



**İNTRASEREBROVENTRİKÜLER STREPTOZOTOSİN  
UYGULAMASIYLA OLUŞTURULAN DENEYSEL  
ALZHEİMER SIÇAN MODELİNDE KURKUMİN'İN  
BEYİN TRPM2 KANAL PROTEİN GENİ İFADESİNE  
ETKİSİ**

**Merve DURHAN**

**TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ**

**Yüksek Lisans Tezi - 2017**

**T.C**  
**İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNTRASEREBROVENTRİKÜLER STREPTOZOTOSİN UYGULAMASIYLA  
OLUŞTURULAN DENEYSEL ALZHEİMER SIÇAN MODELİNDE  
KURKUMİN'İN BEYİN TRPM2 KANAL PROTEİN GENİ İFADESİNE ETKİSİ**

**Merve DURHAN**

**Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**  
**Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı**  
**Prof. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ**

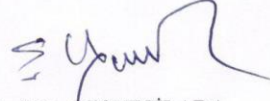
Bu Araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından  
2016/151 Proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA**  
**2017**

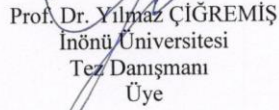
## KABUL VE ONAY SAYFASI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan; **Merve DURHAN**'ın "İntraserebroventriküler Streptozotosin Uygulamasıyla Oluşturulan Deneysel Alzheimer Sıçan Modelinde Kurkumin'in Beyin TRPM2 Kanal Protein Geni İfadesine Etkisi" konulu bu çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 27/07/2017



Prof. Dr. Elif YEŞİLADA  
İnönü Üniversitesi  
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ  
İnönü Üniversitesi  
Tez Danışmanı  
Üye



Prof. Dr. Engin ŞAHNA  
Fırat Üniversitesi  
Üye

## ONAY

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun ...../...../2017 tarih ve 2017/..... sayılı Kararıyla da uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ  
Enstitü Müdürü

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	viii
ABSTRACT.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
TABLolar DİZİNİ .....	xv
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	2
2.1. Alzheimer Hastalığı (AH).....	3
2.1.1. Alzheimer Hastalığının Tarihçesi .....	3
2.1.2. Alzheimer Hastalığının Patofizyolojisi .....	5
2.1.3. Deneysel Alzheimer Hayvan Modelleri.....	16
2.2. TRP Kanalları.....	20
2.2.1 TRPM Kanalları Ailesi ve TRPM2 Kanalı .....	21
2.2.2. TRPM2 ve Alzheimer Hastalığı.....	22
2.3. Kurkumin .....	25
2.3.1. Kurkumin ve Alzheimer Hastalığı .....	26
2.3.2. Kurkumin ve TRPM2 Kanalı .....	26
3. MATERYAL VE METOT .....	27
3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler .....	27
3.2. Kullanılan Alet ve Gereçler .....	28
3.3. Kullanılan Çözelti ve Tamponlar .....	28
3.3.1. Yapay serebrospinal sıvı hazırlanışı.....	28
3.3.2. Streptozotosin hazırlanışı .....	29
3.3.3. Kurkumin hazırlanışı.....	29

3.3.4. RNA saklama çözeltisi.....	29
3.3.5. 10X TBE (Tris-Borat-EDTA) çözeltisinin hazırlanışı.....	29
3.3.6. Lizis solüsyonu hazırlanışı.....	30
3.4. Sıçanların Temini ve Bakımı .....	30
3.5. Grupların Oluşturulması .....	30
3.6. İcvenjeksiyon .....	33
3.7. Morris Su Tankı Deneyi (Morris Water Maze-MWM) .....	37
3.8. Histopatoloji.....	38
3.9. Biyokimyasal Analizler.....	39
3.9.1. Malondialdehit Analizi (MDA).....	39
3.9.2. Glutasyon Analizi (GSH) .....	39
3.9.3. Bakır-Çinko Süperoksit Dismutaz Analizi (Cu-Zn-SOD).....	40
3.9.4. Protein tayini .....	41
3.10. Moleküler Analizler .....	41
3.10.1. Dokudan RNA Saflaştırılması.....	41
3.10.2. cDNA sentez protokolü.....	44
3.10.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu(qRT-PZR).....	44
3.11. İstatistiksel Analizler.....	45
4. BULGULAR.....	46
4.1. Morris Su Tankı Deneyi Bulguları.....	46
4.2. Beyin MDA Seviyesi .....	47
4.3. Beyin GSH Seviyesi.....	48
4.4. Beyin Cu-Zn-SOD Aktivitesi.....	49
4.5. Moleküler Genetik Bulgular .....	50
4.6. Histopatolojik Bulgular .....	54
5.TARTIŞMA .....	56

6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	62
KAYNAKLAR .....	63
EKLER.....	74
EK.1. ÖZGEÇMİŞ .....	74
EK.2. DENEY HAYVANLARI ETİK KURUL KARARI.....	75
EK.3. ETİK KURUL ONAY BELGESİ .....	76
EK.4 .....	77
EK.5 .....	78
EK.6 .....	81



## TEŞEKKÜR

2016-151 nolu yüksek lisans tez araştırma projeme maddi destek sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Tüm yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca daima cesaret verici ve yol gösterici olan, katkılarını ve yardımlarını benden esirgemeyen danışmanım ve kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ'e,

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

Hayvanlara operasyon yapımında bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan ve yardımcı olan Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yard. Doç. Dr. Suat TEKİN'e, histopatoloji analizlerinde yardımcı olan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi Prof. Dr. Nigar VARDI'ya ve Arş. Grv. Azibe YILDIZ'a,

Tez çalışmamın uygulama kısımlarında yardımcı olan değerli arkadaşlarım Fizyoloji Anabilim Dalı doktora öğrencisi Gül Büőra KAYA'ya ve Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencisi Selahattin TUNÇ'a,

Hayatım boyunca benden desteklerini, sevgilerini ve sabırlarını hiç esirgemeyen, zor zamanlarımda her zaman arkamda olan aileme,

Sonsuz sevgi ve saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

**Merve DURHAN**

## ÖZET

### İntraserebroventriküler Streptozotosin Uygulamasıyla Oluşturulan Deneysel Alzheimer Sıçan Modelinde Kurkumin'in Beyin TRPM2 Kanal Protein Geni İfadesine Etkisi

**Amaç:** Streptozotosin sıçan beyinde insüline direnç oluşturarak Alzheimer benzeri patoloji oluşturmaktadır ve deneysel sıçan modeli olarak başarılı kabul edilmektedir. Kurkuminin deneysel Alzheimer sıçan modellerinde oksidatif stresi ve amiloid plaklarını azaltarak koruyucu ve tedavi edici olduğu gösterilmiştir. TRPM2 kanal proteini hücre içine fazla kalsiyum alımıyla Alzheimer patolojisini negatif etkilemektedir. Son araştırmalar kurkuminin *in vitro* indüklenmiş TRPM2 kanal proteinini inhibe edebildiğini rapor etmiştir. Bu çalışmanın amacı *in vivo* olarak Alzheimer sıçan modelinde kurkuminin TRPM2 genine ve hastalık patolojisine olan etkilerinin araştırılmasıdır.

**Materyal ve Metot:** Araştırmada 50 adet Wistar albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Alzheimer model incelemesi Morris su tankı deneyiyle yapıldı. Sıçanların beyin dokusundan SOD, MDA, GSH düzeyleri spektrofotometrik yöntemlerle ölçüldü. Sıçanların hipokampus dokularından TRPM2 ve MAPT genlerinin ifadeleri gerçek zamanlı-PZR analiziyle yapıldı. Beyin dokularından hemotoksilen-eozin boyaması ile histopatolojik incelemeler yapıldı.

**Bulgular:** STZ grubu sıçanlarda MDA seviyesi sadece kurkumin grubuna göre arttı. GSH seviyeleri STZ grubunda azalmış, STZ+kurkumin grubunda artmış olarak bulundu ( $P<0.05$ ). SOD aktivitesi STZ grubunda diğer gruplara göre artmışken STZ+kurkumin grubunda bu gruba oranla azalmış gözlemlendi ( $P <0.05$ ). TRPM2 mRNA seviyesi STZ grubunda kontrole oranla yüksek, STZ+kurkumin grubunda STZ'ye oranla azalmış bulundu. Histopatolojik olarak STZ grubu sıçan beyin dokularında nörodejenerasyon gözlemlendi ve kurkumin uygulamasının STZ+Kürkumin grubundadejenerasyonu hafiflettiği tespit edildi.

**Sonuç:** STZ uygulanan sıçanlarda oksidatif stres ve nörodejenerasyon görülmüş olup ve TRPM2 gen ifadesi artırmıştır. Kurkumin uygulaması nörodejenerasyonda iyileştirme yaparken,TRPM2gen ifadesinde azalmaya yol açmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Alzheimer hastalığı, kurkumin, streptozotosin, sıçan, TRPM2



## ABSTRACT

### **The Effect of Curcumin on Brain TRPM2 Channel Gene mRNA Expression Level in Experimental Alzheimer's Rat Model Induced by Application of Intracerebroventricular Streptozotocin**

**Aim:** Streptozotocin generates insulin-resistant condition in rat brain which forms Alzheimer-like pathology and it has approved successful as experimental rat model. It has been shown that curcumin has protective and therapeutic features as reduced oxidative stress and amyloid plaques in experimental Alzheimer rat models. *TRPM2* channel protein has a negative effect on Alzheimer pathology with intrinsic calcium influx into the neurons. It has been reported in recent studies that curcumin could inhibit induced *TRPM2* channel protein *in vitro*. The aim of this study is to investigate the effect of curcumin to *TRPM2* gene and Alzheimer pathology in Alzheimer rat model as *in vivo*.

**Material and Method:** This study was carried out with 50 Wistar albino male rats. Analysis of experimental Alzheimer rat model performed by Morris water maze. Biochemical analysis like SOD, MDA, GSH with rat brain tissue accomplished by spectrophotometric methods. *TRPM2* and *MAPT* gene expression levels performed by q-real time-PCR in rat hippocampus tissue. Hematoxylin-eosin staining made on brain tissues for histopathological analysis.

**Results:** MDA levels increased in STZ group to STZ+curcumin. It was found GSH levels decreased in STZ group while STZ+curcumin increased ( $P < 0.05$ ). SOD activities were higher in STZ group comparing to STZ+curcumin ( $P < 0.05$ ). *TRPM2* mRNA levels increased in STZ rats and has lower levels in STZ+curcumin. Histopathologically, STZ group had neurodegeneration and STZ+curcumin had attenuated damage.

**Conclusion:** It has been shown that oxidative stress and neurodegeneration and increased *TRPM2* mRNA levels in STZ induced rats. Curcumin has led to a reduction in *TRPM2* mRNA levels with positive effect on neurodegeneration.

**Key Words:** Alzheimer's disease, curcumin, rat, streptozotocin, *TRPM2*

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>A<math>\beta</math></b>	: Amiloid $\beta$
<b>AchE</b>	: Astilkolinesteraz
<b>ADPR</b>	: Adenozin difosfat riboz
<b>AH</b>	: Alzheimer hastalığı
<b>AI3P</b>	: Amiloid 1B protein
<b>APP</b>	: Amiloid öncül (prekürsör) protein
<b>APOE</b>	: Apolipoprotein E
<b>Ca<sup>+2</sup></b>	: Kalsiyum iyonu
<b>CaMK</b>	: Kalmodulin-bağımlı protein kinaz
<b>cDNA</b>	: Komplementer deoksiribo nükleik asit
<b>CLU</b>	: Clusterin
<b>COX-2</b>	: Siklooksijenaz-2
<b>CREB</b>	: Siklik AMP-yanıt elementi bağlayan protein
<b>CuZn-SOD</b>	: Bakır-Çinko Süperoksit Dismutaz
<b>DNA</b>	: Deoksiribo nükleik asit
<b>GLUT2</b>	: Glukoz taşıyıcı-2
<b>GPx</b>	: Glutasyon peroksidaz
<b>GSH</b>	: İndirgenmiş glutasyon
<b>GST</b>	: Glutasyon-s-transferaz
<b>GWAS</b>	: Genom çapında bağlantı çalışmaları
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen peroksit

<b>İcv</b>	: İntraserebroventriküler
<b>İ.p</b>	: İntraperitoneal
<b>İR</b>	: İnsülin reseptörü
<b>KBB</b>	: Kan-beyin bariyeri
<b>MAPK</b>	: Mitojen-aktive protein kinaz
<b>MAPT</b>	: Mikrotübül bağlantılı protein tau
<b>MDA</b>	: Malondialdehit
<b>µL</b>	: Mikrolitre
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>mRNA</b>	: Mesajcı ribonükleik asit
<b>MWM</b>	: Morris su tankı deneyi (Morris water maze)
<b>NAD</b>	: Nikotinamid adenin dinükleotid
<b>NO</b>	: Nitrik oksit
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	: Preoksinitrit
<b>PARP</b>	: Poli ADP riboz polimeraz
<b>PET</b>	: Pozitron emisyon tomografi
<b>PIB</b>	: Pittsburg bileşiği B
<b>PICALM</b>	: Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein
<b>PLA2</b>	: Fosfolipaz A-2
<b>PSEN1</b>	: Presenilin-1
<b>PSEN2</b>	: Presenilin-2
<b>PZT</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR-Polimerase chain reaction)
<b>ROT</b>	: Reaktif oksijen türleri

<b>sAH</b>	: Sporadik Alzheimer hastalığı
<b>SOD</b>	: Süperoksit dismutaz
<b>STZ</b>	: Streptozotosin
<b>TBE</b>	: Tris borat etilendiamintetraasetikasit
<b>TRP</b>	: Transient receptor potential
<b>TRPM2</b>	: Transient receptor potential melastatin-2



# ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Alois Alzheimer .....	4
Şekil 2.2. Alzheimer hastası ve sağlıklı bireyden alınan nörolojik görüntüleme .....	6
Şekil 2.3. Alzheimer hastalığı riskine katkıda bulunan seyrek ve yaygın varyantlar .....	7
Şekil 2.4. Amiloid peptitlerinin iki kararlı formunun şematik gösterimi .....	10
Şekil 2.5. Amiloid kaskadı hipotezi. Amiloid kaskadı hipotezi. ....	11
Şekil 2.6. Güncel amiloid kaskadı hipotezi. ....	12
Şekil 2.7. Fizyolojik ortamda ve patolojik durumda tau fosforilasyonunun tauişlevini düzenlemedeki rolünü gösteren diyagram.....	14
Şekil 2.8. Transgenik farelerde nörofibriler yumak ve plak üretimi. ....	17
Şekil 2.9. TRP süper ailesi.....	21
Şekil 2.10. TRPM2 kanalının yapısı.....	22
Şekil 2.11. Nöronal TRP kanallarının AH'da tahmini katılımları.....	24
Şekil 2.12. Kurkuminin kimyasal yapısı. ....	25
Şekil 3.1. 290 gram Wistar rata ait kafatası diyagramı.....	33
Şekil 3.2. Sıçanın stereotaksi cihazına yerleştirilmesi.....	34
Şekil 3.3. Stereotaksi cihazına sabitlenen sıçanın kafatasında koordinatları belirlemeden önce temiz bir görüntü sağlanması.....	35
Şekil 3.4. Bregma noktasının ve stereotaksik koordinatların belirlenmesi.....	35
Şekil 3.5. Enjeksiyon için kafatasında delik açılması.....	36
Şekil 3.6. Hamilton enjektörüyle STZ enjeksiyonu yapılması.....	36
Şekil 3.7. Operasyon sonrası açılan kesinin süturla kapatılması.....	37
Şekil 3.8. Morris su tankında yüzdürme seansı.....	38
Şekil 3.9. Araştırmada her bir gruba ait beyin doku örneklerinden saflaştırılan RNA'lar.....	42

<b>Şekil 4.1.</b> MWM analizi yapılırken yüzen hayvanların kaydedilen ısı haritaları (heatmap)örnekleri.....	46
<b>Şekil 4.2.</b> Gruplarda ölçülen MDA seviyeleri.....	47
<b>Şekil 4.3.</b> Gruplarda ölçülen GSH seviyeleri.....	48
<b>Şekil 4.4.</b> Gruplarda ölçülen SOD aktiviteleri.....	49
<b>Şekil 4.5.</b> “Hydrolysis Probe” kimyası kullanılarak $\beta$ -aktin, <i>MAPT</i> ve <i>TRPM2</i> mRNA’larından sentezlenen cDNA’ların gerçek zamanlı PZR ile çoğaltım eğrisi.....	50
<b>Şekil 4.6.</b> $\beta$ -aktin, <i>MAPT</i> ve <i>TRPM2</i> cDNA’larının PZR’deki çoğalımının agaroz jel (%1,5) elektroforezi görüntüsü.....	51
<b>Şekil 4.7.</b> Gruplarda ölçülen <i>TRPM2</i> mRNA seviyeleri.....	52
<b>Şekil 4.8.</b> Gruplarda ölçülen <i>MAPT</i> mRNA seviyeleri.....	53
<b>Şekil 4.9.</b> Morfolojik görünümleri normal olarak izlenen piramidal nöronlar.....	54
<b>Şekil 4.10.</b> STZ ve STZ+KK gruplarının histopatolojik görüntüleri.....	55

## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo No</b>	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 2.1.</b> Alzheimer hastalığı risk genleri.....	8
<b>Tablo 2.2.</b> Alzheimer hastalığı transgenik rat modelleri.....	18
<b>Tablo.3.1.</b> Yapay serebrospinal sıvı içeriği.....	28
<b>Tablo 3.2.</b> Çalışma zaman çizelgesi.....	32
<b>Tablo 3.3.</b> Gruplarda ölçülen doku RNA spektrofotometrik absorbans değerleri veRNA miktarları.....	42
<b>Tablo 3.4.</b> Primer dizilimleri.....	45
<b>Tablo 4.1.</b> Gruplarda ölçülen MDA seviyeleri.....	47
<b>Tablo 4.2.</b> Gruplarda ölçülen GSH seviyeleri.....	48
<b>Tablo 4.3.</b> Gruplarda ölçülen SOD aktiviteleri.....	49
<b>Tablo 4.4.</b> Gruplarda ölçülen beyin <i>TRPM2/β Aktin</i> mRNA seviyelerinin oranı.....	52
<b>Tablo 4.5.</b> Gruplarda ölçülen beyin <i>MAPT/β-Aktin</i> mRNA seviyelerinin oranı.....	53
<b>Tablo 4.6.</b> Grupların histopatolojik skorlama sonuçları ve karşılaştırması.....	55

# 1. GİRİŞ

Dünya nüfusu yaşlandıkça Alzheimer hastalığı (AH) için yapılan araştırmalar daha fazla önem kazanmaktadır. 2006 yılında dünya çapında Alzheimer prevalansı 266 milyonken, araştırmacılar bu sayının 2050'de dört katına ulaşacağını öngörmektedir (1). AH, amiloid plaklar ve nörofibriler yumaklar olmak üzere iki önemli belirtece sahip olup hastalığın patolojik süreciyle alakalı tek ve açık bir mekanizma henüz ortaya konamamıştır (2). Alzheimer patolojisiyle kalsiyum arasındaki bağlantılara ait araştırmalar nöronlardaki bu iyonun dengesiz dağılımının demans üzerinde etkili olduğunu ortaya koymaktadır (3).

'Transient receptor potential melastatin-2' (TRPM2), hücre içine kalsiyum alımıyla görevli bir kanal proteindir ve oksidatif stresle indüklendiği gibi, hücre içine kalsiyum akışını artırarak oksidatif stresi de artırmaktadır (4). Alzheimer patolojisinde kalsiyumun rolü ve TRPM2'nin en fazla beyinde ifade edilmesinden dolayı kalsiyum ve TRPM2 arasında doğrudan bir bağlantı kurulmaktadır (5).

Kurkumin, zerdeçala rengini veren bir bileşiktir ve antioksidan özelliğiyle birçok nörodejenerasyon patolojisi için koruyucu ve tedavi edici bir ajan olarak tanıtılmaktadır (6). Kheradpezhoh ve ark. (7) yaptığı çalışma kurkuminin *in vitro* olarak TRPM2 kanal proteinini inhibe edebildiğini göstermektedir.

Bu tezde Alzheimer sıçan modelinde kurkuminin TRPM2 kanal proteinini inhibe etme özelliği *in vivo* olarak araştırılarak hastalık patolojisindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

Alzheimer hastalığı hafıza ve diğer zihinsel fonksiyonların ilerleyen kaybıyla tanımlanmaktadır. Bu hastalık beynin belirli bölgelerinde nöron kaybına yol açtığından beynin ağırlığı ve hacmini azaltmaktadır (8). Alzheimer hastalığının amiloid plaklar ve nörofibriler yumaklar olmak üzere iki patolojik belirteci vardır. Amiloid kaskadı hipotezi, amiloid  $\beta$  ( $A\beta$ ) birikimi sonucu nöronal fonksiyon kaybı ve beyin hücresi ölümünün tetiklendiğini savunmaktadır.  $A\beta$  birikiminin toksik etkisiyle, nörofibriler yumağın ana yapısını oluşturan mikrotübül ilişkili tau proteini hiperfosforilasyona uğramaktadır (2).

$A\beta$  aracılı mekanizmalar ile artan kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) seviyesi, organizmada aşırı mitokondriyel  $Ca^{+2}$  yüklenmesine, süperoksit radikallerinin oluşumuna ve bazı AH modellerinde nörodejenerasyon ve hücre ölümüyle bağlantılı olan proapoptotik mitokondriyal proteinlerin (kaspazlar ve sitokrom c gibi) ortaya çıkmasına öncülük edebilmektedir (9).

TRPM2; ADP-riboz (ADPR), nikotinamid adenin dinükleotid (NAD), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve oksidan tertbütilhidroperoksit gibi reaktif oksijen türleri (ROT) aracılığıyla aktive olup  $Ca^{+2}$  geçişinde rol oynamaktadır. Oksidatif stres mitokondri içindeki ADPR üretimini indüklemekte ve sitozole salmakta bu da TRPM2'yi aktive etmektedir (10).  $A\beta$ , membrana bağlı oksidatif stres ve hücrel  $Ca^{+2}$  homeostazının bozulmasıyla nöronları apoptoza ve eksitotoksisiteye hassas kılmaktadır. Son bulgular TRPM2'nin  $H_2O_2$  indüklü nöronal ölüm rolünün yanı sıra  $A\beta$  indüklü hücre ölümünde de işlevinin olduğunu göstermektedir (5).

Zerdeçal; kurkuminoidler, kurkumin, demetoksikurkumin ve bisdemetoksikurkumin içermektedir. Son zamanlarda kurkuminoidlerin nöronal koruyuculuğu, kemo ve kanser önleyiciliği gibi sağlıkla alakalı özellikleri dikkat çekmeye başlamıştır. Kurkuminoidler, anti-enflamatuar aktiviteye sahip olup organizmanın antioksidan savunma mekanizmasını indüklemektedir (6). Kurkumin, anti-enflamatuar, anti-oksidan ve anti-protein agregat aktiviteler gibi birçok özelliğe sahiptir. Sahip olduğu bu çoklu potansiyel, oral kullanımının güvenliği, uzun zamandan

beri kullanımı ve düşük maliyeti kurkumini birçok nöropatolojik durum için önleyici konuma getirmektedir. Mutant amiloid öncül protein (APP) transgenik plak-oluşturan Alzheimer hayvan modelinde kurkumin test edildiğinde oksidatif hasar ve yangı oranını azalttığı gibi birikmiş A $\beta$  ve amiloid plaklarda da azalma sağlamaktadır(11). Kurkumin ROTtemizleyicisi olarak çalışabilmekte, oksidatif stresi azaltmakta ve böylece ADPR oluşumunu ve devamında TRPM2 kanallarının çalışmasını önlemektedir. Kheradpezhohu ve ark. (7) karaciğer hücreleriyle yaptığı bir araştırmada, kurkuminin oksidatif hasar veya hücreler arası ADPR uygulamasına cevaben gelişen TRPM2'yi inhibe ettiğini ancak aktif TRPM2 kanallarını bloke etmediğini göstermişlerdir. Bu çalışmayla ilk kez kurkuminin ADPR tarafından aktive olan TRPM2'nin bir veya daha fazla yolağını inhibe ettiği ortaya konulmuştur.

## **2.1. Alzheimer Hastalığı (AH)**

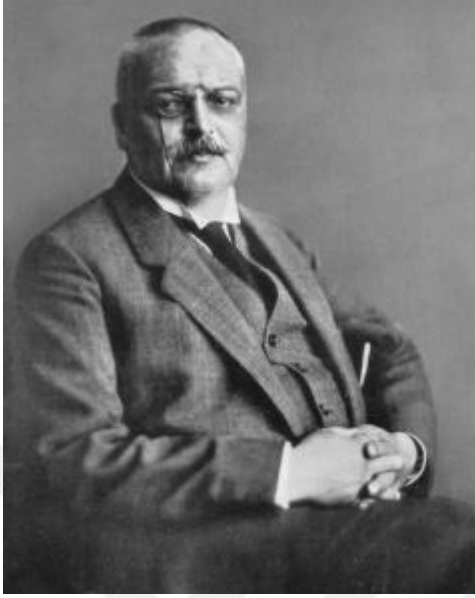
Alzheimer hastalığı yaşlılarda bunamanın (demans) birincil nedeni olarak gösterilen klinik olarak hafıza kaybı ve bilişsel zayıflama ile tanımlanan ilerleyen nörodejeneratif bir hastalıktır. Sadece 2010 yılında AH'nın tedavisinin dünya çapında 604 milyar dolara mal olduğu tahmin edilmektedir (12). AH vakalarının dünya çapında sayısı 2012'de 36 milyon olarak tahmin edilirken 2050'de bu sayının üç katına çıkacağı öngörülmektedir (1).

Bu hastalık beynin belirli bölgelerinde nöron kaybına yol açtığından beynin ağırlığı ve hacmi hastalıkta azalmaktadır (1).

### **2.1.1. Alzheimer Hastalığının Tarihçesi**

Klinik psikiyatrist ve nöroanatomist olan Alois Alzheimer (Şekil 2.1) 3 Kasım 1906'da bir vakada 'serebral korteksin olağandışı şiddetli hastalık süreci' ifadesini kullanmıştır. Alzheimer hastalığı 1910 yılında isim olarak literatüre girmiş olup Alzheimer bundan başka üç vaka daha yayınlayarak aynı süreçten dolayı oluşan plakları göstermiştir (13). Alzheimer hastalığı, radyolojik görüntüleme tekniklerinin

gelişmesiyle birlikte morfometrik ölçümler ile ölüm sonrası (postmortem) dokularda gösterilebildiği gibi artık hayatta olan hastalarla da teşhis edilmeye başlanmıştır (14).



**Şekil 2.1.** Alois Alzheimer (13).

Alzheimer'ın hastalık tanımından sonra yıllarca AH'ye neden olan patolojik tanımlarla ilgili pek az gelişme olmuştur. Elektron mikroskopunun kullanımıyla 1960'larda Alzheimer'a ait iki klasik senil (sinirsel) ve nörofibriler yumak lezyonlarının keşfiyle bu durum değişmiştir. Sinir sistemi kimyasıyla ilgili çalışmalar 1970'lere gelindiğinde, asetilkolin sentezleyen ve salınımını yapan nöronların genellikle şiddetli nörodejenerasyona gittiğini tespit etmiştir (13). Bu sonuçlar kolin asetiltransferaz ve asetilkolinesteraz enzimlerinin miktarında ve etkinliğinde azalma olduğunu da göstermiştir. Daha sonra farmakolojik araştırmalar sinaptik yarıқта asetilkolin seviyelerine yoğunlaşmıştır. AH'da beyin dokusunda çeşitli nörotransmitterlerin eksikliği 1970'lerin sonunda ve 1980'lerin başında tespit edilmiştir ve Alzheimer'ın, Parkinson hastalığından farklı olarak tek bir nörotransmitter sınıfını etkilemediği oldukça fazla unsur barındırdığı açıklığa kavuşturulmuştur (14). Bu bulgulardan sonra sinir bilim kimyacıları amiloid plakların ve nörofibriler yumakların moleküler kaynağına ve içeriğine önem vermeye başlamışlardır. Plakların ve yumakların altyapı içerikleri 1980'lerin ortasından sonra tanımlanmıştır ve moleküler genetikteki ilerlemeler sayesinde AH genetiği ve buna bağlı olarak önemli rolleri olan proteinlerin

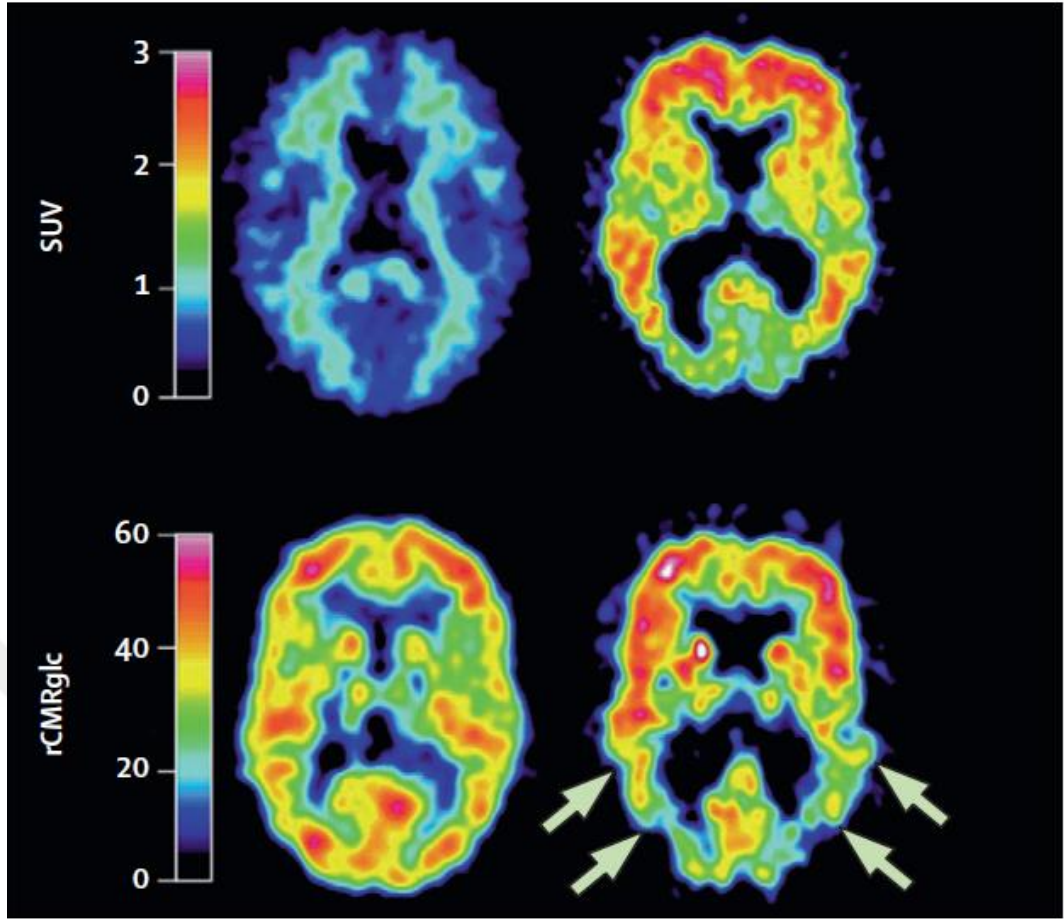
alt birimleri de tanımlanmıştır. Genotip-fenotip ilişkisi ailesel AH tipleriyle bağlantılı olarak açıklanmıştır. Tedavi seçeneklerini geliştirmek ve hastalığın erken mekanizmasını anlayabilmek için kullanışlı hücresel ve deney hayvan modellerinden yararlanılmaktadır (15).

### **2.1.2. Alzheimer Hastalığının Patofizyolojisi**

Alzheimer hastalığının iki ana patolojik belirteci amiloid plaklar ve nörofibriler yumaklardır. Amiloid kaskat hipotezi, A $\beta$  birikiminin nöronal fonksiyon bozukluğunu tetiklediğini ve beyinde ölüme neden olduğunu öne sürmektedir (16).

Mikrotübül bağlantılı protein tau, nörofibriler yumakların ana yapısını oluşturmaktadır. Amiloid kaskadı hipotezi, tau proteininde olan değişimlerinve nörofibriler yumak oluşumunu sonuçlanmasının A $\beta$ 'nin toksik konsantrasyonları tarafından tetiklendiğini ileri sürmektedir (17). Tau çözünebilir bir proteindir ancak nörofibriler yumak oluşumu sürecinde çözünmez. Buna karşın agregatlar üretmektedir ve bu da nöronun işlevini ve yapısını bozmaktadır. Tau monomerleri ilk olarak oligomer oluşturmak için bir araya gelmekte daha sonra  $\beta$  tabakalar halinde birikerek nörofibriler yumakları oluşturmakta ve daha sonra hiper fosforillenmeye uğramaktadır (2).

Radyolojik görüntüleme­deki son gelişmeler yaşayan Alzheimer hastalarında patolojik belirteçlerin tespit edilmesini sağlamıştır ve teşhis doğruluğuy­la klinik deneyler için hasta seçimi de gelişmiştir. Hastalığın teşhisinde kan dolaşım sistemine <sup>11</sup>C işaretli Pittsburg bileş­i B (PIB) enjekte edildikten sonra kan-beyin bariyerini (KBB) aş­p AH patolojik teşhisi için gerekli olan anormal seviyede birikmiş amiloid- $\beta$  peptitlerinin depolarına (amiloid plak) bağlanması gözlenmektedir. Amiloid plaklara bağlanan PIB pozitron emisyon tomografi (PET) aracılığıyla tespit edilebilmektedir (Şekil 2.1) (18).



**Şekil 2.2.** Alzheimer hastası ve sağlıklı bireyden alınan nörolojik görüntüleme.

Solda 67 yaşında sağlıklı bireye ve sağda 79 yaşında Alzheimer hastası bireye  $^{11}\text{C}$  işaretli PIB standart ölçüde verilerle beyin görüntüleri alınmıştır. Alt sıradaki görüntülerde  $^{18}\text{F}$ -florodeoksiglukoz serebral bölgesel glukoz metabolizma görüntüleri bulunmaktadır. Alzheimer hastası bireyin frontal ve temporal kortekslerinde yüksek seviyede PIB tutulması ile serebral bölgesel glukoz metabolizmasında hipometabolizma görülmektedir. Sağlıklı bireyde üst solda PIB tutulmasında eksikler olup alt solda normal serebral bölgesel glukoz metabolizması bulunmaktadır (2).

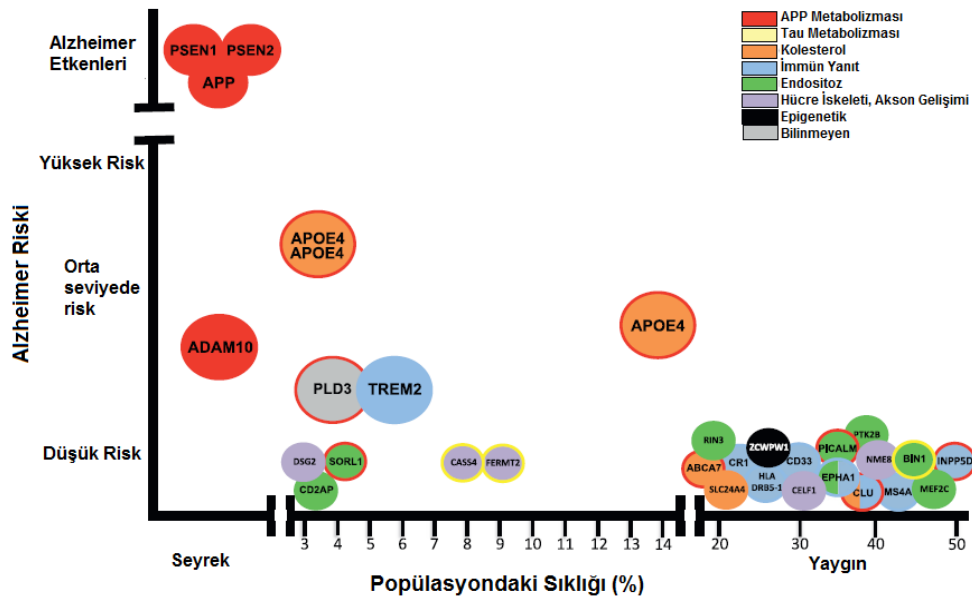
### 2.1.2.1. Alzheimer Hastalığının Genetiği

Alois Alzheimer'ın 1906'daki AH'nın nöropatolojik özelliği olan plakları keşfinden sonra bu plakların ana yapısı 80 yıl boyunca tespit edilememiştir. 1985'te Down sendromu ve Alzheimer hastası bireylerden izole edilen amiloid plaklardan ' $\beta$ -protein' elde edilmiştir. Bu bilgi A $\beta$  geninin kodlarının insan 21. kromozomunda olduğu hipotezine temel sağlamıştır. Daha sonra A $\beta$  cDNA'sının klonlanmasıyla bu bölgenin,

amiloid öncül proteini (amiloid prekürsör protein-APP) denen daha büyük bir yapıya ait olduğu keşfedilmiştir (19).

Genetik açıdan AH hem ailesel hem de sporadik olarak çok etmenli bir hastalıktır. Ailesel AH, otozomal dominant olup 65 yaşından önce başlamaktadır. Hastalığın ailesel çeşidinde keşfedilen ilk mutasyon 21. kromozomda bulunan APP proteinine aittir (20). Yine de bu mutasyonlar sadece birkaç ailesel vakayı açıklamaktadır. Daha çok *presenilin 1 (PSEN1)* ve *presenilin 2 (PSEN2)* genlerindeki benzer mutasyonlar daha fazla ailesel vakayı aydınlatmaktadır. Ailesel tipteki AH oldukça nadir olup prevalansı % 0,1'in altındadır. Sporadik (geç gelişen) AH tipine ait ilk genetik bağlantı 1993'te *apolipoprotein E (APOE) ε4* allelidir. Bu allelin homozigot olduğunda heterozigot haline göre 15 kat daha fazla hastalık riskini artırdığı meta analizlerle gösterilmiştir. *APOE ε4* alleli sporadik AH'nın çoğunda hesaba katılmaktadır, diğer aday genlerin genellikle daha az etkiye sahip olduğu bildirilmektedir (21).

Geç başlangıçlı sporadik AH riski ile ilgili genom çapında ilişkilendirme çalışmalarında (genom-wide association studies-GWAS) *ABCA7*, *CLU*, *CR1*, *CD33*, *CD2AP*, *EPHA1*, *BIN1*, *PICALM* ve *MS4A* gibi birçok polimorfizm tespit etmiştir (Şekil 2.3) (22).



Şekil 2.3. Alzheimer hastalığı riskine katkıda bulunan seyrek ve yaygın varyantlar. Sonuçlar genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) sonucu elde edilmişlerdir (13).

AH için genetik risk yaklaşık olarak % 70 olarak tahmin edilmektedir ve hastalıkla ilişkisi anlaşılmış genlerin en önemlileri Tablo 2.1’de yer almaktadır (2).

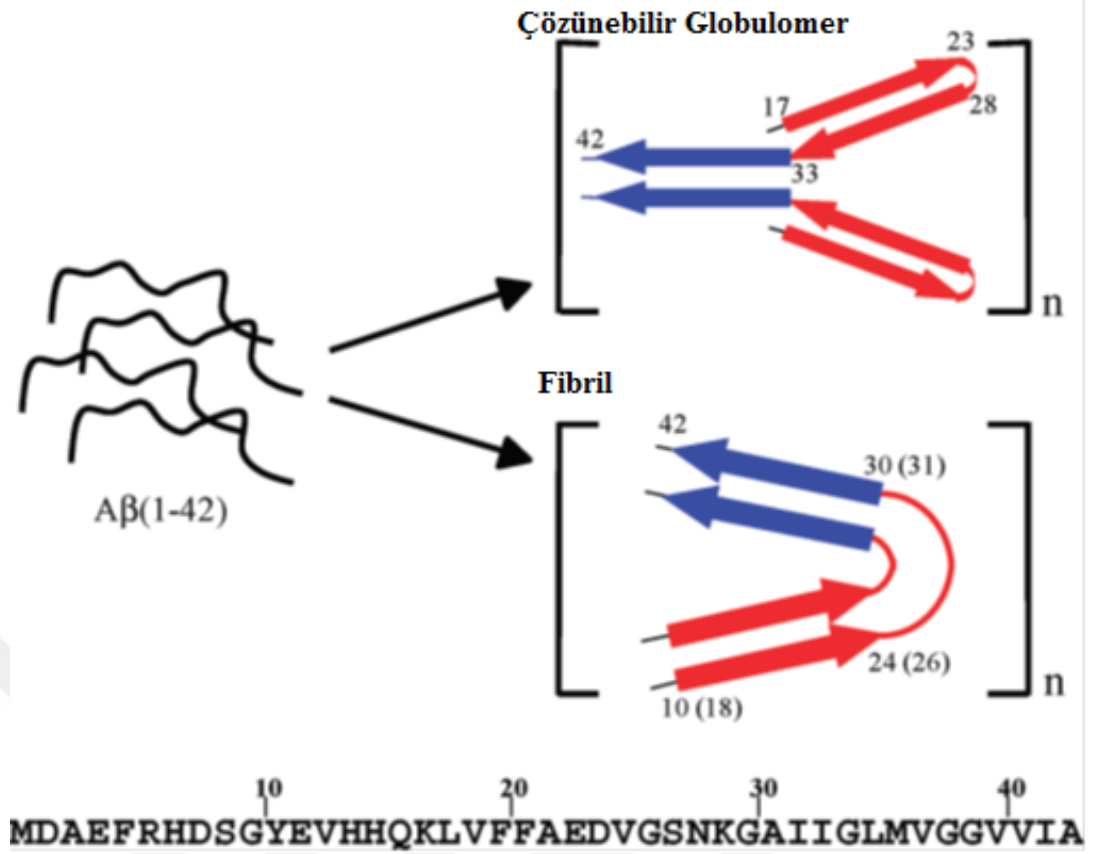
**Tablo 2.1.** Alzheimer hastalığı risk genleri (2).

<b>Genler</b>	<b>Alzheimer Hastalığındaki Rolü</b>
<b>Ailesel Genler</b>	
<b>APP</b>	APP sekretazla kesilen bir membran proteinidir. APP’nin sekretazla kesimi hem amiloidojenik olmayan hem de A $\beta$ üretimi yapan sürece neden olmaktadır. Ailesel APP mutasyonları APP’nin amiloidojenik yolağa öncelikli olarak girmesine yol açmaktadır.
<b>PSEN1</b>	PSEN1, APP’nin A $\beta$ sürecine dahil olan sekretazın bir bileşenidir. Ailesel PSEN1 mutasyonları plak oluşturmaya A $\beta$ 1-40’tan daha eğimli olan A $\beta$ 1-42’nin üretimini değiştirebilmektedir.
<b>PSEN2</b>	APP’nin $\alpha$ -sekretaz ve A $\beta$ kompleksi sürecine dahiletmektedir. Ailesel mutasyonları plak oluşturmaya A $\beta$ 1-40’tan daha eğimli olan A $\beta$ 1-42’nin üretimini değiştirebilmektedir.
<b>SorL1</b>	SorL1, APOE ile etkileşime girmekte, APP trafiğini etkilemekte ve A $\beta$ üretimini azaltan proteinin aşırı miktarda ifade edilmesini sağlamaktadır. SorL1’in APP’ye bağlanması A $\beta$ üretiminin azalmasına yol açmaktadır. SorL1 bir $\gamma$ -sekretaz substratıdır. Alzheimer hastalarında SorL1 miktarı azalabilmektedir.
<b>Risk Genleri</b>	
<b>APOE</b>	APOE kolesterolle taşımakta ve izoformları taşıma etkinliğine göre değişmektedir. APOE, A $\beta$ ’ya izoforma özel olarak bağlanmakta ve A $\beta$ temizlenmesinde görev almaktadır. APOE $\epsilon$ 4 allelleri artan amiloid birikimi ve kolinerjik bozuklukla ilişkilidir.
<b>GSK3<math>\beta</math></b>	GSK3 $\beta$ tau’yu fosforillemekte ve yumak oluşumuna yol açmaktadır. APP kesim ürünleri GSK3 $\beta$ ’yi aktive edebilmekte, bu da tau fosforilasyonunda artışa neden olmaktadır. GSK3 $\beta$ , PSEN kompleksleri tarafından da teşvik edilebilmektedir.
<b>DYRK1A</b>	DYRK1A, 21.kromozomda yer almaktadır. DYRK1A, tau fosforilasyonuna dahil olmakta ve A $\beta$ tarafından artırılmaktadır, bu nedenle amiloid ve tau patolojileriyle arasında bağlantı bulunmaktadır. DYRK1A, tauyu GSK3 $\beta$ ’nin fosforillenmesi için öncül olarak fosforillmektedir. Ayrıca başka bir yumak proteini olan septin-4’ü de fosforillmektedir. DYRK1A, APP fosforilasyonuna dahil olmakta ve amiloidojenik yolak için BACE etkileşimini artırmaktadır.
<b>Tau</b>	Tau nörofibriler yumaklar halinde fosforillenmektedir. Tau 6 tane alternatif kesilim izoformuna sahiptir ve mutasyonları kesilimiyle mikrotübül bağlanma etkinliğini değiştirebilmektedir. Tau haplotipi AH ile ilişkilidir ve kesilim izoformlarının anlatım seviyesini etkilemektedir.
<b>TOMM40</b>	TOMM40 mitokondri dış membranına yerleşmekte ve APP ile etkileşime girmektedir. Yaşa bağlı geç başlangıçlı AH oluşumuyla ilişkilidir.
<b>CLU</b>	Clusterin, A $\beta$ oluşumuna dahil olan bir şaperondur . AH’nin şiddeti ve ilerleme süreciyle ilişkilidir.
<b>PICALM</b>	Fosfatidilinositol bağlayan klatrin birleşme proteini (phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein-PICALM), erken AH’da genişleyen endozomlarda bulunmaktadır.

### 2.1.2.2. Amiloid Hipotezi

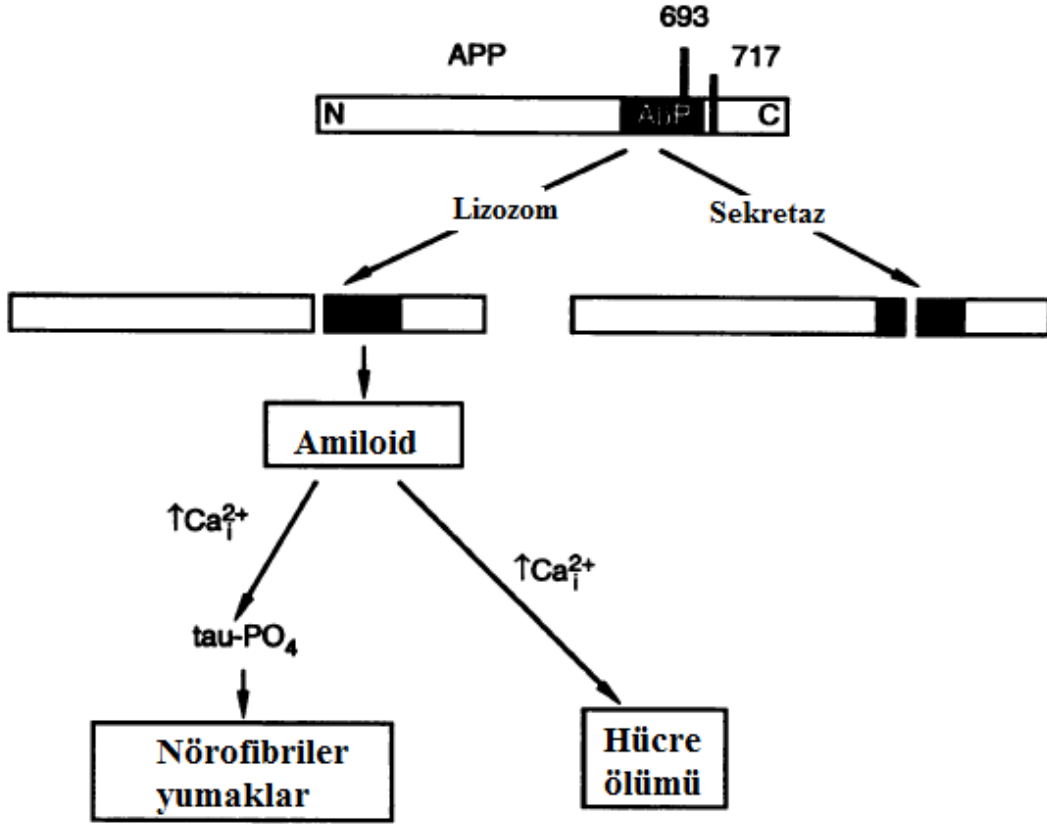
Alzheimer, nörofibriler yumaklar içeren nöronlarca sarılmış çok sayıda amiloid plakların birikiminden dolayı vasküler hasar ve nöronal hücre kaybıyla beyindeki çeşitli patolojik belirteçlerle tanımlanmaktadır (17). Hastalık sürecinde nörofibriler yumaklar mı yoksa amiloid plaklar mı daha önce lezyon oluşturuyor bilinmediğinden bu belirteçlerin hastalık etyolojisindeki rolleri halatartışılmaktadır. Amiloid hipotezine göre A $\beta$  proteininin birikimi plakların ana yapısını oluşturmaktadır ve bu da Alzheimer patolojisinin etken maddesidir; nörofibriler yumaklara, hücre kaybına, vasküler hasara ve bunların devamında demansa neden olmaktadır. APP, daha büyük olan amiloid öncül proteininin bir peptit ürünüdür. AIP molekülü, APP'nin karboksil (COOH)-ucunda hidrofobik transmembran domain oluşturan 39-42.aminoasitler arasındaki peptittir (Şekil 2.4). Amiloid 1B protein (A13P) amiloidin hücre dışı çözünmez çökeltilerini oluşturan protein gruplarından biridir. APP geni çeşitli protein izoformları oluşturmak için alternatif RNA kırılmasına uğramaktadır; diğer dokulardaki APP moleküllerinde var olan serin proteaz inhibitör alanı beyinde baskın olarak bulunan varyantında eksiktir (23).





**Şekil 2.4.** Amiloid peptitlerinin iki kararlı formunun şematik gösterimi. Çözünebilir globulomer form ve çözünmez fibril formların her ikisinde de tekrar eden iki ip gösterilmiştir fakat bu formların son halleri bu kısımlardan daha fazla oligomere sahiptir. Paralel tabaka peptidin hidrofobik C-ucunu içerir ve iki formda maviyle gösterilen ortak bölgelerdir. İki form arasında belirgin ayrımı olan segment kırmızıyla gösterilmiştir. Fibrilin oluşumunda alternatif başlangıç ve bitiş sekansları parentez içinde belirtilmektedir (24).

APP, sitoplazmik membranın arasına girip sonrasında APP sekretaz tarafından APP dizisi içinden 15 ve 17 bölgelerinden kesime uğramaktadır. Bu kesilim olayı bütün bir APP parçası içermediğinden amiloid birikimiyle sonuçlanmamaktadır. Bu parçalar bölünmüş amino (NH<sub>2</sub>)-ucu türevleri içermekte ve beyinle serebrospinal sıvı tarafından tespit edilebilmektedirler. APP bölgesinden kesim yapan sekretaz enzimi bu bölgenin sınırlarını ve APP'nin ikincil yapılarının hepsini tanıyabilecek özgünlüktedir. Hücreler arası metabolik taşıma aracılığıyla membran bağlı APP geri dönüşümünden sonra endozomal-lizozomal yolakla işleme uğradığı gösterilmiştir. Bütün Aβ bölgesini içeren karboksil uçlu parçalar APP'nin normal kesiliminden kaynaklanabilir ve sonuçta amiloid çökeltilerine yol açmaktadır (Şekil 2.5) (23).

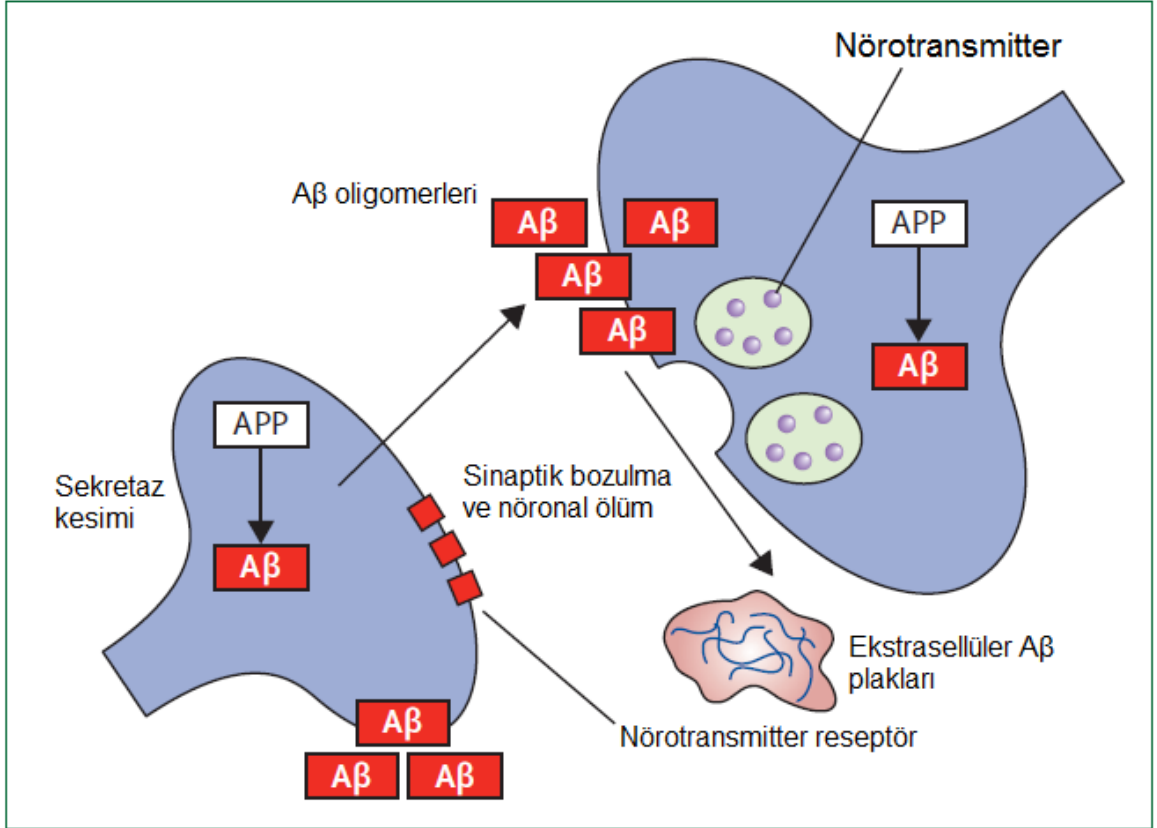


**Şekil 2.5.** Amiloid kaskadı hipotezi. APP'nin işlem görmesi iki yolakla meydana gelebilmektedir: ilki APP bölgesi kısmından sekretaz tarafından kesilerek amiloid oluşumuna katılmayan peptit ürünleri halinde, diğeri de endozomal-lizozomal bölmelerdeki kesimle Aβ kısmı bütün halde kalıp amiloid oluşumuna katılmakta ve bu da Alzheimer'ın ayırıcı özelliklerinden nörofibriler yumaklara ve hücre ölümüne neden olmaktadır (23).

APP proteininin büyük çoğunluğu endoplazmik retikulumda parçalanmakta ve sadece küçük bir kısmı sekretazla kesilme yolağına dahil olmaktadır. APP genel olarak,  $\beta$  sekretaz tarafından proteolitik ayrılmaya uğrarken APP genindeki mutasyonlar,  $\beta$  ve  $\gamma$  sekretazlarca bölgesel kesilimle A $\beta$  üretimi ve artan A $\beta$  birikimiyle ilişkilendirilmiştir.  $\beta$  sekretaz tarafından APP'nin proteolitik kesiminden kaynaklanan A $\beta$ 'nin serbest N-ucu amiloid oluşumunda kritik basamak olarak değerlendirilmektedir (23).

Amiloid kaskadı hipotezi, A $\beta$  birikiminin nöronal fonksiyon bozukluğunu tetiklediğini ve beyinde ölüme neden olduğunu öne sürmektedir (Şekil 2.6). Asıl hipotezde bu nöronal işlevsizliğin ve ölümün toplam amiloid yükünün toksik bir etkisi

olduğu düşünölmüştür. AH patolojik değışimine dair bilginin artmasıyla araştırmalar APP'nin A $\beta$  peptitlerini (A $\beta$ 1-40 ve A $\beta$ 1-42) ayırması ve A $\beta$  oligomerlerinin önemi gibi A $\beta$  işlenmesindeki değışimleri üzerinde daha özel olarak yoğunlaşmıştır. A $\beta$ 1-42 peptidi birikim oluşturmaya A $\beta$ 1-40'tan daha eğilimlidir ve bu iki izoformun oranı  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  sekretaz tarafından APPden ayrılma şablonunu etkilemektedir (2).



**Şekil 2.6.**Güncel amiloid kaskadı hipotezi. APP, nöronlarda ve hücre dışında birikerek plaklara dönüşen A $\beta$  üretmektedir. Amiloid kaskat hipotezinde A $\beta$  çökeltileri toksik olup nöronal hücre ölümü ve sinaptik bozukluklara neden olmaktadır (2).

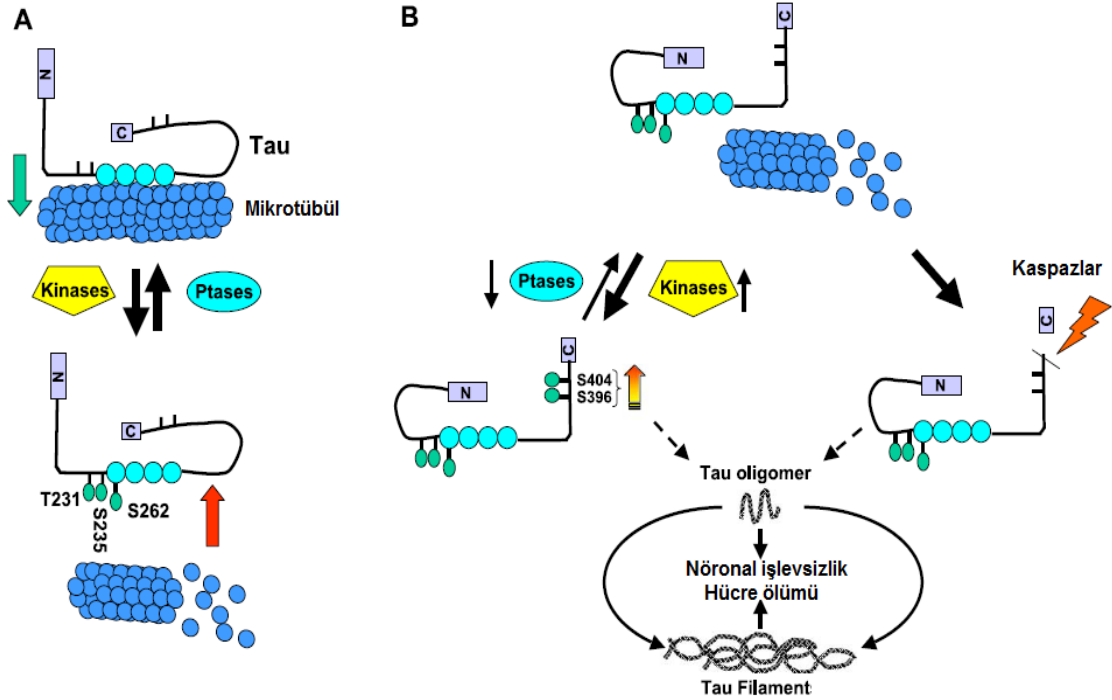
### 2.1.2.3. Tau Proteini ( $\tau$ )

Tau, 1975'te mikrotübüllerle birlikte izole edilmiş ve bir protein olarak tanımlanmıştır. Bu proteine mikrotübüllerin birleşip ayrılma döngüsünde yer aldığından ve tübül oluşumunu indüklemeye kapasitesinden dolayı tau ( $\tau$ ) adı verilmiştir. 1977'de bir fosfoprotein olarak kaydedilmiş ve 1984'te tau'nun fosforillenmeden arınma düzeyi ne

kadar artarsa mikrotübül birleşimini desteklemede o kadar etkili olduğu gösterilmiştir (25).

Tau, tek bir genin alternatif mRNA kırılmasıyla üretilen nöronal protein ailesindedir. Tau'nun en iyi tanımlanmış görevi hücrede mikrotübül kararlılığını desteklemesinin yanı sıra tau'nun başka birçok işlevi olduğuna dair kanıtlar artmaktadır. Tau'nun görevleri fosforilasyon seviyesiyle düzenlenmektedir. İnsan beyin tau proteininin en uzun formu, 80 serin ya da treonin bölgesi (rezidüe) ve beş tirozin bölgesi içerdiğinden neredeyse proteinin % 20'si fosforillenme potansiyeline sahiptir. *In vitro*da onlarca protein kinazın tau'yu fosforillediği gösterilmiştir; tau evrensel fosfat alıcısı olarak kabul edilmektedir (25).

Amiloid kaskadı hipotezi tau da olan değişimlerinve nörofibriler yumak oluşmasının, A $\beta$ 'nin toksik konsantrasyonları tarafından tetiklendiğini ileri sürmektedir. Tau çözünebilir bir proteindir ancak nörofibriler yumak oluşumu sürecinde çözünmez agregatlar üretmekte ve bu da nöronun işlevini ve yapısını bozmaktadır. Tau monomerleri ilk olarak oligomer oluşturmak için bir araya gelmektedir; daha sonra  $\beta$  tabakalar halinde birikerek nörofibriler yumakları meydana getirmektedir ve hiper fosforillenmeye uğramaktadırlar (Şekil 2.7) (2).



**Şekil 2.7.** Fiziyojik ortamda ve patolojik durumda tau fosforilasyonunun tau işlevini düzenlemedeki rolünü gösteren diyagram. A) fiziyojik koşullarda uygun nöronal fonksiyonları sağlaması için mikrotübüllerle tau'nun etkileşimleri fosforilasyon sayesinde dengeli ve dinamik değişimleri içermektedir. Birkaç farklı protein kinaz ve fosfataz tau fosforilasyonunu en uygun haliyle düzenlemek için çalışmaktadırlar. Özellikle Ser262 ve THR231/Ser235 bölgelerindeki fosforilasyonlar tau mikrotübül etkileşimlerinde kilit rol oynamaktadırlar. Normal kinaz ve fosfataz aktiviteleri tau-mikrotübül etkileşimlerini sıkı bir düzende tutmaktadır. B) Patolojik durumda belli toksik hasarlar belirli kinaz ve fosfatazların çalışma dengesinde düzensizliğe neden olmakta ve kritik mikrotübül düzenleyici bölgelerde tau daha fazla fosforillendiğinden mikrotübüllere bağlanmadan serbest kalıp oligomerler oluşturmaktadır. Hücredeki stres durumundan kaynaklı tau'nun yanlış yerleşimi zamanla fibrilogenik bölgelerinden (örneğin Ser396/404) uygunsuz fosforilasyon olaylarıyla sonuçlanabilmekte ve/veya tau'nun fibril oluşumunu artıran Asp421'den kaspazlarca kesilimi olabilmektedir. Tüm bu hareketler tau-tau etkileşimini artırarak oligomerlerin ve devamında tau filamentlerinin oluşumuna öncülük etmektedir. Tau'nun mikrotübüllere ve diğer fiziyojik ilişkili proteinlere bağlanmasındaki azalma kendiliğinden birleşimlerini artırmakta; nöronal işlev bozukluklarına katkı sağlayarak sonunda hücre ölümüne yol açmaktadır (25).

#### 2.1.2.4. Alzheimer Hastalığı ve Kalsiyum

APP'nin tek başına nörotoksik olmadığı fakat nöronları dış toksisite hasarlarına daha duyarlı hale getirdiği ifade edilmiştir. Buna rağmen amiloid hipotezinin ilk ortaya atıldığı dönemde nöronal kayba ve yumak oluşumlarına nasıl yol açtığına dair net bir

bilgi yoktur. Peptidin, kalsiyum iyonu ( $Ca^{+2}$ ) homeostazını bozup nöronlar arası kalsiyum miktarını artırdığı bilinmekteydi. Bu bilgi nörofibriler yumakların nasıl oluştuğunu açıklayabilmektedir. Yumaklar mikrotübül bağlantılı protein tau'nun aşırı fosforillenmiş sarmal filament çiftlerinden meydana gelmektedir ve tau fosforilasyonu hücreler arası kalsiyum tarafından kontrol edilmektedir. Bu durumda APP hücreler arası kalsiyum konsantrasyonunu artırarak tau fosforilasyonuna öncülük edip çift sarmal filamentlerin oluşumunun artışı indüklemektedir (23).

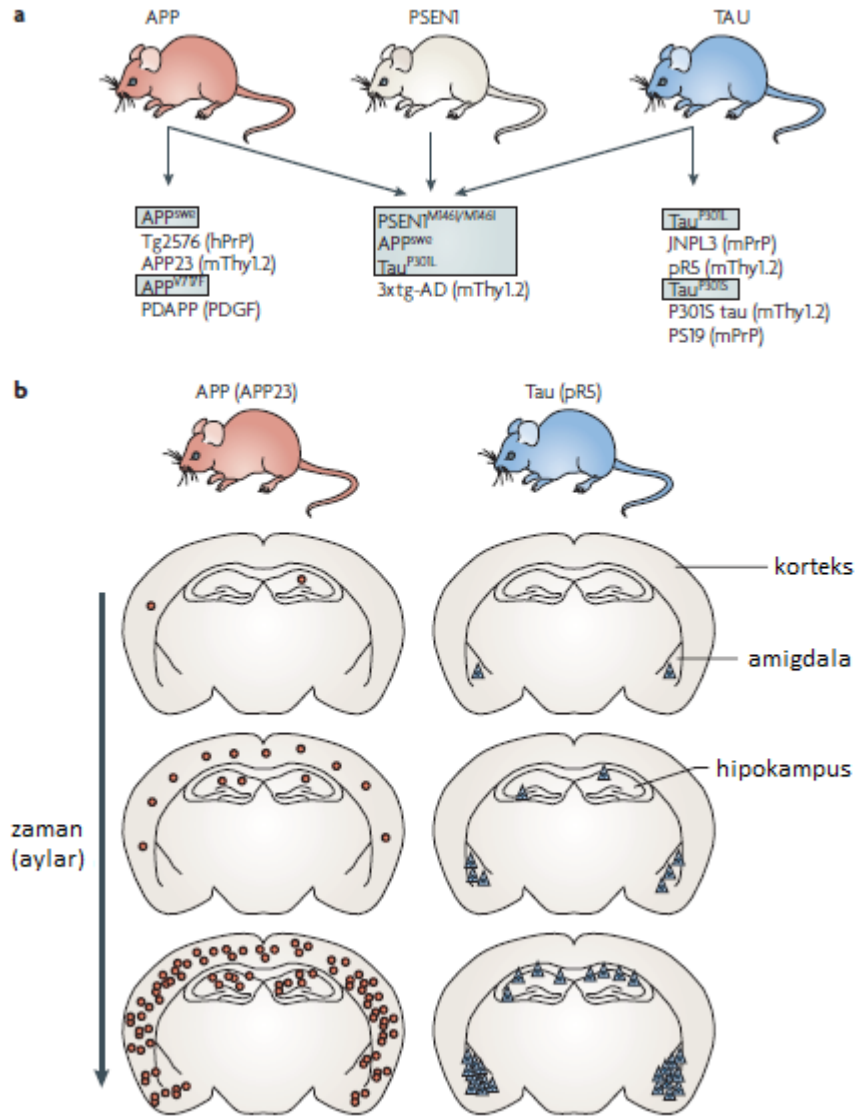
Beynin, yüksek oranda lipid içeriği taşıması ve oksijen tüketimi beyni oksidatif strese açıkça duyarlı hale getirmektedir. A $\beta$  toksisitesini açıklamak üzere birkaç mekanizma önerilmektedir; hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), süperoksit ( $O_2^-$ ), hidroksil radikalleri ( $HO^{\cdot}$ ) ve nitrik oksit (NO), hücreler arası  $Ca^{+2}$  birikimiyle hücre dışı toksisite gibi reaktif oksijen parçacıklarının üretimi membran akışkanlığını azaltmakta, enerji tüketimini, hücre iskeletini, inflamasyon süreçlerini ve metal homeostazını değiştirmektedir. Tüm bu olaylar, belirli nöronal hücre topluluklarının ileri derecede kaybına yol açan nekroza ya da apoptoza ve sinaptik dağılıma neden olan yollarda birleşmektedirler (26).

Bozulmuş  $Ca^{+2}$  dengesi AH ile ilişkilendirilmektedir.  $Ca^{+2}$  asetilkolin ifadesi ve metabolizmasıyla ve aynı zamanda reseptörünün aktivitesiyle bağlantılıdır.  $Ca^{+2}$ /kalmodulin protein fosforilasyonu düzenlemekte ve siklik AMP-yanıt elementi bağlayan protein (CREB), mitojen-aktive protein kinaz (MAPK), kalmodulin-bağımlı protein kinazlar (CaMK) gibi AH'da nörodejenerasyona dahil olan anahtar protein etkenler kalsiyum-bağımlı sinyal transdüksiyon yollarına özgü proteinlerdir.  $Ca^{+2}$  molekülleri nöroinflamasyon sırasında glial hücreleri düzenleyen beyin hücreleriyle bir tür iletişim halindedirler. AH patolojisinin parçası olan A $\beta$ , asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesini artırmakta ve L-tipi voltaj-bağımlı kalsiyum kanalları boyunca  $Ca^{+2}$  geçişini artırarak hücreler arası  $Ca^{+2}$  artışında önemli yükselmeleri tetiklemektedir. AH'da  $Ca^{+2}$ 'un birçok rolü vardır: (1) APP'nin amiloidojenik işleme durumu  $Ca^{+2}$ -bağımlı bir süreç olarak görünmektedir; 2) A $\beta$  kalsiyum kanalları çeşitlerini kullanarak  $Ca^{+2}$  alımını kolaylaştırmaktadır; 3) ayrıca,  $Ca^{+2}$  A $\beta$  birikimini hızlandırmaktadır; 4) hücre dışından içeri çok fazla  $Ca^{+2}$  girişi endoplazmik retikulum ve mitokondride aşırı miktarda  $Ca^{+2}$  birikimine neden olmaktadır; 5) düzensiz hücreler arası  $Ca^{+2}$ , tau fosforilasyonundan sorumlu CaM-bağımlı kinazı aktive eden CaM gibi enzimleri

harekete geçirmektedir; 6) sitozolik fosfolipaz-A2 (PLA2) de  $Ca^{+2}$ -bağımlı bir enzimdir ve aktive olduğunda araşidonik asit salınımına ve siklooksijenaz-2 (COX-2) aracılığıyla nöroinflamasyonun kısmi aktivasyonuna neden olmaktadır. Ayrıca çok fazla  $Ca^{+2}$  akışı proteolitik kalpainlere ve  $Ca^{+2}$ /CaM bağımlı kinaz-II ile çeşitli sayıda enzim aracılığıyla nöronal ölüme öncülük etmektedir (27, 28).

### 2.1.3. Deneysel Alzheimer Hayvan Modelleri

Alzheimer patolojisi *Caenorhabditis elegans*'tan insan dışı primatlara kadar uzanan çok çeşitli modellerde incelenmiş de en çok kullanılan model kemirgenlerle olanlardır. Alzheimer vakalarının büyük bölümünü sporadik tipte AH oluşturmaktadır fakat bu vakaların altında yatan neden tam olarak bilinmemektedir. Erken başlangıçlı ailesel AH ile sporadik tipte olanı, nöropatolojik ve klinik olarak ayırt etmek başlangıç yaşındaki fark dışında çok zordur (29). Bu nedenle hayvan modelleri daha çok ailesel AH mutasyonlarının kullanımına dayanmaktadır. İnsan beyninde bulunan patolojiye benzer olarak mutant APP'yi aşırı derecede üreten transgenik farelerde hücre dışı A $\beta$  plak birikimi yaşa bağılı olarak gelişmekte; bir başka deyişle sabit A $\beta$  üretimine karşın bu hayvanların çoğunda plaklar sadece orta ve geç yetişkin dönemlerinde meydana gelmektedir. Özellikle plak oluşumu APP'den daha uzun olan A $\beta_{42}$  kesimi olduğunda hızlanmaktadır. Bu peptit birikim yapmaya A $\beta_{40}$ 'tan daha eğilimlidir ki bu durumdabilişsel zayıflamanın şiddetini artırmaktadır. AH'nin bir diğer belirteci olan hiperfosforillenmiş tau'nun birikmesiyle oluşan nörofibriler yumaklar, APP aşırı üretimi yapan transgenik farelerde hem olumlu hem olumsuz kanıtlar göstermiştir. İnsandaki AH'nin aksine bu fare modelleri nörofibriler yumak geliştirmemektedirler. Bu hayvalarda tau hiperfosforillenmesinde artış olduğu gösterilmiştir. Bunun için önerilen farklı sebepler arasında 1)insan A $\beta$  birikimi nörofibriler yumak oluşumu için yeterli olmaması; 2) kemirgen tau yapısı ve dizilimi farklı olup yumak oluşumuna yatkın olamaması; 3) farelerin ömrü insanlarda on yıllar içerisinde gelişen patolojinin hiperfosforillenme/birikme kısmını yeterince yapmaya yeterli olamaması ya da 4) tüm bunların bir kombinasyonu sayılabilmektedir (Şekil 2.8) (30).



**Şekil 2.8.** Transgenik farelerde nörofibriler yumak ve plak üretimi. a) Plaklar mutant PSEN1 ile ya da o olmadan ve ailesel AH'da bulunan mutant APP anlatımı tarafından üretilirken nörofibriler yumaklar mutant tau anlatımı tarafından üretilmektedir. b) APP23 ve pR5 farelerinde patolojinin gelişim sürecini göstermektedir. pR5 farelerinde nörofibriler yumak oluşumu amigdalada başlayıp nihayetinde hipokampusa kadar ilerlemektedir (31).

A $\beta$  aşırı üretimi yapan ve tau patolojisini tekrar eden transgenik fare modellerine ek olarak bu hastalıkla alakalı genleri eksik üretimi yapılan genetiği değiştirilmiş çeşitli modeller de mevcuttur. Nakavt farelerde çoğunlukla *BACE*, *presenilin 1* ve *2*, *ADAM10* ve *17* gibi APP sekretazlarla yapılmaktadır. APP ve tau nakavt farelerin, APP'nin fizyolojik rolünü tespit etmede ve hastalık sürecindeki önemini göstermede değersiz



oldukları kanıtlanmıştır. *Presenilin 1* nakavt fareler 1997’de üretilmiştir ve homozigot nakavt presenilin 1’in merkezi sinir sistemi ve kas sistemindeki gelişimsel bozukluklardan dolayı letal olduğu gösterilmiştir. Presenilini eksik farelere karşılık *BACE1* nakavt fareler belirgin bir hata olmaksızın daha sağlıklı bulunmuştur ve daha kısa sürede A $\beta$  üretimi yapmaktadırlar. Tau nakavt fareler APP transgenik modellerde A $\beta$  indüklü bilişsel zayıflamayla hastalığın mekanizmasına ışık tutmuştur. Farelere ek olarak transgenik ratlar da araştırmalarda geniş yer tutmaktadır (29) (Tablo 2.2).

**Tablo 2.2.** Alzheimer hastalığı transgenik rat modelleri (29).

AH rat modelleri	Aile Geçmişi	Transgen(ler)	Promotör(ler)	Hücre dışı A $\beta$ patolojisi	Davranışsal bozukluk
TgAPPswe	Fischer-344	APPswe	PDGF	Yok	Azalmış hafıza kaybı
UKUR25	Wistar	APP751 swe/ind hPS1 Finn	PDGF	Yok	16 ay (orta seviyede bozukluk)
Tg6590	Sprague-Dawley	APPswe	Ubiquitin-C	15 ay sonra	9 ay
Tg478/Tg116	Sprague-Dawley	APP695 swe APP swe/ind	Rat sinapsin I PDGF $\beta$	18 sonra	Belirtilmemiş
Tg478/Tg116/Tg11587	Sprague-Dawley	APP695 swe APP swe/ind hPS1 Finn	Rat sinapsin I PDGF $\beta$ rat sinapsin I	9 ay sonra	7 ay
APP21 ve APP31	Fischer-344	APP695 swe/ind	Ubiquitin-C	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş
#318 hattı	SHR	hTau kesili	Fare Thy-1	Yok (tau patolojisi)	Evet

### 2.1.3.1. Deneysel Alzheimer Hayvan Modelleri ve Streptozotosin

Streptozotosin (STZ) diyabetojenik bir bileşiktir ve genellikle, insülin direncini indükleyip pankreatik  $\beta$  hücrelerinde hasar yapması için periferde uygulanarak hayvanlarda diyabeti tetiklemek amacıyla kullanılmaktadır (32). Beyin insülin homeostazisinin (dengesi) beyin işlevinde önemli bir rolü olduğunu gösteren kanıtlar

her geçen gün artmaktadır. İnsülin sinyalleşmesi, gama-aminobütirik asit (GABA)ve glutamat reseptörleri gibi uyarıcı ve inhibe edici reseptörlerin aktiviteleriyle sinaptik plastisiteyi değiştirerek ve uzun vadeli hafıza desteği için gerekli olan genlerin anlatımına öncülük eden sinyal geçişlerini tetikleyerek öğrenme ve hafızada rol oynamaktadır. İnsülin/insülin reseptörü (IR) sinyal yolağı beyinde de periferdekine benzer şekilde çalışmaktadır. Beyinde insülin sinyalleşmesindeki bozukluğun AH patogenezinde katkıda bulunacağı fikri ilk olarak Siegfried Hoyer tarafından 23 yıl önce öne sürülmüştür (33). Beyin glukoz/enerji metabolizmasındaki erken anormallikler yüksek glukoz ihtiyacı ve yüksek insülin hassasiyetinin her ikisiyle alakalıdır ve bunlar bilişsel bozukluklara da dahil olup sporadik AH (sAH) patogenezinde bozulmuş insülin sinyalleşmesinin rolünü desteklemektedir. sAH insan beyinde IR sinyal yolağındaki değişimlerin ışığında, beyin insülin sisteminde bozukluğu indüklemek amacıyla ratlara intraserebroventriküler (icv) STZ uygulaması sAH araştırmaları için deneysel bir yaklaşım olarak umut vermektedir. sAH, insan beyinde bulunana benzer olarak icv STZ uygulanan ratların da beyinlerinde 35 bölgenin 17'sinde glukoz metabolizmasında ve anahtar niteliğindeki glikolitik enzimlerin aktivitelerinde azalmalar bulunmuştur. İcv STZ modeli aynı zamanda ratlarda serebral amiloid anjiyopatisi geliştirmektedir ve 4 hafta sonrasında hipokampal APP mRNA'sında artış rapor edilmiştir (34).

İcv STZ'nin düşük, diyabetojenik altı (subdiyabetojenik) uygulamasının beyinde bilişsel ve kolinerjik hasarları indüklediği, oksidatif stres, beyin glukoz/enerji metabolizmasında bozulmalara yol açarak insülin dirençli beyin durumu oluşturduğu gösterilmiştir (35). Tek seferde bilateral icv STZ enjeksiyonundan (3 mg/kg) 5 hafta sonra beyin ağırlığında azalma, bilişsel zayıflık, hipokampal A $\beta$  (1–42)'de önemli bir artış ve hem hipokampal hem de kortikal hiperfosforillenmiş tau seviyesinde artış gözlenmiştir. İcv STZ rat modeli bir diğer önemli özellik olan, AH hastalarının beyinlerinde gözlenen beyin dokusunda oksidatif stres işaretlerini de yansıtmaktadır (36).

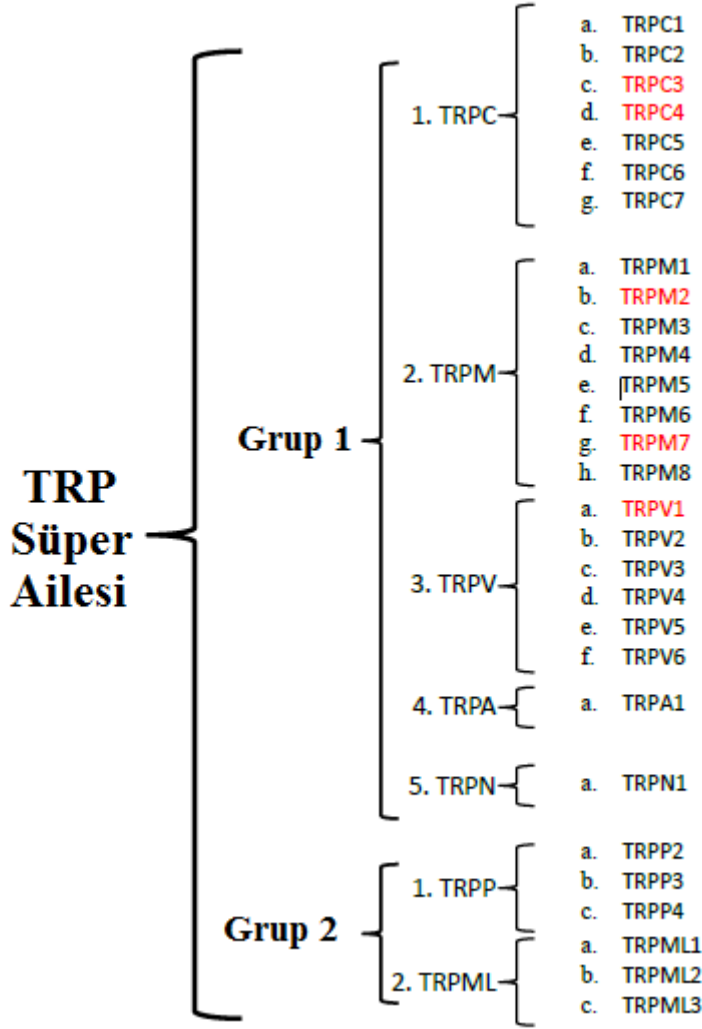
Periferde STZ uygulaması pankreatik  $\beta$  hücrelerinin seçici olarak yıkımını indüklemektedir. STZ hücrelere glukoz taşıyıcı-2 (GLUT2) aracılığıyla girmekte ve DNA'nın alkilenmesine neden olmaktadır. Bu da poli-ADP ribozilasyonunun aktivasyonunu tetikleyerek hücresel NAD<sup>+</sup> ve ATP boşalmasına neden olmakta ve  $\beta$  hücrelerinin ana işlevi olan insülin üretimi ve salınımına hasar vermektedir. Sitotoksik etkilerine karşın STZ pankreatik adacık hücrelerinin metastatik kanserine karşı

savaşması için kullanılmaktadır. Yine de STZ'nin beyindeki aktivasyon mekanizması tam olarak bilinmemekte ve periferaldeki benzer olduğu tahmin edilmektedir. Sonuç olarak icv STZ uygulaması GLUT2 inhibisyonuyla beyin insülin metabolizmasının bozulmasına neden olmakta ve 'insüline dirençli beyin durumu' oluşturarak serebral hipometabolizma, bilişsel fonksiyonlarda zayıflama ve tau proteininin hiperfosforillenmesiyle tanımlanmaktadır (37).

Şimdiye kadar ki çalışmalarda icv STZ enjeksiyonunun AH'da da benzer olarak gözlenen kolinerjik bozukluğa, tau hiperfosforilasyonuna, insülin reseptörü bozulmasına, oksidatif strese, mitokondriyal işlevsizliğe, enerji metabolizmasının aksamasına ve proapoptotik sinyal yollarının aktifleşmesine neden olduğu rapor edilmiştir (35).

## 2.2. TRP Kanalları

TRP kanalları her biri farklı taşıma özelliği olan seçici olmayan katyon kanallarıdır. Şimdiye kadar memelilere ait TRP kanal ailesinin 28 üyesi olduğu bilinmektedir ve iki grup ve yedi alt sınıfa ayrılmaktadır. İlk TRP kanalı *Drosophila*'da tespit edilmiştir ve oksijensiz bir süreç boyunca  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunu artırdığı gösterilmiştir. TRP kanalları mayadan memelilere kadar çeşitli organizmalarda tespit edilmiştir ve kanal türlerinden bilinen en eskisinin TRP kanalları oldukları öne sürülmektedir. TRP süper ailesinin birinci grubu 5 alt aile içermektedir: TRPC (kanonik), TRPV (vaniloid), TRPM (melastatin), TRPA (ankrin) ve TRPN (NOMPC). İkinci grubu da geriye kalan alt aileleri kapsar: transient receptor potential polisistin (TRPP) ve transient receptor potential mukolipin (TRPML). Tüm TRP kanalları segmental kısımlarında homoloji seviyelerinde farklılık gösteren 6 transmembran segmentinden oluşmaktadır. Tüm kanallar  $Ca^{+2}$  taşıma yeteneklerine göre farklılık göstermektedirler. Bilinen 28 TRP kanalı içinde sadece bazıları oksidatif stres boyunca aktifleşmektedirler; TRPC, TRPV ve TRPM alt aileleri (Şekil 2.9) (7, 10).

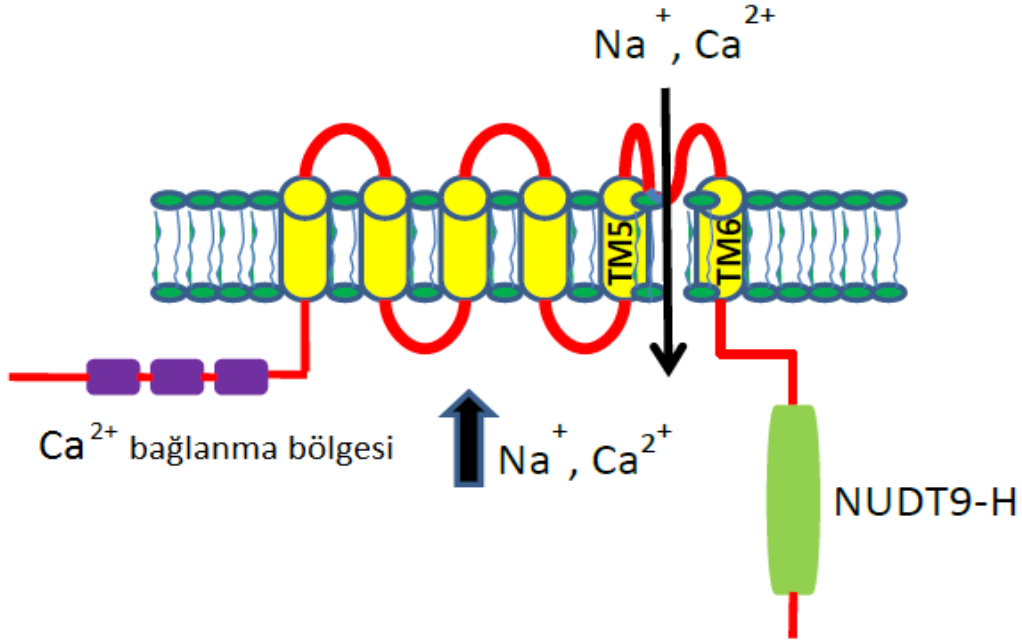


Şekil 2.9. TRP süper ailesi (38).

### 2.2.1 TRPM Kanalları Ailesi ve TRPM2 Kanalı

TRPM kanalları, TRPC kanallarıyla % 20 benzerlik göstermektedir. ‘Melastatin’ adı melanomada TRPM1 proteininin negatif düzenlenmesinin gözlenmesi üzerine verilmiştir (38). Hem TRPM6 hem de TRPM7 fonksiyonel COOH terminal *serin/treonin* kinaziçerirken, TRPM2, ADPR pirofosfataz faaliyeti gösteren fonksiyonel NUDT9 homoloji alanı içermektedir.  $Ca^{+2}$ ’u çok geçirenden (TRPM6/TRPM7 ve TRPM3 ’ün ek yerine kadar)  $Ca^{+2}$  ’u geçirmeyene kadar (TRPM4 ve TRPM5)  $Ca^{+2}$  geçirgenliği farklılıklar göstermektedirler. Buna rağmen TRPM1 kanalı hariç tüm TRPM katyon kanalları bu güne kadar karakterize edilmemişlerdir. TRPM4 ve TRPM5 ısıya duyarlı  $Ca^{+2}$  aktif kanallarıdır (39).

TRPM2 kanalı amino ve karboksil uçlarının her ikisi de sitozole bakan altı TM alanından oluşmaktadır (Şekil 2.10). Karboksil ucu TRPM2 kanalının enzimatik aktivitesinden sorumludur ve bu bölge NUDT9 ile homoloji gösterip ‘NUDT9-H bölgesi’ olarak adlandırılmaktadır. TRPM alt grubu 8 memeli homolog içermektedir. Özellikle TRPM2 ve TRPM7 ROT tarafından aktive edilen  $Ca^{+2}$ ’ye geçirgen seçici olmayan katyon kanalı özelliği göstermektedir. TRPM2 ve TRPM7 ayrıca oksidatif strese bağlı hücre ölümünde rol almaktadırlar. TRPM2, ADP-riboz (ADPR), nikotinamid adenin dinükleotid (NAD),  $H_2O_2^-$  ve oksidan tertbütilhidroperoksit gibi ROT’lar aracılığıyla aktive olup  $Ca^{+2}$  geçirmektedir. Oksidatif stres mitokondri içindeki ADPR üretimini indükler ve sitozole salmakta bu da TRPM2’yi aktive etmektedir (10).



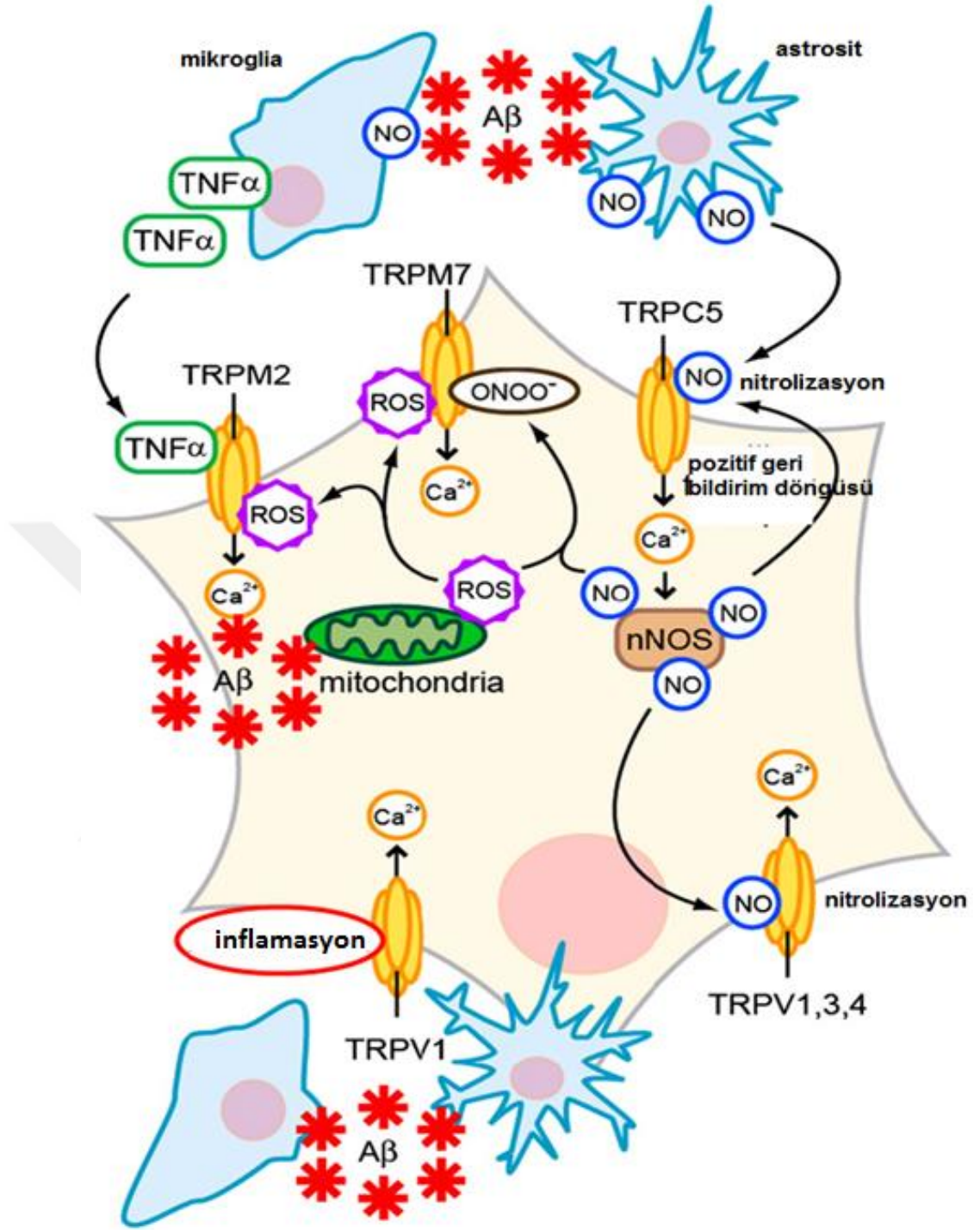
**Şekil 2.10.** TRPM2 kanalının yapısı. ADPR, kanalın karboksil ucunda yer alan NUDT9-H ile etkileşime geçerek TRPM2’yi aktive etmektedir. Etkileşim süresince TM5 ve TM6 arasındaki por açılmakta ve hücreye  $Na^+$  ile  $Ca^{+2}$  girişi olmaktadır.  $Ca^{+2}$  amino ucuyla etkileşime geçerek ADPR etkisinin gücünü artırmaktadır (38).

### 2.2.2. TRPM2 ve Alzheimer Hastalığı

Hipokampal silikalardaki CA1 inter nöronlar dahil hipokampusün piramidal nöronlarında, fonksiyonel TRPM2 katyon kanallarının son derece iyi ifade edildiği

bildirilmiştir (40). Nöronal hücre kültüründe TRPM2 sentezi normal gruplarda, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ya da Aβ peptidi verildiğinde Ca<sup>+2</sup> seviyesinde belirgin bir artış ve hücre ölümü görülmektedir. Buna karşılık poli ADP riboz polimeraz (PARP) ve TRPM2-S ile inhibisyon hücre kültüründeki *TRPM2* mRNA'sı azaldığında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve Aβ aracılı hücre ölümü de azalmaktadır (41). *TRPM2*<sup>-/-</sup> /APP/PS1 transgenik Alzheimer farelerde TRPM2 yokluğunda plak oluşumunu etkilemeden, endoplazmik retikulum stresi ve anormal mikroglial aktivasyon azalmaktadır ve aynı zamanda bilişsel özelliklerde dedüzelme görülmektedir (42). Aβ, membrana bağlı oksidatif stres ve hücrel Ca<sup>+2</sup> homeostazının bozulmasıyla nöronları apoptoza ve eksitotoksisiteye hassas kılmaktadır. Son bulgular, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indüklü nöronal ölüm rolünün yanı sıra TRPM2'nin Aβ indüklü hücre ölümünde de işlevinin olduğunu göstermiştir. TRPM2 kesilim varyantının transfeksiyonu yapılarak ve bu varyantın TRPM2'yi negatif olarak inhibe etmesiyle hem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hem de Aβ indüklü hücre ölümü ve hücreler arası serbest kalsiyum inhibe olmaktadır. Yine TRPM2 hedefli siRNA ile TRPM2 mRNA seviyesi ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve Aβ indüklü toksisite azalmaktadır (5).

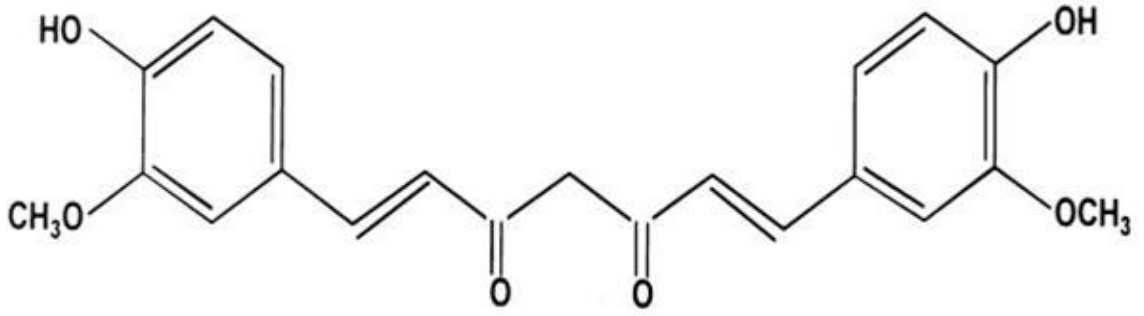
Aβ, mitokondride ROT üretimini ve sitozole salınımını tetiklemektedir. ROT, TRPM2 ve TRPM7'yi aktive etmekte ve sonuçta artan Ca<sup>+2</sup> konsantrasyonu NO üretimini indüklemektedir. NO ve ROT daha sonra oldukça reaktif parçacıklar olan preoksinitrit (ONOO<sup>-</sup>) ile birleşmektedirler. ONOO<sup>-</sup>, TRPM7 aracılığıyla Ca<sup>+2</sup> içe akışını tetiklemektedir. Aβ, TRPM2 aktivasyonunu ve NO'yu indükleyen TNFα'yı üretmekte ve bu da astrositlerle mikrogliaları aktive etmektedir (Şekil 2.11) (10).



Şekil 2.11. Nöronal TRP kanallarının AH'da tahmini katılımları (10).

### 2.3. Kurkumin

Kurkumin (diferuloilmetan), genel olarak zerdeçal olarak bilinen *Curcuma longa* bitkisinin köklerinden elde edilen hidrofobik bir polifenoldür. Kurkuminin kullanımı bundan yaklaşık 5000 yıl öncesine kadar uzanmaktadır. Zerdeçalın sarı rengini sağlayan kurkumin yaklaşık 200 yıl kadar önce izole edilmiştir ve 1910'da yapısı keşfedildikten sonra diferuloilmetan adıyla anılmaktadır (Şekil.2.12) (43).



Şekil 2.12. Kurkuminin kimyasal yapısı (43).

Zerdeçal; kurkuminoidler, kurkumin, demetoksikurkumin ve bisdemetoksikurkumin içermektedir. Son zamanlarda kurkuminoidlerin nöronal koruyuculuğu, kemo ve kanser önleyiciliği gibi sağlıkla alakalı özellikleri dikkat çekmeye başlamıştır. Kurkuminoidler, anti-enflamatuar aktiviteye sahip olup organizmanın antioksidan savunma mekanizmasını indüklemektedir (6). Birçok *in vivo* ve *in vitro* çalışma, çeşitli vücut bölgelerindeki farklı kanser durumlarında kurkuminin lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini ve süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon (GSH), glutatyon-s-transferaz (GST) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi antioksidan moleküllerin aktivitelerini artırdığını rapor etmiştir (44).



### 2.3.1. Kurkumin ve Alzheimer Hastalığı

Kurkuminin yaşa bağlı nörodejeneratif hastalıkların büyük kısmında tedavi ve önleyici özellikleriyle güçlü bir aday olarak gösterilmiştir. *İn vivo* ve *in vitro* çalışmaların ikisi de AH'da kurkuminin amiloid oligomerlerinin ve plaklara bağlanan fibrillerin oluşumunu inhibe ettiğini, amiloid birikimini azalttığını göstermiştir (45).

Kurkumin, anti-enflamatuar, anti-oksidan ve anti-protein agregat aktiviteleriyle nöronal koruyucu bir ilaçtan istenebilecek birçok özelliğe sahiptir. Sahip olduğu bu çoklu potansiyel, oral kullanımın güvenliği, uzun zamandan beri kullanımı ve düşük maliyeti kurkumini birçok nörolojik durum için önleyici konuma getirmektedir. APP transgenik plak-oluşturan Alzheimer hayvan modelinde kurkumin test edildiğinde oksidatif hasar ve yangı oranını azalttığı gibi birikmiş A $\beta$  ve amiloid plaklarında da azalma sağlamıştır (11). Zayıf etkileşim özelliğine rağmen bazı çalışmalar kurkuminin KBB'yi aştığını göstermiştir. Esasında kurkumin gibi doğadan elde edilen ürünler P-glikoprotein taşıyıcısının substrat bağlama bölgesinde taşınarak KBB'ni geçebilmektedir (46). Transgenik AH farelerde kurkuminle besleme sonucu A $\beta$  plakların ve birikiminin önemli ölçüde azaldığı, tau fosforilasyonunu inhibe ettiği ve oksidatif hasarı azaltıp inflamasyonu hafiflettiği gösterilmiştir (47).

### 2.3.2. Kurkumin ve TRPM2 Kanalı

Kurkumin ROTtemizleyicisi olarak çalışabilmekte, oksidatif stresi azaltmakta ve böylece ADPR oluşumunu ve devamında TRPM2 kanallarının aktivasyonunu önlemektedir. Kheradpezhohu ve arkadaşlarının karaciğer hücreleriyle yaptığı çalışma kurkuminin oksidatif hasar veya hücreler arası ADPR uygulamasına cevaben gelişen TRPM2'yi inhibe ettiğini ancak aktif TRPM2 kanallarını bloke etmediğini göstermiştir. Bu çalışmayla kurkuminin ilk kez ADPR tarafından aktive olan TRPM2'nin bir veya daha fazla yolağını inhibe ettiği ortaya konmuştur (7). TRPM2 inhibisyonunun mekanizması henüz net değildir fakat direkt olarak porun bloklanması ya da ADPR bağlanma bölgesiyle kurkuminin yarışmasının da söz konusu olmadığı öne sürülmektedir (10).

### 3. MATERYAL VE METOT

Çalışma İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanlar Üretim Merkezi'nde (İNÜTF-DEHÜM) ve İnönü Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde gerçekleştirildi. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanlar Etik Kurulu tarafından onaylanan (03/06/2016 tarihli ve 2016/A-80 protokol no'lu karar) bu çalışmada tüm uygulamalar etik kurul protokolüne uygun şekilde yapıldı.

#### 3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Streptozotosin (Santa-Cruz), Kurkumin (Acros Organics), sodyum karboksil metil selüloz (CMC- Sigma), Tween-80 (Merck), Nitroblue tetrazolium (Sigma), Sığır serum albümin, Glutasyon (GSH, Sigma-Aldrich), 5,5'-ditiyobis-2 nitrobenzoik asit (DTNB, Sigma-Aldrich), 2-tiyobarbutirik asit (TBA, Sigma-Aldrich), sodyum klorür (NaCl, Merck), potasyum klorür (KCl, Merck), magnezyum klorür ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , Sigma-Aldrich), kalsiyum klorür ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , Sigma-Aldrich), sodyum dihidrojen fosfat ( $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ , Riedel-de-Haen), disodyum hidrojen fosfat ( $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ , Riedel-de-Haen), (1,1,3,3, tetramethoksiopropan, Sigma-Aldrich), n-butanol (Fluka), triklor asetik asit (TCA, Sigma-Aldrich), sodyum hidroksit (NaOH, Sigma-Aldrich), tri sodyum sitrat (Sigma-Aldrich), fosforik asit ( $H_3PO_4$ , %85'lik, Riedel-de-Haen), potasyum dihidrojen fosfat ( $KH_2PO_4$ , Sigma-Aldrich), dipotasyum hidrojen fosfat ( $K_2HPO_4$ , Sigma-Aldrich), etilendiamintetraasetik asit (EDTA, Sigma-Aldrich), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ , Sigma-Aldrich) Na-K-tartarat (Sigma-Aldrich), bakır sülfat ( $CuSO_4$ , Sigma-Aldrich), Etidyum bromid (EtBr, Fisher Scientific), Agaroz (Sigma-Aldrich), Sodyum sitrat tri bazik dihidrat (Sigma-Aldrich), Sodyum asetat (Sigma-Aldrich), Guanidin Tiyosiyanat (Sigma-Aldrich), Hidroklorik asit (HCl, Sigma-Aldrich), PZR için primerler, RNA saflaştırma kiti, Gerçek zamanlı PZR reaksiyonu için master mix, cDNA sentez kiti Roche firmasından, Hayvanların anestezisinde kullanılan ksilazin ve ketamin HCl ise Alfasan firmasından ve operasyon sonrası antibiyotik (sefazolin, Sefazol) Mustafa Nevzat firmasından temin edilmiştir.

### 3.2. Kullanılan Alet ve Gereçler

Araştırmada; millipore marka saf su ünitesi, ASI-Instruments marka SAS-4100 model stereotaksi aleti, Hamilton marka 10 µl hacimli enjektör, Biorad-MyCycler marka PZR cihazı, Roche marka LC96 model gerçek zamanlı PZR cihazı, Denver Instrument marka terazi, Ohaus marka hassas terazi, Biorad marka elektroforez güç kaynağı, Retsch marka MM400 model bilyeli parçalama sistemi, Mettler Toledo marka EL20 model pH metre, Hettich-zentrifugen marka 200 model masaüstü santrifüj cihazı, Hermle marka Z216MK model mikro santrifüj, EpochBiotek marka spektrofotometre cihazı, Heidolph marka vorteks, Heidolph marka manyetik karıştırıcı, bazı kimyasal reaksiyonlar için Memmert marka su banyosu kullanıldı. Leica RM2125 mikrotom, Leica DFC-280 araştırma mikroskobu kullanıldı.

### 3.3. Kullanılan Çözelti ve Tamponlar

#### 3.3.1. Yapay serebrospinal sıvı hazırlanışı

Yapay serebrospinal sıvı Tablo 3.1’de belirtilen A ve B solüsyonlarının 1:1 (v/v) oranında karıştırılmasıyla laboratuvar ortamında hazırlandı. Hayvanlara verilecek STZ miktarı tek tek ağırlıkları ölçülerek hesaplandı ve enjeksiyon bu oranlara göre gerçekleştirildi.

**Tablo 3.1.** Yapay serebrospinal sıvı içeriği (48).

A Solüsyonu		B Solüsyonu	
Bileşen	Gram	Bileşen	Gram
NaCl	8,66	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,214
KCl	0,224	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	0,027
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,206		
MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,163		

### **3.3.2. Streptozotosin hazırlanışı**

Streptozotosin hazırlanan yapay serebrospinal sıvı içerisinde çözdürülerek STZ ve STZ+kurkumin grubundaki hayvanlara yetecek miktarda stok olarak hazırlandı ve icv enjeksiyon sırasında her hayvanın ağırlığına göre 1,5 mg/kgvücut ağırlığı dozunda (49) eş dağılım olacak şekilde belirlenen miktarlarda Hamilton enjektörüne çekildi. Sham grubuna da STZ olmaksızın sadece çözücü olan yapay serebrospinal sıvı enjekte edildi.

### **3.3.3. Kurkumin hazırlanışı**

Kurkumin hidrofobik yapıda bir madde olduğundan çözücü olarak % 1 sodyum karboksil metil seluloz ve % 1 tween-80 karışımı içerisinde hazırlandı (50). STZ+kurkumin ve kurkumin gruplarındaki sıçanlara icv operasyonundan 25 gün sonra günde bir kez 300 mg/kg vücut ağırlığı dozunda 10 gün boyunca i.p enjeksiyon yapıldı (51).

### **3.3.4. RNA saklama çözeltisi**

70 gr Amonyum Sülfat 100 ml dietilpirokarbonat (DEPC)'lı suda çözüldü. Üzerine 10 mM EDTA (pH=8) ve 25 mM Sodyum Sitrat (pH=5,2) eklenip DEPC'li saf su ile 150 ml'ye tamamlandı ve pH 5,2'ye ayarlandı.

### **3.3.5. 10X TBE (Tris-Borat-EDTA) çözeltisinin hazırlanışı**

1 litre 10X TBE tamponu hazırlarken; öncelikle 108 gr TRIS baz, 55 gr Borik Asit ve 40 ml 0.5 M EDTA çözeltisi 900 ml saf su içerisinde manyetik karıştırıcıda çözdürüldü. Çözeltinin pH değeri 8.0 oluncaya kadar HCl eklendi. Daha sonra çözeltinin toplam hacmi 1000 ml'ye tamamlandı ve son olarak otoklavda 121 °C' de 20 dakika otoklavlandı.

### 3.3.6. Lizis solüsyonu hazırlanışı

4 M Guanidin izotiyosiyanat, 25 mM sodyum sitrat (pH:7) ve % 0.5 sarkosil (N-Lauroylsarcosine) eklenerek lizis karışımı hazırlandı ve çalışma esnasında kullanılacak solüsyonun miktarının % 1'i olacak kadar  $\beta$ -Merkaptoetanol eklenerek homojenizasyonda kullanıldı.

### 3.4. Sıçanların Temini ve Bakımı

Araştırmada İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen, ortalama ağırlıkları 350-375 gram olan 12 aylık Wistar Albino cinsi toplam 50 adet erkek sıçan kullanıldı. Deney süresince sıçanlar sıcaklığın 21°C ve ortam neminin % 55-60 olduğu, 12 saat ışık (08:00-20:00 saatleri), 12 saat karanlık uygulanan odalarda tutuldular, *ad libitum* olarak standart sıçan yemiyle beslendiler ve normal musluk suyu içtiler.

### 3.5. Grupların Oluşturulması

Deneye başlamadan önce hayvanlar ağırlıklarına göre eş dağılım olacak şekilde aşağıdaki gibi 5 gruba ayrıldı. Kullanılacak hayvan sayısını belirlemek için güç analizi yapıldı. Gruplar arası en yüksek SOD farkı 33 unit/L, standart sapması da 20 ve tip1 hata  $\alpha$ : 0.05, tip2 hata  $\beta$ : 0.020 olduğundan her bir grupta en az 10 deney hayvanı olmak üzere toplamda en az 50 deney hayvanı gerektiği güç analiziyle hesaplandı (52).

**1- Kontrol Grubu (K, n=10):** Bu grup 45 gün boyunca *ad libitum* olarak beslendi. Bu gruptaki hayvanlar, ilk 5 gün, ikinci olarak 21-25. günlerde bir 5 gün daha ve deneyin son 5 günü Morris su tankı (MWM) deneyine katıldı. Bunların dışında bir uygulama yapılmadı.

**2- Kurkumin Grubu (KK, n=10):** Bu grup diğer gruplar gibi ilk 5 gün, ikinci olarak 21-25. günlerde bir 5 gün daha ve son 5 gün MWM su tankı deneyine katıldı. 25. ve 35. günler arasında 300 mg/kg vücut ağırlığı dozunda (i.p) olarak kurkumin enjeksiyonu yapıldı (50).

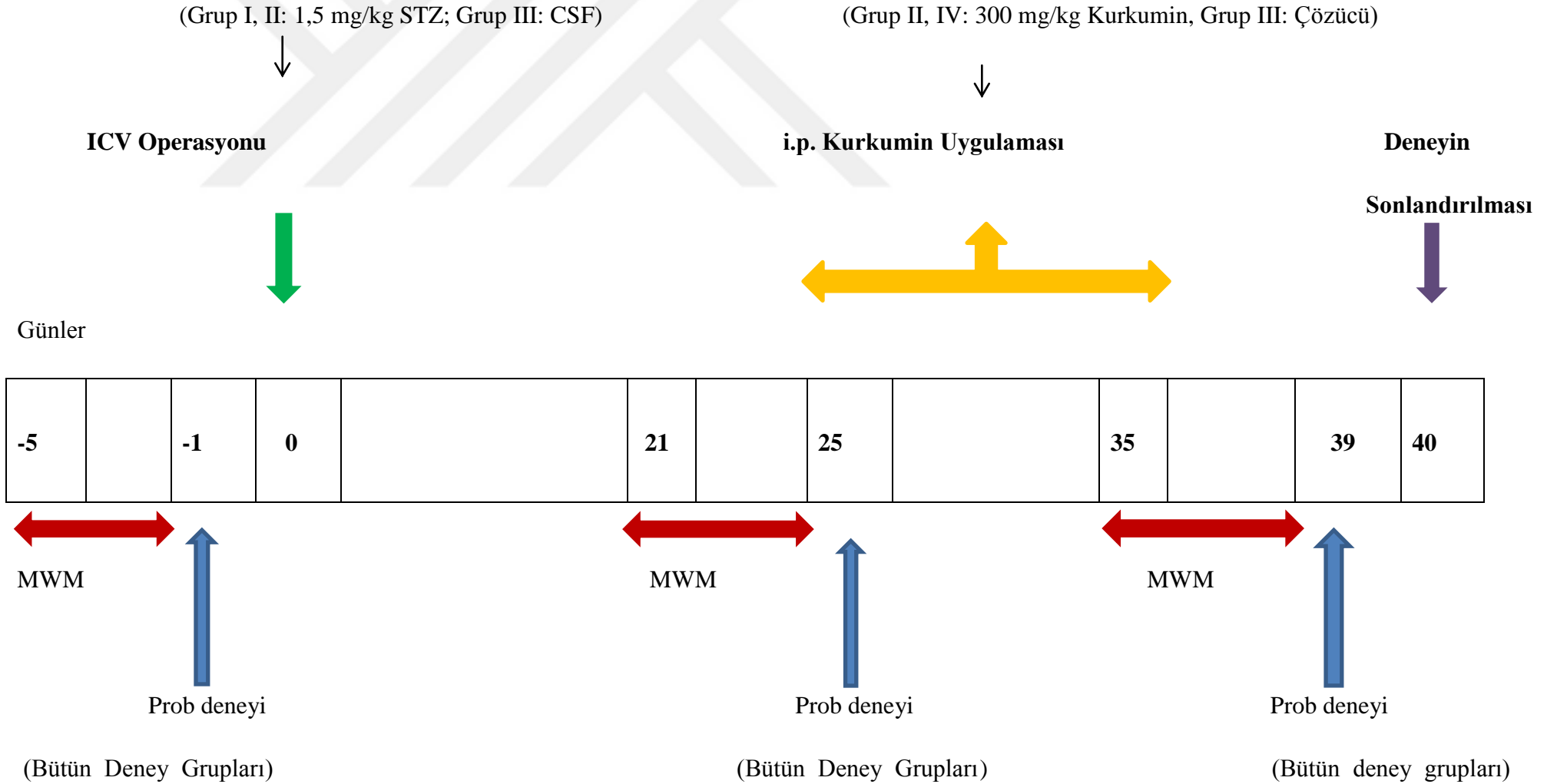
**3- Sham Grubu (SH, n=10):** Bu grup diğer gruplar gibi ilk 5 gün, ikinci olarak 21-25. günlerde bir 5 gün daha ve son 5 gün MWM su tankı deneyine katıldı. İlk MWM deneyinden sonra 6. günde icv yöntemle vücut ağırlıklarına göre beyin dokusunda, 5 mg/kg STZ çözücüsü olan yapay serebrospinal sıvı enjekte edildi. İkinci MWM deneyinden sonra 25. ve 35. günler arasında 10 gün boyunca yine vücut ağırlıklarına göre kurkumin çözücüsü olan %1 sodyum karboksimetil seluloz (CMC) ve % 1 Tween-80 karışımı i.p olarak enjekte edildi.

**4- Streptozotosin Grubu (STZ, n=10):** Bu grup diğer gruplar gibi ilk 5 gün, ikinci olarak 21-25. günlerde bir 5 gün daha ve son 5 gün MWM su tankı deneyine katıldı. İlk MWM deneyinden sonra 6. günde icv yöntemle vücut ağırlıklarına göre beyin dokusuna 1,5 mg/kg vücut ağırlığı dozunda STZ uygulandı (49).

**5- Streptozotosin+Kirkumin Grubu (STZ+KK, n=10):** Bu grup diğer gruplar gibi ilk 5 gün, ikinci olarak 21-25. günlerde bir 5 gün daha ve son 5 gün MWM su tankı deneyine katıldı. İlk MWM deneyinden sonra 6. günde icv yöntemle vücut ağırlıklarına göre beyin dokusuna 1,5 mg/kg vücut ağırlığı dozunda STZ uygulandı. 25. ve 35. günler arasında 300 mg/kg vücut ağırlığı dozunda intraperitoneal (i.p) olarak kurkumin enjeksiyonu yapıldı (51).

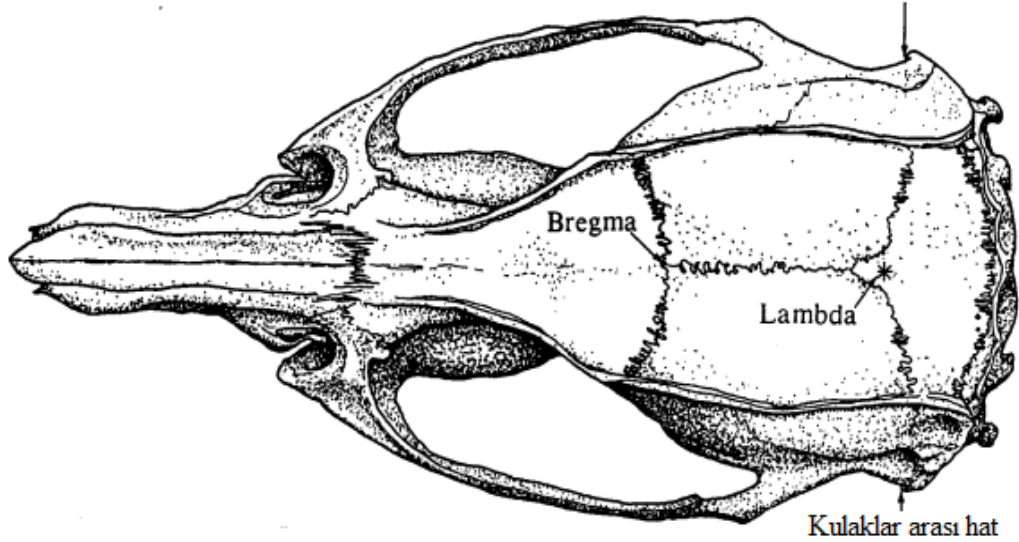
Çalışmaya başlamadan önce yapılacak uygulamaların planlanması için bir çizelge hazırlandı. Çalışma zamanı çizelgesine göre deney hayvanlarının tamamı herhangi bir uygulama olmadan Morris su tankı sisteminde 4 gün alıştırma ve bir gün prob deneyi olmak üzere toplam 5 gün yüzdürüldüler. 5.günden sonra icv uygulaması ile STZ ve STZ+kirkumin gruplarına STZ enjeksiyonu yapıldı ve hayvanlar 21 gün model oluşum süreci için bekletildi. 21 günün sonunda yine 5 gün boyunca yüzdürme deneyi yapıldı ve ardından 10 günlük kurkumin enjeksiyonu gerçekleştirildi. Kirkumin sadece STZ+kirkumin grubuyla kurkumin grubuna verildi. Kirkumin çözücüsü olan bileşen de sham grubuna enjekte edildi. Son olarak üçüncü kez yüzdürme deneyi yapıldı ve son olarak anestezi altında hayvanların beyin dokuları alındı (Tablo 3.2).

**Tablo 3. 2.** Çalışma zaman çizelgesi. MWM: Morris Su Tankı Deneyi, STZ: Streptozotosin, ICV: İntraserebroventriküler, i.p: intraperitonel



### 3.6. İcv enjeksiyon

Hayvanlara icv enjeksiyon yapmak için stereotaksik cihazı (ASI-Instruments, SAS-4100, ABD) kullanıldı ve Hamilton enjektörüyle (10 µl hacimli, Hamilton, ABD) sıvı aktarımı sağlandı. İcv enjeksiyon için lateral ventrikülün stereotaksik koordinat noktaları Paxinos & Watson sıçan beyin atlasına göre belirlendi (53). Lateral ventrikül giriş noktası referans noktası olan bregmadan 1,40 mm mediyal ve 0,8 mm posteriyör (kaudal) gidilerek tespit edildi (Şekil 3.1). Bu noktada matkapla kafatası kemiği delindikten sonra 4,8 mm yüzeyin altına enjektörle inildi ve her hayvan için belirlenen miktarda STZ yavaş yavaş verildi ve yine yavaşça enjektör çıkarıldı.

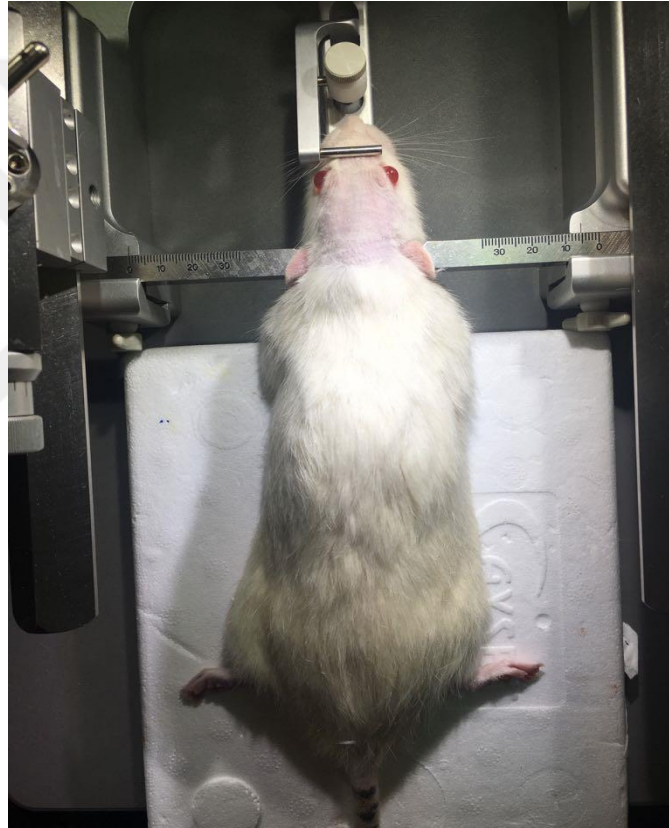


**Şekil 3.1.** 290 gram Wistar rata ait kafatası diyagramı. Bregma, lambda ve kulaklar arası hat lateral pozisyonda görülmektedir (54).

Hayvanlar icv operasyonun hemen öncesinde intramüsküler olarak 75 mg/kg ketamin (Alfamine, Alfasan, Hollanda) ve 5 mg/kg ksilazin (Alfazyne, Alfasan, Hollanda) ile anestezi yapıldı. Hayvanlar fizyolojik yanıtları (parmak kıstırma gibi) takip edilerek anestezi etkisine girdikten sonra kafaları traş edilip operasyon için hazır hale getirdiler. Sonrasında hayvanlar stereotaksik cihaza kulakları ve ağzı cihaza sabitlenerek yere paralel şekilde yerleştirildiler (Şekil 3.2). Kafa derisi sagittal olarak bistüri yardımıyla açıldıktan sonra bregma noktası belirlenip (Şekil 3.3) stereotaksi koordinatlarına göre her iki ventrikülde de matkapla duraya zarar verilmeden delik açıldı (Şekil 3.4). Ardından her iki noktaya da STZ ve STZ+kurkumin gruplarındaki



hayvanlar için yapay serebrospinal sıvıda çözdürülen STZ hayvan ağırlığına göre enjekte edildi ve sham grubundaki hayvanlara da aynı şekilde kafatasında hesaplanan noktaya delik açılıp ağırlığına göre sadece STZ çözücüsü yapay serebrospinal sıvı enjekte edildi (Şekil 3.5). Enjeksiyon tamamlandıktan sonra hayvan cihazdan çıkarılıp kesi bölgesi suturelarla kapatıldı (Şekil 3.6) ve hemen ardından 1 ml intraperitoneal serum fizyolojik ve intramüsküler olarak ağırlıklarına göre antibiyotik enjekte edildi. Hayvanlar tekli kafeslere alındıktan sonra yiyeceğe ve suya ulaşabilecekleri şekilde iyileşme sürecine bırakıldılar (Şekil 3.7).



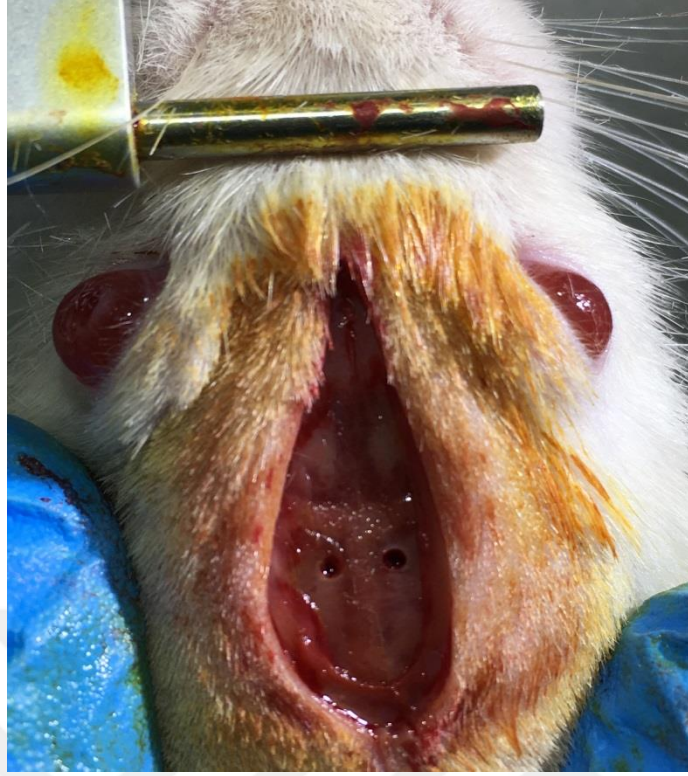
**Şekil 3.2.** Sıçanın stereotaksi cihazına yerleştirilmesi.



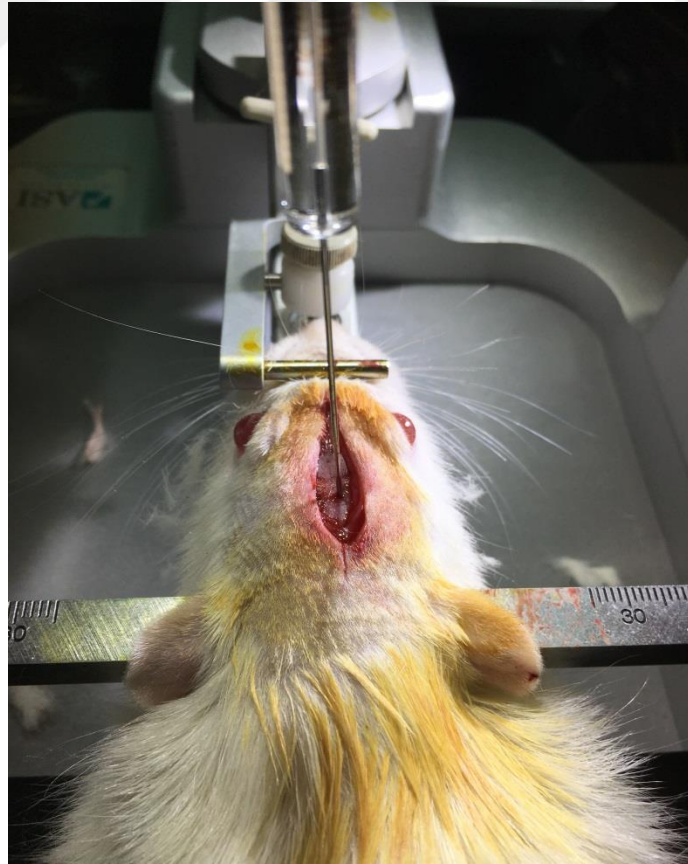
**Şekil 3.3.** Stereotaksi cihazına sabitlenen sıçanın kafatasında koordinatları belirlemeden önce temiz bir görüntü sağlanması.



**Şekil 3.4.** Bregma noktasının ve stereotaksik koordinatların belirlenmesi.



**Şekil 3.5.** Enjeksiyon için kafatasında delik açılması.



**Şekil 3.6.** Hamilton enjektörüyle STZ enjeksiyonu yapılması.



**Şekil 3.7.** Operasyon sonrası açılan kesinin süturla kapatılması.

### **3.7. Morris Su Tankı Deneyi (Morris Water Maze-MWM)**

MWM kemirgenlerin uzamsal hafıza ve öğrenme becerilerini görüntülemekte kullanılan bir davranış deneyi sistemidir (55). 150 cm çapında ve 60 cm yüksekliğinde dairesel bir tankın su ile doldurulup tank üzerindeki kamera yardımıyla monitöre aktarılan görüntü ve videolar aracılığıyla ölçümler yapılmaktadır. Tank deney sisteminin yazılımı aracılığıyla (Noldus EthoVision XT10, Noldus Information Technology, ABD) dairenin merkezi çevresinde 4 farklı kadrana (kuzeybatı, kuzeydoğu, güneybatı, güneydoğu) ayrılmaktadır. Uygulama öncesi hayvanların rengine zıt olarak su rengi ayarlandı (56). Bu çalışmada albino ratlar kullanıldığından tanktaki su gıda boyasıyla siyaha boyandı. Her kadranın ortası çeşitli renk ve şekildeki göstergelerle işaretlendi ve hayvanların görebileceği şekilde tankın etrafına sabitlendi. MWM su tankı deneyinde su seviyesinin 3-4 cm altında kalacak şekilde gizli bir platform yerleştirilerek hayvanlara platformun yeri öğretildi (Şekil 3.8). Bu çalışmada

platform kuzeydoğu kadranının ortasında olacak şekilde ayarlandı ve hayvanlar her dört kadrandan da suya bırakılarak yön tayini ve hafıza durumları izlendi. Tüm yüzdürme seanslarında her hayvan dört yönden de toplamda 60 saniye olacak şekilde yüzmeye bırakıldı. Süre sonunda platformu bulamayan hayvanlara ilk 4 gün boyunca platformun üstüne bırakılıp 20 saniye gözlem yapması için zaman tanındı. 4 günden sonraki beşinci gün yüzdürme seansında platform sudan çıkarılıp hayvanların öğrenme yetenekleri ve hafıza durumları görüntülendi (57).



**Şekil 3.8.** Morris su tankında yüzdürme seansı.

### **3.8. Histopatoloji**

Deney sonunda alınan beyin dokuları % 10'luk formaldehit içerisinde tespit edildi. Tespit sonunda çeşme suyunda yıkanan dokular, dehidrasyon ve parlatma işlemlerinden geçirilerek parafine gömüldü. Parafin bloklardan 4-5 µm kalınlığında kesitler alındı. Deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemlerinden geçirilen kesitlere, genel morfolojik yapının incelenmesi için hematoksilin-eozin (H-E) boyama metodu

uygulandı. Boyanan preparatlar Leica DFC-280 araştırma mikroskobu ile incelendi (58).

H-E boyama metodu uygulanan her kesit rastgele seçilen 10 alanda, serebral korteksteki nöronal dejenerasyon (büzülmüş ve hipereozinofilik sitoplazma, piknotik nükleus) varlığına göre inceledi. Histopatolojik değişiklikler, Salama ve arkadaşları tarafından gösterilen yarı kantitatif skorlama sisteminde, bazı modifikasyonlar yapılarak değerlendirildi. Bu skorlama sisteminde; 0: normal görünümlü dokuya, 1: hafif, 2: orta ve 3 şiddetli düzeydeki histopatolojik değişiklikler içeren dokuya işaret etmektedir (59).

### 3.9. Biyokimyasal Analizler

#### 3.9.1. Malondialdehit Analizi (MDA)

Lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA, Uchiyama ve Mihara'nın yöntemine göre çalışıldı (60). Sıçan beyin numunesi, % 1,15'lik KCl çözeltisi içinde, % 10'luk homojenat oluşturacak şekilde, 15000 devir/dakikada, 1 dakika süreyle buz üzerinde homojenize edildi. Bu homojenat doğrudan MDA analizinde kullanıldı.

Analizin yapılışı:

	Numune
Homojenat	250 µl
% 1'lik fosforik asit	1500 µl
% 0,6'lık TBA	1500 µl

Hazırlanan çözeltiler deney tüplerine eklendi, vortekslendi ve tüpler kaynar suda (en az 95 derecede) 1 saat bekletildi. Tüplere 2 ml n-butanol eklendi ve 5 dakika boyunca vortekslendi. Daha sonra numuneler 3000xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Spektrofotometrede 535 nm ve 520 nm'de numunelerin absorbanasları okunarak, MDA konsantrasyonları 1,1',3,3' tetrametoksiopropan ile hazırlanan standart grafikten değerlendirildi ve sonuçlar nmol/gram yaş doku olarak verildi.

#### 3.9.2. Glutatyon Analizi (GSH)

GSH, Ellman'ın (61) yöntemine göre tayin edildi. Sıçan beyin numunesi, 1-2 dakika 15000 devir/dakikada, % 10'luk homojenat oluşturacak şekilde buz üzerinde

homojenize edildi. Daha sonra, homojenat 3000 devir/dakikada, +4 derecede, 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatanta TCA çözeltisi ilave edildi, karıştırıldı ve tekrar santrifüj edilerek numune GSH analizine hazır hale getirildi.

Analizin yapılışı:

	Numune	Kör
% 10'luk homojenat	500 µl	---
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,3 M)	4 ml	4 ml
DTNB	500 µl	500 µl
Distile su	-----	500 µl

Hazırlanan çözeltiler deney tüplerine eklendi, vortekslendi ve 5 dakika sonra oluşan rengin şiddeti spektrofotometrede 410 nm'de okundu ve sonuçlar glutatyon standart grafiğinden değerlendirilerek µmol /gram yaş doku olarak verildi.

### 3.9.3. Bakır-Çinko Süperoksit Dismutaz Analizi (Cu-Zn-SOD)

Doku SOD aktivitesi Sun ve ark. (62) yöntemine göre ölçüldü. Sıçan beyin numunesi % 10'luk homojenat oluşturacak şekilde, 15000 devir/dakikada, 1 dakika süreyle buz üzerinde homojenize edildi. 10000 rpm'de bu homojenat 20 dakika santrifüj edildi. Bu supernatan üzerine 3'e 5 oranında hazırlanan kloroform/etanol karışımından (3 birim kloroform/5 birim etanol ) eklendi. Daha sonra +4 derecede 5000 rpm'de örnekler 20 dakika santrifüj edildi. En üstteki berrak beyaz kloroform fazı pipetle dikkatlice alındı ve CuZn-SOD analizinde kullanıldı.

Analizin yapılışı:

	Kör (ml)	Numune (ml)
Assay reaktifi (0,3 mM/L ksantin, 0,6 mM/L Na <sub>2</sub> EDTA, 150µmol/L NBT, 400 mmol/L Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 1gr/L BSA)	2,45	2,45
Süpernatant	----	0,5
Bidistile su	0,5	-----
Ksantin oksidaz (167 Ü/L)	0,05	0,05

Hazırlanan deney tüpleri 25 °C’de 20 dakika süreyle inkübe edildi. Sürenin sonunda her iki tüpede 1 ml CuCl<sub>2</sub> ilave edildi ve reaksiyon durduruldu (0,8 mmol/L). Spektrofotometre 560 nm’ye dalga boyuna ayarlandı ve distile su ile sıfırlandı. Kör ve numunelerin absorbansı kaydedildi ve enzim aktivitesi hesaplandı. Enzim aktivitesi U/gr protein olarak verildi.

#### **3.9.4. Protein tayini**

Dokudaki protein tayini, sığır serum albuminin standart olarak kullanıldığı Biüret protein analizi ile yapıldı (63).

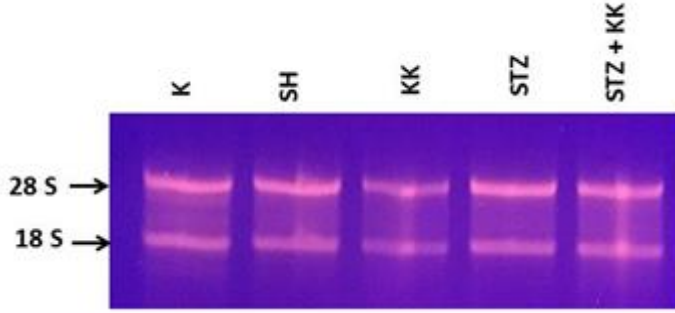
### **3.10. Moleküler Analizler**

#### **3.10.1. Dokudan RNA Saflaştırılması**

Beyin dokusu *β-Aktin*, *TRPM2* ve *mikrotübül-bağlantılı protein tau (MAPT)* mRNA seviyelerinin tespiti için gruplardan alınan beyin doku örnekleri RNA saklama çözeltisi içine konuldu ve bu dokulardan Roche firmasının “High Pure RNA Tissue Kit” (Lot no:16529600 ve referans no:12033674001) saflaştırma kiti kullanılarak toplam RNA saflaştırılması yapıldı. Protokole göre önce 30 mg doku tartıldı ve üzerine 600 µl “Lysis Buffer” eklendi. Daha sonra bilyeli doku parçalayıcıda 30 Hz titreşim hızıyla yaklaşık 1 dakika süresince homojenize edildi. Sonrasında homojenatın üzerine hacminin yarısı kadar etanol eklendi bu karışım vortekslelendikten sonra 13,000xg’de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında kolona 100 µl DNaz enzimi eklendi ve 15 dakika oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 500 µl Wash buffer-I eklenerek ve 8000x g de 1 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi, üzerine 500 µl Wash buffer-II eklendi ve tekrar 8000x g de 1 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi. Daha sonra üzerine 300µl Wash buffer-II eklendi ve 13000xg’de 2 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi. Santrifüj sonrası koleksiyon tüpü atıldı ve kolon steril bir ependorf tüpe alındı bu işlemten sonra kolona 100 µl “Elüsyon buffer” eklendi ve 8000xg’de 1 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi tüpte toplanan sıvı total RNA olarak elde edildi. “High Pure RNA Kit Protokolü” kiti ile beyin dokusu örneklerinden saflaştırılan toplam RNA’larda herhangi bir yıkımın olup olmadığının belirlenmesi amacıyla örnekler, % 1 agaroz jelinde ve 1X TBE tamponu ile 100 mV’de elektroforez işlemine tabi tutuldu.



Saflaştırılan RNA'larda 28S ve 18S ribozomal bantlarının varlığı ve herhangi bir yıkılım olmadığı görüldü (Şekil 3.9).



**Şekil 3.9.** Araştırmada her bir gruba ait beyin doku örneklerinden saflaştırılan RNA'lar.

Kontrol grubu (K), Sham grubu (SH), Kurkumin grubu (KK), Streptozotosin grubu (STZ), Streptozotosin+Kurkumin grubu (STZ+KK).

Ayrıca dokulardan saflaştırılan RNA örneklerinin spektrofotometrik analizleri yapıldı, örneklerin saf RNA içerdiği tespit edildi. Örneklerin RNA'ları miktar ve saflık tayini için "Biotek" marka spektrofotometre cihazı ile "Gen5" programları kullanılarak 260 ve 280 nm UV spektrumunda ölçüldü. RNA miktarı ng/ $\mu$ L cinsinden hesaplandı ve 260/280 oranları yaklaşık 2 olan saf RNA örnekleri cDNA sentezinde kullanıldı (Tablo 3.3).

**Tablo 3.3.** Gruplarda ölçülen doku RNA spektrofotometrik absorbans değerleri ve RNA miktarları.

Örnek No	Absorbans 260/280 nm	RNA: ng/ $\mu$ l
1	2,0	137,2
2	2,0	199,9
3	2,0	213,5
4	2,0	124,3
5	2,0	214,9
6	2,0	180,5
7	2,0	223,8
8	2,0	166,8
9	2,0	252,2
10	2,0	175,4
11	2,0	186,7

12	2,0	206,4
13	2,0	128,1
14	2,0	174,7
15	2,0	250,3
16	2,0	224,6
17	2,0	219,2
18	2,0	206,6
19	2,0	216,8
20	2,0	161,0
21	2,0	234,4
22	2,0	216,0
23	2,0	172,7
24	2,0	167,4
25	2,0	192,7
26	2,0	222,5
27	2,0	210,2
28	2,0	232,6
29	2,0	150,1
30	2,0	202,4
31	2,0	235,2
32	2,0	270,0
33	2,0	263,7
34	2,0	209,9
35	2,0	139,2
36	2,0	211,7
37	2,0	191,4
38	2,0	138,9
39	2,0	235,2
40	2,0	136,9
41	2,0	79,1
42	2,0	221,9
43	2,0	250,3
44	2,0	117,5
45	2,0	105,9
46	2,0	195,0
47	2,0	289,1
48	2,0	199,9
49	2,0	257,9
50	2,0	289,5

### 3.10.2. cDNA sentez protokolü

cDNA sentezi için Roche firmasının ürettiği “Evoscript Universal cDNA Master Kit”(Lot no:21703900, Ref no:07912439001) kullanıldı. cDNA sentezi firmanın önerdiği şekilde yapıldı. Kısaca 100 µl’lik PZR tüpüne 1000 ng toplam RNA, 4 µl ‘5x Master Reaction Mix’ ve toplam hacim 18 µl olacak şekilde saf su eklendi ve karıştırıldı. Daha sonra buz üzerinde en az 5 dakika primerlerin RNA’ya bağlanması için inkübasyona bırakıldı. Bu karışımın üzerine 2 µl‘10x Enzyme Mix’ eklendi ve böylece toplam hacim 20 µl oldu. Karıştırılan numuneler PZT makinesinde 42 °C’de 15 dakika, 85 °C’de 5 dakika ve 65 °C’de 15 dakika ısıtıldı ve +4 °C’de soğutulup daha sonra -20 °C’de analize kadar saklandı.

### 3.10.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PZR)

Gerçek zamanlı PZT analizi; Roche Light Cycler 96 gerçek zamanlı PZR cihazı, Roche firmasının ürettiği “Fast Start Essential DNA Probes Master kit (Lot no:20139200, Ref no: 06 402 682 001)” ve “Real Time Ready Assay  $\beta$ -Actin (lot no: 0000031501, config no: 100109946); *TRPM2* (lot no: 0000048251, config no:100128468), *MAPT* (lot no: 0000048249 config no: 100128510)”(8 pmol/µl) hidroliz problu primerler kullanılarak yapıldı. Reaksiyonlar 10 µl toplam hacimde hazırlandı. Bunun için 5 µl master mix, 0,5 µl real time ready mix, 2 µl PCR kalitesinde su ve 2,5 µl cDNA olacak şekilde hazırlandı. Çalışmada her örnek için 3 tekrar yapıldı. PZT şartları firmanın önerdiği şekilde yapıldı; ilk denaturasyon 95°C’de 10 dakika, ikinci denaturasyon 95°C’de 10 saniye, bağlanma 60°C’de 30 saniye ve polimerizasyon 72°C’de 1 saniye olarak oluşturuldu ve 55 döngü tekrarlandı. Tablo 3.4’te dizilimleri ve büyüklükleri verilen primerler gen ifadelerinin analizinde kullanıldı.

**Tablo.3.4.** Primer dizilimleri (Ek. 4-6).

Gen	Primer dizisi (Forward ve Reverse)	Ref. Number	Seq. Ürün büyüklüğü
<i><math>\beta</math>-Aktin</i>	F: 5' CTAAGGCCAACCGTGAAAAG 3' R: 5' GCCTGGATGGCTACGTACA 3'	NM_031144	79 bç
<i>TRPM2</i>	F: 5' GGACACCATGGTGGATCTGT 3' R: 5' TCAGGCTCCACAGAGCAGAG 3'	NM_001011559	63 bç
<i>MAPT</i>	F: 5' AGGATCCCAGCCAAGACCAC 3' R: 5' AACCAACAAAATCCGGAGAA 3'	NM_017212	71 bç

Her bir örnekten saflaştırılan RNA'lardan elde edilen cDNA'lar,  *$\beta$ -Aktin*, *TRPM2* ve *MAPT* genlerine özgü primerler kullanılarak gerçek zamanlı PZR ile çoğaltıldı ve gen ifadesindeki değişimler  *$\beta$ -aktin* genine oranla belirlendi.

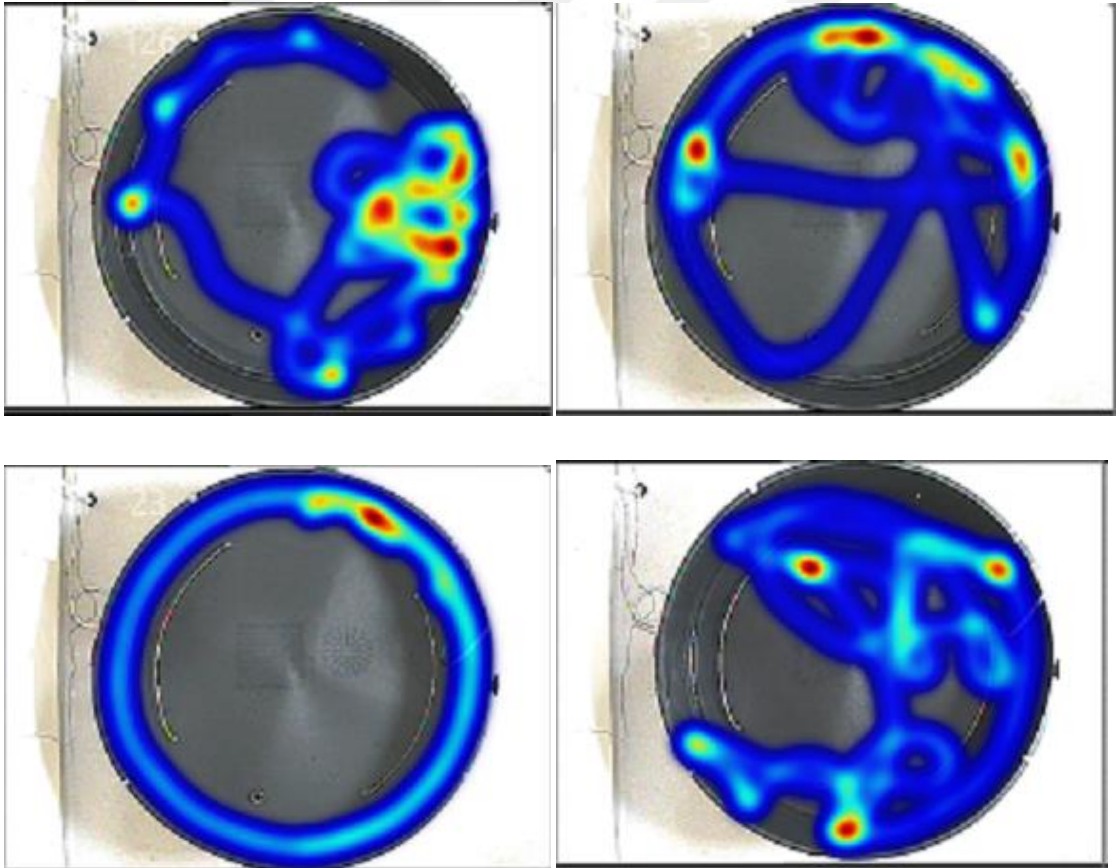
### 3.11. İstatistiksel Analizler

İstatistik incelemede, SPSS for Windows 21 istatistik paket programı kullanıldı. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediği öncelikle Kolmogorow-Smirnow testiyle değerlendirildi, moleküler genetik ve biyokimyasal analizler için verilerin normal dağılıma sahip olduğu tespit edildi ( $P > 0.05$ ). Diğer analizler tek yönlü varyans analizi ile değerlendirildikten sonra gruplar arası çoklu karşılaştırmalar Tukey'in testi ile değerlendirildi. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata (SH) olarak verildi. Water maze testi sonuçları paired sample t test yapılarak değerlendirildi. Histopatolojik sonuçların istatistiki analizleri için verilerin normal dağılıma sahip olmadığı tespit edildi ( $P < 0.05$ ). Gruplar arası karşılaştırmalar için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Bütün veriler med (min – max) olarak ifade edildi. P değerinin 0.05'ten küçük olduğu değerler istatistiki olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Morris Su Tankı Deneyi Bulguları

Streptozotosin uygulanan hayvanların su tankında platformu bulmak için toplam kat ettikleri yol cihazda cm cinsinden verilen sonuçlarla değerlendirildi. Buna göre hayvanlara STZ uygulanmadan önce ortalama kat edilen yol  $1075.59 \pm 47.9$  cm iken, STZ uygulandıktan 21 gün sonrasında  $1283.83 \pm 53,1$  cm olarak tespit edildi ( $P < 0.05$ ).



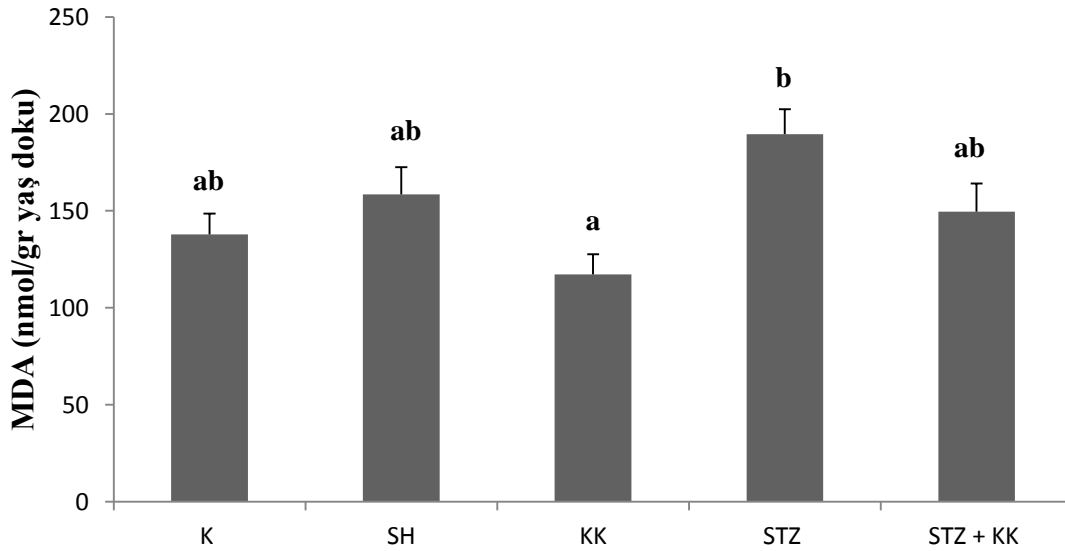
**Şekil 4.1.** MWM analizi yapılırken yüzen hayvanların kaydedilen ısı haritaları (heatmap) örnekleri.

## 4.2. Beyin MDA Seviyesi

STZ grubu hayvanların beyin MDA değerlerinin sadece kurkumin grubuna göre istatistikî olarak anlamlı bir artış gösterdiği tespit edildi ( $P < 0.05$ ). Diğer gruplar arasında MDA seviyesi açısından istatistikî olarak bir anlam tespit edilemedi ( $P > 0.05$ ) (Tablo 4.1 , Şekil 4.2).

**Tablo 4.1.** Gruplarda ölçülen MDA seviyeleri. Sütunda farklı olan harfler istatistikî olarak birbirlerinden anlamlıdır ( $P < 0.05$ ).

Gruplar	MDA (nmol/gr yaş doku) Ortalama $\pm$ Standart Hata
K (n=10)	137,87 $\pm$ 10,7 <sup>a, b</sup>
SH (n=10)	158,44 $\pm$ 14,1 <sup>a, b</sup>
KK (n=10)	117,25 $\pm$ 10,4 <sup>a</sup>
STZ (n=10)	189,59 $\pm$ 12,8 <sup>b</sup>
STZ + KK (n=10)	149,60 $\pm$ 14,5 <sup>a, b</sup>



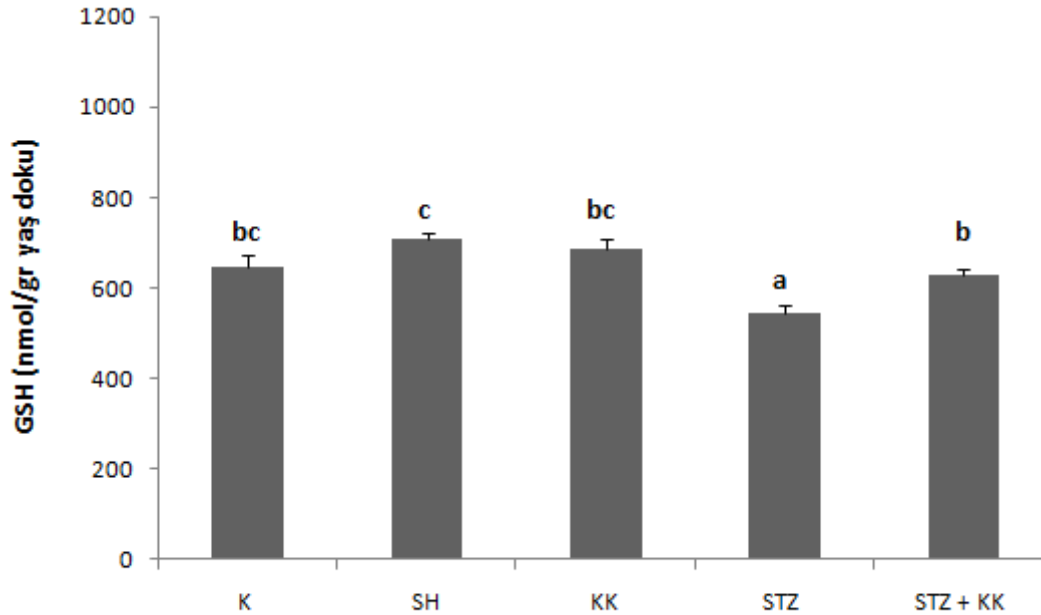
**Şekil 4.2.** Gruplarda ölçülen MDA seviyeleri. Gruplarda farklı olan harfler istatistikî olarak birbirlerinden anlamlıdır ( $P < 0.05$ ).

### 4.3. Beyin GSH Seviyesi

STZ grubu hayvanların beyin GSH düzeyleri diğer gruptaki hayvanların beyin GSH düzeylerine göre istatistiki olarak anlamlı bir azalma gösterdi ( $P < 0.05$ ). Kurkumin uygulaması STZ uygulaması ile azalan GSH değerlerini kontrol seviyelerine kadar istatistiki olarak bir seviyede yükseltmişti ( $P < 0.05$ ) (Tablo 4.2, Şekil 4.3).

**Tablo 4.2.** Gruplarda ölçülen GSH seviyeleri. Sütunda farklı olan harfler istatistiki olarak birbirlerinden anlamlıdır ( $P < 0.05$ ).

Gruplar	GSH (nmol/gr yaş doku) Ortalama $\pm$ Standart Hata
K (n=10)	646,68 $\pm$ 24,6 <sup>b, c</sup>
SH (n=10)	707,37 $\pm$ 15,5 <sup>c</sup>
KK (n=10)	687,32 $\pm$ 22,9 <sup>b, c</sup>
STZ (n=10)	546,60 $\pm$ 16,5 <sup>a</sup>
STZ + KK (n=10)	630,03 $\pm$ 10,2 <sup>b</sup>



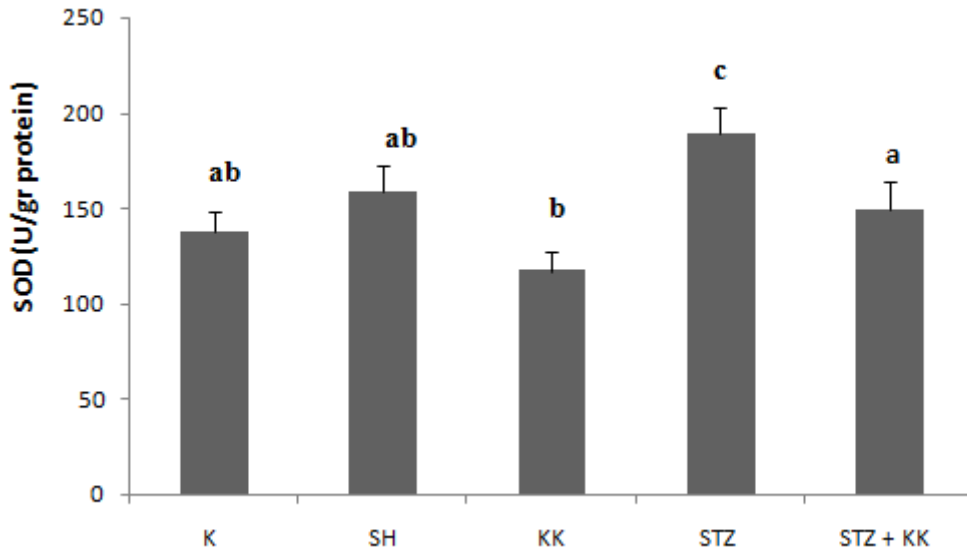
**Şekil 4.3.** Gruplarda ölçülen GSH seviyeleri. Gruplarda farklı olan harfler istatistiki olarak birbirlerinden anlamlıdır ( $P < 0.05$ ).

#### 4.4. Beyin Cu-Zn-SOD Aktivitesi

STZ grubu hayvanların beyin SOD aktivitelerinin diğer gruplardaki hayvanların beyin SOD aktivitesine göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği tespit edildi ( $P < 0.05$ ). STZ grubuna kurkumin uygulaması STZ grubunda artan SOD aktivitesini istatistiki olarak anlamlı düşürmüştü ( $P < 0.05$ ) (Tablo 4.3, Şekil 4.4).

**Tablo 4.3.** Gruplarda ölçülen SOD aktiviteleri. Kolonda birbirinden farklı olan harfler istatistiksel olarak birbirlerinden önemli farklılığı ifade etmektedir ( $P < 0.05$ ).

Gruplar	SOD (U/gr protein) Ortalama $\pm$ Standart Hata
K (n=10)	131,34 $\pm$ 7,3 <sup>a, b</sup>
SH (n=10)	133,48 $\pm$ 9,9 <sup>a, b</sup>
KK (n=10)	150,83 $\pm$ 7,6 <sup>b</sup>
STZ (n=10)	210,34 $\pm$ 5,9 <sup>c</sup>
STZ + KK (n=10)	110,91 $\pm$ 6,5 <sup>a</sup>

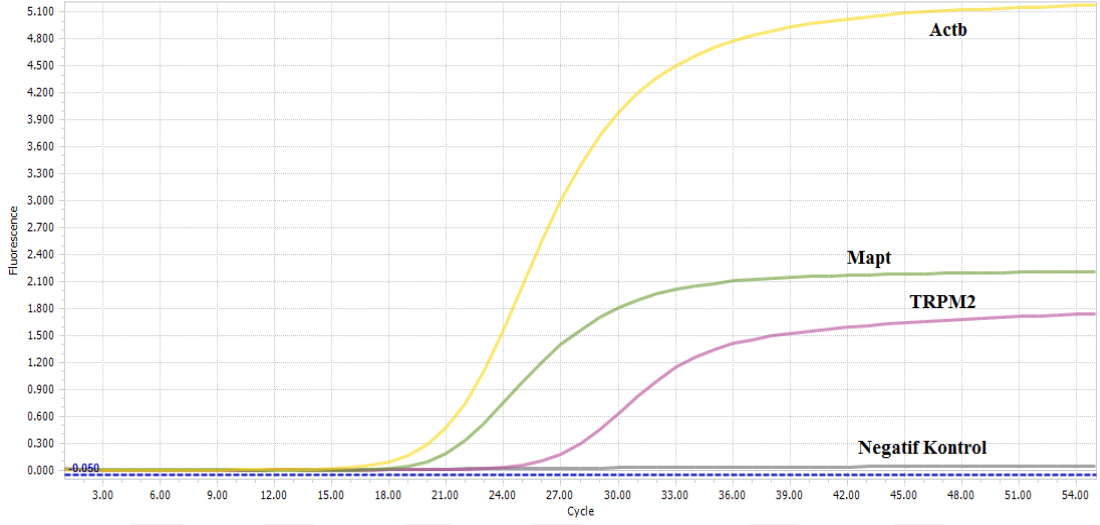


**Şekil 4.4.** Gruplarda ölçülen SOD aktiviteleri. Gruplarda farklı olan harfler istatistiki olarak birbirlerinden anlamlıdır ( $P < 0.05$ ).



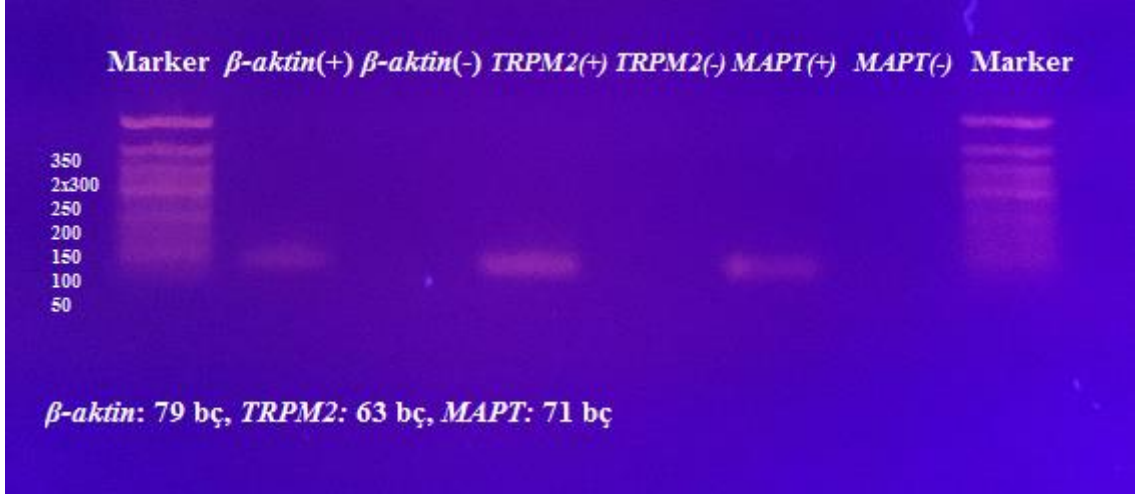
#### 4.5. Moleküler Genetik Bulgular

Moleküler analizlerde “Hydrolysis Probe” kimyası kullanılarak  $\beta$ -aktin, *TRPM2* ve *MAPT* mRNA’larından sentezlenen cDNA’ların gerçek zamanlı PZR ile çoğaltımı yapıldı (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. “Hydrolysis Probe” kimyası kullanılarak  $\beta$ -aktin, *MAPT* ve *TRPM2* mRNA’larından sentezlenen cDNA’ların gerçek zamanlı PZR ile çoğaltım eğrisi.

$\beta$ -aktin, *MAPT* ve *TRPM2* cDNA’ları kullanılarak yapılan gerçek zamanlı PZR sonrası agaroz jelinde örnekler koşturularak primer bağlanmasının özgüllüğü kontrol edildi. Analiz sonucunda her iki gen için de tek ve istenilen boyda bir DNA bandı oluştuğu görüldü (Şekil 4.6).

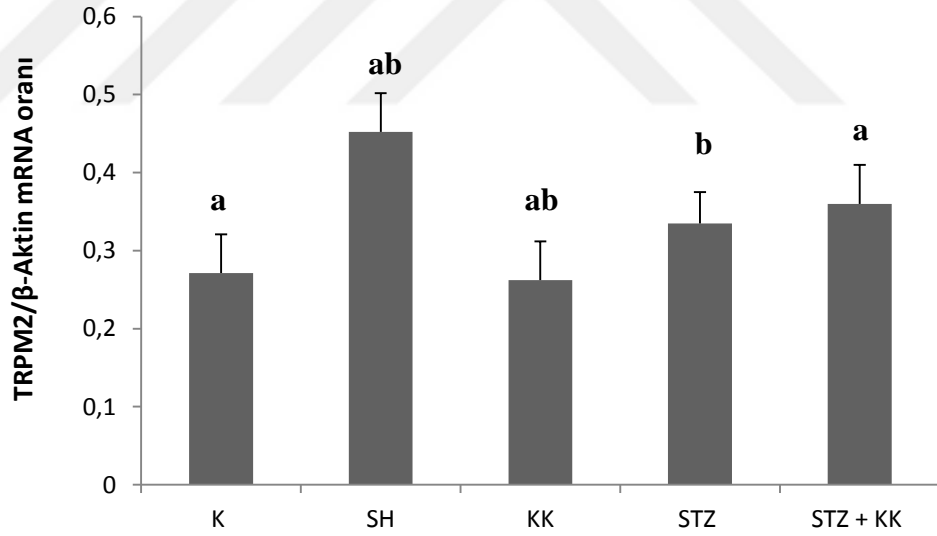


**Şekil 4.6.**  $\beta$ -aktin, MAPT ve TRPM2 cDNA'larının PZR'deki çoğalımının agaroz jel (%1,5) elektroforezi görüntüsü. Kullanılan DNA Markeri 50 bç DNA Markeri'dir (Bioron, 50 bp, catalog no: 304007).

STZ grubu sıçanların beyin TRPM2/ $\beta$ -aktin mRNA seviyeleri karşılaştırıldığında, kontrol grubu TRPM2/ $\beta$ -aktin mRNA seviyelerine göre istatistiki olarak anlamlı bir artış tespit edildi ( $P < 0.05$ ). Alzheimer grubuna kurkumin uygulaması STZ uygulaması ile artan TRPM2 gen ifadesini istatistiki olarak anlamlı oranda düşürmüştü ( $P < 0.05$ ) (Tablo 4.4, Şekil 4.7).

**Tablo 4.4.** Gruplarda ölçülen beyin *TRPM2/β-Aktin* mRNA seviyelerinin oranı. Sütunda farklı olan harfler istatistiki olarak anlamlıdır ( $P < 0,05$ ).

Gruplar	<i>TRPM2/β-Aktin</i> mRNA seviyelerinin oranı
	Ortalama $\pm$ Standart Hata
K (n=10)	0,00470 $\pm$ 0,0008 <sup>a</sup>
SH (n=10)	0,00534 $\pm$ 0,0005 <sup>a, b</sup>
KK (n=10)	0,00611 $\pm$ 0,0005 <sup>a, b</sup>
STZ (n=10)	0,00740 $\pm$ 0,0006 <sup>b</sup>
STZ + KK (n=10)	0,00408 $\pm$ 0,0003 <sup>a</sup>

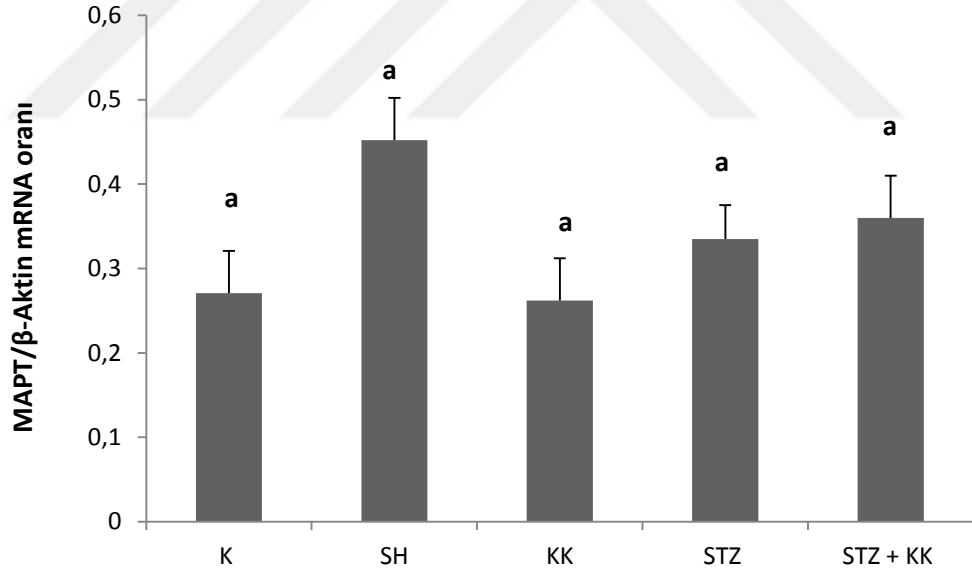


**Şekil 4.7.** Gruplarda ölçülen *TRPM2* mRNA seviyeleri. Gruplarda farklı olan harfler istatistiki olarak birbirlerinden anlamlıdır ( $P < 0,05$ ).

*MAPT* gen ifadesi açısından gruplar arasında istatistiki bir fark tespit edilemedi (Tablo 4.5, Şekil 4.8).

**Tablo 4.5.** Gruplarda ölçülen beyin *MAPT/β-Aktin* mRNA seviyelerinin oranı. Sütunda farklı olan harfler istatistiki olarak anlamlıdır ( $P < 0.05$ ).

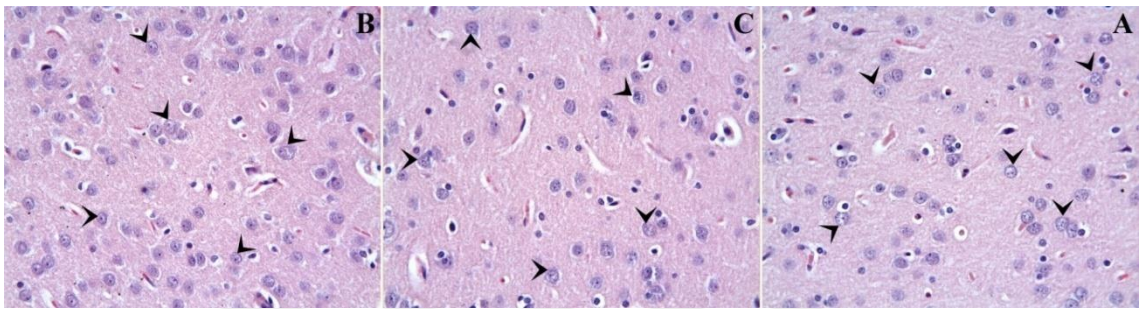
Gruplar	<i>MAPT/β-Aktin</i> mRNA seviyelerinin oranı
	Ortalama ± Standart Hata
K (n=10)	0,271 ± 0,05 <sup>a</sup>
SH (n=10)	0,452 ± 0,05 <sup>a</sup>
KK (n=10)	0,262 ± 0,05 <sup>a</sup>
STZ (n=10)	0,335 ± 0,04 <sup>a</sup>
STZ + KK (n=10)	0,360 ± 0,05 <sup>a</sup>



**Şekil 4.8.** Gruplarda ölçülen *MAPT* mRNA seviyeleri. Gruplarda farklı olan harfler istatistiki olarak birbirlerinden anlamlıdır ( $P < 0.05$ ).

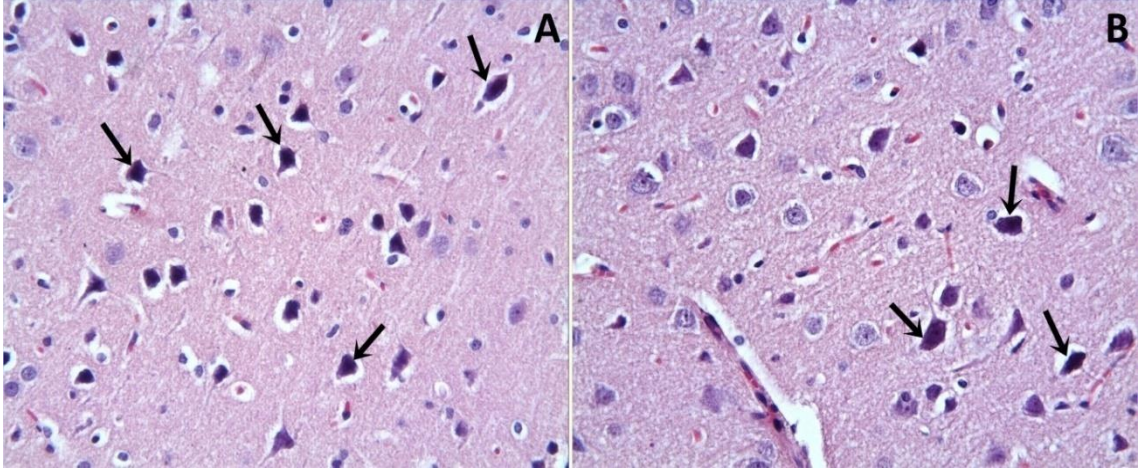
#### 4.6. Histopatolojik Bulgular

Kontrol, sham ve kurkumin gruplarına ait kesitlerde, serebral korteksin normal histolojik özelliklere sahip olduğu izlendi. Bu gruplarda, nöronlar yuvarlak, ökromatik nükleusları ve hafif eozinofilik sitoplazmaları ile normal morfolojik özellikler sergiliyordu. Bununla birlikte az sayıda, hafif düzeyde dejeneratif değişikliklere sahip nöronlara da rastlandı(Şekil 4.9. A, B ve C). İstatistiksel olarak birbirlerine benzer bulunan kontrol, Sham ve Kurkumin gruplarında histopatolojik skor, 0.0 (0.0 – 2.0) olarak tespit edildi.



**Şekil 4.9.** Morfolojik görünümü normal olarak izlenen piramidal nöronlar (ok başları), H-E x40. A; kontrol, B; sham, C; Kurkumin grupları.

STZ grubuna ait kesitlerde, çok sayıda nöronun özellikle büyük piramidal nöronların sitoplazmalarının büzüştüğü ve yoğun şekilde eozinofilik boyandığı, nükleuslarının da piknotik bir görünüm aldığı dikkat çekti. Bu grupta histopatolojik skor 2.0 (0.0 – 3.0) olarak hesaplandı. Sham grubu ile karşılaştırıldığında, STZ grubunda nöronal dejenerasyonun istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edildi ( $p=0.000$ ). Diğer yandan kurkumin uygulaması ile nöronlarda izlenen dejeneratif değişikliklerin hafiflediği ve dejenerasyonun azaldığı gözlemlendi. Bu gruba ait histopatolojik skor 1.0 (0.0 – 3.0) olarak saptandı. STZ grubu ile karşılaştırıldığında, STZ+KK grubundaki dejeneratif değişikliklerdeki azalmanın, istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi ( $p=0.006$ ) (Şekil.4.10).



**Şekil 4.10.** STZ ve STZ+KK gruplarının histopatolojik görüntüleri. STZ grubunda (A) çok sayıda büzülmüş sitoplazması ve piknotik nükleusları ile ayırt edilen dejenere nöronlar (oklar) dikkat çekmekte. STZ+KK grubunda (B), STZ grubuna göre dejenere nöron (oklar) yoğunluğunda belirgin azalma izlenmekte. H-E x20.

**Tablo 4.6.** Grupların histopatolojik skorlama sonuçları ve karşılaştırması.

Gruplar	K	SH	KK	STZ	STZ+KK
<b>Nöronal</b>	0.0 (0.0-2.0)	0.0 (0.0– 2.0)	0.0 (0.0– 2.0)	2.0 (0.0– 3.0) <sup>a</sup>	1.0 (0.0– 3.0) <sup>b</sup>
<b>Dejenerasyon</b>					

<sup>a</sup>Sham grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı artış (p= 0.000).

<sup>b</sup>STZ grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı azalış (p= 0.006).

## 5.TARTIŞMA

Araştırmada, hayvanlara STZ uygulanmadan önce ortalama kat edilen yol tek bir atış noktasından alındığında  $1075.59 \pm 47.9$  cm iken, STZ uygulandıktan 21 gün sonrasında  $1283.83 \pm 53.1$  cm olarak tespit edildi. STZ uygulaması sonrası hayvanların kendilerine öğretilmiş olan platformu bulmak için kat ettikleri mesafede istatistiki olarak anlamlı bir artış tespit edildi ( $P < 0.05$ ). STZ grubu hayvanların beyin MDA değerleri sadece kurkumin grubuna göre istatistiki olarak anlamlı bir artış gösterirken ( $P < 0.05$ ), diğer gruplar arasında MDA seviyesi açısından istatistiki olarak bir anlam tespit edilemedi ( $P > 0.05$ ). STZ grubu hayvanların beyin GSH düzeyleri diğer gruptaki hayvanların beyin GSH düzeylerine göre istatistiki olarak anlamlı bir azalma gösterdi ( $P < 0.05$ ). Kurkumin uygulaması STZ uygulaması ile azalan GSH değerlerini kontrol seviyelerine kadar istatistiki olarak anlamlı bir seviyede yükseltmişti ( $P < 0.05$ ). STZ grubu hayvanların beyin SOD aktiviteleri diğer gruplardaki hayvanların beyin SOD aktivitesine göre istatistiki olarak anlamlı bir artış göstermiştir ( $P < 0.05$ ). STZ grubuna kurkumin uygulaması STZ grubunda artan SOD aktivitesini istatistiki olarak anlamlı bir seviyede azaltmıştı ( $P < 0.05$ ). STZ grubu sıçanların beyin *TRPM2/β-aktin* mRNA seviyeleri karşılaştırıldığında, kontrol grubu *TRPM2/β-aktin* mRNA seviyelerine göre istatistiki olarak anlamlı bir artış tespit edilirken ( $P < 0.05$ ), STZ grubuna kurkumin uygulaması STZ uygulaması ile artan *TRPM2* gen ifadesini istatistiki olarak anlamlı bir biçimde düşürmüştü ( $P < 0.05$ ).

İcv STZ indüklü Alzheimer sıçan modeli SAH araştırmaları için yaygın olarak kullanılan modellerden biridir ve sıçanlarda bilişsel bozukluğu sağlamak için literatürde çeşitli dozlarda STZ uygulamaları mevcuttur (35). 3 mg/kg vücut ağırlığı STZ'nin aynı günde iki ventriküle enjeksiyonu ya da iki gün aralıklı çift enjeksiyonu 2-4 hafta içinde ratlarda bilişsel bozukluğa ve diğer AH belirtilerine yol açtığı gibi daha düşük dozlarda yapılan enjeksiyonlar da 4 hafta sonrasında modelin oluşması için yeterli olduğubildirilmektedir (64, 65). Bu yaygın olarak kullanılan modelde ilk gün birinci ventriküle iki gün sonra ikinci ventriküle enjeksiyon yapılan çift dozlu operasyonlarda tek seferde yapılan enjeksiyona göre hayvanlarda ölüm oranının % 25 daha fazla olduğu kaydedilmiştir (65). Mehla ve ark. (65) deneysel Alzheimer modeli olarak sıçanlar

üzerinde en uygun dozu bulmak için farklı dozları denemişler ve patoloji oluşumu için en uygun dozun 3 mg/kg vücut ağırlığı olduğunu kaydetmişlerdir. Bu araştırmada da öncelikle sıçanlara bu dozda uygulama yapıldı fakat dozun diyabetojenik etkisinden dolayı hayvanların % 70'i bir hafta içinde öldüler. Ölüm oranlarının çok olması nedeniyle subdiyabetojenik doz olan 1,5 mg/kg STZ enjeksiyonu tek seferde yapıp 25 gün model oluşumu için zaman tanındı.

Birçok araştırmada STZ ile indüklenmiş sAH sıçan modelinin bilişsel fonksiyonlarındaki bozulmayı gözlemlemek adına yapılan MWM deneylerinde enjeksiyon yapılan hayvan gruplarıyla sham ve kontrol grupları arasında platforma ulaşma süreleri ve prob deneyinde platform bölgesini hatırlamada önemli farklılıklar tespit edilmiştir (66, 67). Bu araştırmada da STZ indüklü Alzheimer sıçan modelinin başarılı olup olmadığını analiz edebilmek adına enjeksiyondan önce sıçanlar MWM deneyine tabi tutulup referans bilgiler kaydedilmiştir. İcv enjeksiyondan sonra üç hafta patoloji oluşumu için zaman tanınıp yeniden sıçanların hafıza durumlarını değerlendirmek adına MWM deneyi yapılmıştır. Operasyon öncesinde yapılan MWM deneyi ve operasyon sonrası üç hafta beklendikten sonra yapılan MWM deneyi sonuçlarına göre sıçanların kat ettikleri mesafe açısından bulgular değerlendirildiklerinde Alzheimer modelinin oluştuğuna kanaat getirilmiştir. Ayrıca hayvanların beyin dokularında yapılan patolojik inceleme sonuçları da bu bulgularımızı desteklemiştir.

Araştırmamızda STZ uygulanan sıçan grubuyla sham grubu arasında bulunan anlamlı nörodejenerasyon farkı gözlenmiştir. STZ indüklü Alzheimer sıçan modellerinde histopatoloji çalışmalarında da enjeksiyon yapılmamış gruplara karşılık STZ enjekte edilmiş hayvan gruplarında yoğun oranda nörodejenerasyon tespit edilmiştir (68). Ahmed ve ark. (69) yaptığı araştırmada STZ enjeksiyonu yapılmış hayvanlarda nöron kayıpları görülürken buna karşılık icv yine operasyonu yapılan sham grubu olan hayvanlarda operasyondan kaynaklı bir dejenerasyona rastlanmamıştır. STZ uygulanmış sıçanların beyin kesitlerinin histopatolojik incelemelerinde morfolojik olarak normal sıçan beynine göre farklılıklar gözlemlenmiş ve büyük oranda nöron kaybı kaydedilmiştir.

*TRPM2* gen anlatımı en fazla beyinde olmaktadır, bunun yanında kemik iliği, dalak, karaciğer, akciğer gibi dokularda ve pankreatik  $\beta$  hücreleri, mikroglia, nöron gibi



hücrelerde de tespit edilmiştir (70, 71). *TRPM2*'nin gen anlatımının fazla beyinde olduğu tespit edildikten sonra merkezi sinir sistemiyle alakalı patolojilerin *TRPM2* ile ilişkili çalışmaları yoğunlaşmıştır (72). Aktif *TRPM2* katyon kanallarının açılması üzerinde hücre dışı etken (aktivatör) bilinmektedir. Bunlar; oksidatif stres, ADPR/NAD<sup>+</sup> metabolizması ve tümörnekroz faktörü alfa (TNF $\alpha$ )'dır (73). Olah ve ark. (40) hipokampalsilikalardaki CA1 inter nöronlar dahil hipokampüsün piramidal nöronlarında, fonksiyonel *TRPM2* katyon kanallarının son derece iyi ifade edildiğini göstermişlerdir ve başka çalışmalar da AH patolojisinde hipokampusta nörodejenerasyona neden olan faktörlerden birinin *TRPM2* kanal proteininin dengesiz Ca<sup>+2</sup> alımı olduğunu bildirmişlerdir (10). *TRPM2* kanal aktivitesinin ve gen anlatımının nörodejeneratif hastalıklarda arttığını rapor eden çalışmalar mevcuttur (74, 75). Bu araştırmada da STZ indüklü Alzheimer sıçan grubunda *TRPM2* mRNA seviyesinin kontrol ve sham grubundakilere kıyasla anlamlı bir artış göstermesinin nörodejenerasyon kaynaklı olduğu söylenebilir. *TRPM2*, ROT ile açılan bir kanal olup hücre ölümünü kolaylaştırmakta ve hücre içine toksik oranda Ca<sup>+2</sup> alımıyla dengeyi bozup yine hücre ölümünü tetiklemektedir (3). Yamamoto ve ark. (10) değerlendirmesine göre *TRPM2*, A $\beta$  ile nöron içine Ca<sup>+2</sup> alımını artırmakta ve hücre içi Ca<sup>+2</sup> da *TRPM2* kanalını aktive etmektedir bu da Alzheimer patolojisinin şiddetini artırmaktadır. Araştırmamızda STZ grubunda, SH grubuna göre *TRPM2* gen ifadesinde artış bulunması Yamamoto ve arkadaşlarının bulgularıyla paralellik göstermektedir.

*TRPM2*<sup>-/-</sup> farelerle yapılan Alzheimer fare modelinin MWM deneyi *TRPM2* geni eksikliğinde farelerin bilişsel fonksiyonlarında bozulmalar olduğunu ve *TRPM2* kanallarının öğrenmede önemli bir rol oynadığını göstermiştir (76).

MAPT, kısaca tau olarak adlandırılmakta olup esas görevi mikrotübüllerin stabilitesini sağlamak olan bir proteindir (27). AH belirteçlerinden olan senil plakların kaynağı tau proteinin hiperfosforillenmiş çöktellerinin beynin farklı bölgelerindeki mRNA seviyeleriyle olan ilişkisi postmortem insan beyni çalışmalarıyla rapor edilmiştir (77). Ayrıca GWAS çalışmalarıyla plazma tau seviyeleri sağlıklı ve AH yaşlı bireylerde karşılaştırılmış ve tau'nun AH ile güçlü bağlantısına rağmen nöronal dejenerasyonla miktarının doğrudan bir bağlantısı bulunamamış, normal geni taşıyanların tau seviyeleri mutant bireylere göre daha düşük ya da normal seviyede görülmüştür (78). Bu çalışmada da hipokampüs *MAPT* mRNA seviyeleri STZ grubu ve diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Bu sonuca göre fosforillenmiş tau miktarının total MAPT proteininin gen ifadesiyle doğrudan bir bağlantısı olmadığı söylenebilir (77).

Kurkumin antitümör, antioksidan, anti-inflamatuvar özellikleriyle bilinmektedir ve AH bireylerin beyinlerinde A $\beta$  yıkımıyla birikimini inhibe edebilmektedir (79). Birkaç hayvan model araştırmasında kurkuminin beyin, karaciğer, akciğer, böbrek ve kalbi oksidatif stres ajanlarından koruduğu ve ROT oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir (46). Kurkumin nötral ve bazik pH ortamlarında dengesiz bir yapıda olup asidik ortamda dağılımı daha iyidir ve bu nedenle mide ve bağırsak sistemlerinde daha stabildir (80).

Kurkumin birçok nörodejeneratif sıçan modeli araştırmasında farklı dozlarda ve sürelerde uygulanmış ve bu araştırmalarda kısa süreli uygulamalarda MDA ve GSH seviyelerinde anlamlı bir farklılık görülememişken daha uzun süreli uygulamalarda kurkumininMDA seviyesindeki artışı önlediği ve GSH salınımını azalttığı rapor edilmiştir (81). Bu çalışmanın MDA analiz sonuçlarına göre sadece STZ grubu ve kurkumin grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuş olup, STZ+KK grubunda belirgin bir MDA azalması gözlenememiştir. Khurana ve ark. (81) kurkuminin kısa süreli uygulamada MDA düzeyine etki edemeği değerlendirmesi bu çalışmadaki 10 günlük kurkumin uygulamasının yeterli olamayacağını destekler niteliktedir. Agrawal ve ark. (45) STZ uygulanan sıçanlara kurkumin uygulamasında operasyon kontrol gruplarıyla sağlıklı hayvanlar arasında bir GSH seviyesi farklılığı bulamamış fakat STZ grubunda GSH seviyesinin anlamlı bir düşüş gösterdiğini, kurkumin uygulamasının bunu zıt yöne çevirdiğini rapor etmişlerdir. Araştırmamızda STZ grubunda kontrol ve kurkumin gruplarına oranla gözlenen GSH düzeyindeki azalma ve STZ+KK grubunda STZ grubuna göre GSH düzeyinde bulunan yükselmediğer araştırmaların sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. Kurkumin, nörodejenerasyon hayvan modellerinde antioksidan etkisiyle SOD enzim aktivitesini de azaltabilmektedir (79). Araştırmamızda STZ grubunda SOD aktivitesi kontrol gruplarına göre artmış olmasına rağmen STZ+KK grubunda SOD aktivitesindeki azalmanın anlamlı olması, kurkuminin antioksidan özelliğinden kaynaklanabileceğini bize gösterebilmektedir. Lim ve ark. (82) transgenik Alzheimer fareler kurkuminin yüksek ve düşük dozlarını uyguladıkları araştırmalarında, düşük doz kurkumin uygulanan farelerde bile kurkuminin oksidatif stresi azaltıp A $\beta$  birikim oranını düşürdüğünü bildirmişlerdir.

Kurkumin uygulamasının Alzheimer fare ve sıçan modellerinde hafıza ve öğrenme becerilerindeki bozulmalarda azalma sağladığı yapılan MWM analizleriyle gösterilmiştir (66, 67, 83).

Kurkuminin Alzheimer sıçan modelinde fosforillenmiş tau proteinini azalttığı da rapor edilmiştir (84). Literatürde Alzheimer hasta beyinleri ve hayvan modellerinde total tau proteininin gen ifadesiyle alakalı çalışmalar mevcut olup kurkumin uygulamasının tau mRNA'sı üzerindeki etkisine dair net bir bilgi bulunmamaktadır. Araştırmamızda; yapılan *MAPT* gen ifadesi seviyelerinde STZ sıçan grubuyla STZ+KK grubu arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. AH öncül patolojisi olan A $\beta$  plakları *in vitro* çalışmalarda nöronal hücre hatlarında kurkumin uygulamasının, A $\beta$  oluşumunda ve var olan A $\beta$  miktarında azalma sağladığı tespit edilmiştir (85). Aynı şekilde *in vivo* araştırmalarda da Alzheimer hayvan modellerine uygulanan kurkuminin antienflamatuvar etkisiyle A $\beta$  oranını azalttığı bildirilmiştir (82). *In vitro* ve *in vivo* araştırmalara ek olarak kurkuminin belli dozlarda AH bireylere uygulandığı klinikaraştırma sonuçları da Alzheimer'da kurkuminin bir tedavi seçeneği olabileceğini göstermektedir (86).

TRPM2'nin hücre ölümündeki rolünü anlamak adına *in vitro* nöronal hücre çalışmalarında poli-ADP riboz polimeraz (PARP) gibi inhibitörlerle bloke edilerek oksidatif stresle tetiklenen Ca<sup>+2</sup> akışı sağlayan işlevi araştırılmıştır ve *TRPM2* mRNA seviyesinde azalmanın hücre ölümüyle ters orantılı olduğu bulunmuştur (41). TRPM2 inhibitörü kullanımının hücre ölümünde azalma sağlaması flufenamik asit, ekonazol, klotrimazol, antranilik asit ve klorpromazin gibi çeşitli inhibitörlerin geliştirilmesini sağlamıştır (87-89). Kurkuminin sıçan hepatosit hücre hattında TRPM2 kanal aktivitesini inhibe ettiği ve diğer inhibitör ajanlardan daha fazla potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir (7). TRPM2'nin inhibe edilmesiyle Ca<sup>+2</sup> bağlantılı nörodejenerasyonun azalması durumu *in vivo* olarak da araştırılmayı gerektirmektedir. Araştırmamızda STZ grubuna göre STZ+KK grubunda *TRPM2* mRNA seviyesinde azalma tespit edilmiştir. Kheradpezhohu ve ark. (7) kurkuminin rat hepatosit hücrelerinde TRPM2'yi inhibe ettiğini rapor ettiği araştırmanın ışığında bizim sonuçlarımızın da *in vivo* olarak kurkumin *TRPM2* gen ifadesi üzerinde inhibe edici bir etkiye sahip olduğu söylenebilir. *TRPM2* gen ifadesindeki azalma kendini kurkumin uygulanan hayvanlarda tespit edilen biyokimyasal ve patolojik düzelmelerle ve azalan oksidatif stresle göstermiş olabilir.

Nörodejenerasyon hayvan modeli çalışmalarında kurkuminin koruyucu ve tedavi edici etkileri patolojik olarak da gösterilmiştir (44). Dejenerasyon öncesi kurkumin uygulamasının, dejenerasyon sonrası kurkumin uygulamasına göre daha anlamlı koruma

sağladığı ve nöronlarda hasarlanmayı önlediği bildirilmiştir (66). Işık ve ark. (51) STZ indüklü Alzheimer sıçan modeli araştırmalarında, STZ grubunda büyük ölçüde nöron kaybı ve dejenerasyon tespit edilmiş, kurkumin uygulamasıyla bu hasarın histopatolojik açıdan kendini daha azdejenereasyon ve nöron kaybıyla gösterdiğini bildirmişlerdir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

TRPM2 kanal protein miktarında ve aktivitesindeki artışın Alzheimer hastalığının şiddetine doğrudan katkı yaptığını gösteren araştırmalar, hastalığın tedavisinde bu kanal proteinin inhibisyonuna önem kazandırmaktadır. Araştırma sonuçlarımız kurkuminin *TRPM2* gen ifadesini inhibe etmekte başarılı olabileceğini göstermektedir. *MAPT* gen ifadesinde değişim olmaması Alzheimer patolojisinden bağımsız bir mekanizma olarak kabul edilebilir. Fosforillenme seviyelerinde yapılacak araştırmalar tau mekanizmasında daha detaylı bir şekilde aydınlatılabilecektir.

Araştırma sonuçlarımız; kurkuminin STZ uygulamasıyla oluşan oksidatif stresi azaltması ve STZ kaynaklı oluşan nörodejenerasyonu histopatolojik, biyokimyasal ve genetik açıdan düzeltme etkisine sahip olmasının Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılabileceğini göstermektedir.

## KAYNAKLAR

1. Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, Arrighi HM. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2007 Jul;3(3):186-91. PubMed PMID: WOS:000249580100010. English.
2. Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. Alzheimer's disease. *Lancet.* 2011 Mar 19;377(9770):1019-31. PubMed PMID: 21371747.
3. Mattson MP. Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell.* 2007 Jun;6(3):337-50. PubMed PMID: WOS:000247315100010. English.
4. Takahashi N, Kozai D, Kobayashi R, Ebert M, Mori Y. Roles of TRPM2 in oxidative stress. *Cell Calcium.* 2011 Sep;50(3):279-87. PubMed PMID: WOS:000295744800009. English.
5. Xie YF, Macdonald JF, Jackson MF. TRPM2, calcium and neurodegenerative diseases. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2010 Mar 15;2(2):95-103. PubMed PMID: 21383889. Pubmed Central PMCID: 3047260.
6. Esatbeyoglu T, Huebbe P, Ernst IM, Chin D, Wagner AE, Rimbach G. Curcumin--from molecule to biological function. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2012 May 29;51(22):5308-32. PubMed PMID: 22566109.
7. Kheradpezhoh E, Barritt GJ, Rychkov GY. Curcumin inhibits activation of TRPM2 channels in rat hepatocytes. *Redox Biol.* 2016 Apr;7:1-7. PubMed PMID: 26609559. Pubmed Central PMCID: 4683391.
8. Huang Y, Mucke L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell* 2012 Mar 16;148(6):1204-22. PubMed PMID: 22424230. Pubmed Central PMCID: 3319071.
9. Demuro A, Parker I, Stutzmann GE. Calcium Signaling and Amyloid Toxicity in Alzheimer Disease. *J Biol Chem* 2010 Apr 23;285(17):12463-8. PubMed PMID: WOS:000276787800001. English.

10. Yamamoto S, Wajima T, Hara Y, Nishida M, Mori Y. Transient receptor potential channels in Alzheimer's disease. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* 2007 Aug;1772(8):958-67. PubMed PMID: WOS:000249187400016. English.
11. Cole GM, Teter B, Frautschy SA. Neuroprotective effects of curcumin. *Adv Exp Med Biol* 2007;595:197-212. PubMed PMID: 17569212. Pubmed Central PMCID: 2527619.
12. Wimo AP, M. World Alzheimer Report 2010 The Global Economic Impact of Dementia. Alzheimer's Disease International: The International Federation of Alzheimer's Disease and Related Disorders Societies, 2010.
13. Hanns Hippus MGN, MD. The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues in Clinical Neuroscience* 2003;5(1):101-8.
14. Berchtold NC, Cotman CW. Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer's disease: Greco-Roman period to the 1960s. *Neurobiol Aging*. 1998 May-Jun;19(3):173-89. PubMed PMID: WOS:000074451400002. English.
15. Selkoe DJ. Alzheimer's disease: Genes, proteins, and therapy. *Physiological Reviews*. 2001 Apr;81(2):741-66. PubMed PMID: WOS:000167638300006. English.
16. Terry RD. Alzheimer's disease and the aging brain. *J Geriatr Psych Neur* 2006 Sep;19(3):125-8. PubMed PMID: WOS:000240020900002. English.
17. Hardy JH, G. A. Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis. *Science* 1992;256:184-5.
18. Kim S, Jensen JR, Cisek K, Funk KE, Naphade S, Schafer K, et al. Imaging as a Strategy for Premortem Diagnosis and Staging of Tauopathies. *Curr Alzheimer Res* 2010 May;7(3):230-4. PubMed PMID: WOS:000276412800009. English.
19. Holtzman DM, Morris JC, Goate AM. Alzheimer's Disease: The Challenge of the Second Century. *Science Translational Medicine* 2011 Apr 6;3(77). PubMed PMID: WOS:000292975500004. English.
20. Han SH, Park JC, Mook-Jung I. Amyloid beta-interacting partners in Alzheimer's disease: From accomplices to possible therapeutic targets.

- Prog Neurobiol 2016 Feb;137:17-38. PubMed PMID: WOS:000386104300002. English.
21. Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. Lancet 2006 Jul-Aug;368(9533):387-403. PubMed PMID: WOS:000239441900033. English.
  22. Karch CM, Goate AM. Alzheimer's Disease Risk Genes and Mechanisms of Disease Pathogenesis. Biol Psychiat 2015 Jan 1;77(1):43-51. PubMed PMID: WOS:000346082600010. English.
  23. Hardy J. Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis: An update and reappraisal. J Alzheimers Dis 2006;9:151-3. PubMed PMID: WOS:000208999500017. English.
  24. Yu LP, Edalji R, Harlan JE, Holzman TF, Lopez AP, Labkovsky B, et al. Structural Characterization of a Soluble Amyloid beta-Peptide Oligomer. Biochemistry 2009 Mar 10;48(9):1870-7. PubMed PMID: WOS:000263896100004. English.
  25. Stoothoff WH, Johnson GVW. Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease 2005 Jan 3;1739(2-3):280-97. PubMed PMID: WOS:000226120400019. English.
  26. Masters CL, Cappai R, Barnham KJ, Villemagne VL. Molecular mechanisms for Alzheimer's disease: implications for neuroimaging and therapeutics. J Neurochem 2006 Jun;97(6):1700-25. PubMed PMID: WOS:000238144200014. English.
  27. Sanabria-Castro A, Alvarado-Echeverria I, Monge-Bonilla C. Molecular Pathogenesis of Alzheimer's Disease: An Update. Annals of Neurosciences 2017 Apr;24(1):46-54. PubMed PMID: WOS:000401340600008. English.
  28. Rosales-Corral S, Tan DX, Manchester L, Reiter RJ. Diabetes and Alzheimer disease, two overlapping pathologies with the same background: oxidative stress. Oxid Med Cell Longev 2015;2015:985845. PubMed PMID: 25815110. Pubmed Central PMCID: 4357132.



29. Benedikz E, Kloskowska E, Winblad B. The rat as an animal model of Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* 2009 Jun;13(6):1034-42. PubMed PMID: WOS:000267703900002. English.
30. LaFerla FM, Green KN. Animal Models of Alzheimer Disease. *Csh Perspect Med.* 2012 Nov;2(11). PubMed PMID: WOS:000314282300011. English.
31. Gotz J, Ittner LM. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurosci* 2008 Jul;9(7):532-44. PubMed PMID: WOS:000256929300013. English.
32. Chen YX, Liang ZH, Blanchard J, Dai CL, Sun SG, Lee MH, et al. A Non-transgenic Mouse Model (icv-STZ Mouse) of Alzheimer's Disease: Similarities to and Differences from the Transgenic Model (3xTg-AD Mouse). *Mol Neurobiol* 2013 Apr;47(2):711-25. PubMed PMID: WOS:000316120900022. English.
33. Hoyer S, Henneberg N, Knapp S, Lannert H, Martin E. Brain glucose metabolism is controlled by amplification and desensitization of the neuronal insulin receptor. *Neurobiology of Alzheimer's Disease* 1996;777:374-9. PubMed PMID: WOS:A1996BF30Z00054. English.
34. Barilar JO, Knezovic A, Grunblatt E, Riederer P, Salkovic-Petrisic M. Nine-month follow-up of the insulin receptor signalling cascade in the brain of streptozotocin rat model of sporadic Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2015 Apr;122(4):565-76. PubMed PMID: WOS:000352295900009. English.
35. Salkovic-Petrisic M, Knezovic A, Hoyer S, Riederer P. What have we learned from the streptozotocin-induced animal model of sporadic Alzheimer's disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer's research. *J Neural Transm* 2013 Jan;120(1):233-52. PubMed PMID: WOS:000313043900024. English.
36. Grieb P. Intracerebroventricular Streptozotocin Injections as a Model of Alzheimer's Disease: in Search of a Relevant Mechanism. *Mol Neurobiol* 2016 Apr;53(3):1741-52. PubMed PMID: WOS:000372263600030. English.
37. Correia SC, Santos RX, Santos MS, Casadesus G, Lamanna JC, Perry G, et al. Mitochondrial abnormalities in a streptozotocin-induced rat

- model of sporadic Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2013 May 01;10(4):406-19. PubMed PMID: 23061885.
38. Kheradpezhoh E. *The Role of TRPM2 Channels in Oxidative Stress Induces Liver Damage: University of Adelaide; 2014.*
  39. Nazıroğlu MÖ, C. . Nörolojik hücrelerde TRPM2 katyon kanallarının moleküler mekanizmalardaki rolleri. *Journal of Experimental and Clinical Medicine* 2010;27:144-51.
  40. Olah ME, Jackson MF, Li HB, Perez Y, Sun HS, Kiyonaka S, et al. Ca<sup>2+</sup>-dependent induction of TRPM2 currents in hippocampal neurons. *J Physiol-London* 2009 Mar 1;587(5):965-79. PubMed PMID: WOS:000263759800004. English.
  41. Fonfria E, Marshall ICB, Boyfield I, Skaper SD, Hughes JP, Owen DE, et al. Amyloid beta-peptide(1-42) and hydrogen peroxide-induced toxicity are mediated by TRPM2 in rat primary striatal cultures. *J Neurochem* 2005 Nov;95(3):715-23. PubMed PMID: WOS:000232493900011. English.
  42. Ostapchenko VG, Chen MA, Guzman MS, Xie YF, Lavine N, Fan J, et al. The Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) Channel Contributes to beta-Amyloid Oligomer-Related Neurotoxicity and Memory Impairment. *J Neurosci* 2015 Nov 11;35(45):15157-69. PubMed PMID: WOS:000366054200018. English.
  43. Rahimi HR, Nedaenia R, Sepehri Shamloo A, Nikdoust S, Kazemi Oskuee R. Novel delivery system for natural products: Nano-curcumin formulations. *Avicenna J Phytomed* 2016 Jul-Aug;6(4):383-98. PubMed PMID: 27516979. Pubmed Central PMCID: 4967834.
  44. Bala K, Tripathy BC, Sharma D. Neuroprotective and anti-ageing effects of curcumin in aged rat brain regions. *Biogerontology* 2006 Apr;7(2):81-9. PubMed PMID: 16802111.
  45. Agrawal R, Mishra B, Tyagi E, Nath C, Shukla R. Effect of curcumin on brain insulin receptors and memory functions in STZ (ICV) induced dementia model of rat. *Pharmacol Res* 2010 Mar;61(3):247-52. PubMed PMID: 20026275.

46. Belkacemi A, Doggui S, Dao L, Ramassamy C. Challenges associated with curcumin therapy in Alzheimer disease. *Expert Rev Mol Med* 2011 Nov 04;13:e34. PubMed PMID: 22051121.
47. Zhang C, Browne A, Child D, Tanzi RE. Curcumin decreases amyloid-beta peptide levels by attenuating the maturation of amyloid-beta precursor protein. *J Biol Chem* 2010 Sep 10;285(37):28472-80. PubMed PMID: 20622013. Pubmed Central PMCID: 2937872.
48. Alzet. [cited 2016 11.12.2016]. Available from: [http://www.alzet.com/products/guide\\_to\\_use/cfs\\_preparation.html](http://www.alzet.com/products/guide_to_use/cfs_preparation.html).
49. Dehghani Dolatabadi HR, Reisi P, Alaei H, Azizi Malekabadi H, Pilehvarian AA. Folic Acid and coenzyme q10 ameliorate cognitive dysfunction in the rats with intracerebroventricular injection of streptozotocin. *Iran J Basic Med Sci* 2012 Mar;15(2):719-24. PubMed PMID: 23493655. Pubmed Central PMCID: 3586880.
50. Thiyagarajan M, Sharma SS. Neuroprotective effect of curcumin in middle cerebral artery occlusion induced focal cerebral ischemia in rats. *Life Sci* 2004 Jan 9;74(8):969-85. PubMed PMID: WOS:000187676200002. English.
51. Isik AT, Celik T, Ulusoy G, Ongoru O, Elibol B, Doruk H, et al. Curcumin ameliorates impaired insulin/IGF signalling and memory deficit in a streptozotocin-treated rat model. *Age* 2009 Mar;31(1):39-49. PubMed PMID: WOS:000263644800004. English.
52. Khan MB, Khan MM, Khan A, Ahmed ME, Ishrat T, Tabassum R, et al. Naringenin ameliorates Alzheimer's disease (AD)-type neurodegeneration with cognitive impairment (AD-TNDCI) caused by the intracerebroventricular-streptozotocin in rat model. *Neurochem Int* 2012 Dec;61(7):1081-93. PubMed PMID: 22898296.
53. Paxinos GW, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 3 ed: Academic Press; 1997.
54. Paxinos GW, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 3 ed: Academic Press; 1997.
55. Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature*

- protocols 2006;1(2):848-58. PubMed PMID: 17406317. Pubmed Central PMCID: 2895266.
56. Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 1982 Jun 24;297(5868):681-3. PubMed PMID: 7088155.
  57. Tuzcu M, Baydas G. Effect of melatonin and vitamin E on diabetes-induced learning and memory impairment in rats. *Eur J Pharmacol* 2006 May 10;537(1-3):106-10. PubMed PMID: 16626697.
  58. Thompson JH, Richter WR. Hemotoxylin-eosin staining adapted to automatic tissue processing. *Stain technology* 1960 May;35:145-8. PubMed PMID: 13855059.
  59. Salama A, Hegazy R, Hassan A. Intranasal Chromium Induces Acute Brain and Lung Injuries in Rats: Assessment of Different Potential Hazardous Effects of Environmental and Occupational Exposure to Chromium and Introduction of a Novel Pharmacological and Toxicological Animal Model. *Plos One* 2016 Dec 20;11(12). PubMed PMID: WOS:000392842900068. English.
  60. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical biochemistry* 1978 May;86(1):271-8. PubMed PMID: 655387.
  61. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics* 1959 May;82(1):70-7. PubMed PMID: 13650640.
  62. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem.* 1988 Mar;34(3):497-500. PubMed PMID: 3349599.
  63. Hiller A, Greif RL, Beckman WW. Determination of protein in urine by the biuret method. *J Biol Chem* 1948 Dec;176(3):1421-9. PubMed PMID: 18098591.
  64. Mayer G, Nitsch R, Hoyer S. Effects of changes in peripheral and cerebral glucose metabolism on locomotor activity, learning and memory in adult male rats. *Brain Res* 1990 Nov 05;532(1-2):95-100. PubMed PMID: 2149302.

65. Mehla J, Pahuja M, Gupta YK. Streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's disease: selection of appropriate dose. *J Alzheimers Dis* 2013;33(1):17-21. PubMed PMID: 22886014.
66. Ishrat T, Hoda MN, Khan MB, Yousuf S, Ahmad M, Khan MM, et al. Amelioration of cognitive deficits and neurodegeneration by curcumin in rat model of sporadic dementia of Alzheimer's type (SDAT). *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 2009 Sep;19(9):636-47. PubMed PMID: 19329286.
67. Rinwa P, Kaur B, Jaggi AS, Singh N. Involvement of PPAR-gamma in curcumin-mediated beneficial effects in experimental dementia. *N-S Arch Pharmacol* 2010 Jun;381(6):529-39. PubMed PMID: WOS:000277644200005. English.
68. Kosaraju J, Gali CC, Khatwal RB, Dubala A, Chinni S, Holsinger RM, et al. Saxagliptin: a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor ameliorates streptozotocin induced Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 2013 Sep;72:291-300. PubMed PMID: 23603201.
69. Ejaz Ahmed M, Khan MM, Javed H, Vaibhav K, Khan A, Tabassum R, et al. Amelioration of cognitive impairment and neurodegeneration by catechin hydrate in rat model of streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's type. *Neurochem Int* 2013 Mar;62(4):492-501. PubMed PMID: 23411413.
70. Togashi K, Hara Y, Tominaga T, Higashi T, Konishi Y, Mori Y, et al. TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. *Embo J* 2006 May 3;25(9):1804-15. PubMed PMID: WOS:000237589900002. English.
71. Yamamoto S, Shimizu S, Kiyonaka S, Takahashi N, Wajima T, Hara Y, et al. TRPM2-mediated Ca(2+) influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. *Nat Med* 2008 Jul;14(7):738-47. PubMed PMID: WOS:000257452700021. English.
72. Sumoza-Toledo A, Penner R. TRPM2: a multifunctional ion channel for calcium signalling. *J Physiol-London* 2011 Apr 1;589(7):1515-25. PubMed PMID: WOS:000288959800005. English.

73. Hara Y, Wakamori M, Ishii M, Maeno E, Nishida M, Yoshida T, et al. LTRPC2 Ca<sup>2+</sup>-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol Cell* 2002 Jan;9(1):163-73. PubMed PMID: WOS:000173387300019. English.
74. Blenn C, Wyrsh P, Bader J, Bollhalder M, Althaus FR. Poly(ADP-ribose)glycohydrolase is an upstream regulator of Ca<sup>2+</sup> fluxes in oxidative cell death. *Cell Mol Life Sci* 2011 Apr;68(8):1455-66. PubMed PMID: WOS:000288798800014. English.
75. Chung KKH, Freestone PS, Lipski J. Expression and functional properties of TRPM2 channels in dopaminergic neurons of the substantia nigra of the rat. *J Neurophysiol* 2011 Dec;106(6):2865-75. PubMed PMID: WOS:000298345000008. English.
76. Chen MM. Contribution of TRPM2 to Memory Loss in an Alzheimer's Mouse Model: The University of Western Ontario; 2013.
77. Boutajangout A, Boom A, Leroy K, Brion JP. Expression of tau mRNA and soluble tau isoforms in affected and non-affected brain areas in Alzheimer's disease. *Febs Lett* 2004 Oct 8;576(1-2):183-9. PubMed PMID: WOS:000224607800037. English.
78. Chen J, Yu JT, Wojta K, Wang HF, Zetterberg H, Blennow K, et al. Genome-wide association study identifies MAPT locus influencing human plasma tau levels. *Neurology* 2017 Feb 14;88(7):669-76. PubMed PMID: WOS:000397344500014. English.
79. Khuwaja G, Khan MM, Ishrat T, Ahmad A, Raza SS, Ashafaq M, et al. Neuroprotective effects of curcumin on 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonism in rats: Behavioral, neurochemical and immunohistochemical studies. *Brain Res* 2011 Jan 12;1368:254-63. PubMed PMID: WOS:000286849900027. English.
80. Wang YJ, Pan MH, Cheng AL, Lin LI, Ho YS, Hsieh CY, et al. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J Pharmaceut Biomed* 1997 Aug;15(12):1867-76. PubMed PMID: WOS:A1997XR34300010. English.
81. Khurana S, Jain S, Mediratta PK, Banerjee BD, Sharma KK. Protective role of curcumin on colchicine-induced cognitive

- dysfunction and oxidative stress in rats. *Human & experimental toxicology* 2012 Jul;31(7):686-97. PubMed PMID: 22262262.
82. Lim GP, Chu T, Yang FS, Beech W, Frautschy SA, Cole GM. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *J Neurosci* 2001 Nov 1;21(21):8370-7. PubMed PMID: WOS:000171608600016. English.
83. Awasthi H, Tota S, Hanif K, Nath C, Shukla R. Protective effect of curcumin against intracerebral streptozotocin induced impairment in memory and cerebral blood flow. *Life Sci* 2010 Jan 16;86(3-4):87-94. PubMed PMID: WOS:000273833200003. English.
84. Huang HC, Zheng BW, Guo Y, Zhao J, Zhao JY, Ma XW, et al. Antioxidative and Neuroprotective Effects of Curcumin in an Alzheimer's Disease Rat Model Co-Treated with Intracerebroventricular Streptozotocin and Subcutaneous D-Galactose. *J Alzheimers Dis* 2016;52(3):899-911. PubMed PMID: WOS:000377137500012. English.
85. Zhang C, Browne A, Child D, Tanzi RE. Curcumin Decreases Amyloid-beta Peptide Levels by Attenuating the Maturation of Amyloid-beta Precursor Protein. *J Biol Chem* 2010 Sep 10;285(37):28472-80. PubMed PMID: WOS:000281594000010. English.
86. Brondino N, Re S, Boldrini A, Cuccomarino A, Lanati N, Barale F, et al. Curcumin as a Therapeutic Agent in Dementia: A Mini Systematic Review of Human Studies. *Sci World J* 2014. PubMed PMID: WOS:000330669100001. English.
87. Hill K, Benham CD, McNulty S, Randall AD. Flufenamic acid is a pH-dependent antagonist of TRPM2 channels. *Neuropharmacology* 2004 Sep;47(3):450-60. PubMed PMID: WOS:000223235600015. English.
88. Hill K, McNulty S, Randall AD. Inhibition of TRPM2 channels by the antifungal agents clotrimazole and econazole. *N-S Arch Pharmacol* 2004 Oct;370(4):227-37. PubMed PMID: WOS:000225089300001. English.

89. Bari MR, Akbar S, Eweida M, Kuhn FJP, Gustafsson AJ, Luckhoff A, et al. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Ca<sup>2+</sup>influx and its inhibition by N-(p-aminocinnamoyl) anthranilic acid in the beta-cells: involvement of TRPM2 channels. *J Cell Mol Med* 2009 Sep;13(9B):3260-7. PubMed PMID: WOS:000274179300027. English.





## **EKLER**

### **EK.1. ÖZGEÇMİŞ**

#### **Kişisel Bilgiler**

Adı Soyadı: Merve Durhan

Doğum Yeri: Malatya

Doğum Tarihi: 23.03.1990

İletişim: mervedurhan@windowlive.com

#### **Eğitim Bilgileri**

2014-2017: İnönü Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans

2012-2008: İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik (%100 Burslu), Lisans

2004-2008: Malatya Anadolu Lisesi

## EK.2. DENEY HAYVANLARI ETİK KURUL KARARI



**İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI**

Toplantı Tarihi : 03-06-2016  
Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya  
Araştırma Protokol no.su : 2016/A-80  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Türü : Wistar  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Soyü :  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : E D Farketmez  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 50 Adet  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı : 12 ay/225-275 g

Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. Yılmaz Çiğremiş'in yürüttüğü "İntraserebroventriküler Streptozotosin Uygulamasıyla Oluşturulan Deneysel Alzheimer Sıçan Modelinde Kurkumin'in Beyin TRPM2 Kanal Protein Geni İfadesi ve Seviyesine Etkisi" isimli 2016/A-80 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneş Hayvanları Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verildi.

Doç.Dr.M.Arif ALADAĞ  
Başkan

Prof. Dr. Nigar VARDI  
Üye

Prof. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ  
Üye

Vet.Hek.M.Zafer BOZDAĞ  
Üye

Yrd.Doç.Dr.Mehmet KARATAŞ  
Üye

Yrd.Doç.Dr. Mustafa KARAKAPLAN  
Üye

Salih AVCI  
Sivil Üye

Ahmet GÖNÜLLÜOĞLU  
Sivil Üye

## EK.3. ETİK KURUL ONAY BELGESİ



T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
Tıp Fakültesi

Deney Hayvanları Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 60161673

Konu : 2016/A-80 nolu çalışma

MALATYA

13 / 07 / 2017

Sayın: Prof. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ  
Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD

2016/A-80 protokol nolu "İntraserebroventriküler Streptozotosin Uygulamasıyla Oluşturulan Deneysel Alzheimer Sıçan Modelinde Kurkumin'in Beyin TRPM2 Kanal Protein Geni İfadesi ve Seviyesine Etkisi" başlıklı çalışmanın başlığının "İntraserebroventriküler Streptozotosin Uygulamasıyla Oluşturulan Deneysel Alzheimer Sıçan Modelinde Kurkumin'in Beyin TRPM2 Kanal Protein Geni İfadesine Etkisi" şeklinde değiştirilmesi Etik Kurul Başkanlığı tarafınca uygun görülmüştür.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Prof. Dr. Davut ÖZBAĞ  
Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanı



## EK.5

Sıçan *TRPM2* geninin 4555 baz çiftinden oluşan mRNA dizilimi ve primerlerin dizilimdeki yerleri gösterilmiştir. Gen Bankası Kayıt No: NM\_001011559.1

1 atggagcct tggaccagag aagaactgac tctgatcaag aggagggcct tggggtgcag  
61 tcccgagggg ccactgatct gggcatggtc cccaatctcc gacgaagcaa tagcagtctt  
121 tgcaagagca ggaggcttct gtgctccttc agcagtgaga agcaagaaaa ccttagctca  
181 tggattcccc agaacatcaa gaagaaggaa tgtgtgtatt tctggaaaag ttccaagctc  
241 tcggatcgag ggaaggtagt gtgtgagtgt ggttacaccc acgagcagca cattgaagtg  
301 gccatcaage ctcacacctt ccagggcaag gaggggacc caaagaaaca cgtccatgag  
361 atgcctacag atgccttgg tgacattgtc ttcaccggcc tgagccagaa agtggggaag  
421 tatgtccgac tctcccagga cacgtcgtcc attgtcatct accagcttat gacacagcac  
481 tggggcctgg atgtcccag cctctcctc tctgtgaccg gtggggccaa gaactcaac  
541 atgaagtga ggtgaagag catctccgg agaggcctgg ttaaggtggc ccaaacacg  
601 ggggcctgga tcatcactgg gggttccac accggtgga tgaagcaggt gggcgaggcg  
661 gtacgggact tcagcctaag cagcagctgc aaagaaggcg acgtcatcac catcggcata  
721 gccacgtggg gcaccatcca caaccgtgag gcactgatcc atccatggg aggcttcccc  
781 gctgagtaca tgctggatga ggaaggccaa gggaacctga cctgcctgga cagcaaccac  
841 tcccactca tctgtgga tgatgggacc cacgggcagt atggtgtgga gattccgctg  
901 aggactaac tgagaaagt catatcggag caaacgaagg aaagaggggg tgtggccatt  
961 aagatccca ttgtctgct ggtgtggag ggtggccctg gcactctgca taccatctac  
1021 aacgccatca ccaatggcac accctgcgtg atagtggagg gctccggccg agtggctgac  
1081 gtcctcgtc aggtggccgc tctgcccgtc tctgagatca ccatctcctt gatccagcag  
1141 aagctcagcg tcttctcca ggagatggtt gagacttca ccgaaaacca gattgtgga  
1201 tggacaaaa agatccaaga tattgtcagg aggcggcagc tgctgacgtt cttccgggaa  
1261 ggcaaggatg gtcagcagga tttggatgtt gccattctgc aagcttact gaaagcctct  
1321 cgaagccaag atcacttgg ccacgagaac tgggaccatc agctgaagct ggccgtggcc  
1381 tggaacctg tggacatgc ccgcagtgag atcttactg atgagtggca gtggaagcct  
1441 tcagactgc atccatgat gacagctgcc ctcactcca acaagcctga gtttgtgag  
1501 ctcttctgg agaacgggt gcggctgaag gagttgtca cctgggatac tcttctctg  
1561 ctctacgaga acctggagcc atctgcctt tccacagca agctgcagaa ggtgctggca  
1621 gaagagcatg aacgcttagc ctatgcatct gagacacccc ggctgcaaat gcaccacgtg  
1681 gcccaggtgc tgcgtgagct cctcggagac tccacacagc tgctgtatcc ccggccccgg  
1741 tacactgacc gcccacggct ctcgtgccc atgccacaca taaactcaa cgtgcaagga  
1801 gtgagcctcc ggtctctcta taagcatca acaggccacg ttaccttca cattgacca  
1861 gtccgcgatc ttctcattg ggccatcctc cagaaccaca gggagctggc gggcatcctc  
1921 tgggctcaga gccaggactg cacagcagcc gcactggcct gcagcaagat cctgaaggag  
1981 ctgtccaagg aggaggaaga tacagacagc tctgaggaga tgctggcact cgcggatgag  
2041 tttgagcata gagctatcgg tctctcacc gactgttaca gaaagatga gaaagagcc



4381 aacctgcaaa ctcgatgcc aaaggagtcg gcccgaggct tggagatgct tactgaatgg  
4441 caggtttag accggcggat ccctctgtat gtgaaccaca agaagatcct ccaaaggtg  
4501 gcctcgctgt ttggcgctca ctctga

**>>>>> İleri primer**

**<<<<<Geri primer**







2641 accttacaac cttgtttggt ttgctccatc atttcccatc gtggatggga gtccgtgtgt  
2701 gcctggagat taccctggac acctctgctt tttttttt acfttagcgg ttgctccta  
2761 ggctgactc cttcccatgt tgaactggag gcagccacgt taggtgtcaa tgcctgga  
2821 tcagatgaa cagtcagtag tcccaggga gggccacact tctccatct tctgctcca  
2881 cccagcttg tgattgctag cctccagag ctcagccgcc attaagtccc catgcacgta  
2941 atcagccctt catacccaa tttggggaac atacccttg attgaaatgt ttcctcca  
3001 gtccatgga agcgggtgctg cctgccctgc tggagcagcc agccatctcc agagacgcag  
3061 ccctttctct cctgtccgca cctgttgcg ctgtagtcgg attcgtctgt ttgtctgggt  
3121 tcaccagagt gactatgata gtgaaaagaa aaagaaaaag aaaaaagaaa aaagaaaaaa  
3181 aaaaaggac gcatgtatc ttgaaatatt tgcataaagg ttgtagcca ccgcagggat  
3241 tggagggcct ggatattctt tctctctc gtgacttagg tccaggccgg tgcagtgcta  
3301 cctgtctggg acatccatg tttgaaagg tttctctc atctgggacc ctgcagacac  
3361 tggatttga cattggaggt ctatgacatt ggccaaggcc tgaagcacag gacccgttag  
3421 aggcagcagg ctcgactgt caggagagc ttgtggctgg cctgtttctc tgagtgaaga  
3481 ttgtcctc taatcacaac ttcaagtccc acagcagccc tggcagacat ctaagaactc  
3541 ctgcatcaca agagaaaagg aactagtag cagcaggag agctgtgccc ctagaaatc  
3601 catgactctc cactacatc cctgggtcc ttccaagcc ttggcctcgt caccaaggcc  
3661 ttgggatgga ctgcccact gatgaaagg acatcttgg agacccctt ggttccaag  
3721 gcgtcagccc cctgacctg catgacctc tacagctgta aggatgagcc cttaaagat  
3781 taggaactc agggccaggt cggccactt gggttgggt acagttaggg acgatcggt  
3841 agaaggaggt ggccaactt tccatataa gacttctgtg tcccagagc taccattg  
3901 tgagctccc actgctgat gacttagct gtcttagaa gtgaagagc caacggagga  
3961 aaaggaagtg tggttgatg gtctgtggtc cttcatcat ggttacctgt tgggtttc  
4021 tctgtatac ccattacc atcctcagt tctgtcctt gaataggggt ggggttactc  
4081 tgccatctt ctttagggc agtcagccc caagcatag ttggagtga tctggtcagt  
4141 gctaataggc agttacaaa ggaattctgg cttgttact cagtgaggac aatcccca  
4201 gggccctggc acctgtctg ttttccatg gctctccact gcagagccaa tgccttgg  
4261 tgggctagat aggggtgaca atttgcctgg ttctccaag ctcttaatcc actttatca  
4321 tagttccatt taaattgact tcaatgataa gactgtatcc catttgagat tgcctgtgt  
4381 gtggggtaaa ggggggagga ggaacatgt aagataattg acatgggcaa ggggaagtct  
4441 tgaagttag cagttaaacc atctgtagc cccattcatg atgtgacca cttgctagag  
4501 agaagagtg ccataaggt agaacctaga ggcttggctg tcccaccaac aggcaggtt  
4561 ttgcaaggca gagcagcca gctaggtccc tgaactcca gccaggtgca gctctaagaa  
4621 ctgctctgc ctgctcctt cttgtggtg ccagagccca cagccaatgc ctctcaaaa  
4681 ccctggctc cttcttcta atccactgc acatcagcat cacctccgga ttgactcag  
4741 atccacagc tacactacta gcagtggga agaccctc cttgtcctt gtctgtctc  
4801 cagaaaagtg ggcagggag cgggtttaa aactataggt ctgtgcttt atgacctc  
4861 aaacttct ctgctctg aaagggttac tttgggcag tattgcagtc taccctccc  
4921 gatgggctg agcctgtgca gttgctgtac tggcatgat cccagctgt tcaagtccc  
4981 atgattctt tgggtattt gaggggggg ggaggacat gaatcatct agcttagct  
5041 cctgtctgt aatgtccata taggtactg tgtttaaca aacatttac actgactgt  
5101 gctgtacaag tgaattgga aataaagta ttactctgat taaacaaaa aaaaaaaa

>>>>> İleri primer

<<<<<< Geri primer