;31:71-8.
41. Buée L, Bussiere T, Buée-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Research Reviews*. 2000;33(1):95-130.
42. Garcia ML, Cleveland DW. Going new places using an old MAP: tau, microtubules and human neurodegenerative disease. *Current opinion in cell biology*. 2001;13(1):41-8.
43. Engel T, Goñi-Oliver P, Lucas JJ, Avila J, Hernández F. Chronic lithium administration to FTDP-17 tau and GSK-3 β overexpressing mice prevents tau hyperphosphorylation and neurofibrillary tangle formation, but pre-formed neurofibrillary tangles do not revert. *J Neurochem*. 2006;99(6):1445-55.
44. Noble W, Planel E, Zehr C, Olm V, Meyerson J, Suleman F, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(19):6990-5.
45. Arendash GW, Mori T, Cao C, Mamcarz M, Runfeldt M, Dickson A, et al. Caffeine reverses cognitive impairment and decreases brain amyloid- β levels in aged Alzheimer's disease mice. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2009;17(3):661-80.
46. Eskelinen MH, Ngandu T, Tuomilehto J, Soininen H, Kivipelto M. Midlife coffee and tea drinking and the risk of late-life dementia: a population-based CAIDE study. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2009;16(1):85-91.

47. Yang Y, Ma D, Wang Y, Jiang T, Hu S, Zhang M, et al. Intranasal insulin ameliorates tau hyperphosphorylation in a rat model of type 2 diabetes. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2013;33(2):329-38.
48. Shemesh E, Rudich A, Harman-Boehm I, Cukierman-Yaffe T. Effect of intranasal insulin on cognitive function: a systematic review. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2011;97(2):366-76.
49. Dahlgren KN, Manelli AM, Stine WB, Baker LK, Krafft GA, LaDu MJ. Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability. *J Biol Chem*. 2002;277(35):32046-53.
50. Hampel H, Blennow K, Shaw LM, Hoessler YC, Zetterberg H, Trojanowski JQ. Total and phosphorylated tau protein as biological markers of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol*. 2010;45(1):30-40.
51. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*. 2000;403(6765):98-103.
52. Dominguez RO, Marschoff ER, Guareschi EM, Repetto MG, Famulari AL, Pagano MA, et al. Insulin, glucose and glycated hemoglobin in Alzheimer's and vascular dementia with and without superimposed Type II diabetes mellitus condition. *J Neural Transm*. 2008;115(1):77-84.
53. Revett TJ, Baker GB, Jhamandas J, Kar S. Glutamate system, amyloid β peptides and tau protein: functional interrelationships and relevance to Alzheimer disease pathology. *J Psychiatry Neurosci*. 2013;38(1):6-23.
54. Novelli A, Reilly J, Lysko P, Henneberry R. Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain research*. 1988;451(1):205-12.
55. Cross A, Crow T, Ferrier I, Johnson J. The selectivity of the reduction of serotonin S2 receptors in Alzheimer-type dementia. *Neurobiol Aging*. 1986;7(1):3-7.
56. Watkins PB, Zimmerman HJ, Knapp MJ, Gracon SI, Lewis KW. Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. *JAMA*. 1994;271(13):992-8.
57. Klugman A, Naughton DP, Isaac M, Shah I, Petroczi A, Tabet N. Antioxidant enzymatic activities in Alzheimer's disease: the relationship to acetylcholinesterase inhibitors. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2012;30(3):467-74.
58. Zhang HY, Yan H, Tang XC. Non-cholinergic effects of huperzine A: beyond inhibition of acetylcholinesterase. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2008;28(2):173-83.
59. Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, Mufson EJ. Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging*. 2006;27(10):1372-84.
60. Terry RD. Cell death or synaptic loss in Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 2000;59(12):1118-9.
61. Hamos JE, DeGennaro LJ, Drachman DA. Synaptic loss in Alzheimer's disease and other dementias. *Neurology*. 1989;39(3):355-.
62. Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY, Dong L-M, Salvesen GS, Pericak-Vance M, et al. Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993;90(17):8098-102.
63. Schmechel D, Saunders A, Strittmatter W, Crain BJ, Hulette CM, Joo S, et al. Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of

- apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993;90(20):9649-53.
64. Bertram L, Tanzi RE. The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(6):1449-57.
 65. Sorbi S, Forleo P, Tedde A, Cellini E, Ciantelli M, Bagnoli S, et al. Genetic risk factors in familial Alzheimer's disease. *Mechanisms of ageing and development*. 2001;122(16):1951-60.
 66. Tanzi RE, Vaula G, Romano DM, Mortilla M, Huang TL, Tupler RG, et al. Assessment of amyloid β -protein precursor gene mutations in a large set of familial and sporadic Alzheimer disease cases. *Am J Hum Genet*. 1992;51(2):273.
 67. Cruts M, Van Broeckhoven C. Presenilin mutations in Alzheimer's disease. *Hum Mutat*. 1998;11(3):183-90.
 68. Prasher V, Farrer MJ, Kessling AM, Fisher E, West R, Barber P, et al. Molecular mapping of Alzheimer-type dementia in Down's syndrome. *Ann Neurol*. 1998;43(3):380-3.
 69. Potter H. Review and hypothesis: Alzheimer disease and Down syndrome--chromosome 21 nondisjunction may underlie both disorders. *Am J Hum Genet*. 1991;48(6):1192.
 70. König G, Mönning U, Czech C, Prior R, Banati R, Schreiter-Gasser U, et al. Identification and differential expression of a novel alternative splice isoform of the beta A4 amyloid precursor protein (APP) mRNA in leukocytes and brain microglial cells. *J Biol Chem*. 1992;267(15):10804-9.
 71. Cruts M, Theuns J, Van Broeckhoven C. Locus-specific mutation databases for neurodegenerative brain diseases. *Human mutation*. 2012;33(9):1340-4.
 72. Nunan J, Small DH. Regulation of APP cleavage by α -, β - and γ -secretases. *FEBS letters*. 2000;483(1):6-10.
 73. Campion D, Dumanchin C, Hannequin D, Dubois B, Belliard S, Puel M, et al. Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *The American Journal of Human Genetics*. 1999;65(3):664-70.
 74. Zhang ZH, Hartmann H, Do VM, Abramowski D, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, et al. Destabilization of beta-catenin by mutations in presenilin-1 potentiates neuronal apoptosis. *Nature*. 1998;395(6703):698-702.
 75. Yankner BA. Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron*. 1996;16(5):921-32.
 76. Wodarz A, Nusse R. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annual review of cell and developmental biology*. 1998;14(1):59-88.
 77. Dumanchin C, Tournier I, Martin C, Didic M, Belliard S, Carlander B, et al. Biological effects of four PSEN1 gene mutations causing Alzheimer disease with spastic paraparesis and cotton wool plaques. *Human mutation*. 2006;27(10):1063-.
 78. Cai Y, An SSA, Kim S. Mutations in presenilin 2 and its implications in Alzheimer's disease and other dementia-associated disorders. *Clin Interv Aging*. 2015;10:1163.
 79. Jayadev S, Leverenz JB, Steinbart E, Stahl J, Klunk W, Yu C-E, et al. Alzheimer's disease phenotypes and genotypes associated with mutations in presenilin 2. *Brain*. 2010;133(4):1143-54.
 80. Bruni A. Cloning of a gene bearing missense mutations in early onset familial Alzheimer's disease: a Calabrian study. *Functional neurology*. 1997;13(3):257-61.

81. Lleó A, Blesa R, Queralt R, Ezquerra M, Molinuevo JL, Pena-Casanova J, et al. Frequency of mutations in the presenilin and amyloid precursor protein genes in early-onset Alzheimer disease in Spain. *Archives of neurology*. 2002;59(11):1759-63.
82. Sano M, Ernesto C, Thomas RG, Klauber MR, Schafer K, Grundman M, et al. A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*. 1997;336(17):1216-22.
83. Liu X, Hao W, Qin Y, Decker Y, Wang X, Burkart M, et al. Long-term treatment with Ginkgo biloba extract EGb 761 improves symptoms and pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Brain, behavior, and immunity*. 2015;46:121-31.
84. Grimm MO, Stahlmann C, Mett J, Haupenthal V, Zimmer V, Lehmann J, et al. Vitamin E: Curse or benefit in Alzheimer's disease? A systematic investigation of the impact of α -, γ - and δ -tocopherol on A β generation and degradation in neuroblastoma cells. *The journal of nutrition, health & aging*. 2015;19(6):646-54.
85. Chen N, Yang M, Zhou M, Xiao J, Guo J, He L, et al. L-carnitine for cognitive enhancement in people without cognitive impairment. *The Cochrane Library*. 2015.
86. Zhang L, Chopp M, Lu M, Zhang T, Winter S, Doppler E, et al. Cerebrolysin dose-dependently improves neurological outcome in rats after acute stroke: A prospective, randomized, blinded, and placebo-controlled study. *Int J Stroke*. 2016;11(3):347-55.
87. Froestl W, Gallagher M, Jenkins H, Madrid A, Melcher T, Teichman S, et al. SGS742: the first GABA B receptor antagonist in clinical trials. *Biochemical pharmacology*. 2004;68(8):1479-87.
88. Marcade M, Bourdin J, Loiseau N, Peillon H, Rayer A, Drouin D, et al. Etazolate, a neuroprotective drug linking GABAA receptor pharmacology to amyloid precursor protein processing. *J Neurochem*. 2008;106(1):392-404.
89. Raje S, Patat A, Parks V, Schechter L, Plotka A, Paul J, et al. A Positron Emission Tomography Study to Assess Binding of Lecozotan, a Novel 5-Hydroxytryptamine-1A Silent Antagonist, to Brain 5-HT_{1A} Receptors in Healthy Young and Elderly Subjects, and in Patients With Alzheimer's Disease. *Clin Pharmacol Ther*. 2008;83(1):86-96.
90. Long DD, Armstrong SR, Beattie DT, Choi S-K, Fatheree PR, Gendron RA, et al. Discovery, oral pharmacokinetics and in vivo efficacy of velusetrag, a highly selective 5-HT₄ receptor agonist that has achieved proof-of-concept in patients with chronic idiopathic constipation. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2012;22(19):6048-52.
91. Maher-Edwards G, Dixon R, Hunter J, Gold M, Hopton G, Jacobs G, et al. SB-742457 and donepezil in Alzheimer disease: a randomized, placebo-controlled study. *Int J Geriatr Psych*. 2011;26(5):536-44.
92. Roberts JC, Reavill C, East SZ, Harrison PJ, Patel S, Routledge C, et al. The distribution of 5-HT₆ receptors in rat brain: an autoradiographic binding study using the radiolabelled 5-HT₆ receptor antagonist [¹²⁵I] SB-258585. *Brain research*. 2002;934(1):49-57.
93. Gravius A, Laszy J, Pietraszek M, SÁghy K, Nagel J, Chambon C, et al. Effects of 5-HT₆ antagonists, Ro-4368554 and SB-258585, in tests used for the detection of cognitive enhancement and antipsychotic-like activity. *Behav Pharmacol*. 2011;22(2):122-35.
94. Hirst WD, Stean TO, Rogers DC, Sunter D, Pugh P, Moss SF, et al. SB-399885 is a potent, selective 5-HT₆ receptor antagonist with cognitive enhancing properties in aged rat water maze and novel object recognition models. *Eur J Pharmacol*. 2006;553(1):109-19.

95. Brioni JD, Esbenshade TA, Garrison TR, Bitner SR, Cowart MD. Discovery of histamine H3 antagonists for the treatment of cognitive disorders and Alzheimer's disease. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011;336(1):38-46.
96. Brambilla R, Cottini L, Fumagalli M, Ceruti S, Abbracchio MP. Blockade of A2A adenosine receptors prevents basic fibroblast growth factor-induced reactive astrogliosis in rat striatal primary astrocytes. *Glia.* 2003;43(2):190-4.
97. Liu Y, Sun B, Yoshitake M, Kambayashi J-i. Pharmaceutical Compositions Comprising A Multifunctional Phosphodiesterase Inhibitor and An Adenosine Uptake Inhibitor. Google Patents; 2007.
98. Asayama K, Yamadera H, Ito T, Suzuki H, Kudo Y, Endo S. Double blind study of melatonin effects on the sleep-wake rhythm, cognitive and non-cognitive functions in Alzheimer type dementia. *Journal of Nippon Medical School.* 2003;70(4):334-41.
99. Hampel H, Ewers M, Bürger K, Annas P, Mörtberg A, Bogstedt A, et al. Lithium trial in Alzheimer's disease: a randomized, single-blind, placebo-controlled, multicenter 10-week study. *The Journal of clinical psychiatry.* 2009;70(6):922-31.
100. Mellow AM, Solano-Lopez C, Davis S. Sodium valproate in the treatment of behavioral disturbance in dementia. *J Geriatr Psych Neur.* 1993;6(4):205-9.
101. Maia L, De Mendonça A. Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease? *European Journal of Neurology.* 2002;9(4):377-82.
102. Lovestone S, Boada M, Dubois B, Hüll M, Rinne JO, Huppertz H-J, et al. A phase II trial of tideglusib in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease.* 2015;45(1):75-88.
103. Mazanetz MP, Fischer PM. Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. *Nature reviews Drug discovery.* 2007;6(6):464-79.
104. Sereno L, Coma M, Rodriguez M, Sanchez-Ferrer P, Sanchez M, Gich I, et al. A novel GSK-3 β inhibitor reduces Alzheimer's pathology and rescues neuronal loss in vivo. *Neurobiol Dis.* 2009;35(3):359-67.
105. Dumont M, Stack C, Elipenahli C, Jainuddin S, Gerges M, Starkova N, et al. Bezafibrate administration improves behavioral deficits and tau pathology in P301S mice. *Hum Mol Genet.* 2012;21(23):5091-105.
106. Craft S, Baker LD, Montine TJ, Minoshima S, Watson GS, Claxton A, et al. Intranasal insulin therapy for Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment: a pilot clinical trial. *Arch Neurol-Chicago.* 2012;69(1):29-38.
107. Corcoran NM, Martin D, Hutter-Paier B, Windisch M, Nguyen T, Nheu L, et al. Sodium selenate specifically activates PP2A phosphatase, dephosphorylates tau and reverses memory deficits in an Alzheimer's disease model. *Journal of Clinical Neuroscience.* 2010;17(8):1025-33.
108. Trojanowski JQ, Smith AB, Huryn D, Lee VM. Microtubule-stabilising drugs for therapy of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders with axonal transport impairments. *Expert opinion on pharmacotherapy.* 2005;6(5):683-6.
109. Zhang B, Carroll J, Trojanowski JQ, Yao Y, Iba M, Potuzak JS, et al. The microtubule-stabilizing agent, epothilone D, reduces axonal dysfunction, neurotoxicity, cognitive deficits, and Alzheimer-like pathology in an interventional study with aged tau transgenic mice. *The Journal of Neuroscience.* 2012;32(11):3601-11.
110. Rojo LE, Alzate-Morales J, Saavedra IN, Davies P, Maccioni RB. Selective interaction of lansoprazole and astemizole with tau polymers: potential new clinical use in diagnosis of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease.* 2010;19(2):573-89.

111. Henley DB, May PC, Dean RA, Siemers ER. Development of semagacestat (LY450139), a functional γ -secretase inhibitor, for the treatment of Alzheimer's disease. Expert opinion on pharmacotherapy. 2009;10(10):1657-64.
112. Lim GP, Chu T, Yang F, Beech W, Frautschy SA, Cole GM. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. The Journal of Neuroscience. 2001;21(21):8370-7.
113. Kontsekova E, Zilka N, Kovacech B, Novak P, Novak M. First-in-man tau vaccine targeting structural determinants essential for pathological tau–tau interaction reduces tau oligomerisation and neurofibrillary degeneration in an Alzheimer's disease model. Alzheimer's research & therapy. 2014;6(4):1.
114. Galimberti D, Scarpini E. Disease-modifying treatments for Alzheimer's disease. Therapeutic advances in neurological disorders. 2011;4(4):203-16.
115. Rezai-Zadeh K, Arendash GW, Hou H, Fernandez F, Jensen M, Runfeldt M, et al. Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reduces β -amyloid mediated cognitive impairment and modulates tau pathology in Alzheimer transgenic mice. Brain research. 2008;1214:177-87.
116. Choi Y-T, Jung C-H, Lee S-R, Bae J-H, Baek W-K, Suh M-H, et al. The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate attenuates β -amyloid-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons. Life sciences. 2001;70(5):603-14.
117. Sun M-K, Alkon DL. Dual effects of bryostatin-1 on spatial memory and depression. Eur J Pharmacol. 2005;512(1):43-51.
118. Eriksen JL, Sagi SA, Smith TE, Weggen S, Das P, McLendon D, et al. NSAIDs and enantiomers of flurbiprofen target γ -secretase and lower A β 42 in vivo. The Journal of clinical investigation. 2003;112(3):440-9.
119. Kaltschmidt B, Uherek M, Volk B, Baeuerle PA, Kaltschmidt C. Transcription factor NF- κ B is activated in primary neurons by amyloid β peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer disease. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1997;94(6):2642-7.
120. Salminen A, Ojala J, Kauppinen A, Kaarniranta K, Suuronen T. Inflammation in Alzheimer's disease: amyloid- β oligomers trigger innate immunity defence via pattern recognition receptors. Prog Neurobiol. 2009;87(3):181-94.
121. Chong ZZ, Li F, Maiese K. Stress in the brain: novel cellular mechanisms of injury linked to Alzheimer's disease. Brain research reviews. 2005;49(1):1-21.
122. Mamelak M. Alzheimer's disease, oxidative stress and gamma-hydroxybutyrate. Neurobiol Aging. 2007;28(9):1340-60.
123. Smith MA, Hirai K, Hsiao K, Pappolla MA, Harris PL, Siedlak SL, et al. Amyloid- β Deposition in Alzheimer Transgenic Mice Is Associated with Oxidative Stress. J Neurochem. 1998;70(5):2212-5.
124. Shelat PB, Chalimoniuk M, Wang JH, Strosznajder JB, Lee JC, Sun AY, et al. Amyloid beta peptide and NMDA induce ROS from NADPH oxidase and AA release from cytosolic phospholipase A2 in cortical neurons. J Neurochem. 2008;106(1):45-55.
125. Perl DP, Good PF. Aluminum, Alzheimer's Disease, and the Olfactory System. Annals of the New York Academy of Sciences. 1991;640(1):8-13.
126. Spuch C, Antequera D, Portero A, Orive G, Hernández RM, Molina JA, et al. The effect of encapsulated VEGF-secreting cells on brain amyloid load and behavioral impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. Biomaterials. 2010;31(21):5608-18.
127. Wolf SA, Kronenberg G, Lehmann K, Blankenship A, Overall R, Staufenbiel M, et al. Cognitive and physical activity differently modulate disease progression in the

- amyloid precursor protein (APP)-23 model of Alzheimer's disease. *Biol Psychiat*. 2006;60(12):1314-23.
128. Watson GS, Craft S. Modulation of memory by insulin and glucose: neuropsychological observations in Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol*. 2004;490(1):97-113.
129. Labak M, Foniok T, Kirk D, Rushforth D, Tomanek B, Jasiński A, et al. Metabolic changes in rat brain following intracerebroventricular injections of streptozotocin: a model of sporadic Alzheimer's disease. *Brain Edema XIV: Springer*; 2010. p. 177-81.
130. Gasparini L, Netzer WJ, Greengard P, Xu H. Does insulin dysfunction play a role in Alzheimer's disease? *Trends in Pharmacological Sciences*. 2002;23(6):288-93.
131. Peila R, Rodriguez BL, Launer LJ. Type 2 diabetes, APOE gene, and the risk for dementia and related pathologies. *Diabetes*. 2002;51(4):1256-62.
132. Anandatheerthavarada HK, Biswas G, Robin M-A, Avadhani NG. Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells. *The Journal of cell biology*. 2003;161(1):41-54.
133. Hirai K, Aliev G, Nunomura A, Fujioka H, Russell RL, Atwood CS, et al. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience*. 2001;21(9):3017-23.
134. Crouch PJ, Blake R, Duce JA, Ciccotosto GD, Li Q-X, Barnham KJ, et al. Copper-dependent inhibition of human cytochrome c oxidase by a dimeric conformer of amyloid- β 1-42. *The Journal of neuroscience*. 2005;25(3):672-9.
135. Blass J, Gibson G. The role of oxidative abnormalities in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Revue neurologique*. 1990;147(6-7):513-25.
136. Murray F, Landsberg J, Williams R, Esiri M, Watt F, editors. *Elemental Analysis of Neurofibrillary Tangles in Alzheimer's Disease Using Proton-Induced X-ray Analysis*. Ciba Foundation Symposium 169-Aluminium in Biology and Medicine; 1992: Wiley Online Library.
137. Nixon RA, SAITO KI, Grynspan F, Griffin WR, Katayama S, Honda T, et al. Calcium-Activated Neutral Proteinase (Calpain) System in Aging and Alzheimer's Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1994;747(1):77-91.
138. Johnson GV, Cox TM, Lockhart JP, Zinnerman MD, Miller ML, Powers RE. Transglutaminase activity is increased in Alzheimer's disease brain. *Brain research*. 1997;751(2):323-9.
139. Ly JD, Grubb D, Lawen A. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) in apoptosis; an update. *Apoptosis*. 2003;8(2):115-28.
140. Ahrén B. Vildagliptin: an inhibitor of dipeptidyl peptidase-4 with antidiabetic properties. *Expert opinion on investigational drugs*. 2006;15(4):431-42.
141. Miller SA, Onge ELS. Sitagliptin: a dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *Annals of Pharmacotherapy*. 2006;40(7-8):1336-43.
142. Drucker DJ. Dipeptidyl peptidase-4 inhibition and the treatment of type 2 diabetes preclinical biology and mechanisms of action. *Diabetes care*. 2007;30(6):1335-43.
143. Ahrén B, Landin-Olsson M, Jansson P-A, Svensson M, Holmes D, Schweizer A. Inhibition of dipeptidyl peptidase-4 reduces glycemia, sustains insulin levels, and reduces glucagon levels in type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004;89(5):2078-84.
144. Schweizer A, Couturier A, Foley J, Dejager S. Comparison between vildagliptin and metformin to sustain reductions in HbA1c over 1 year in drug-naïve patients with Type 2 diabetes. *Diabetic Med*. 2007;24(9):955-61.

145. Fonseca V, Schweizer A, Albrecht D, Baron M, Chang I, Dejager S. Addition of vildagliptin to insulin improves glycaemic control in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2007;50(6):1148-55.
146. Kosaraju J, Murthy V, Khatwal RB, Dubala A, Chinni S, Muthureddy Nataraj SK, et al. Vildagliptin: an anti-diabetes agent ameliorates cognitive deficits and pathology observed in streptozotocin-induced Alzheimer's disease. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2013;65(12):1773-84.
147. Pintana H, Apajai N, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. DPP-4 inhibitors improve cognition and brain mitochondrial function of insulin-resistant rats. *Journal of Endocrinology*. 2013;218(1):1-11.
148. Scheen AJ. Dipeptidylpeptidase-4 inhibitors (gliptins). *Clinical pharmacokinetics*. 2010;49(9):573-88.
149. Scirica BM, Bhatt DL, Braunwald E, Steg PG, Davidson J, Hirshberg B, et al. Saxagliptin and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine*. 2013;369(14):1317-26.
150. Nabeno M, Akahoshi F, Kishida H, Miyaguchi I, Tanaka Y, Ishii S, et al. A comparative study of the binding modes of recently launched dipeptidyl peptidase IV inhibitors in the active site. *Biochemical and biophysical research communications*. 2013;434(2):191-6.
151. Kosaraju J, Gali CC, Khatwal RB, Dubala A, Chinni S, Holsinger RD, et al. Saxagliptin: a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor ameliorates streptozotocin induced Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*. 2013;72:291-300.
152. Schirra J, Nicolaus M, Roggel R, Katschinski M, Storr M, Woerle HJ, et al. Endogenous glucagon-like peptide 1 controls endocrine pancreatic secretion and antropyloro-duodenal motility in humans. *Gut*. 2006;55(2):243-51.
153. Barnett A. DPP-4 inhibitors and their potential role in the management of type 2 diabetes. *International journal of clinical practice*. 2006;60(11):1454-70.
154. Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *The Lancet*. 2006;368(9548):1696-705.
155. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*. 2007;132(6):2131-57.
156. Biedler JL, Helson L, Spengler BA. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer research*. 1973;33(11):2643-52.
157. Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer research*. 1978;38(11 Part 1):3751-7.
158. Encinas M, Iglesias M, Liu Y, Wang H, Muhaisen A, Cena V, et al. Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *Journal of neurochemistry*. 2000;75(3):991-1003.
159. Liu R, Barkhordarian H, Emadi S, Park CB, Sierks MR. Trehalose differentially inhibits aggregation and neurotoxicity of beta-amyloid 40 and 42. *Neurobiol Dis*. 2005;20(1):74-81.
160. Song G, Li Y, Lin L, Cao Y. Anti-autophagic and anti-apoptotic effects of memantine in a SH-SY5Y cell model of Alzheimer's disease via mammalian target of rapamycin-dependent and-independent pathways. *Molecular medicine reports*. 2015;12(5):7615-22.

161. Kosaraju J, Holsinger RD, Guo L, Tam KY. Linagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, mitigates cognitive deficits and pathology in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *Molecular neurobiology*. 2017;54(8):6074-84.
162. Heiss K, Raffaele M, Vanella L, Murabito P, Prezzavento O, Marrazzo A, et al. (+)-Pentazocine attenuates SH-SY5Y cell death, oxidative stress and microglial migration induced by conditioned medium from activated microglia. *Neuroscience letters*. 2017;642:86-90.
163. Ray B, Banerjee PK, Greig NH, Lahiri DK. Memantine treatment decreases levels of secreted Alzheimer's amyloid precursor protein (APP) and amyloid beta (A β) peptide in the human neuroblastoma cells. *Neuroscience letters*. 2010;470(1):1-5.
164. Leuner K, Schütt T, Kurz C, Eckert SH, Schiller C, Occhipinti A, et al. Mitochondrion-derived reactive oxygen species lead to enhanced amyloid beta formation. *Antioxidants & redox signaling*. 2012;16(12):1421-33.
165. Pitsikas N, Sakellaris N. Memantine and recognition memory: Possible facilitation of its behavioral effects by the nitric oxide (NO) donor molsidomine. *European journal of pharmacology*. 2007;571(2-3):174-9.
166. Lipton SA. Failures and successes of NMDA receptor antagonists: molecular basis for the use of open-channel blockers like memantine in the treatment of acute and chronic neurologic insults. *NeuroRx*. 2004;1(1):101-10.
167. Mehmet H. Apoptosis: Caspases find a new place to hide. *Nature*. 2000;403(6765):29-30.
168. Lee S-T, Chu K, Park J-E, Kang L, Ko S-Y, Jung K-H, et al. Memantine reduces striatal cell death with decreasing calpain level in 3-nitropropionic model of Huntington's disease. *Brain research*. 2006;1118(1):199-207.
169. Ma QH, Jiang LF, Mao JL, Xu WX, Huang M. Vildagliptin prevents cognitive deficits and neuronal apoptosis in a rat model of Alzheimer's disease. *Molecular medicine reports*. 2018;17(3):4113-9.
170. Nakagawa T, Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *The Journal of cell biology*. 2000;150(4):887-94.
171. Degerman Gunnarsson M, Kilander L, Basun H, Lannfelt L. Reduction of phosphorylated tau during memantine treatment of Alzheimer's disease. *Dementia and geriatric cognitive disorders*. 2007;24(4):247-52.
172. Ma Q-L, Yang F, Rosario ER, Ubeda OJ, Beech W, Gant DJ, et al. β -amyloid oligomers induce phosphorylation of tau and inactivation of insulin receptor substrate via c-Jun N-terminal kinase signaling: suppression by omega-3 fatty acids and curcumin. *Journal of Neuroscience*. 2009;29(28):9078-89.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Alim Hüseyin Dokumacı
Uyruğu: Türkiye (TC)
Doğum Tarihi ve Yeri: 13/10/1987, Adıyaman
Tel: 05334365923
Email: ahuseyindokumaci@gmail.com

EĞİTİM

2005-2010 Lisans	İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
2012- Doktora	İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji A.B.D daha sonra ÖYP kapsamında 2013 Şubat Erciyes Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık Farmakoloji A.B.D

İŞ DENEYİMİ

2013-2016 Araştırma görevlisi	Erciyes Üniversitesi/Eczacılık Fakültesi/Eczacılık Meslek Bilimleri Bölümü/Farmakoloji Anabilim Dalı)
2012-2013 Araştırma görevlisi	İnönü Üniversitesi/Eczacılık Fakültesi/Eczacılık Meslek Bilimleri Bölümü/Farmakoloji Anabilim Dalı (ÖYP geçici görevi Erciyes Üniversitesinde doktora için haziran 2013 te görevlendirildi.)

YABANCI DİL

İngilizce.

Projelerde Yaptığı Görevler

1. Fensiklidin ve MK 801 Uygulanmış SH SY5Y Hücrelerinde Famotidin in Akt GSK 3β Katenin Sinyal Yolağı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi, TÜBİTAK PROJESİ, Bursiyer, , 01/07/2015 - 01/07/2016 (ULUSAL)
2. Beta Amiloid Peptide İndüklenmiş Nörotoksitede Çeşitli Salvia Türlerinin GSK 3 Beta İnhibisyonu Üzerinden Koruyucu Etkilerinin İncelenmesi, TÜBİTAK PROJESİ, Bursiyer, , 01/06/2013 - 01/06/2015 (ULUSAL)

3. 1st International Conference on Natural Products for Cancer Prevention and Therapy, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı,, Diğer kamu kuruluşları (Yükseköğretim Kurumları hariç), Araştırmacı, , 11/11/2015 - 16/03/2016 (ULUSAL)
4. DPP 4 İnhibitörü Vildagliptin ve Saksagliptin in SHSY 5Y Hücrelerinde Koruyucu Etkisinin Araştırılması, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı, , 16/03/2015 (Devam Ediyor) (ULUSAL)
5. 1st International Conference on Natural Products for Cancer Prevention and Therapy, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı, , 16/03/2015 - 16/03/2016 (ULUSAL)

Ödüller

Poster bildiri ödülü; Guaianolides from Chrysophthalmum montanum(DC.) Boiss, ERCİYES ÜNİVERSİTESİ ve LARKİN HEALTH INSTITUTE, 2015

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler

1. Gürbüz Perihan,Dokumacı Alim Hüseyin,Bilge Odabaşı,EROĞLU DUYGU,AYCAN MÜKERREM BETÜL (2015). GSK 3β Beta İnhibitory Activities Of Various Salviaextracts On SH SY5Y Cell Lines. 1st International Conference On Natural Products For Cancer Prevention And Therapy, 26, 1-39., Doi: 10.1097/CAD.0000000000000280 (Özet Bildiri)/(Yayın No:1973694)
2. Gürbüz Perihan,Doğan Şengül Dilem,Leyla Paşayeva,Dokumacı Alim Hüseyin,Eroğlu Duygu,Paksoy Mehmet Yavuz,Aycan Mükerrerrem Betül (2015). Guaianolides From Chrysophthalmum Montanum DC Boiss. 1st International Conference On Natural Products For Cancer Prevention And Therapy, 26, 1-39., Doi: 10.1097/CAD.0000000000000280 (Özet Bildiri)/(Yayın No:2018370)
3. Peter Olutope Fayemi,Abdulatef MRGHNI AHHMED,Ceyda Birisik,Ceylan Dilek,Özcan Servet,Muchenje Voster,Öztürk İsmet,Çam Mustafa,DOKUMACI ALİM HÜSEYİN,Aycan Mükerrerrem Betül,Yetim Hasan (2015). Phytochemicals İn Callistemon Citrinus A Noveltherapeutic Approach Against MCF 7 Cell Line. 1st International Conference On Natural Products For Cancer Prevention And Therapy, 26, 1-39., Doi: 10.1097/CAD.0000000000000280 (Özet Bildiri)/(Yayın No:1972742)
4. Şeker Karatoprak Gökçe,Koşar Müberra,Dokumacı Alim Hüseyin,Aycan Mükerrerrem Betül (2015). The Cytotoxicity And Gsh Px Activities Ofpelargonium Endlicherianum Fenzl On A549 Cells. 1st International Conference On Natural Products For Cancer Prevention And Therapy, 26, 1-39., Doi: 10.1097/Cad.0000000000000280 (Özet Bildiri)/(Yayın No:1973259)

5. Dokumacı Alim Hüseyin, Gürbüz Perihan, Bilge Odabaşı, Eroğlu Duygu, Aycan Mükerrerem Betül (2015). Protective Effects Of Salvia Rosifolia And S Huberi On β Amyloid Peptide Induced Neurotoxicity Through Gsk 3 β Inhibition. The 12th International Conference On Alzheimer's And Parkinson's Diseases And Related Neurological Disorders (Ad/Pdtm 2015), 15(1), 1-1969., Doi: 10.1159/000381736 (/)(Yayın No:2019943)
6. Aycan Mükerrerem Betül, Dokumacı Alim Hüseyin, Abdussamed Akşit, Çelik İsmail, Gürbüz Perihan (2014). The Cytotoxic Effects Of Chrysophthalmum Dichotomum On A549 And Hepg2 Cell Lines. 2nd Anticancer Agent Congress, 62-62. (Özet Bildiri)(Yayın No:2021903)
7. Dokumacı Alim Hüseyin, Ünal Gökhan, Şeker Karatoprak Gökçe, Aycan Mükerrerem Betül (2014). Investigation Of Cytotoxic Effects Of Pelargonium Endlicherianum Extracts And Related Phenolic Compounds Esculetin And Scopoletin. 2nd Anticancer Agent Congress, 100-100. (/)(Yayın No:2022105)
8. Dokumacı Alim Hüseyin (2013). Possible Protective Effect Of Atorvastatin Against Various Diabetic Complications. International Multidisciplinary Symposium On Drug Research And Development (Tam Metin Bildiri)(Yayın No:194011)
9. Dokumacı Alim Hüseyin (2013). Effect Of Dihydropyridine Calcium Antagonist Nitrendipine In Experimental Diabetes. International Multidisciplinary Symposium On Drug Research And Development (/)(Yayın No:1004851)

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. BERK AHMET, DOKUMACI ALİM HÜSEYİN, MUSTAFA BAHADIR KAYMAZ (2015). YARA İYİLEŞMESİ VE DİYABETİK YARA TEDAVİSİNDE KULLANILAN TIBBİ BİTKİLER. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi (Kontrol No: 2123007)
2. Ebru Öztürk, Ayşe Kübra Karaboğa Arslan, Alim Hüseyin Dokumacı, Mükerrerem Betül Yerer (2016). Real-time analysis of impedance alterations by the effects of vanadium pentoxide on several carcinoma cell lines. Turkish Journal of Pharmacy

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1. DOKUMACI ALİM HÜSEYİN, KARABOĞA AYŞE KÜBRA, AYCAN MÜKERREM BETÜL (2015). KERSETİN VE KURKUMİN BİLEŞİKLERİNİN SHSY 5Y HÜCRELERİNE ETKİLERİNİN GERÇEK ZAMANLI PROFİLLENMESİ. 13th Turkish Neuroscience Congress April 30th 2015 to May 3rd 2015, Konya, Turkey, 9(1) (/)(Yayın No:2019202)
2. DOKUMACI ALİM HÜSEYİN, ŞEKER KARATOPRAK GÖKÇE, KOŞAR MÜBERRA, AYCAN MÜKERREM BETÜL (2014). Pelargonium endlicherianum Kök Ekstrelerinin A 549 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi. 21.Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, 1(1), 46-46. (/)(Yayın No:2020417)
3. KARABOĞA ARSLAN AYŞE KÜBRA, DOKUMACI ALİM HÜSEYİN, DEMİRPOLAT EREN, AYCAN MÜKERREM BETÜL (2014). Bazı Flavonoidlerin A549 Hücrelerinde Canlılığa Ve

Hücre İçi Reaktif Oksijen Türlerinin Oluşumuna Etkisinin Değerlendirilmesi. 21. BİTKİSEL İLAÇ HAMMADDELERİ TOPLANTISI (/)(Yayın No:2149945)

4. ÇELİK İSMAİL,DOKUMACI ALİM HÜSEYİN,ABDUSSAMED AKŞİT,GÜRBÜZ PERİHAN,AYCAN MÜKERREM BETÜL (2014). Chrysophthalmum günerii bitkisinin A 549 ve Hep G2 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri. 5. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi, 177 (/)(Yayın No:2021011)
5. DOKUMACI ALİM HÜSEYİN,AKŞİT ABDUSSAMED,ÇELİK İSMAİL,AYCAN MÜKERREM BETÜL,GÜRBÜZ PERİHAN (2014). Chrysophthalmum montanum Bitkisinin A 549 Ve Hep G2 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkileri. 5th Multidisciplinary Cancer Research, 75-75. (Özet Bildiri/)(Yayın No:2021609)
6. KARABOĞA AYŞE KÜBRA,DOKUMACI ALİM HÜSEYİN,AYCAN MÜKERREM BETÜL (2014). IL1B İle Mpges 1 Enzimi İndüklenmiş Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanser Epitel Hücrelerinde Kemferol ün Canlılığa Etkisi. Ulusal Kanser Haftası Kayıtlılık ve Tarama Eğitimleri (/)(Yayın No:2022259)

Teknik Not, Vaka Takdimi, Araştırma notu ve Diğer Yayınlar

1. Özet, AYCAN MÜKERREM BETÜL,DOKUMACI ALİM HÜSEYİN,ÜNAL GÖKHAN,şahin ceren,ARICIOĞLU FEYZA (2017). POSSIBLE PROTECTIVE EFFECTS OF AGMATINE ANDFAMOTIDINE ON MK-801-INDUCED CYTOTOXICITY IN SHSY 5YCELL LINE. Journal of Cellular Neuroscience and oxidative stess (Yayın No: 3453881)
2. Özet, DOKUMACI ALİM HÜSEYİN,AYCAN MÜKERREM BETÜL (2017). INVESTIGATION OF SAXAGLIPTINE AND VILDAGLIPTINE PROTECTIVE. Journal of Cellular Neuroscience and Oxidative Stress (Yayın No: 3453891)
3. Özet, GÜRBÜZ PERİHAN,DOKUMACI ALİM HÜSEYİN,bilge odabaşı,eroğlu duygu,AYCAN MÜKERREM BETÜL (2015). GSK 3β beta inhibitory activities of various Salviaextracts on SH SY5Y cell lines. Anti-Cancer Drugs, 26, 1-39., Doi: 10.1097/CAD.000000000000280 (Yayın No: 2276713)
4. Özet, ŞEKER KARATOPRAK GÖKÇE,KOŞAR MÜBERRA,DOKUMACI ALİM HÜSEYİN,AYCAN MÜKERREM BETÜL (2015). The cytotoxicity and GSH Px activities ofPelargonium endlicherianum Fenzl on A549 cells. Anti-Cancer Drugs, 26, 1-39., Doi: 10.1097/CAD.000000000000280 (Yayın No: 2145659)
5. Özet, PETER OLUTOPE fayemi,AHHMED ABDULATEF MRGHNI,BİRİŞİK CEYDA,CEYLAN DİLEK,ÖZCAN SERVET,VOSTER MUVHENJE,ÖZTÜRK İSMET,ÇAM MUSTAFA,DOKUMACI ALİM HÜSEYİN,AYCAN MÜKERREM BETÜL,YETİM HASAN (2015). Phytochemicals in Callistemon citrinus a noveltherapeutic approach against MCF 7 cell line. Anti-Cancer Drugs, 26, 1-39., Doi: 10.1097/CAD.000000000000280 (Yayın No: 2277419)
6. Özet, GÜRBÜZ PERİHAN,DOĞAN ŞENGÜL DİLEM,LEYLA PAŞAYEVA,DOKUMACI ALİM HÜSEYİN,eroğlu duygu,PAKSOY MEHMET YAVUZ,AYCAN MÜKERREM BETÜL (2015). Guaianolides from Chrysophthalmum montanum DC Boiss. Anti-Cancer Drugs, 26, 1-39., Doi: 10.1097/CAD.000000000000280 (Yayın No: 2276441)

7. Özet, DOKUMACI ALİM HÜSEYİN,KARABOĞA ARSLAN AYŞE KÜBRA,AYCAN MÜKERREM BETÜL (2015). Kersetin Ve Kurkumin Bileşiklerinin Shsy 5y Hücrelerine Etkilerinin Gerçek Zamanlı Profillenmesi. Anatomy, 9(Suppl 1), 1-69., Doi: 10.2399/ana.15.001s (Yayın No: 2278925)
8. Özet, DOKUMACI ALİM HÜSEYİN,GÜRBÜZ PERİHAN,ODABAŞI BİLGE,KÖNGÜL ESRA,EROĞLU DUYGU,AYCAN MÜKERREM BETÜL (2015). Protective Effects of Salvia rosifolia and S huberi on β Amyloid Peptide Induced Neurotoxicity through GSK 3 β Inhibition. Neurodegenerative Diseases, 15(1), Doi: 10.1159/000381110 (Yayın No: 2278342)

Üniversite Dışı Deneyim

2012	ÜYE	MALATYA ECZACI ODASI, ECZACI ODASI ÜYELİĞİ, (Mesleki Dernekler)
2010-2012	Eczacı	eczane, serbest eczacı , (Ticari (Özel))

Tasarım

DPP-4 İNHİBİTÖRÜ VİLDAGLİPTİN VE SAKSAGLİPTİN' İN SHSY 5Y HÜCRELERİNDE KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI, Alim Hüseyin DOKUMACI,M. Betül AYCAN, Bilimsel Tasarım, Erciyes Üniversitesi Teknoloji Transfer Ofisi(ETTO) tarafından düzenlenen TÜBİTAK destekli projepark2015, Erciyes Üniversitesi Teknoloji Transfer Ofisi(ETTO) tarafından düzenlenen TÜBİTAK destekli projepark2015, 01.05.2015 -21.05.2015, Kişi Sayısı:2

Sertifika

DENEY HAYVANLARI UYGULAMA VE ARAŞTIRMA SERTİFİKASI, DENEY HAYVANLARI UYGULAMA VE ARAŞTIRMA YAPMAK İÇİN GEREKLİ SERTİFİKA, İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ DENEY HAYVANLARI UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ, Sertifika, 04.11.2012 -10.11.2012 (Ulusal)

Üyelikler

1. Türk Farmakoloji Derneği
2. Moleküler Kanser Araştırma Derneği