



**SIÇANLARDA DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN
ALZHEİMER PATOGENEZİ ÜZERİNE FEZ1 GEN
İFADESİ VE PİNEALEKTOMİNİN ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI**

Mehmet DEMİR

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Süleyman SANDAL
Doktora Tezi – 2016**

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

**SIÇANLARDA DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN ALZHEİMER
PATOGENEZİ ÜZERİNE FEZ1 GEN İFADESİ VE PINEALEKTOMİNİN
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

Mehmet DEMİR

**Fizyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Süleyman SANDAL**

Bu araştırma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)
tarafından 214S410 proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA
2016**

KABUL VE ONAY SAYFASI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan; **Mehmet DEMİR'in " Sıçanlarda Deneysel Olarak Oluşturulan Alzheimer Patogenezi Üzerine FEZ1 Gen İfadesi ve Pinealektominin Rolünün Araştırılması "** konulu bu çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 18/05/2016



Prof. Dr. Ahmet AYAR
Karadeniz Teknik Üniversitesi
Jüri Başkanı



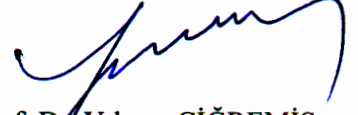
Prof. Dr. Nurettin AYDOĞDU
Trakya Üniversitesi
Üye



Prof. Dr. Sedat YILDIZ
İnönü Üniversitesi
Üye



Prof. Dr. Süleyman SANDAL
Tez Danışmanı
İnönü Üniversitesi
Üye



Prof. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ
İnönü 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/...../2016 tarih ve 2016/..... sayılı Kararıyla da uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Demans	2
2.2. Alzheimer Hastalığı	3
2.2.1. AH Patogenezi	3
2.2.2. AH'nin Klinik Seyri.....	5
2.3. AH Genetiği.....	6
2.3.1. Amiloid Prekürsör Protein	7
2.3.2. Presenilin-1 ve Presenilin-2	8
2.3.3. Apolipoprotein E.....	8
2.4. AH'nin Patolojik Biyobelirteçleri.....	10
2.4.1. Amiloid β	10
2.4.2. Tau Protein.....	11
2.4.3. Nörofibriler Yumak	14
2.5. Sirkadiyen Saat.....	15
2.6. Pineal Bez.....	16
2.7. Melatonin.....	16
2.7.1. Melatonin Sentez ve Salınımı.....	17
2.8. Mikrotübül.....	19
2.9. Fasikülasyon ve Elongasyon Protein Zeta-1	21
2.10. Monoaminler	23
2.10.1. Serotonin	24
2.10.2. Dopamin.....	25
2.10.3. Noradrenalin	27
3. MATERYAL VE METOT.....	29
3.1. Gruplardaki Hayvan Sayılarının Belirlenmesi.....	29

3.2. Denev Hayvanları ve Grupların Oluşturulması	29
3.3. Morris Su Tankı Denevleri I. Aşama	32
3.4. Uygulama ve Operasyonlar	33
3.4.1. Hazırlık	33
3.4.1.1. Yapay Beyin Omurilik Sıvısının Hazırlanması	33
3.4.1.2. STZ Çözeltisinin Hazırlanması	33
3.4.1.3. Melatonin Çözeltisinin Hazırlanması	34
3.4.2. Stereotaksik İşlem ve ICV STZ Enjeksiyonu	34
3.4.3. Pinealektomi İşlemi	36
3.5. Morris Su Tankı Denevleri II. Aşama	36
3.6. Denevin Sonlandırılarak Kan ve Dokuların Alınması	37
3.6.1. Beynin Çıkartılması	37
3.7. Analizlerin Yapılması	39
3.7.1. Serum (ELISA) Analizleri	39
3.7.1.1. Serum Noradrenalin Seviyelerinin Belirlenmesi	39
3.7.1.2. Serum Serotonin Seviyelerinin Belirlenmesi	40
3.7.1.3. Serum Dopamin Seviyelerinin ELISA Yöntemiyle Belirlenmesi	40
3.7.2. Genetik Analizler	41
3.7.2.1. Dokudan RNA Saflaştırılması	41
3.7.2.2. cDNA Sentez Protokolü	42
3.7.2.3. Gerçek Zamanlı PZR Protokolü	43
3.7.3. Western Blot Analizi	43
3.7.4. İstatistiksel Analizler	44
4. BULGULAR	45
4.1. Morris Su Tankı Test Bulguları	45
4.1.1. Uygulama ve Operasyonlar Öncesi (preop) Veriler	45
4.1.2. Uygulama ve Operasyonlar Sonrası (postop) Veriler	54
4.1.3. Probe Test Verileri ve Karşılaştırmaları	60
4.2. Biyokimyasal Analiz Bulguları	63
4.2.1. Serum Noradrenalin Seviyelerinin Analiz Bulguları	63
4.2.2. Serum Dopamin Seviyelerinin Analiz Bulguları	64
4.2.3. Serum Serotonin Seviyelerinin Analiz Bulguları	64
4.3. PZR Analiz Bulguları	65
4.4. Western Blot Analiz Bulguları	67

5. TARTIŞMA.....	70
5.1. AH-FEZ1 ile Katekolaminler (NA ve dopamin) ve Serotonin İlişkisi	70
5.2. AH-FEZ1 ile Melatonin İlişkisi	72
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	77
KAYNAKLAR	78
EK 1. ÖZGEÇMİŞ.....	100
EK 2. ETİK KURUL ONAY BELGESİ	101
EK 3. B-AKTİN GEN DİZİLİMİ	102
EK 4. FEZ1 GEN DİZİLİMİ	103



TEŐEKKÜR

Doktora tez çalışmama 214S410 no'lu proje ile maddi destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK), tez araştırmamı destekleyen, katkı ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Süleyman SANDAL'a, doktora eğitimim süresince bilgi ve desteklerini benden esirgemeyen blmmn tüm ğretim üyelerine, tez araştırmamın yapımı ve yazımı sırasında katkı ve yardımlarını esirgemeyen İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı ğretim yesi ve İnönü Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Birimi sorumlusu Prof. Dr. Yılmaz İęREMİŐ ve İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı ğretim yesi Doç. Dr. İbrahim TEKEDERELİ'ye, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı ğretim yesi Doç. Dr. Cemil ÇOLAK'a, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalından Dr. Fatma ZYALIN'a ve tez araştırmamın deneyleri sırasında katkı ve yardımlarını esirgemeyen İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı ğretim elemanı Arş. Gör. Ümit YILMAZ'a ve hayatımın her alanında benden desteğini esirgemeyen eşime ve aileme sevgi ve saygılarımı sunar, teŐekkür ederim.

Mehmet DEMİR

ÖZET

Sıçanlarda Deneysel Olarak Oluşturulan Alzheimer Patogenezine Üzerine Fez1 Gen İfadesi ve Pinealektominin Rolünün Araştırılması

Amaç: Alzheimer hastalığı (AH), klinik olarak belirgin hafıza kaybı, entelektüel işlevlerde azalma, bilişsel fonksiyonlarda bozulmalar ile senil plakların ve nörofibriler düğümlerin oluşumu gibi spesifik bir patolojiye sahip, nörodejeneratif bir beyin hastalığıdır. İmmünohistokimyasal çalışmalar, mental hastalıklar da dahil olmak üzere pek çok nörolojik hastalıkların neokorteks disfonksiyonu nedeniyle geliştiğini ve bu hastalıkların neokorteksin derin katmanlarında ifade edilen FEZ1 (Fasikülasyon ve Elongasyon Protein Zeta-1) ile ilişkili olabileceğini ortaya koymuştur. Bu çalışma, AH ve FEZ1 arasındaki muhtemel ilişkinin yanısıra aksonal taşımada önemli rolü bulunan FEZ1 ile eksitator/inhibitör sinyallerin kontrollü dengesinin düzenlenmesinde görev alan nörotransmitterler (serotonin, noradrenalin, dopamin) ve melatonin arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla yapıldı.

Materyal ve Metot: Çalışmada 220-280 g ağırlığında 60 adet erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar, sham intraserebroventriküler (ICV) kontrol, sham ICV+Pinealektomi (PnX)+intraperitoneal (i.p.) kontrol, streptozotosin (STZ), Melatonin+STZ, PnX+STZ ve Melatonin+STZ+PnX grubu olmak üzere 6 gruba (n=10) ayrıldı. Tüm hayvanlara 5 gün süreyle (3-7. günler arasında 4 tekrar olarak) Morris su tankı testleri yaptırıldı ve skorlar EthoVision XT10 Image Analysis (Noldus Information Tech.) yazılım programı yardımıyla analiz edildi. 8. günde PnX ve ICV uygulamalarına başlandı. Sıçanlara ICV STZ enjeksiyonları 8. ve 10. günlerde 3 mg/kg olarak yapıldı. Sıçanlara STZ uygulamasından hemen önce PnX yapıldı. Melatonin uygulamalarına (i.p. olarak 10 mg/kg/gün), ilk doz STZ uygulamasından 1 saat önce başlandı ve 14 gün süreyle devam edildi. İlk STZ uygulamasından 14 gün sonra davranış testlerine tekrar başlandı ve 5 gün süreyle devam edildi. Davranış deneyleri sonunda hayvanlar dekapitasyonla öldürüldü, kan ve hipokampus dokuları toplandı. Alınan kan örneklerinden ELISA (Enzyme-linked immuno sorbent assay) yöntemiyle serum serotonin, noradrenalin ve dopamin seviyeleri belirlendi. Hipokampus dokusundan da PZR (Polimeraz zincir reaksiyonu) ile FEZ1 gen ifadesi ve Western blot yöntemi ile de FEZ1 protein seviyeleri ölçüldü.

Bulgular: ICV STZ grubunda FEZ1 ifadesinin her iki sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği belirlendi ($p<0.05$). ICV STZ+MLT grubunun FEZ1 seviyelerinin sham grupları seviyelerine yakın olduğu ve ICV STZ+PnX+MLT grubu FEZ1 değerlerinin ise ICV STZ+PnX grubundan ve hatta sham gruplarından bile istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu tespit edildi ($p<0.05$). Gruplar arası serum dopamin ve serotonin seviyelerinde bir farklılık gözlenmezken, noradrenalin seviyelerinin kontrollere göre daha düşük olduğu belirlendi ($p<0.05$).

Sonuç: Çalışma sonuçları deneysel Alzheimer modeli oluşturulan sıçanlarda FEZ1 seviyelerinin yüksek olduğunu, melatonin uygulamasının bu artışı geri çevirdiğini ortaya koydu.

Anahtar Kelimeler: FEZ1, Alzheimer hastalığı, pinealektomi, melatonin, serotonin, dopamin, noradrenalin, sıçan

ABSTRACT

Investigation of the FEZ1 gene expression and the role of pinealectomy on the pathogenesis of Alzheimer produced experimentally in rats

Aim: The Alzheimer Disease (AD) is a neuro-degenerative brain disease that has a specific pathology such as the formation of senile plaque, neurofibrillary tangles, and clinical symptoms such as memory loss, decrease in intellectual functions and failures in cognitive functions. Immunohistochemical studies have shown that many neurologic diseases, including mental diseases, develop due to neocortex dysfunction, and these diseases may be related with the FEZ1 (Fasciculation and Elongation Protein Zeta-1) expressed in the deeper layers of the neocortex. This study was designed to determine the possible relation between the AD and FEZ1 and the neurotransmitters (serotonin, noradrenaline, dopamine) and melatonin have an important role in axonal transfer and regulating the controlled balance of the excitator/inhibitor signals.

Material and Method: 60 male rats weighing 220-280 gr will be used in the study. The rats were divided into 6 groups (n= 10), which are: sham intra-cerebro-ventricular (ICV) control, sham ICV+Pinealectomy (PnX)+intraperitoneal (i.p.) control, streptozotocin (STZ), Melatonin+STZ, PnX+STZ and Melatonin+STZ+PnX group. The Morris water tank tests was applied to all animals for 5 days (between the 3-7. days, 4 recurrences), and the scores were analyzed with a software program ((EthoVision XT10 Image Analysis). On the 8th day, the PnX and ICV applications were start. The ICV STZ injections were applied to the rats on the 8th and 10th days as 3 mg/kg. The PnX process was applied to the rats before the STZ application. Melatonin applications (as i.p. 10 mg/kg/day) were started 1 hour before the first dose of STZ application, and was continued for 14 days. 14 days after the first STZ application, the behavioral tests were applied for 5 days, again. In the end of behavioral tests, the rats were sacrificed and their blood and hippocampus tissues were collected. The serum serotonin, noradrenaline and dopamine levels were determined with the ELISA (Enzyme-linked immuno sorbent assay) method. The hippocampus area from the brain will be divided into two portions. The FEZ1 gene expression were determined with PCR (Polymerase Chain Reaction) and protein levels of FEZ1 were measured via Western Blot method.

Results: In the ICV STZ group, the levels of FEZ1 were found higher than both sham groups ($p < 0.05$). While the levels of FEZ1 in the ICV STZ+MLT group were similar to sham groups, the levels of FEZ1 in the ICV STZ+PnX+MLT group were found to be lower than ICV STZ+PnX and even sham groups ($p < 0.05$). While no statistically significant differences were observed between the groups in terms of serum dopamine and serotonin levels, the noradrenaline levels of all experiment groups were found to be lower than that of sham groups ($p < 0.05$).

Conclusion: Study results demonstrated that FEZ1 levels were to be high in the rat models of Alzheimer's Disease and these increases in FEZ1 levels were turned back by melatonin.

Keywords: FEZ1, Alzheimer's disease, pinealectomy, melatonin, serotonin, dopamine, noradrenaline, rat

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
ApoE	: Apolipoprotein E
APP	: Amiloid prekürsör protein
Aβ	: Amiloid β
Aβ40	: Amiloid beta-40 proteini
Aβ42	: Amiloid beta-42 proteini
cAMP	: Siklik adenzin monofosfat
cDNA	: Komplementer DNA
DISC1	: Disrupted In Schizophrenia 1
ELISA	: Enzyme-linked immuno sorbent assay
EBAH	: Erken-Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı
FEZ1	: Fasikülasyon ve Elongasyon protein zeta-1
GBAH	: Geç-Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı
g	: Gram
ICV	: İntraserebroventriküler
ip	: İntraperitoneal
JIP1	: Jun N-terminal kinaz (JNK)-etkileşim protein 1
kg	: Kilogram
LCD	: Lewy cisimli demans
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
MSS	: Merkezi sinir sistemi
NA	: Noradrenalin
NFY	: Nörofibriler yumak
ng	: Nanogram
pg	: Pikogram
PnX	: Pinealektomi
PSEN1	: Presenilin-1
PSEN2	: Presenilin-2
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu

SF : Serum fizyolojik
SKN : Suprakiazmatik çekirdek
STZ : Streptozotozin
yBOS : Yapay beyin omurilik sıvısı



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. 65 yaş üstü bireylerde görülen Demans tipleri ve oranları	2
Şekil 2.2. Nörofibriler Yumaklar	3
Şekil 2.3. Amiloid plaklar	4
Şekil 2.4. AH'nin beyinde yayılma süreci	5
Şekil 2.5. Bilinen ve farazi AH genlerinin katkı ve etkileşimleri.....	6
Şekil 2.6. Sağlıklı beyin ve AH patogenezinde ApoE izoformlarının rolleri.....	9
Şekil 2.7. Amiloidojenik ve non-amiloidojenik mekanizmalar	11
Şekil 2.8. Tau ve mikrotübülün görünüşü.....	12
Şekil 2.9. Tau izoformlarının diziliş motifleri.....	13
Şekil 2.10. Taunun düzenleyici görevleri	13
Şekil 2.11. Tau-mikrotübül oluşum hipotezi	15
Şekil 2.12. Melatoninin kimyasal yapısı	17
Şekil 2.13. Melatonin sentez basamakları	18
Şekil 2.14. Kinesin, dinein ve aksonal taşıma	20
Şekil 2.15. Kinesin otoinhibisyon mekanizması	21
Şekil 2.16. Bağlanma ortaklarına göre FEZ1 fonksiyonları	22
Şekil 2.17. Otoinhibisyon mekanizması, FEZ1 ve JIP1	23
Şekil 2.18. Serotoninin kimyasal yapısı	24
Şekil 2.19. Dopaminin kimyasal yapısı	25
Şekil 2.20. Dopamin ve Noradrenalin sentez basamakları	27
Şekil 2.21. Noradrenalin kimyasal yapısı	28
Şekil 3.1. Deneysel araştırma planı	31
Şekil 3.2. Morris su tankı ve tankın üstten kamera görüntüsü.....	32
Şekil 3.3. Kafa derisine insizyon yapılması (A) ve periostun sıyrılması (B)	34
Şekil 3.4. Bregma noktasının görünüşü (A) ve lateral ventriküllerin koordinatlarının belirlenmesi (B).....	35
Şekil 3.5. Kafatası kemiğinin matkapla delinmesi (A) ve ventrikül içerisine STZ enjeksiyonu yapılması (B).....	35
Şekil 3.6. Lambda noktası (A), pinealektomi yapılacak bölgenin delinmesi (B) ve çıkarılan pineal bez (C)	36

Şekil 3.7. Kafatası üzerindeki deri ve kas tabakalarının kesilmesi.....	37
Şekil 3.8. Kafatası kemiğinin kesilmesi.....	37
Şekil 3.9. Kesilen kafatası kemiğinin kaldırılması ve beynin çıkarılması.....	38
Şekil 3.10. Hipokampus bölgesinin çıkarılması	39
Şekil 3.11. Her bir gruba ait beyin doku örneklerinden saflaştırılan RNA'lar	42
Şekil 4.1. Preop 5 günlük yüzdürme testlerinde ortalama platform mesafeleri.....	51
Şekil 4.2. Preop 5 günlük yüzdürme testlerinde platformu bulma süreleri	51
Şekil 4.3. Preop 5 günlük yüzdürme testlerinde kadran frekansları	52
Şekil 4.4. Preop 5 günlük yüzdürme testlerinde kadran süreleri	52
Şekil 4.5. Preop 5 günlük yüzdürme testlerinde kadran süresi yüzdeleri	53
Şekil 4.6. Preop platformun yerini öğrenmiş sıçanlarının haritaları	53
Şekil 4.7. Postop 5 günlük yüzdürme testlerinde ortalama platform mesafeleri	55
Şekil 4.8. Postop 5 günlük yüzdürme testlerinde yüzme süreleri.....	56
Şekil 4.9. Postop 5 günlük yüzdürme testlerinde kadran frekansları.....	57
Şekil 4.10. Postop 5 günlük yüzdürme testlerinde kadran süreleri.....	58
Şekil 4.11. Postop 5 günlük yüzdürme testlerinde kadran süresi yüzdeleri	59
Şekil 4.12. Sıçanların preop probe test ısı haritaları	61
Şekil 4.13. Sıçanların postop probe test ısı haritaları	61
Şekil 4.14. β -aktin ve FEZ1 cDNA'larının gerçek zamanlı PZR ile çoğaltım eğrisi	65
Şekil 4.15. β -aktin ve FEZ1 cDNA'larının PZR'deki çoğaltımının agaroz jel (%2) elektroforezi görüntüsü	66
Şekil 4.16. Tüm grupların FEZ1/ β -aktin mRNA oranları	67
Şekil 4.17. Tüm grupların FEZ1/ β -aktin oranları	69

TABLolar DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 2.1. AH ile ilişkili genler	7
Tablo 3.1. Yapay beyin omurilik sıvısının içerdiği bileşikler ve miktarları	33
Tablo 3.2. β -Aktin ve FEZ1 genine ait primer dizilimleri	43
Tablo 4.1. Tüm grupların 5 günlük preop ve postop ortalama platform mesafe (cm) verilerinin günlere göre ve birbiriyle karşılaştırılması	46
Tablo 4.2. Tüm grupların 5 günlük preop ve postop platformu bulma süre (sn) verilerinin günlere göre ve birbiriyle karşılaştırılması	47
Tablo 4.3. Tüm grupların 5 günlük preop ve postop kadran süre (sn) verilerinin günlere göre ve birbiriyle karşılaştırılması	48
Tablo 4.4. Tüm grupların 5 günlük preop ve postop kadran frekans verilerinin günlere göre ve birbiriyle karşılaştırılması	49
Tablo 4.5. Tüm grupların 5 günlük preop ve postop kadran süresi yüzde (%) verilerinin birbiriyle karşılaştırılması	50
Tablo 4.11. Probe test uygulamasında preop ve postop kadran frekanslarının karşılaştırılması	60
Tablo 4.12. Probe test uygulamasında preop ve postop kadran sürelerinin karşılaştırılması	62
Tablo 4.13. Tüm deney gruplarındaki serum Noradrenalin seviyeleri	63
Tablo 4.14. Tüm deney gruplarındaki serum Dopamin seviyeleri	64
Tablo 4.15. Tüm deney gruplarındaki serum Serotonin seviyeleri	64
Tablo 4.16. Tüm grupların FEZ1/ β -aktin mRNA oranlarının karşılaştırılması	66
Tablo 4.17. Tüm grupların FEZ1/ β -aktin oranlarının karşılaştırılması	68

1. GİRİŞ

Yüzyılımızın önemli sağlık sorunlarından birisi olan Alzheimer Hastalığı (AH), 65 yaş üzeri insanlar arasında en yaygın ölüm nedenleri arasında dördüncü sırada bulunmaktadır (1). AH ve diğer demansların, yaşlanan dünya popülasyonu ile 2030 yılına kadar 66 milyona; 2050 yılına kadar ise 115 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (2). AH, ilerleyici nöron ve sinaps kaybı ile karakterize edilen (3), nörofibriler yumaklar olarak adlandırılan hiperfosforile tau proteinlerinin kümelenmesi ve amiloid plak (AP) olarak adlandırılan amiloid β peptid ($A\beta$)'lerin birikimi gibi patofizyolojik lezyonlar gözlenen bir hastalıktır (4). Klinik olarak, bilişsel işlevlerde ilerleyici tarzda bir kayıp, takiben demans ve ölüm ile karakterize bir durum olarak tanımlanırken, patolojik olarak $A\beta$ 'lerin ekstrasellüler; hiperfosforile tau proteinlerin ise intrasellüler birikimi ve nöronal ölüm şeklinde tanımlanmaktadır (5, 6).

Aksonal büyüme ve uzama için gerekli olan FEZ1 beyinde ifade edilen bir proteindir (7). İmmünohistokimyasal çalışmalar, mental hastalıklar da dahil olmak üzere pek çok nörolojik hastalıkların neokorteks disfonksiyonu nedeniyle geliştiğini ve bu hastalıkların neokorteksin derin katmanlarında ifade edilen FEZ1 ile ilişkili olabileceğini ortaya koymuştur (8). FEZ1 mRNA'sının, yetişkin sıçan beyninin hipokampus, olfaktör bulbus, dentat girus ve serebellar korteks kısımlarında güçlü sinyaller verdiği gösterilmiştir (9). Şimdiye kadar bildirilen çalışma sonuçları FEZ1'in, nöronal gelişim, nöropatiler ve viral enfeksiyonlar ile ilişkili olduğunu göstermesine rağmen son zamanlarda proteomik teknikler kullanılarak yapılan çalışmaların sonuçları, FEZ1'in hücre motor proteinleri ve sinyal iletimi gibi çeşitli hücre içi olaylarla ilişkisinin olabileceğini düşündürmektedir (10).

Bu çalışma FEZ1 ile AH ile arasındaki ilişkinin belirlenmesi ve bu ilişkide melatoninin rolünün ne olduğunun ortaya konulması amacıyla yapılmıştır. Ayrıca AH oluşumunda önemli olduğu düşünülen serotonin, dopamin ve noradrenalin (NA) gibi nörotransmitterler ile FEZ1 arasındaki ilişkinin gösterilmesi de çalışmanın amaçları arasındadır.

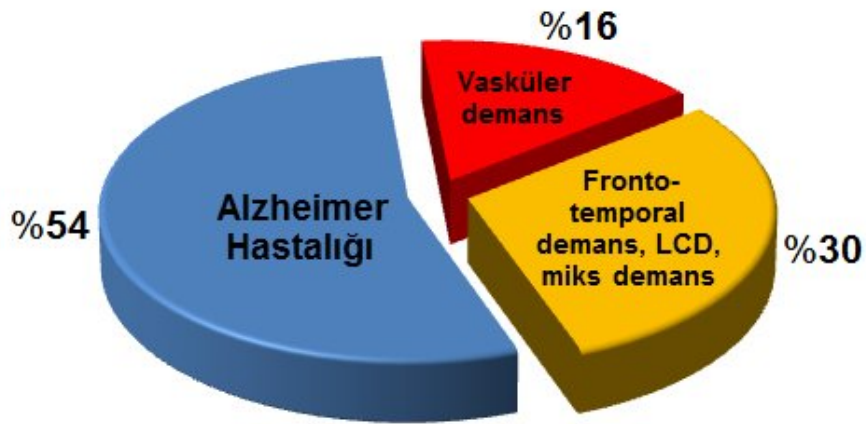
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Demans

Demans dünya çapında her yıl tahmini olarak 4.6 milyon yeni vaka ile epidemik oranlara ulaşmış, yetişkin ve yaşlı nüfusu etkileyen (11), beyinde birçok patolojik bozukluğun artan yükünün klinik olarak gözlemlenebilir bir sonucudur. 65 yaş üstü bireylerdeki görülme oranları Şekil 2.1’de sunulan demans tiplerinden en fazla rastlanana AH’dır (12). Demansın ileri yaşlarda birden fazla patolojik durumu yansıttığı, nöropatolojik çalışmalarda açık bir şekilde görülmektedir (13).

Lewy cisimli demans (LCD), AH'den sonra dejeneratif demansın ikinci en sık görülen tipidir. LCD, klinik ve patolojik olarak Parkinson Hastalığı ve demansı ile ilişkilidir. Yine Parkinson Hastalığı demansı ve LCD’nin klinik özellikleri benzerlik göstermektedir (14). Parkinson Hastalığı demansı ve LCD , α -sinüklein içeren Lewy cisimleri ve Lewy nöritlerinin varlığı ile karakterizedir. Ancak her iki demans da AH patolojisinin çeşitli aşamalarında (AP ve nörofibriler yumaklar (NFY)), özellikle yüksek bilişsel fonksiyonlarla ilişkili korteks bölgelerinde ortaya çıkarlar (15). Ayrıca Lewy cisimleri sıklıkla Geç-Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı (GBAH) patolojisine eşlik ederler (16).

Vasküler Demans ise serebrovasküler hastalık veya kardiyovasküler patoloji nedeniyle ortaya çıkan iskemik veya hemorajik beyin lezyonlarından kaynaklanan bilişsel işlev kaybı olarak tanımlanmaktadır (17).



Şekil 2.1. 65 yaş üstü bireylerde görülen Demans tipleri ve oranları (18)

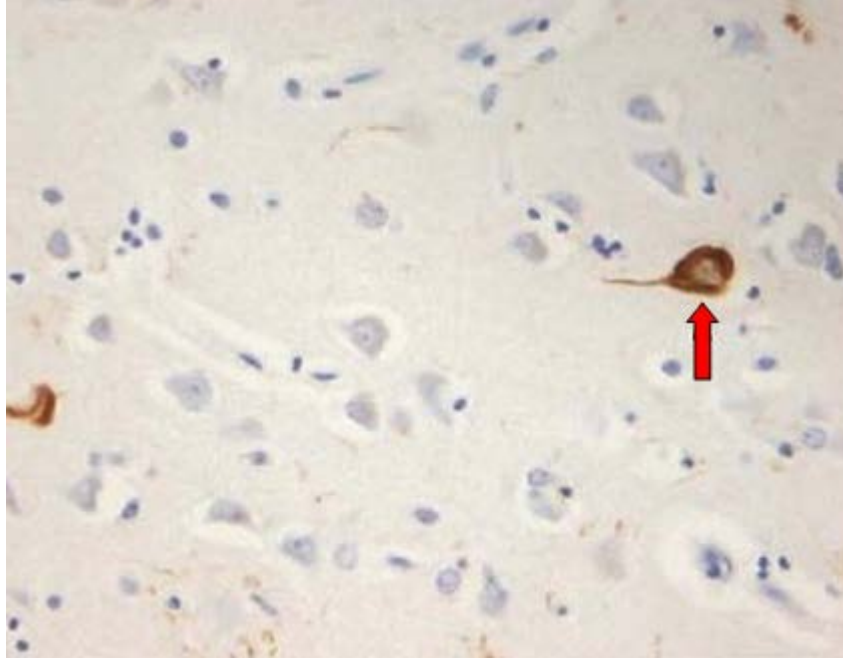
2.2. Alzheimer Hastalığı

AH, demansın ilerleyici bir formudur (19). Bu hastalık, hafıza, muhakeme, karar verme, fiziksel çevreye uyum ve dilde ilerleyici bozukluklara yol açan, özellikle hipokampus ve kortekste geri dönüşümsüz nöronal kayıp ile karakterize en yaygın nörodejeneratif bir hastalıktır (20).

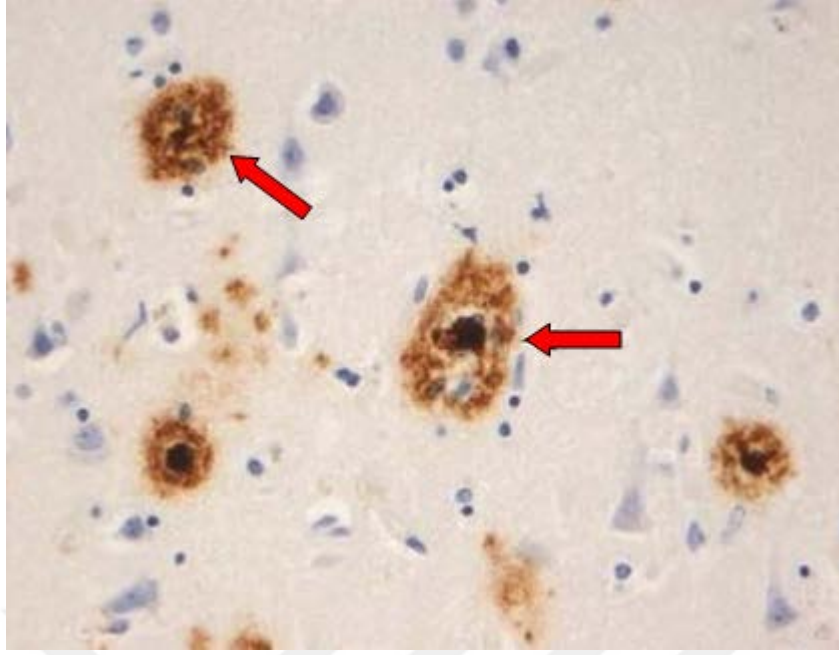
İlk olarak 1907 yılında Alois Alzheimer tarafından tarif edilen ve nörodejeneratif bir hastalık olan AH, yüzyılımızın önemli sağlık sorunlarından biridir (21). 65 yaş üzeri insanlar arasında en yaygın ölüm nedenleri arasında dördüncü sırada bulunmaktadır (1). AH ve diğer demansların, yaşlanan dünya popülasyonu ile 2030 yılına kadar 66 milyona; 2050 yılına kadar ise 115 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (2).

2.2.1. AH Patogenezi

AH, ilerleyici nöron ve sinaps kaybı ile karakterize edilen (3), NFY olarak adlandırılan hiperfosforile tau proteinlerinin kümelenmesi (Şekil 2.2) ve AP olarak adlandırılan A β peptidlerin birikimi (Şekil 2.3) gibi patofizyolojik lezyonlar gözlenen bir hastalıktır (4).



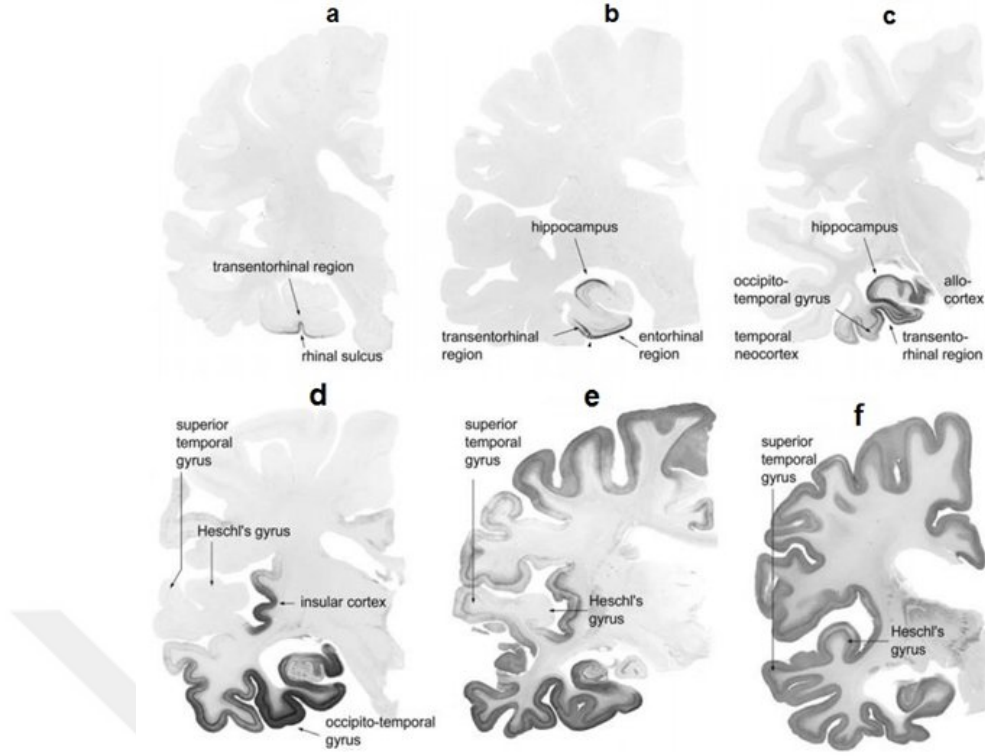
Şekil 2.2. Nörofibriler Yumaklar (22) (okla gösterilmiştir)



Şekil 2.3. Amiloid plaklar (22). (okla gösterilmiştir)

AH, klinik olarak bilişsel işlevlerde ilerleyici tarzda bir kaybı takiben demans ve ölüm ile karakterize bir durum olarak tanımlanır. Patolojik olarak, A β peptidlerin ekstrasellüler, hiperfosforile tau proteinlerin ise intrasellüler birikimi ve nöronal ölüm şeklinde tanımlanmaktadır (5, 6). A β peptidlerin birikmesinin ve aşırı üretiminin, AH'deki nöronal hücre fonksiyon bozukluğu ve ölüme yol açan patolojik akışı başlattığına dair önemli kanıtlar mevcuttur (23).

AH'de AP ve NFY özellikle frontal, temporal ve pariyetal korteks, hipokampus ve bazal ön beyin kolinerjik çekirdekleri gibi beyindeki birçok bölgede gözlemlenmektedir (24). Öncelikle transentorhinal kortekste oluşurlar ve daha sonra sırasıyla entorhinal kortekse, hipokampus bölgelerine ve daha sonra da serebral kortekse yayılırlar (25; Şekil 2.4). AH'de hem neokorteks hem de hipokampustaki sinaptik bağlantılarda kayıp mevcuttur (26).



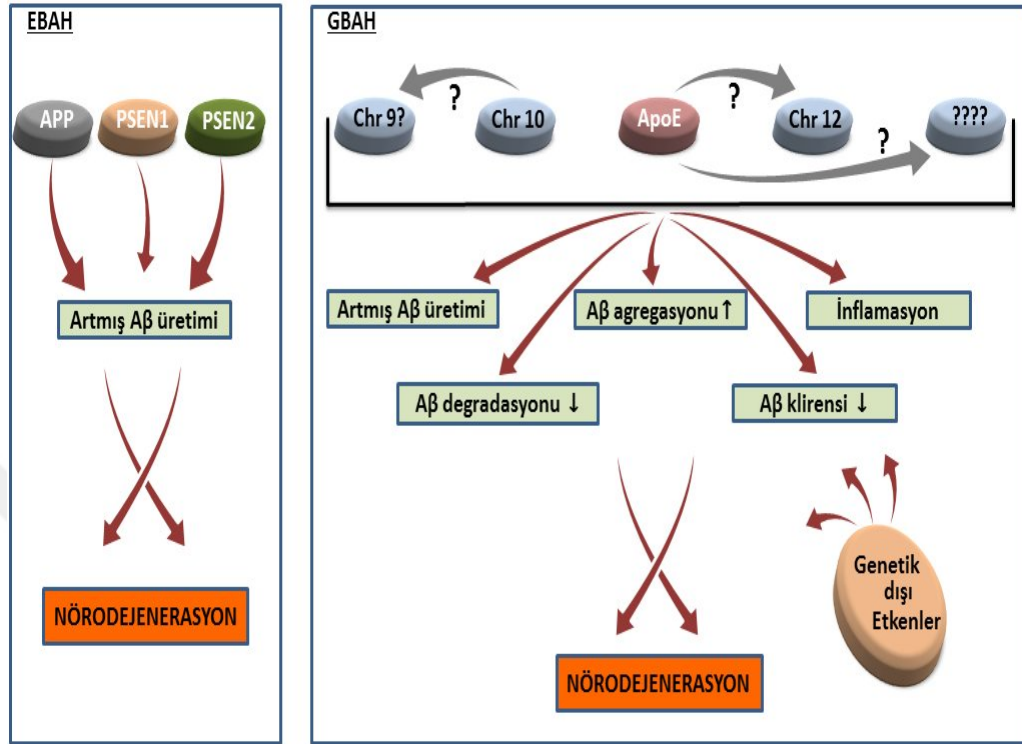
Şekil 2.4. AH'nin beyinde yayılma süreci (27)

2.2.2. AH'nin Klinik Seyri

AH klinik olarak üç aşamadan meydana gelmektedir. Pre-semptomatik fazda kişiler bilişsel olarak normal olup AH'ye ait bazı patolojik değişiklikler gözlemlenir. Bu kişilerin bazıları hiç klinik belirtiler göstermeden öldüklerinden bu kişileri "AH'nin pre-semptomatik fazında" şeklinde isimlendirmek, gerçek bir ifadeden ziyade daha çok bir hipotezdir (12). Yaygın olarak hafif bilişsel bozukluk olarak anılan prodromal faz (hafif bilişsel bozukluk), demans kriterlerine uymayan, erken bilişsel semptomların başlamasıyla karakterizedir. Prodromal fazda bilişsel bozukluğun şiddeti, bellek bozukluğunun erken ortaya çıkmasından diğer bilişsel alanlardaki daha yaygın fonksiyon bozukluğuna kadar değişim gösterir. Son faz demans ise oldukça ciddi fonksiyon kaybına yol açan çoklu alanlardaki bozukluklar olarak tanımlanır (28, 29).

AH, Erken-Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı (EBAH) ve GBAH olarak 2 alt tipe kategorize edilebilir (30, 31). AH vakalarının yaklaşık % 1-5'inde EBAH mevcuttur ve EBAH bulunan bu hastalardaki başlangıç yaşı 65 yaş öncesi, 40'lı yaşların sonu ya da 50'li yaşların başlangıcı şeklinde değişirken, 65 yaşından sonra hastalık gelişen hastaların % 95'inden fazlasında ise GBAH görülmektedir (32). Pozitif AH aile öyküsü

olan kişilerde hem EBAH hem de GBAH ortaya çıkabilir. EBAH vakalarının yaklaşık % 60'ının ailelerinde birden fazla Alzheimer olgusuna rastlandığı rapor edilmiştir (33).



Şekil 2.5. Bilinen ve farazi AH genlerinin katkı ve etkileşimleri (34).

İlgili kaynaktan değiştirilerek alıntı yapılmıştır.

2.3. AH Genetiği

EBAH'de 3 gendeki mutasyonların otozomal dominant kalıtımından sorumlu olduğu tespit edilmiştir (Tablo 2.1). Bunlar; 21. kromozom üzerinde (21q21) bulunan Amiloid prekürsor protein (APP), 14. kromozom üzerinde bulunan (14q24.2) presenilin-1 (PSEN1) ve 1. kromozom üzerinde bulunan (1q42.13) presenilin-2 (PSEN2). Bu genlerdeki mutasyonlar, demans ve nöronların apoptozisine yol açan Aβ üretim değişikliğine (hem Aβ40 hem de Aβ42) neden olabilirler (35; Şekil 2.5). Apolipoprotein E (APoE) geninin ε4 alleli daha yaygın ve karmaşık olan GBAH için önemli bir genetik risk faktörü olarak kabul edilmiştir. Fosforile taunun fibriller yumakları da AH'nin önemli bir patolojik özelliğidir (36).

Tablo 2.1. AH ile ilişkili genler (37)

Gen sembol	Lokasyon	Protein	Kalıt	Başlangıç yaşı (yıl)	Kalıtsal formlara katkı
APP	21q21.2	Amiloid beta A4	Otozomal dominant	40-60	\leq % 5
ApoE	19q13.2	Apolipoprotein E	Risk faktör	40-90	Risk faktör
PSEN1	14q24.3	Presenilin-1	Otozomal dominant	30-58	\geq % 50-75
PSEN2	1q31-q42	Presenilin-2	Otozomal dominant	45-88	\leq % 5

2.3.1. Amiloid Prekürsör Protein

APP, kromozom 21q21 üzerinde yer alan ve tek bir gen tarafından kodlanan (38), birçok dokuda ifade edilen ve nöronlarda konsantre edilen bir transmembran proteindir (39). Endoplazmik retikulumda sentezlenir, golgide post transkripsiyonel değişim geçirerek salgı yolu ile hücre yüzeyine taşınır. Daha sonra hücre yüzeyinden endositozla alınıp, endozomal-lizozomal yolla işlenir (40).

APP'nin 7. ve 8. eksonlarının alternatif bağlantıları sonucunda üretilen üç ana izoformu (APP695, APP751, APP770) bulunmaktadır (41). APP izoformları 695-770 amino asitler arasında değişirler ve insan vücudu içindeki çeşitli organların zarlarında bulunmaktadır (42). APP'nin çeşitli sinyal yollarında ve birçok biyolojik süreçlerde rol oynadığı gösterilmiştir. Ancak gelişmekte olan ve yetişkin organizmalardaki temel fizyolojik fonksiyonu belirsizdir. Bununla birlikte, model organizmalar üzerinde yapılan araştırmalar, beyindeki APP fizyolojik fonksiyonlarının daha iyi anlaşılmasını sağlamışlardır (43). Normalde APP, β ve γ sekretazlar tarafından amiloidojenik yol; α ve β sekretazlar tarafından da amiloidojenik olmayan yol şeklinde iki alternatif yol ile işlenir (39).

2.3.2. Presenilin-1 ve Presenilin-2

PSEN1 ve PSEN2, yaygın olarak merkezi sinir sistemi (MSS)'nde ifade edilen transmembran proteinlerdir (44). İmmünohistokimyasal analizler bu transmembran proteinlerinin gerek boyut gerekse hücre içindeki lokalizasyon bölgeleri bakımından benzer olduklarını göstermektedir. Yapılan *in situ* hibridizasyon analizleri ise beyindeki PSEN1 ve PSEN2 ifadelerinin birbirlerine son derece benzerlik gösterdiğini ve her ikisi için de mesajların başlıca nöronal popülasyonda saptanabileceğini ortaya koymaktadır (45). PSEN1 ve PSEN2 genleri, APP'lerin sıralı proteolitik bölünmelerinden ve daha sonra da A β peptidlerin oluşumundan sorumlu olan γ -sekretazın ana bileşenini kodlamaktadır (46). PSEN1, PSEN2 ve A β prekürsör protein mutasyonları ailesel AH etiyolojisinde rol alırken, sporadik AH'nin nedeni hala bilinmemektedir (44).

PSEN1 geni, 14. kromozomda yer alır (14q24.2) ve 467 aminoasitlik bir proteini kodlayan 12 eksondan oluşur. PSEN1 γ -sekretaz enzim kompleksinin katalitik bölgesini oluşturan polipeptik bir membran proteini olup PSEN1'deki mutasyonlar EBAH'ın en sık rastlanan nedenidir (47).

PSEN1 mutasyonları genellikle ailesel AH'deki patolojik değişikliklere neden olduğu düşünülen A β 42 peptid'in üretilme oranını A β 40'a göre artırır, bu da γ -sekretaz aktivitesinin azalmasına yol açan fonksiyon değişikliğiyle sonuçlanır (48).

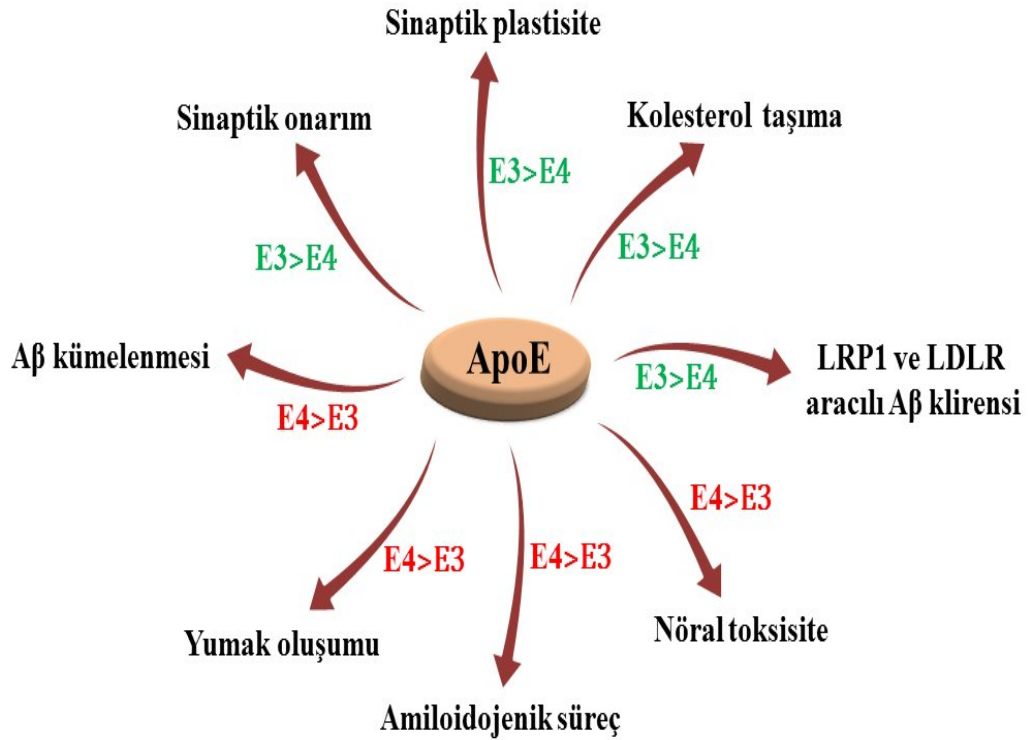
12 eksonu bulunan PSEN2 geni, 1. kromozomda yer alır (1q42.13) ve 10 eksonu, 448 amino asitlik bir peptidi kodlar. PSEN1 gibi PSEN2 de A β 'nın kesilmesinden sorumlu olan γ -sekretaz bileşenidir. PSEN2 öncelikle beyindeki nöronlar olmak üzere bir dizi dokuda ifade edilir (47). PSEN1 mutasyonları çok sık görülmesine rağmen PSEN2 mutasyonları çok nadir olarak ortaya çıkar (49).

2.3.3. Apolipoprotein E

Yaşam boyunca ve ilerleyen yaşla birlikte, nöronlar yeniden biçimlendirilmeli ve sinaptodendritik bağlantıları sürdürmek üzere onarılmalıdırlar. ApoE, lipid transport fonksiyonu yanında bu süreçlerde de önemli bir faktör olarak rol alır (50). ApoE, birbirinden bağımsız katlanmış 22 kDa N-terminal bölgesi (1-191 kalıntılar) ve 10 kDa'lık bir C-terminal bölgesi (216-299 kalıntılar) olmak üzere 2 fonksiyonel bölge içeren (51), beyinde lipid taşımayı ve yaralanma esnasında onarımı destekleyen önemli bir kolesterol taşıyıcısıdır (52). Periferik sinir sisteminde ApoE duyu ve motor

nöronların etrafındaki gliya hücrelerinde, miyelinize olmayan Schwann hücreleri ve hasara uğramış periferik sinirlerin yerleşik makrofajlarından sentezlenir. MSS'de astrositler, ApoE üreten asıl hücrelerdir. Bunun yanında, MSS nöronları da ApoE'yi ifade edebilirler (50).

İnsanlarda ApoE'nin sadece bir ya da iki amino asit farkı ile ApoE2, ApoE3 ve ApoE4 olmak üzere yaygın üç izoformu bulunmaktadır ve bu farklılıklar ApoE'nin hem yapısal hem de fonksiyonel özelliklerini değiştirebilirler (53). İnsanlarda ApoE geni $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$ olmak üzere üç ayrı allelik forma sahiptir. $\epsilon 2$ alleli ApoE2 izoformunu (Cys112, Cys158), $\epsilon 3$ alleli wild-type (yabani-tip) ApoE3 izoformunu (Cys112, Arg158) ve $\epsilon 4$ alleli ise ApoE4 izoformunu (Arg112, Arg158) kodlar (54). Tüm insan popülasyonlarında en yaygın formu Apo $\epsilon 3$ 'dür (% 50-70) ve ApoE gen havuzunun büyük çoğunluğundan (%70-80) sorumludur (55). Apo $\epsilon 3$ formunun normal bir form olduğu kabul edilir (56). Apo $\epsilon 4$ alleli, ApoE gen havuzunun % 10-15'inden; Apo $\epsilon 2$ ise % 5-10'undan sorumludur (55). ApoE, nöronların korunması ve tamirinde önemli bir rol oynar ancak onun üç izoformu $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$ bu kritik görevleri yerine getirme bakımından farklı yeteneklere sahiptirler (50; Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Sağlıklı beyin ve AH patogenezinde ApoE izoformlarının rolleri (57).

İlgili kaynaktan değiştirilerek alıntı yapılmıştır.

ApoE polimorfik allelleri AH riskinin başlıca genetik belirleyicileridir. $\epsilon 2$ alleli bu riski azaltırken, $\epsilon 4$ alleli taşıyan bireyler, daha yaygın $\epsilon 3$ alleli taşıyanlara kıyasla artmış risk altındadırlar. ApoE $\epsilon 4$ allelin varlığı, aynı zamanda serebral amiloid anjiyopati ve normal yaşlanma esnasında yaşa bağlı olarak algıda düşüş riski ile ilişkilidir (52). ApoE $\epsilon 2$ ve $\epsilon 3$ nöral hücrelerin korunması ve onarımında etkili olmalarına rağmen, Apo $\epsilon 4$, nöropor üzerine belirgin zarar verici etkilere sahiptir. Bu etkiler, nöron uzantılarının dışarıya doğru gelişmelerinin inhibisyonu, nöral iskeletin bozulması, tau fosforilasyonunun stimülasyonu, nörodejenerasyon, nöronların artmış proteolitik ayrılması, azalmış kognitif fonksiyonlar, A β -aracılı lizozomal sızıntı, apoptozis, androjen reseptör uyarılması ve artmış A β birikimidir (50).

ApoE ile AH arasındaki ilişkinin moleküler mekanizması henüz aydınlatılamamıştır. Sinaptik plastisite ve sinaptogenezis üzerine farklı etkilerinin bulunmasının yanında, A β 'nin fibriler formlarına dönüşümüne ve artmış tau fosforilasyonuna katkıda bulunduğu dair birkaç hipotez ileri sürülmüştür (58).

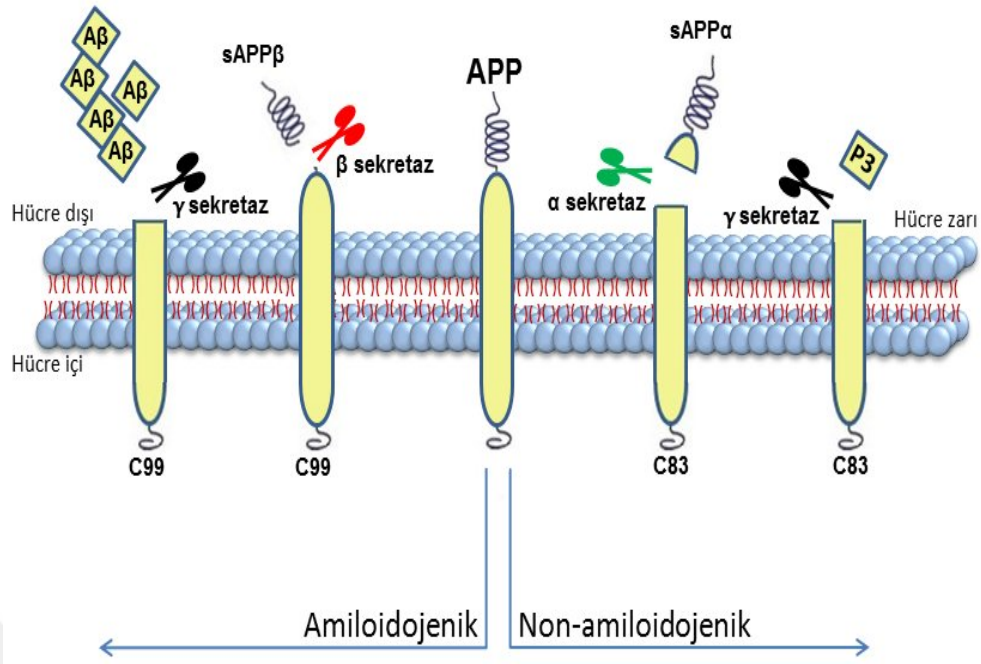
AH'de gözlenen genetik değişkenliğin % 40-60'ından sorumlu olan Apo $\epsilon 4$, bu hastalık için önemli bir risk faktörüdür. Apo $\epsilon 4$ 'ün varlığı sadece riski artırmakla kalmayıp aynı zamanda AH başlangıç yaşını da düşürmektedir. Bunun yanısıra Apo $\epsilon 4$ kalıtımı serebral amiloid anjiyopati, tauopatiler, LCD, Parkinson ve multipl skleroz ile de ilişkilidir (59).

2.4. AH'nin Patolojik Biyobelirteçleri

2.4.1. Amiloid β

APP, sıralı proteolitik bölünmelerle A β peptidlerin üretimi ile sonuçlanan AH'nin patofizyolojisinde büyük öneme sahiptir (60). Amiloid plaklar, APP'nin proteolitik bölünmeleriyle meydana gelen (61), 40-42 aminoasit uzunluğundaki A β proteinin ekstrasellüler birikimi sonucunda oluşur (62).

APP, α ve β sekretazlar olarak adlandırılan iki farklı proteolitik enzim tarafından kesilen bir membran proteinidir. α veya β -sekretaz tarafından gerçekleştirilen bu kesimi γ -sekretaz tarafından yapılan kesilme işlemi takip eder (63, 64). Bu kesilme β -sekretaz tarafından gerçekleşir ise A β ; α -sekretaz tarafından yapılır ise P3 olarak adlandırılan ve amiloidojenik olmadığı kabul edilen bir forma dönüşür (65, 66; Şekil 2.7).



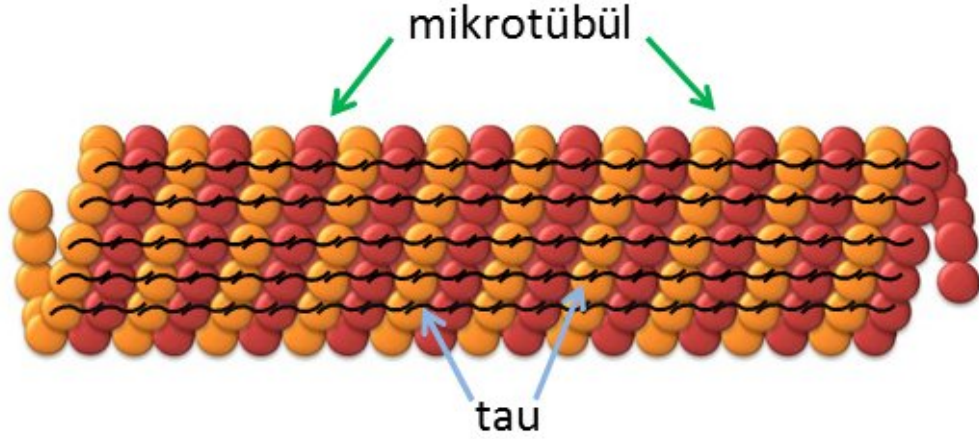
Şekil 2.7. Amiloidojenik ve non-amiloidojenik mekanizmalar.

A β 42 ve A β 40 çoğunlukla AH'ye neden olan ana patojenik türler olarak kabul edilir (67, 68). Bu türlerden 40 amino asit kalıntıları içeren A β 40 formu (%85), 42 amino asit içeren A β 42 formundan daha yaygın görülmektedir (48). A β 42 proteini nöronlara toksik olma ve Alzheimer hastalarının beyinlerinde bulunan fibriler amiloid kümelenmelerini oluşturma yönünden artan bir eğilim göstermektedir. Çalışmalar A β 40/A β 42 oranındaki küçük değişikliklerin toksisiteye ilişkin ciddi etkilere yol açtığını göstermiştir (68).

2.4.2. Tau Protein

“Mikrotübül-bağlayıcı protein Tau” olarak da bilinen tau proteinleri (69), MSS nöronlarda bol miktarda fakat MSS astrositleri ve oligodendrositleri içinde ise çok düşük seviyelerde ifade edilmiş mikrotübül stabilize edici proteinlerdir (70).

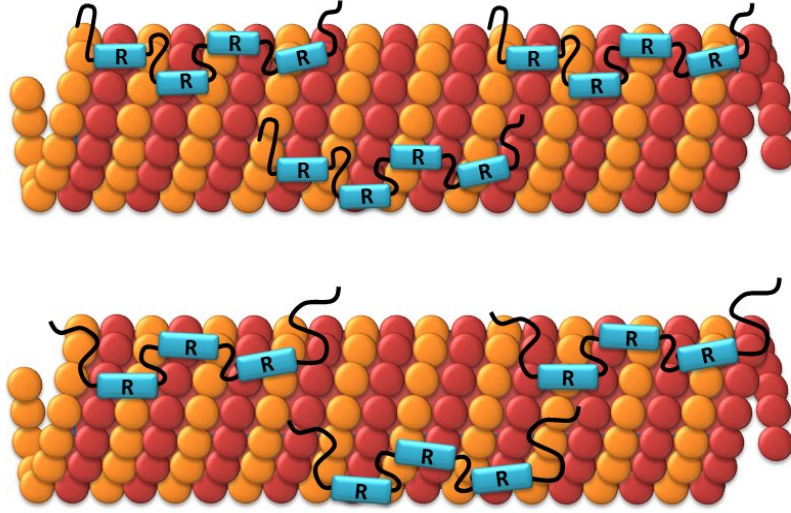
Tau proteini ilk olarak AH'de gözlenen NFY içinde tespit edilmiştir. Astrositik ve oligodendroglial ipliksi tau içeriği ile karakterize AH dışındaki diğer dejeneratif bozukluklardaki gliyal lezyonun da bir parçasını oluşturmaktadır (71). Bu proteinler tübülün monomerlerinin mikrotübüllere monte edilerek nöronal mikrotübüler ağını meydana getirilmesinde önemli bir rol oynarlar (72; Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Tau ve mikrotübülün görünüşü.

Nöronlar içindeki normal tau proteininin ana işlevlerinden biri normal aksonal taşımayı teşvik etmek için mikrotübülleri bağlamak (73), onların organizasyonunu ve stabilizasyonunu artırmaktır (74). Mikrotübüllere bu bağlanmanın nöronların aksonal bütünlüğünün korunması için gerekli olduğu düşünülmektedir (75). Bu durum tau proteininin hem bağımsız hem de diğer mikrotübül bağlantılı proteinler ile sinerji halinde olması ile ilişkilidir (76). Tau, N-terminal projeksiyon bölgesi, prolin açısından zengin alan, mikrotübül bağlama alanı ve bir C-terminal bölgesi olmak üzere dört bölgeye ayrılır (77). Mikrotübül-Bağlayıcı Protein Tau geni, kromozom 17 üzerinde yer alır ve 16 eksondan oluşur (78). 2, 3 ve 10. eksonlarının alternatif mRNA kırılması ile oluşturulan (79), 6 farklı izoformu mevcuttur (78, 80). Bu izoformların fosforilasyon durumu, mikrotübüllere bağlanma afinitesini belirlemektedir (81).

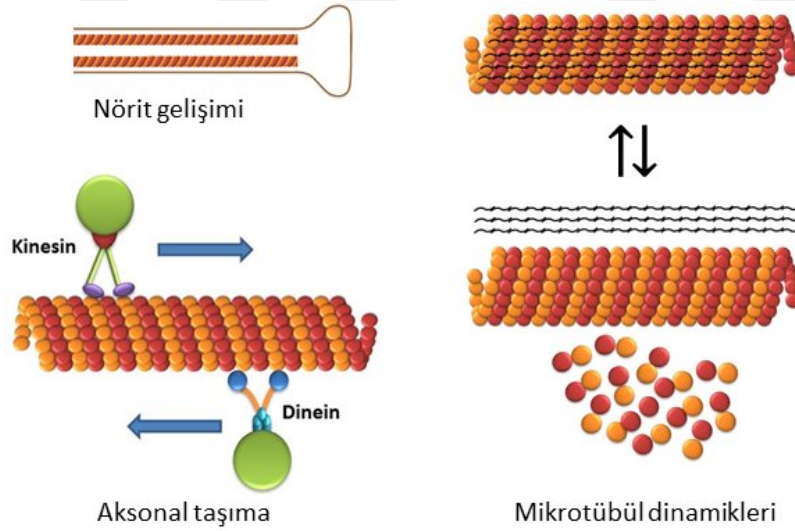
Tau proteini amino asit dizisi içinde belirli bir motifin tekrarı (R) ile ayırt edilir. Bu proteinin 6 izoformunun üçü, bu motifi üç kez (3R), diğer üçü ise dört kez (4R) tekrarlar (Şekil 2.9). 4R tau proteinleri ilave bir bağlanma bölgesine sahip olduğundan mikrotübül stabilizasyonunda 3R'den daha etkindir (82).



Şekil 2.9. Tau izoformlarının diziliş motifleri.

Mikrotübüller, 4R tau proteinleri (üstte) ve 3R tau proteinleri (altta) ile sağlamlaştırılmıştır.

Yaygın olarak MSS’de ağırlıklı nöronlarda ifade edilen Mikrotübül-Bağlayıcı Protein Tau, mikrotübül dinamikleri, aksonal taşıma ve nörit gelişimini düzenler (83; Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Taunun düzenleyici görevleri (84)

İlgili kaynaktan değiştirilerek alıntı yapılmıştır.

Nörodejenerasyon ve demansa neden olan tau proteininin disfonksiyonu neticesinde görülen nörodejeneratif bozukluklar “taupatiler” olarak adlandırılır. Bu durum fosforile ve/veya kümelenmiş tau ile ilişkilidir (71). Taudaki hiperfosforilasyon

ve kümelenmiş tau gibi çeşitli anormallikler ise AH, Pick hastalığı, ilerleyici supranükleer palsi, frontotemporal demans ve parkinsonizm gibi nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilidir (83).

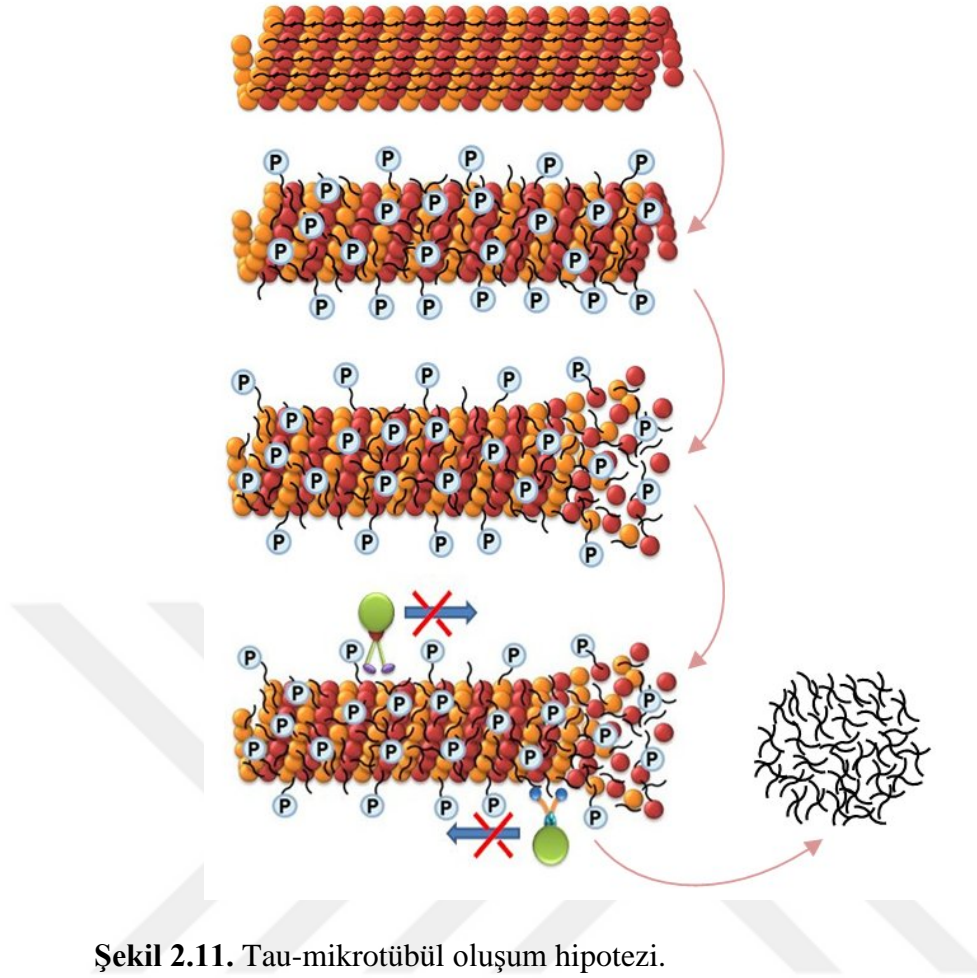
Taupatiler, tau kümelenmelerinde bulunan izoform içeriği ve fosforilasyon tipine dayalı olarak sınıflandırılabilir (85). Sınıf I taupatilerden gelen kümelenmeler tüm 6 izoformu içerirken, Sınıf II kümelenmeleri büyük bir oranda 4R'den 3R tau izoformuna karakterize edilir ve Sınıf III taupatiler ise çoğunlukla 3R izoformlar içeren kümelenmelerle ilişkilidir. Aynı zamanda Sınıf III taupatileri 262 ve 356 serin kalıntılarında fosforilasyon eksikliği ile karakterize edilirler (86, 87).

AH'de tau, patolojik olarak hiperfosforilize olur (88). Bu durum mikrotübüllerden tau ayrılmasını ve fosforile tau içerisine hatalı katlanma/kümelenmesini içeren bir dizi olaylar zincirini tetikler. Bu da mikrotübüllerin dağılmasına, aksonal taşımanın bozulmasına ve nöronal ölüme neden olur (82, 89).

2.4.3. Nörofibriler Yumak

NFY'nin oluşumu hiperfosforile tau toplanmasının (90), ve fosforilasyon seviyelerinin anormal artışının sonucudur. Normal fizyolojik koşullarda tau protein molekül başına 2-3 molekül fosfat içerir. AH'de ise beyin tau protein, 5-9 mol fosfat içerir (91). Tau proteininin hiperfosforilasyonuna yol açan hiperaktif kinazlar ve/veya hipoaktif fosfatazlar tau'nun mikrotübüllere bağlanma yeteneğini bozarlar. Bağlanma yeteneği bozulmuş fosforile tau çözilemeyen çift sarmallı filamanlara polimerize olur. Zamanla bunlar intranöronal NFY'ler haline gelir. NFY sonunda hücre iskeletinin bütünlüğünü ve aksonal transportu bozarak hücre ölümüne neden olur (92, 93).

AH'de beyinde transentorhinal bölgedeki nöronlardan başlayarak hipokampus ve sonunda kortekse yayılan iyi tanımlanmış bir model olması taunun önemli özelliğidir. Böylece tau kümelenmesi gösteren beyin bölgeleri klinik semptomların hafif bilişsel bozukluktan şiddetli demansa ilerleyişini yansıtır (92).



Şekil 2.11. Tau-mikrotübül oluşum hipotezi.

Tau-mikrotübül hipotezinde tau hiperfosforilize olur bu hiperfosforilize taunun mikrotübül bağlayıcı yeteneğini azalır böylece mikrotübüller arasından ayrılır ve mikrotübüller parçalamaya başlar. Sonuç olarak, veziküllerin aksonal taşınması kesintiye uğrar ve sinaptik fonksiyon engellenmiş olur (Şekil 2.11). Hiperfosforile tau proteinleri aksoplazmada birikir ve sonunda eşleşmiş sarmal ve düz filamentler içine kümelenerek yumak oluşturmak için kaynaşır (94).

2.5. Sirkadiyen Saat

Memelilerde uyku, vücut sıcaklığı, hormon salınımı, kan basıncı ve metabolizma gibi temel biyolojik süreçleri yaklaşık 24 saat düzenleyen sirkadiyen ritim, hiyerarşik bir sistem olarak düzenlenmiş vücudun bütün hücrelerinde yer alan ve kendi kendine işleyen endojen saatler ile sürdürülür (95). Sirkadiyen saat, günlük ritmik süreçlerin çevre ile senkronizasyonunu sağlayan endojen bir zamanlama mekanizmasıdır (96). Bu endojen zamanlama mekanizması, sıcaklık, besinler ve ışığın çevresel döngüleri ile

senkronizasyonunu sağlamak için biyokimyasal, fizyolojik ve davranışsal süreçleri koordine eder (97).

Memelilerde uyku-uyanıklık döngüsünü kontrol eden sirkadiyen saat ön hipotalamusun suprakiazmatik nükleus (SKN) kısmında bulunmaktadır (98). SKN'de bulunan ve günlük aydınlık/karanlık siklusu ile 24 saatlik bir periyoda ayarlanmış merkezi sirkadiyen saat, memelilerde melatonin üretimini ve salınımını kontrol etmektedir (99). Sirkadiyen sistemde gerekli bir unsur olan melatonin, sirkadiyen biyolojiyi optimize etmede rol oynar (100).

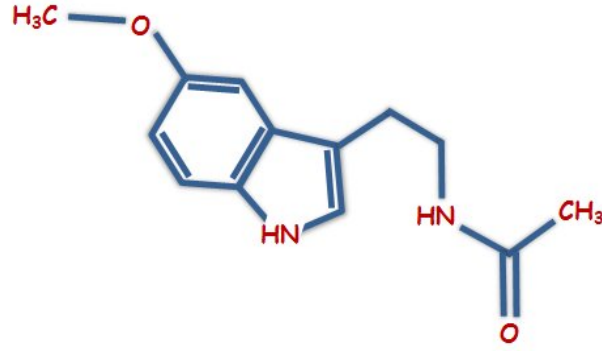
2.6. Pineal Bez

Pineal bez, beyin orta hattında, III. Ventrikülün arkasında yer alan ve kan-beyin bariyeri içermeyen insandaki en küçük endokrin bezdir (101). Pineal bezin salgı fonksiyonu iki ana grup endojen madde ile sağlanmaktadır. Bunlar indolaminler ve peptidlerdir (102). Nöral tüpten türetilmiş olan bu bez (103), hem indolaminleri (çoğunlukla melatonin) hem de peptidleri (arginin, vazotosin gibi) üreten baskın pinealositler ile nöroglial hücreler olmak üzere iki tip hücreden oluşur ve damarlaşma yönünden oldukça zengindir (104).

2.7. Melatonin

Melatonin pineal bez tarafından beyinde üretilen, davranışsal ve fizyolojik sirkadiyen ritimleri kontrol eden bir hormondur. Bu hormon, gece ve gündüz sinyallerine cevap olarak değişiklik gösterir ve melatonin seviyeleri her zaman gece saatlerinde yükselir (105). Türlerle bağlı olarak, pineal ve kan melatonin düzeylerindeki bu gece artışları genellikle 2 ile 12 kat arasında değişmektedir. (Gün boyunca 10 pg/ml ile gece 120 pg/ml). Yetişkin bir insanda ise melatoninin gündüz seviyeleri ortalama 10 pg/ml iken bu değer gece ortalama 60 pg/ml seviyelerindedir (106, 107). Yükselmiş melatonin düzeyinin yüksek kalma süresi ise, karanlığın süresine bağlıdır (108).

Melatonin ritmi hipotalamusun SKN kısmında yerleşmiş bulunan sirkadiyen saat tarafından merkezi ve periferal yapılardan geçen bir nöral devrenin pineal bezi uyarması sayesinde meydana getirilir (105).



Şekil 2.12. Melatoninin kimyasal yapısı (109)

2.7.1. Melatonin Sentez ve Salınımı

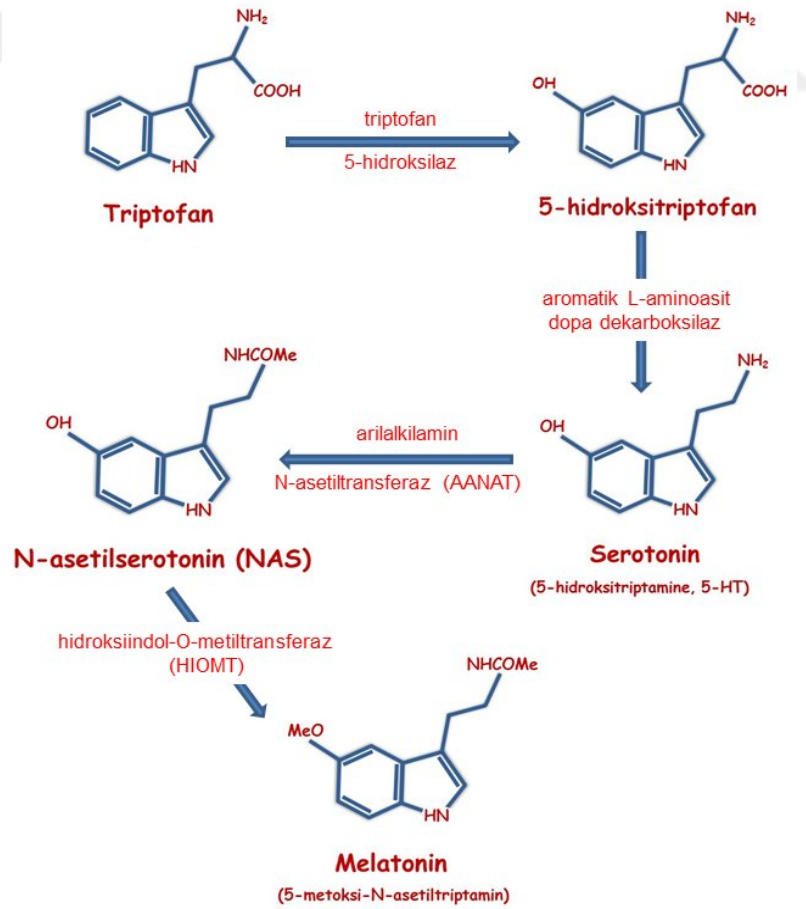
Geceleyin SKN uyarılması, pineal bezde sinir uçlarından pineal perivasküler boşluğa, NA salınımı ile sonuçlanmaktadır (100). Noradrenalin, postsinaptik reseptörler olan pinealosit membranındaki β ve α -reseptörlerine bağlanır. Melatonin yaklaşık % 85 β -reseptörlerinin aktivasyonu ile, % 15'i ise α -reseptörlerinin uyarılması ile sentez edilir, β ve α adrenerjik reseptörlerin uyarılması ile hücre içinde cAMP ve N-asetiltransferaz artışı olur. Melatoninin ön maddesi, bir aminoasit olan triptofandır ve pinealositler içinde önce serotonine, daha sonra melatonine dönüştürülür (108, 110, 111).

Melatonin, gece boyunca iki büyük bölgede üretilir. Biri dolaşımdaki melatonin kaynağı olan pineal bez (epifiz) dir (112). Dolaşımdaki melatonin, mevsimsel ve sirkadiyen fizyolojide endokrin bir role sahiptir. Melatonin sentezinin ikinci kısmı melatoninin ışık ve karanlığa adaptasyonda bir parakrin rol oynadığı düşünülen retina fotoreseptör hücreleridir (105). Retina tarafından algılanan bir ışık sinyali öncelikle retino-hipotalamik yolla asıl sirkadiyen saat alanı olan SKN'ye ve sonra paraventriküler nükleusa iletilir. Daha sonra sinyal, dorsomedial hipotalamik nükleus ve medulla spinalisin intermediolateral kolonundan geçerek süperior servikal gangliyon (sempatik gangliyon)'a ulaşır. Sonunda süperior servikal gangliyondan çıkan postgangliyonik sinirler pineal bezi innerve ederler (111, 113). Fotonöroendokrin sistem çevresel ışık bilgilerini algılayan retinadan meydana gelirken, retinohipotalamik yol ise endojen sirkadiyen osilatör alanı oluşturan SKN'ye ışık sinyallerini iletir (114).

İnsanlarda serum melatonin seviyesindeki artış karanlığın hemen ardından başlar (20:00-23:00), gece (01:00 ile 05:00 arasında) zirveye ulaşır, daha sonra (gecenin ikinci

yarısında) giderek azalır. Serum melatonin seviyeleri yaşa bağlı olarak da değişir (115). Spesifik melatonin antikörlerin yardımıyla melatonin beyin, retina, lens, koklea, solunum yolu epiteli, deri, gastro-intestinal yol, karaciğer, böbrek, tiroid, pankreas, timus, dalak, immun sistem hücreleri ve endotel hücreleri dahil olmak üzere birçok ekstrapineal dokularda tespit edilmiştir. Bu dokuların çoğunda melatonin sentezleyen enzimler belirlenmiştir (106, 116). Melatonin esas olarak, beyin omurilik sıvısı, tükürük, safra, eklem sıvısı, amniyotik sıvı ve anne sütü de dahil olmak üzere tüm biyolojik sıvılar içinde bulunmaktadır (117, 118).

Melatonin sentezi pineal bez (pinealositler) içerisine amino asit triptofanın aktif olarak alımı ile başlar (119) ve triptofan, triptofan hidroksilaz enzimi ile 5-hidroksitriptofana (5-HTP) dönüştürülür (Şekil 2.13). Sonraki adım serotonine (5-hidroksitriptamine) dönüştüren bir nonspesifik dekarboksilaz tarafından 5-HTP dekarboksilasyonunu kapsar ve 5-HTP, serotonine dönüştürülür (120, 121). Serotonin de N-asetiltransferaz ile N-asetilserotonine ve son olarak dahidroksiindol-O-metiltransferaz enzimi tarafından melatoninine dönüştürülür (122, 123).



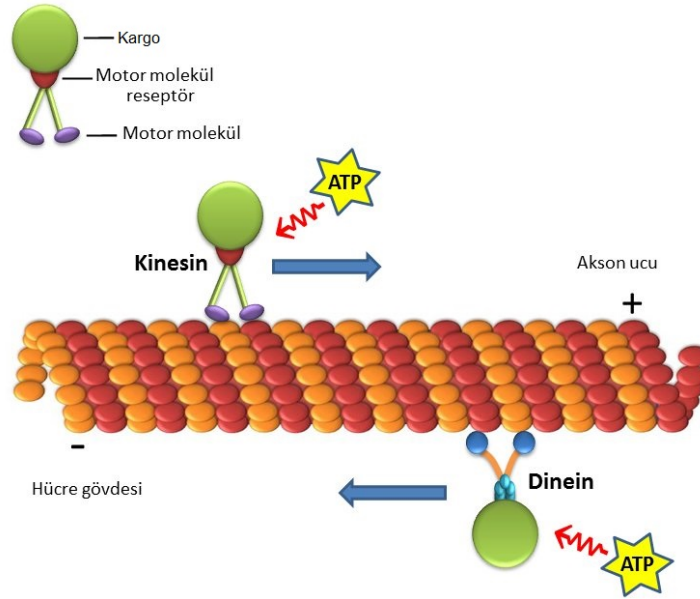
Şekil 2.13. Melatonin sentez basamakları (124)

Memelilerde melatonin birçok etkisini hücre zarına bağlı MT1 (yüksek afiniteli) ve MT2 (düşük afiniteli) olarak adlandırılan iki G protein-bağlı reseptörler aracılığıyla gerçekleştirir. MT1 ve MT2 reseptörleri SKN, substantia nigra ve nukleus akumbens gibi MSS'nin çeşitli bölgelerinin yanısıra bağışıklık hücreleri, retina ve koroner arterlerde de dahil olmak üzere çeşitli periferik dokularda ifade edilmektedir (125-129) ve bu reseptörler ortak 7 transmembran yapısını paylaşırlar (130, 131).

Melatonin, sentezlendikten sonra pinealositlerde depolanmayan lipofilik ve hidrofilik bir bileşiktir. Bu özelliklerinden dolayı hızlı bir şekilde pasif difüzyon ile pinealositlerden atılır. Üretilen melatonin kana ve beyin omurilik sıvısı (BOS)'na salınır ve böylece melatonin vücudun her hücrel bölümüne ulaşır (105, 132). Kanda melatoninin % 61-78 oranında albumine bağlı olarak bulunduğu bilinmektedir (133). Dolaşımdaki melatonin, sitokrom P450 enziminin aracılık ettiği O-demetilasyon ve hidroksilasyon yoluyla karaciğerde metabolize edilir (109) ve karaciğerden tek geçişi sırasında % 90 temizlenir (107, 134). Pineal bez, kan-beyin bariyerinin dışında olduğu için, kandaki herhangi bir molekül pineal aktiviteyi değiştirebilir. Melatoninin kandaki yarı ömrü 20-40 dakika kadardır (107).

2.8. Mikrotübül

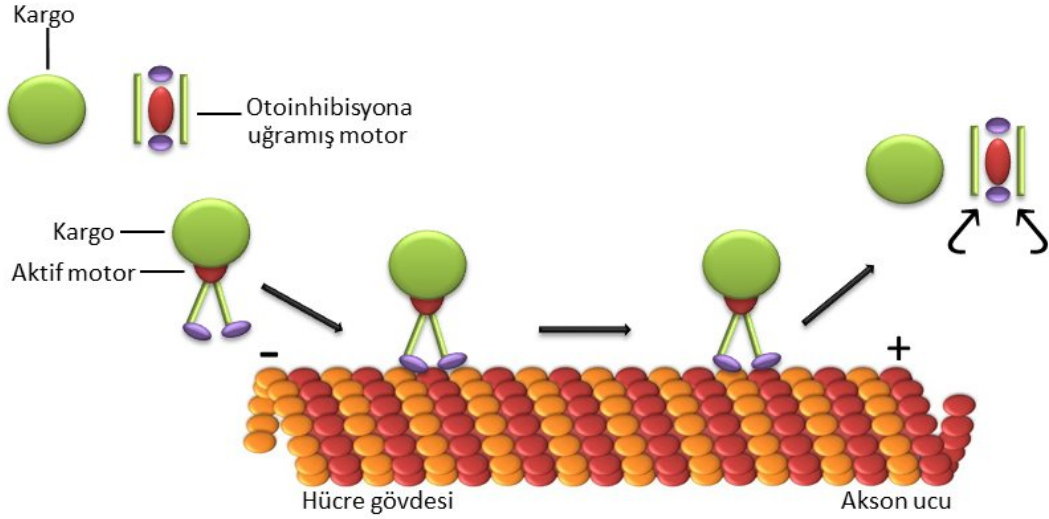
Mikrotübüller, hücre bölünmesi, kutuplaşma ve intrasellüler transportta önemli roller oynayan hücre iskeletinin polimerleridir (135). Aksonlardaki mitokondriyal hareket, mikrotübüller boyunca zıt yönlü olarak dinein ve kinesin adlı iki motor protein tarafından yürütülmektedir (136; Şekil 2.14).



Şekil 2.14. Kinesin, dinein ve aksonal taşıma (137)

İlgili kaynaktan değiştirilerek alıntı yapılmıştır.

Kinesin1, mikrotübüllerin artı ucuna, dinein ise mikrotübüllerin eksi ucuna yönelmekle görevli olup çeşitli hücre içi kargoların taşınmasında adenozin trifosfat (ATP)-türevi enerji kullanırlar (138). Moleküler hareketliliğin (motorların) düzenlenmesi önemli bir hücrel sorundur. Kargo yokluğunda boş yere ATP israfını ve mikrotübül sıkışıklığını önlemek için kinesin otoinhibisyon mekanizması devreye girer (Şekil 2.15). Yaygın görüş olarak katlanmış otoinhibisyon durumunu korumak için kuyruk alanının motor alanına bağlandığı bildirilmektedir ancak moleküler mekanizma henüz tam olarak açıklanmış değildir. Sterik ve allosterik inhibisyonun da dahil olduğu birkaç otoinhibisyon mekanizması ileri sürülmektedir (139-141).



Şekil 2.15. Kinesin otoinhibisyon mekanizması (139)

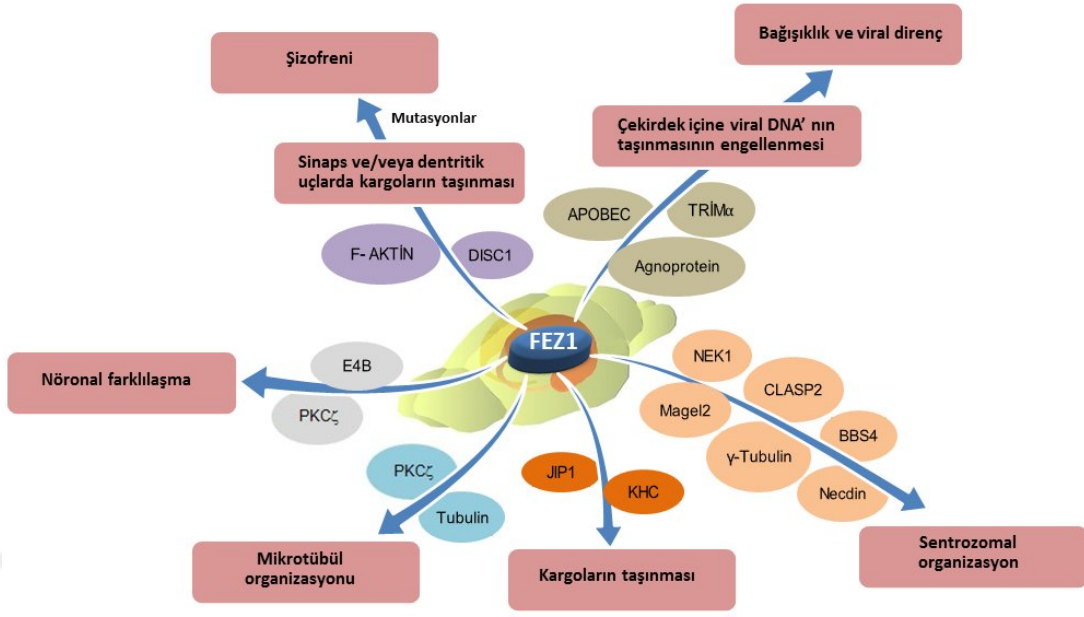
İlgili kaynaktan değiştirilerek alıntı yapılmıştır.

2.9. Fasikülasyon ve Elongasyon Protein Zeta-1

Aksonal büyüme ve uzama için gerekli olan FEZ1, beyinde ifade edilen bir proteindir ve insanda 392, sıçanda ise 393 amino asitten oluşur (7). Yetişkin ve gelişmekte olan sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada her iki gruptaki sıçanların hipokampal nöronlarında FEZ1 mRNA'sının yüksek düzeyde ifade edildiği belirlenmiştir (142). İmmünohistokimyasal çalışmalar, mental hastalıklar da dahil olmak üzere pek çok nörolojik hastalıkların neokorteks disfonksiyonu nedeniyle geliştiğini ve bu hastalıkların neokorteksin derin katmanlarında ifade edilen FEZ1 ile ilişkili olabileceğini ortaya koymuştur (8).

FEZ1 mRNA'sının, yetişkin sıçan beyninin hipokampus, olfaktör bulbus, dentat girus ve serebellar korteks kısımlarında güçlü sinyaller verdiği gösterilmiştir (Şekil 2.16). Özellikle hipokampusta yoğun bir biçimde FEZ1 mRNA'sının ifade edilmesi, bellek ve öğrenme için yüksek nöronal plastisitenin bir göstergesi olarak yorumlanmıştır (9).

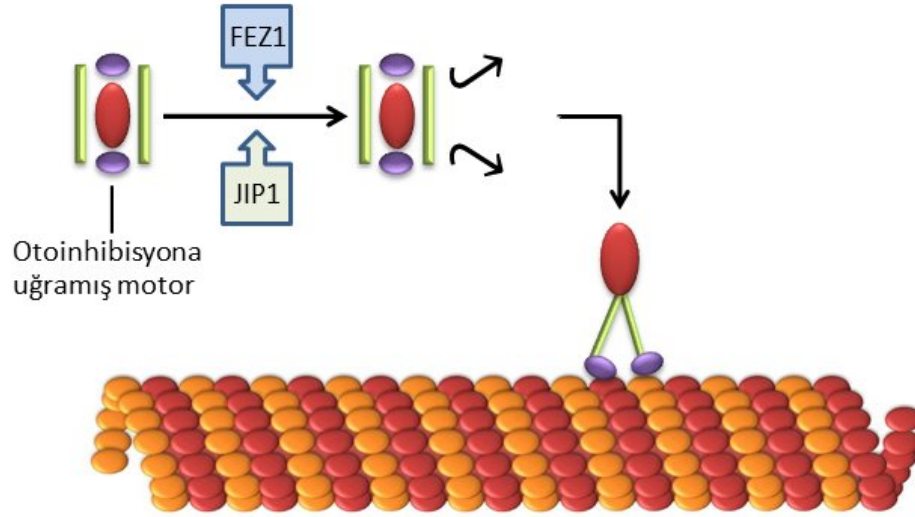
Şimdiye kadar bildirilen çalışma sonuçları FEZ1'in, nöronal gelişim, nöropatiler ve viral enfeksiyonlar ile ilişkili olduğunu göstermesine rağmen son zamanlarda proteomik teknikler kullanılarak yapılan çalışmaların sonuçları, FEZ1'in hücre motor proteinleri ve sinyal iletimi gibi çeşitli hücre içi olaylarla ilişkisinin olabileceğini düşündürmektedir (10; Şekil 2.17).



Şekil 2.16. Bağlanma ortaklarına göre FEZ1 fonksiyonları (10)
İlgili kaynaktan değiştirilerek alıntı yapılmıştır.

AH'nin de dahil olduğu nörodejeneratif hastalıkların gelişmesinde mitokondrinin önemli bir rolünün olduğu gösterilmiştir (143). Günden güne artan kanıtlar, Aβ'nin AH olan beyinde mitokondriyal fonksiyon üzerinde zararlı etkilerinin olduğunu ileri sürmektedir (144). Akson içindeki mitokondriyal taşıma, aksonal bakım için oldukça önemlidir ve düzensizliği nörodejeneratif hastalıklara yol açabilir (145).

JIP1 (Jun N-terminal kinaz (JNK)-etkileşim protein 1), kinesin1 hafif zincire bağlanan ve mikrotübül motor protein olan kinesin ile taşınan bir proteindir (146, 147). Genetik çalışmalar JIP1'in yapısal aksonal taşımayı düzenlemede rol aldığını göstermektedir (148). Kinesin1 motorların otoinhibisyonunun, mikrotübül bağlama ve ilerleyici motilite kısıtlamalarını kaldıran FEZ1 ve JIP1'in etkileşimi ile giderilebileceği ileri sürülmektedir (139; Şekil 2.18).



Şekil 2.17. Otoinhibisyon mekanizması, FEZ1 ve JIP1 (139).

İlgili kaynaktan değiştirilerek alıntı yapılmıştır.

Son zamanlarda nöron aksonları üzerinde yapılan çalışmalar, FEZ1 aracılı-kinesin1 tabanlı bir mekanizmayı ortaya koymuştur (149). FEZ1'in aksonda kinesin ile etkileşerek FEZ1/kinesin kompleksi oluşturduğu ve bu kompleksin mikrotübüller boyunca mitokondrinin taşınmasını düzenlediği gösterilmiştir (150). Ayrıca hipokampal nöronlarda mitokondrinin akson boyunca ileriye taşınması için de FEZ1'in gerekli olduğu ileri sürülmüştür (151). Nöron gövdesi ve aksonda (şiga toksini ile) oluşturulan FEZ1 mutasyonlarının, nörodejeneratif hastalıklarda görülen transport kusurlarına oldukça benzerlik gösteren bir duruma neden olduğu, bunun da FEZ1'in intrasellüler transportta önemli bir rolünün olabileceğine delil teşkil ettiği bildirilmiştir (149). Mikrotübül bağımlı taşımada meydana gelebilecek azalmaların, APP'nin proteolitik işlenmesini uyarabileceği bunun da amiloid plakların gelişimi ve AH ile sonuçlanabileceği rapor edilmiştir (152).

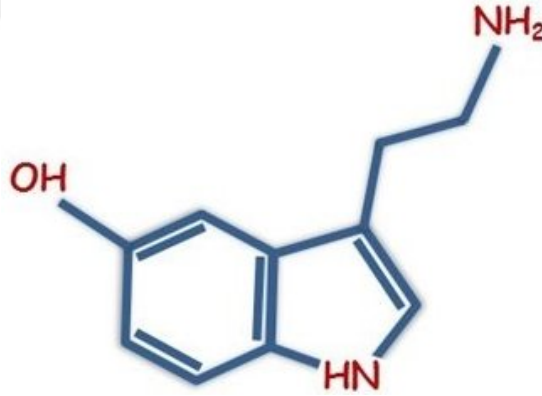
2.10. Monoaminler

Dopamin, NA ve adrenalin katekolaminler olarak bilinen nörotransmitterlerin bir sınıfına ait olup yapısal olarak bir katekol halkası ve bir amin yan zinciri ile tanımlanmışlardır. Katekolaminler ve indolaminler (serotonin gibi), monoaminler olarak ifade edilir. Monoaminler amino asitlerin dekarboksile türevleri olan, küçük ve suda çözünür moleküllerdir. Monoaminler, salgı granülleri içerisinde yüksek konsantrasyonlarda depolanırlar. Bu salgı granülleri, metabolik enzimler tarafından

bozulmaya karşı koruma sağlamanın yanında ekzositoz yoluyla düzenli bir şekilde salınmalarını sağlarlar (153).

2.10.1. Serotonin

Serotonin, intrasınaptik ve ekstrasınaptik reseptörler üzerine etkiyerek spinal motor kontrolü modüle eden bir monoamindir (154). Serotonin özellikle sinaptik sonlanmalarda amino asit triptofandan sentezlenir. Bu işlem 2 enzimatik aşamada gerçekleşir. Birinci aşama triptofanın, triptofan hidroksilaz enzimi yardımıyla 5HTP'ye dönüştürülmesi ikinci aşama ise aromatik amino asit dekarboksilaz tarafından 5HTP, serotonine dönüştürülür. Serotonin, veziküler monoamin taşıyıcı yardımıyla veziküller içine taşınır. Serotonerjik nöronlarda bir ateşleme olduğunda bu veziküllerdeki serotonin sinaptik aralığa serbestlenir (155). Serotoninin 14 farklı reseptörü, moleküler yapı, sinyal transdüksiyon özellikleri ve farmakolojik özelliklerine dayalı olarak 7 gruba ayrılmaktadır (5-HT1, 5-HT2, 5-HT3, 5-HT4, 5-HT5, 5-HT6, 5-HT7). Bunların da çoklu alt grupları bulunmaktadır (156).



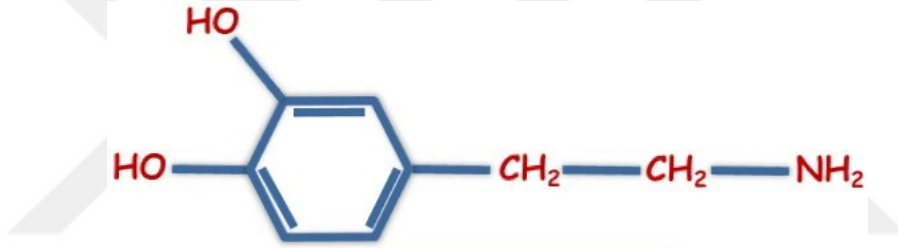
Şekil 2.18. Serotoninin kimyasal yapısı (124)

Esansiyel amino asit triptofan, serotonin için öncüdür. Vücuttaki serotoninin % 95'inden fazlası bağırsakların ve gastrik mukozanın enterokromafin hücrelerinde, geriye kalanı ise beynin raphe çekirdeği, akciğer nöroendotelial hücreleri ve kardiyovasküler sistemin dahil olduğu birkaç farklı bölgeden sentezlenir (157, 158). Beyinde serotonin ve NA nörotransmisyon sistemleri, öğrenme, ruh hali, uyku, uyanıklık ve bunun yanı sıra nöroendokrin ve otonom sinir sistemi düzenleme gibi MSS fonksiyonlarında rol

almaktadırlar. Bu iki sinir ileti sistemi genellikle bağımsız çalışmaktadır, ancak son zamanlarda birinin diğeri üzerine olası etkileri göz önünde bulundurulmaktadır (159).

2.10.2. Dopamin

Dolaşımdaki tirozinin çoğunluğu besin kaynaklarından az bir miktarı ise karaciğer enzimi fenilalanin hidroksilaz'ın aracılık ettiği fenilalanin hidroksilasyonundan kaynaklanmaktadır (160). Tirozin, enerji-bağımlı bir alım işlemi ile nöronlara girer ve aktif tirozin hidroksilaz enzimiaracılığı ile önce L-aromatik amino asit dekarboksilaz olarak da adlandırılan dihidroksifenilalanin, daha sonra da dekarboksilaz aracılığı ile dopamine dönüştürülür (153, 161). Nigrostriatal nöronlar, striatumdaki akson terminallerinden ve substantia nigra'daki soma ve dendritlerinden dopaminin salınımına neden olurlar (162).



Şekil 2.19. Dopamininkimyasal yapısı (163)

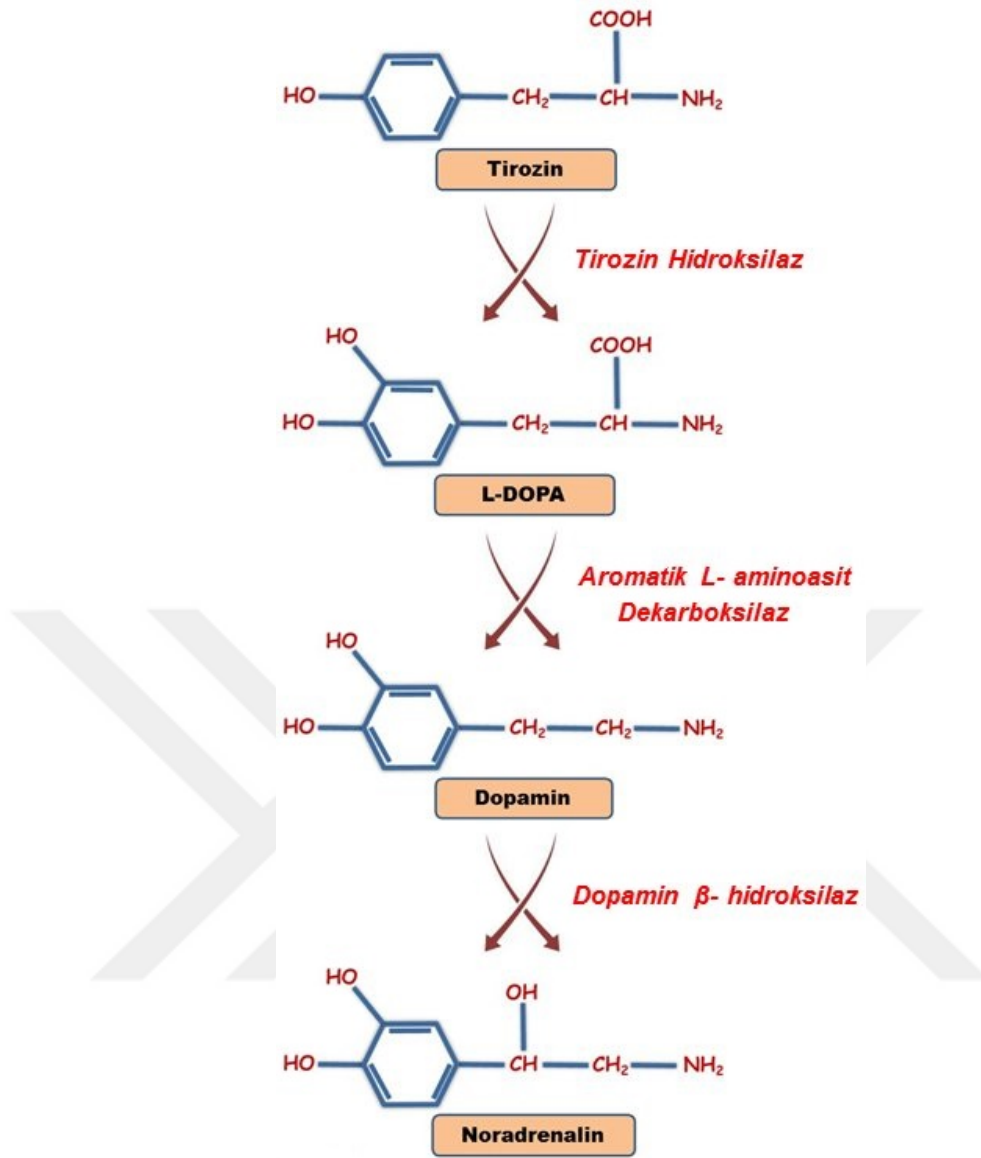
Dopamin memeli beyinde lokomotor aktivite, duygu, olumlu pekiştirme, gıda alımı ve hormon düzenlemesi de dahil olmak üzere çeşitli fonksiyonları kontrol eden baskın bir katekolamin nörotransmitterdir (164). Dopaminin bu işlevlerine büyük G protein-bağlı reseptör üst grubu üyeleri olan 5 farklı reseptör alt tipi aracılık eder. Dopamin reseptör alt tipleri, D1 benzeri grup (D1 - D5) ve D2 benzeri grup reseptörler (D2, D3 ve D4) olmak üzere iki ana alt sınıfa ayrılır (165). Genel olarak D1 benzeri reseptörler adenilat siklaz aktivitesini ve siklik AMP (cAMP) oluşumunu uyarırken, D2 benzeri reseptörler baskırlar. cAMP oluşumunun uyarılması veya baskılanmasının en önemli sonucu protein kinaz A'nın aktive olması veya baskılanmasıdır (166).

MSS'de D1 benzeri reseptörler başlıca postsinaptik, D2 benzeri reseptörler ise hem presinaptik hem de postsinaptik olmak üzere spesifik anatomik dağılım sergilerler. Hipotalamustan salınan dopamin, D2 dopamin reseptörleri aracılığıyla ön hipofizden

prolaktinin sentez ve salgılanmasını kontrol ederler. Dopamin reseptör alt tiplerinin henüz hiçbiri şizofreni gibi psikotik bozuklukların etiyojisi ile ilişkilendirilmemiştir. Ancak D3 ve D4 reseptörleri kognitif fonksiyonla ilgili bölgelerde ifade edilmektedir (167).

Merkezi dopamin sistemleri, davranışın serebral organizasyonunun yanısıra çeşitli nörolojik ve psikiyatrik hastalıklarda da önemli rollere sahiptirler (168). Kapsamlı nöropatolojik çalışmalar, subkortikal monoaminerjik yapı ve fonksiyonlarındaki anormallikler ile AH'nin patofizyolojisi arasında dikkat çekici bir ilişki olduğunu ileri sürmektedir (169, 170). Yapılan son çalışmalardaki deneysel kanıtlar da AH patogenezi ile dopaminin ilişkisini destekler niteliktedir. Alzheimer transgenik farelerden elde edilen deneysel veriler, dopaminerjik patoloji ve amiloid birikimi arasında yakın bir ilişkinin olduğunu ileri sürmektedir (171).

Beyin fonksiyonları genellikle lokal devreler içinde ve arasındaki eksitatör ve inhibitör sinyallerin kontrollü dengesi ile bu dengenin düzenlenmesinde önemli bir role sahip GABAerjik nöronlar tarafından yürütülür (172). FEZ1'in, GABAerjik nöronlarda ifade edildiği ve bu nedenle bu nöronlardaki FEZ1 eksikliğinin anormal davranışlarla sonuçlanan dopaminerjik iletimi değiştirebileceği ileri sürülmüştür (10). Yapılan bir çalışmada nükleus akumbensde FEZ1 eksikliğinin dopaminerjik iletimi değiştirdiği, bunun da davranış bozuklukları ile sonuçlandığı bildirilmiştir (172).



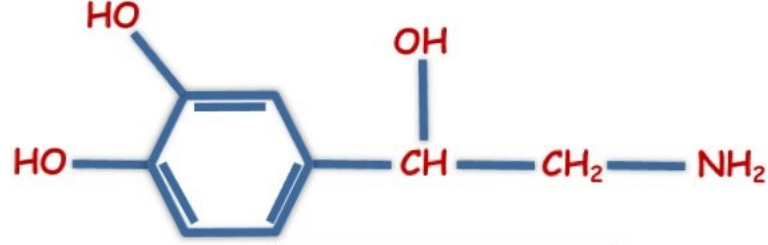
Şekil 2.20. Dopamin ve Noradrenalin sentez basamakları (163)

2.10.3. Noradrenalin

Böbrek üstü bezleri, dışta korteks ve içte medulla kısımlarından oluşmaktadır. Ana işlevleri hormon sentezini ve salgılanmasını sağlamaktır. Adrenal korteks, karmaşık bir dizi steroid hormon üretirken, sempatik sinir sisteminin bir parçası olan medulla ise katekolaminleri (adrenalin ve NA) üretir (173).

Noradrenalin önemli bir katekolaminerjik nörotransmitter olup (174), beyindeki noradrenerjik nöronlar geniş çapta yayılmış efferent projeksiyonlar aracılığı ile çoğu beyin bölgesine NA sağlamaktadırlar. Noradrenalin sentezi tirozinin kandan nörona alınması ile başlayan bir seri enzimatik adımlar ile meydana gelir. Tirozin ilk olarak

hız-kısıtlayıcı enzim olan tirozin hidroksilaz ile levodopaya; levodopada piridoksal fosfat ve DOPA dekarboksilaz enzimi aracılığı ile dopamine dönüştürülür. Dopamin ise β hidroksilaz enzimi ile etkileşerek NA'ye çevrilir (175-178; Şekil 2.21).



Şekil 2.21. Noradrenalin kimyasal yapısı (163)

Noradrenalin kendi sinyalini plazma zarından iletmek için G proteinine bağlı reseptörleri aktive eder. Bu adreseptörler 3 farklı gruba ayrılabilir: α_1 -reseptörleri (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}), α_2 -reseptörleri (α_{2A} , α_{2B} , α_{2C}) ve β -reseptörleri (β_1 , β_2 , β_3) (179). Tüm iç organların ve düz kasların hücre zarları üzerinde bulunan bu adrenerjik reseptörlerin katekolamin nörohormonlar ile etkileşime girmesi ile sinyalleşme yolları aktif hale geçer. Böylece organ fonksiyonlarında ve düz kas tonusunda değişiklikler meydana gelir. "Savaş ya da kaç" tepkisi oluşturan bu değişiklikler organizmanın hayatta kalması için hızla gerçekleştirilmelidir. Dolaşımdaki katekolaminler aynı zamanda MSS'nin işlevini etkileyen afferent duyu sinirlerinin üzerine etki göstererek hafızayı etkileyebilirler (180).

3. MATERYAL VE METOT

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylanan (23.05.2014 tarih ve 2014/A-50 Protokol no'lu) çalışmadaki tüm uygulamalar etik kurul protokolünde belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

Çalışma süresince deney hayvanlarının beslenme ve bakımı İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (İNÜ-DEHÜM); ELISA analizleri İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'da; Gerçek Zamanlı PZR analizleri ise İnönü Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Birimi araştırma laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.1. Gruplardaki Hayvan Sayılarının Belirlenmesi

Deneyleerde kullanılacak hayvanların sayısı (örneklem büyüklüğü), gruplar arası en büyük tahmini vücut ağırlık ortalaması farkı 22 gr, standart sapması 10 gr, tip 1 hata (α) 0.05 ve tip 2 hata (β) ($Güç=0.80$) ve grup sayısı 6 olduğunda; her bir grupta en az 10 hayvanın gerektiği güç analizi ile belirlendi. (Minitab for Windows, 16.2.0).

3.2. Deney Hayvanları ve Grupların Oluşturulması

Bu çalışmada İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edilen ortalama 220-280 gr ağırlığında 60 adet erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar 6 gruba ($n=10$) ayrıldı. Deneyleer süresince $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklık ve 12 saat ışık/karanlık periyoduna sahip ortamda tutulan hayvanlar, normal musluk suyu ve pellet halindeki standart sıçan yemi ile *ad libitum* olarak beslendi.

Gruplar

Sham intraserebroventriküler (ICV) kontrol grubu: Sıçanlara su tankına ve ortama alışmaları için 2 gün süreyle yüzdürme yaptırılmasından ve ardından 3. günden 8. güne kadar uygulama ve operasyonlar öncesi davranış testlerinin yapılmasının ardından bu gruptaki hayvanlara ICV enjeksiyon ile iki gün arayla (8. ve 10. günlerde)

çözücü (yapay beyin omurilik sıvısı; yBOS) enjeksiyonu yapıldı ve diğer gruplardaki hayvanlarla eş zamanlı olarak davranış testlerine tabii tutuldu.

Sham ICV+pinealektomi (PnX)+ intraperitoneal (ip) kontrol grubu: Sıçanlara su tankına ve ortama alışmaları için 2 gün süreyle yüzdürme yaptırılmasından ve ardından 3. günden 8. güne kadar uygulama ve operasyonlar öncesi davranış testlerinin yapılmasının ardından bu gruptaki sıçanlara sham PnX yapıldı ve ICV olarak iki gün arayla (8. ve 10. günlerde) yBOS enjekte edildi. İlk enjeksiyondan itibaren 14 gün süreyle hayvanlara intra peritoneal (ip) olarak melatonin çözücüsü (10 mg/kg/gün % 0.5 etanol) enjekte edildi. 22. günde davranış testlerine tekrar başlandı ve 5 gün süreyle testlere devam edildi.

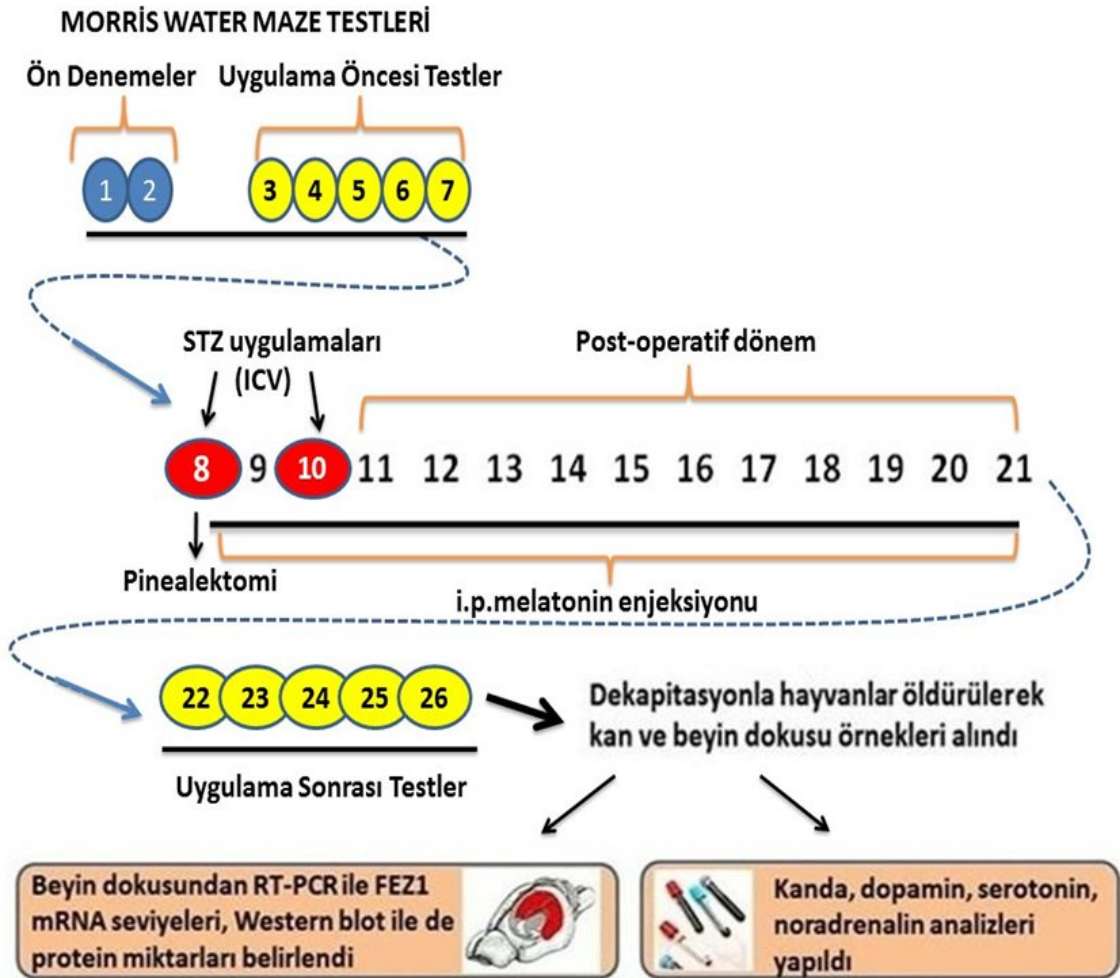
ICV Streptozotozin (STZ) grubu: Sıçanlara su tankına ve ortama alışmaları için 2 gün süreyle yüzdürme yaptırılmasından ve ardından 3. günden 8. güne kadar uygulama ve operasyonlar öncesi davranış testlerinin yapılmasının ardından bu gruptaki hayvanlara ICV olarak 8. ve 10. günlerde 3 mg/kg STZ enjeksiyonu yapıldı ve 14 gün hiçbir uygulama yapılmayıp, iyileşmeleri beklendi. 22. günde davranış testlerine tekrar başlandı ve 5 gün süreyle testlere devam edildi.

ICV STZ+Melatonin (MLT) grubu: Sıçanlara su tankına ve ortama alışmaları için 2 gün süreyle yüzdürme yaptırılmasından ve ardından 3. günden 8. güne kadar uygulama ve operasyonlar öncesi davranış testlerinin yapılmasının ardından bu gruptaki sıçanlara ICV olarak 8. ve 10. günlerde 3 mg/kg STZ enjeksiyonu yapıldı. İlk doz STZ uygulamasından 1 saat önce ip olarak 10 mg/kg/gün melatonin enjeksiyonuna başlandı ve 14 gün süreyle devam edildi (181). 22. günde davranış testlerine tekrar başlandı ve 5 gün süreyle testlere devam edildi.

ICV STZ+PnX grubu: Sıçanlara su tankına ve ortama alışmaları için 2 gün süreyle yüzdürme yaptırılmasından ve ardından 3. günden 8. güne kadar uygulama ve operasyonlar öncesi davranış testlerinin yapılmasının ardından bu gruptaki hayvanlara ICV olarak 8. ve 10. günlerde 3 mg/kg STZ enjeksiyonu yapıldı. İlk doz STZ uygulamasından hemen önce PnX yapıldı. Bu gruptaki sıçanlara 14 gün hiçbir işlem yapılmayıp, iyileşmeleri beklendi. 22. günde davranış testlerine tekrar başlandı ve 5 gün süreyle testlere devam edildi.

ICV STZ+PnX+MLT grubu: Sıçanlara su tankına ve ortama alışmaları için 2 gün süreyle yüzdürme yaptırılmasından ve ardından 3. günden 8. güne kadar uygulama ve operasyonlar öncesi davranış testlerinin yapılmasının ardından bu gruptaki sıçanlara ICV olarak 8. ve 10. günlerde 3 mg/kg STZ enjeksiyonu yapıldı. İlk doz STZ uygulamasından 1 saat önce ip olarak 10 mg/kg/gün melatonin enjeksiyonuna başlandı ve 14 gün süreyle devam edildi (181). Ayrıca İlk doz STZ uygulamasından hemen önce hayvanlara PnX işlemi de yapıldı. 22. günde davranış testlerine tekrar başlandı ve 5 gün süreyle testlere devam edildi.

ARAŞTIRMA PLANI



Şekil 3.1. Deneysel araştırma planı

3.3. Morris Su Tankı Deneyleri I. Aşama

Hayvanların uzamsal öğrenme ve hafızaları, Morris su tankı kullanılarak test edildi (182). Morris su tankı, 60 cm yüksekliğinde, 150 cm çapında paslanmaz çelikten yapılmış, siyah ve büyük bir dairesel havuzdur (Şekil 3.2). Suyun sıcaklığı otomatik ısıtıcı sayesinde $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ seviyelerinde korunabilmektedir (183). Su yüzeyinin 1 cm altına, çapı 8 cm olan sabit konumlu ve siyah renkli bir platform yerleştirilmiştir. Sıçan, yüzme zorluğundan kaçmak için platform üzerine tırmanabilecektir. Platformun yerini gizlemek için su, toksik olmayan siyah bir boya (Mixol konsantre boya renklendirici 20 ml No:1 Siyah) ile renklendirildi.



Şekil 3.2. Morris su tankı ve tankın üstten kamera görüntüsü

Havuz, 4 varsayımsal çeyrek daireye bölünmüştür (kuzey, güney, doğu, batı). Veriler, havuzun merkezi üzerinde tavana sabitlenmiş video izleme sistemine bağlı bir video kamera ile elde edildi (184). Morris su tankı testlerine başlanmadan önce tüm gruplardaki sıçanlara, su tankına ve ortama alışmaları için 2 gün süreyle günde 4 tekrar şeklinde platformsuz ön eğitim yaptırıldı (Testler, kontrol grubundaki hayvanlara da diğer gruplarla eş zamanlı olarak uygulanmıştır). Ön eğitimler bittikten sonra (3. günden

itibaren) uygulama ve operasyonlar öncesi davranış testlerine geçildi ve 5 gün süreyle günde 4 tekrar olarak yapıp veriler kaydedildi (185). 5 günlük bu testin ardından platform, bulunduğu yerden kaldırılarak (probe testi) 90 sn süreyle hayvanların tank içerisindeki kayıtları alınarak veriler analizler için kaydedildi (186).

3.4. Uygulama ve Operasyonlar

3.4.1. Hazırlık

3.4.1.1. Yapay Beyin Omurilik Sıvısının Hazırlanması

Hem çözücü olarak doğrudan uygulamak için hem de STZ'yi çözmek amacıyla kullanılacak olan yBOS hazırlamak için Tablo 3.1.'de belirtilen kimyasal bileşikler tartılarak 500 ml steril distile su içerisinde iki farklı çözelti elde edildi. 1 ve 2. çözelti 1:1 hacminde karıştırılarak yBOS elde edildi (187).

Tablo 3.1.Yapay beyin omurilik sıvısının içerdiği bileşikler ve miktarları

1. çözelti		2 çözelti	
Bileşik	Miktar (g)	Bileşik	Miktar (g)
NaCl	8.66	Na ₂ HPO ₄ . 7H ₂ O	0.214
KCl	0.224	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0.027
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0.206		
MgCl ₂ . 6H ₂ O	0.163		

3.4.1.2. STZ Çözeltisinin Hazırlanması

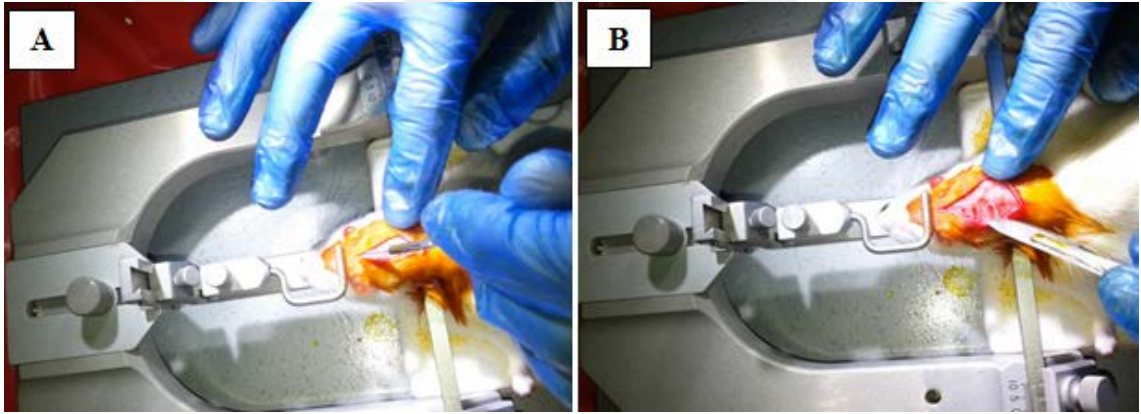
Hayvanlara ICV yolla enjekte edilecek olan STZ, biyolojik emniyet kabinde steril şartlarda taze olarak hazırlandı ve steril yBOS içerisinde çözdürülerek 3 mg/kg dozuna ayarlandı (188).

3.4.1.3. Melatonin Çözeltisinin Hazırlanması

Melatonin uygulanma öncesinde % 0.5 etanol içerisinde çözdürülerek serum fizyolojik ile uygun konsantrasyona ayarlandı (10 mg/kg). Hazırlanan bu çözelti içerisindeki etanolün final konsantrasyonunun % 0.5'den fazla olmamasına dikkat edildi (189, 190).

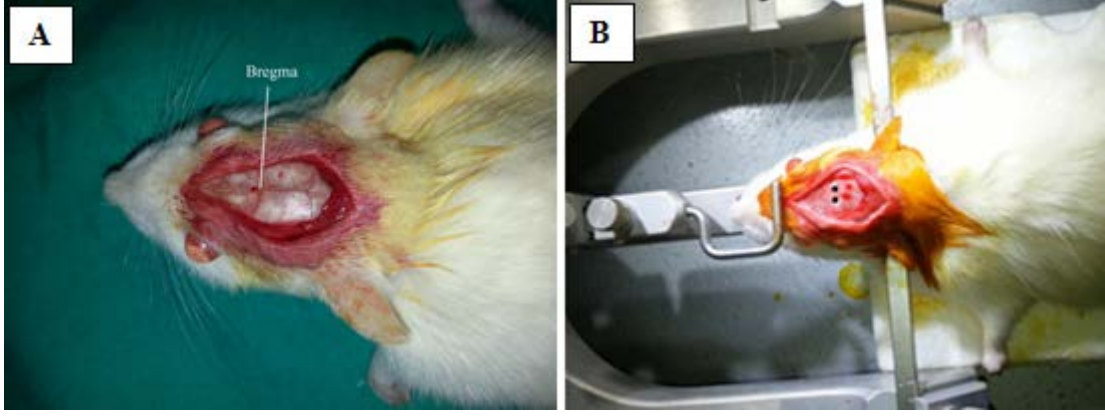
3.4.2. Stereotaksik İşlem ve ICV STZ Enjeksiyonu

Sıçanlar, ip olarak 70 mg/kg ketamin (Richter Pharma AG, Avustralya) ve 8 mg/kg xylazine (Bioveta PLC, Çek Cumhuriyeti) ile anestezi altına alındı (191). Sıçanların anesteziye girip girmediklerine parmak kıştırma ve fizyolojik yanıtların izlenmesi sonunda karar verildi. Anesteziye giren sıçanların kafa derisi traş edilerek kafatası dış kulak yolundan stereotaksik cihaza yerleştirildi (Small Animal Stereotaxic System, ASI Instruments, ABD). Antiseptik solüsyonla temizlenen kafa derisine, gözler hizasından enseye kadar bir insizyon yapılarak (Şekil 3.3A) periost sıyrıldı (Şekil 3.3B).



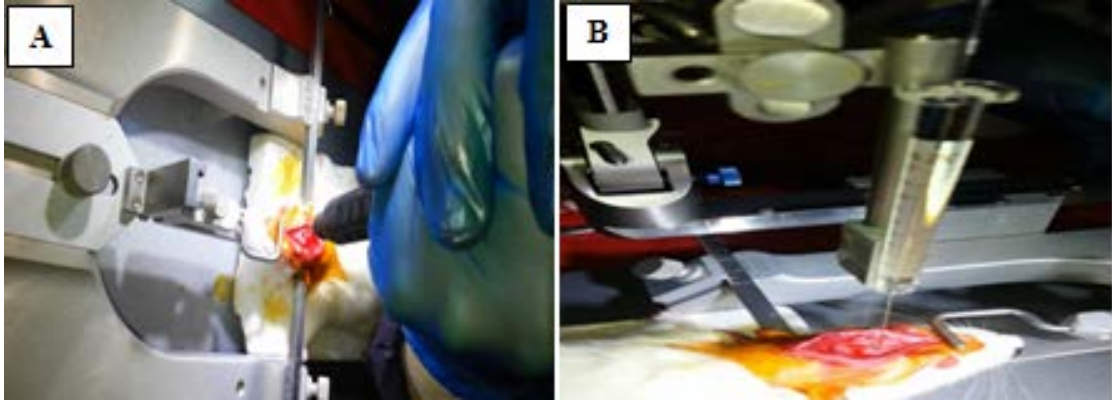
Şekil 3.3. Kafa derisine insizyon yapılması (A) ve periostun sıyrılması (B).

Paxinos-Watson Stereotaksik Rat Beyin Atlası'na göre Bregma noktası referans alınarak (Bregmadan 0.8 mm posteriyör, sagittal suturdan 1.4 mm lateral ve kafatası kemiğinden 4.8 mm vertikal) sağ ve sol lateral ventrikülün koordinatları tespit edildi (192; Şekil 3.5A-B).



Şekil 3.4. Bregma noktasının görünüşü (A) ve lateral ventriküllerin koordinatlarının belirlenmesi (B)

Kafatası kemiği üzerinde tespit edilen ve işaretlenen sağ ve sol lateral ventrikülün yeri duraya zarar vermeden 2 mm çaplı matkap ucu ile delinip (Şekil 3.6A) Hamilton enjektörü yardımıyla her iki ventriküle ICV olarak 8. ve 10. günlerde STZ ve çözücü enjeksiyonları yapıldı (193; Şekil 3.6B). Her bir sıçan için tek seferde her ventriküle 10 µl enjeksiyon yapıldı (188). İnsizyon yeri dikildikten sonra % 10 povidon iyodin sürüldü (194) ve hayvanlar iyileşmeleri için tekli kafeslere alındı.



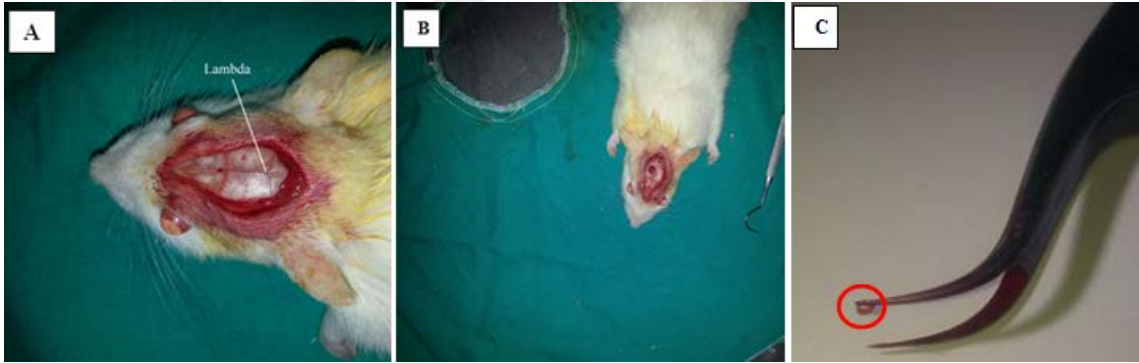
Şekil 3.5. Kafatası kemiğinin matkapla delinmesi (A) ve ventrikül içerisine STZ enjeksiyonu yapılması (B).

STZ, toprak bakterilerinden türetilen ve ilk kez 1963'te anti-kanser ajan olarak geliştirilen glukozamin-nitrozoüre bileşiği olup deney hayvanlarında diyabeti indüklediği bulunmuştur. O zamandan beri sistemik STZ uygulaması, insüline bağımlı (Tip I) diyabetin en sık başvurulanan deneysel modeli olmuştur (195). Kimyasal olarak kararsız bir molekül olan STZ, pankreas β hücrelerinde birikir ve toksik radikaller üretir

(196). Sıçanlara düşük diyabetojenik dozda ICV STZ enjekte edildiğinde beyin glukoz ve enerji metabolizmasında uzun süreli bozulmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Buna ek olarak öğrenme ve hafıza bozukluğu ile birlikte hipokampus kolin asetil transferaz düzeylerinde azalma görülmüştür (197, 198). Son zamanlarda ICV STZ modeli hatırı sayılır şekilde popülerlik kazanmaktadır (195).

3.4.3. Pinealektomi İşlemi

Sıçanlar, ip olarak 70 mg/kg ketamin ve 8 mg/kg ksilazin ile anestezi altına alındı (191). Kafatası derisine ve deri altı dokuya bir kesi yapılarak Lambda'nın ortaya çıkması sağlandı (Şekil 3.7A). Kafatasının üst kısmına mikro freze matkap (Proxxon MICROMOT 50/E, Almanya) ile 3 mm çapında dairesel bir kesi yapıldı (Şekil 3.7B) ve venöz sinüs altında yer alan pineal bez pensle tek parça halinde çıkarıldı (Şekil 3.7C).



Şekil 3.6. Lambda noktası (A), pinealektomi yapılacak bölgenin delinmesi (B) ve çıkarılan pineal bez (C)

3.5. Morris Su Tankı Deneyleri II. Aşama

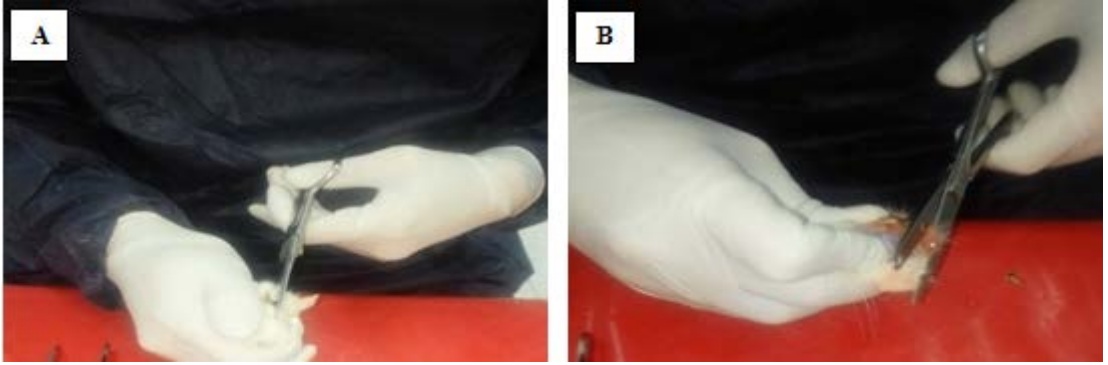
Tüm gruplara yapılan operasyon ve uygulamalardan sonra 14 gün süren post-operatif dönemin ardından (22. Günden itibaren) daha önce anlatıldığı şekilde Morris su tankı deneyleri tekrar yapıldı ve veriler kaydedildi. Davranış testleri bittikten sonra elde edilen veriler EthoVision XT10 Image Analysis (Noldus Information Tech.) software programı yardımıyla analiz edilerek, istatistik analizler kısmında belirtilen testler kullanılarak kıyaslandı.

3.6. Deneyin Sonlandırılarak Kan ve Dokuların Alınması

Son testleri takiben hayvanlar dekapitasyonla öldürülerek, kan ve beyin dokuları alındı. Alınan kan örneklerinden serum dopamin, serotonin ve NA seviyeleri belirlendi. Ayrıca hayvanların beyni çıkarılıp (işlemin ayrıntıları aşağıda beynin çıkartılması başlığı altında anlatılmıştır) hipokampus bölgesi ayrıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile FEZ1 gen ifadesi, Western blot ile de protein düzeyleri belirlendi.

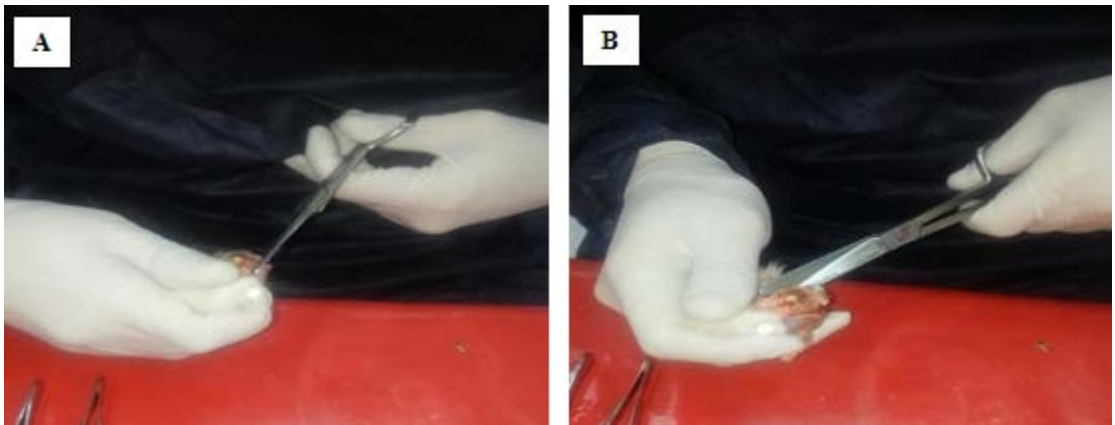
3.6.1. Beynin Çıkartılması

Dekapitasyon işlemi gerçekleştirildikten hemen sonra makasla foramen magnum'u açığa çıkarmak için kafatası üzerindeki deri ve kas tabakaları kesildi (Şekil 3.12A-B).



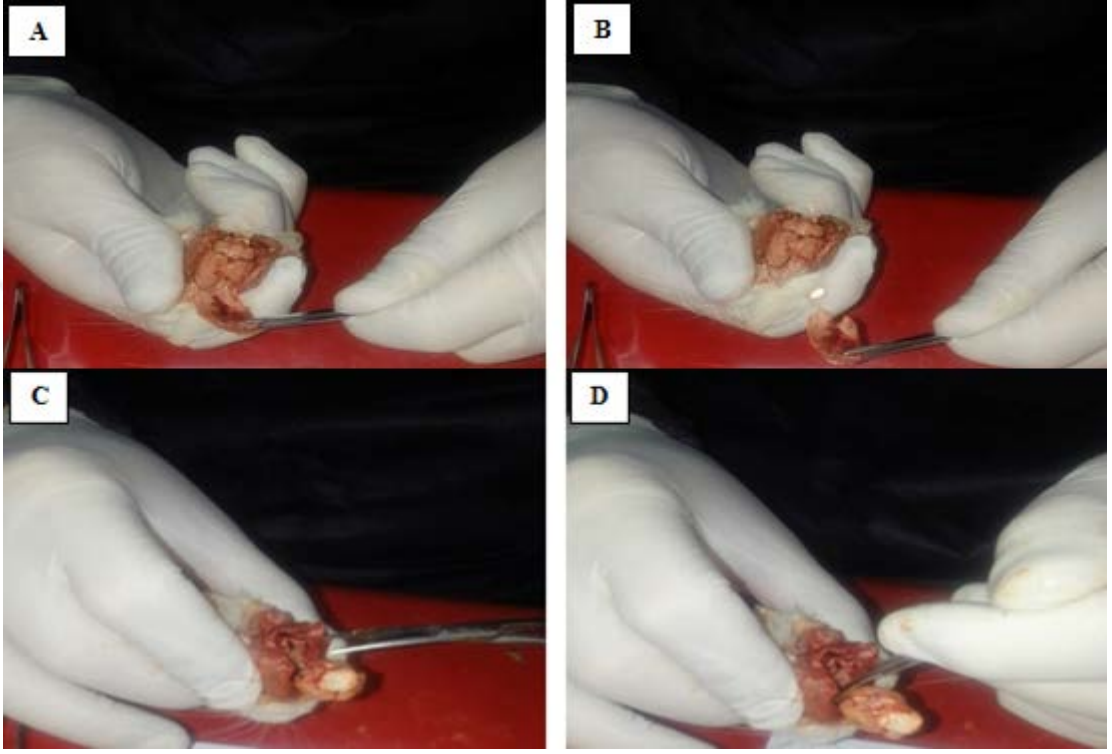
Şekil 3.7. Kafatası üzerindeki deri ve kas tabakalarının kesilmesi

Makasın bir ucu Foramen magnum'un içinden sokularak (sağlı ve sollu olarak) beyne dokunulmadan kafatası kemiği kesildi (Şekil 3.13A-B).

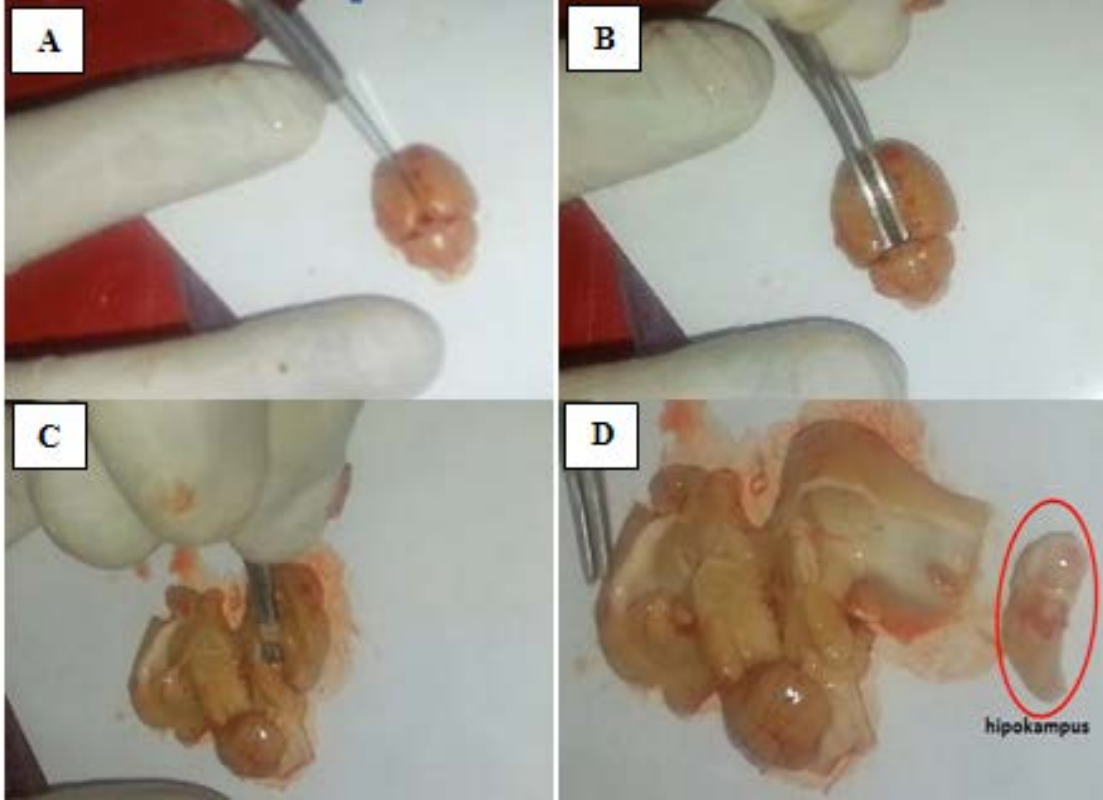


Şekil 3.8. Kafatası kemiğinin kesilmesi

Kesilen kemik bir pens yardımıyla kaldırılarak yerinden çıkarıldı (Şekil 3.14A-B). Daha sonra beyin, foramen magnum'un alt tarafından ucu küt bir pens ile sinir bağlantıları kesilerek bulunduğu yerden çıkartıldı (199; Şekil 3.14 C-D). Beyin dokusu çıkarılır çıkarılmaz hipokampus bölgesi ayrıldı (Şekil 3.15 A-D) ve RNA later solüsyonuna konularak FEZ1 gen ifadesi analizlerine kadar -80°C 'de muhafaza edildi.



Şekil 3.9. Kesilen kafatası kemiğinin kaldırılması ve beynin çıkarılması



Şekil 3.10. Hipokampus bölgesinin çıkarılması

3.7. Analizlerin Yapılması

3.7.1. Serum (ELISA) Analizleri

Sıçanların serum dopamin, serotonin ve NA seviyeleri ticari ELISA kitleri (Cusabio Biotech, ELISA kit) kullanılarak belirlendi.

3.7.1.1. Serum Noradrenalin Seviyelerinin Belirlenmesi

Analiz için sıçan NA'ye spesifik monoklonal antibody ile kaplı 96 kuyucuklu plak kullanıldı. Kitin (Cusabio Biotech, ELISA kit, Cat no: CSB-E07022r, Hubei Province, P.R. China) içeriğindeki konjüгат hariç, tüm solüsyonlar oda ısısına getirilerek çalışıldı. Kit içerisinde mevcut olan standartta 1 ml standart dilüsyon tamponu eklenerek 2000pg/ml stok standart solüsyonu hazırlandı. Daha sonra dilüsyon tamponuyla bu stok standarttan sulandırma yapılarak 0; 31.2; 62.5; 125; 500; 1000; 2000 ng/ml'lik konsantrasyonlarda standartlar hazırlandı. Numuneler ve diğer çalışma kitleri oda sıcaklığına getirildi. Yönteme uygun olarak çalışma solüsyonları dilüe edildi.

Blank olarak belirlenen kuyucuklara hiçbir şey eklenmedi. Daha önceden yerleri belirlenen standart ve numunelerden 50 µl plaktaki kuyucuklara eklendi. 50 µl antibody solüsyonu blank hariç eklenip 40 dk 37°C’de inkübe edildi. Ardından plak 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı. 100µl HRP konjüгат solüsyonu eklendi. 30 dk 37°C’de tekrar oda ısısında inkübe edildi. Plak inkübasyon sonunda 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı. Yıkamanın ardından 90 µl TMB substrat solüsyonu kuyucuklara eklenip 20 dk 37°C’de inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda 50 µl stop solüsyonu kuyucuklara eklenerek reaksiyon durduruldu. Çalışma sonunda plak okuyucu yardımıyla 450 nm’de okuması yapıldı. Kitin sensitivitesi 0.49 pg/ml’dir.

3.7.1.2. Serum Serotonin Seviyelerinin Belirlenmesi

Bu yöntemde sıçan serotoninin spesifik monoklonal antibody ile kaplı 96 kuyucuklu plak kullanıldı. Kitin (Cusabio Biotech, ELISA kit, Cat no: CSB-E083664r, Hubei Province, P.R. China) içeriğindeki konjüгат hariç, tüm solüsyonlar oda ısısına getirilerek çalışıldı. Kit içerisinde mevcut olan hazır 0; 0.2; 0.8; 3.2; 12.8; 40; 160; ng/ml’lik standartlar kullanıldı. Numuneler ve diğer çalışma kitleri oda sıcaklığına getirildi. Yönteme uygun olarak çalışma solüsyonları dilüe edildi.

Blank olarak belirlenen kuyucuklara hiçbir şey eklenmedi. Daha önceden yerleri belirlenen standart ve numunelerden 50 µl plaktaki kuyucuklara eklendi. 50 µl antibody solüsyonu ve 50 µl HRP solüsyonu blank hariç eklenip 1 saat 37°C’de inkübe edildi. Ardından plak 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı. Yıkamadan sonra 50 µl Substrat A ve 50 µl Substrate B solüsyonları tüm kuyucuklara eklendi. 15 dk 37°C’de inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda 50 µl stop solüsyonu kuyucuklara eklenerek reaksiyon durduruldu. Çalışma sonunda plak okuyucu yardımıyla 450 nm’de okuması yapıldı. Kitin sensitivitesi 0.4 ng/ml’dir.

3.7.1.3. Serum Dopamin Seviyelerinin ELISA Yöntemiyle Belirlenmesi

Sıçan dopaminin seviyesinin belirlenmesinde, sıçan dopaminin spesifik monoklonal antibody ile kaplı 96 kuyucuklu plak kullanıldı. Kitin (Cusabio Biotech, ELISA kit, Cat no: CSB-E08660r, Hubei Province, P.R. China) içeriğindeki konjüгат hariç, tüm solüsyonlar oda ısısına getirilerek çalışıldı. Kit içerisinde mevcut olan hazır 0; 0.16; 0.31; 0.63; 1.25; 2.5; 5; 10 ng/ml’lik standartlar kullanıldı. Numuneler ve diğer

çalışma kitleri oda sıcaklığına getirildi. Yönteme uygun olarak çalışma solüsyonları dilüe edildi.

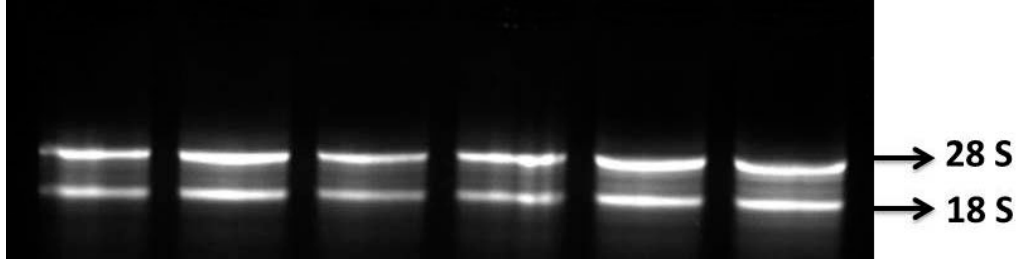
Blank olarak belirlenen kuyucuklara hiçbir şey eklenmedi. Daha önceden yerleri belirlenen standart ve numunelerden 100 µl plaktaki kuyucuklara eklendi. 2 saat 37°C’de inkübe edildi. Yıkama yapılmadan 100µl antibody solüsyonu blank hariç eklenip 1 saat 37°C’de inkübe edildi. Ardından plak 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı. Yıkamadan sonra 100µl HRP solüsyonu blank hariç eklenip 1 saat 37°C’de inkübe edildi. Plak 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı. 90 µl TMB Substrat solüsyonu tüm kuyucuklara eklendi. 15 dk 37°C’de inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda 50 µl stop solüsyonu kuyucuklara eklenerek reaksiyon durduruldu. Çalışma sonunda plak okuyucu yardımıyla 450 nm’de okuması yapıldı. Kitin sensitivitesi 0.039 ng/ml’dir.

3.7.2. Genetik Analizler

3.7.2.1. Dokudan RNA Saflaştırılması

Beyin dokusu β-Aktin ve FEZ1 mRNA seviyelerinin tespiti için gruplardan alınan beyin doku örnekleri buz üzerinde küçük parçalar halinde kesildi, RNA saklama çözültisi içine konuldu ve bu dokulardan Roche firmasının ürettiği “High Pure RNA Tissue kit” (lot no: 11596700, ref no: 12033674001) kullanılarak toplam RNA saflaştırılması yapıldı. Protokole göre önce 25 mg doku tartıldı ve üzerine 350µl “Lysis Buffer” eklendi. Daha sonra homojenizatörde 13.500 rpm hızda buz üzerinde yaklaşık 1 dakika homojenize edildi. Bunu takiben homojenatın üzerine hacminin yarısı kadar etanol eklendi ve bu karışım vortekslendikten sonra 13.000xg’de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında kolona 100 µl “Dnase” eklendi ve 15 dakika oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 500 µl Wash buffer I eklenerek 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 işlemden 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. RNA görüntülemesi UVP marka ChemiDoc it² sistemi ile ultraviyole ışık altında gerçekleştirildi. Saflaştırılan RNA'larda 28S ve 18S ribozomal bantlarının varlığı ve herhangi bir yıkılım olmadığı görüldü (Şekil 3.17).



Şekil 3.11. Her bir gruba ait beyin doku örneklerinden saflaştırılan RNA'lar

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/ μ L cinsinden hesaplandı ve 260/280 oranları yaklaşık 2 olan saf RNA örnekleri cDNA sentezinde kullanıldı.

3.7.2.2. cDNA Sentez Protokolü

cDNA sentezi için Roche firmasının ürettiği "Transcriptor First strand cDNA Synthesis" kiti (Lot no:10842322, Ref no: 04 896 866 001)" kullanıldı. cDNA sentezi firmanın önerdiği şekilde yapıldı. Kısaca 100 μ l'lik PZR tüpüne 200 ng toplam RNA, 1 μ l OligodT18 (50 pmol/ μ l), 1 μ l Random Hexamer Primer (600 pmol/ μ l) ve toplam hacim 13 μ l olacak şekilde bidistile su eklendi ve karıştırıldı. Daha sonra 65 °C'de 10 dakika PZR makinesinde ısıtıldı. Bu karışımın üzerine 4 μ l "Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer", 0.5 μ l "Protector RNase Inhibitor", 2 μ l DeoxynucleotideMix (her nükleotid için 10 mM konsantrasyonda), 0.5 μ l "Transcriptor Reverse Transcriptase" enzimi eklendi ve böylece toplam hacim 20 μ l oldu. Karıştırılan numuneler PZR makinesinde 25 °C'de 10 dakika, 55 °C'de 60 dakika ve 85 °C'de 5 dakika ısıtıldı daha sonra -20 °C'de analize kadar saklandı.

3.7.2.3. Gerçek Zamanlı PZR Protokolü

Gerçek zamanlı PZR analizi; Roche Light Cycler 96 gerçek zamanlı PZR cihazı, Roche firmasının ürettiği “Fast Start Essential DNA Probes Master kit (Lot no:10519000, Ref no: 06402682001)” ve “Real Time Ready Assay (β -Actin lot no: 90017829, config no: 100081783; Fez1 lot no: 90018146, config no: 100101827)” (8 pmol/ μ l) hidroliz problu primerler kullanılarak yapıldı. Reaksiyonlar 10 μ l toplam hacimde hazırlandı. Bunun için 5 μ l master mix, 0.5 μ l real time ready mix, 2 μ l PZR kalitesinde su ve 2.5 μ l cDNA olacak şekilde hazırlandı. Çalışmada her örnek için 3 tekrar yapıldı. PZR şartları firmanın önerdiği şekilde yapıldı; ilk denatürasyon 95°C’de 10 dakika, ikinci denatürasyon 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 3.2.’de dizilimleri ve büyüklükleri verilen primerler gen ifadelerinin analizinde kullanıldı. β -Aktin ve FEZ1 gen dizilimleri sırasıyla EK 3 ve EK 4 ‘te verilmiştir.

Tablo 3.2. β -Aktin ve FEZ1 genine ait primer dizilimleri

Gen adı	Primer dizisi (Forward ve Reverse)	Ref. Sekans no	PCR ürün büyüklüğü
β -Aktin	F: 5’CTAAGGCCAACCGTGAAAAG 3’ R: 5’GCCTGGATGGCTACGTACA 3’	NM_031144.3	79 bp
FEZ1	F: 5’CTCCAGTGAAGAACCAGTTGC 3’ R: 5’GTCAGAGCATCCCAAACCTC 3’	NM_031066.1	76 bp

Her bir örnekten saflaştırılan RNA’lardan elde edilen cDNA’lar, β -Aktin, FEZ1 genlerine özgü primerler kullanılarak gerçek zamanlı PZR ile çoğaltıldı ve gen ifadesindeki değişimler β -aktin genine oranla belirlendi.

3.7.3. Western Blot Analizi

Her doku lizatından 50 μ g total protein içeren örnekler % 6-12’lik kademedeki sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide jel (SDS-PAGE) elektroforezi ile 90V’da yürütülerek nitroselüloz membrana transfer edildi. Transfer işlemi sonrasında membran, Tween 20 içeren TBS (Tris-Buffer-Salin) (TBS/T) ile hazırlanan %5’ lik süt tozu

solüsyonunda 1 saat blotlandı ve 3 kez TBS/T ile 10' ar dakika aralarla yıkandı. %2.5' luk süt tozunda 1:1000 oranında seyreltilen monoklonal FEZ1 antikoruna ile bir gece +4°C'de inkübe edildi. Ardından 3 kez TBS/Tween20 ile 10'ar dakika yıkandı ve TBS/Tween20 de hazırlanan % 2.5'luk süt tozu solüsyonunda horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit sekonder antikoruna ile oda sıcaklığında 1 saat muamele edildi. Membran yıkamalar sonrasında 1: 1 oranında karıştırılan Luminol ve peroksit ile muamele edilerek UVP ChemiDoc-It² kemoluminesans ile görüntüledi. Yükleme kontrolü olarak β -aktin antikoruna kullanıldı ve sekonder antikor muamelesi sonrasında yıkamalar yapılarak görüntüledi. Bant yoğunlukları ImageJ kullanılarak belirlendi.

3.7.4. İstatistiksel Analizler

Veriler ortalama ve standart sapma ile özetlendi. Verilerin istatistiksel analizleri IBM SPSS Statistics version 22.0 for Windows paket programı ile yapıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testi ile değerlendirildi. Verilerin gruplar arası karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi veya tek yönlü varyans analizi kullanıldı. Çoklu karşılaştırmalarda, tek yönlü varyans analizi sonrasında homojen olmayan varyanslar için Tamhane testi, Kruskal-Wallis testi sonrasında da Conover testi kullanıldı. Gruplar arası ve günlere göre istatistiksel karşılaştırmaların gösterimi American Statistical Association (ASA) stiline göre yapıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Morris Su Tankı Test Bulguları

Morris su tankı testlerine başlamadan önce tüm gruptaki sıçanlara, su tankına ve ortama alışmaları için 2 gün süreyle günde 4 tekrar şeklinde platformsuz ön denemeler yaptırıldı. Ön denemeler bittikten sonra uygulama ve operasyonlar öncesi davranış testlerine geçildi. Tüm gruptaki hayvanlara 5 gün süreyle günde 4 tekrar olarak yaptırılan yüzme testlerinin sonuçlarının ortalamaları hesaplandı ve veriler günlük bloklar haline dönüştürüldü. Uygulama ve operasyonlar sonrası, iyileşme sürecinden sonra tekrar 5 gün süreyle (günde 4 tekrar olarak) testler yapıp elde edilen verilerin ortalamaları hesaplandı. Beş gün süreyle yapılan bu yüzdürme seanslarından elde edilen veriler grafik haline getirilerek öğrenme eğrileri elde edildi. Bu testte elde edilen parametreler sıçanların uzun süreli uzaysal bellek performanslarını yansıtmaktadır. Bu testlerden elde edilen bulgular, uygulama ve operasyonlar öncesi (preop) 5 günlük döneme ait veriler ile uygulama ve operasyonlar sonrası (postop) 5 günlük döneme ait veriler şeklinde 2 ana alt grupta sunulmuştur.

4.1.1. Uygulama ve Operasyonlar Öncesi (preop) Veriler

Sıçanlara operasyonlar öncesinde (preop) uygulanan davranış testi süresince kaydedilen ortalama platform mesafeleri, platformu bulma süreleri, kadran frekansı (hedef kadrandan geçme sıklığı), kadran süresi (hedef kadranda geçirilen süre) ve kadran süresi yüzdesi (hedef kadranda geçirilen sürenin toplam süreye oranı) aşağıda sırasıyla verilmiştir. Bu parametreler açısından deney boyunca ölçülen nicelikler (ortalama platform mesafeleri, platformu bulma süreleri, kadran frekansı, kadran süresi ve kadran süresi yüzdesi), deney gruplarındaki sıçanların hedef kadranda platformu öğrendiklerini ve bu öğrenme performansları açısından gruplar arasında istatistiksel bir fark olmadığı belirlendi (Tablo 4.1-10).

Tablo 4.1. Tüm grupların 5 günlük preop ve postop ortalama platform mesafe (cm) verilerinin günlere göre ve birbiriyle karşılaştırılması

	MESAFE PREOP 1.GÜN	MESAFE PREOP 2.GÜN	MESAFE PREOP 3.GÜN	MESAFE PREOP 4.GÜN	MESAFE PREOP 5.GÜN	MESAFE POSTOP 1.GÜN	MESAFE POSTOP 2.GÜN	MESAFE POSTOP 3.GÜN	MESAFE POSTOP 4.GÜN	MESAFE POSTOP 5.GÜN
Sham icv (Grup1)	50.91 ±5.56 Ω	45.57 ±5.42	37.98 ±4.71	32.28 ±3.36	22.90 ±2.41 #	37.15 ±6.83 ^{c, e} ■	36.15 ±4.55 ^{c, e}	36.88 ±5.15 ^e	30.89 ±4.71 ^{c, e}	25.82 ±3.81 ^{c, e} #
Sham icv+Pnx+ip (Grup2)	50.23 ±5.61 Ω	45.17 ±4.57	35.40 ±3.05	29.57 ±2.13	22.72 ±2.89 #	40.32 ±2.45 ^c ■	40.24 ±3.23	37.66 ±4.03 ^e	36.24 ±2.33 ^c	30.09 ±3.25 ^{c, d} ◇
icv STZ (Grup3)	50.65 ±4.37 Ω	42.32 ±3.27	37.19 ±3.70	28.11 ±3.03	22.96 ±2.39 #	48.84 ±3.33 ^{a, b, f} Ω	45.15 ±4.08 ^{a, d, f}	43.52 ±3.95 ^{d, f}	45.30 ±6.59 ^{a, b, d, f}	46.71 ±6.49 ^{a, b, d, e, f} Ω
icv STZ+MLT (Grup4)	50.94 ±3.67 Ω	45.99 ±6.25	36.87 ±3.91	28.49 ±2.84	22.51 ±3.26 #	42.02 ±7.86 ■	37.05 ±4.85 ^{c, e}	34.84 ±4.86 ^{c, e}	29.66 ±6.08 ^{c, e}	23,66 ±3.14 ^{b, c, e, f} #
icv STZ+Pnx (Grup5)	49.86 ±6.99 Ω	44.38 ±6.32	37.14 ±7.10	30.54 ±4.40	22.93 ±2.42 #	48.41 ±8.53 Ω	47.38 ±8.43 ^{a, d, f}	45.31 ±6.49 ^{a, b, d, f}	42.41 ±10.98 ^{a, d, f}	35.88 ±4.34 ^{a, c, d} ■
icv STZ+Pnx+MLT (Grup6)	50.33 ±7.18 Ω	43.31 ±6.12	36.06 ±5.40	28.90 ±3.70	22.47 ±2.65 #	40.28 ±5.53 ■	35.03 ±5.87 ^{c, e}	34.58 ±6.70 ^{c, e}	31.42 ±6.62 ^{c, e}	29.90 ±6.08 ^{c, d} ◇

Sütunlardaki değerler gruplar arası değişimi göstermekte olup **a:** Grup 1'e göre anlamlı **b:** Grup 2'e göre anlamlı **c:** Grup 3'e göre anlamlı **d:** Grup 4'e göre anlamlı **e:** Grup 5'e göre anlamlı **f:** Grup 6'ya göre anlamlı. (Değerler ortalama±standart hata olarak verilmiştir, anlamlılık düzeyi p<0.05)

Satırlardaki değerler günlere göre değişimi göstermekte olup karşılaştırmada farklı sembolü taşıyan değerler birbirlerinden istatistiksel olarak farklıdır. p<0.05. (Değerler ortalama±standart hata olarak verilmiştir, anlamlılık düzeyi p<0.05)

Tablo 4.2. Tüm grupların 5 günlük preop ve postop platformu bulma süre (sn) verilerinin günlere göre ve birbiriyle karşılaştırılması

	SÜRE PREOP 1.GÜN	SÜRE PREOP 2.GÜN	SÜRE PREOP 3.GÜN	SÜRE PREOP 4.GÜN	SÜRE PREOP 5.GÜN	SÜRE POSTOP 1.GÜN	SÜRE POSTOP 2.GÜN	SÜRE POSTOP 3.GÜN	SÜRE POSTOP 4.GÜN	SÜRE POSTOP 5.GÜN
Sham icv (Grup1)	50.50 ±2.50 Ω	48.58 ±3.74 ^{b, e}	37.51 ±18.29	27.10 ±6.34	21.57 ±5.05 #	46.57 ±4.99 ^f Ω	41.54 ±6.08 ^{c, f}	37.25 ±4.37 ^{c, f}	29.46 ±5.87 ^{c, e}	25.22 ±3.85 ^{c, e, f} #
Sham icv+Pnx+ip (Grup2)	49.25 ±3.05 Ω	41.20 ±6.02 ^a	33.29 ±6.26	27.98 ±5.29	21.56 ±4.77 #	44.37 ±7.28 Ω	39.99 ±5.52 ^{c, f}	36.84 ±6.25 ^{c, f}	33.50 ±6.24 ^{c, f}	28.88 ±5.28 ^{c, e, f} #
icv STZ (Grup3)	49.94 ±4.74 Ω	42.59 ±3.48	32.42 ±3.37	26.11 ±2.99	21.56 ±2.73 #	50.68 ±3.17 Ω	48.12 ±3.11 ^{a, b, d, e, f}	47.44 ±2.72 ^{a, b, d, e, f}	44.73 ±4.27 ^{a, b, d, e, f}	40.85 ±2.49 ^{a, b, d, e, f} ■
icv STZ+MLT (Grup4)	49.24 ±6.43 Ω	43.44 ±5.78	36.60 ±4.70	31.34 ±3.86	21.34 ±3.89 #	40.42 ±5.13 ■	39.26 ±4.68 ^c	35.02 ±4.45 ^{c, e, f}	28.53 ±1.74 ^{c, e}	24.66 ±3.03 ^{c, e, f} #
icv STZ+Pnx (Grup5)	51.15 ±6.52 Ω	42.13 ±3.29 ^a	37.44 ±4.29	29.38 ±4.07	21.63 ±4.25 #	44.15 ±3.33 ■	40.43 ±2.62 ^{c, f}	40.96 ±1.88 ^{c, d, f}	37.90 ±4.05 ^{a, c, d, f}	34.85 ±3.48 ^{a, b, c, d, f} ◇
icv STZ+Pnx+MLT (Grup6)	50.95 ±4.72 Ω	43.03 ±4.57	37.86 ±3.43	29.79 ±4.46	21.90 ±1.42 #	39.62 ±3.02 ■	33.90 ±1.87 ^{a, b, c, e}	29.11 ±2.31 ^{a, b, c, d, e}	25.19 ±2.46 ^{b, c, e}	19.15 ±2.78 ^{a, b, c, d, e} #

Sütunlardaki değerler gruplar arası değişimi göstermekte olup **a:** Grup 1'e göre anlamlı **b:** Grup 2'e göre anlamlı **c:** Grup 3'e göre anlamlı **d:** Grup 4'e göre anlamlı **e:** Grup 5'e göre anlamlı **f:** Grup 6'ya göre anlamlı. (Değerler ortalama±standart hata olarak verilmiştir, anlamlılık düzeyi p<0.05)

Satırlardaki değerler günlere göre değişimi göstermekte olup karşılaştırmada farklı sembolü taşıyan değerler birbirlerinden istatistiksel olarak farklıdır. p<0.05. (Değerler ortalama±standart hata olarak verilmiştir, anlamlılık düzeyi p<0.05)

Tablo 4.3. Tüm grupların 5 günlük preop ve postop kadran süre (sn) verilerinin günlere göre ve birbiriyle karşılaştırılması

	K. SÜRE PREOP 1.GÜN	K. SÜRE PREOP 2.GÜN	K. SÜRE PREOP 3.GÜN	K. SÜRE PREOP 4.GÜN	K. SÜRE PREOP 5.GÜN	K. SÜRE POSTOP 1.GÜN	K. SÜRE POSTOP 2.GÜN	K. SÜRE POSTOP 3.GÜN	K. SÜRE POSTOP L. GÜN	K. SÜRE POSTOP 5.GÜN
Sham icv (Grup1)	7.13 ±1.72 Ω	7.78 ±2.67	8.75 ±2.68	10.25 ±2.36	11.01 ±2.97 #	8.05 ±4.26 ^c Ω	8.07 ±3.17 ^c	7.89 ±3.11 ^{c, d}	7.93 ±4.08 ^{c, d}	8.57 ±2.54 ^{c, d, e} Ω
Sham icv+Pnx+ip (Grup2)	8.88 ±1.75 Ω	8.70 ±2.23	8.83 ±2.79	9.33 ±2.66	10.24 ±2.02 #	7.93 ±1.60 Ω	7.98 ±1.48 ^c	8.19 ±0.86 ^{c, d, e}	8.65 ±1.89 ^{c, e}	9.37 ±1.05 ^{c, e} #
icv STZ (Grup3)	7.50 ±1.22 Ω	9.48 ±1.49	10.44 ±1.44	11.32 ±1.32	13.02 ±2.22 #	4.98 ±2.39 ^{a, d} ■	4.83 ±1.75 ^{a, b, d, f}	4.63 ±1.44 ^{a, b, d, f}	4.78 ±1.43 ^{a, b, d, f}	5.39 ±1.00 ^{a, b, d, f} ■
icv STZ+MLT (Grup4)	7.44 ±0.81 Ω	8.16 ±1.98	10.60 ±0.95	11.49 ±1.70	12.49 ±2.48 #	8.71 ±1.38 ^{c, e} Ω	9.33 ±0.51 ^{c, e}	10.65 ±0.98 ^{a, b, c, e, f}	11.34 ±1.32 ^{a, c, e, f}	11.14 ±0.99 ^{a, c, e} #
icv STZ+Pnx (Grup5)	7.51 ±1.30 Ω	8.06 ±1.13	9.25 ±1.65	10.59 ±2.08	12.22 ±1.98 #	5.46 ±1.17 ^d ■	6.20 ±1.27 ^d	5.88 ±0.69 ^{b, d, f}	5.75 ±0.59 ^{b, d}	6.40 ±0.85 ^{a, b, d, f}
icv STZ+Pnx+MLT (Grup 6)	8.32 ±0.94 Ω	8.96 ±0.93	9.99 ±1.57	10.93 ±1.42	11.70 ±2.12 #	7.74 ±1.29 Ω	7.88 ±1.14 ^c	8.05 ±1.01 ^{c, d, e}	7.86 ±0.95 ^{c, d}	9.37 ±0.87 ^{c, e} ■

Sütunlardaki değerler gruplar arası değişimi göstermekte olup **a:** Grup 1'e göre anlamlı **b:** Grup 2'e göre anlamlı **c:** Grup 3'e göre anlamlı **d:** Grup 4'e göre anlamlı **e:** Grup 5'e göre anlamlı **f:** Grup 6'ya göre anlamlı. (Değerler ortalama±standart hata olarak verilmiştir, anlamlılık düzeyi p<0.05)

Satırlardaki değerler günlere göre değişimi göstermekte olup karşılaştırmada farklı sembolü taşıyan değerler birbirlerinden istatistiksel olarak farklıdır. p<0.05. (Değerler ortalama±standart hata olarak verilmiştir, anlamlılık düzeyi p<0.05)

Tablo 4.4. Tüm grupların 5 günlük preop ve postop kadran frekans verilerinin günlere göre ve birbiriyle karşılaştırılması

	KADRAN FREKANS PREOP 1.GÜN	KADRAN FREKANS PREOP 2.GÜN	KADRAN FREKANS PREOP 3.GÜN	KADRAN FREKANS PREOP 4.GÜN	KADRAN FREKANS PREOP 5.GÜN	KADRAN FREKANS POSTOP 1.GÜN	KADRAN FREKANS POSTOP 2.GÜN	KADRAN FREKANS POSTOP 3.GÜN	KADRAN FREKANS POSTOP 4.GÜN	KADRAN FREKANS POSTOP 5.GÜN
Sham icv (Grup1)	1.77 ±0.62	2.10 ±0.60	1.84 ±0.43	1.88 ±0.56	2.22 ±0.79	1.63 ±0.40	1.74 ±0.49	1.74 ±0.85	1.75 ±0.70	1.70±0.34
Sham icv+Pnx+ip (Grup2)	1.64 ±0.67	1.64 ±0.37	1.78 ±0.38	1.68 ±0.45	1.73 ±0.61	1.78 ±0.42	1.70 ±0.75	1.81 ±0.72	1.88 ±0.67	1.91 ±0.60
icv STZ (Grup3)	1.72 ±0.26 Ω	1.83 ±0.63	1.93 ±0.46	1.79 ±0.62	2.25 ±0.30 #	1.51 ±0.42 Ω	1.47 ±0.26	1.56 ±0.31	1.67 ±1.28	1.38 ±0.40
icv STZ+MLT (Grup4)	1.72 ±0.55 Ω	1.81 ±0.52	1.93 ±0.55	2.20 ±0.45	2.20 ±0.41 #	1.84 ±0.30	1.83 ±0.30	1.83 ±0.34	1.88 ±0.49	1.60 ±0.29
icv STZ+Pnx (Grup5)	1.72 ±0.28 Ω	1.64 ±0.57	2.04 ±0.46	2.17 ±0.33	2.28 ±0.51 #	1.52 ±0.36 Ω	1.51 ±0.47	1.55 ±0.57	1.60 ±0.34	1.67 ±0.12
icv STZ+Pnx+MLT (Grup6)	1.66 ±0.17 Ω	1.76 ±0.36	1.75 ±0.38	2.00 ±0.23	2.28 ±0.41 #	1.74 ±0.30 Ω	1.78 ±0.42	1.80 ±0.21	1.91 ±0.16	1.88 ±0.12

Satırlardaki değerler günlere göre değişimi göstermekte olup karşılaştırmada farklı sembolü taşıyan değerler birbirlerinden istatistiksel olarak farklıdır. p<0.05. (Değerler ortalama±standart hata olarak verilmiştir, anlamlılık düzeyi p<0.05)

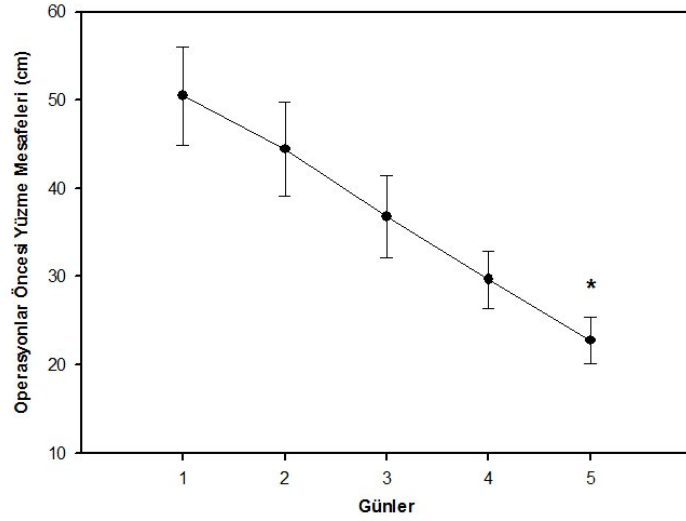
Tablo 4.5. Tüm grupların 5 günlük preop ve postop kadran süresi yüzde (%) verilerinin birbiriyle karşılaştırılması

	YÜZDE PREOP 1.GÜN	YÜZDE PREOP 2.GÜN	YÜZDE PREOP 3.GÜN	YÜZDE PREOP 4.GÜN	YÜZDE PREOP 5.GÜN	YÜZDE POSTOP 1.GÜN	YÜZDE POSTOP 2.GÜN	YÜZDE POSTOP 3.GÜN	YÜZDE POSTOP 4.GÜN	YÜZDE POSTOP 5.GÜN
Sham icv (Grup1)	15.26 ±3.27 Ω	17.08 ±5.47	26.25 ±12.70	34.46 ±9.36	53.40 ±21.95 #	17.85 ±9.82 Ω	19.73 ±7.32 ^c	21.46 ±8.36 ^c	27.18 ±13.05 ^c	34.68 ±11.56 ^{c, e} ■
Sham icv+Pnx+ip (Grup2)	18.95 ±3.93 Ω	19.92 ±7.27	27.56 ±12.69	35.97 ±11.47	47.41 ±14.39 #	18.15 ±3.78 ^{c, e} Ω	20.24 ±4.33 ^c	22.74 ±3.79 ^{c, d, e}	26.43 ±6.08 ^{c, d, e}	33.36 ±6.46 ^{c, d, e, f} ■
icv STZ (Grup3)	15.11 ±2.09 Ω	23.29 ±2.98 ^e	33.14 ±5.08 ^e	45.42 ±6.63 ^f	65.26 ±10.28 ^f #	9.96 ±5.05 ^{b, d, f} ■	10.05 ±3.55 ^{a, b, d, e, f}	9.78 ±3.04 ^{a, b, d, e, f}	10.74 ±3.26 ^{a, b, d, e, f}	13.23 ±2.39 ^{a, b, d, e, f} Ω
icv STZ+MLT (Grup4)	15.35 ±2.64 Ω	20.77 ±3.94	30.52 ±3.33	42.14 ±5.53	65.06 ±13.84 #	21.81 ±4.17 ^{c, e} Ω	24.02 ±2.55 ^{c, e}	30.76 ±4.05 ^{b, c, e}	39.97 ±5.81 ^{b, c, e, f}	40.00 ±8.37 ^{b, c, e} ■
icv STZ+Pnx (Grup5)	13.41 ±3.46 Ω	17.81 ±3.02 ^c	24.57 ±4.73 ^c	35.23 ±9.03	60.40 ±13.50 #	12.54 ±3.31 ^{b, d, f} Ω	15.43 ±3.46 ^{c, d, f}	14.35 ±1.45 ^{b, c, d, f}	15.29 ±1.98 ^{b, c, d, f}	18.45 ±2.53 ^{a, b, c, d, f} ■
icv STZ+Pnx+MLT (Grup6)	16.73 ±2.98 Ω	20.52 ±3.68	26.25 ±3.95	35.28 ±6.01 ^c	47.38 ±10.11 ^c #	19.66 ±3.57 ^{c, e} Ω	23.37 ±3.99 ^{c, e}	27.84 ±4.37 ^{c, e}	31.48 ±5.17 ^{c, d, e}	49.76 ±7.98 ^{b, c, e} #

Sütunlardaki değerler gruplar arası değişimi göstermekte olup **a:** Grup 1'e göre anlamlı **b:** Grup 2'e göre anlamlı **c:** Grup 3'e göre anlamlı **d:** Grup 4'e göre anlamlı **e:** Grup 5'e göre anlamlı **f:** Grup 6'ya göre anlamlı. (Değerler ortalama±standart hata olarak verilmiştir, anlamlılık düzeyi p<0.05)

Satırlardaki değerler günlere göre değişimi göstermekte olup karşılaştırmada farklı sembolü taşıyan değerler birbirlerinden istatistiksel olarak farklıdır. p<0.05. (Değerler ortalama±standart hata olarak verilmiştir, anlamlılık düzeyi p<0.05)

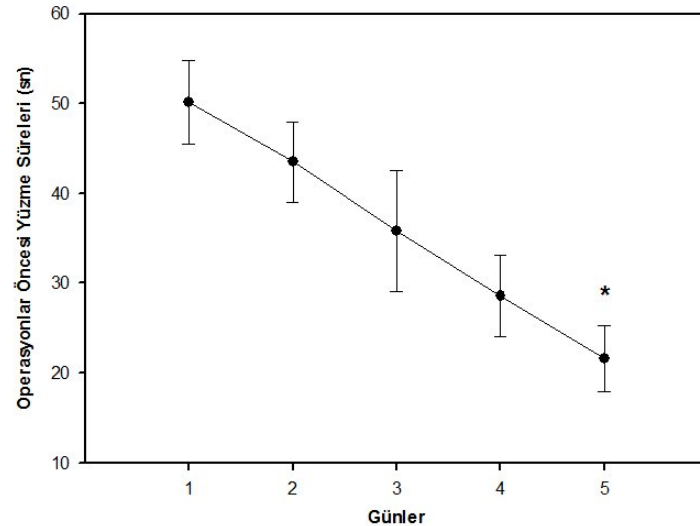
Günlere bağı olarak azalan yüzme mesafenin istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0.05$), gruplar arasında ise azalış kalıbı açısından bir fark olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Preop 5 günlük yüzdürme testlerinde ortalama platform mesafeleri.

(Değerler ortalama±standart hata olarak verilmiştir, anlamlılık düzeyi $p<0.05$. Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.)

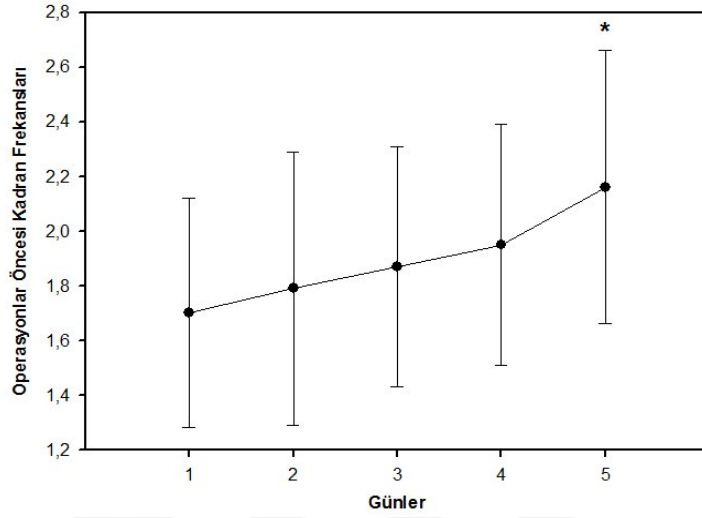
Günlere bağı olarak azalan yüzme sürelerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0.05$), gruplar arasında ise süre azalması bakımından bir fark olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Preop 5 günlük yüzdürme testlerinde platformu bulma süreleri.

(Değerler ortalama±standart hata olarak verilmiştir, anlamlılık düzeyi $p<0.05$. Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.)

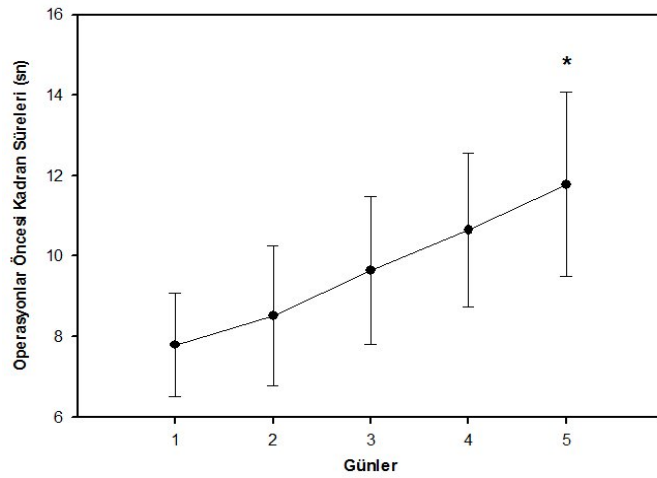
Günlere bağı olarak artan kadran frekanslarının istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0.05$), gruplar arasında ise artış kalıbı açısından bir fark olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Preop 5 günlük yüzdürme testlerinde kadran frekansları.

(Değerler ortalama±standart hata olarak verilmiştir, anlamlılık düzeyi $p<0.05$. Dikey çubuklar ortalamamın standart hatasını göstermektedir.)

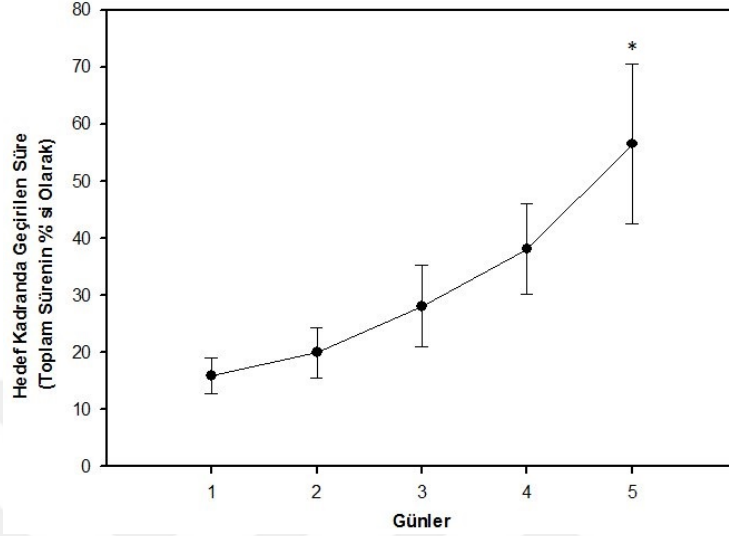
Günlere bağı olarak artan kadran sürelerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0.05$), gruplar arasında ise artış kalıbı açısından bir fark olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Preop 5 günlük yüzdürme testlerinde kadran süreleri.

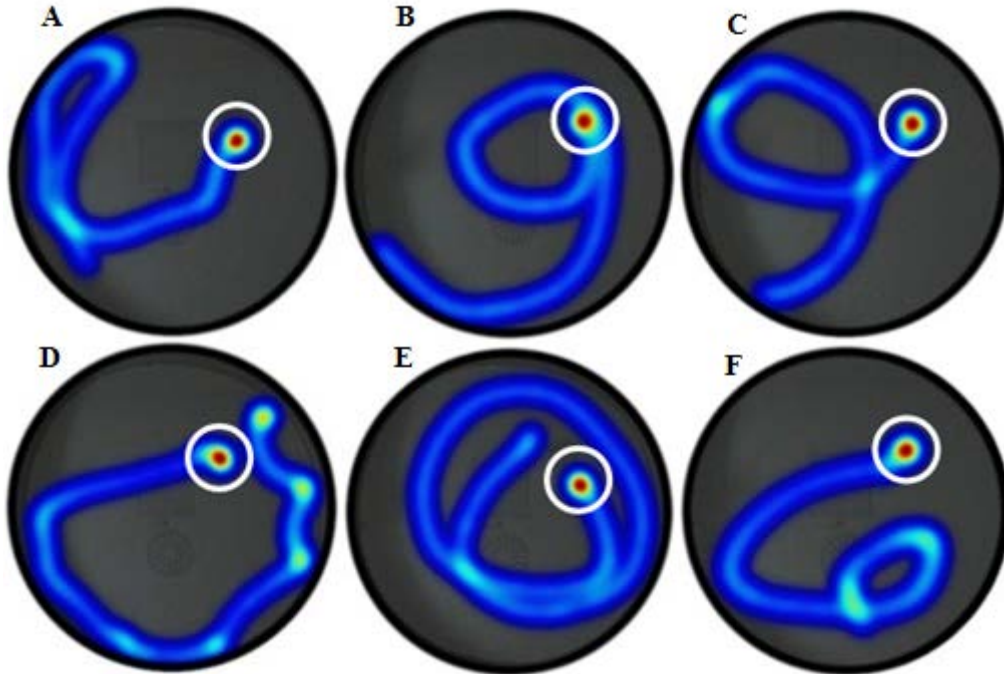
(Değerler ortalama±standart hata olarak verilmiştir, anlamlılık düzeyi $p<0.05$. Dikey çubuklar ortalamamın standart hatasını göstermektedir.)

Günlere bağılı olarak artan kadran süresi yüzdelerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0.05$), gruplar arasında ise artış kalıbı açısından bir fark olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Preop 5 günlük yüzdürme testlerinde kadran süresi yüzdeleri.

(Değerler ortalama±standart hata olarak verilmiştir, anlamlılık düzeyi $p<0.05$. Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.)



Şekil 4.6. Preop platformun yerini öğrenmiş sıçanlarının haritaları.

(Beyaz halka platformun yerini göstermektedir.)

4.1.2. Uygulama ve Operasyonlar Sonrası (postop) Veriler

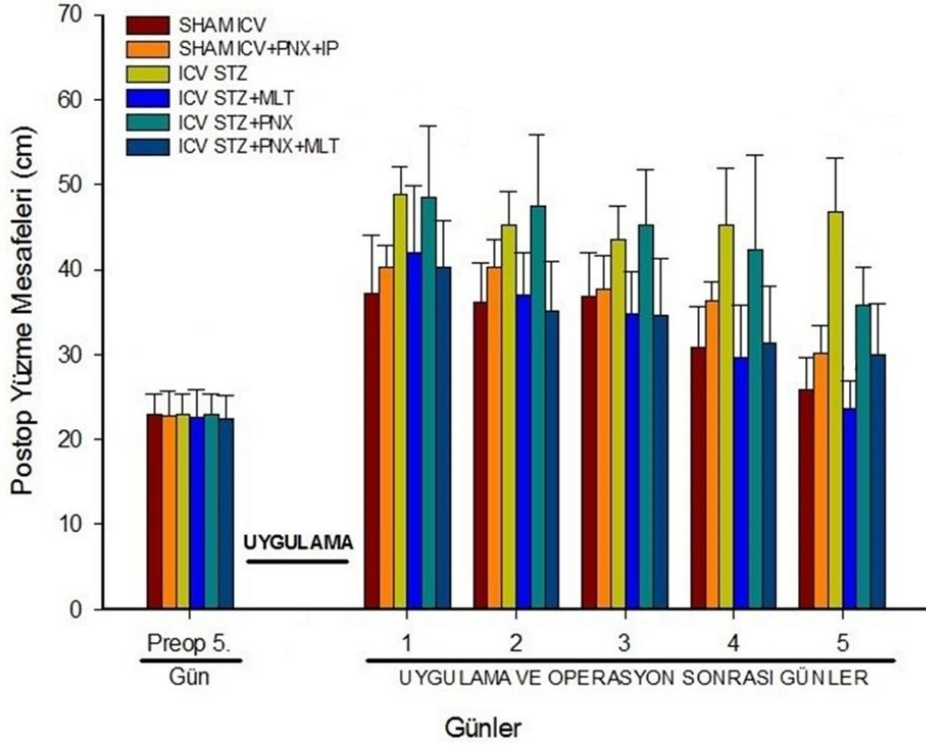
Uygulama ve operasyonlar sonrası 14 günlük iyileşme sürecinden sonra 5 gün süreyle günde 4 tekrar olarak yapılan testlerden her grup için elde edilen verilerin ortalamaları hesaplandı ve günlük bloklar haline dönüştürülen veriler, hem gruplar arası hem de grup içi kıyaslamaları yapılarak Tablo 4.1-10'da sunuldu. Preop yapılan davranış testlerinin 5. gün verileri ile postop yapılan davranış testlerinin 5 günlük verileri sütun grafik haline getirildi. Grupların test periyodu boyunca ortalama platform mesafeleri, platformu bulma süreleri, kadran frekansı (hedef kadrandan geçme sıklığı), kadran süresi (hedef kadranda geçirilen süre) ve kadran süresinin yüzdeleri (hedef kadranda geçirilen sürenin toplam süreye oranı) istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve aşağıda şekil olarak sunulmuştur.

a- Platformu bulmak için katedilen yüzme mesafeleri

Preop 5. gün verilerinde grupların (Sham ICV, Sham ICV+PnX+ip, ICV STZ, ICV STZ+MLT, ICV STZ+PnX, ICV STZ+PnX+MLT) birbirleri arasında herhangi bir farklılığın olmadığı belirlendi ($p<0.05$). Grupların preop 5. gün ortalama platformu bulmak için katettikleri yüzme mesafeleri ile postop 1. gün verileri karşılaştırıldığında tüm gruplarda post 1. gün verilerinin preop 5. gün verilerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlendi ($p<0.05$).

Deney gruplarının postop 1. gün ortalama platform mesafeleri ile postop 5. gün verileri karşılaştırıldığında ICV STZ grubu hariç diğer gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir. ICV STZ grubu sıçanların ortalama platform mesafelerinde bir azalma gözlenmemiştir (Şekil 4.7).

Postop 5. güne ait ortalama platforma ulaşma mesafeleri gruplar arası karşılaştırıldığında ICV STZ grubunun diğer gruplara (Sham ICV, Sham ICV+PnX+ip, ICV STZ+MLT, ICV STZ+PnX, ICV STZ+PnX+MLT) göre anlamlı yüksek olduğu belirlendi ($p<0.05$). Bunun yanında ICV STZ+PnX grubu ortalama platform mesafelerinin, Sham ICV grubuna ve ICV STZ+MLT grubuna göre anlamlı yüksek olduğu belirlendi ($p<0.05$). ICV STZ+PnX+MLT grubu ortalama platform mesafelerinin ise ICV STZ+MLT grubuna göre anlamlı yüksek olduğu belirlendi ($p<0.05$).



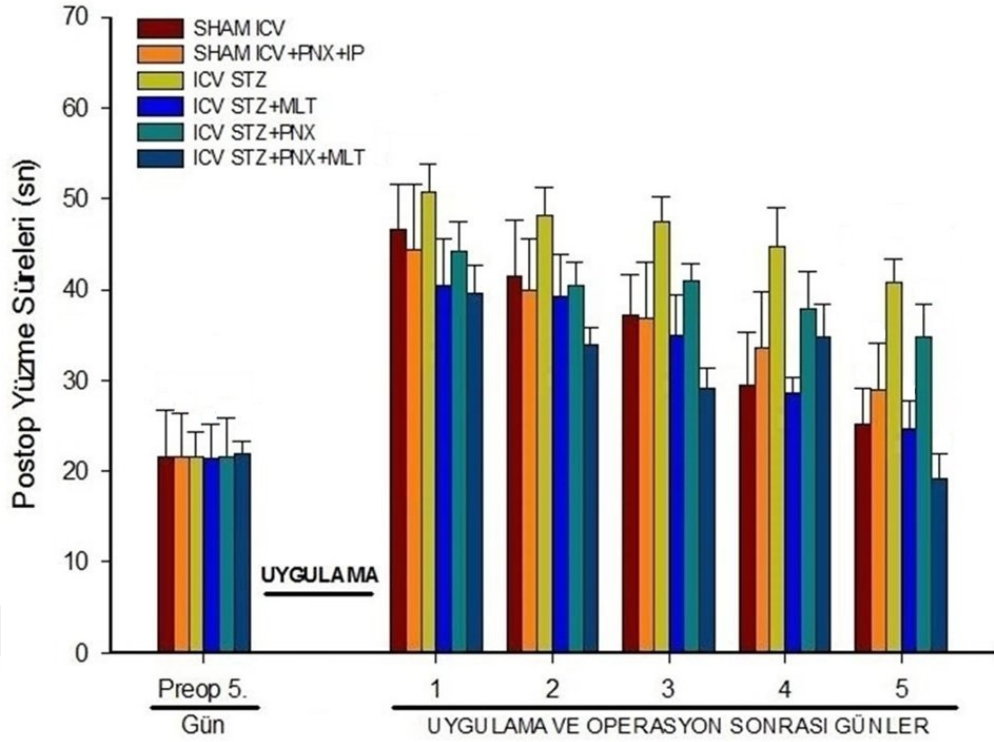
Şekil 4.7. Postop 5 günlük yüzdürme testlerinde ortalama platform mesafeleri.

(Gruplar arası ve günlere göre karşılaştırmalardaki istatistiksel anlamlılık Tablo 4.1' de gösterilmiştir. Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.)

b- Platformu bulma süreleri

Preop 5. gün verilerinde grupların (Sham ICV, Sham ICV+PnX+ip, ICV STZ, ICV STZ+MLT, ICV STZ+PnX, ICV STZ+PnX+MLT) birbirleri arasında herhangi bir farklılığın olmadığı belirlendi. Grupların preop 5. gün yüzme süreleri ile postop 1. gün verileri karşılaştırıldığında tüm gruplarda post 1. gün verilerinin preop 5. gün verilerine göre istatistiksel olarak yüksek olduğu belirlendi ($p < 0.05$). Deney gruplarının postop 1. gün yüzme süreleri ile postop 5. gün verileri karşılaştırıldığında tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$) (Şekil 4.8).

Postop 5. güne ait yüzme süreleri gruplar arası karşılaştırıldığında ıcv STZ grubunun diğer gruplara (Sham ICV, Sham ICV+PnX+ip, ICV STZ+MLT, ICV STZ+PnX, ICV STZ+PnX+MLT) göre anlamlı yüksek olduğu belirlendi ($p < 0.05$). ICV STZ+PnX grubuna ait yüzme sürelerinin Sham ICV, Sham ICV+PnX+ip ve ICV STZ+MLT grupları verilerine göre istatistiksel olarak yüksek olduğu gözlemlendi. ($p < 0.05$). ICV STZ+PnX+MLT grubuna ait yüzme sürelerinde ise diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$)

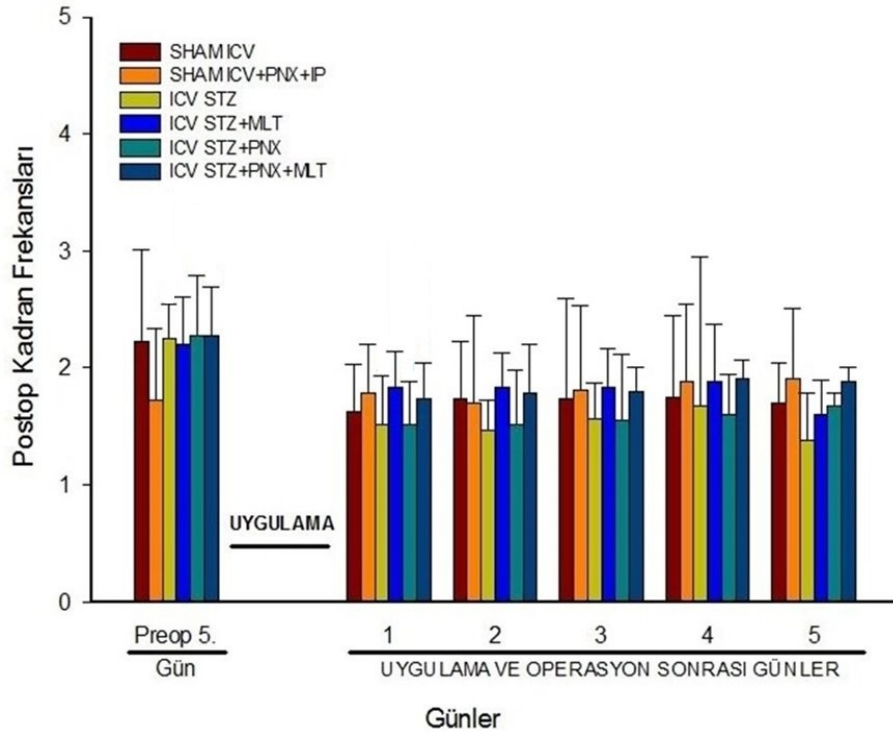


Şekil 4.8. Postop 5 günlük yüzdürme testlerinde yüzme süreleri.

(Gruplar arası ve günlere göre karşılaştırmalardaki istatistiksel anlamlılık Tablo 4.2' de gösterilmiştir. Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.)

c- Kadran frekansı

Grupların preop 5. gün kadran frekansları ile postop 1. gün verileri karşılaştırıldığında ICV STZ, ICV STZ+PnX ve ICV STZ+PnX+MLT gruplarının preop 5. gün kadran frekanslarının postop 1. gün verilerine göre istatistiksel olarak yüksek olduğu belirlendi ($p < 0.05$) (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Postop 5 günlük yüzdürme testlerinde kadran frekansları.

(Gruplar arası ve günlere göre karşılaştırmalardaki istatistiksel anlamlılık Tablo 4.4' de gösterilmiştir. Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.)

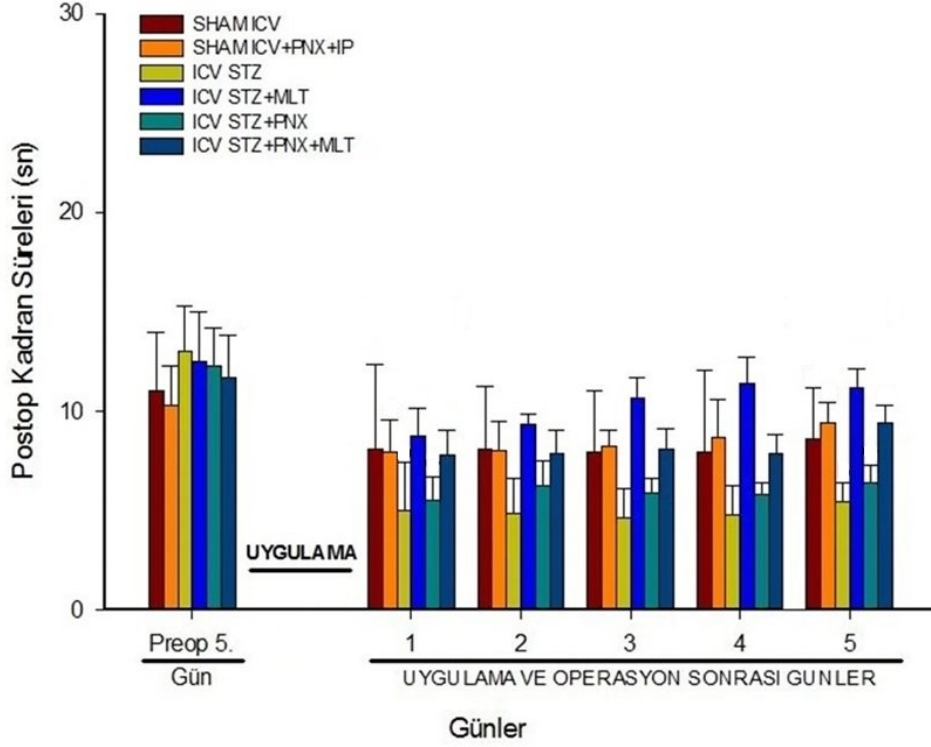
d- Kadran süresi

Preop 5. gün kadran süreleri ile postop 1. gün kadran süreleri karşılaştırıldığında tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Postop 1. gün kadran süreleri ile postop 5. gün kadran süreleri karşılaştırıldığında ise ICV STZ ve ICV STZ+PnX grupları haricinde diğer grupların kadran sürelerinin istatistiksel olarak yüksek olduğu belirlendi ($p<0.05$).

Postop 1. gün kadran süreleri gruplar arası karşılaştırıldığında Sham ICV ve ICV STZ+MLT gruplarının, ICV STZ grubuna göre istatistiksel olarak yüksek olduğu belirlendi ($p<0.05$). ICV STZ ve ICV STZ+PnX gruplarının kadran sürelerinde ICV STZ+MLT grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). ICV STZ+MLT grubunun kadran sürelerinin ICV STZ+PnX grubuna göre istatistiksel olarak yüksek olduğu belirlendi ($p<0.05$).

Postop 5. gün kadran süreleri gruplar arası karşılaştırıldığında ICV STZ ve ICV STZ+PnX gruplarının kadran sürelerinde diğer grupların kadran sürelerine göre

istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Sham ICV, Sham ICV+PnX+ip, ICV STZ+MLT ve ICV STZ+PnX+MLT gruplarının kadran sürelerinin ICV STZ ve ICV STZ+PnX gruplarının kadran sürelerine göre istatistiksel olarak yüksek olduğu belirlendi ($p<0.05$) (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Postop 5 günlük yüzdürme testlerinde kadran süreleri.

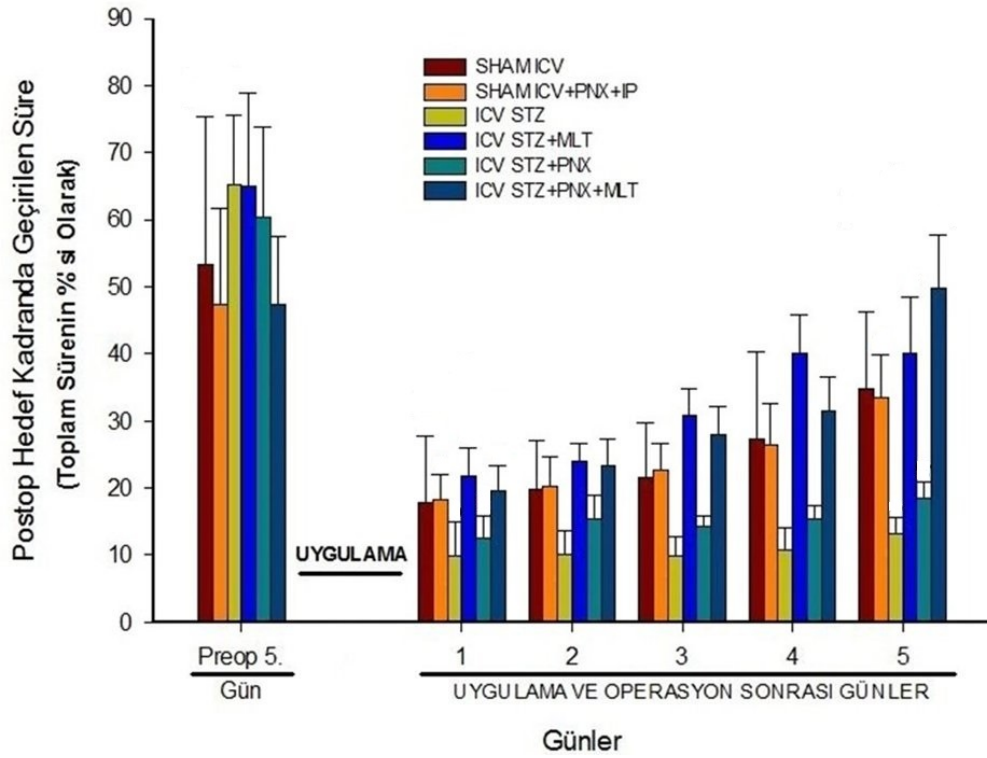
(Gruplar arası ve günlere göre karşılaştırmalardaki istatistiksel anlamlılık Tablo 4.3' de gösterilmiştir. Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.)

e- Kadran süresi yüzdesi

Preop 5. gün kadran süresi yüzdeleri ile postop 1. gün kadran süresi yüzdeleri karşılaştırıldığında tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Postop 1. gün kadran süresi yüzdeleri ile postop 5. gün kadran süresi yüzdeleri karşılaştırıldığında ise tüm grupların kadran süresi yüzdelерinin istatistiksel olarak yüksek olduğu belirlendi ($p<0.05$) (Şekil 4.11).

Preop 5. gün kadran süresi yüzdeleri gruplar arası karşılaştırıldığında ICV STZ grubu kadran süresi yüzdelерinin ICV STZ+PnX+MLT grubu verilerine göre

istatistiksel olarak yüksek olduğu belirlendi ($p<0.05$). Postop 1. gün kadran süresi yüzdeleri gruplar arası karşılaştırıldığında Sham ICV+PnX+ip, ICV STZ+MLT ve ICV STZ+PnX+MLT gruplarının kadran süresi yüzdelerinin ICV STZ ve ICV STZ+PnX gruplarının kadran süresi yüzdelerine göre istatistiksel olarak yüksek olduğu belirlendi ($p<0.05$). Postop 5. gün kadran süresi yüzdeleri gruplar arası karşılaştırıldığında ICV STZ ve ICV STZ+PnX gruplarının kadran süresi yüzdelerinde diğer grupların verilerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). ICV STZ+MLT ve ICV STZ+PnX+MLT gruplarının kadran süresi yüzdelerinin Sham ICV+PnX+ip, ICV STZ ve ICV STZ+PnX gruplarının verilerine göre istatistiksel olarak yüksek olduğu belirlendi ($p<0.05$).



Şekil 4.11. Postop 5 günlük yüzdürme testlerinde kadran süresi yüzdeleri.

(Gruplar arası ve günlere göre karşılaştırmalardaki istatistiksel anlamlılık Tablo 4.5' de gösterilmiştir. Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.)

4.1.3. Probe Test Verileri ve Karşılaştırmaları

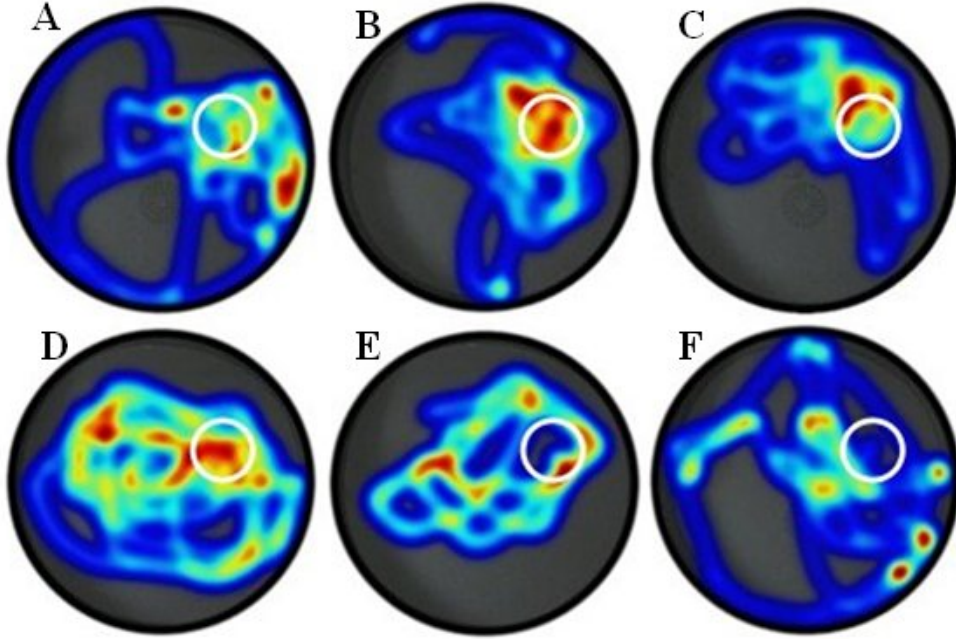
Probe testler, uygulama ve operasyonlar öncesi (preop) probe testi ile uygulama ve operasyonlar sonrası (postop) probe testi olmak üzere iki kez yapıldı. Sıçanların preop ve postop kadran frekansları ile kadran süreleri karşılaştırıldı. Preop probe test kadran frekans verilerinde gruplar arasında (Sham ICV, Sham ICV+PnX+ip, ICV STZ, ICV STZ+MLT, ICV STZ+PnX, ICV STZ+PnX+MLT) herhangi bir farklılığın olmadığı belirlendi.

Postop probe test kadran frekans verileri gruplar arası karşılaştırıldığında Sham ICV ve Sham ICV+PnX+ip gruplarının kendi aralarında bir farklılığın olmadığı ancak kadran frekans verilerinin diğer grupların verilerine göre istatistiksel olarak yüksek olduğu belirlendi ($p<0.05$). ICV STZ ve ICV STZ+PnX grupları kadran frekans verileri arasında herhangi bir anlamlı fark gözlenmezken bu grupların verilerinin diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde düşük olduğu tespit edildi ($p<0.05$). ICV STZ+MLT ve ICV STZ+PnX+MLT grupları kadran frekans verileri arasında herhangi bir anlamlı fark gözlenmezken Sham ICV ve Sham ICV+PnX+ip gruplarına göre istatistiksel olarak düşük olduğu ($p<0.05$), ICV STZ ve ICV STZ+PnX grupları kadran frekans verilerine göre ise istatistiksel olarak yüksek olduğu belirlendi ($p<0.05$) (Tablo 4.11).

Tablo 4.11. Probe test uygulamasında preop ve postop kadran frekanslarının karşılaştırılması

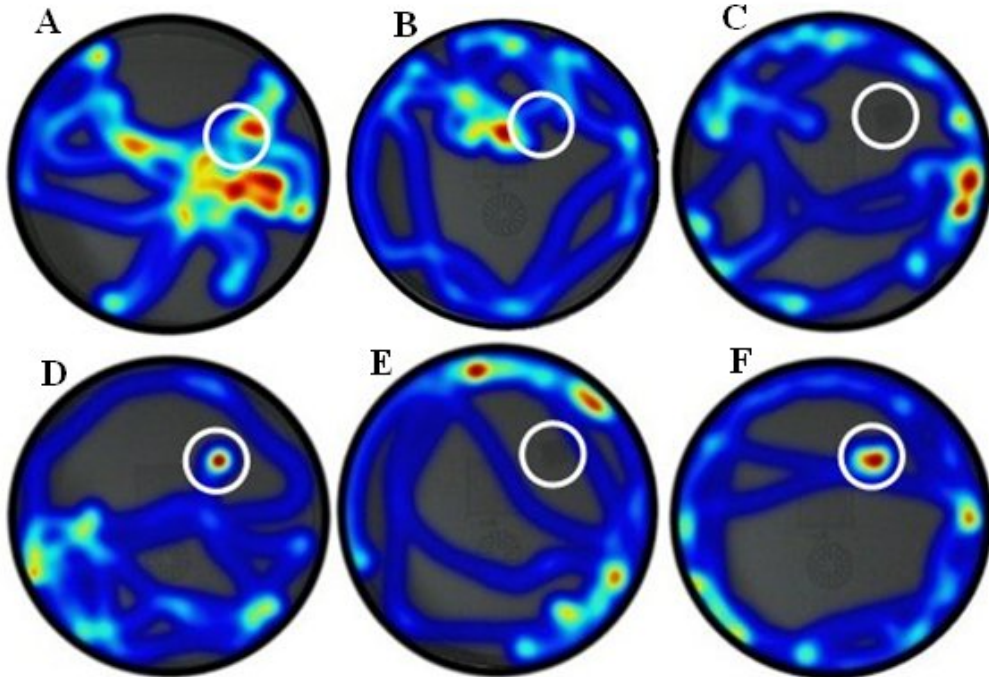
GRUP	n	Preop probe test kadran frekansı	Postop probe test kadran frekansı
Sham ICV	10	6.99 (5.25-8.75)	6.50 (5.50-9.00) ^a
Sham ICV+PnX+ip	10	6.96 (5.00-7.56)	5.63 (4.75-10.25) ^a
ICV STZ	10	6.85 (5.68-7.75)	3.38 (1.25-5.00) ^b
ICV STZ+MLT	10	6.73 (5.75-7.75)	4.75 (3.75-6.75) ^c
ICV STZ+PnX	10	6.75 (6.25-7.50)	3.75 (2.75-4.75) ^b
ICV STZ+PnX+MLT	10	6.50 (5.75-7.75)	4.75 (4.75-6.50) ^c

(Değerler ortanca (en küçük-en büyük) olarak ifade edildi. Sütunlarda aynı harfi taşıyan gruplar arasında anlamlı bir fark olmayıp, farklı harfleri taşıyan gruplar birbirlerine göre istatistiksel olarak anlamlı. ($p<0.05$.)



Şekil 4.12. Sıçanların preop probe test ısı haritaları.

(A:Sham ICV; B: Sham ICV+PnX+ip;C: ICV STZ; D: ICV STZ+MLT; E: ICV STZ+PnX; F: ICV STZ+PnX+MLT). (Beyaz halka platformun kaldırıldığı yeri göstermektedir.)



Şekil 4.13. Sıçanların postop probe test ısı haritaları.

(A:Sham ICV; B: Sham ICV+PnX+ip;C: ICV STZ; D: ICV STZ+MLT; E: ICV STZ+PnX; F: ICV STZ+PnX+MLT). (Beyaz halka platformun kaldırıldığı yeri göstermektedir.)

Postop probe test kadran süresi verileri gruplar arası karşılaştırıldığında Sham ICV ve Sham ICV+PnX+ip gruplarının kendi aralarında bir farklılığın olmadığı ancak kadran süresi verilerinin diğer grupların verilerine göre istatistiksel olarak yüksek olduğu belirlendi ($p<0.05$). ICV STZ ve ICV STZ+PnX grupları kadran süreleri verileri arasında herhangi bir anlamlı fark gözlenmezken bu grupların verilerinin diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde düşük olduğu tespit edildi ($p<0.05$). ICV STZ+MLT ve ICV STZ+PnX+MLT grupları kadran süreleri verileri arasında herhangi bir anlamlı fark gözlenmezken Sham ICV ve Sham ICV+PnX+ip gruplarına göre istatistiksel olarak düşük olduğu ($p<0.05$), ICV STZ ve ICV STZ+PnX grupları kadran süresi verilerine göre ise istatistiksel olarak yüksek olduğu belirlendi ($p<0.05$) (Tablo 4.12).

Tablo 4.12. Probe test uygulamasında preop ve postop kadran sürelerinin karşılaştırılması

GRUP	n	Preop probe test kadran süresi	Postop probe test kadran süresi
Sham ICV	10	32.82 (29.54-35.64)	31.72 (23.24-36.98) ^a
Sham ICV+PnX+ip	10	31.26 (30.11-33.94)	27.39 (22.45-36.74) ^a
ICV STZ	10	31.63 (30.16-33.92)	19.29 (14.04-25.42) ^b
ICV STZ+MLT	10	31.09 (29.11-32.68)	25.98 (25.46-27.97) ^c
ICV STZ+PnX	10	30.87 (27.67-39.48)	17.45 (13.03-19.70) ^b
ICV STZ+PnX+MLT	10	30.95 (28.22-32.77)	26.10 (25.46-29.16) ^c

(Değerler ortanca (en küçük-en büyük) olarak ifade edildi. Sütunlarda aynı harfi taşıyan gruplar arasında anlamlı bir fark olmayıp, farklı harfleri taşıyan gruplar birbirlerine göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$.)

4.2. Biyokimyasal Analiz Bulguları

4.2.1. Serum Noradrenalin Seviyelerinin Analiz Bulguları

Tablo 4.13. Tüm deney gruplarındaki serum Noradrenalin seviyeleri

GRUP	n	Noradrenalin (pg/ml)
Sham ICV (Grup1)	10	1364.09±403.74 ^{c, d, e, f}
Sham ICV +PnX+ip (Grup2)	10	1339.59±633.9 ^{c, d, e, f}
ICV STZ (Grup3)	10	712.1±189.52 ^{a, b, f}
ICV STZ+MLT (Grup4)	10	700.83±409.44 ^{a, b}
ICV STZ+PnX (Grup5)	10	630.69±316.38 ^{a, b}
ICV STZ+PnX+MLT (Grup6)	10	515.88±222.5 ^{a, b, c}

Değerler ortalama±standart hata olarak verilmiştir, anlamlılık düzeyi $p<0.05$. (Her gruba ait satırlardaki sayısal değerlerin taşıdığı harfler, istatistiksel olarak hangi grup veya gruplara göre farklı olduğunu ifade etmektedir $p<0.05$). (a: Grup 1'e göre anlamlı, b: Grup 2'e göre anlamlı, c: Grup 3'e göre anlamlı, d: Grup 4'e göre anlamlı, e: Grup 5'e göre anlamlı, f: Grup 6'ya göre anlamlı).

Gruplararası serum Noradrenalin seviyeleri karşılaştırıldığında Sham ICV grubu ile Sham ICV+PnX+ip gruplarının kendi aralarında istatistiksel olarak bir farklılığın olmadığı belirlendi. Ancak bu iki grubun değerlerinin diğer gruplara göre istatistiksel olarak yüksek olduğu belirlendi ($p<0.05$). ICV STZ grubu serum NA seviyelerinin, ICV STZ+PnX+MLT grubuna göre istatistiksel olarak yüksek olduğu belirlendi ($p<0.05$)(Tablo 4.13).

4.2.2. Serum Dopamin Seviyelerinin Analiz Bulguları

Tablo 4.14. Tüm deney gruplarındaki serum Dopamin seviyeleri

GRUP	n	Dopamin (ng/ml)
Sham ICV	10	0.16±0.04
Sham ICV+PnX+ip	10	0.15±0.05
ICV STZ	10	0.15±0.04
ICV STZ+MLT	10	0.09±0.03
ICV STZ+PnX	10	0.16±0.05
ICV STZ+PnX+MLT	10	0.15±0.05

Tüm grupların (Sham ICV, Sham ICV+PnX+ip, ICV STZ, ICV STZ+MLT, ICV STZ+PnX, ICV STZ+PnX+MLT) serum Dopamin seviyeleri karşılaştırıldığında gruplarının kendi aralarında istatistiksel olarak bir farklılığın olmadığı belirlendi (Tablo 4.14).

4.2.3. Serum Serotonin Seviyelerinin Analiz Bulguları

Tablo 4.15. Tüm deney gruplarındaki serum Serotonin seviyeleri

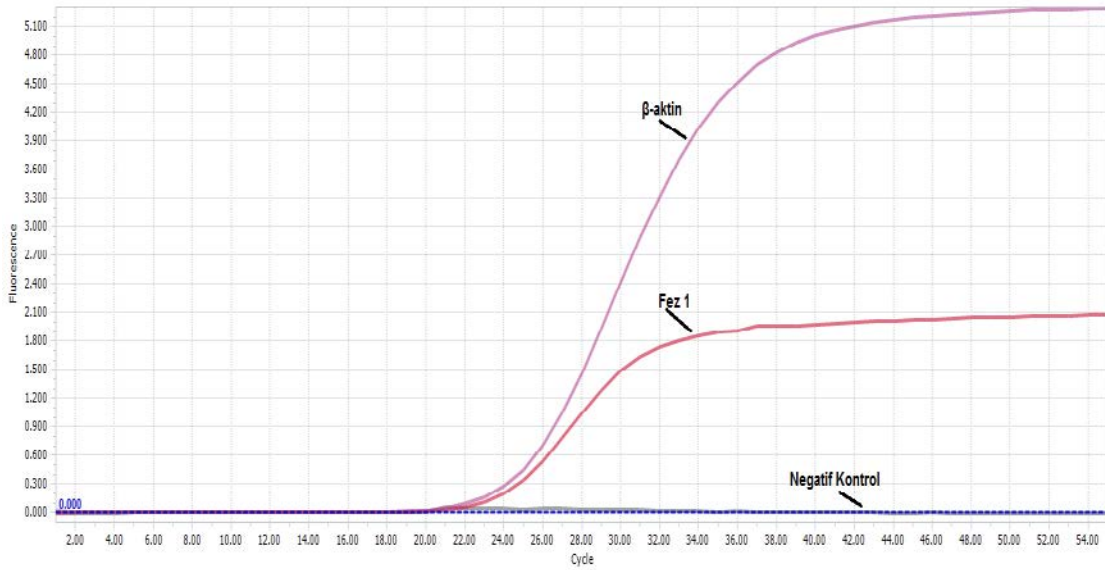
GRUP	n	Serotonin (ng/ml)
Sham ICV	10	25.18±20.95
Sham ICV+PnX+ip	10	28.69±12.28
ICV STZ	10	28.17±12.15
ICV STZ+MLT	10	25.93±14.42
ICV STZ+PnX	10	34.20±20.72
ICV STZ+PnX+MLT	10	30.63±22.1

Tüm grupların (Sham ICV, Sham ICV+PnX+ip, ICV STZ, ICV STZ+MLT, ICV STZ+PnX, ICV STZ+PnX+MLT) serum Serotonin seviyeleri karşılaştırıldığında gruplarının kendi aralarında istatistiksel olarak bir farklılığın olmadığı belirlendi (Tablo 4.15).

4.3. PZR Analiz Bulguları

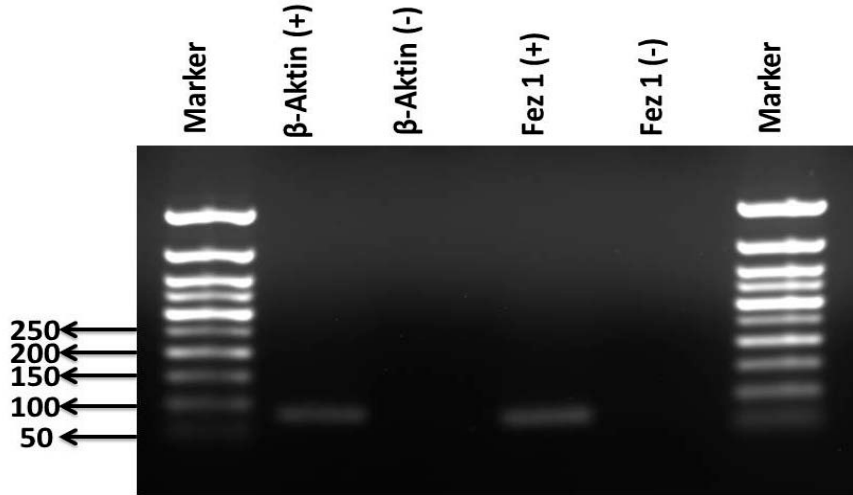
Moleküler Genetik Bulgular

Moleküler analizlerde “Hydrolysis Probe” kimyası kullanılarak β -aktin ve FEZ1 mRNA’larından sentezlenen cDNA’ların gerçek zamanlı PZR ile çoğaltımı yapıldı (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. β -aktin ve FEZ1 cDNA’larının gerçek zamanlı PZR ile çoğaltım eğrisi.

β -aktin ve FEZ1 cDNA’ları kullanılarak yapılan gerçek zamanlı PZR sonrası agaroz jelinde örnekler koşturularak primer bağlanmasının özgülüğü kontrol edildi. Analiz sonucunda her iki gen için de tek ve istenilen boyda bir DNA bandı oluştuğu görüldü (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. β -aktin ve FEZ1 cDNA'larının PZR'deki çoğalımının agaroz jel (%2) elektroforezi görüntüsü. Kullanılan DNA Markeri 50 bp DNA Markeri'dir. (Bioron, 50 bp, catalog no: 304007).

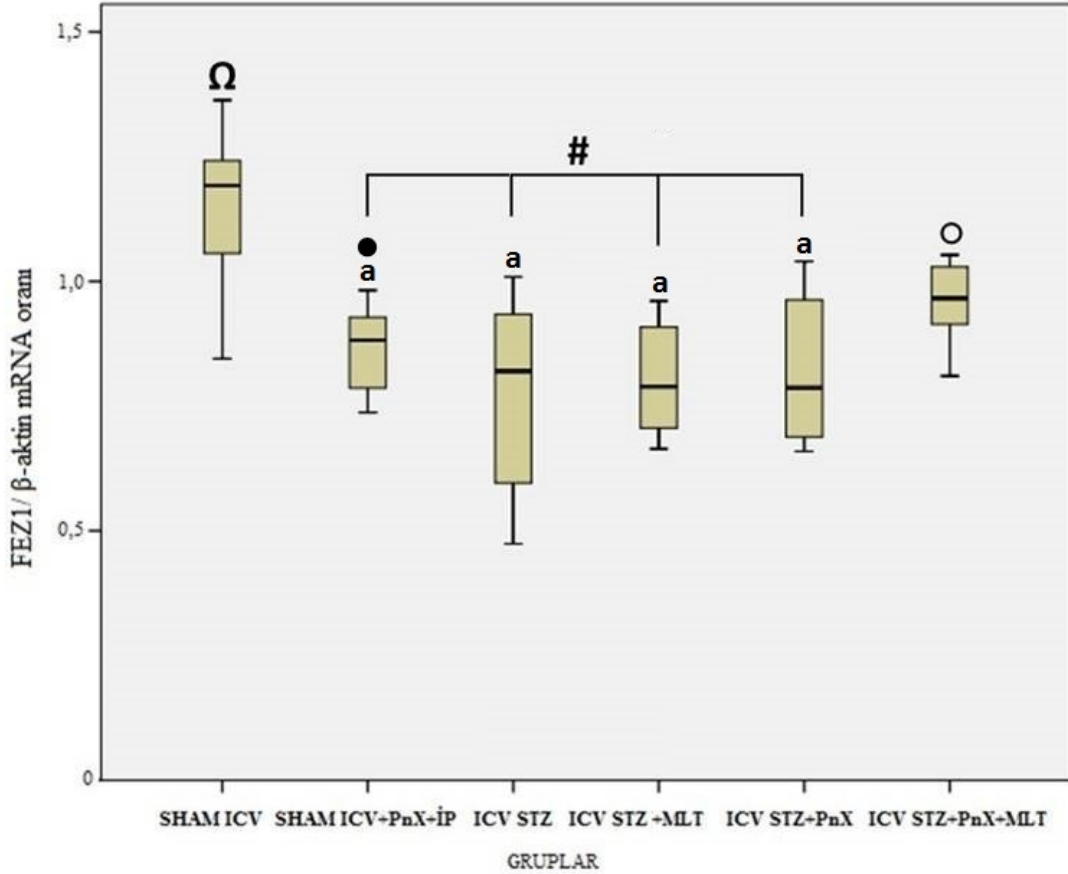
ICV STZ, ICV STZ+MLT ve ICV STZ+PnX gruplarına ait FEZ1/ β -aktin mRNA oranlarının, Sham ICV ve ICV STZ+PnX+MLT gruplarının FEZ1/ β -aktin mRNA oranlarına göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde düşük olduğu tespit edildi ($p < 0.05$) (Tablo 4.16).

Tablo 4.16. Tüm grupların FEZ1/ β -aktin mRNA oranlarının karşılaştırılması

GRUP	n	FEZ1/ β -aktin mRNA oranları
Sham ICV (Grup1)	10	1.192 (0.845-1.363) ^{b, c, d, e, f}
Sham ICV+PnX+ip (Grup2)	10	0.882 (0.737-0.982) ^a
ICV STZ (Grup3)	10	0.820 (0.474-1.009) ^{a, f}
ICV STZ+MLT (Grup4)	10	0.789 (0.664-0.961) ^{a, f}
ICV STZ+PnX (Grup5)	10	0.787 (0.659-1.040) ^{a, f}
ICV STZ+PnX+MLT (Grup6)	10	0.966 (0.810-1.053) ^{c, d, e}

(Değerler ortanca (en küçük-en büyük) olarak ifade edildi. (Her gruba ait satırlardaki sayısal değerlerin taşıdığı harfler, istatistiksel olarak hangi grup veya gruplara göre farklı olduğunu ifade etmektedir $p < 0.05$). (a: Grup 1'e göre anlamlı, b: Grup 2'e göre anlamlı, c: Grup 3'e göre anlamlı, d: Grup 4'e göre anlamlı, e: Grup 5'e göre anlamlı, f: Grup 6'ya göre anlamlı)

Tüm gruplardaki (Sham ICV, Sham ICV+PnX+ip, ICV STZ, ICV STZ+MLT, ICV STZ+PnX, ICV STZ+PnX+MLT) sıçanların hipokampus FEZ1/ β -aktin mRNA oranları karşılaştırıldığında Sham ICV grubunun hipokampus FEZ1/ β -aktin mRNA oranları diğer gruplara göre istatistiksel olarak yüksek olduğu belirlendi ($p < 0.05$; Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Tüm grupların FEZ1/ β -aktin mRNA oranları (Sütunlarda aynı sembolü taşıyan gruplar arasında anlamlı bir fark olmayıp, farklı sembolleri taşıyan gruplar birbirlerine göre istatistiksel olarak anlamlı. • Sham ICV grubuna göre anlamlı ($p < 0.05$))

4.4. Western Blot Analiz Bulguları

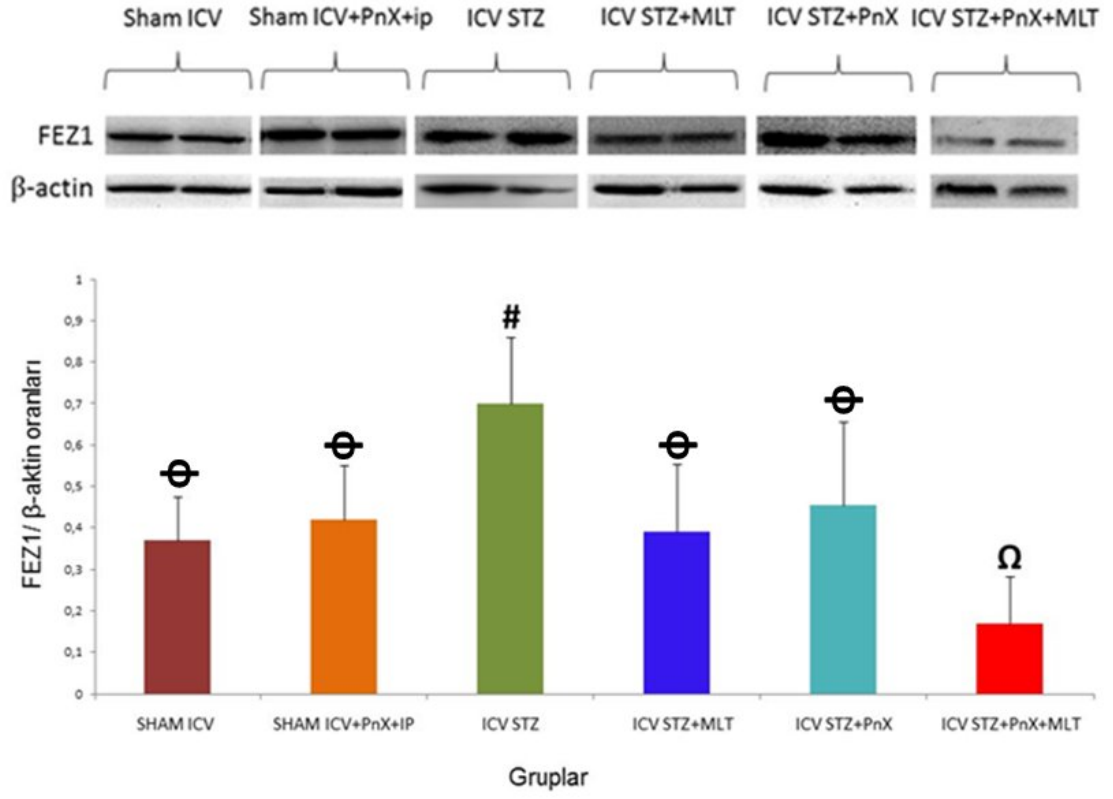
Tüm gruplardaki (Sham ICV, Sham ICV+PnX+ip, ICV STZ, ICV STZ+MLT, ICV STZ+PnX, ICV STZ+PnX+MLT) sıçanların hipokampus Fez1/ β -aktin oranları karşılaştırıldığında Sham ICV grubu ile sham ICV+PnX+ip grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmadığı gözlemlendi. ICV STZ+MLT grubunun ICV STZ

grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde düşük olduğu ($p<0.05$) ve ICV STZ+PnX+MLT grubunun ise bu iki gruba göre anlamlı biçimde düşük olduğu belirlendi ($p<0.05$). ICV STZ grubunun diğer tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde yüksek olduğu gözlemlenirken, ICV STZ+PnX+MLT grubunun ise tüm gruplara göre anlamlı biçimde düşük olduğu gözlemlenmiştir ($p<0.05$; Tablo 4.17, Şekil 4.17).

Tablo 4.17. Tüm grupların FEZ1/ β -aktin oranlarının karşılaştırılması

GRUP	n	FEZ1/ β -aktin oranları
Sham ICV (Grup1)	10	0.37 ± 0.11 ^{c, f}
Sham ICV+PnX+ip (Grup2)	10	0.42 ± 0.14 ^{c, f}
ICV STZ (Grup3)	10	0.70 ± 0.17 ^{a, b, d, e, f}
ICV STZ+MLT (Grup4)	10	0.39 ± 0.17 ^{c, f}
ICV STZ+PnX (Grup5)	10	0.45 ± 0.22 ^{c, f}
ICV STZ+PnX+MLT (Grup6)	10	0.17 ± 0.12 ^{a, b, c, d, e}

Değerler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir, anlamlılık düzeyi $p<0.05$. (Her gruba ait satırlardaki sayısal değerlerin taşıdığı harfler, istatistiksel olarak hangi grup veya gruplara göre farklı olduğunu ifade etmektedir $p<0.05$). (a: Grup 1'e göre anlamlı, b: Grup 2'e göre anlamlı, c: Grup 3'e göre anlamlı, d: Grup 4'e göre anlamlı, e: Grup 5'e göre anlamlı, f: Grup 6'ya göre anlamlı)



Şekil 4.17. Tüm grupların FEZ1/ β-aktin oranları (Sütunlarda aynı sembolü taşıyan gruplar arasında anlamlı bir fark olmayıp, farklı sembolleri taşıyan gruplar birbirlerine göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$)).

5. TARTIŞMA

5.1. AH-FEZ1 ile Katekolaminler (NA ve dopamin) ve Serotonin İlişkisi

AH'deki kolinerjik yetersizliklere, NA, dopamin ve serotoninin de dahil olduğu nörotransmitter sistemlerdeki değişikliklerin eşlik ettiğini gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur. Ancak, AH-FEZ1-serotonin-NA-dopamin arasındaki ilişkilerin ve etkileşimlerin nasıl olduğunu gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada aksonal taşımada önemli rolü bulunan FEZ1 ile beyindeki lokal devreler içindeki ve arasındaki eksitator/inhibitör sinyallerin kontrollü dengesinin düzenlenmesinde görev alan bu nörotransmitterler arasındaki ilişkinin belirlenmesine çalışıldı.

Alzheimer hastalığındaki kolinerjik yetersizliklere NA, dopamin ve serotonin ile ilgili anormal sinir iletiminin de dahil olduğu bazı transmitter sistemlerdeki bir takım değişiklikler eşlik ederken, hastalığın patogeneze başka nörotransmitter sistemlerin de katıldığı ileri sürülmektedir (200, 201). Kolinerjik, noradrenerjik ve serotonerjik innervasyon kaybı erken bir aşamada gerçekleşir. Bu yüzden nöronların belirteçleri hem ölüm öncesi hem de ölüm sonrası dokuda kaybolur. Buna karşılık, dopaminerjik innervasyon bozulmadan kalır ve kortikal GABAerjik internöronların belirteçleri sadece ölüm sonrası dokuda etkilenir. GABAerjik nöronların kaybının hastalığın sadece geç biraşamasında oluştuğu ileri sürülmektedir (202).

Dopamin iletimi üzerine serotonerjik etkilerin artan delilleri bulunmaktadır. Yapılan çalışmaların çoğu serotonin iletiminin dopaminerjik aktivite üzerine engelleyici bir rol oynadığını göstermiştir (203-205), ancak bazı çalışmalar ise tam tersi bir görüşü ileri sürmektedir (206, 207). Bu farklılıklar serotonin reseptörlerinin alt tipleri ve faaliyetleri ile kısmen açıklanabilir. Örneğin 5HT_{2C} agonistleri dopaminerjik etkileri inhibe ederken (208), 5-HT_{1B} ve 5-HT₃ agonistleri dopamin salımını artırır (209, 210). Yapılan bir çalışmada Alzheimer tip demans bulunan beş hastadan ve difüz Lewy cisim hastalığı bulunan aynı sayıdaki hastadan ölüm sonrası alınan beyinlerdeki NA, dopamin ve serotonin konsantrasyonları ile yine ölüm sonrası alınmış normal beyinlerdeki (n=5) konsantrasyonları karşılaştırılmıştır. Difüz Lewy cisim hastalığı bulunan hastalardan alınan ölüm sonrası beyinlerdeki NA, serotonin konsantrasyonları putamen ve neokortekste azalma gösterirken; dopamin seviyesinin her iki beyin

bölgesinde neredeyse birbirine eşit seviyede olduğu rapor edilmiştir (211). Buna paralel olarak Dopamin D2 reseptörleri hipokampal kompleksin belirli bölgelerinde (hipokampal alanlar, entorhinal korteks, perirhinal korteks) ifade edilmektedir. Yapılan bir çalışmada AH'nin, dopamin D2 reseptörünün azalmış ifadesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir, ancak etkilerin hipokampal kompleks içindeki alan ve rostrakaudal eksen bakımından farklı olduğu gözlemlenmiştir. AH'nin etkilediği entorhinal kortekste ise dopamin D2 reseptörü ifadesinde bir azalma olmadığı tespit edilmiştir. D2 reseptörleri kaybı gösteren bölgelerin ise tipik olarak nöritik plaklar, nörofibriler yumaklar veya önemli nöron kaybı içermediği tespit edilmiştir (212).

Bu çalışmada da STZ ile indüklenmiş ICV STZ grubu (Alzheimer modeli grup) ile Sham ICV ve Sham ICV+PnX+ip kontrol gruplarının dopamin seviyeleri bakımından istatistiksel bir anlamlı farklılık gözlemlenmemiş olup, literatür bilgilerle benzerlikler bulunmaktadır.

Yapılan bir çalışmada Alzheimer hastalarında Serotonin (5HT) konsantrasyonlarının hipokampal korteks, hipokampus ve striatumda yaklaşık % 21-37 oranında azaldığı, NA konsantrasyonlarının frontal ve temporal korteks ile putamende % 18-36 oranında azaldığı belirtilmektedir. Hipokampus ile birlikte temporal ve hipokampal kortekste dopamin konsantrasyonunun ise Alzheimer hastalarının beyinlerinde % 18-27 oranında azaldığı gözlemlenmiştir. (213). Alzheimer hastalarının trombosit serotonin konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla yapılan farklı iki çalışmada da serotonin seviyelerinde azalma olduğu ifade edilmiştir (214, 215).

Erken-başlangıçlı Alzheimer tip demanslı hasta grubu ile geç-başlangıçlı Alzheimer tip demanslı hasta grubunun serotonin ve NA konsantrasyonlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada, erken-başlangıçlı Alzheimer tip demanslı hasta grubunun serotonin ve NA konsantrasyonlarında, geç-başlangıçlı Alzheimer tip demanslı hasta grubunun konsantrasyonlarına göre daha ciddi bir azalma olduğu bildirilmiştir (216). Alzheimer tip demanslı hasta grubu ile kontrollerin karşılaştırıldığı başka bir çalışmada ise serebrospinal sıvı serotonin konsantrasyonlarının kontrollere göre azaldığı belirtilmektedir (217). Alzheimer hastalığı olan deneklerin öldükten sonra frontal ve temporal kortekste dopaminerjik, noradrenerjik ve serotonerjik nöronların faaliyetlerinin incelendiği ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığı bir çalışmada dopamin konsantrasyonlarında bir azalma görülmezken, NA ve serotonin konsantrasyonlarında azalmanın olduğu tespit edilmiştir (218).

Locus coeruleus ponsda izole edilmiş ve MSS'de % 90'ın üzerinde noradrenerjik nöronların bulunduğu bir çekirdektir (219, 220). AH'nin etkilediği bölgelerden olan entorhinal korteks (25), locus coeruleusdan çok miktarda noradrenerjik projeksiyonlar almaktadır (221). Normal yaşlanma sürecinde locus coeruleus nöronları ve serebral NA konsantrasyonları % 25-50 azalır. Beyinde büyük ölçüde locus coeruleusdaki hücrelerden kaynaklanan noradrenerjik sistemdeki bir yetersizliğin, AH ve Parkinson Hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların gelişiminde önemli bir rol oynadığı ileri sürülmektedir (222). Yapılan bir çalışmada Senil demans Alzheimer tip bulunan 6 hasta ile benzer yaşlardaki kişilerden oluşan kontrol grubu karşılaştırılmış ve locus coeruleus hücrelerinde değişken bir kayıp (ortalama % 60 azalma) gözlemlenmiştir. Locus coeruleusdaki noradrenerjik nöron kaybına, temporal korteksteki NA konsantrasyonunda benzer büyüklükteki bir azalma eşlik ederken, dopamin seviyelerinde herhangi bir değişiklik veya artış tespit edilmemiştir (223).

Mevcut çalışmada da gruplar arası dopamin ve serotonin seviyeleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmezken, NA seviyelerindeki düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Eksojen melatonin uygulamasının NA, dopamin ve serotonin seviyelerini yükseltmede etkili olmadığı gözlemlenmiştir.

5.2. AH-FEZ1 ile Melatonin İlişkisi

Melatonin ile A β arasında bir etkileşimin olduğunu gösteren bazı ipuçları bulunmaktadır (224). Melatonin nöronal öğrenme ve hafıza ile ilgili aktiviteleri artırabileceği ve hem in vitro hem de in vivo A β yüklerini azaltabileceği ayrıca melatonin, AH benzeri nörodejenerasyona müdahale için potansiyel bir tedavi yaklaşımı haline gelebileceği speküle edilmesine karşın bu spekülasyonları doğrulamak için daha çok çalışma yapılmasına gereksinim bulunduğu da ifade edilmektedir (225).

Noradrenerjik innervasyonların düzensizliğinin ve serotonin azalmasının, anti-enflamasyonda ve kolinerjik sistemin korunmasında önemli bir rol oynayan melatoninin AH'deki azalmış seviyelerinden ve melatoninin ritm kaybından sorumlu olabileceği ileri sürülmektedir (226). Pineal bez tarafından salgılanan melatoninin, bir sitoskeletal modülatör gibi davranarak mikrofilament ve mikrotübülü etkileme yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir (227). Melatoninin, nöronal sinyalleri etkilemesinin yanı sıra mitokondriyal fonksiyonlar üzerine etki ederek AH'deki nöroprotektif mekanizmada da rol oynadığı rapor edilmiş (228) olup, melatoninin bu koruyucu etkisinin kısmen

mitokondri aracılı olduğuna inanılmaktadır (143). Yaşlanmanın temel parametresi olan genel nöronal plastisitenin kaybının da melatonin ile önlenebildiği bildirilmiştir (229, 230). İleri yaşlardaki kişilerde melatonin üretimindeki azalmanın, AH gibi yaşa bağlı nörodejeneratif hastalıkların gelişiminde rol alan temel faktörlerden birisi olduğu öne sürülmektedir. Melatoninin iskemik inme, parkinsonizm ve AH deneysel modellerinde görülen nörodejeneratif olguları durdurmada etkili olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (231).

Yapılan bir çalışmada, öncesinde amiloid plak taşıyan transjenik farelere (Tg2576 fare) 14 aylıkken 4 ay süreli kronik melatonin tedavisi başlatılmış, tedavinin 4. ayından sonra plazmadaki melatonin seviyelerinin yükselmesine rağmen melatonin tedavisi gören ve görmeyen fareler arasında istatistiksel bir fark olmadığı gözlemlenmiştir. Amiloid plak birikiminden sonra başlatılan melatoninin tedavisinin anti-amiloid veya antioksidan etkiler oluşturmada başarısız olduğu sonucuna varılmış ve AH tedavisinde melatoninin yararlı olabileceği ihtimalinin azaldığı ifade edilmiştir (232). Başka bir çalışmada ise melatoninin AH patogenezi erken olaylarında görülen oksidatif strese ve hastalık sürecinin sadece bu aşamasında antioksidan tedavi olarak yararlı olabileceği ileri sürülmüştür. Ayrıca geleneksel antioksidanların aksine melatoninin kan-beyin bariyerini geçen, nispeten toksisiteden yoksun ve AH tedavisinde potansiyel bir terapötik aday olabileceği belirtilmiştir (233).

Çalışmamızda hem PnX hem de ICV STZ enjeksiyonu öncesi sıçanlara ip yolla melatonin enjeksiyonlarına başlanmış olup 14 gün süreyle bu enjeksiyonlara devam edilmiştir. Morris testlerinde ICV STZ grubu ile ICV STZ+MLT grubu arasındaki ve ICV STZ+PnX ile ICV STZ+PnX+MLT grupları arasındaki istatistiksel açıdan gözlemlenen farklılığın, uygulama ve enjeksiyonlar öncesinde başlattığımız melatonin uygulamasının koruyucu/engelleme bir fonksiyonuna sahip olabileceğine delil oluşturmaktadır. Yine sonuçlarımıza göre melatonin takviyesinin AH gelişiminin önlenmesine katkıda bulunmasına karşın melatonin yoksunluğunun AH gelişimi üzerine önemli bir etkisinin olmadığı söylenebilir.

Melatoninin antioksidan ve anti-amiloid özellikleri sayesinde nöronal hücreleri A β aracılı toksisiteden etkin bir şekilde koruduğu ve bunu A β üretimini inhibe etmenin yanında amiloid fibrillerin oluşumunu da engelleyerek ortaya koyduğu ileri sürülmektedir. Yapılan son çalışmalarda melatoninin Alzheimer benzeri tau hiperfosforilasyonunu azalttığı, bunun yanında anti-inflamasyonda ve kolinerjik nöronların korunmasında rol oynadığı iddia edilmektedir (234). Alzheimer deneysel

modellerinde yapılan başka bir çalışmada da melatoninin A β üretimini inhibe etme, amiloid fibrillerin oluşumunu engelleme etkilerinin yanında anti-oksidatif hasar, anti-apoptoz ve bilişsel fonksiyonların iyileştirmesi gibi birçok yararlı etkilere sahip olduğu ve melatoninin bu etkisini tau protein hiperfosforilasyonunu inhibe ederek ortaya koyduğu ifade edilmiştir (235). Transgenik farelere eksojen olarak melatoninin verilerek yapılan bir çalışmada beklenen zamana bağımlı A β artışının kısmen inhibe edildiği, proteinlerin anormal nitrasyonunun azaldığı ve tedavi gören transgenik farelerin hayatta kalma şanslarının da arttığı bildirilmiştir (190).

Sinaptik vezikül proteinlerin aksonal transportu, nöronların sinaptik iletim yoluyla iletişim kurma yeteneğini korumaları için gereklidir. Nörotransmitter içeren sinaptik veziküller membran proteinlerinin endositozu yoluyla sinaptik terminallerinde toplanmaktadır. Bu sinaptik vezikül membran proteinleri hücre gövdesinde sentezlenir ve kinesin moleküler motorları kullanan mikrotübül-bağımlı taşıma yoluyla taşıyıcı veziküllerle sinapslara taşınır (236). Aksonlardaki mitokondriyal hareket, mikrotübüllerin eksi ucuna yönelen dinein ile artı ucuna yönelen kinesin adlı iki motor proteinin enerji kullanarak çeşitli hücre içi kargoların (sinaptik veziküller, mitokondri, hücre iskeleti elemanları ve mRNA'lar) taşınmasında rol almasıyla yürütülmektedir (136, 138, 237).

Kargo (sinaptik veziküller, mitokondri, hücre iskeleti elemanları ve mRNA'lar) yokluğunda Kinesin1 otoinhibisyonu, boş yere ATP hidrolizini engeller ve hem geçici hem de mekansal motor aktivitenin hızlı ve spesifik kontrolünü sağlar. Kinesin1 otoinhibisyonuna iki bağlama partneri arasındaki etkileşimin katkıda bulunduğu bildirilmiştir (145). Yapılan bir çalışmada JIP1 kargo proteininin Kinesin1'i aktif hale getirmek için yeterli olmadığı, motor aktivasyonu için Kinesin1'in iki bölgesinden diğerine de ikinci bir molekülün bağlanması gerektiği ve Kinesin ağır zincirin diğer bağlama partnerinin FEZ1 olduğu ileri sürülmüştür. Yine aynı çalışmada, JIP1 ve FEZ1'in Kinesin'e bağlanmasının mikrotübül bağlanması ve motilitede motoru aktifleştirmek için yeterli olduğu gösterilmiştir (238).

Önemli ruhsal bozukluklara yatkınlık geni olan DISC1, nöronal gelişim üzerinde çok yönlü bir etkiye sahip olan iskelet proteinini kodlamaktadır (239). Hipokampus ve serebral kortekste oldukça zengin ifade edilen ve bu bölgelerde nörogenesis, progenitör çoğalma, göç ve dendritik dallanmada önemli rollere sahip olan DISC1 geni beyin gelişimi, nöronal bağlantı ve sinaptogenez için de önem taşımaktadır (240, 241).

DISC1, hem şizofreni hem de bipolar bozukluklar için olası bir genetik risk faktörü olarak tanımlanmıştır ve bu psikiyatrik hastalıklar ise bozulmuş öğrenme ve hafıza ile ilişkilidir (242). DISC1'in ilk belirlenen bağlama ortaklarından biri FEZ1'dir (243). Şizofreni hastalarının hem dorsolateral prefrontal korteksinde hem de hipokampusunda FEZ1 mRNA seviyelerinde anlamlı bir azalma olduğu ve DISC1 genotip ile FEZ1 mRNA seviyeleri arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir (244). Bu bulgular FEZ1 ve DISC1'in şizofreni riski ile nöronal gelişimi düzenlemede işbirliği içinde olabilecekleri ihtimalini yükseltmektedir (239). Parkinson sıçan modelinde FEZ1 ifadesi ile hücre lokalizasyonunu araştırmak ve Parkinson patogenezinde FEZ1'in rolünü ortaya koymak için yapılan bir çalışmada FEZ1 seviyelerinin önce giderek arttığı, pik yaparak daha sonra azaldığı belirtilmektedir. Ayrıca Parkinson sürecinde FEZ1'in nöronal mikro çevrenin düzenlenmesinde ve dopamin nöronlarının astrositik korunmasında rol oynadığı ileri sürülmektedir (7).

FEZ1'in tübülün ve kinesin motor proteinler ile etkileşimde olduğu ve sinir büyüme faktörü tarafından uyarılmış PC12 hücrelerinin büyüyen nöritlerinde mitokondrinin hareketini kontrol ettiği gösterilmiştir (150). Yapılan bir çalışmada yetişkin sıçan beyninde FEZ1 mRNA'nın, özellikle hipokampus, olfaktör bulbus, dentat girus ve serebellar korteks kısımlarında güçlü sinyaller verdiği fakat oligodendrosit ve astrositlerde ifade edilmediği gösterilmiştir. Olfaktör bulbusdaki sinyaller mitral hücreler ve granüler hücrelerde tespit edilirken, hipokampüsteki güçlü sinyaller ise dentat girusun granüler hücrelerinde gözlemlenmiştir (142). Astrositler dopaminerjik nöronları nekrotik dejenerasyona karşı korurlar ve Parkinson Hastalığı patolojisinin ilerlemesi esnasında nispeten istikrarlı bir ortam sağlarlar (7, 245). Farklı bir çalışmada da FEZ1-yetersiz farede mezolimbik yolda değişen dopamin salınımından kaynaklanan anormal davranışların varlığı tespit edilmiştir (172).

Noradrenerjik innervasyonların düzensizliği ve serotonin azalmasının, AH'deki azalmış melatonin seviyeleri ve melatonin ritm kaybından sorumlu olabileceği de ileri sürülmektedir. Ayrıca melatoninin, kolinerjik sistemin korunmasında önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (226).

Literatürde AH ve melatonin ile ilgili oldukça fazla sayıda (insan ve hayvan) çalışma mevcuttur ancak bu çalışmaların birçoğu melatonin seviyelerinin belirlenmesi veya eksojen melatonin uygulanması sonucu protektif mekanizmayı sorgulayan tarzda çalışmalardır. Bizim çalışmamızda pinealektomi yapılan ve yapılmayan iki farklı deney düzeneğinde AH modeli oluşturulmuş olup hastalığın patogenezinde melatoninin

etkinliğinin (yokluğunda ve varlığında) daha net bir biçimde ortaya konulması sağlanmıştır. Melatoninin nöronal sinyalleri etkilemesinin yanı sıra mitokondriyal fonksiyonlar üzerine de etkiyerek, AH'deki nöroprotektif mekanizmada rol oynadığı bildirilmiştir (228). Yaşlanmadaki genel nöronal plastisite kaybının melatonin ile önlenemediği ileri sürülmüştür (229, 230). FEZ1'in, mitokondriyal taşımayı düzenlemesi ve uzun süreli bellek ve öğrenme için yüksek nöronal plastisite göstermesi (9), melatonin ile FEZ1 arasında muhtemel bir ilişkinin olabileceğini akla getirmektedir.

Literatürde nörodejeneratif bir hastalık olan AH ile aksonal taşımada rolü bulunan FEZ1 arasındaki ilişkinin gösterildiği herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma ile AH ve FEZ1 arasındaki muhtemel ilişki belirlenmeye çalışıldı ve aksonal taşımada önemli rolü bulunan FEZ1 ile eksitator/inhibitör sinyallerin kontrollü dengesinin düzenlenmesinde görev alan bu nörotransmitterler (melatonin, serotonin, NA, dopamin) arasındaki ilişki gösterilmeye çalışıldı.

Çalışmamızda ICV STZ grubundaki FEZ1 protein seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir. AH patolojisinde yer alan tau hiperfosforilasyonunda mikrotübüllerin bağlayıcı yeteneğinin azalması ve mikrotübüllerin parçalanması sözkonusudur. Sonuç olarak, veziküllerin aksonal taşınması kesintiye uğrar ve sinaptik fonksiyon engellenir. Hiperfosforilize tau proteinleri aksoplazmada birikir. Taşımada görevli kinesin1 'in motor aktivasyonu için gerekli ortaklardan biri olan FEZ1'deki bu artışın aksonal taşımadaki bir kesintiden veya FEZ1 proteininde oluşabilecek bir birikmeden kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir. Bunun yanısıra melatonin enjeksiyonu yapılmış gruplarımızda FEZ1 seviyelerinin kontrol gruplarına benzer veya kontrol gruplarından düşük çıkması ise yine melatoninin AH patolojisi ve FEZ1 seviyelerinin normal seviyelerde tutulması yönünde olumlu etkiye sahip olabileceğini akla getirmektedir.

Çalışmamıza FEZ1 protein seviyelerinin ICV STZ grubunda sham gruplarına göre istatistiksel olarak yüksek olması AH ile FEZ1 arasında bir ilişkinin varlığına işaret etmesi bakımından oldukça önemlidir. Bunun yanısıra ICV STZ+MLT grubu seviyelerinin sham grupların seviyelerine yakın olması ve ICV STZ+PnX+MLT grubu değerlerinin istatistiksel olarak ICV STZ+PnX grubundan ve hatta sham gruplarından bile anlamlı şekilde düşük olması yine melatonin AH'de koruyucu/engelleme bir rolünün olabileceğine delil teşkil etmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda ICV STZ grubu FEZ1 seviyelerinin sham gruplarına göre anlamlı ölçüde yüksek seviyelerde olması FEZ1 ile AH patogenezi arasında bir ilişkinin olabileceği yönündeki hipotezimizi destekler niteliktedir. Literatürde mikrotübül bağımlı taşımada meydana gelebilecek azalmaların, APP'nin proteolitik işlenmesini uyurabileceği bunun da amiloid plak gelişimi ve AH ile sonuçlanabileceği rapor edilmiştir (152). Buradan yola çıkarak mikrotübül organizasyonu ve kargo taşınması ile ilişkili olan FEZ1'in bu patolojide rolünün olabileceği söylenebilir. Başka bir bakış açısından ise yine literatürde melatoninin mitokondriyal fonksiyon üzerine etkileyerek, AH'deki nöroprotektif mekanizmada rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (228). Eksojen olarak melatonin uyguladığımız gruplarda gözlemlediğimiz FEZ1 seviyelerindeki anlamlı azalma, melatoninin AH ve FEZ1 patolojilerini ortadan kaldırmada çift yönlü bir etki gösterebileceğini ve protektif bir role sahip olabileceğini ispatlar niteliktedir. Ancak bu etki ve ilişkileri hangi yolak veya mekanizmalar aracılığıyla ortaya koyduğu henüz aydınlatılamamıştır. Bu yüzden çalışmalar planlanarak ilgili mekanizmalara açıklık getirilmesi gereklidir. Agonist veya antagonist çeşitli ajanların da dahil edilebileceği çalışmaların tasarlanması ve bunun yanında immünohistokimyasal çalışmalarla farklı veriler elde edilmesi de mekanizmaya açıklık getirme bakımından önem arz edecektir.

Çalışmamızda sham grupları dışındaki gruplarda NA seviyelerinde anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Bu veri mevcut literatürdeki AH'den etkilenen entorhinal korteksin locus coeruleusdan çok miktarda noradrenerjik projeksiyonlar aldığı ve noradrenerjik sistemdeki yetersizliğin, AH ve Parkinson Hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların gelişiminde önemli bir rol oynayabileceği (221, 222) fikrini desteklemektedir. Çalışmamızda gruplar arası dopamin ve serotonin seviyeleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiş olup eksojen melatonin uygulamasının NA, dopamin ve serotonin seviyelerini değiştirmede etkili olmadığı belirlenmiştir. AH, FEZ1 ve ilişkili oldukları nörotransmitterler arasındaki ilişkinin daha iyi anlaşılabilmesi için kapsamlı ve mekanizmaya yönelik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Sonkusare SK, Kaul CL, Ramarao P. Dementia of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders--memantine, a new hope. *Pharmacol Res* 2005; 51(1): 1-17.
2. Wortmann M. Dementia: a global health priority - highlights from an ADI and World Health Organization report. *Alzheimers Res Ther* 2012; 4(5): 40.
3. Kim DH, Huh JW, Jang M, Suh JH, Kim TW, Park JS, Yoon SY. Sitagliptin increases tau phosphorylation in the hippocampus of rats with type 2 diabetes and in primary neuron cultures. *Neurobiol. Dis* 2012; 46(1): 52-8.
4. Lehmann S, Delaby C, Touchon J, Hirtz C, Gabelle A. Biomarkers of Alzheimer's disease: the present and the future. *Revue neurologique* 2013; 169(10): 719-23.
5. Bertram L, Lill CM, Tanzi RE. The genetics of Alzheimer disease: back to the future. *Neuron* 2010; 68(2): 270-81.
6. Aly HF, Metwally FM, Ahmed HH. Neuroprotective effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) in rat model of Alzheimer's disease. *Acta Biochim Pol* 2011; 58(4): 513-20.
7. Sun YY, Zhang Y, Sun XP, Liu TY, Liu ZH, Chen G, Xia CL. Fasciculation and elongation protein zeta-1 (FEZ1) expression in reactive astrocytes in a rat model of Parkinson's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2014; 40(2): 164-76.
8. Inoue K, Terashima T, Nishikawa T, Takumi T. Fez1 is layer-specifically expressed in the adult mouse neocortex. *Eur J Neurosci* 2004; 20(11): 2909-16.
9. Fujita T, Ikuta J, Hamada J, Okajima T, Tatematsu K, Tanizawa K, Kuroda S. Identification of a tissue-non-specific homologue of axonal fasciculation and elongation protein zeta-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313(3): 738-44.
10. Maturana AD, Fujita T, Kuroda S. Functions of fasciculation and elongation protein zeta-1 (FEZ1) in the brain. *Scientific World Journal* 2010; 10: 1646-54.
11. Smith AD. The worldwide challenge of the dementias: a role for B vitamins and homocysteine? *Food Nutr Bull* 2008; 29(2 Suppl): s143-72.
12. Jack CR, Jr., Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen PS, Weiner MW, Petersen RC, Trojanowski JQ. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol* 2010; 9(1): 119-28.

13. Kovacs GG, Alafuzoff I, Al-Sarraj S, Arzberger T, Bogdanovic N, Capellari S, Ferrer I, Gelpi E, Kovari V, Kretschmar H, Nagy Z, Parchi P, Seilhean D, Soinineh H, Troakes C, Budka H. Mixed brain pathologies in dementia: the BrainNet Europe consortium experience. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2008; 26(4): 343-50.
14. Donaghy PC, McKeith IG. The clinical characteristics of dementia with Lewy bodies and a consideration of prodromal diagnosis. *Alzheimers Res Ther* 2014; 6(4): s46.
15. Howlett DR, Whitfield D, Johnson M, Attems J, O'Brien JT, Aarsland D, Lai MK, Lee JH, Chen C, Ballard C, Hortobagyi T, Francis PT. Regional Multiple Pathology Scores Are Associated with Cognitive Decline in Lewy Body Dementias. *Brain pathology* 2014. 25(4): 401-8.
16. Chung EJ, Babulal GM, Monsell SE, Cairns NJ, Roe CM, Morris JC. Clinical Features of Alzheimer Disease With and Without Lewy Bodies. *JAMA Neurol* 2015.
17. Servello A, Androzzini P, Bechini F, De Angelis R, Pontecorvo ML, Vulcano A, Cerra E, Vigliotta MT, Artini M, Selan L, Ettore E. [Effect of AChE and BuChE inhibition by rivastigmin in a group of old-old elderly patients with cerebrovascular impairment (SIVD type)]. *Minerva medica* 2014; 105(2): 167-74.
18. Grand JH, Caspar S, Macdonald SW. Clinical features and multidisciplinary approaches to dementia care. *J Multidiscip Healthc* 2011; 4: 125-47.
19. Milovanovic M, Eriksson K, Winblad B, Nilsson S, Lindahl TL, Post C, Jaremo P. Alzheimer and platelets: low-density platelet populations reveal increased serotonin content in Alzheimer type dementia. *Clinical biochemistry* 2014; 47(15): 51-3.
20. Nussbaum RL, Ellis CE. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2003; 348(14): 1356-64.
21. Chen PY, Tsai CT, Ou CY, Hsu WT, Jhuo MD, Wu CH, Shih TC, Cheng TH, Chung JG. Computational analysis of novel drugs designed for use as acetylcholinesterase inhibitors and histamine H3 receptor antagonists for Alzheimer's disease by docking, scoring and de novo evolution. *Mol Med Rep* 2012; 5(4): 1043-8.

22. Purohit DP, Batheja NO, Sano M, Jashnani KD, Kalaria RN, Karunamurthy A, Kaur S, Shenoy AS, Van Dyk K, Schmeidler J, Perl DP. Profiles of Alzheimer's disease-related pathology in an aging urban population sample in India. *J Alzheimers Dis : JAD* 2011; 24(1): 187-96.
23. Huang X, Chen Y, Zhang H, Ma Q, Zhang YW, Xu H. Salubrinal attenuates beta-amyloid-induced neuronal death and microglial activation by inhibition of the NF-kappaB pathway. *Neurobiol Aging* 2012; 33(5): 1007 e9-17.
24. Allen SJ, Watson JJ, Dawbarn D. The neurotrophins and their role in Alzheimer's disease. *Curr Neuropharmacol* 2011; 9(4): 559-73.
25. DeKosky ST, Scheff SW. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol* 1990; 27(5): 457-64.
26. Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, Mufson EJ. Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 2006; 27(10): 1372-84.
27. Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretschmar H, Del Tredici K. Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol* 2006; 112(4): 389-404.
28. Pratico D. Alzheimer's disease and the quest for its biological measures. *J Alzheimers Dis : JAD* 2013; 33 Suppl 1: s237-41.
29. Price JL, Morris JC. Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1999; 45(3): 358-68.
30. Sakamoto S, Ishii K, Sasaki M, Hosaka K, Mori T, Matsui M, Hirono N, Mori E. Differences in cerebral metabolic impairment between early and late onset types of Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 2002; 200(1-2): 27-32.
31. Zou Z, Liu C, Che C, Huang H. Clinical genetics of Alzheimer's disease. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 291862.
32. Reitz C, Brayne C, Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 2011; 7(3): 137-52.
33. Brickell KL, Steinbart EJ, Rumbaugh M, Payami H, Schellenberg GD, Van Deerlin V, Yuan W, Bird TD. Early-onset Alzheimer disease in families with late-onset Alzheimer disease: a potential important subtype of familial Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2006; 63(9): 1307-11.
34. Bertram L, Tanzi RE. The current status of Alzheimer's disease genetics: what do we tell the patients? *Pharmacol Res* 2004; 50(4): 385-96.

35. Tanzi RE. The genetics of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2(10).
36. Kim DH, Yeo SH, Park JM, Choi JY, Lee TH, Park SY, Ock MS, Eo J, Kim HS, Cha HJ. Genetic markers for diagnosis and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Gene* 2014; 545(2): 185-93.
37. Alonso Vilatela ME, Lopez-Lopez M, Yescas-Gomez P. Genetics of Alzheimer's disease. *Arch Med Res* 2012; 43(8): 622-31.
38. Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 1987; 325(6106): 733-6.
39. Goodenough S, Schafer M, Behl C. Estrogen-induced cell signalling in a cellular model of Alzheimer's disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003; 84(2-3): 301-5.
40. Koo EH, Squazzo SL. Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *The Journal of biological chemistry* 1994; 269(26): 17386-9.
41. Moir RD, Lynch T, Bush AI, Whyte S, Henry A, Portbury S, Multhaup G, Small DH, Tanzi RE, Beyreuther K, Masters CL. Relative increase in Alzheimer's disease of soluble forms of cerebral Abeta amyloid protein precursor containing the Kunitz protease inhibitory domain. *The Journal of biological chemistry* 1998; 273(9): 5013-9.
42. Platt TL, Reeves VL, Murphy MP. Transgenic models of Alzheimer's disease: better utilization of existing models through viral transgenesis. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1832(9): 1437-48.
43. Nicolas M, Hassan BA. Amyloid precursor protein and neural development. *Development* 2014; 141(13): 2543-8.
44. Rivabene R, Visentin S, Piscopo P, De Nuccio C, Crestini A, Svetoni F, Rosa P, Confaloni A. Thapsigargin affects presenilin-2 but not presenilin-1 regulation in SK-N-BE cells. *Exp Biol Med* 2014; 239(2): 213-24.
45. Kovacs DM, Fausett HJ, Page KJ, Kim TW, Moir RD, Merriam DE, Hollister RD, Hallmark OG, Mancini R, Felsenstein KM, Hyman BT, Tanzi RE, Wasco W. Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells. *Nat Med* 1996; 2(2): 224-9.

46. Delabio R, Rasmussen L, Mizumoto I, Viani GA, Chen E, Villares J, Costa IB, Turecki G, Linde SA, Smith MC, Payao SL. PSEN1 and PSEN2 gene expression in Alzheimer's disease brain: a new approach. *J Alzheimers Dis : JAD* 2014; 42(3): 757-60.
47. Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW. Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 2010; 23(4): 213-27.
48. Woodruff G, Young JE, Martinez FJ, Buen F, Gore A, Kinaga J, Li Z, Yuan SH, Zhang K, Goldstein LS. The presenilin-1 DeltaE9 mutation results in reduced gamma-secretase activity, but not total loss of PS1 function, in isogenic human stem cells. *Cell reports* 2013; 5(4): 974-85.
49. Cohn-Hokke PE, Elting MW, Pijnenburg YA, van Swieten JC. Genetics of dementia: update and guidelines for the clinician. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2012; 159B(6): 628-43.
50. Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y. Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(15): 5644-51.
51. Mizuguchi C, Hata M, Dhanasekaran P, Nickel M, Okuhira K, Phillips MC, Lund-Katz S, Saito H. Fluorescence study of domain structure and lipid interaction of human apolipoproteins E3 and E4. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1841(12): 1716-24.
52. Liu CC, Kanekiyo T, Xu H, Bu G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol* 2013; 9(2): 106-18.
53. Hatters DM, Peters-Libeu CA, Weisgraber KH. Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends Biochem Sci* 2006; 31(8): 445-54.
54. Nishimura M, Satoh M, Matsushita K, Nomura F. How proteomic ApoE serotyping could impact Alzheimer's disease risk assessment: genetic testing by proteomics. *Expert Rev Proteomics* 2014; 11(4): 405-7.
55. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988; 240(4852): 622-30.
56. Mahley RW, Ji ZS. Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Lipid Res* 1999; 40(1): 1-16.
57. Bu G. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurosci* 2009; 10(5): 333-44.

58. Hauser PS, Narayanaswami V, Ryan RO. Apolipoprotein E: from lipid transport to neurobiology. *Prog Lipid Res* 2011; 50(1): 62-74.
59. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 1993; 261(5123): 921-3.
60. Zheng H, Koo EH. Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein. *Mol Neurodegener* 2011; 6(1): 27.
61. Yang X, Sun GY, Eckert GP, Lee JC. Cellular membrane fluidity in amyloid precursor protein processing. *Mol Neurobiol* 2014; 50(1): 119-29.
62. Loureiro JA, Rocha S, Pereira Mdo C. Charged surfactants induce a non-fibrillar aggregation pathway of amyloid-beta peptide. *J Pept Sci* 2013; 19(9): 581-7.
63. Zambrano N, Gianni D, Bruni P, Passaro F, Telese F, Russo T. Fe65 is not involved in the platelet-derived growth factor-induced processing of Alzheimer's amyloid precursor protein, which activates its caspase-directed cleavage. *J Biol Chem* 2004; 279(16): 16161-9.
64. Piao Y, Kimura A, Urano S, Saito Y, Taru H, Yamamoto T, Hata S, Suzuki T. Mechanism of intramembrane cleavage of alcadeins by gamma-secretase. *PLoS one* 2013; 8(4): e62431.
65. Kowalska A. [The beta-amyloid cascade hypothesis: a sequence of events leading to neurodegeneration in Alzheimer's disease]. *Neurol Neurochir Pol* 2004; 38(5): 405-11.
66. Naslund J, Jensen M, Tjernberg LO, Thyberg J, Terenius L, Nordstedt C. The metabolic pathway generating p3, an A beta-peptide fragment, is probably non-amyloidogenic. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 204(2): 780-7.
67. Price DL, Tanzi RE, Borchelt DR, Sisodia SS. Alzheimer's disease: genetic studies and transgenic models. *Annu Rev Genet* 1998; 32: 461-93.

68. Kuperstein I, Broersen K, Benilova I, Rozenski J, Jonckheere W, Debulpaep M, Vandersteen A, Segers-Nolten I, Van Der Welf K, Subramaniam V, Braeken D, Callewaert G, Bartic C, D'Hooge R, Martins IC, Rousseau F, Schymkowitz J, De Strooper B. Neurotoxicity of Alzheimer's disease Aβ peptides is induced by

- small changes in the Abeta42 to Abeta40 ratio. *The EMBO journal* 2010; 29(19): 3408-20.
69. Noble W, Hanger DP, Miller CC, Lovestone S. The importance of tau phosphorylation for neurodegenerative diseases. *Frontiers in neurology* 2013; 4: 83.
 70. Shin RW, Iwaki T, Kitamoto T, Tateishi J. Hydrated autoclave pretreatment enhances tau immunoreactivity in formalin-fixed normal and Alzheimer's disease brain tissues. *Lab Invest* 1991; 64(5): 693-702.
 71. Avila J. Intracellular and extracellular tau. *Frontiers in neuroscience* 2010; 4: 49.
 72. Alonso AD, Zaidi T, Novak M, Barra HS, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Interaction of tau isoforms with Alzheimer's disease abnormally hyperphosphorylated tau and in vitro phosphorylation into the disease-like protein. *J Biol Chem* 2001; 276(41): 37967-73.
 73. Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW. Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J Mol Biol* 1977; 116(2): 227-47.
 74. Flach K, Ramminger E, Hilbrich I, Arsalan-Werner A, Albrecht F, Herrmann L, Goedert M, Arendt T, Holzer M. Axotrophin/MARCH7 acts as an E3 ubiquitin ligase and ubiquitinates tau protein in vitro impairing microtubule binding. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1842(9): 1527-38.
 75. Peter SJ, Mofrad MR. Computational modeling of axonal microtubule bundles under tension. *Biophysical journal* 2012; 102(4): 749-57.
 76. Gonzalez-Billault C, Engelke M, Jimenez-Mateos EM, Wandosell F, Caceres A, Avila J. Participation of structural microtubule-associated proteins (MAPs) in the development of neuronal polarity. *J Neurosci Res* 2002; 67(6): 713-9.
 77. Mandelkow EM, Schweers O, Drewes G, Biernat J, Gustke N, Trinczek B, Mandelkow E. Structure, microtubule interactions, and phosphorylation of tau protein. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 777: 96-106.
 78. Rodriguez-Martin T, Anthony K, Garcia-Blanco MA, Mansfield SG, Anderton BH, Gallo JM. Correction of tau mis-splicing caused by FTDP-17 MAPT mutations by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Hum Mol Genet* 2009; 18(17): 3266-73.

79. Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 1989; 3(4): 519-26.
80. Wang JZ, Gao X, Wang ZH. The physiology and pathology of microtubule-associated protein tau. *Essays in biochemistry* 2014; 56: 111-23.
81. Sanchez MP, Alvarez-Tallada V, Avila J. [The microtubule-associated protein tau in neurodegenerative diseases. Tauopathies]. *Revista de neurologia* 2001; 33(2): 169-77.
82. Spires-Jones TL, Stoothoff WH, de Calignon A, Jones PB, Hyman BT. Tau pathophysiology in neurodegeneration: a tangled issue. *Trends in neurosciences* 2009; 32(3): 150-9.
83. Chambraud B, Sardin E, Giustiniani J, Dounane O, Schumacher M, Goedert M, Baulieu EE. A role for FKBP52 in Tau protein function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(6): 2658-63.
84. Johnson GV, Stoothoff WH. Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *Journal of cell science* 2004; 117(Pt 24): 5721-9.
85. Sergeant N, Delacourte A, Buee L. Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochimica et biophysica acta* 2005; 1739(2-3): 179-97.
86. Mailliot C, Sergeant N, Bussiere T, Caillet-Boudin ML, Delacourte A, Buee L. Phosphorylation of specific sets of tau isoforms reflects different neurofibrillary degeneration processes. *FEBS letters* 1998; 433(3): 201-4.
87. Probst A, Tolnay M, Langui D, Goedert M, Spillantini MG. Pick's disease: hyperphosphorylated tau protein segregates to the somatoaxonal compartment. *Acta neuropathologica* 1996; 92(6): 588-96.
88. Dong S, Duan Y, Hu Y, Zhao Z. Advances in the pathogenesis of Alzheimer's disease: a re-evaluation of amyloid cascade hypothesis. *Translational neurodegeneration* 2012; 1(1): 18.
89. Trojanowski JQ, Schmidt ML, Otvos L, Jr., Arai H, Hill WD, Lee VM. Vulnerability of the neuronal cytoskeleton in aging and Alzheimer disease: widespread involvement of all three major filament systems. *Annu Rev Gerontol Geriatr* 1990; 10: 167-82.

90. Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83(11): 4044-8.
91. Kopke E, Tung YC, Shaikh S, Alonso AC, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J Biol Chem* 1993; 268(32): 24374-84.
92. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta neuropathologica* 1991; 82(4): 239-59.
93. Bennett DA, Schneider JA, Wilson RS, Bienias JL, Arnold SE. Neurofibrillary tangles mediate the association of amyloid load with clinical Alzheimer disease and level of cognitive function. *Archives of neurology* 2004; 61(3): 378-84.
94. Cowan CM, Chee F, Shepherd D, Mudher A. Disruption of neuronal function by soluble hyperphosphorylated tau in a Drosophila model of tauopathy. *Biochem Soc Trans* 2010; 38(2): 564-70.
95. Lowrey PL, Takahashi JS. Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2004; 5: 407-41.
96. Kolmos E, Chow BY, Pruneda-Paz JL, Kay SA. HsfB2b-mediated repression of PRR7 directs abiotic stress responses of the circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111(45): 16172-7.
97. Paul KN, Saafir TB, Tosini G. The role of retinal photoreceptors in the regulation of circadian rhythms. *Rev Endocr Metab Disord* 2009; 10(4): 271-8.
98. Peirson S, Foster RG. Melanopsin: another way of signaling light. *Neuron* 2006; 49(3): 331-9.
99. Lynch HJ, Wurtman RJ, Moskowitz MA, Archer MC, Ho MH. Daily rhythm in human urinary melatonin. *Science* 1975; 187(4172): 169-71.
100. Klein DC. Arylalkylamine N-acetyltransferase: "the Timezyme". *J Biol Chem* 2007; 282(7): 4233-7.
101. Reiter RJ. The mammalian pineal gland: structure and function. *Am J Anat* 1981; 162(4): 287-313.
102. Calvo J, Boya J, Borregon A, Garcia-Maurino JE. Presence of glial cells in the rat pineal gland: a light and electron microscopic immunohistochemical study. *The Anatomical record* 1988; 220(4): 424-8.

103. Moller M, Baeres FM. The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell and tissue research* 2002; 309(1): 139-50.
104. Brzezinski A. Melatonin in humans. *N Engl J Med* 1997; 336(3): 186-95.
105. Klein DC, Coon SL, Roseboom PH, Weller JL, Bernard M, Gastel JA, Zatz M, Iuvone PM, Rodriguez IR, Begay V, Falcon J, Cahill GM, Cassone VM, Baler R, . The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. *Recent Prog Horm Res* 1997; 52: 307-57; discussion 57-8.
106. Waldhauser F, Dietzel M. Daily and annual rhythms in human melatonin secretion: role in puberty control. *Ann N Y Acad Sci* 1985; 453: 205-14.
107. Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrine reviews* 1991; 12(2): 151-80.
108. Arendt J. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Reviews of reproduction* 1998; 3(1): 13-22.
109. Semak I, Korik E, Antonova M, Wortsman J, Slominski A. Metabolism of melatonin by cytochrome P450s in rat liver mitochondria and microsomes. *Journal of pineal research* 2008; 45(4): 515-23.
110. Pfeffer M, Kuhn R, Krug L, Korf HW, Stehle JH. Rhythmic variation in beta1-adrenergic receptor mRNA levels in the rat pineal gland: circadian and developmental regulation. *Eur J Neurosci* 1998; 10(9): 2896-904.
111. Klein DC. Photoneural regulation of the mammalian pineal gland. *Ciba Found Symp* 1985; 117: 38-56.
112. Vanecek J. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiological reviews* 1998; 78(3): 687-721.
113. Karolczak M, Korf HW, Stehle JH. The rhythm and blues of gene expression in the rodent pineal gland. *Endocrine* 2005; 27(2): 89-100.
114. Maronde E, Stehle JH. The mammalian pineal gland: known facts, unknown facets. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 2007; 18(4): 142-9.
115. Fourtillan JB, Brisson AM, Fourtillan M, Ingrand I, Decourt JP, Girault J. Melatonin secretion occurs at a constant rate in both young and older men and women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280(1): E11-22.
116. Kvetnoy IM. Extrapineal melatonin: location and role within diffuse neuroendocrine system. *The Histochemical journal* 1999; 31(1): 1-12.

117. Huether G. The contribution of extrapineal sites of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates. *Experientia* 1993; 49(8): 665-70.
118. Acuna-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, Diaz-Casado ME, Lima-Cabello E, Lopez LC, Rosales-Corral S, Tan DX, Reiter RJ. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2014; 71(16): 2997-3025.
119. Chattoraj A, Liu T, Zhang LS, Huang Z, Borjigin J. Melatonin formation in mammals: in vivo perspectives. *Rev Endocr Metab Disord* 2009; 10(4): 237-43.
120. Li Y, Li L, Stephens MJ, Zenner D, Murray KC, Winship IR, Vavrek R, Baker GB, Fouad K, Bennett DJ. Synthesis, transport, and metabolism of serotonin formed from exogenously applied 5-HTP after spinal cord injury in rats. *Journal of neurophysiology* 2014; 111(1): 145-63.
121. Rouzaud-Laborde C, Hanoun N, Baysal I, Rech JS, Mias C, Calise D, Sicard P, Frugier C, Seguelas MH, Parini A, Pizzinat N. Role of endothelial AADC in cardiac synthesis of serotonin and nitrates accumulation. *PloS one* 2012; 7(7): e34893.
122. Kang K, Lee K, Park S, Kim YS, Back K. Enhanced production of melatonin by ectopic overexpression of human serotonin N-acetyltransferase plays a role in cold resistance in transgenic rice seedlings. *J Pineal Res* 2010; 49(2): 176-82.
123. Zmijewski MA, Sweatman TW, Slominski AT. The melatonin-producing system is fully functional in retinal pigment epithelium (ARPE-19). *Mol Cell Endocrinol* 2009; 307(1-2): 211-6.
124. Carocci A, Catalano A, Sinicropi MS. Melatonergic drugs in development. *Clinical pharmacology : advances and applications* 2014; 6: 127-37.
125. Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, Spence DW, Maestroni GJ, Zisapel N, Cardinali DP. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Progress in neurobiology* 2008; 85(3): 335-53.
126. Pala D, Lodola A, Bedini A, Spadoni G, Rivara S. Homology models of melatonin receptors: challenges and recent advances. *Int J Mol Sci* 2013; 14(4): 8093-121.
127. Barrett P, Conway S, Morgan PJ. Digging deep--structure-function relationships in the melatonin receptor family. *J Pineal Res* 2003; 35(4): 221-30.

128. Barrenetxe J, Delagrangé P, Martínez JA. Physiological and metabolic functions of melatonin. *J Physiol Biochem* 2004; 60(1): 61-72.
129. Reppert SM, Weaver DR, Godson C. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol Sci* 1996; 17(3): 100-2.
130. Dubocovich ML, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine* 2005; 27(2): 101-10.
131. Chen CQ, Fichna J, Bashashati M, Li YY, Storr M. Distribution, function and physiological role of melatonin in the lower gut. *World journal of gastroenterology : WJG* 2011; 17(34): 3888-98.
132. Cagnacci A. Melatonin in relation to physiology in adult humans. *Journal of pineal research* 1996; 21(4): 200-13.
133. Di WL, Kadva A, Djahanbakhch O, Silman R. Radioimmunoassay of bound and free melatonin in plasma. *Clinical chemistry* 1998; 44(2): 304-10.
134. Zawilska JB, Skene DJ, Arendt J. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. *Pharmacological reports : PR* 2009; 61(3): 383-410.
135. Prahl LS, Castle BT, Gardner MK, Odde DJ. Quantitative analysis of microtubule self-assembly kinetics and tip structure. *Methods in enzymology* 2014; 540: 35-52.
136. Shahpasand K, Uemura I, Saito T, Asano T, Hata K, Shibata K, Toyoshima Y, Hasegawa M, Hisanaga S. Regulation of mitochondrial transport and inter-microtubule spacing by tau phosphorylation at the sites hyperphosphorylated in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2012; 32(7): 2430-41.
137. Duncan JE, Goldstein LS. The genetics of axonal transport and axonal transport disorders. *PLoS genetics* 2006; 2(9): e124.
138. Gennerich A, Vale RD. Walking the walk: how kinesin and dynein coordinate their steps. *Curr Opin Cell Biol* 2009; 21(1): 59-67.
139. Verhey KJ, Hammond JW. Traffic control: regulation of kinesin motors. *Nature reviews Molecular cell biology* 2009; 10(11): 765-77.
140. Stock MF, Guerrero J, Cobb B, Eggers CT, Huang TG, Li X, Hackney DD. Formation of the compact conformation of kinesin requires a COOH-terminal heavy chain domain and inhibits microtubule-stimulated ATPase activity. *J Biol Chem* 1999; 274(21): 14617-23.

141. Cai D, Hoppe AD, Swanson JA, Verhey KJ. Kinesin-1 structural organization and conformational changes revealed by FRET stoichiometry in live cells. *J Cell Biol* 2007; 176(1): 51-63.
142. Honda A, Miyoshi K, Baba K, Taniguchi M, Koyama Y, Kuroda S, Katayama T, Tohyama M. Expression of fasciculation and elongation protein zeta-1 (FEZ1) in the developing rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 2004; 122(1): 89-92.
143. Dong W, Huang F, Fan W, Cheng S, Chen Y, Zhang W, Shi H, He H. Differential effects of melatonin on amyloid-beta peptide 25-35-induced mitochondrial dysfunction in hippocampal neurons at different stages of culture. *Journal of pineal research* 2010; 48(2): 117-25.
144. Chen JX, Yan SD. Amyloid-beta-induced mitochondrial dysfunction. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 2007; 12(2): 177-84.
145. Su B, Wang X, Zheng L, Perry G, Smith MA, Zhu X. Abnormal mitochondrial dynamics and neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1802(1): 135-42.
146. Verhey KJ, Meyer D, Deehan R, Blenis J, Schnapp BJ, Rapoport TA, Margolis B. Cargo of kinesin identified as JIP scaffolding proteins and associated signaling molecules. *The Journal of cell biology* 2001; 152(5): 959-70.
147. Whitmarsh AJ, Kuan CY, Kennedy NJ, Kelkar N, Haydar TF, Mordas JP, Appel M, Rossini AA, Jones SN, Flavell RA, Rakic P, Davis RJ. Requirement of the JIP1 scaffold protein for stress-induced JNK activation. *Genes & development* 2001; 15(18): 2421-32.
148. Horiuchi D, Barkus RV, Pilling AD, Gassman A, Saxton WM. APLIP1, a kinesin binding JIP-1/JNK scaffold protein, influences the axonal transport of both vesicles and mitochondria in *Drosophila*. *Current biology : CB* 2005; 15(23): 2137-41.
149. Chua JJ, Jahn R, Klopfenstein DR. Managing intracellular transport. *Worm* 2013; 2(1): e21564.
150. Fujita T, Maturana AD, Ikuta J, Hamada J, Walchli S, Suzuki T, Sawa H, Wooten MW, Okajima T, Tatematsu K, Tanizawa K, Kuroda S. Axonal guidance protein FEZ1 associates with tubulin and kinesin motor protein to transport mitochondria in neurites of NGF-stimulated PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 361(3): 605-10.

151. Ikuta J, Maturana A, Fujita T, Okajima T, Tatematsu K, Tanizawa K, Kuroda S. Fasciculation and elongation protein zeta-1 (FEZ1) participates in the polarization of hippocampal neuron by controlling the mitochondrial motility. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 353(1): 127-32.
152. Stokin GB, Lillo C, Falzone TL, Brusch RG, Rockenstein E, Mount SL, Raman R, Davies P, Masliah E, Williams DS, Goldstein LS. Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science* 2005; 307(5713): 1282-8.
153. Ben-Jonathan N, Hnasko R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocrine reviews* 2001; 22(6): 724-63.
154. Perrier JF, Cotel F. Serotonergic modulation of spinal motor control. *Curr Opin Neurobiol* 2015; 33: 1-7.
155. Visser AK, Ramakrishnan NK, Willemsen AT, Di Gialleonardo V, de Vries EF, Kema IP, Dierckx RA, Van Waarde A. [(11)C]5-HTP and microPET are not suitable for pharmacodynamic studies in the rodent brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2014; 34(1): 118-25.
156. Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacological reviews* 1994; 46(2): 157-203.
157. Vanhoutte P, Amery A, Birkenhager W, Breckenridge A, Buhler F, Distler A, Dormandy J, Doyle A, Frohlich E, Hansson L. Serotonergic mechanisms in hypertension. Focus on the effects of ketanserin. *Hypertension* 1988; 11(2): 111-33.
158. Ni W, Watts SW. 5-hydroxytryptamine in the cardiovascular system: focus on the serotonin transporter (SERT). *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; 33(7): 575-83.
159. Stockmeier CA, Martino AM, Kellar KJ. A strong influence of serotonin axons on beta-adrenergic receptors in rat brain. *Science* 1985; 230(4723): 323-5.
160. Nagatsu T, Stjarne L. Catecholamine synthesis and release. Overview. *Advances in pharmacology* 1998; 42: 1-14.
161. Fitzpatrick PF. The aromatic amino acid hydroxylases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 2000; 74: 235-94.

162. Andersson DR, Bjornsson E, Bergquist F, Nissbrandt H. Motor activity-induced dopamine release in the substantia nigra is regulated by muscarinic receptors. *Experimental neurology* 2010; 221(1): 251-9.
163. Daubner SC, Le T, Wang S. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch Biochem Biophys* 2011; 508(1): 1-12.
164. Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiological reviews* 1998; 78(1): 189-225.
165. Jackson DM, Westlind-Danielsson A. Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacology & therapeutics* 1994; 64(2): 291-370.
166. Forn J, Krueger BK, Greengard P. Adenosine 3',5'-monophosphate content in rat caudate nucleus: demonstration of dopaminergic and adrenergic receptors. *Science* 1974; 186(4169): 1118-20.
167. Jaber M, Robinson SW, Missale C, Caron MG. Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology* 1996; 35(11): 1503-19.
168. Ikeda H, Saigusa T, Kamei J, Koshikawa N, Cools AR. Spiraling dopaminergic circuitry from the ventral striatum to dorsal striatum is an effective feed-forward loop. *Neuroscience* 2013; 241: 126-34.
169. Trillo L, Das D, Hsieh W, Medina B, Moghadam S, Lin B, Dang V, Sanchez MM, De Miguel Z, Ashford JW, Salehi A. Ascending monoaminergic systems alterations in Alzheimer's disease. translating basic science into clinical care. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 2013; 37(8): 1363-79.
170. Simic G, Stanic G, Mladinov M, Jovanov-Milosevic N, Kostovic I, Hof PR. Does Alzheimer's disease begin in the brainstem? *Neuropathol Appl Neurobiol* 2009; 35(6): 532-54.
171. Perez SE, Lazarov O, Koprach JB, Chen EY, Rodriguez-Menendez V, Lipton JW, Sisodia SS, Mufson EJ. Nigrostriatal dysfunction in familial Alzheimer's disease-linked APP^{swe}/PS1^{DeltaE9} transgenic mice. *J Neurosci* 2005; 25(44): 10220-9.
172. Sakae N, Yamasaki N, Kitaichi K, Fukuda T, Yamada M, Yoshikawa H, Hiranita T, Tatsumi Y, Kira J, Yamamoto T, Miyakawa T, Nakayama KI. Mice lacking the schizophrenia-associated protein FEZ1 manifest hyperactivity and enhanced responsiveness to psychostimulants. *Human molecular genetics* 2008; 17(20): 3191-203.

173. Tevosian SG, Jimenez E, Hatch HM, Jiang T, Morse DA, Fox SC, Padua MB. Adrenal Development in Mice Requires GATA4 and GATA6 Transcription Factors. *Endocrinology* 2015; 156(7): 2503-17.
174. Wang Y, Wang HS, Wang T, Huang C, Liu J. L-DOPA-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease is associated with the fluctuational release of norepinephrine in the sensorimotor striatum. *Journal of neuroscience research* 2014; 92(12): 1733-45.
175. Gannon M, Che P, Chen Y, Jiao K, Roberson ED, Wang Q. Noradrenergic dysfunction in Alzheimer's disease. *Frontiers in neuroscience* 2015; 9: 220.
176. Swanson LW, Hartman BK. The central adrenergic system. An immunofluorescence study of the location of cell bodies and their efferent connections in the rat utilizing dopamine-beta-hydroxylase as a marker. *The Journal of comparative neurology* 1975; 163(4): 467-505.
177. Feve AP. Current status of tyrosine hydroxylase in management of Parkinson's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2012; 11(4): 450-5.
178. Prince J. Catecholamine dysfunction in attention-deficit/hyperactivity disorder: an update. *J Clin Psychopharmacol* 2008; 28(3 Suppl 2): s39-45.
179. Hein L. Adrenoceptors and signal transduction in neurons. *Cell and tissue research* 2006; 326(2): 541-51.
180. Tank AW, Lee Wong D. Peripheral and central effects of circulating catecholamines. *Comprehensive Physiology* 2015; 5(1): 1-15.
181. Saxena G, Bharti S, Kamat PK, Sharma S, Nath C. Melatonin alleviates memory deficits and neuronal degeneration induced by intracerebroventricular administration of streptozotocin in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2010; 94(3): 397-403.
182. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of neuroscience methods* 1984; 11(1): 47-60.
183. Elcioglu H, Kabasakal L, Alan S, Salva E, Tufan F, Karan M. Thalidomide attenuates learning and memory deficits induced by intracerebroventricular administration of streptozotocin in rats. *Biotech Histochem* 2013; 88(3-4): 145-52.
184. Tota S, Kamat PK, Saxena G, Hanif K, Najmi AK, Nath C. Central angiotensin converting enzyme facilitates memory impairment in intracerebroventricular streptozotocin treated rats. *Behavioural brain research* 2012; 226(1): 317-30.

185. Tiwari V, Kuhad A, Bishnoi M, Chopra K. Chronic treatment with tocotrienol, an isoform of vitamin E, prevents intracerebroventricular streptozotocin-induced cognitive impairment and oxidative-nitrosative stress in rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 2009; 93(2): 183-9.
186. Kashani MS, Tavirani MR, Talaei SA, Salami M. Aqueous extract of lavender (*Lavandula angustifolia*) improves the spatial performance of a rat model of Alzheimer's disease. *Neuroscience bulletin* 2011; 27(2): 99-106.
187. http://www.alzet.com/products/guide_to_use/cfs_preparation.html. 23 Augustos 2015.
188. Agrawal R, Tyagi E, Shukla R, Nath C. Insulin receptor signaling in rat hippocampus: a study in STZ (ICV) induced memory deficit model. *Eur Neuropsychopharmacol* 2011; 21(3): 261-73.
189. Gwayi N, Bernard RT. The effects of melatonin on sperm motility in vitro in Wistar rats. *Andrologia* 2002; 34(6): 391-6.
190. Matsubara E, Bryant-Thomas T, Pacheco Quinto J, Henry TL, Poeggeler B, Herbert D, Cruz-Sanchez F, Chyan YJ, Smith MA, Perry G, Shoji M, Abe K, Leone A, Grundke-Ikbal I, Wilson GL, Ghiso J, Williams C, Refolo LM, Pappolla Ma, Chain DG, Neria E. Melatonin increases survival and inhibits oxidative and amyloid pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* 2003; 85(5): 1101-8.
191. Altintas R, Parlakpınar H, Beytur A, Vardi N, Polat A, Sagir M, Odabas GP. Protective effect of dexpanthenol on ischemia-reperfusion-induced renal injury in rats. *Kidney Blood Press Res* 2012; 36(1): 220-30.
192. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 7th Edition. London, UK: Academic Press; 2013.
193. Unsal C, Oran M, Albayrak Y, Aktas C, Erboğa M, Topcu B, Uygur R, Tulubas F, Yanartas O, Ates O, Ozen OA. Neuroprotective effect of ebselen against intracerebroventricular streptozotocin-induced neuronal apoptosis and oxidative stress in rats. *Toxicology and industrial health* 2013.
194. Dutia R, Meece K, Dighe S, Kim AJ, Wardlaw SL. beta-Endorphin antagonizes the effects of alpha-MSH on food intake and body weight. *Endocrinology* 2012; 153(9): 4246-55.

195. Grieb P. Intracerebroventricular Streptozotocin Injections as a Model of Alzheimer's Disease: in Search of a Relevant Mechanism. *Molecular neurobiology* 2016; 53(3): 1741-52.
196. Nukatsuka M, Sakurai H, Yoshimura Y, Nishida M, Kawada J. Enhancement by streptozotocin of O₂- radical generation by the xanthine oxidase system of pancreatic beta-cells. *FEBS letters* 1988; 239(2): 295-8.
197. Lannert H, Hoyer S. Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. *Behavioral neuroscience* 1998; 112(5): 1199-208.
198. Blokland A, Jolles J. Spatial learning deficit and reduced hippocampal ChAT activity in rats after an ICV injection of streptozotocin. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 1993; 44(2): 491-4.
199. Yilmaz B, Gilmore DP, Wilson CA. Inhibition of the pre-ovulatory LH surge in the rat by central noradrenergic mediation: Involvement of an anaesthetic (urethane) and opioid receptor agonists. *Biogenic Amines* 1996; 12(5): 423-35.
200. Klingner M, Apelt J, Kumar A, Sorger D, Sabri O, Steinbach J, Scheunemann M, Schliebs R. Alterations in cholinergic and non-cholinergic neurotransmitter receptor densities in transgenic Tg2576 mouse brain with beta-amyloid plaque pathology. *Int J Dev Neurosci* 2003; 21(7): 357-69.
201. Doraiswamy PM. The role of the N-methyl-D-aspartate receptor in Alzheimer's disease: therapeutic potential. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2003; 3(5): 373-8.
202. Palmer AM. Neurochemical studies of Alzheimer's disease. *Neurodegeneration* 1996; 5(4): 381-91.
203. Kapur S, Remington G. Serotonin-dopamine interaction and its relevance to schizophrenia. *The American journal of psychiatry* 1996; 153(4): 466-76.
204. Korsgaard S, Gerlach J, Christensson E. Behavioral aspects of serotonin-dopamine interaction in the monkey. *European journal of pharmacology* 1985; 118(3): 245-52.
205. Sasaki-Adams DM, Kelley AE. Serotonin-dopamine interactions in the control of conditioned reinforcement and motor behavior. *Neuropsychopharmacology* 2001; 25(3): 440-52.

206. De Deurwaerdere P, Bonhomme N, Lucas G, Le Moal M, Spampinato U. Serotonin enhances striatal dopamine outflow in vivo through dopamine uptake sites. *Journal of neurochemistry* 1996; 66(1): 210-5.
207. Robert PH, Mulin E, Mallea P, David R. REVIEW: Apathy diagnosis, assessment, and treatment in Alzheimer's disease. *CNS neuroscience & therapeutics* 2010; 16(5): 263-71.
208. Walsh SL, Cunningham KA. Serotonergic mechanisms involved in the discriminative stimulus, reinforcing and subjective effects of cocaine. *Psychopharmacology* 1997; 130(1): 41-58.
209. De Deurwaerdere P, Stinus L, Spampinato U. Opposite change of in vivo dopamine release in the rat nucleus accumbens and striatum that follows electrical stimulation of dorsal raphe nucleus: role of 5-HT₃ receptors. *J Neurosci* 1998; 18(16): 6528-38.
210. Kapur S, Zipursky RB, Remington G. Clinical and theoretical implications of 5-HT₂ and D₂ receptor occupancy of clozapine, risperidone, and olanzapine in schizophrenia. *The American journal of psychiatry* 1999; 156(2): 286-93.
211. Ohara K, Kondo N, Ohara K. Changes of monoamines in post-mortem brains from patients with diffuse Lewy body disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1998; 22(2): 311-7.
212. Ryoo HL, Joyce JN. Loss of dopamine D₂ receptors varies along the rostrocaudal axis of the hippocampal complex in Alzheimer's disease. *The Journal of comparative neurology* 1994; 348(1): 94-110.
213. Reinikainen KJ, Soininen H, Riekkinen PJ. Neurotransmitter changes in Alzheimer's disease: implications to diagnostics and therapy. *Journal of neuroscience research* 1990; 27(4): 576-86.
214. Prokselj T, Jerin A, Muck-Seler D, Kogoj A. Decreased platelet serotonin concentration in Alzheimer's disease with involuntary emotional expression disorder. *Neuroscience letters* 2014; 578: 71-4.
215. Kumar AM, Sevush S, Kumar M, Ruiz J, Eisdorfer C. Peripheral serotonin in Alzheimer's disease. *Neuropsychobiology* 1995; 32(1): 9-12.
216. Arai H, Ichimiya Y, Kosaka K, Moroji T, Iizuka R. Neurotransmitter changes in early- and late-onset Alzheimer-type dementia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1992; 16(6): 883-90.

217. Tohgi H, Abe T, Takahashi S, Kimura M, Takahashi J, Kikuchi T. Concentrations of serotonin and its related substances in the cerebrospinal fluid in patients with Alzheimer type dementia. *Neuroscience letters* 1992; 141(1): 9-12.
218. Palmer AM, Wilcock GK, Esiri MM, Francis PT, Bowen DM. Monoaminergic innervation of the frontal and temporal lobes in Alzheimer's disease. *Brain research* 1987; 401(2): 231-8.
219. Foote SL, Bloom FE, Aston-Jones G. Nucleus locus ceruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiological reviews* 1983; 63(3): 844-914.
220. Jin X, Li S, Bondy B, Zhong W, Oginsky MF, Wu Y, Johnson CM, Zhang S, Cui N, Jiang C. Identification of a Group of GABAergic Neurons in the Dorsomedial Area of the Locus Coeruleus. *PloS one* 2016; 11(1): e0146470.
221. Xiao Z, Deng PY, Rojanathammanee L, Yang C, Grisanti L, Permpoonputtana K, Weinshenker D, Doze VA, Porter JE, Lei S. Noradrenergic depression of neuronal excitability in the entorhinal cortex via activation of TREK-2 K⁺ channels. *The Journal of biological chemistry* 2009; 284(16): 10980-91.
222. Marien MR, Colpaert FC, Rosenquist AC. Noradrenergic mechanisms in neurodegenerative diseases: a theory. *Brain Res Brain Res Rev* 2004; 45(1): 38-78.
223. Iversen LL, Rossor MN, Reynolds GP, Hills R, Roth M, Mountjoy CQ, Foote SL, Morrison JH, Bloom FE. Loss of pigmented dopamine-beta-hydroxylase positive cells from locus coeruleus in senile dementia of Alzheimer's type. *Neuroscience letters* 1983; 39(1): 95-100.
224. Masilamoni JG, Jesudason EP, Dhandayuthapani S, Ashok BS, Vignesh S, Jebaraj WC, Paul SF, Jayakumar R. The neuroprotective role of melatonin against amyloid beta peptide injected mice. *Free radical research* 2008; 42(7): 661-73.
225. Wang XC, Zhang J, Yu X, Han L, Zhou ZT, Zhang Y, Wang JZ. Prevention of isoproterenol-induced tau hyperphosphorylation by melatonin in the rat. *Sheng Li Xue Bao* 2005; 57(1): 7-12.
226. Wu YH, Fischer DF, Swaab DF. A promoter polymorphism in the monoamine oxidase A gene is associated with the pineal MAOA activity in Alzheimer's disease patients. *Brain research* 2007; 1167: 13-9.
227. Benitez-King G. Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *Journal of pineal research* 2006; 40(1): 1-9.

228. Ionov M, Burchell V, Klajnert B, Bryszewska M, Abramov AY. Mechanism of neuroprotection of melatonin against beta-amyloid neurotoxicity. *Neuroscience* 2011; 180: 229-37.
229. Pierpaoli W, Maestroni GJ. Melatonin: a principal neuroimmunoregulatory and anti-stress hormone: its anti-aging effects. *Immunology letters* 1987; 16(3-4): 355-61.
230. Pierpaoli W, Yi C. The involvement of pineal gland and melatonin in immunity and aging. I. Thymus-mediated, immunoreconstituting and antiviral activity of thyrotropin-releasing hormone. *Journal of neuroimmunology* 1990; 27(2-3): 99-109.
231. Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Maestroni GJ, Esquifino AI, Hardeland R, Cardinali DP. Role of melatonin in neurodegenerative diseases. *Neurotoxicity research* 2005; 7(4): 293-318.
232. Quinn J, Kulhanek D, Nowlin J, Jones R, Pratico D, Rokach J, Stackman R. Chronic melatonin therapy fails to alter amyloid burden or oxidative damage in old Tg2576 mice: implications for clinical trials. *Brain research* 2005; 1037(1-2): 209-13.
233. Feng Z, Qin C, Chang Y, Zhang JT. Early melatonin supplementation alleviates oxidative stress in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Free radical biology & medicine* 2006; 40(1): 101-9.
234. Wang JZ, Wang ZF. Role of melatonin in Alzheimer-like neurodegeneration. *Acta pharmacologica Sinica* 2006; 27(1): 41-9.
235. Cheng Y, Feng Z, Zhang QZ, Zhang JT. Beneficial effects of melatonin in experimental models of Alzheimer disease. *Acta pharmacologica Sinica* 2006; 27(2): 129-39.
236. Sgro AE, Bajjalieh SM, Chiu DT. Single-axonal organelle analysis method reveals new protein-motor associations. *ACS chemical neuroscience* 2013; 4(2): 277-84.
237. Toda H, Mochizuki H, Flores R, 3rd, Josowitz R, Krasieva TB, Lamorte VJ, Suzuki E, Gindhart JG, Furukubo-Tokunaga K, Tomoda T. UNC-51/ATG1 kinase regulates axonal transport by mediating motor-cargo assembly. *Genes & development* 2008; 22(23): 3292-307.

238. Blasius TL, Cai D, Jih GT, Toret CP, Verhey KJ. Two binding partners cooperate to activate the molecular motor Kinesin-1. *The Journal of cell biology* 2007; 176(1): 11-7.
239. Kang E, Burdick KE, Kim JY, Duan X, Guo JU, Sailor KA, Jung DE, Ganesan S, Choi S, Pradhan D, Lu B, Avramopoulos D, Christian K, Malhotra AK, Song H, Ming GL. Interaction between FEZ1 and DISC1 in regulation of neuronal development and risk for schizophrenia. *Neuron* 2011; 72(4): 559-71.
240. Ishizuka K, Paek M, Kamiya A, Sawa A. A review of Disrupted-In-Schizophrenia-1 (DISC1): neurodevelopment, cognition, and mental conditions. *Biological psychiatry* 2006; 59(12): 1189-97.
241. Namba T, Ming GL, Song H, Waga C, Enomoto A, Kaibuchi K, Kohsaka S, Uchino S. NMDA receptor regulates migration of newly generated neurons in the adult hippocampus via Disrupted-In-Schizophrenia 1 (DISC1). *Journal of neurochemistry* 2011; 118(1): 34-44.
242. Thomson PA, Harris SE, Starr JM, Whalley LJ, Porteous DJ, Deary IJ. Association between genotype at an exonic SNP in DISC1 and normal cognitive aging. *Neuroscience letters* 2005; 389(1): 41-5.
243. Miyoshi K, Honda A, Baba K, Taniguchi M, Oono K, Fujita T, Kuroda S, Katayama T, Tohyama M. Disrupted-In-Schizophrenia 1, a candidate gene for schizophrenia, participates in neurite outgrowth. *Molecular psychiatry* 2003; 8(7): 685-94.
244. Lipska BK, Peters T, Hyde TM, Halim N, Horowitz C, Mitkus S, Weickert CS, Matsumoto M, Sawa A, Straub RE, Vakkalanka R, Herman MM, Weinberger DR, Kleinman JE. Expression of DISC1 binding partners is reduced in schizophrenia and associated with DISC1 SNPs. *Human molecular genetics* 2006; 15(8): 1245-58.
245. Mena MA, de Bernardo S, Casarejos MJ, Canals S, Rodriguez-Martin E. The role of astroglia on the survival of dopamine neurons. *Molecular neurobiology* 2002; 25 (3): 245-63.

EK 1. ÖZGEÇMİŞ

11.12.1971 tarihinde Malatya’da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Malatya’da, lisans eğitimimi ise Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nde tamamladım. Askerlik görevimin ardından yaklaşık 10 yıl kadar ilaç sektöründe çalıştım. O döneme kadar sürekli ilgili ve istekli olduğum doktora eğitimime 2011 yılında İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı’nda başladım. Evli ve iki çocuk babasıyım.



EK 2. ETİK KURUL ONAY BELGESİ



İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 23-05-2014
Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya
Araştırma Protokol no.su : 2014/A-50
Deneide Kullanılacak Hayvanın Türü : Sıçan
Deneide Kullanılacak Hayvanın Soyu : Sprague-Dawley
Deneide Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : E D Farketmez
Deneide Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 60 Adet
Deneide Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı : 4-6 aylık/ 220-280 gr

Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Doç.Dr. Süleyman SANDAL'ın yürüttüğü olduğu "Sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan Alzheimer patogenezi üzerine FEZ1 gen ifadesi ve Pinealektominin rolünün araştırılması." isimli 2014/A-50 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel 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	Doç. 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. B-AKTİN GEN DİZİLİMİ

Sıçan β -aktin geninin 1293 baz çiftinden oluşan mRNA dizilimi ve primerlerin dizilimdeki yerleri gösterilmiştir. Gen Bankası Kayıt No: NM_031144.3

```
1 gtcgagtcgcggtccaccgcgagtacaaccttcttgagctcctccgctcgccggtccac
61 acccgccaccagttcgccatggatgacgatatcgctgcgctcgtcgtcgacaacggctcc
121 ggcatgtgcaaggccggcttcgcgggcgacgatgctccccgggcccgtcttcccctccatc
181 gtgggcccgcctaggcaccaggggtgatgggtgggtatgggtcagaaggactcctacgtg
241 ggcgacgaggcccagagcaagagaggcatcctgaccctgaagtacccattgaacacggc
301 attgtcaccaactgggacgatatggagaagatttggcaccacactttctacaatgagctg
361 cgtgtggcccctgaggagcaccctgtgctgctcaccgaggcccctctgaaccctaaggcc
421 aaccgtgaaaagatgaccagatcatgtttgagaccttcaacaccccagccatgtacgta
481 gccatccaggctgtgttgtccctgtatgcctctggctcgtaccactggcattgtgatggac
541 tccggagacggggtcaccacactgtgcccattctatgaggggttacgcgctccctcatgcc
601 atcctgcgtctggacctggctggccgggacctgacagactacctcatgaagatcctgacc
661 gagcgtggctacagcttcaccaccacagctgagagggaaatcgtgcgtgacattaaagag
721 aagctgtgctatgttgccctagacttcgagcaagagatggccactgcccgcacccctctcc
781 tcctggagaagagctatgagctgcctgacgggtcaggtcatcactatcggcaatgagcgg
841 ttccgatgccccgaggctctcttcagccttccttccctgggtatggaatcctgtggcatc
901 catgaaactacattcaattccatcatgaagtgtgacggtgacatccgtaaagacctctat
961 gccaacacagtgtgtctggtggcaccaccatgtaccaggcattgctgacaggatgcag
1021 aaggagattactgcctggctcctagcaccatgaagatcaagatcattgctcctcctgag
1081 cgcaagtactctgtgtggattggtggctctatcctggcctcactgtccaccttcagcag
1141 atgtggatcagcaagcaggagtacgatgagtcggcccctccatcgtgcaccgcaaagtc
1201 ttctaggcggactgttactgagctgcttttacacccttctttgacaaaacctaacttg
1261 cgcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

>>>>> İleri primer

<<<<<< Geri primer

EK 4. FEZ1 GEN DİZİLİMİ

Sıçan Fez-1 geninin 1697 baz çiftinden oluşan mRNA dizilimi ve primerlerin dizilimdeki yerleri gösterilmiştir. Gen Bankası Kayıt No: NM_031066.1

```
1 tagctggcttgcccgctgccggtgcactgcaccgggcccactctagccggtggatgggga
61 tgtctggctgaacccccgggatccgattccctcctccaggacctgctcagggaaacgggatc
121 ttgacagttgccatcattgtactacggtgccaggatggaggctccactggtgagtctgga
181 tgaagagtttgaagatatcaggccctgctgcactgaggaccagaggaaaagccacaaag
241 tctctatggcacatctcctcaccacctggaggacccttcctcctccgagcttgagaattt
301 ttcttccgaaataatcagcttcaagtccatggaggacctcgtgaatgaatttgatgagaa
361 gctcaatgtctgctttcggaaactacaatgccaaagaccgagaacctggctccagtgaagaa
>>>>>>>>>>>>>>>>
421 ccagttgcagatccaggaggaggaggagactcttcgggatgaggaggtttgggatgctct
>>>>>>>> <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
481 gacagacaattacatcccttactctcagaagactggagggacccaaacattgaagctct
<<<<
541 gaatggcaacagctctgacactgagatccacgagaaggaagaagaagatgagttcattga
601 gaagagtgaaaacgactctgggtatcaacgaggagcctctcctcacagctgaccaggtgat
661 tgaggagatcgaagaaatgatgcagaactcccagatcctgaggaggaagtggaggtgct
721 ggaagaggaggatggaggagaaatctcgtctcaggcagattcagtcctgctacaagagat
781 gcaggccctgacgcagaccttcaacaacaactggctcctatgaagggtgagacacatgtc
841 tgggtctgagctgacagagctgctggaccaggtggaggggtgccatccgtgacttctcgga
901 ggagctggtccaccagctggcccgcagagatgagctggagttagagaaggaagtgaagaa
961 ctctttcatcacggtgctcattgaggttcagaataagcagaaggagcagcgggaactgat
1021 gaagaagaggcggaagagaaggggttaagcctgcagagcagtcggatagagaaggggaa
1081 ccagatgcctctcaagcgtttcagcatggaggcatctccaacatcctgcagagtggcat
1141 ccgccagacctttggctcctcaggagctgacagacagtagctgaacacagtcacccctta
1201 tgagaagaaatcttctcctcctcctctgtggaagacctgcagatgctgacaaacattctctt
1261 cgccatgaaggaggataacgagaaggtgcctactttgctaacggactacattttaaaagt
1321 gctctgtccaacctaacctcacctttggagcagcctcactgcaggaggtcactgagcaag
1381 aaagtattccatcactgggattgcatgacaccacgtaacctccggcggtgtatttaaagc
1441 tgtatagcttaacctggattaacatgagcaaccgcgcacgcgcgggggtcctttgctgtt
1501 ggcttctagtgctagtaatcattggatgcatgatcggcgtagggccagtgactctgctc
```

1561 cctctaacctgtggtggggaagacaggtgcacctcaccactcattatgtagtctggctcca
1621 gccctcaaccagcttataactcttcagactaattttgaaataaaccttcatttaattaat
1681 atcaaaaaaaaaaaaaa

>>>>> İleri primer

<<<<<< Geri primer

