

T.C.  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

**ALZHEİMER HASTALARININ BEYİN VE İSKELET KAS  
HÜCRELERİNDE AMİLOİD BETA TOKSİSİTESİ ÜZERİNE  
HUPERZİN-A'NIN ETKİLERİ**

Çağatay Han TÜRKSEVEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Belgin BÜYÜKAKILLI

MERSİN – 2014

T.C.  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

**ALZHEİMER HASTALARININ BEYİN VE İSKELET KAS  
HÜCRELERİNDE AMİLOİD BETA TOKSİSİTESİ ÜZERİNE  
HUPERZİN-A'NIN ETKİLERİ**

Çağatay Han TÜRKSEVEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Belgin BÜYÜKAKILLI

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP-SBE  
BFB (ÇHT) 2013-1 YL nolu proje olarak kabul edilmiştir.

Tez No:262

MERSİN – 2014

**Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

Biyofizik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi Programı çerçevesinde yürütülmüş olan "Alzheimer hastalarının beyin ve iskelet kas hücrelerinde amiloid beta toksisitesi üzerine Huperzin-A'nın etkileri" başlıklı çalışma, jürimiz tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

**Tez Savunma Tarihi: 24/07/2014**



Prof. Dr. Belgin BÜYÜKAKILLI  
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Jüri Başkanı



Doç. Dr. Ebru BALLI  
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Jüri Üyesi



Prof. Dr. Nurten ERDAL  
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Jüri Üyesi

Yukarıdaki tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 05/08/2014 tarih ve 2014-212 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Enstitü Müdürü  
Prof. Dr. Nedat YILMAZ



## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince emeğini ve bilgisini benden esirgemeyen saygıdeğer hocalarıma; tez çalışmamın her aşamasında değerli katkılar sunan tez danışmanım Prof. Dr. Belgin BÜYÜKAKILLI'ya en içten saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgilerinden yararlandığım hocalarım Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU'na, Prof. Dr. Nurten ERDAL'a, teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca değerli katkıları olan Yakın Doğu Üniversitesi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Rüştü ONUR, Histoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ebru BALLI'ya, Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Leyla ŞAHİN'e, Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. M. Y. Burak ÇİMEN'e, teşekkür ederim. Zorda kaldığım noktalarda yorumlarıyla katkıda bulunan arkadaşım Yrd. Doç. Dr. Nail Can ÖZTÜRK'e teşekkür ederim. Tez çalışmamın deneysel aşamasındaki katkılarından dolayı Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Yüksek Lisans Öğrencisi olan Esra PEKOĞLU'na ve Anatomi Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Turan KOÇ'a çok teşekkür ederim.

Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı çalışanları Veteriner Hekim Taner YENER'e, Tekniker Mehmet ACIOĞLU'na, Personel Muhsin YAŞAR ve Vedat ÜREDİ'ye çok teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında yanımda olan ve akademik eğitimimin sürekliliğini sağlarken yanımdan hiç ayrılmayan, yaşamımın daha iyi daha güzel olması için maddi ve manevi desteklerini esirgemeyerek beni bugünlere getiren annem Sevgi TÜRKSEVEN'e ve kardeşim Ertuğrul TÜRKSEVEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çağatay Han TÜRKSEVEN

# İÇİNDEKİLER

<b>KABUL VE ONAY</b> .....	ii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iii
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	iv
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	viii
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	xii
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	xiv
<b>ÖZET</b> .....	xviii
<b>ABSTRACT</b> .....	xix
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	5
2.1. Alzheimer Hastalığı (AH) Tarihçesi .....	5
2.2. Alzheimer Hastalığı Epidemiyoloji ve Etiyolojisi .....	5
2.3. Alzheimer Hastalığı Patolojisi .....	8
2.3.1. Amiloid Beta Prekürsör Proteini (APP) ve Amiloid Beta (A $\beta$ ) Peptidi .....	9
2.3.2. Nörofibriler Yumaklar (NFY) .....	14
2.3.3. Sinaps ve Nöron Kaybı .....	17
2.3.4. Kolinergic Kayıp .....	20
2.4. Asetilkolin Esteraz (AChE) İnhibitörleri .....	22
2.4.1. Huperzin-A .....	25
2.5. Alzheimer Hastalığına Bağlı Kas Hastalığı (İnklüzyon Cisimcikli Miyozit ICM) Patolojisi .....	28
2.5.1. Normal İskelet Kas Morfolojisi .....	28
2.5.2. Ekstansör Digitorum Longus (EDL) Kası .....	33
2.5.3. İnklüzyon Cisimcikli Miyozit (ICM) ve Alzheimer Hastalığı Etkileşimi .....	34
2.6. Alzheimer Hastalığında Hayvan Modelleri .....	37
2.7. Sıçanların Bilişsel ve Lokomotor Yetilerinin Değerlendirilmesi .....	41

2.8. Sıçanların Ağrıya Yanıtlarının Değerlendirilmesi-Sıcak Plaka (Hot Plate) Testi	43
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEMLER</b>	45
3.1. Deneysel Hayvanlarının Sağlanması	45
3.2. Ön Çalışma	45
3.3. Çalışma Gruplarının ve Alzheimer Hayvan Modelinin Oluşturulması	48
3.4. Cerrahi Prosedür: Overektomi	50
3.5. Davranış Deneyleri	51
3.5.1. Lokomotor Aktivite Deneyi (Açık Alan)	52
3.5.2. Öğrenme ve Hafıza Deneyleri (Morris Su Tankı)	53
3.5.3. Ağrı Eşiğini Saptama Deneyi (Sıcak Plaka-Hot Plate)	57
3.6. Biyopotansiyel ve Biyomekanik Kayıtlar	58
3.6.1. EDL Kasının Elektriksel Aktivite Kaydı (EMG-BKAP)	59
3.6.2. EDL Kası Mekanik Aktivite Yanıtlarının Kayıt Tekniği	60
3.6.3. Optimum Kas Boyunun ( $L_0$ ) Belirlenmesi	62
3.6.4. Uyarı Protokolü ve Ölçülen İzometrik Sarsı Eğrisi Parametreleri	65
3.7. Davranış, Biyopotansiyel ve Biyomekanik Deneysel Sonuçlarının İmmünohistokimyasal Doğrulaması İçin Doku Fiksasyon İşlemi (Perfüzyon Yöntemi)	70
3.7.1. Işık Mikroskopik Değerlendirme	73
3.8. Biyokimyasal Analizler	74
3.9. İstatistiksel Analizler	75
<b>4. BULGULAR</b>	76
4.1. Sıçanların Vücut Kütlesi	76
4.2. EDL Kas Kütle/Sıçan Vücut Kütle Oranı Bulguları	78
4.3. Davranış Deneyleri ile İlgili Bulgular	79
4.3.1. Açık Alan Lokomotor Aktivite Deneyi	79
4.3.2. Morris Su Tankı (MST) Spasyal Hafıza Deneyleri	82
4.3.2.1. Dört Günlük Öğrenme Sürecinde Elde Edilen Bulgular	82
4.3.2.1.1. MST Deneyinde Ortalama Katedilen Mesafe	82
4.3.2.1.2. MST Deneyinde Ortalama Yükseltiyi Bulma Süreleri	86
4.3.2.1.3. MST Deneyinde Ortalama Yüzme Hızları	90

4.3.2.2. Spasyal Hafızanın (Hatırlamanın) Test Edildiği-Son Gün (5. Gün)	
Bulguları .....	94
4.3.2.2.1. MST Deneyinde (5. Gün) Yükseltinin Bulunduğu	
Kadranda Ortalama Geçirilen Süre.....	95
4.3.2.2.2. MST Deneyinde (5. Gün) Ortalama Katedilen Mesafe	97
4.3.2.2.3. MST Deneyinde (5. Gün) Ortalama Yüzme Hızları....	99
4.4. Sıcak Plaka (Hot Plate) Deneyi .....	100
4.5. EDL Kası Elektriksel ve Mekaniksel Aktivite Bulguları .....	101
4.5.1. EDL Kası Elektriksel Aktivite Bulguları (Elektromiyografi-EMG) .....	101
4.5.1.1. Bileşik Kas Aksiyon Potansiyeli (BKAP) Tepeden Tepeye Genlik	
(Peak to Peak Amplitude) .....	102
4.5.1.2. BKAP Genlik (Amplitude) .....	103
4.5.1.3. BKAP Tepe (Peak) Latansı.....	104
4.5.1.4. BKAP Toplam Süre (Duration).....	104
4.5.1.5. BKAP Depolarizasyon Süresi .....	105
4.5.1.6. BKAP %50 Repolarizasyon Süresi .....	106
4.5.1.7. BKAP Alan (Area) .....	107
4.5.2. EDL Kası Mekanik Aktivite Bulguları .....	108
4.5.2.1. EDL Kasını Optimum Boyuna Getiren Ön Gerimler.....	108
4.5.2.2. Kas Mekanik Aktivite Parametreleri .....	111
4.5.2.2.1. Tek Bir Uyarıya ( $T_w$ ) Yanıt Olarak Kaydedilen Sarsı	
Eğrisinin Kasılma Süresi (CT).....	113
4.5.2.2.2. Tek Bir Uyarıya Yanıt Olarak Kaydedilen Sarsı	
Eğrisinin Yarı Gevşeme Süresi (%50 RT) .....	113
4.5.2.2.3. Tek Bir Uyarıya Yanıt Olarak Kaydedilen Sarsı	
Eğrisinin Toplam Süresi (TCT) .....	114
4.5.2.2.4. Tek Bir Uyarıya Yanıt Olarak Kaydedilen Sarsı	
Eğrisinin Tepe Sarsı Kuvveti ( $P_{T_w}$ ).....	115
4.5.2.2.5. Maksimum Tetanik Kuvvet ( $P_o$ ).....	116
4.5.2.2.6. Tek ( $T_w$ ) ve Belirli Frekans Aralığında (10-150 Hz)	
Uyarılara Karşı Oluşan Maksimum Kasılma	
Kuvvetleri .....	117

4.5.2.2.7. $P_i/P_0$ Oranları ( $i=Tw, 10, 20, 40, 80, 100$ ve 150 Hz).....	120
4.5.2.2.8. Belirli Frekans Aralığında (10-150 Hz) Uyarılara Karşı Oluşan Maksimum Kasılma Genliğine Ulaşma Süreleri .....	122
4.6. Biyokimyasal Bulgular .....	125
4.6.1. Total Oksidan Kapasite (TOK) ve Total Antioksidan Kapasite (TAK) Bulguları .....	125
4.7. Işık Mikroskobu Bulguları.....	126
4.7.1. İmmünohistokimyasal İşaretleme İle AH Patolojisinin Doğrulanması ....	126
4.7.1.1. Sıçan Frontal Korteksinde ve EDL Kasında A $\beta$ Ekspresyonun Değerlendirilmesi.....	127
4.7.1.2. Sıçan Frontal Korteksinde ve EDL Kasında AChE Aktivitesinin Değerlendirilmesi.....	131
<b>5. TARTIŞMA</b> .....	135
<b>6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER</b> .....	150
<b>7. KAYNAKLAR</b> .....	152
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	171



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1.</b> Alzheimer hastalığıyla ilgili en önemli hipotezler (ChAT: Kolin Asetiltransferaz) .....	9
<b>Şekil 2.2.</b> Alzheimer hastalığında görülen amiloid beta peptidin oluşum mekanizması.....	11
<b>Şekil 2.3.</b> APP ve onun başlıca metabolik türevlerini gösteren diyagram .....	12
<b>Şekil 2.4.</b> Nöronal dejenerasyon sürecinde tau proteini düzenlenmesi .....	14
<b>Şekil 2.5.</b> Nörofibriler dejenerasyonun mekanizması .....	16
<b>Şekil 2.6.</b> A $\beta$ 42 varlığında gerçekleşen plak ve yumak oluşumuyla ilgili öne sürülen mekanizmanın şematik sunumu.....	19
<b>Şekil 2.7.</b> Asetilkolin metabolizması .....	21
<b>Şekil 2.8.</b> Alzheimer tedavisinde kullanılmak üzere ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onay alınan asetilkolin esteraz inhibitörlerinin biyokimyasal yapısı .....	24
<b>Şekil 2.9.</b> Huperzin A'nın elde edildiği <i>Huperzia serrata</i> bitkisi ve Huperzin A'nın biyokimyasal yapısı.....	26
<b>Şekil 2.10.</b> Tipik bir iskelet kas lifi yapısı .....	28
<b>Şekil 2.11.</b> İskelet kası-sinir kavşağı ve ilgili yapılar .....	32
<b>Şekil 2.12.</b> Kas hücrelerinde biriken ICM biyo-belirteci olarak A $\beta$ 1-40 spesifik antikoruyla immünboyama.....	36
<b>Şekil 2.13.</b> Östrojen eksikliği ve Alzheimer ilişkisiyle ilgili öne sürülen olaylar dizisi.....	41
<b>Şekil 2.14.</b> Sıcak Plaka (Hot plate) cihazı test düzeneği .....	44
<b>Şekil 3.1.</b> (a) 8 hafta ve (b) 10 hafta boyunca D-galaktoz enjeksiyonu yapılan sıçan frontal korteksinde immünohistokimyasal işaretleme ile elde edilen A $\beta$ peptitlerin ekspresyon düzeylerinin ışık mikroskopundaki görüntüleri.....	47

<b>Şekil 3.2.</b> (a) 8 hafta ve (b) 10 hafta boyunca D-galaktoz enjeksiyonu yapılan sıçan EDL kas dokusunda immünohistokimyasal işaretleme ile ışık mikroskopundaki görüntüleri .....	47
<b>Şekil 3.3.</b> Sıçanların overektomi görüntüleri.....	51
<b>Şekil 3.4.</b> Açık alan düzeneği .....	53
<b>Şekil 3.5.</b> Morris su tankının üstten ve yandan görünümü.....	53
<b>Şekil 3.6.</b> Morris su tankı deneyine ait sabit görsel ipuçları .....	54
<b>Şekil 3.7.</b> Uzak hafıza deneyinde 1. günde sıçanların suya atılış şeması.....	55
<b>Şekil 3.8.</b> Spasyal hafıza deneyi günlere göre uygulama şeması .....	56
<b>Şekil 3.9.</b> Morris su tankında platformu bulan bir sıçanın üstten görünümü.....	56
<b>Şekil 3.10.</b> Sıcak plaka (Hot plate) sistemi .....	57
<b>Şekil 3.11.</b> Isıtımlı operasyon masasına yatırılmış sıçanın üstten görünümü.....	58
<b>Şekil 3.12.</b> Sıçanların EDL kası diseksiyonu .....	59
<b>Şekil 3.13.</b> EMG kaydı için bipolar yüzeysel disk elektrotların yerleşimi .....	60
<b>Şekil 3.14.</b> Kas mekanik yanıtlarının kaydedilmesinde kullanılan izole organ banyosu sistemi.....	61
<b>Şekil 3.15.</b> Optimum boyu (L0) belirlenmiş sıçan EDL kası.....	63
<b>Şekil 3.16.</b> Maksimum kasılma kuvvetinin elde edilebileceği optimum kas boyuna (L0) getirebilmek için öngerim (yaklaşık 2-3 g) uygulanmış bir sıçan EDL kasından, tek bir uyarı uygulanması sonucu elde edilen izometrik sarsı eğrisi için örnek bir kayıt. ....	64
<b>Şekil 3.17.</b> Tek bir uyarıya yanıt olarak kaydedilmiş EDL kası eğrisinden ölçülen parametreler .....	65
<b>Şekil 3.18.</b> Sıçan EDL kasının (a) 10 Hz ve (b) 20 Hz frekanslı uyarılara karşı oluşturduğu sarsı eğrileri için örnek kayıtlar .....	67
<b>Şekil 3.19.</b> Sıçan EDL kasının (a) 40 Hz ve (b) 80 Hz frekanslı uyarılara karşı oluşturduğu sarsı eğrileri için örnek kayıtlar .....	68
<b>Şekil 3.20.</b> Sıçan EDL kasının (e) 100 Hz ve (f) 150 Hz frekanslı uyarılara karşı oluşturduğu sarsı eğrileri için örnek kayıtlar .....	69
<b>Şekil 3.21.</b> Doku fiksasyon işlemi için kullanılan perfüzyon sistemi .....	70

<b>Şekil 3.22.</b> Dokuların ışık mikroskobik incelemesinde kullanılan fiksasyon işlemi sırasında (perfüzyon fiksasyon yöntemi) solusyonların yaklaşık 1-1,5 m yükseklikten deney hayvanının dolaşımına verilmesi	71
<b>Şekil 3.23.</b> Doku fiksasyon işlemi için yapılan perfüzyon işlemi sonucu diseke edilen beyin dokusu. ....	72
<b>Şekil 4.1.</b> Sıçanların gruplara göre kütle oran (EDL kas kütlesi/vücut kütlesi) değerlerinin dağılımı.....	79
<b>Şekil 4.2.</b> Açık alan deneyinde sıçanların katettikleri ortalama mesafenin (ort±ss) gruplar arası karşılaştırılması .....	81
<b>Şekil 4.3.</b> Açık alan deneyinde sıçanların ortalama hızlarının (ort±ss) gruplar arası karşılaştırılması .....	81
<b>Şekil 4.4.</b> Açık alan deneyinde sıçanların katettikleri ortalama mesafenin (ort±ss) gruplar arası karşılaştırılması .....	82
<b>Şekil 4.5.</b> Güne göre platformu bulmak için sıçanların katettikleri mesafenin (ort±ss) gruplar arasında karşılaştırılması.....	84
<b>Şekil 4.6.</b> Morris su tankı (MST) spasyal hafıza deneyinde grupların platformu bulmak için günlere göre katettiği mesafenin (ort±ss) ve günler arasındaki değişimin karşılaştırması .....	86
<b>Şekil 4.7.</b> Güne göre yükseltiyi bulma sürelerinin (ort±ss) gruplar arası karşılaştırılması.....	88
<b>Şekil 4.8.</b> Grupların günlere göre yükseltiyi bulma sürelerinin ortalama değerlerinin ve günler arasındaki değişimin karşılaştırması.....	90
<b>Şekil 4.9.</b> Günlere göre yüzme hızlarının (ort±ss) gruplar arası karşılaştırılması .....	92
<b>Şekil 4.10.</b> Grupların günlere göre elde edilen ortalama yüzme hızı değerleri ve günler arasındaki değişimin karşılaştırması .....	94
<b>Şekil 4.11.</b> Beşinci günde KD1 (Güney-Batı) kadranda geçirilen sürenin (ort) gruplara göre dağılımı.....	97
<b>Şekil 4.12.</b> Morris su tankı (MST) deneyinin beşinci gününde katedilen mesafenin (ort±ss) gruplara göre dağılımı .....	98
<b>Şekil 4.13.</b> Morris su tankı (MST) deneyinin beşinci gününde yüzme hızlarının (ort±ss) gruplara göre dağılımı .....	99
<b>Şekil 4.14.</b> Ağrı eşiği süresinin (ort±ss) gruplara göre dağılımı .....	101

<b>Şekil 4.15.</b> Bileşik kas aksiyon potansiyeli (BKAP) tepeden tepeye genliğinin (ort±ss) gruplara göre dağılımı .....	103
<b>Şekil 4.16.</b> Bileşik kas aksiyon potansiyeli (BKAP) genliğinin (ort±ss) gruplara göre dağılımı.....	103
<b>Şekil 4.17.</b> Bileşik kas aksiyon potansiyeli (BKAP) tepe latansının (ort±ss) gruplara göre dağılımı.....	104
<b>Şekil 4.18.</b> Bileşik kas aksiyon potansiyeli (BKAP) toplam süresinin (ort±ss) gruplara göre dağılımı.....	105
<b>Şekil 4.19.</b> Bileşik kas aksiyon potansiyeli (BKAP) depolarizasyon süresinin (ort±ss) gruplara göre dağılımı.....	106
<b>Şekil 4.20.</b> Bileşik kas aksiyon potansiyeli (BKAP) %50 repolarizasyon süresinin (ort±ss) gruplara göre dağılımı.....	107
<b>Şekil 4.21.</b> Bileşik kas aksiyon potansiyeli (BKAP) alan değerlerinin (ort±ss) gruplara göre dağılımı.....	108
<b>Şekil 4.22.</b> Tek ( $T_w$ ) ve farklı frekanslı uyarı protokollerinde gruplara uygulanan ortalama ön gerim değerleri .....	111
<b>Şekil 4.23.</b> Tek kare puls ( $T_w$ ) uygulanan grupların kasılma süreleri (ort±ss) değerleri	113
<b>Şekil 4.24.</b> Tek kare puls ( $T_w$ ) uygulanan grupların yarı gevşeme süresi değerleri ..	114
<b>Şekil 4.25.</b> Tek kare puls ( $T_w$ ) uygulanan grupların toplam kasılma süresi değerleri	115
<b>Şekil 4.26.</b> Tek kare puls ( $T_w$ ) uygulanan grupların tepe sarsı kuvveti değerleri .....	116
<b>Şekil 4.27.</b> Frekansı 150 Hz olan uyarı protokolünün uygulandığı grupların tepe sarsı kuvveti değerleri .....	117
<b>Şekil 4.28.</b> Tek ( $T_w$ ) ve belirli frekans aralığındaki ( $T_w$ , 10-150 Hz) uyarılara karşı oluşan maksimum kasılma kuvvetleri.....	119
<b>Şekil. 4.29.</b> Maksimum kasılma genliğine ulaşma sürelerinin gruplara göre dağılımı.....	124
<b>Şekil 4.30.</b> İmmünohistokimyasal işaretleme ile sıçan frontal korteksinde A $\beta$ ekspresyonu.....	129
<b>Şekil 4.31.</b> İmmünohistokimyasal işaretleme ile sıçan EDL kasında A $\beta$ ekspresyonu	130
<b>Şekil 4.32.</b> İmmünohistokimyasal işaretleme ile sıçan frontal korteksinde AChE aktivitesi.....	133
<b>Şekil 4.33.</b> İmmünohistokimyasal işaretleme ile sıçan EDL kasında AChE aktivitesi	134

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1.</b> Alzheimer tedavisinde kullanılan ABD Gıda ve İlaç Komitesi (FDA) onaylı AChE inhibitörlerinin özellikleri, yararlı ve zararlı yönleri .....	25
<b>Çizelge 3.1.</b> Deney şeması.....	49
<b>Çizelge 4.1.</b> Sıçanların ilk kütle ve son kütle ölçüm değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması.....	77
<b>Çizelge 4.2.</b> Her bir grup için ilk vücut kütlesi ile son vücut kütlesi ölçüm değerlerinin karşılaştırılması	78
<b>Çizelge 4.3.</b> Açık alan deneyinde grupların katettikleri ortalama mesafe, hareket hızı ve merkezde katettikleri mesafe değerleri ve bu değerler için gruplar arası karşılaştırmalar .....	80
<b>Çizelge 4.4.</b> MST spasyal hafıza deneyinde sıçanların yükseltiyi bulmaları için katettikleri mesafenin (ort±ss) günlere göre gruplar arası değerleri.....	83
<b>Çizelge 4.5.</b> MST spasyal hafıza deneyinde platformu bulmak için grupların günlere göre ortalama katettikleri mesafe.....	85
<b>Çizelge 4.6.</b> MST spasyal hafıza deneyinde, her bir gün için ortalama yükseltiyi bulma sürelerinin gruplara göre değerleri.....	87
<b>Çizelge 4.7.</b> Grupların günlere göre ortalama yükseltiyi bulma süreleri (MST Spasyal Hafıza Deneyi).....	89
<b>Çizelge 4.8.</b> MST spasyal hafıza deneyinde ortalama yüzme hızlarının (ort±ss) günlere göre gruplar arası değerleri .....	91
<b>Çizelge 4.9.</b> Grupların günlere göre ortalama yüzme hızları (MST Spasyal Hafıza Deneyi).....	93
<b>Çizelge 4.10.</b> MST spasyal hafıza deneyinde grupların 5. günde KD1’de geçirdikleri sürenin yüzde olarak değerleri .....	95
<b>Çizelge 4.11.</b> MST spasyal hafıza deneyinde grupların 5. günde kadranlarda geçirdikleri sürelerin (ort±ss) gruplar arası karşılaştırılması.....	96

<b>Çizelge 4.12.</b> MST spasyal hafıza deneyinde grupların 5. günde katettikleri mesafenin (ort±ss) gruplar arası karşılaştırılmaları .....	98
<b>Çizelge 4.13.</b> Morris su tankı (MST) spasyal hafıza deneyinde grupların 5. günde yüzme hızlarının (ort±ss) gruplar arası karşılaştırılmaları.....	99
<b>Çizelge 4.14.</b> Sıcak plaka (Hot plate) deneyi ile elde edilen gruplara ait ağrı eşiği sürelerinin (ort±ss) değerleri.....	100
<b>Çizelge 4.15.</b> Gruplara göre bileşik kas aksiyon potansiyeli (BKAP) parametrelerine ait değerler .....	102
<b>Çizelge 4.16.</b> Kas mekanik aktivitesinde her bir uyarı protokolü için uygulanan ön gerim (g) değerlerinin (ort±ss) gruplar arası karşılaştırılması T <sub>w</sub> :Tek uyarı.....	109
<b>Çizelge 4.17.</b> Kas mekanik aktivitesinde her bir grup için uygulanan ön gerim (g) değerlerinin (ort±ss) uyarı protokolleri arası karşılaştırılması .....	110
<b>Çizelge 4.18.</b> Kas mekanik aktivite parametre değerleri.....	112
<b>Çizelge 4.19.</b> Kas mekanik aktivitesinde tek uyarı (TW) ve farklı frekanslarda uyanlar için elde edilen maksimum sarsı kuvvetleri (ort±ss). .....	118
<b>Çizelge 4.20.</b> Kas mekanik aktivite parametrelerinden hesaplanan P <sub>i</sub> /P <sub>0</sub> oranları (ort±ss). (i=Tw, 10, 20, 40, 80, 100 ve 150 Hz; PTw: Tek uyarı için oluşan maksimum kasılma kuvveti, P <sub>0</sub> : 150 Hz frekansındaki uyarıya karşı oluşan maksimum kasılma kuvveti .....	121
<b>Çizelge 4.21.</b> Her bir grup için farklı frekanslarda uyanlara yanıt olarak kaydedilen kas mekanik aktivite yanıtlarında maksimum sarsı kuvvetlerine ulaşma süreleri (ms) (ort±ss) .....	123
<b>Çizelge 4.22.</b> Grupların doku_TAK, serum_TAK, doku_TOK ve serum_TOK parametre değerleri .....	126
<b>Çizelge 4.23.</b> Beynin frontal korteksinde Aβ ekspresyon miktarının gruplar arası karşılaştırılması (ort±ss)	128
<b>Çizelge 4.24.</b> Beynin frontal korteksinde AChE aktivitesinin gruplar arası karşılaştırılması (ort±ss)	132

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>°A</b> .....	Angström
<b>ABTS</b> .....	2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)
<b>AChE</b> .....	Asetilkolin estera
<b>ACh</b> .....	Asetilkolin
<b>AGPC</b> .....	Asit Guanidinyum-Fenol Kloroform
<b>AH</b> .....	Alzheimer Hastalığı
<b>APOE</b> .....	Apolipoprotein E
<b>ApoEε4</b> .....	Apolipoprotein E epsilon 4 alleli
<b>APP</b> .....	Amiloid Beta Prekürsör Protein
<b>Aβ</b> .....	Amiloid Beta
<b>AP</b> .....	Aksiyon Potansiyeli
<b>BACE</b> .....	Beta Sekretaz
<b>BKAP</b> .....	Bileşik Kas Aksiyon Potansiyeli
<b>BSA</b> .....	Bovin Serum Albumin
<b>BuChE</b> .....	Butirilkolin estera
<b>°C</b> .....	Santigrat derece
<b>Ca<sup>+2</sup></b> .....	Kalsiyum
<b>CaMKII</b> .....	Kalmodulin-bağımlı protein kinaz II
<b>ChAT</b> .....	Kolin asetil transferaz
<b>CK</b> .....	Kreatin Kinaz
<b>Cl<sup>-</sup></b> .....	Klor
<b>cm</b> .....	Santimetre
<b>cm<sup>2</sup></b> .....	Santimetre Kare
<b>CoA</b> .....	Koenzim A
<b>CPK</b> .....	Kreatin Fosfokinaz
<b>Cs</b> .....	Sezyum
<b>CSA</b> .....	Kas Kesit Alanı

<b>CT</b> .....	Kasılma Süresi
<b>D</b> .....	D-galaktoz
<b>DAB</b> .....	Diaminobenzidin
<b>DEPC-H<sub>2</sub>O</b> .....	Dietilpirokarbonatlı su
<b>DNA</b> .....	Deoksiribonükleik Asit
<b>EAS</b> .....	Elektriksel Alan Stimulasyonu
<b>EDL</b> .....	Ekstensör Dijitorum Longus Kası
<b>EHP</b> .....	Ekstensor Hallusis Proprius
<b>EMG</b> .....	Elektromiyografi
<b>ER</b> .....	Endoplazmik Retikulum
<b>FSH</b> .....	Folikül Stimüle Edici Hormon
<b>FDA</b> .....	Gıda ve İlaç Komitesi
<b>g</b> .....	Gram
<b>G1</b> .....	Asetilkolin esteraz'ın monomerik formu
<b>G4</b> .....	Asetilkolin esteraz'ın tetramerik formu
<b>GRH</b> .....	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
<b>GSCN</b> .....	Guanidinyum Tiyosiyonat
<b>H</b> .....	Huperzin-A grubu
<b>HCL</b> .....	Hidroklorik Asit
<b>HDD</b> .....	Hayvan Davranış Deneyi
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> .....	Hidrojen Peroksit
<b>Hup A</b> .....	Huperzin A
<b>Hz</b> .....	Hertz
<b>ICM</b> .....	İnklüzyon Cisimcikli Miyozit
<b>İle</b> .....	İzolösin
<b>i.p</b> .....	İntraperitoneal
<b>K</b> .....	Kontrol grubu
<b>K<sup>+</sup></b> .....	Potasyum
<b>kg</b> .....	Kilogram
<b>KPI</b> .....	Serin proteaz inhibitör domaini
<b>LDH</b> .....	Laktik Dehidrojenaz
<b>LH</b> .....	Lüteinleştirici Hormon



<b>Li<sup>+</sup></b> .....	Lityum
<b>L0</b> .....	Optimum Kas Boyu
<b>LTP</b> .....	Uzun süreli potansiyel
<b>M</b> .....	Molar
<b>MAP</b> .....	Mikrotübül assosiye protein
<b>mg</b> .....	Miligram
<b>miRNA</b> .....	Mikro RNA
<b>ml</b> .....	Mililitre
<b>mm</b> .....	Milimetre
<b>mM</b> .....	Milimolar
<b>miRNA</b> .....	Mikro RNA
<b>mRNA</b> .....	Mesajcı RNA
<b>MST</b> .....	Morris Su Tankı
<b>Na<sup>+</sup></b> .....	Sodyum
<b>NFY</b> .....	Nörofibriler yumak
<b>ng</b> .....	Nanogram
<b>nm</b> .....	Nanometre
<b>O</b> .....	Overektomi grubu
<b>OsO<sub>4</sub></b> .....	Osmium Tetraoksit
<b>Ort</b> .....	Ortalama
<b>PBS</b> .....	Fosfat Buffer Salin
<b>PKA</b> .....	Protein kinaz A
<b>PP-2A...</b> .....	Protein fosfataz 2A
<b>P<sub>0</sub></b> .....	Maksimum Kasılma Kuvveti
<b>PSEN1</b> .....	Presenilin-1
<b>PSEN2</b> .....	Presenilin-2
<b>RNA</b> .....	Ribonükleik Asit
<b>ROS</b> .....	Reaktif Oksijen Türevi
<b>rpm</b> .....	Dakikadaki Devir Sayısı
<b>RT</b> .....	Gevşeme Süresi
<b>RT-PCR</b> .....	Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu

<b>SH</b> .....	Sham grubu
<b>s</b> .....	Saniye
<b>SS</b> .....	Standart Sapma
<b>TAK</b> .....	Total Antioksidan Kapasite
<b>TA</b> .....	Tibialis Anterior
<b>TOK</b> .....	Total Oksidan Kapasite
<b>TCT</b> .....	Toplam Sarsı Süresi
<b>Tw</b> .....	Tepe Sarsı Kuvveti
<b>µg</b> .....	Mikrogram
<b>µl</b> .....	Mikrolitre
<b>µm</b> .....	Mikrometre
<b>Val</b> .....	Valin
<b>%</b> .....	Yüzde
<b>α</b> .....	Alfa
<b>β</b> .....	Beta
<b>γ</b> .....	Gama
<b>ε</b> .....	Epsilon

## ÖZET

### Alzheimer Hastalarının Beyin ve İskelet Kas Hücrelerinde Amiloid-Beta Toksikitesi Üzerine Huperzin-A'nın Etkileri

Alzheimer hastalığı (AH), kolinerjik nöronların kaybı, serebrovasküler inflamasyon ve serebral kan damarlarında ve beyin parankimasında amiloid plakların (A $\beta$ ) birikimi ile karakterize, kronik nörodejeneratif bir hastalıktır. AH'da diğer A $\beta$  ile ilişkili kas hastalıklarında saptanan bazı motor fonksiyon bozuklukları görülür. Bu araştırmada, AH'nın ilerleyen sürecinde A $\beta$  plaklarının kas dokusunda aşırı birikmesi sonucu gelişebilen ve AH patofizyolojisine çok benzerlik gösteren inklüzyon cisimcikli miyozitin (ICM), çalışmada kullanılan deneysel AH modelinde gelişip gelişmediğinin, kullanılan modelin kognitif fonksiyonlara etkisinin ve Huperzin-A'nın (Hup-A) A $\beta$  kaynaklı olası doku hasarları üzerindeki terapötik yararının araştırılması planlanmıştır.

Çalışmaya, 68 adet 13 haftalık dişi Sprague–Dawley sıçan alındı. Alzheimer modeli oluşturmak ve Hup-A uygulaması yapmak üzere sıçanlar kontrol ve 4 deney grubu olarak rastgele 5 gruba ayrıldı. Deneysel AH modeli oluşturmak için overektominin ardından 10 hafta, her gün 100 mg/kg dozda D-galaktoz (i.p.) uygulaması yapıldı. AH'da nörodejeneratif patolojinin etkilerini değerlendirmek üzere davranış testleri uygulandı. Sonrasında, sıçanların beyin ve kas dokuları biyopotansiyel ile biyomekanik kayıtlar, histolojik ve biyokimyasal analizler yapılmak üzere kullanıldı.

Alzheimer modelinin patolojik bulguları immünohistokimyasal analizler ile gösterilerek, davranış testleri ile desteklendi. AH'nın ilerleme sürecinde oluşum gösterebilen ve AH patolojisiyle paralellik gösteren ICM patolojisi biyopotansiyel, biyomekanik, histolojik parametrelere bakılarak değerlendirildi. Ekstensor dijitorum longus (EDL) kasından kaydedilen elektromiyografi (EMG) verilerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı. EDL kasına tek ve farklı frekanslarda (10, 20, 40, 80, 100 ve 150 Hz) uyarılar verilerek elde edilen sarsı eğrilerine ait parametrelerde kontrole göre deney gruplarında anlamlı azalma olduğu saptandı. Ancak kas dokusunun histolojik incelemesinde ICM patolojisi bulguları gözlenmedi. EDL kas gücündeki azalmanın overektomi kaynaklı olduğu düşünüldü. Çalışma sonucunda Hup-A'nın AH patolojisi üzerinde iyileştirici etkisi olduğu belirlendi.

ICM patolojisinin oluşumu için daha ağırlaştırılmış AH modelinin geliştirilmesi gerektiği ve bu amaçla D-galaktoz uygulaması bitiminden sonra sıçanların kendi halinde yaşlanmaya bırakılması ya da D-galaktoz uygulama süresi ve/veya doz miktarının arttırılması gerektiği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Alzheimer Hastalığı, Beyin, Ekstensor Dijitorum Longus Kası, Kasılabilirlik, Huperzin-A

## ABSTRACT

### Effects of Huperzin-A on the Cytotoxic Effects of Amyloid Beta in the Brain and Skeletal Muscle Cells of a Rat Model for Alzheimer's Disease

Alzheimer's disease (AD) is a chronic neurodegenerative disease which is characterized by the neuronal loss, cerebrovascular inflammation and the accumulation of amyloid plaques (A $\beta$ ) on the cerebral blood vessels and the brain parenchyma. Also, certain motor dysfunction in the AD is seen as like muscle diseases associated with the accumulation of A $\beta$ . In this study, it's planned to research whether inclusion-body myositis (IBM) which is very similar to AD patofizyoloji and can develop on the muscle tissue of A $\beta$  plaques in the advanced process of AD occur in the experimental AD model used in the study or not. It is also aimed to find out the effect of the model on cognitive functions and the therapeutics benefits of Huperzine-A (Hup-A) on tissue damage as a result of A $\beta$ .

Sixty-eight healthy female Sprague-Dawley rats (200–250 g) were included in this study. Rats were randomly divided into five groups for create a model of Alzheimer's and to perform application Hup-A. Ovariectomy following the D-galactose injection during 10 weeks, every day to 100 mg / kg were performed in rats to create an animal model of Alzheimer's. The behavioral tests were done on the rats to assess the effects of neurodegenerative pathology in AD. Then, the brain and muscle tissues were dissected for biomechanics and biopotential records, histological and biochemical analyzes.

The results of behavioral tests and immünohistochemical analysis showed that the Alzheimer's model was successful. Data of IBM which may occur in the progression of AD and show parallels with AD pathology were evaluated based on biopotentials, biomechanical, histological and biochemical parameters.

No statistically significant differences were observed in electromyography (EMG) activity of extensor digitorum longus (EDL). In biomechanical analysis of data, statistical significance was found between the groups. Measured parameter is occurred significant reduction between groups that biomechanical value is acquired by giving stimulation at different frequencies on EDL muscle (10, 20, 40, 80, 100 and 150 Hz), was seen Alzheimer's disease pathology-induced in some frequency protocols whereas ovariectomy-induced in the other frequency protocols. However, histological examination of muscle pathology was not observed findings of IBM pathology. It was considered that the decrease in the EDL muscle force was related by ovariectomy. As a result of study, the healing effect of Hup-A was determined on the Alzheimer's pathology.

In conclusion, the formation of IBM pathology needs to be improved AD model that is further aggravated. For this purpose, after the last injection of D-galactose, rats should be allowed to form their own aging or the execution time or the dose of D-galactose should be increased.

**Keywords:** Alzheimer's Disease, Brain, Extensor Digitorum Longus Muscle, Contractility, Huperzin-A

# 1. GİRİŞ

Alzheimer hastalığı (AH), yaşa bağılı olarak bilişsel fonksiyonlarda ilerleyici bozulma, günlük yaşamın temel aktivitelerini gerçekleştirilmede azalan yeterlilik ve kişilik özelliklerinde dalgalanmalar ile seyreden geri dönüşsüz nörolojik bir hastalıktır (1). İlk olarak 1907 yılında Alman Hekim Alois Alzheimer tarafından klinik ve nöropatolojik özellikleri ile tanımlanmıştır (2). En sık demans nedeni olup bütün demansların %50-80'ini oluşturur. Günümüzde yaşam süresinin uzaması, gittikçe artan sayıda bireyin başta AH olmak üzere pek çok nörodejeneratif hastalıklara yakalanmasına neden olmaktadır. Bugün tüm dünyada 24,3 milyon Alzheimer hastası belirlenmiştir ve her yıl tüm dünyada yaşlı nüfusun artmasına bağılı olarak 4,6 milyon yeni AH olgusu geliştiği tahmin edilmektedir (3).

AH'na bağılı kognitif bozuklukların yanısıra, olası periferdeki patolojik tutulumların da yaşam kalitesini düşürdüğü ve mortaliteye zemin hazırlamakta olduğu düşünülmektedir.

AH ve ilgili nöro-dejeneratif rahatsızlıkların patogenezi altında yatan mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

AH ve diğer nörodejeneratif hastalıklar için birincil risk faktörü olan mitokondriyal fonksiyonun yaşla birlikte azaldığını gösteren önemli kanıtlar bulunmaktadır (4). Yapılan çalışmalar, mitokondriyal disfonksiyonun hücre dışı amiloid birikmesinden önce oluştuğunu göstermektedir (5).

AH'nın fizyopatolojisi karmaşık süreçleri içerir. AH'nın patolojisini, beynin belirli bölgelerinde fazla miktarda oluşan senil amiloid plaklar, nörofibriler yumak yapısı, belirgin düzeyde sinaps ve kolinerjik kayıplar ile nöron atrofisi oluşturur (6). Alzheimer hastalarının özellikle hipokampuslarında %45-55 oranında sinaptik kayıp olduğu bilinmektedir (7). AH'nın ilerlemesi ile sinaptik fonksiyon kayıpları arasındaki korelasyona bağılı olarak, protein modifikasyonları, değişen nöronal aktivite ve sinaptik yoğunlukta azalma çok iyi anlaşılmalı olmakla birlikte, bütün bunların altında yatan mekanizmalar hala belirsizliğini korumaktadır.

Alzheimer hastalarında en belirgin nöropatolojik değişiklik, özellikle hipokampus ve kortekste senil amiloid plakların yoğunlaşmasıdır. Amiloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) peptid ( $\beta$ AP), senil plakların major komponentidir ve nöronlar, astrositler, glial hücreler ve beyin endotelyumu üzerinde çok sayıda toksik etkisi vardır (6).  $A\beta$  peptidi daha büyük bir transmembran protein olan amiloid prekürsör protein (APP)'den proteolitik yolla oluşur (1, 8). Bu proteolitik süreç sonucunda oluşan özellikle  $A\beta_{40-42}$  formu nörotoksik etkiye sahiptir. Alzheimer hastalarının beyin dokularında ve serebral damarlarında  $A\beta$ , plaklar halinde birikerek nörovasküler fonksiyonların bozulmasına ve kronik nörodejenerasyona yol açar. Aynı zamanda oksidatif stres, apoptozis ve kalsiyum dengesinin bozulması gibi yolaklarla ve nöron membranlarındaki iyon kanallarının yapısını bozarak uzun süreli elektriksel aktivitenin bozulmasını tetikleme ve bu yolla nöronal fonksiyon kaybı ve nihayetinde nöron ölümüne yol açabilir (9-11). Oluşum mekanizmaları arasında bu yollardan herhangi biri ya da birilerinin bulunduğu AH, demansın en sık görülen sebebidir.  $A\beta$  peptidi, AH'nın beyinlerinde olduğu gibi deri ve kas da dahil olmak üzere diğer periferik dokularda da uzun, çözölemeyen fibriller oluşturarak birikir.  $A\beta$ 'nin AH'nın beyinlerinde bulunduğu bilinen formunun ( $A\beta_{42}$ ), hastaların iskelet kaslarında da önemli ölçüde artmış olduğu bildirilmiştir (12).  $\beta$ -amiloid, hem beyinde ve hem de periferde olmak üzere her yerde bulunan bir peptid olup, hücre kan (eritrositler, lenfositler gibi), fibroblastlar ve kasları da içeren çeşitli dokularda toksik etkileri gösterilmiştir (12). Yapılan çalışmalar, AH'na bağlı kas bozukluklarının, hem iskelet ve hem de kalp-miyositlerini etkileyebildiğini göstermiştir (13, 14).

AH'nda günlük yaşamın temel aktivitelerini gerçekleştirmede gözlenen yetersizlikte önemli bir katkının da, azalan bilişsel fonksiyonların yanında kas fonksiyonunun kaybı olduğu düşünölmektedir. Son zamanlarda kas bozukluklarının AH'nın içsel bir yönü olabileceği kabul edilmiştir. Beyin manyetik rezonans görüntöleme (MR) ve dual enerji X-ışını absorpsiyometri (DEXA) kullanılarak vücut kitlesinin saptanması konusunda yapılan çalışmalar, yağsız kas kütlesi kaybının Alzheimer hastalarında hızlandığı ve bunun hipokampal atrofi ve bilişsel yetersizlikle ilişkili olduğu gösterilmiştir (15).

Kurbağa iskelet kas liflerinin dinlenme membran potansiyeli üzerine  $\beta$ AP'in etkisini ve mekanizmalarını araştırmak için geleneksel elektrofizyolojik teknikleri

kullanarak yapılan bir çalışmada,  $\beta$ AP'in iskelet kası plazma zarlarında belirgin bir depolarizasyona yol açarak, iskelet kas liflerinin dinlenme membran potansiyelini bozduğu ve bunun hem  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz inhibisyonuna ve hem de  $\beta$ AP-porlarının oluşumuna bağlı olduğu gösterilmiştir.  $\beta$ AP-porlarının oluşumu zar geçirgenliğinin artmasına neden olmaktadır.  $\beta$ AP'in neden olduğu iskelet kası plazma zarlarının depolarizasyonunun, iskelet kaslarının fonksiyonunu önemli ölçüde bozabileceği ve böylece Alzheimer ve  $\beta$ AP birikimiyle ilişkili diğer bozukluklarda gözlenen motor fonksiyon bozukluğuna önemli ölçüde katkıda bulunabileceği bildirilmiştir (16).

Genetik yapısı değiştirilmiş (transgenik) alzheimer farelerinde yapılan bir diğer çalışmada, diyafram kas liflerinde elektriksel aktivitenin bozulduğu ve gözlenen motor bozuklukların, AH'larının günlük yaşamlarında meydana gelen aktivite azalmalarında önemli bir anahtar rol oynayabileceği ve kas patofizyolojisinin dikkate alınmasının AH'de yaşam kalitesini geliştirebileceği bildirilmiştir (12).

Yapılan literatür taramalarında AH'na bağlı olarak iskelet kas lifleri membranlarında elektriksel mekanizmanın bozulduğu konusunda çok sayıda çalışmalar bulunmasına karşın, AH'nın iskelet kasının mekanik aktivitesi (kasılabilirliği) üzerine etkilerini inceleyen çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle bu çalışmanın amacı, AH'nın iskelet kasının kasılabilirliği üzerine etkilerini incelemek ve elde edilecek sonuçlarla, önemli ölçüde, AH'nda iskelet kası fonksiyon bozukluğu ve motor rahatsızlıkların mekanizmaları konusundaki mevcut bilgileri genişletmektir.

Günümüzde Alzheimer tedavisi, hastalığı ortadan kaldırmaktan ziyade semptomlarını iyileştirmek ya da ilerlemesini durdurmak odaklıdır. Bu amaçla, Alzheimer sürecinde kolinerjik kayıpların en başında gelen beyindeki asetilkolin (ACh) düzeylerindeki azalmanın önüne geçilmesi amacıyla çok çeşitli asetilkolin esteraz inhibitörleri (AChE) geliştirilmiş ve ilaç olarak kullanım onayı alınmıştır (17). Bu ilaçların hepsi de farklı farmakolojik özelliklerinin yanı sıra, etkinlik dereceleri ve yan etkilerinin bulunması sebebiyle kullanım sınırlaması içermektedir. Bu nedenle yetersiz kalmakta olan konvansiyonel tedavi yaklaşımlarına bir yenisini ekleyebilmek ve deneysel AH modelinde doğal bir asetilkolin esteraz inhibitörü olan ve özel bir bitkiden elde edilen Huperzin A (HupA)'nın hem beyinde ve hem de periferde etkinliğinin değerlendirilmesi, bu çalışmanın bir diğer amacıdır. Hup A'nın kan-beyin bariyerini geçme kapasitesi, penetrasyonu ve yarılanma süresi gibi özellikleri bakımından diğer

kullanımdaki ilaçlara oranla belirli avantajlara sahip bir moleköl olduğu bildirilmiştir (17, 18).



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Alzheimer Hastalığı Tarihçesi

1901'de Alman nörolog ve patolog olan Alois Alzheimer senil plaklar ve nörofibriler yumaklarla birlikte progresif kognitif yıkımı ve davranış değişikliği olan 51 yaşındaki bir kadın hastayı rapor etmiştir (2). Bu ilk bulgunun yayınlanmasından sonra ise hastalığa "Alzheimer" adını klinik şefi Dr. Emil Kraepelin vermiştir. Alzheimer'ın bu ilk olgusunda hastanın kocası ile ilgili aşırı kıskançlık hezeyanları bulunmaktaydı (19). Daha sonra bellek başta olmak üzere yüksek beyin fonksiyonlarında bozukluk saptanmıştı. Hastalık belirlendikten 5 yıl sonra hastanın ölmesiyle birlikte yapılan otopsisinde nöritik plaklar, nörofibriler yumaklar ve serebral kortekste belirgin yaygın atrofi ve hücre kaybı gözlenmiştir (20). 1960'lara kadar çok nadir bir hastalık olduğu ve sadece presenil yaş grubunda görüldüğü düşünülmüştür.

### 2.2. Alzheimer Hastalığı Epidemiyoloji ve Etiyolojisi

Genel olarak AH prevalansı 65 yaş üstü kişilerde % 3-5 iken 85 yaş üstü kişilerde %50'dir (21). Dünya genelinde hali hazırda 24 milyon kadar yüksek bir oranda demans hastası olduğu bilinmekte ve bu oranın 2050 yılına kadar 4 kat artacağı öngörülmektedir (3, 22). 2008 yılında gerçekleştirilen Türkiye Alzheimer Hastalığı Prevalansı Çalışması'nda 70 yaş üzerindeki kişiler arasında AH prevalansının %11 olduğu saptanmıştır. Bu prevalans değerine göre Türkiye'de 250-300 bin Alzheimer hastası olduğu varsayılmaktadır (23).

AH'nın etiyolojisi kesin olarak bilinmemektedir. Epidemiyolojik çalışmalar AH'nın tek bir faktöre bağlı olmadığına işaret etmektedir. Hastalığın etiyolojisinde genetik ve çevresel faktörler etkili olmaktadır. AH'nda genetik faktörler büyük oranda hastalığın gelişimi için çevresel faktörlere bir yatkınlık zemini yaratacak şekilde birer risk faktörü niteliğindedirler. Monozigotik ve dizigotik ikizlerde yapılan çalışmalara göre, ikizlerden birinde AH belirtileri görüldüğünde, diğer ikizde hastalığın görülme

olasılığı dizigotik ikizlerde daha düşüktür. İkizlerle ilgili yapılan çalışmaların ortak olarak ulaştığı sonuç, AH'nda hem çevresel hem de genetik faktörlerin rol oynadığıyla ilgilidir. AH ile ilişkili olduğu belirlenen çok sayıda genetik risk faktörü olmasına karşılık, Alzheimer vakalarının sadece çok az bir kısmında spesifik gen mutasyonları tanımlanabilmiştir (24).

Alzheimer olgularının çoğu sporadiktir. Bununla birlikte, tüm Alzheimer olgularının %1'inden azı otozomal dominant kalıtım özelliği taşır. 21 numaralı kromozomda bulunan amiloid prekürsör protein (APP) geni, 14 numaralı kromozomda bulunan presenilin-1 (PSEN1) geni, 1 numaralı kromozomda bulunan presenilin-2 (PSEN2) geni ve 19 numaralı kromozomda bulunan apolipoprotein E (APOE) geni ailesel Alzheimer'da otozomal geçişten sorumlu olduğu belirlenen genlerdir (25). Bu genlerin kodladığı proteinler normal işlevleri çok iyi bilinmeyen, nöronal plastisitede rol oynadıkları yönünde varsayımlar ileri sürülen transmembran proteinlerdir (26). Bu dört lokus (APP, PSEN1, PSEN2, APOE) AH'nın toplam genetik etiolojisinin yarısını oluşturur ve geri kalan %50 için henüz bulunmayan genler ve otozomal dominant olmayan geçiş biçimleri ileri sürülmektedir.

Söz konusu genlerdeki mutasyonların hepsi APP'den metabolize edilen A $\beta$  proteininin atılamayarak amiloid plaklar içinde biriken daha uzun şeklinin (A $\beta$ 42) üretiminin artışına yol açar. Erken başlangıçlı AH'nda belirlenen ilk mutasyon APP geninde belirlenmiştir (27). Bu mutasyon, APP geninin 17. eksonunda A $\beta$  peptidinin kodlandığı bölgede meydana gelen Valin $\rightarrow$ İzolösin değişimini (Val717Ile) içermektedir. Bu mutasyon sonucunda A $\beta$  peptidinde meydana gelen değişimin Alzheimer patolojisine yol açtığı gösterilmiştir. A $\beta$  öncü proteininin ilerleme sürecini etkileyerek Alzheimer patolojisinde rol oynayan 26 farklı APP gen mutasyonu daha belirlenmiş durumdadır (28).

Erken başlangıçlı ailesel AH'ndan 14. kromozom üzerindeki PSEN1 ve 1. kromozom üzerindeki PSEN2 genlerinin sorumlu olduğu gösterilmiştir. PSEN1'deki mutasyonlar ailesel AH'nın en sık sebebidir (29). PSEN1 ve PSEN2 genlerinde 160'dan fazla mutasyon tanımlanmıştır. Erken başlangıçlı Alzheimer bulunan 34 ailede yapılan çalışmada, %56 oranında PSEN1 mutasyonu, %15 oranında APP mutasyonu olduğu bulunmuştur (30). Diğer bazı çalışmalarda %18-56 oranında PSEN1 geninde mutasyonlar olduğu belirlenmiştir (31, 32). Presenilinler APP'nin  $\gamma$ -sekretaz ile

bölünmesinden sorumlu atipik aspartil proteaz komplekslerinin merkezi bileşenleridir. Presenilin mutasyonları, amiloid  $\beta$ 42/amiloid  $\beta$ 40 oranını artırır. Bu değişim muhtemelen fonksiyondaki değişim neticesiyle oluşmaktadır (33). PSEN1 mutasyonlarının prelinik evresinde amiloid  $\beta$ 42 depozisyonu erken bir bulgudur (34, 35). Transgenik hayvan modellerinde yapılan çalışmalar,  $\gamma$ -sekretaz aktivitesinde azalmanın, A $\beta$  depozitleri olmaksızın tau hiperfosforilasyonuna yol açıyor olabileceğini düşündürmüştür (36). Buna göre, ailesel Alzheimer olgularında yapılan araştırmalar, amiloid kaskadı hipotezinin temelini oluşturmakta, amiloid  $\beta$ 42'deki artışın tüm Alzheimer olgularından sorumlu olduğunu, nörofibriler yumak oluşumu, nöron dejenerasyonu ve demansın amiloid  $\beta$ 42 oluşumuna bağlı ve onu takip ederek oluştuğunu düşündürmektedir.

Son genetik çalışmalar Alzheimer nöropatogenezinde, özellikle de geç başlangıçlı AH'nda APOE'nin önemli rol oynadığını ortaya koymuştur (37). 19. kromozom üzerindeki APOE'nin kalıtımının geç başlangıçlı Alzheimer ile birlikte olduğu ve ApoE $\epsilon$ 4'ü pozitif hastaların negatiflere oranla artmış amiloid depolanmalarına maruz kaldığı gösterilmiştir (38). Apolipoprotein E epsilon 4 alleli ApoE $\epsilon$ 4 moleküllerinin nöronal membran içine uygulandıkları zaman, hipokampal nöronlardaki potasyum kanallarının aktivitesini hızla baskıladığı, patch clamp ile gösterilmiş olup (39); bu sonuç ApoE $\epsilon$ 4'ün AH ile kesinlikle ilişkili olduğunu kanıtlar niteliktedir. Böylece, nöronlarda ApoE $\epsilon$ 4'ün aşırı üretimi, normal potasyum kanallarının aktivitesini baskılayabilir ve böylece AH'nın patogeneziyle ilişkili nöronal hasarlardan sorumlu olabilir.

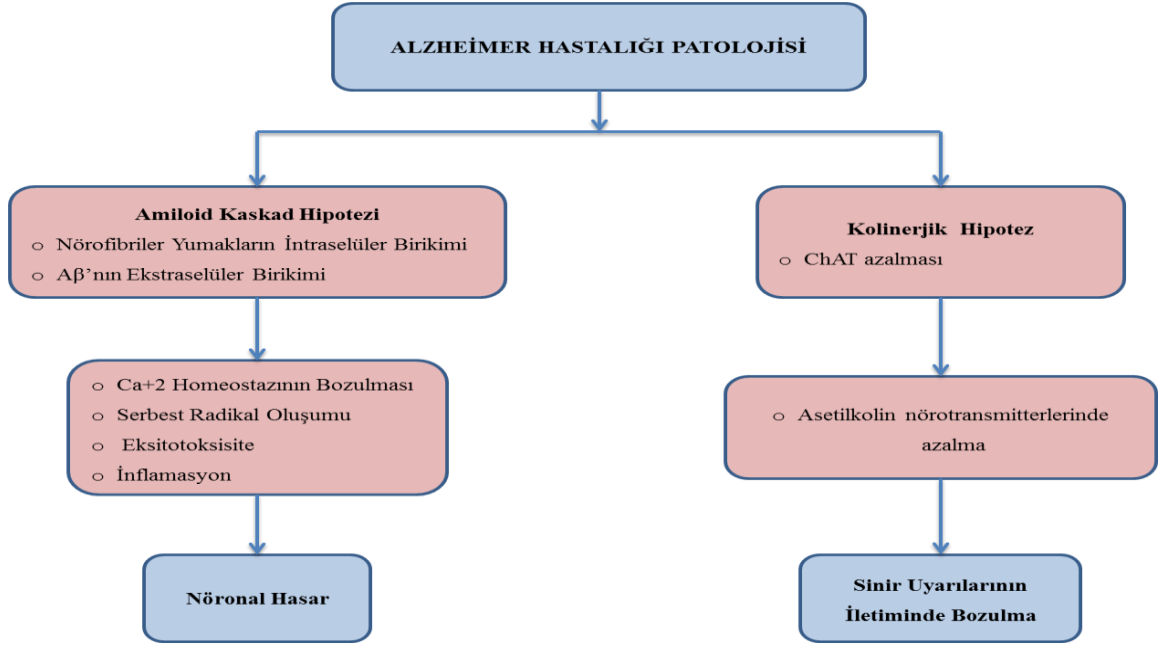
AH'nda rol oynayan çevresel risk faktörleri arasında en güçlü kanıtlar ilerlemiş yaş için mevcuttur. Hastalığın görülme sıklığı 60 yaşından önce nadirken, 85 yaş ve üzerindeki yaşlarda yaklaşık %50'ye yükselir. AH riski her 5 yılda bir 65 yaşından önce 5 kat, 75 yaşından önce 3 kat ve 85 yaşından önce 1,5 kat artar (21). Kadınlarda hastalığın erkeklerden daha fazla olduğu bilinmektedir. AH geliştirme oranı erkeklerden %10 fazla bulunmuştur (40). Cinsiyetler arasında 80 yaş ve altı grupta küçük ama anlamlı bir fark varken, 85 yaş ve üstü grupta kadınlarda AH insidansı belirgin yüksek bulunmuştur (41). AH insidansı düşük eğitim seviyesi olanlarda daha yüksek eğitim seviyesinde olanlardan 1,5 kat fazla bulunmuştur (42).

Ayrıca, yaşlılık, uzun süreli alkol kullanımı (43), posterior kortikal atrofi (44), kanda yüksek homosistein düzeyi (45), hipertansiyon ve inflamasyon (46), Down sendromu (47, 48, 49), östrojen eksikliği ve menapoz (50, 51, 52), diyabet (53), serumda pestisit düzeyinin yükselmesi (54), arteroskleroz, felç, geçici iskemik ataklar, kalp hastalığı, hiperlipidemi, metabolik sendrom, obezite ve diyabet (55), gibi çok sayıda minör risk faktörü de genetik etkenlerle birlikte hem vasküler demans ve hem de AH'na yakalanma oranına katkıda bulunmaktadır.

### **2.3. Alzheimer Hastalığı Patolojisi**

AH, bilişsel işlevlerde bozulma, günlük yaşam aktivitelerinde azalma ve davranışsal ve psikolojik bozukluklarla sonuçlanan ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır (1). Yaşlılıkla birlikte ortaya çıkan bir hastalık olmakla birlikte, AH'nın patogenezi anormal beyin süreçlerinin bir sonucu olarak gelişir. AH'nın histopatolojisini, beynin belirli bölgelerinde fazla miktarda oluşan senil amiloid plaklar, nörofibriler yumak yapısı ile belirgin düzeyde sinaps ve nöron kaybı (atrofi) oluşturur.

AH ile ilgili olarak amiloid kaskad hipotezi ve kolinerjik hipotez olmak üzere 2 önemli hipotez bulunmaktadır (56) (Şekil 2.1). Amiloid kaskad hipotezine göre, Alzheimer patogenezi ekstraselüler olarak A $\beta$  peptidinin ve intraselüler olarak nörofibriler yumak yapısının aşırı birikmesiyle başlar. Bu birikim, nöronlarda Ca<sup>+2</sup> homeostazının bozulması, eksitotoksisite, serbest radikal üretimi ve inflamasyon gibi çok sayıda nörotoksik yolağı harekete geçirir. Kolinerjik hipoteze göre, kolin asetil transferazın (ChAT) kaybı sonucunda bir nörotransmitter olan asetilkolinin azalmasıyla bilişsel ve hafıza ile ilgili fonksiyonlarda bozulma ortaya çıkar (57).



Şekil 2.1. Alzheimer hastalığıyla ilgili en önemli hipotezler (ChAT: Kolin Asetiltransferaz) (56).

### 2.3.1. Amiloid Beta Prekürsör Proteini ve Amiloid Beta Peptidi

AH'nda görülen en belirgin nöropatolojik değişiklik, özellikle hipokampus ve kortekste senil amiloid plakların yoğunlaşmasıdır. Alzheimer hastalarının beyin dokusunda ve serebral damarlarında A $\beta$ 'nin birikmesi, nörovasküler fonksiyonların bozulmasına ve kronik nörodejenerasyona yol açar.

A $\beta$  peptid, senil plakların major komponentidir ve nöronlar, astrositler, glial hücreler ve beyin endotelyumu üzerinde çok sayıda toksik etkisi vardır (6). A $\beta$  peptidi, 40-42 aminoasitten oluşan bir proteindir ve daha büyük bir transmembran protein olan, 21. kromozomda kodlanan amiloid prekürsör protein (APP)'den proteolitik yolla oluşur. Yani, A $\beta$ , APP'nin metabolizma ürünlerindedir. APP, nöron hücrelerinin normal biyolojik fonksiyonları üzerindeki rolü ile ilgili yapılan çalışmalar, APP'nin nöron gelişimi ve nöronal aktivitenin düzenlenmesinde çok önemli olduğunu göstermiştir (58).

APP'nin kaybı, kültüre edilmiş hipokampal nöronlarda sinaps oluşumunu ve iletimini engellemiştir (59). AH'nda APP, enzimatik reaksiyonlar tarafından daha küçük fragmentlere dönüştürülmektedir (60). Bu fragmentler, nöron hücreleri dışında beta amiloid fibriller olarak birikerek senil plaklar denilen formları oluştururlar (61). Öncül

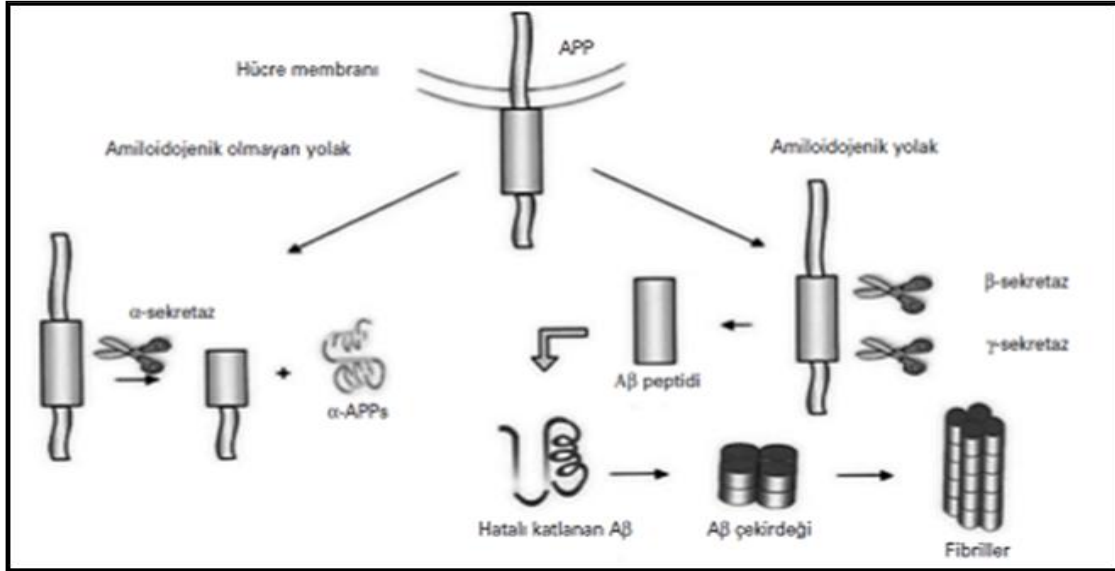
proteinin birikimi amiloid oluşumunu başlatan ilk basamaktır. Aynı amiloid öncül proteinleri bir araya gelerek amiloid fibrillerini oluşturur. Bu sebeple fibrillerin kütlece büyük kısmını amiloid öncülü proteinler oluşturur. Amiloid peptid birikiminin, AH'yla sonuçlanan bir patojenik kaskadın başlangıcı olduğu düşünülmüştür (62).

Amiloid plakların, içerdikleri A $\beta$  peptidinin yapısı ve toksisite potansiyeline göre bazı türleri vardır: diffüz, kompakt ve nöritik plak (63). Diffüz plaklar, toksik etkisi çok sınırlı olan ya da olmayan plaklardır. Pre-amiloid plaklar olarak kabul edilirler ve demansı olmayan yaşlı bireylerde sıklıkla bulunurlar. Diffüz plaklar inflamasyon, serbest radikallerin etkisi, oksidatif stres gibi nedenlerle kompakt plaklara dönüşebilirler. Kompakt plaklar toksik etkilidir ve nöron dejenerasyonuna yol açarlar. Nöritik plaklar, dejenere olmuş A $\beta$  peptid içeren dentrit ve akson parçalarından oluşan ve çoğu nörofibriller yumak da içeren oluşumlardır. Hem kompakt hem de nöritik plaklar Alzheimer hastalarında yaygın olarak bulunur. Toksik olup olmama potansiyeline bakılmaksızın, plaklar, serebral korteksin limbik yapılarından ziyade neokortikal bölgelerinde yerleşme eğilimindedirler.

Senil plakların oluşumu hastalığın en önemli histopatolojik belirtisidir. Öte yandan, AH'nın kesin tanısı için nörofibriler yumak ve senil plakların saptanması gerekli ancak yeterli değildir. Her iki lezyon da, hem normal yaşlanmada hem de bazı başka nörodejeneratif hastalıklarda görülebilir. AH'nın kesin tanısı için nörofibriler yumak ve senil plakların belli bir nöroanatomik dağılımda ve belli miktarlarda oldukları gösterilmelidir. Tipik nöritik, klasik veya kompakt plaklar, ortalama çapları 30  $\mu$ m olan küresel ekstraselüler lezyonlardır. Diffüz senil plaklar büyüklük bakımından daha heterojen olma eğilimindedir ve bunların büyük bir kısmı 20  $\mu$ m'den daha küçük ortalama çapa sahiptir. En fazla serebral korteks olmak üzere çeşitli neokortikal alanlarda dağılmış halde bulunurlar (64).

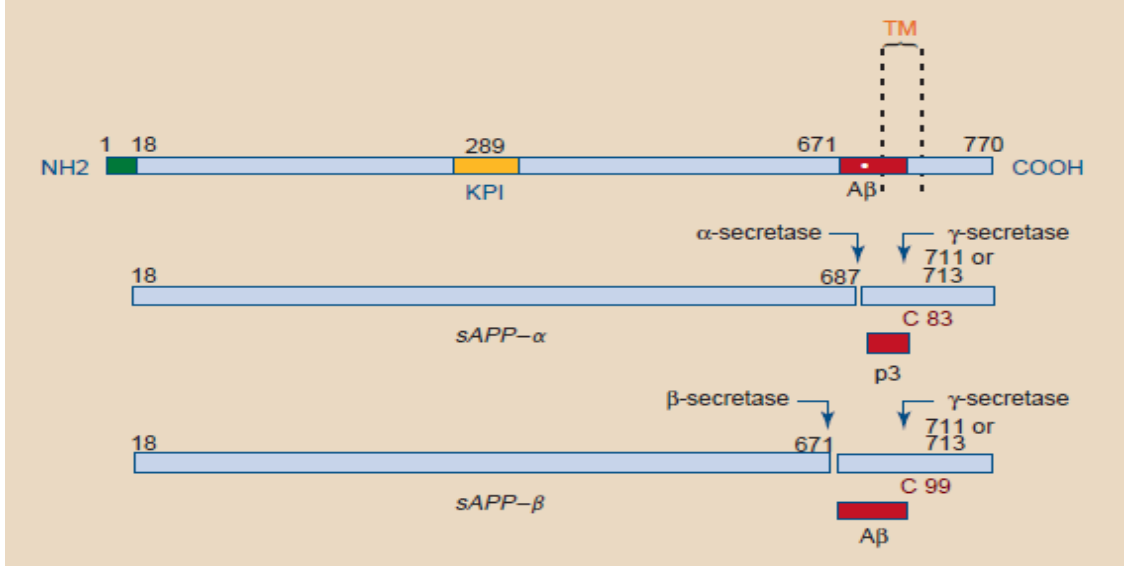
Bütün transmembran proteinlerde olduğu gibi APP'nin de hücre içi karboksit ucu, membran içinde seyreden 28 aminoasitlik bölümü ve hücre dışı amino ucu vardır. A $\beta$ , APP'nin membran içi 28 aminoasitlik bölgesini de içeren bir parçasıdır. APP bir dizi proteolitik enzimle kesilerek metabolize edilir. Bu enzimlere  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  sekretaz adları verilir. A $\beta$ 'nın öncülü olan APP hücrede iki farklı şekilde yıkılmaktadır. APP,  $\gamma$ -sekretaz ve/veya  $\alpha$ -sekretaz enzimleriyle kesildiğinde oluşan peptid yıkılabilmektedir ve bu nedenle de amiloid plak oluşturacak özellikte değildir (65). Ancak APP'nin  $\gamma$ -

sekretaz ve  $\beta$ -sekretaz ile kesilmesi durumunda oluşan 40-42 aminoasitlik bir peptid ( $A\beta$ ) amiloid oluşturabilme özelliğindedir (66) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Alzheimer hastalığında görülen amiloid beta peptidin oluşum mekanizması (66).

$\alpha$ -sekretaz APP'yi yaklaşık olarak ortasından keser. Bu kesim sonunda  $A\beta$  yerine  $\alpha$ -APPs ya da sAPP- $\alpha$  adı verilen ekstraselüler yeni protein meydana gelir.  $\beta$  ve  $\gamma$ -sekretazlar, APP'yi amino ucundan ( $\beta$ -sekretaz ile) ve/veya karboksi ucundan ( $\gamma$ -sekretaz ile) böler ve ürün olarak  $A\beta$  oluşur (67) (Şekil 2.3). Oluşan  $A\beta$ 'ler 40 veya 42 aminoasit uzunluğundadır. Bunlardan daha fazla amiloidojenik olanı 42 aminoasitlik form olup ilk çöken de odur (68, 69). Ardından  $A\beta$  diffüz plaklar halinde agregre olur ve bunlar yoğun nöritik plaklara dönüşür (70).  $A\beta$ 'nın 40 ve 42 rezidülerinin AH'nda görülen plak oluşumunun majör komponentleri olduğu ve Alzheimer'da görülen nöronal dejenerasyonda çok önemli rol oynadıkları gösterilmiştir (11, 71).



**Şekil 2.3.** APP ve onun başlıca metabolik türevlerini gösteren diyagram. En üstteki diyagram, APP'nin 770 aminoasitlik bilinen en büyük alternatif splayz formudur. N-terminalinde 17 rezidülük bir sinyal peptidi oluşur. 56 aminoasitlik ekson bir serin proteaz inhibitör domaini içerir (KPI). 700-723. aminoasitlerde hücre membran domaini (TM) gösterilmiştir. Amiloid β bölgesi, kırmızı ile gösterilmiştir. Ortadaki diyagramda, α sekretaz tarafından yapılan kesim oluşan büyük, çözülebilir ekto-domain formu (sAPP-α) görülmektedir. En alttaki diyagramda, β ve γ-sekretazların APP'nin 671 ile 711 veya 713. rezidülerindeki kesim aktivitesi sonucu β40 ve β42 peptidlerini oluşturması görülmektedir. Aynı zamanda β sekretazın 671. rezidüde yaptığı alternatif proteolitik kesim sonucunda çözülebilir APP-β (sAPP-β) formunun oluşumu gösterilmiştir (67).

Aβ oligomerleri; oksidatif strese, apoptosize ve kalsiyum homeostazının bozulmasına yol açabilir ve hücre membranlarındaki geniş, voltaja duyarlı olmayan ve non-selektif iyon kanallarının içinde kendi kendine bir araya gelip birikerek hücrelerdeki elektriksel aktivitenin uzun süreli bozulmasını tetikleyebilir. Wistar sıçanların kortikal nöronlarından hazırlanan primer kültürlerde, Aβ'nin endoplazmik retikulumdan (ER)  $Ca^{+2}$  salınımını arttırdığı, bu durumda ER ile mitokondrinin fiziksel yakınlığı nedeni ile mitokondrinin çok miktarda  $Ca^{+2}$  iyonunu yakalayabildiği ve bunun da mitokondriyal apoptotik yolağı aktive ettiği gösterilmiş ve böylece AH'nda görülen nöron kaybının mekanizmalarından birisi anlaşılabilmiştir (72).

Nöron hücrelerindeki iyon dengesinin bozulmasının, AH'nın patogenezinde rol oynadığı bilinmektedir. Aβ'nin lipid veziküllerindeki  $Ca^{+2}$  kanallarını biçimlendirdiği ve astrositlerde ve nöron hücrelerinde hücre içi  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunu değiştirdiği,



hücre kültürlerinde standart floresan görüntüleme teknikleri kullanılarak gösterilmiştir (73). Elektrofizyolojik çalışmalar in-vitroda A $\beta$ 'nin sıçan giruslarında uzun-dönem potansiyelini arttırdığını ve bu şekilde sinaptik plasititeyi kolaylaştırdığını göstermiştir. Akut olarak genç sıçanların hipokampuslarına düşük miktarda A $\beta$ 1-40 uygulanması (70-120 gün), bazal sinaptik iletimi değiştirmezen, uzun süreli potansiyelde (LTP) artışa neden olmuştur (74).

Ayrıca A $\beta$ , yağlar ve proteinler gibi çeşitli biyomoleküllere bağlanarak, hücre membranının moleküler yapısını da bozabilir ve bu şekilde; membran akışkanlığı, moleküler düzeni, iyon kanallarının formasyonu, membran potansiyeli ve geçirgenliği gibi biyofiziksel özelliklerinin değişmesine neden olabilir (75, 76). A $\beta$  uygulanmasının ardından, nöronal membranların depolarize olduğu ve nöron hücre gövdesi boyunca sirkülasyonda değişiklikler ortaya çıktığı, floresan voltaj duyarlı problemlerin kullanıldığı bir çalışmada gösterilmiştir (77). A $\beta$ 'nin nörodejenerasyonda rol oynayan diğer bir fonksiyonu da, mitokondrial membranda biriktiğinde, mitokondrial disfonksiyona neden olarak serbest oksijen radikallerinin oluşmasını sağlamasıdır (78, 79). Serbest radikaller proteinler, lipidler ve DNA gibi hücrenel makromoleküllerin birçoğu ile etkileşebildiği için toksiktir. Çeşitli patolojik durumlarda normalden fazla miktarda serbest oksijen radikali oluşması veya organizmanın yapısında bulunan antioksidan sistemin yetersiz kalması sonucunda artan serbest radikaller, hücrenin çeşitli bileşenlerini etkileyerek hücre hasarına yol açarlar (80).

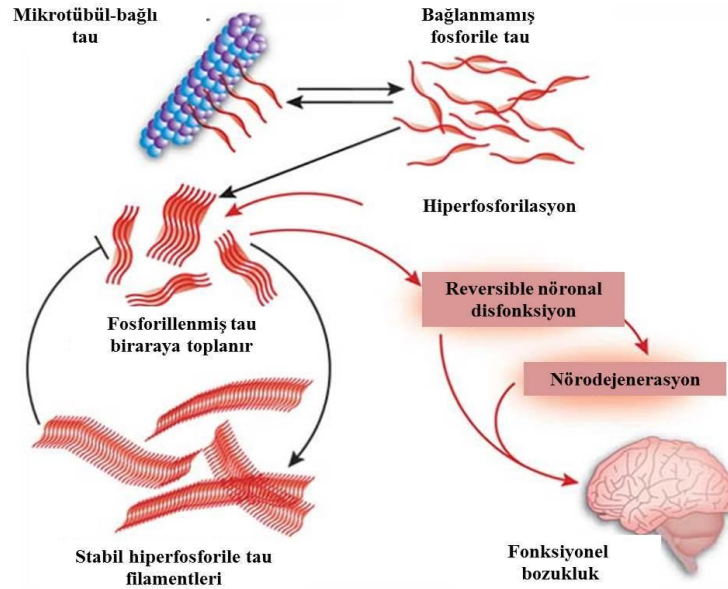
Beyinde A $\beta$ 'nin birikmesinin serebral endotelyum üzerine de etkileri vardır. Serebral endotelyum hücrelerinin biyomekanik özellikleri, adezyon, sinyal iletimi ve morfoloji gibi çok sayıda hücrenel fonksiyonun düzenlenmesinde önemlidir ve kan-beyin bariyerinin geçirgenliğinin ve beyin parenkimasının dengesinin korunmasında hayati bir rol oynar. Serebral endotelial hücre sınırı, kan-beyin bariyerinin major komponentidir. AH'nda; senil plakların birikimiyle birlikte serebral endotelial hücre sınırının yapı ve fonksiyonları bozulur; serebral kan akışı azalır, mikrovasküler yoğunluk artar, membranlardaki kalsiyum kanallarının formasyonu ve hücrenel kalsiyum seviyesi değişir (55).

### 2.3.2. Nörofibriler Yumaklar (NFY)

Nörofibriler yumakların (NFY) temel bileşeni hiperfosforile tau proteindir. Hiperfosforile tau proteini oluştuktan sonra diğer tau proteinleri ile dimerler yaparak nöron hücresi içerisinde nörofibriler yumak denilen yapıları oluşturur (81). Nörofibriler yumaklar meydana geldiğinde mikrotübüllerin yapı bütünlüğü bozulur ve nöronların transport sistemi dağılır (82). Bunun sonucu olarak nöronlar arasındaki biyokimyasal etkileşim ortadan kalkarak hücre ölümüne neden olabilir.

Tau, başlıca fonksiyonu nöronal mikrotübüllerin stabilizasyonu olan ve 17. kromozom tarafından kodlanan mikrotübül asosiyasyon proteinleri (MAP) ailesinden bir proteindir (83, 84). Mikrotübüllerin stabilizasyonu, hücre iskeletinin bütünlüğü ve aksonal transportta önemli rol alır. Tau aynı zamanda nöronların nükleus ve plazma membranlarında da lokalizedir ve DNA tamiri ve sinyal iletiminde rol alır (85).

Tau proteininin ana fonksiyonu, mikrotübüllere bağlanmak ve onları stabilize etmektir. Nörofibriler yumak oluşumu, tau bu fonksiyonunu gerçekleştiremediği zaman yani mikrotübüllere bağlanamadığında gerçekleşir (86) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Nöronal dejenerasyon sürecinde tau proteini düzenlenmesi (86).

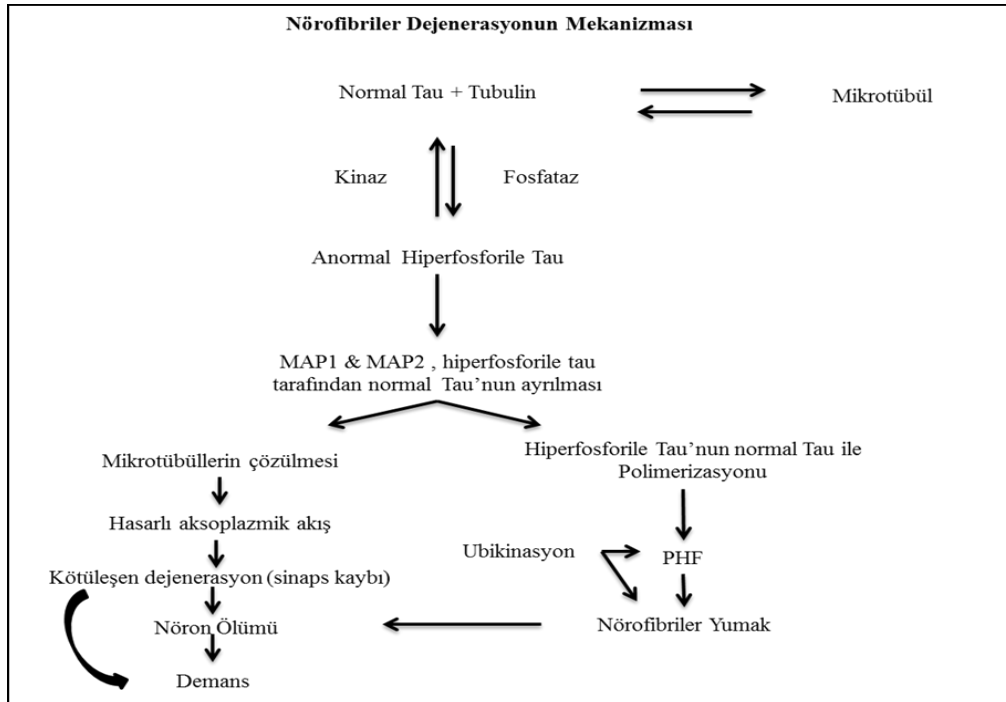
Alzheimer patogenezinde hiperaktif kinazlar ve/veya hipoaktif fosfatazlar tau proteininin hiperfosforilasyonuna yol açarak mikrotübüllere bağlanma yeteneğini bozarlar. Bağlanmamış fosforilize tau çözilemeyen çift sarmallı filamentlere (PHF-paired helical filaments) polimerize olur (82). Bunlar zaman içinde intranöronal NFY'lar haline gelirler (Şekil 2.5). Anormal hiperfosforile tau proteini, Alzheimer'lı beyinlerde; düz filamentlerle çift sarmal filamentlerin birleşerek oluşturduğu nörofibriler yumaklara polimerize formda ve sitozolde non-fibrilize formda olmak üzere 2 subselüler durumda bulunur (87). Tau proteini, nörofibriler yumak haline enzimatik defosforilasyon yoluyla dönüşebilir (Şekil 2.5).

NFY'lar, hücre iskeletinin bütünlüğünü ve aksonal transportu bozarak hücre ölümüne neden olur. Transgenik farelerde yapılan çalışmalar primer nörotoksik oluşumun NFY'lerden daha çok mutant tau proteini olduğunu düşündürmektedir (88). Ancak ailesel AH'ndaki mutasyonların tau proteininden çok A $\beta$  üretimini artırmaları ve AH'na benzemeyen bazı nörodejeneratif hastalıklarda da tau proteininin bulunması, Alzheimer patolojisinde tau proteininin önemini tartışmaya açmaktadır (81). Bununla birlikte beyinde tau proteini olduğu zaman, doğrudan nörodejenerasyona sebep olduğu gösterilmiştir. Alzheimer hastalarının beyinlerinde anormal hiperfosforile tau protein seviyesi kontrol bireylerine göre 4-8 kat artmış olarak bulunmuştur (89). Sitolitik anormal hiperfosforile tau proteini Alzheimer beyinlerindeki total anormal tau proteininin yaklaşık %40'ını oluşturur ve tübülün/mikrotübüllerle interaksiyona girmeden mitojen aktiviteli proteinler (MAP1A, MAP1B ve MAP2) normal tau proteinlerini ayırarak mikrotübüllerin çözülmesi ve inhibisyonuna yol açar (82, 90, 91) (Şekil 2.5).

Sağlıklı beyinler, tau proteininin optimum aktivitesi için 2-3 molekül fosfat gerekir. Tau proteininin hiperfosforilasyonu normal biyolojik aktivitesini baskılar. AH ve diğer tau ile ilişkili patolojilerde, tau anormal şekilde hiperfosforillenir. Bu olaya birden fazla mekanizma katılır. Normal tau proteininin aksine Alzheimer'da bu protein N-glikozillenir ve bu glikolizasyon tau proteinini fosforilasyon için daha uygun hale getirir. PP-2A (Protein fosfataz 2A) tarafından yapılacak defosforilasyon için ise daha az uygun halde bir tau proteini oluşur. Fakat sadece defosforilasyon aktivitesinin azalması değil aynı zamanda CaMKII (kalmodulin-bağımlı protein kinaz II), PKA (protein kinaz A) ve MAP kinaz enzimlerinin aktivitesinin artması da anormal tau

proteini hiperfosforilasyona yol açar. Anormal hiperfosforile tau proteini, sadece mikrotübüllerin oluşumunu uyarmakta başarısız olmakla kalmaz aynı zamanda o mikrotübüllere bağlanır. Ayrıca normal tau proteinlerini, MAP1A/MAP1B ve MAP2'yi ayırarak mikrotübül çözülmesine ve inhibisyonuna yol açar. Etkilenmiş nöronlarda mikrotübül ağının yıkılması, aksonal transportu engelleyerek nöron dejenerasyonunun artmasına ve en nihayetinde de demansa neden olur.

Alzheimer'da anormal fosforile tau ve normal tau arasındaki ilişki glikosilasyon varlığında gerçekleşir ve nörofibriler yumak oluşumuyla sonuçlanır. Yumaklar, non-lizozomal ubikitin yolağı tarafından parçalanmak üzere ubikinasyona uğrar. Fakat bu parçalanma çok minimal düzeyde gerçekleşebilir. Non-polimerize anormal hiperfosforile tau'nun aksine nörofibriler yumaklar daha etkisizdir. Fakat hastalık ilerledikçe bu lezyonlar da büyüyerek hücre ölümlerini arttırarak demansı kuvvetlendirir (82).



**Şekil 2.5.** Nörofibriler dejenerasyonun mekanizması (82).

### 2.3.3. Sinaps ve Nöron Kaybı

Sinaptik kayıp, AH'nın erken döneminde meydana gelen ve Alzheimer sürecini yavaşlatmak ve bilişsel ve fonksiyonel yeteneklerin korunmasını sağlamak için koruyucu tedavilerde üzerinde durulan bir prosesdir. Sinaps kaybı, bilişsel bozuklukla en iyi ilişkilendirilen patolojidir ve sinaptik disfonksiyon, sinapslar ve nöronlar kaybedilmeden önce belirgindir. Sinaptik fonksiyon bozukluğu başladığında, eğer hala sağlam nöron hücreleri ile bağlantıları varsa, hastalık sürecine etkin bir şekilde müdahale etmek için küçük bir şans olabilir (92).

Sinaptik kaybın derecesi değişken olmakla birlikte frontal korteks en fazla, oksipital korteks ise en az etkilenen beyin bölgeleridir (93). Sinapslarda en göze çarpan azalma, muhtemelen azalan entorhinal korteks input'unun bir sonucu olarak dentat girus sınırının dış kısımlarında bulunmuştur (94). Klasik senil plakların yoğun amiloid merkezleri içerisindeki sinapslar tamamen kaybedilmiştir (95). Entorhinal korteks, beyinde AH'ndan etkilenen ilk alandır; yeni bir fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme çalışması lateral entorhinal korteks alana lokalize olarak gerçekleştirilmiştir (96).

Sinaptik fonksiyon bozukluğu veya kaybı, nöronal iletişimin açık bir şekilde bozulmasıyla demansın klinik işaretlerine katkıda bulunur. Alzheimer'da temporal ve frontal korteksteki nöron ve sinaps yoğunluğunun kantitatif analizleri, sinaps-nöron oranının %48'lik bir oranda azaldığını göstermiştir (97). Sinapslar yapısal olarak intakt durumda görülse bile fonksiyonel olmayabilirler. Bu durum, transmitter sentezi, transportu, salınımı ve geri alımındaki defektler, vezikül trafiğindeki düzensizlikler (98), değişmiş veya azalmış transmitter reseptörlerinin, pompalarının ve iyon kanallarının varlığı ve ikinci haberci sistemlerdeki bozukluklar nedeniyledir (92). Aynı zamanda sinapslardaki fonksiyon bozukluğu, nörodejeneratif süreçle bağlantılı olabilen, metabolik aktivitede, serebral kan akışında (99), mikroglial aktivasyonda azalma (100) ve nikotinik reseptörlerin kaybı (101) gibi dejeneratif süreçlerle de ilişkilidir.

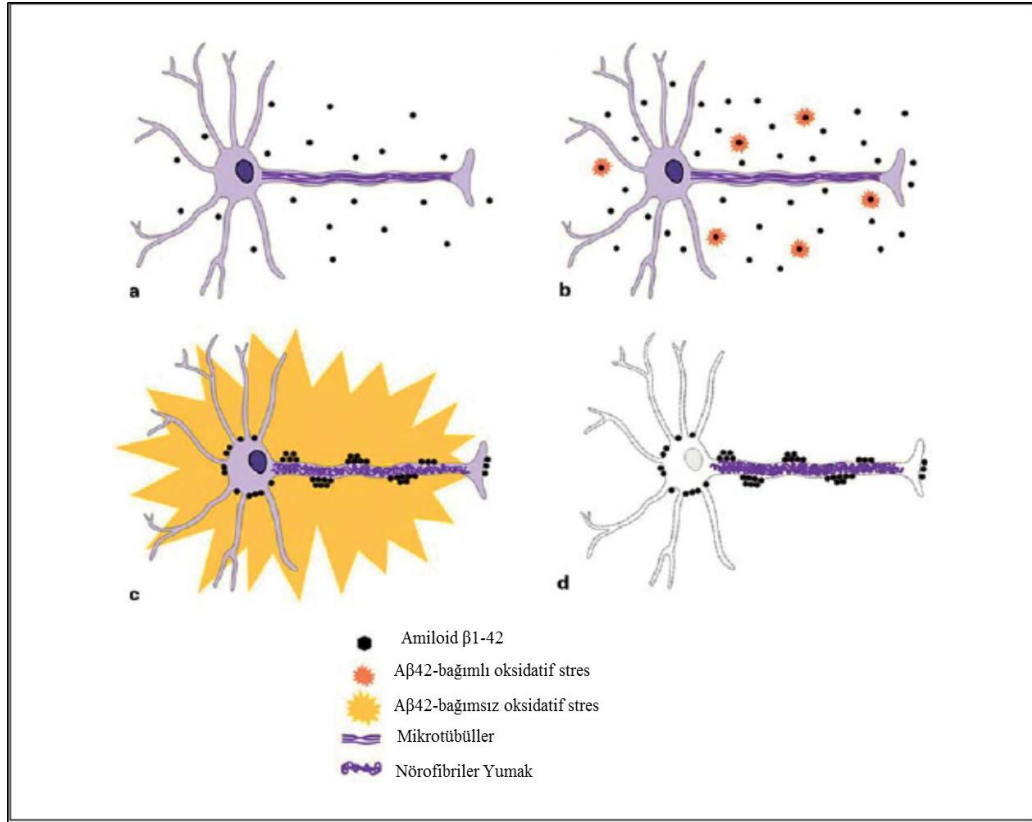
Nöron ölümü, nöronal enerji metabolizmasındaki değişiklikler veya besleyici faktörlerin azalması sonucunda meydana gelen sinaptik bağlantılardaki kayıp, bilişsel gerilemeye sebep olabilir (102). Aβ peptid depolanmaları ise; oksidatif stres, eksitotoksikite, enerji kaybı, inflamasyon ve apoptozisi içeren olası mekanizmalar yoluyla nöronal ölüme sebep olur (56). AH'nda, birçok canlı nöron hastalanmıştır ve

sinapslarını kaybetmiştir. Canlı olarak kalan bir nöronun sinaptik fonksiyonunu kaybedebileceği önemli bir gözlemdir. Postmortem beyinlerde nöron düzeyinde yapılan histopatolojik çalışmalarda yaşayan bir nöron için 2 kriter belirlenmiştir. Bunlardan birisi, nöronun nukleus içermesi ve diğeri de bozulmamış mRNA'ya sahip olmasıdır. Alzheimer hastalarının beyinlerinde çok sayıda bu kriterleri taşıyan nöronların olduğu görülmüştür. Bu nöronların hala transkript oluşturabildikleri in-situ hibridizasyon veya başka yöntemlerle gösterilmiş ve bu şekilde canlı oldukları sonucuna varılmıştır (92).

A $\beta$ , yapısı gereği lipidler, proteinler ve proteoglikanlar gibi çeşitli biyomoleküllere bağlanma yeteneğine sahiptir. A $\beta$ 'nın membran lipidlerine bağlanmasının, membranların akışkanlığı (11) ya da iyon kanallarının formasyonu gibi özellikler üzerinde yıkıcı yönde etkisi vardır (71). Bu yıkıcı etkinin sonucunda membran yapısı bozulan nöronda hücre ölümü gerçekleşebilir. Lipidler, hücre membranının yapısında olduğu gibi, lizozom, golgi kompleksi ve endoplazmik retikulum dahil hücre organellerinin de membran yapısını oluşturan biyomoleküllerdir. A $\beta$  bu yapıların membranlarına da güçlü bir şekilde bağlanabilir (103). A $\beta$  agregatının boyutu ve hidrofobik özelliğinin yüksekliği ile membran akışkanlığının azalması birbiriyle ilişkilidir (104). Oligomerik A $\beta$ , kolesterol, fosfolipid ve monosialogangliosid gibi lipidlerin nöronal membranlardan serbest kalmasını sağlayarak nöron hücresinin lipid dengesini bozarak nöron kaybına neden olur (105). Aynı zamanda, amiloid peptidler lipid tabakadaki iyon kanallarını biçimlendirebilir (106). A $\beta$  kanallar, büyüklük, seçicilik, blokaj ve geçirgenlik bakımından heterojendir. Genellikle de geniş, voltaj-bağımsız ve nispeten de Ca<sup>+2</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> ve Cl<sup>-</sup> gibi fizyolojik iyonlara karşı zayıf seçiciliği olan kanallardır (107). Hipokampal nöronlardaki A $\beta$  agregatları, Ca<sup>+2</sup> kanal reseptörlerini uygun olmayan bir şekilde aktive ederek kanal geçirgenliğini artırır ve Ca<sup>+2</sup>'un aşırı yükselmesine yol açarak nöronal fonksiyon bozukluğuna neden olur (108).

A $\beta$  ve oksidatif stresin birlikte, sıçan beyinde nöron ölümünü, amiloid depositlerinin oluşumunu, glikozisi ve hafıza bozukluklarını indüklediği gösterilmiştir (109). Transgenik farelerde yapılan bir çalışmada ise oksidatif stres oluşturularak beyinde amiloid plak oluşturulabildiği bildirilmiştir (110). Amiloidogenezis hipotezine göre, kalsiyum dengesinin bozulması, oksidatif stresin indüklenmesi ve tau proteininin hiperfosforilasyonu Alzheimer patolojisine yol açar.

Aynı zamanda beyinde amiloid plak agregatlarının fazlalığı, amiloidin mitokondri membranlarına bağlanarak membran bütünlüğünü bozması nedeniyle nöronal oksidatif strese sebep olur (Şekil 2.6). Bu konuda özellikle insandaki APP mutasyonlarına göre oluşturulan transgenik fare modelleri ile yapılan çok sayıda çalışma olmasına rağmen, sürecin ilerleyişi henüz çok net değildir. Astrosit kültürlerinde yapılan bir çalışmada, A $\beta$ 'nin antioksidan sistemin desteğini bozarak Ca<sup>+2</sup>'a bağlı oksidatif strese neden olduğu ve nöron ölümüne yol açtığı gösterilmiştir (111).



**Şekil 2.6.** A $\beta$ 42 varlığında gerçekleşen plak ve yumak oluşumuyla ilgili öne sürülen mekanizmanın şematik sunumu. a) Sağlıklı bir kişinin nöronu b) Alzheimer hastasının beyinde A $\beta$ 42 konsantrasyonunda artış. Peptid, biyokimyasal ya da patolojik sonuçları olmayan oksidatif özellikler gösteriyor. c) Antioksidan savunma çalışmadığı ya da A $\beta$ 42 agregasyonu, plak oluşumu ve nörofibriler yumaklar oluşması için serbest radikal türlerine uygun bir ortam oluşturduğu için oksidatif stresin oluşması. d) Nöron ölümü (109).

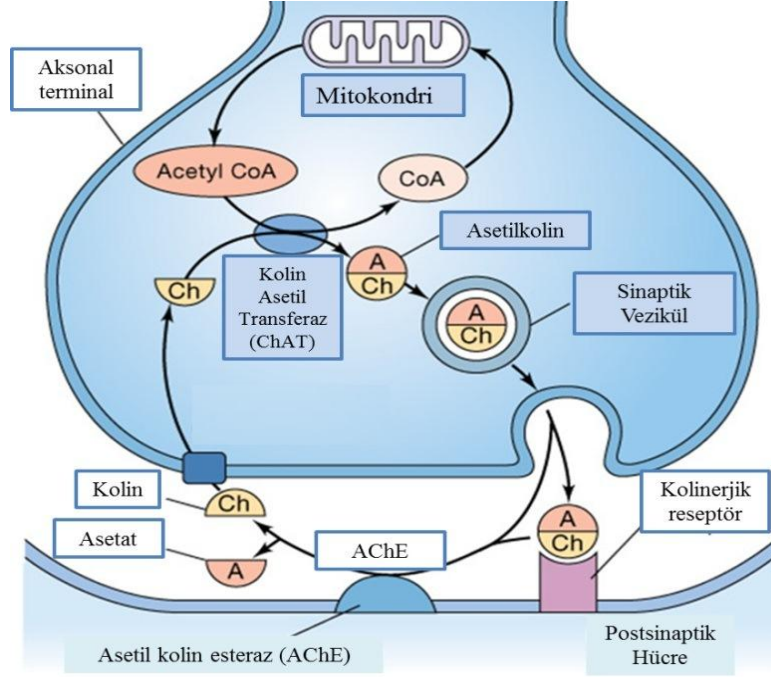
#### 2.3.4. Kolinergic Kayıp

AH'ndaki patolojilerden bir diğeri ise beyindeki kolinergic sistemin, özellikle öğrenme ve bellek ile ilgili bölgelerde, bozulmasıdır. Hastalığın anahtar noktaları olarak düşünülen senil plaklar ve nörofibriler yumaklar dışında Alzheimer hastalarında beyinde başta asetilkolin (ACh) olmak üzere çok sayıda nörotransmitter sistem etkilenmektedir. ACh, AH'nda en fazla azalma gösteren nörotransmitterdir (112). ACh seviyesindeki azalma, sinaptik bozukluğun da en erken belirtilerinden birisidir (87).

ACh belli kolinergic nöronların gövdesinde, kolinin asetil CoA ile kolin asetil transferaz (ChAT) enzimi sayesinde katalize edilmesiyle oluşur (113). Asetil CoA glikoliz reaksiyonlarının bir ürünüdür. Kolinin ise besinler ve hücre membranındaki fosfolipidler dışındaki en önemli kaynağı ACh hidrolizi sonucu açığa çıkan ve yeniden asetilkolin sentezinde kullanılan kolindir. ACh'in sinaptaki varlığı, asetilkolini sentezleyen ChAT ve asetilkolini parçalayan asetilkolin esteraz (AChE) enzimlerinin etkinliğine bağlıdır. ChAT enziminin seviyesi AH'nın hipokampus ile neokorteksinde azalmıştır (113, 114).

ACh sentezlendikten sonra, presinaptik nöronlardaki veziküllerde depolanır ve bu veziküller, nörona sinir uyarısı geldiğinde içeriğini sinaptik aralığa döker. Sinaptik aralığa salınan ACh moleküllerinin çoğu postsinaptik reseptörlere bağlanır. Reseptörlere bağlanmayan ACh molekülleri AChE tarafından yıkılır. Postsinaptik nörona bağlanan ACh molekülleri, sinir uyarısının diğeri nörona iletilmesinin ardından reseptörden ayrılır, AChE tarafından yıkılır ve açığa çıkan kolin yeniden kullanılmak üzere presinaptik nörona gönderilir (Şekil 2.7).





Şekil 2.7. Asetilkolin metabolizması. (115)

Asetilkolin, merkezi sinir sisteminde yer alan bir kimyasal iletici olmasının yanı sıra insan da dahil birçok organizmanın parasempatik sinir sisteminde yer alır. İskelet kası liflerindeki asetilkolin reseptörlerine bağlanarak, lifin kasılmasına neden olur. Asetilkolinin öğrenme ve hafıza ile de derin bir ilişkisi bulunur (116). Presinaptik nöronlardaki veziküllerden salınır ve postsinaptik reseptörlere bağlanır. Sinaptik aralıkta difüzyonla ilerleyen asetilkolin postsinaptik membranda nikotinik reseptörlere bağlanarak doğrudan, muskarinik reseptörlere bağlanarak G-proteini ilişkili ikincil mesajcılar üzerinden etkisini gösterir. Nikotinik etkilerin hücrenin uyarılabilirliğini artırarak dikkat tonusunun sağlanmasında rol oynadığı, muskarinik etkilerin ise kalıcı sinaptik değişikliklerle yeni bilginin depolanması şeklindeki nöroplastisite mekanizmalarının unsuru olduğu bilinmektedir. Hem nikotinik, hem de muskarinik stimülasyon kaybının  $A\beta$  oluşumunu ve nörotoksitesini artırdığı in vitro olarak gösterilmiş,  $A\beta$ 'nın asetilkolin sentezini, salınımını ve postsinaptik etkinliğini azaltabileceği de ortaya konmuştur. Sinaptik boşluğa salınarak görevini tamamladıktan sonra asetilkolin, AChE yardımıyla kolin ve asetata çevrilerek yıkılır. Farklı alt ünite ve

hidrodinamik özellikleri nedeniyle farklı moleküler formlarda asetilkolin esteraz enzimleri vardır. Memeli beyinlerinde tetramerik formda (G4 formunda), daha az miktarlarda da monomerik formda (G1) bulunurlar (116, 117).

AH'nın başlaması ile birlikte gerçekleşen nöron ve akson kaybı daha düşük düzeylerde asetilkolin salınımına neden olur. Düşük konsantrasyondaki nörotransmitter düzeylerinde sinir iletilerinin devamlılığını sağlamak daha güç bir hal alır. ACh düzeylerini arttırmayı sağlayacak mekanizma ise ACh'i yıkan AChE enziminin baskılanmasıdır. Çalışmalar, AChE inhibisyonuna bağlı ACh düzey artışlarının, AH'nın erken evrelerindeki kognitif yetmezliği iyileştirebileceğini göstermiştir (118).

#### **2.4. Asetilkolin Esteraz İnhibitörleri**

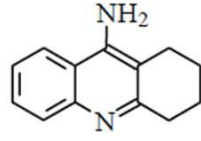
Sinir uyarısının nöron boyunca ilerlemesi sonucunda, sinir son ucu aksonda asetilkolin salınır. Asetilkolin, istirahat halindeki hücrede sinir iletilerini yeniden oluşturmak için sinaptik boşluğu geçerek takip eden nörona bağlanır. Asetilkolini sinaptik aralıktan uzaklaştırmak için AChE enzimi nörotransmitteri hidroliz eder. Kolinerjik nöronlarda AChE, hücre gövdesinde, aksonlarda ve dentritik uzantıların proksimalinde yer alır (119).

AH'nın başlaması ile birlikte gerçekleşen nöron ve akson kaybı, daha düşük düzeylerde ACh salınımına neden olur. Daha düşük konsantrasyondaki nörotransmitter düzeylerinde sinir iletilerinin devamlılığını sağlamak ve sonuç olarak bilgilerin aktarımı daha güç bir hal alır. Bu durumu düzeltmek için ya kişiye ACh benzeri maddeler verilmelidir ki bu mümkün görünmemektedir, ya da mevcut ACh seviyesinin daha da düşmesini önleyici tedbirlerin alınması gerekmektedir. Bunu sağlamak üzere kullanılan tedavilerin odağında ACh'i yıkan AChE enziminin baskılanması vardır. Bu baskılama olayı için çok sayıda AChE inhibitörü kullanılmaktadır. AChE inhibisyonuna bağlı asetilkolin düzey artışlarının, AH'nın erken evrelerindeki kognitif bozukluğu iyileştirebileceği düşünülmüştür. Kolinerjik eksikliğin klinik tablo ile olan yakın ilişkisi nedeniyle ACh'in sinaptik aralıkta daha uzun kalmasını sağlama amacı, günümüzde hastalığın semptomatik tedavisinde en sık uygulanan stratejidir.

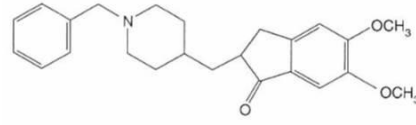
Memelilerde; bir tanesi seçici olarak ACh'i hidroliz eden AChE, diğeri ise ACh ve diğerkolin esterlerini hidroliz edebilen butirilcholin esteraz (BuChE) olmak üzere iki tip kolinesteraz bulunur (119, 120). Kolinesterazlar, plazma ve diğerkolin esterlerinde de bulunmak üzere kolinerjik ve kolinerjik olmayan dokularda geniş bir dağılıma sahip enzimlerdir. Substrat özgüllüğüne, aşırı substrat varlığındaki davranışlarına ve inhibitörlere karşı duyarlılıklarına göre iki gruba ayrılmışlardır. Farmakolojik özellikleri bakımından birbirinden farklı olan bütün AChE inhibitörlerinin hepsi de ortak bir şekilde, ACh'in yıkımının inhibisyonunu sağlamak üzere fonksiyon gösterir (121). AChE veya gerçek kolinesteraz (AChE: E.C.3.1.1.7, asetilkolin asetilhidrolaz) ve butirilcholinesteraz (BuChE: E.C.3.1.1.8 açilkolin açilhidrolaz), spesifik olmayan kolinesteraz veya psödokolinesteraz olarak bilinir (117). AChE, beyin ve eritrositlerde yüksek konsantrasyonda bulunurken; BuChE, serum, pankreas, karaciğer ve santral sinir sisteminde bulunur (122, 123). Beyindeki kolinesteraz aktivitesinin %80'inden AChE, geriye kalan %20'inden BuChE'nin sorumlu olduğu düşünülmektedir (124).

AChE'in G1,G2 ve G4 olmak üzere üç izoformu olduğu bilinmektedir. Alzheimer hastalarının beyinlerinin belirli bölgelerinde G4 formunun kaybı nedeni ile G4/G1 oranının azaldığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (125).

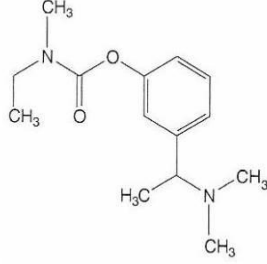
Şimdiye kadar, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Komitesi (FDA) tarafından AH'nın tedavisi için AChE inhibitörü olarak 4 ilaç (Takrin, Donepezil, Galantamin ve Rivastigmin) onaylanmış ve birkaç tane de yeni AChE inhibitörü deneme aşamasındadır (17) (Şekil 2.8).



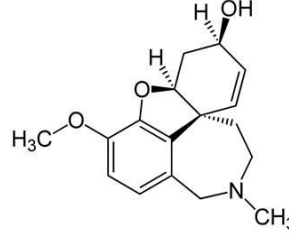
**Takrin**



**Donepezil**



**Rivastigmin**



**Galantamin**

**Şekil 2.8.** Alzheimer tedavisinde kullanılmak üzere ABD Gıda ve İlaç Komitesi (FDA) tarafından onay alınan asetilkolin esteraz inhibitörlerinin biyokimyasal yapısı.

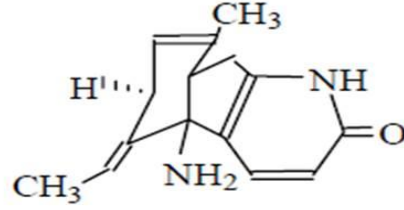
Hafif ve orta derece Alzheimer demansı için Donepezil (Aricept®), Rivastigmin (Exelon®) veya Galantamin (Reminyl®) kullanılmaktadır. Fakat bu ilaçların klinik kullanımlarının, yarılanma sürelerinin kısa olması, periferik kolinerjik sistem üzerindeki yan etkileri ve hepatoksisite nedeniyle kısıtlı olduğu bildirilmektedir (126) (Çizelge 2.1). Örneğin; takrinin kullanımı karaciğer harabiyetine neden olması bakımından sınırlıdır ve bu nedenle artık kullanılmamaktadır (127). Donepezil, takrinin dezavantajlarının üstesinden gelmek üzere geliştirilmiş ve onay almıştır. Kullanımında karaciğer üzerinde olumsuz etkiler görülmemiştir fakat kolinerjik yan etkiler göstermiştir (128). Yan etkileri daha çok da gastrointestinal sistem üzerinde olmuştur. Rivastigmin, prelinik biyokimyasal çalışmalarda belirgin santral sinir sistemi seçiciliği gösterilmiş olan kısmi geri dönüşümlü bir AChE inhibitörüdür (129).

**Çizelge 2.1.** Alzheimer tedavisinde kullanılan ABD Gıda ve İlaç Komitesi (FDA) onaylı AChE inhibitörlerinin özellikleri, yararlı ve zararlı yönleri (126).

Asetil Kolin Esteraz İnhibitörü	Özellikleri ve Kullanım Şekli	Yararları	Sakıncaları
Donepezil	Sadece tablet ve ağızda dağılan formu vardır. İlaça günde bir kez alınan 5 mg ile başlanıp bir ay sonra günde 10 mg'lık forma geçilir. Yurt dışında 23 mg'lık formu da bulunmaktadır.	Yüksek doz (23 mg) donepezilin bilişsel işlevlerde, düşük doz forma (5 ve 10 mg) göre üstünlüğü olmasına karşın günlük işlevlerde ortaya çıkardığı belirgin bir fark yoktur ve yan etkileri de biraz daha fazladır.	-Hastalığın ilerlemesini durduramaz. -Davranış bozuklukları üzerinde etkili değildir ya da çok az etkisi görülür. -Olası Yan Etkileri: Genellikle zayıf belirtiler olarak gözlenir. ✓ Bulantı ✓ İshal ✓ Kusma ✓ Mide sorunları ✓ Karın ağrısı ✓ İştah ve kilo kaybı ✓ Nadiren uyku bozukluğu, Yorgunluk ve Kas krampları
Rivastigmin	Kapsül, flaster ve solüsyon formları vardır. Flaster ve sıvı formu ağızdan ilaç almakta zorlanan veya reddeden hastalarda tercih edilmektedir. Sabah ve akşam alınan 1.5 mg dozu ile tedavi başlanır. Hatanın ilacı tolere edebilmesi halinde doz tedrici olarak 4 haftada günde 3 mg artışlarla sabah ve akşam 6 mg dozuna kadar çıkarılır. İlaç yemeklerle birlikte alınmalıdır.	Hafıza performansının iyileştirilmesi mümkündür. Böylece hastalar günlük aktivitelerini belirli bir süre için daha kolay yapabilir.	
Galantamin	Piyasada 4, 8 mg tablet ve 8, 16, 24 mg'lık uzatılmış salınımlı kapsül formu vardır. İlaça sabah ve akşam alınan 4 mg'lık tablet veya 8 mg'lık günde bir kez alınabilen uzatılmış salınımlı kapsül formu ile başlanır. Bir ay sonunda günde 16 mg'a çıkılabilir. Maksimum günlük doz 24 mg'dır. İlaç yemeklerle birlikte alınmalıdır.		

#### 2.4.1. Huperzin-A

Huperzin A (Hup A), AH'nın patolojisinde önemli bir yeri olduğu biyokimyasal, histolojik, genetik ve fizyolojik çalışmalarla belirlenmiş doğal bir asetilkolin esteraz inhibitörüdür. Hup A, *Huperzia serrata*'dan elde edilen bir enantiomerik likodin alkaloiddir (116) (Şekil 2.9). Potansiyel, geri dönüşümlü bir asetilkolin esteraz inhibitörüdür (EC 3.1.1.7, AChE) ve BChE'lara benzer (EC 3.1.1.8, BChE). Yapılan çalışmalar, FDA onayı alan diğer AChE'lara göre kan-beyin bariyerine olan ilgisi nedeniyle daha iyi penetre olduğunu ve biyolojik aktivite süresinin daha elverişli olduğunu ortaya koymuştur (18).



**Huperzin A**

**Şekil 2.9.** Hup A'nın elde edildiği *Huperzia serrata* bitkisi ve Hup A'nın biyokimyasal yapısı. (117)

Şu anda pek çok ülkede ilaç sektöründe kullanılabilmesi için Faz III-Faz IV çalışmaları yapılmaktadır. Çünkü Hup A'nın oral yolla kullanıldığında çok kısa sürede ve etkin bir şekilde kan-beyin bariyerini aşır, özellikle de beyin korteks ve hipokampus bölümlerine penetre olabildiği bilinmektedir. Asetilkolin esterase inhibitör aktivitesi ise, bugün için kullanılan diğer ilaçlara göre daha uzundur. Kemirgenlerle ve sağlıklı gönüllülerle yapılan çalışmalar Hup A'nın hızla absorbe edildiğini, vücutta geniş oranda dağıldığını ve oral yolla alındığında yavaş ve uzun sürede salındığını ve yavaş elimine olduğunu göstermiştir (17). Çin'de insanlarla denendiğinde yaşlılarda yaşlanmayla ve Alzheimer'la ilgili hafıza bozukluklarını, vasküler demansı iyileştirdiği, minimal düzeyde periferik kolinerjik yan etkisi olduğu ama toksisitesi olmadığı gösterilmiş ve potansiyel tedavi seçeneği olabileceği önerilmiştir (130).

Hup A'nın asetilkolin esterase inhibisyonu spektrofotometrik yöntemlerle hem in vivo hem de in vitro değerlendirilmiştir. Bu çalışmalar, Hup A'nın Alzheimer tedavisinde kullanılan diğer ilaçlarla benzer veya daha üstün özellikleri olduğunu

göstermiştir (131). Hup A ve takrin'in kolin esteraz aktivitesi karşılaştırıldığında, Hup A'nın korteks ve hipokampusta daha seçici aktivite gösterdiği ve biyolojik olarak kullanımının daha elverişli olduğu çalışmalarla gösterilmiştir. Hup A'nın Alzheimer tedavisinde AChE inhibitörü olarak kullanılmasının daha ideal bir durum olduğu ifade edilmiştir (132).

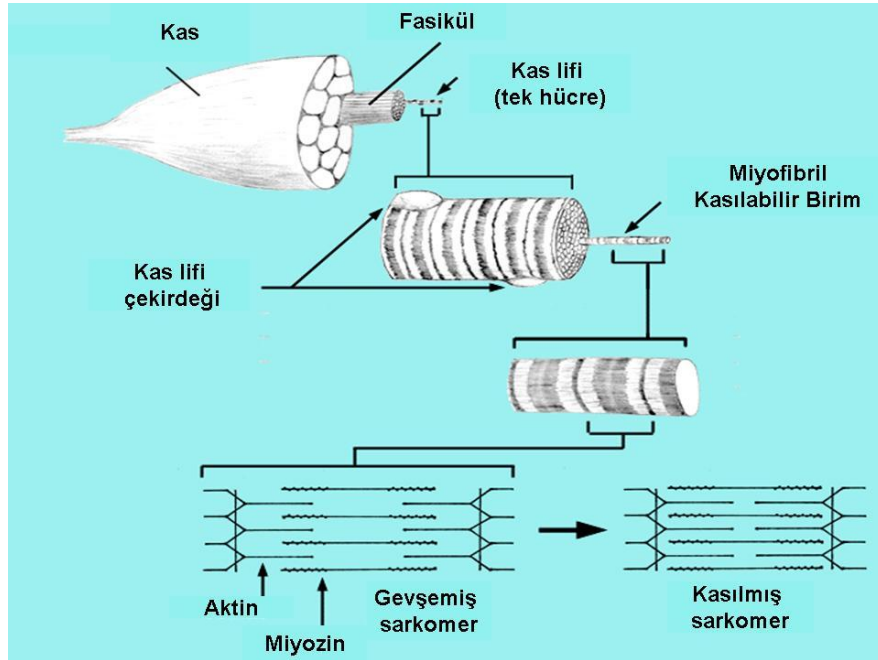
Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda serebral iskemi-reperfüzyon hasarları ve kafa hasarlarının oksidatif metabolizmalardaki değişiklikler ve serbest radikal artışıyla ilişki olduğu düşünülür. Sağlıklı kişilerde normal metabolizma esnasında üretilen serbest radikaller organizmadaki antioksidanlar tarafından etkisizleştirilir. Ancak serbest radikallerin aşırı artışı veya antioksidan sistemlerin yetersizliği oksidatif stresle sonuçlanır. Serbest oksijen radikalleri ile temel hücre komponentlerinin oksidatif hasarı, AH'nın oluşumunda rol oynar. Hup A'nın sıçanlarda, hücre kültürlerinde ve kortikal nöronların primer hücre kültürlerinde, hidrojen peroksite ve A $\beta$  indüklü hücre lezyonlarına karşı koruyucu etki gösterdiği, lipid peroksidasyonunu azalttığı ve antioksidant enzim aktivitesini arttırdığı bulunmuştur. (133). Böylece Hup A, hücreleri, staurosporin (protein kinaz c inhibitörü) kaynaklı sitotoksiste ve apoptoza, ve beta-amiloid protein (veya peptid), hidrojen peroksit, glutamat ve iskemiye karşı koruma yeteneğinde olan, hem merkezi ve hem de periferik aktiviteye sahip olduğu söylenen kompetitif, geri dönüşümlü bir asetilkolin esteraz inhibitörüdür (134). Hup A'nın bu etkisi, Alzheimer'dan korunma ya da hastalığın ilerleyişinin yavaşlaması açısından önemlidir.

Hup A'nın, anti-iskemik özellikleri global beyin iskemisi, ön beyin iskemisi ve kronik serebral hipoperfüzyon gibi birçok beyin iskemi modellerinde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (133). Wang ve ark. (2008) tarafından geçici fokal serebral iskemi oluşturulmuş sıçan modelinde yapılan bir diğer çalışmada, Hup A'nın koruyucu etkileri araştırılmış ve bu çalışmada klinik senaryoya daha uygun olarak Hup A ile post-iskemik tedavinin, bölgesel serebral kan akışını büyük ölçüde düzenlediği, hem ipsilateral korteks ve hem de striatumda enfarktüs alanlarının boyutunu azalttığı ve nörolojik hasarı iyileştirdiği bildirilmiştir (133). Bu çalışmada, dikkat edilmesi gereken diğer bir nokta da, klinik senaryoya uygun olarak hasardan 14 gün sonra başlayan Hup A tedavisinin bile nörolojik hasarı iyileştirmesidir (133).

## 2.5. Alzheimer Hastalığına Bağlı Kas Hastalığı (İnklüzyon Cisimcikli Miyozit-ICM) Patolojisi

### 2.5.1. Normal İskelet Kas Morfolojisi

İskelet kasları, konnektif doku (endomizyum) ile ayrılmış kas lifi adını alan çok sayıda hücreden oluşur. Olgunlaşmış kas hücresi olan kas lifi, boyu birkaç santimetreye kadar ulaşabilen, iğ görünümünde ve çok çekirdekli bir yapıdadır. İskelet kası, liflerin birbirine paralel seyrettiği demetler (fasiküller) şeklinde düzenlenir (Şekil 2.10). Endomizyumda kapillerler ve intramüsküler sinir lifleri bulunur. Fasiküller ise birbirinden perimizyum adı verilen bağ dokusu ile ayrılır. Perimizyal alanda, arteriyol ve venüllerle birlikte kas liflerine yönelmiş motor sinir demetleri bulunur.



Şekil 2.10. Tipik bir iskelet kas lifi yapısı.



İskelet kas liflerinin uzunlukları ortalama 3 cm olmakla birlikte 1 mm'den kısa ve 4 cm'den uzun lifler de vardır. Liflerin çapı 10-100 mikrometre arasındadır. Bir kas lifi, hücre içi jelimsi sıvı içine dalmış 1000-2000 dolayındaki 0,5-2 µm kalınlıkta miyofibrillerden oluşur (135). Genişlikleri yaşa, cinsiyete, yaşlı türüne, kas lifinin uzunluğuna, kasın yaptığı işin ağırlığına, bireyin beslenme durumuna göre değişebilir. Kas içinde merkezdeki lifler daha geniş çaplıdır. Liflerin fasikül içindeki yerleşimleri; fasikülün bir ucundan diğer ucuna uzananlar, bir ucundan başlayıp fasikül içinde sonlananlar ve iki ucu da fasikül içinde bulunanlar olmak üzere üç şekildedir. Kas hücre zarı sarkolemma olarak adlandırılır. Diğer hücrelerin zarları gibi yaklaşık 90 °A kalınlığında birim zar yapısındadır. İskelet kas hücresinin sitoplazmasında yani sarkoplazmada organel ve inklüzyonların dışında homojen ve az yoğun bir matriksten oluşur. Matriks, miyogloblin gibi protein yapısında pigmentler ve bir miktar da enzim içerir. Şekli elemanların başlıcaları sarkolemmaya yakın olarak yerleşmiş çok sayıda çekirdek, çok sayıda mitokondri, golgi kompleksi, sarkoplazmik retikulum gibi organeller ile miyofibriller ve glikojen ve lipid damlacıklarıdır. Uzun oval biçimli çekirdekler bir kas lifinde birkaç yüz tanedir ve lifin uzun eksenine paralel olarak sarkolemmanın altında yerleşirler. Çekirdekler lif boyunca oldukça düzenli aralıktadır, tendona bağlanma yerinde daha fazla sayıda ve düzensizdirler (136).

Sarkoplazma içinde uzun, iplik şeklinde, kas lifinin uzunluğuna bulunan miyofibrillerin 1-2 µm çapta olup elektron mikroskopunda yine uzunlamasına düzenlenmiş, ince miyofilamentlerden oluştuğu gözlenir. Büyüklük ve kimyasal yapısı farklı iki tip miyofilament ayırt edilir. Bunlardan biri diğerinden kalın, 10 nm çapta, 1,5 µm uzunlukta olup çoğunluğu miyozinden ibarettir. Daha ince olan filamentler ise 5 nm çapta, 1 µm uzunluktadır. Başlıca aktinden yapılmıştır. Aktin filamentleri aktin, tropomiyozin ve troponin proteinlerinden yapılmıştır. Globuler aktin molekülleri ard arda dizilerek fibriller aktini oluştururlar. İki fibriller aktin bir sarmal oluşturur. Tropomiyozin de aktine uygun sarmallar yapar. Troponin molekülleri ise düzgün aralıklarla (miyozin başına uyacak şekilde) tropomiyozine bağlanırlar.

Kalın miyozin filamentleri, orta kısımda, M çizgisi hizasında daha kalındır, uçlara gidildikçe incelikler. Orta kısımları düzgün olduğu halde uç kısımları, filament eksenine dik olan, kısa çıkıntılar içerir. Bu çıkıntılar miyozin filamentini çevreleyen 6 aktin filamentine doğru uzanırlar. Bu uzantılar miyozin filamentlerini meydana getiren

moleküllerin düzenlenmesine bağlıdır. Her bir molekül bir baş ve bir kuyruk kısmından oluşur. Moleküllerin kuyruk kısımları birbirine paralel olarak uzanır ve öyle düzenlenir ki orta kısım yalnız kuyruktan oluştuğu için çıkıntı içermez, düzdür. Baş kısımları filamentin incelen kısımları boyunca dik olarak yanlara doğru çıkar. Çıkıntılar birbirinden 6-7 nm aralıklarla ve her 6 çıkıntı 45 nm de bir heliks tamamlayacak şekilde düzenlenir. Miyozin filamentlerinin baş kısımlarında, kas kontraksiyonu için gerekli enerjiyi açığa çıkarmak üzere adenozin trifosfatı parçalayan adenozin trifosfataz enzimi bulunur.

I bandını sadece aktin filamentleri oluşturmaktadır. I bandının ortasındaki Z çizgisi ise komşu sarkomerlerdeki aktin filamentlerinin tutundukları yerdir. A bandı miyozin filamentlerinin boyu kadardır. A bandında miyozin filamentler içine her iki taraftan aktin filamentleri sokulur. Aktin filamentleri M çizgisine kadar sokulmadıklarından A bandının ortasında açık renkte gözlenen H bandı oluşur. Yani H bandında sadece miyozin filamentleri vardır. H bandının genişliğini aktin filamentlerinin giriş derecesi belirler. Başka bir deyişle kasın kasılma derecesine bağlıdır. Miyozin filamentlerinin kalın olan orta kısmında bulunan M çizgisinde miyozin filamentleri, miyozin yapısında olmayan köprülerle birbirlerine bağlanırlar. Aktin ve miyozin filamentlerinin düzenlenişini üç boyutlu düşünürsek altıgen prizmalar yapacak biçimdedir. Enine kesitte her kalın miyofilament altı ince miyofilament ile altıgen yapacak şekilde çevrilidir. Üç boyutlu durumda orta eksenini oluşturan miyozin filamentleri çevresinde 6 aktin filamentleri, altıgen prizmanın köşelerini yapacak şekilde düzenlenmiştir. Bunun dışını da yine altıgen prizmanın köşelerini oluşturacak biçimde 6 miyozin filamentleri çevreler. Bu düzenlenmeye çift hegzagonal alan adı verilmiştir. Enine kesitte her aktin filamentinin çevresinde üç miyozin filamentinin bulunduğu gözlenir. Kalın ve ince filamentler arasındaki uzaklık sabit olup 45 nm kadardır ve miyozin moleküllerinin oluşturduğu enine köprücükler tarafından kat edilir.

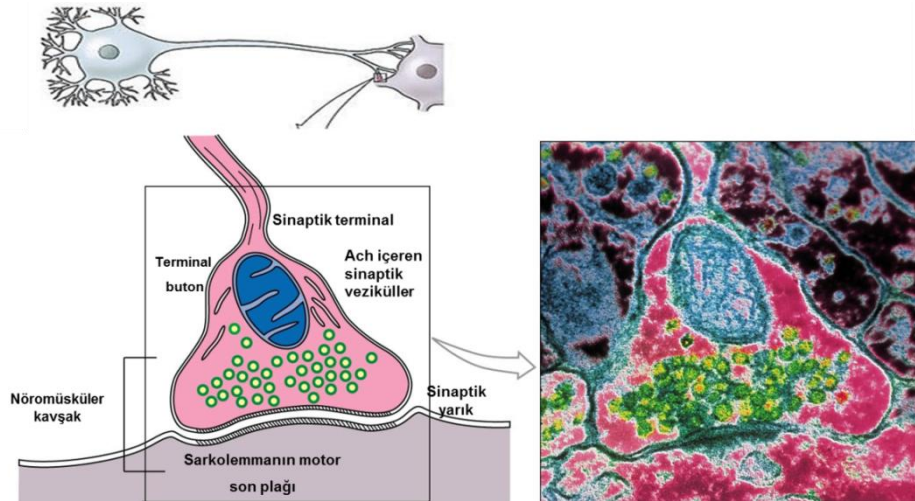
Kasılma sırasında A bandının uzunluğu değişmez. I ve H bandının her ikisinin uzunluğu azalır. Z çizgisi A bandının sonuna yaklaşır. Aktin filamentleri miyozin filamentleri içinde daha derine girerek filamentlerin boyu değişmediği halde I ve H bantlarını, buna bağlı olarak da sarkomerlerin boyunu kısaltmış olurlar. Bu da miyofibrillerin boyunun kısalması demektir. Kasılma sırasında aktin ve miyozin filamentlerinin boyu değişmez; birbiri içinde kayarak sarkomerin boyunu kısaltırlar.

Filamentlerin kayma işlemi, miyozin moleküllerinin baş kısmı ile komşu aktin filamentleri arasındaki bağlantılarının yapılıp bozulmasının tekrarlanmasıyla sağlanır. Miyozinlerin baş kısımları aktin filamentlerine bağlandıktan sonra dik olan açılı M çizgileri tarafında daralır. Böylece aktin filamentleri M çizgisine doğru ilerler. Bağlantılar açıldıktan sonra miyozin tekrar eski durumuna geçer ve sonraki noktada aktinlere bağlanır. Bu iş için gerekli olan enerji sarkoplazmik retikulumundan salınan kalsiyum iyonlarının uyarılmasıyla, köprücüklerdeki adenozin trifosfatın, adenozin trifosfatı parçalamasından açığa çıkar.

T tübüleri, sarkolemanın hücre içine yaptıkları girintilerden oluşur. Miyofibrilleri çevreler ve komşu miyofibrillerde birbirleriyle devam ederler. T tüpçükleri hücre yüzeyinde hücreler arası aralığa açılırlar. Sarkoplazmik retikulum denen granülsüz endoplazmik retikulum çizgili iskelet kasında oldukça modifiye bir şekil gösterir. Bu dokuda çok gelişmiş olan sarkoplazmik retikulum, T tübüleri gibi miyofibrilleri çevreler ve onların etrafında ağ yapan enine ve boyuna seyirli tüpçüklerden oluşur. Miyofibrilin uzun eksenine dik olarak onları enine saran tübüller A ve I bandı birleşkesinde bulunan T tübülerine komşudur; genişçe oldukları için terminal sisterna da denir. T tübüller ve iki yanında bulunan terminal sisternaların oluşturduğu üçlü yapıya iskelet kası triyadı adı verilir. Bir miyofibrilin çevresini saran terminal sisterna T tübüllerinde olduğu gibi komşu miyofibrilinkiyile bağlantılıdır. Boyuna tübüller ise her bantta enine tübüller arasında uzanır ve onlara açılırlar. Boyuna tübüller A bandında H bandı düzeyinde, I bandında daha az olmak üzere Z çizgisi hizasında birbirleri arasında bağlantılar yaparlar. T tübüleri sistemi hücre zarına gelen uyarının lifin dışından miyofibrillere hızlı taşınmasını sağlar ve böylece uyumlu bir cevap elde edilir. T tübüleri terminal sisternalarla sıkıca yan yana oldukları için T tübüllerine gelen uyarı kolayca terminal sisternalara ve boyuna tübüllere geçer. Uyarının sarkoplazmik retikuluma geçmesi, kasılmayı sağlayan elemanların çalışmasını başlatacak olan kalsiyum iyonlarının sarkoplazmik retikulumdan salınmasına sebep olur (136).

Her kas bir veya daha fazla sinir sonlanması ile donanmıştır. Tek bir sinir lifinin sonlandığı kas lifi sayısı motor birim olarak adlandırılır. Motor birim aktivitenin tam kontrolünün gerektiği kaslarda küçük yani her kas lifinde ayrı bir sinir lifi sonlanacak şekilde, kaba aktivite gösteren kaslarda ise büyük, yani bir sinir lifinin birçok kas lifinde sonlanması şeklindedir. Büyük ekstremite kaslarında bir sinir 1500-2000 kas lifinde

sonlanır. Kas lifindeki motor sinir sonlanmalarına motor plak veya kas-sinir bağlantısı denmektedir. Bağlantı kas lifi üzerinde biraz kabarık bir plak gibi görülür. Sinir lifi sonlanmaya yaklaşırken önce miyelin kılıfını kaybeder, kas yüzeyinde Schwann hücreleri kılıfı da kaybolur. Kas hücresinde sinir sonlanmasının yerleştiği girintiye primer sinaps oluşu denir. Sinir uzantısında sinaps oluşuna girmeden ve girdikten sonra dallanmalar görülür. Dallanmaların uçları küremsi küçük kabartılarla sonlanır. Terminal buton denen bu kabartılar primer sinaps oluşunda kendilerine uyan çukurcuklara yerleşmişlerdir. Sinaps oluklarında sarkolemma küçük katlantılar gösterir. Bu bölgede sarkolemma içinde veya çok yakınında asetilkolin esteraz enzimi vardır. Kas lifi çevresindeki eksternal lamina sarkolemma ve aksolemma arasında da devam eder. Sinir sonlanması bölgesinde sarkoplazmada fazla sayıda çekirdek, bol mitokondri, ribozomlar ve granülsüz endoplazmik retikulum vardır. Terminal buton içinde de çok sayıda mitokondri ve asetilkolin içeren veziküller (sinaps vezikülleri) bulunur (137) (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. İskelet kası-sinir kavşağı ve ilgili yapılar (137)

İskelet kası, miyelinsiz sinirlerin kas lifini sarması şeklinde basit duyu sonlanmaları yanında, kas içcikleri (sinir-kas içcikleri) denen yüksek derecede organize duyu siniri sonlanmalarını fazla sayıda içerir. Kas içciği birkaç ince, değişikliğe uğramış çizgili kas lifi ve bunları saran uzunca oval kapsülden ibarettir. İçcik içindeki kas liflerine intrafüzal lifler denir. Bu liflerin orta kısımlarında çizgilenme kaybolur ve büyük olan tipte genişlemiş olan bu bölgede çekirdek kümesi bulunur. Daha fazla sayıda olan ince tip intrafüzal liflerde ise bu bölgede çekirdekler bir dizi oluşturur. Her intrafuzal lifin orta kısmında lifi spiraller şeklinde saran duyu siniri sonlanmaları vardır.

### **2.5.2. Ekstansör Dijitorum Longus (EDL) Kası**

Bacak bölgesi kasları, diz eklemi ile ayak bileği eklemi arasında yer alan kaslardır ve ön bölge, lateral bölge, arka bölge olmak üzere 3 grupta incelenir. Tibialis anterior (TA), ekstansör dijitorum longus (EDL) ve ekstansör hallucis proprius (EHP) kasları bacağın ön kısmında yer alan ekstansör kaslardır. Kütle olarak en büyüğü TA olup, bunu EDL ve EHP izlemektedir (kütlesi 300 g olan bir sıçanda sırasıyla yaklaşık 450, 150 ve 12 mg). Ön grupta yer alan kaslardan M. tibialis anterior kası ayağa ekstansiyon ve inversiyon hareketlerini yaptırır. M.ekstansör digitorum longus kası ayak bileği ekleminden sonra 4 tendona ayrılır ve her bir tendon 2-5.parmaklara kadar uzanır. Bu sayede bu kas 2-5. parmaklara ve ayağa ekstansiyon hareketini yaptırır.

Ekstansör digitorum longus ve ekstansör hallucis longus kasları, tibialis anteriorun altında uzanır. Ekstansör digitorum longus kaval kemiğinin tepesine ve neredeyse boylu boyunca tüm kaval kemiğine (tibia) tutunur. Kasın diğer ucu, dört bağımsız tendonla dört küçük parmağın kemiklerine tutunur. EDL, ayağı dışa döndüren kuvvetin bir kısmını da sağlar. Tüm bacak kasları ayak ve ayak bileğinin motor ve dinamik stabilizatörü olarak çalışır. Bu nedenle bacağın kasları ön, yan, yüzeysel arka ve derin arka kompartmanlar olmak üzere dört kompartmana ayrılır. Bacağın arkasında bulunan kaslar iki kompartmanda bulunur. Yüzeysel arka kompartmanda gastroknemius ve soleus kasları bulunmaktadır. Ayak bileğine doğru bu iki kas birleşerek Aşil tendonunu oluşturur. Aşil tendonu kalkaneal tuberositeye yapışmadan önce hafifçe iç rotasyon yapar. Sonuç olarak arka grup kasları kasıldığı zaman bu tendon topuğun

plantar fleksiyon-supinasyon hareketini sağlar. Aşıl tendonunun kalkaneal tuberositasına yapışma yeri distale doğrudur. Bu nedenle tendonla kemik arasında oluşacak sürtünme kuvvetini azaltmak için bir tendokalkaneal bursaya gereksinim oluşmuştur.

### **2.5.3. İnklüzyon Cisimcikli Miyozit (ICM) ve Alzheimer Hastalığı Etkileşimi**

AH'nın kas hücrelerinde A $\beta$ 'nin etkilerini anlamak önemlidir. Çünkü Alzheimer hastalarında da diğer A $\beta$  ile ilişkili kas hastalıklarında olduğu gibi bazı motor fonksiyon bozuklukları görülür. Alzheimer hastalarındaki A $\beta$ 'nin toksik etkileri sadece sinir sistemini değil, kaslar gibi diğer bazı dokuları da kapsıyor olabilir.

İnklüzyon cisimcikli miyozit (ICM), özellikle 50 yaş üzerindeki insanlarda en fazla görülen idiyopatik inflamatuvar miyopati hastalığıdır (138, 139). Özellikle yaşlı erkeklerde kadınlardan daha fazla görülür (140). Tam olarak nedeni bilinmeyen ve henüz herhangi bir tedavisi olmayan bir hastalıktır (141). ICM'de tipik olarak distal üst ekstremitelerdeki zayıflığa, alt ekstremitelerdeki kas zayıflığı da eşlik eder.

Lenfotik inflamasyonun kas hücrelerinde hasara yol açtığı ancak ICM hastalığında bunun çok az bir etkisi olduğu düşünülmüştür. Bununla birlikte, proteinlerin yanlış katlanmaları, kümeleşmeleri ve anormal birikimlerinin kas liflerinin atrofisi ve vakuolar dejenerasyonunda daha etkin olduğu ve ICM hastalarında bu durumun spesifik olduğu öne sürülmüştür (141). APP'nin ve A $\beta$ 'nin anormal birikimi kas hücrelerinde yaşlanmayla ilişkilidir ve bu nedenle ICM'nin patolojik süreçlerinde anahtar rol oynadığı düşünülmektedir (141, 142). ICM patogenezinde önemli olduğu düşünülen, Alzheimer patolojisiyle de bağlantılı fakat henüz kesinleşmemiş süreçler şöyle özetlenebilir (142, 143):

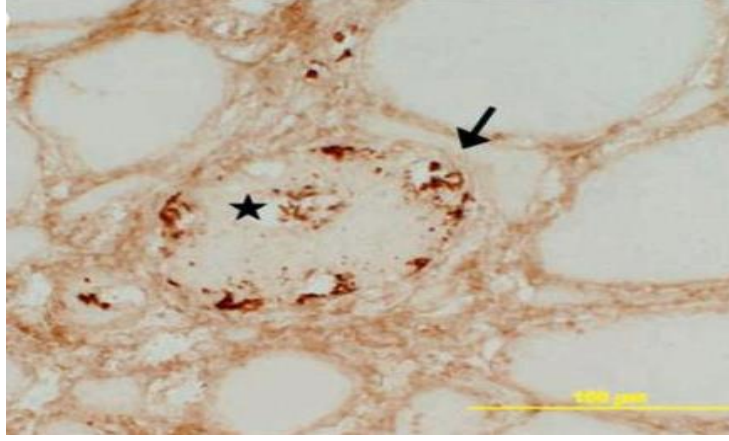
1. APP'nin artmış transkripsiyonu ve birikimiyle buna eşlik eden A $\beta$  birikimi
2. Fosforillenmiş tau ve diğer Alzheimer-ilişkili proteinlerin birikimi
3. Kolesterol ve düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörlerinin, apolipoprotein E'nin birikimi
4. Oksidatif stres
5. Kas çevresinde hücresel yaşlanma

## 6. Yanlış katlanan/katlanmayan proteinlerin anormal birikimi

Kas hastalıklarının tanısında kas enzimlerinden kreatin fosfokinaz (CPK), aldolaz ve laktik dehidrojenazın (LDH) serum düzeyleri kullanılmakla birlikte, pratikte en sık kullanılan kreatin kinaz (CK) düzeyidir. Kas hastalıklarında serum CK düzeyi genellikle yükselir. Bu artış özellikle kas membranı bozuklukları ve kas nekrozu ile giden miyopatilerde çok yüksek değerlere ulaşabilir. ICM, diğer miyozitlerden farklı bir hastalık tablosudur. Patogenezi kesin olarak belirlenmemiştir. Orta yaşlı erkeklerde, sinsi başlangıçlı ve ilerleyici proksimal ve distal kas güçsüzlüğü mevcuttur. CPK seviyesi normal veya hafif yükselmiştir. Kortikosteroid ve immünosupressif ilaçlara cevabı çok zayıftır. Kreatin kinaz, ICM'de normal veya hafif yüksek olabilir (139).

Hücre içinde çok sayıda protein inklüzyonlarının anormal bir şekilde birikmesi, ICM fenotipinin karakteristik bir özelliğidir ve inklüzyon cisimciği oluşumuyla birlikte protein katlanmasındaki bozuklukların (katlanmama ve/veya yanlış katlanma) birlikte rol oynadığı bir “konformasyonel hastalık” olarak da düşünülebilir (144). Katlanmayan proteinlerin hücre içinde anormal bir şekilde birikmesi, inklüzyon cisimciği yapısının oluşumuna neden olabilir.

ICM hastalarının iskelet kaslarında çok sayıda protein birikir. Bu proteinlerin birçoğu, diğer kas hastalıkları ya da nörodejeneratif hastalıklarda birikim ve/veya anomali gösterme eğilimleri olan proteinler arasından ICM'de çalışılmak üzere seçilmiştir. Bunların büyük bir kısmı da ICM biyo-belirteçleri olarak belirlenmiştir (145) (Şekil 2.12). APP'nin A $\beta$  fragmentinin özellikle de A $\beta$ 1-42 peptidinin beyinde birikmesi, AH'nın amiloid hipotezi olarak çok iyi belirlenmiş bir özelliktir. A $\beta$ , AH'nın hücre dışında oluşan plak yapısının başlıca bileşenidir. AH hafıza kaybı ile ilişkili bir hastalık olmakla birlikte, sıklıkla da müsküler fonksiyon kaybı gibi non-kognitif semptomlarla da ilişkilidir (12). Bu motor bozukluklarına sahip olan hastaların büyük çoğunluğu doğrudan AH'nın kendisiyle ilişkili olabilir. Patolojisi büyük oranda belirlenmemiş olmakla birlikte, A $\beta$  peptidinin hem beyin hem de periferde anahtar role sahip olduğu düşünülür.



**Şekil 2.12.** Kas hücrelerinde biriken ICM biyo-belirteci olarak Aβ1-40 spesifik antikoruyla immün boyama (ölçek 100μm) (145)

Alzheimer oluşturulan transgenik farelerde, standart elektrofizyolojik teknikler kullanılarak, iskelet kas liflerindeki elektrogenezde bozukluklar olduğu gösterilmiştir (12). Bu değişikliklerin kas hücre membranlarındaki iyon pompalarının aktivitelerinin bozulmasıyla ilişkisi olduğu düşünülmektedir. Aβ peptidinin nöron hücreleri üzerindeki toksik etkisi kesin olarak bilinmekle birlikte diğer hücre tipleri, örneğin iskelet kas lifleri üzerine etkileri çok fazla çalışılmamıştır. Yapılan az sayıda çalışmada ise, Aβ'nın iskelet kas liflerinin dinlenme membran potansiyel oluşumunu bozduğu ve bunu 2 mekanizma aracılığı ile depolarizasyona yol açarak yaptığı gösterilmiştir (14).

- 1- Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPaz inhibisyonu
- 2- Amiloid kanalların oluşması nedeniyle membranın katyonik iyonlara geçirgenliğinin artması

Bazı ICM hastalarının iskelet kas hücrelerinde APP'nin Aβ fragmentinin immünoaktivitesi olduğu ve kongofilik amiloid birikimleri gösterilmiştir (146). APP proteininin tamamına değil fakat Aβ peptidinin C-terminaline bağlanan antikorlar kullanılarak ICM hastalarının kas hücrelerinin sitoplazmasında Aβ agregatları olduğu belirlenmiştir (147).

Fosforillenmiş nörofilamentlerin ağır zincirlerini tanımlamak için kullanılan bir antikor olan SMI-31 ve SMI-310 kullanılarak ICM hastalarının kas hücrelerinde



fosforillenmiş tau proteininin varlığı da belirlenmiştir. Bütün bu bulgular AH ve ICM'nin aynı etiyojolojiyi paylaştığını düşündürmektedir. AH'na eşlik eden ICM'si bulunan vakalar olduğu bildirilmiştir (148, 149). Bu vakalarda hastanın hem kas biyopsisinde hem de beyin dokusunda A $\beta$  birikimi ve fosforillenmiş tau proteininin varlığı gösterilmiştir.

ICM hastalığı, quadriseps femoris ve elin uzun fleksör kaslarını öncelikle tutar. Bu nedenle önkol medial yüzünde ve quadriseps kasında atrofi, elleri sıkma güçlüğü ve "dizlerde çözülme" hissi ile sık düşmelere ve bunun yaratacağı komplikasyonlara yol açar. Hastalar ortalama 10 yılda tekerlekli iskemleye bağlanır. Elektromiyografide (EMG) miyopatik potansiyeller dışında nörojen tutulum bulgularının da olması bu ayırıcı tanı sorununu daha da artırır. Ancak dikkat edildiğinde ICM hastalarının EMG'sinde nöropatik potansiyeller arasında miyopatik potansiyeller de görülür. Elektron mikroskopik olarak bazı liflerde tubulofilamentöz inklüzyonlar görülür. AH'nda, gerek bu inklüzyonlar, gerekse hücre sitoplazmasında biriken birçok protein ve A $\beta$ 'nin da birikmiş olduğu görülür. Olayın başlamasına sodyum kanallarında inaktivasyon bozukluğu olan mutant kanallar sebep olur, ancak olay sağlam olan sodyum kanallarına bağlı olarak gelişir. Bozuk kanallardaki inaktivasyon bozukluğu depolarizasyonun uzamasına neden olmaktadır. Hafif düzeyde bir depolarizasyon uzaması söz konusu ise o sırada inaktivasyondan çıkmış olan ve istirahat halinde olan sağlam sodyum kanalları bu süregelen depolarizasyonun etkisiyle yeniden aktif hale gelir. Bu durumda klinik olarak miyotoni görülür. Bozuk kanalların inaktive olamaması membranda ağır bir depolarizasyon oluşturursa sağlam kanalların inaktivasyondan istirahat haline geçebilmeleri için gereken membran potansiyeli yaratılamamış olur ve sağlam kanallar da inaktivasyondan çıkamaz. Bu durumda hücre uyarılamaz ve klinik olarak güçsüzlük görülür.

## **2.6. Alzheimer Hastalığında Hayvan Modelleri**

Son yıllarda AH'nın kökten tedavisine yönelik daha özgün ilaçlar geliştirmek, hastalığın fizyopatolojisi ile ilişkili genlerin daha kapsamlı araştırılması ve AH

esnasında ortaya çıkan davranışsal değişiklikler ile beyindeki nörokimyasal veya nöropatolojik değişiklikler arasındaki ilişkiyi daha yakından incelemek amacıyla hastalığın bazı nörolojik, genetik ve biyokimyasal özelliklerini taklit eden hayvan modelleri üzerinde çok fazla durulmuştur.

Buna yönelik olarak geliştirilen hayvan modellerinde başlıca 3 noktaya odaklanılmıştır (150):

- 1) Beynin korteks, hipokampus ve ön beyin bazal nükleus bölgesi gibi bölgelerinde stereotaksik cerrahi yöntemlerle lezyon oluşturmak
- 2) Nörotoksik ajanlarla Alzheimer hastalarındakine benzer nitelikte nöron harabiyeti oluşturmak
- 3) AH'nda yer alan genlerin transfer edildiği transgenik modeller elde edilerek hastalığı taklit etmek

Bu esaslara dayanılarak AH için kullanılan hayvan modelleri;

- 1) Kolinergik fonksiyon bozukluğu esasına dayanan modeller
- 2) Amiloid  $\beta$ -Peptid (A $\beta$ ) ile ilişkili transgenik olmayan modeller
- 3) Amiloid  $\beta$ -Peptid (A $\beta$ ) ile ilişkili transgenik modeller
- 4) Nörofibriler yumaklarla ilişkili modeller
- 5) Presenilin ile ilişkili modeller olarak gruplandırılabilir.

Ailesel Alzheimer'da rol oynadığı belirlenen 3 genin (PSEN-1, PSEN-2, APOE) mutasyonlarını içeren genlerin sıçanlara transfeksiyonu ile oluşturulan transgenik sıçan modelleri yaygın olarak kullanılmaktadır (151). Transgenik hayvanlar kendi genomunda başka bir organizmaya ait rekombinant bir geni taşıyan hayvanlardır. Aktarılan rekombinant genin (transgenin) ekspresyonu, promotor gibi gen ekspresyonunu kontrol edici dizilerin yardımıyla transgenik hayvanın belirli dokularına yönlendirilmesi ile olur. Transgenik hayvan üretiminde çeşitli teknikler geliştirilmiş olmasına rağmen pratikte en yaygın kullanılanı tek hücreli embriyonun (zigot) bir pronukleusuna rekombinant DNA'nın doğrudan mikroenjeksiyon ile verilmesi en etkili yol olarak bilinmektedir. Embriyo transferi sonrası doğan yavrular 21 günlük yaşa eriştikleri zaman kuyruk dokularından 1'er cm kesilerek alınır ve bunlardan genomik DNA izolasyonları yapılır. Bu DNA'larda aktarılan transgenin varlığı için Shouthern blot, Slot blot veya PCR gibi moleküler teknikler kullanılır. Transgenin varlığı tespit edilen yavruya founder (anaç) ismi verilir ve F0 olarak değerlendirilir. Ancak doğan her anaç

rodentden ayrı ayrı üretim hatları oluşturulur. Çünkü her anacın (F0) taşıdığı transgen kromozomların farklı yerlerinde olabilir. Her F0 anaç rodent normal rodentler ile çiftleştirilir ve bunlardan elde edilen F1 rodentler kendi aralarında çiftleştirilir. Bunlardan (%25 homozigot, %75 hemizigot ve %25 boş) elde edilecek erkek ve dişi homozigot rodentler kendi aralarında çiftleştirilerek hattın devamlılığı sağlanır.

Transgenik rodentlerde farklı hastalık modelleri oluşturulmuştur. Bunların başında Alzheimer gelmektedir. AH'na benzer belirgin bir nöropatoloji sergileyen transgenik model ilk olarak rodentlerde yaratılmıştır. Bu modelde kalıtsal AH ile ilişkili kromozom 21'deki amiloid prekürsör protein (APP) V717F mutasyonu şifreleyen bir insan APP mini geni taşıyan rodentler (PDAPP rodentler) oluşturulmuştur (152). Aβ tabakalarının oluşumunda APOE geninin rolünü incelemek için APOE geni ortadan kaldırılmış (APOE knockout) fareler oluşturulmuştur. APOE geni yokluğunda Aβ tabakaları anlamlı ölçüde azalırken, APP ekspresyonu veya Aβ oluşumu değişmemiştir (153).

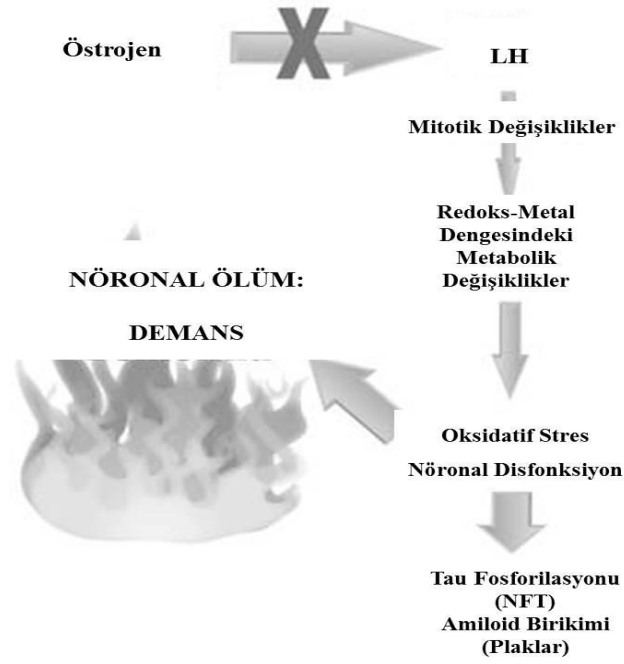
Tg2576 fareler çift mutasyon geçirmiş insan APP695 ekspresyonu yapılmış bir transgenik Alzheimer modelidir (154). Tg2576 transgenik fareler su labirent testinde uzaysal öğrenmede bozulma ve Y labirent testinde başarısızlık sergilerler. Bu belirtilerin yanı sıra Tg2576 farelerin beyinlerinde amiloid plaklar da gözlenmiştir. Tg2576'da olduğu gibi APP proteininin geninde çifte mutasyon oluşturulan İsveç kökenli diğer bir transgenik model APP23'dür. Bu fareler normal APP içeren farelerden 7 kat daha fazla APP protein ekspresyonu yaparlar. Amiloid plaklar erken dönemde (6 ayda) özellikle kortekste gelişirler. Tg2576'dan farklı olarak bu sıçan modelinde, hipokampustaki CA1 primidial nöronlarda %14 kayıp görülür. Neokortekse nöronal kayıp yoktur. Nörofibriler yumak oluşumu yoktur. Yaşla doğru orantılı bilişsel kayıplar vardır.

Her iki model de Alzheimer patolojisinde önemli yeri olan amiloid plakları yoğun olarak göstermesine rağmen, Tg2576'da nöronal kayıp olmaması (152) ve de APP23'ü temin etmekteki zorluklar bu iki transgenik modelle ilgili handikaplar olarak karşımıza çıkmaktadır. Genel anlamda tüm transgenik Alzheimer modellerinin temini yurt dışından sağlanma zorunlulukları nedeniyle kısıtlıdır.

AH'nın patolojik gelişimiyle ilişkisi olduğu bilinen oksidatif stres ve östrojen kaybını temel alarak geliştirilen hayvan modellerinden birisi de, overektomi yapılarak

östrojen metabolizması zarar görmüş hayvanlara D-galaktoz uygulaması yapılmasıdır (155). Uzun süreli D-galaktoz uygulamasının metabolik anomalilere yol açtığı, reaktif oksijen türevi (ROS) üretimini arttırdığı ve nöronal hasara yol açtığı bilinmektedir (155, 156). Bu iki uygulamanın birlikte yapıldığı hayvanlarda, 6 haftanın sonunda ileri derecede bilişsel fonksiyonlarda ve hafızada kayıplar, ön beyinde nöronal hasar, hipokampusta sinaptik dejenerasyon ve A $\beta$  oluşumu histolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle gösterilmiştir (157, 158).

AH'nın insidansı ve prevalansının kadınlarda daha yüksek olması, östrojenin bu hastalıktaki etkisi üzerinde yapılan çalışmaların önünü açmıştır. Östrojen üretimi, hipotalamusun kontrolünde gerçekleşir. Hipotalamustan gonadotropin salgılatıcı hormon (GRH) salınımı indüklenir. GRH da hipotalamusun pituiter bezlerinden lüteinleştirici hormon (LH) ve folikül stimüle edici hormon (FSH) salınımını sağlar. LH ve FSH hormonları erkek ve kadında üreme sistemini etkileyerek östrojen ve testosteron yapımını, cinsel farklılaşmayı, yumurta ve sperm yapımını sağlar. Menapozun ardından ise hipotalamusun pituiter bezleri üzerindeki östrojen ve testosteronun negatif feedback etkisinin kaybı nedeniyle LH ve FSH sirkülasyonu artar. FSH'nin sentezini sağladığı inhibin hormonu azalır, FSH inhibisyonu yetersiz kalır, FSH artar. Olay ilerledikçe FSH'nin yanısıra başlangıçta normal olan LH seviyelerinde de artış başlar. Follikül gelişimi tamamen durur ve menopoz ortaya çıkar. Östrojen eksikliğinin ve menopozun, bu hastalığın meydana gelişindeki rolü tartışmalıdır. Öne sürülen olaylar dizisine göre, lüteinleştirici hormon, LH reseptörlerini taşıyan nöronlarda mitotik olayları başlatarak, metabolik ve oksidatif değişiklikler gibi çeşitli hücrel değişikliklere yol açar. Bu değişikliklerin hepsi birlikte meydana geldiğinde, nörofibriler yumaklar, amiloid plaklar ve nöron ölümü gibi Alzheimer patolojileri ve nihayetinde de demansa yol açar (159) (Şekil 2.13).



**Şekil 2.13.** Östrojen eksikliği ve Alzheimer ilişkisiyle ilgili öne sürülen olaylar dizisi (159).

## 2.7. Sıçanların Bilişsel ve Lokomotor Yetilerinin Değerlendirilmesi

Sıçanların bilişsel ve lokomotor yetilerinin değerlendirilmesinde bugüne dek tanımlanmış çok sayıda hayvan davranış deney (HDD) modeli mevcuttur. HDD'ler ile sıçanlarda anksiyete, otonom fonksiyonlar, öğrenme, hafıza ve lokomotor aktivite gibi birçok yetinin değerlendirilmesi yapılmaktadır. Bilimsel yeterlilik ölçütlerinin tümüne aynı anda sahip olan bir HDD modeli yoktur ve bu modellerin çoğu %100 kesinlikte sonuç sağlayamamaktadır. Bilim ve teknolojiye ilerlemelerle hayvan davranış deneyi modelleri giderek istenen ideal düzeye ulaşabilecektir (160).

Davranış deneylerinin sıçanların nöromotor gelişiminin tamamlandığı 80-85. günlerden sonra yapılması önerilmektedir (161). Sıçanların doğumu takiben kaç haftalık olduğu belirtilen ya da belirtilmeyen pek çok çalışmada, deneylerin ortalama 180-400 g ağırlığındaki erişkin erkek sıçanlarla yapıldığı bildirilmiştir (162, 163, 164). Tüm HDD'lerin  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  sıcaklığında, 12 saatlik gece-gündüz döngüsünün sağlandığı bir odada ses, ışık, sıcaklık ve bekleme koşullarının standardize edildiği ortamlarda

yapılması önerilmektedir. Bu standardizasyonun sağlanabilmesi için tüm hayvan gruplarının deney alanına deney gününden birkaç gün önce getirilmesi ve ortama alıştırılması gerekliliği bildirilmiştir (160).

Çalışmaya alınacak sıçanların daha önceden yavrulayan ve önceki yavrulara bakmış olan bir anneden alınmaları önemlidir. Aksi durumda çalışmaya alınan sıçanların anne tarafından bakılmama ve ölme riski olabilir. Tüm sıçanlar aynı sürede annelerinden ayrılmalı, benzer şekilde beslenmeli ve benzer sayıda sıçan aynı kafese konmalıdır. Böylece nöromotor gelişimlerini etkileyebilecek diğer faktörler mümkün olduğunca azaltılmalıdır (160). Davranış deneyi modelini uygulayan araştırmacının da her grup için aynı kişi olması, aynı renk giysi giymesi, aynı parfümü kullanması, her zaman aynı yerde durması gibi faktörlere de dikkat edilmelidir (160).

Bu deneylerde sıçanların cinsiyetlerine göre farklı davranışlar sergilediği tespit edilmiştir (165). Özellikle uzaysal öğrenmenin değerlendirilmesinde erkek cinsiyetin daha uygun olduğu saptanmıştır (166, 167). Bu durumun hormonal farklılık ve hipokampus gelişimindeki farktan kaynaklandığı ileri sürülmüştür (166). Bu nedenle yapılan pek çok çalışmada erkek sıçan kullanılmıştır (162, 163, 168).

İdeal AH'nın geliştirilmesi, AH'nın patogenezlerine ve bu yıkıcı nörodejeneratif hastalıkların önlenmesi ve tedavisi için mevcut stratejileri keşfetmek için hayati önem taşımaktadır (169). AH'nın patogenezi tam olarak belirlenememiş olmasına rağmen, endokrin seviyesindeki anormallikler, özellikle östrojen yoksunluğu ve AH'nın patolojik gelişimi arasındaki yakın ilişki, birkaç yıldır kapsamlı bir araştırma konusu olmuştur (170). Temel araştırma yapılan çalışmalardan elde edilen kanıtlar da geniş hücrel metabolik ve nörotransmitter seviyelerinin yanı sıra kognitif ve hafıza davranış açısından da beyin üzerinde östrojenin nöro-koruyucu etkileri gösterilmiştir (171, 172, 173). Örneğin dişi Sprague-Dawley sıçanlarının overektomi yapılmasını takiben uzun dönem östrojen yoksunluğu kaynaklı bazal ön beyinlerinde kolinerjik nöron kaybı ile ilgili olarak bir geri öğrenme ve bellek bozukluğu ile sonuçlanmıştır (171, 173).

Östrojen yoksunluğu ve oksidatif stresin, AH'nın gelişmesi ve ilerlemesi ile ilgili hızlandırıcı sinerjistik etkilere sahip olduğu kanıtlanmıştır. AH'nda görülen patolojik nörokimyasal ve davranışsal değişiklikler overektomi yapılmış sıçanlara intraperitoneal (i.p.) olarak uzun dönem D-galaktoz uygulanması sonucunda oluşturulmuş ve böylece AH'nı taklit eden ideal bir kemirgen model elde edilmiştir

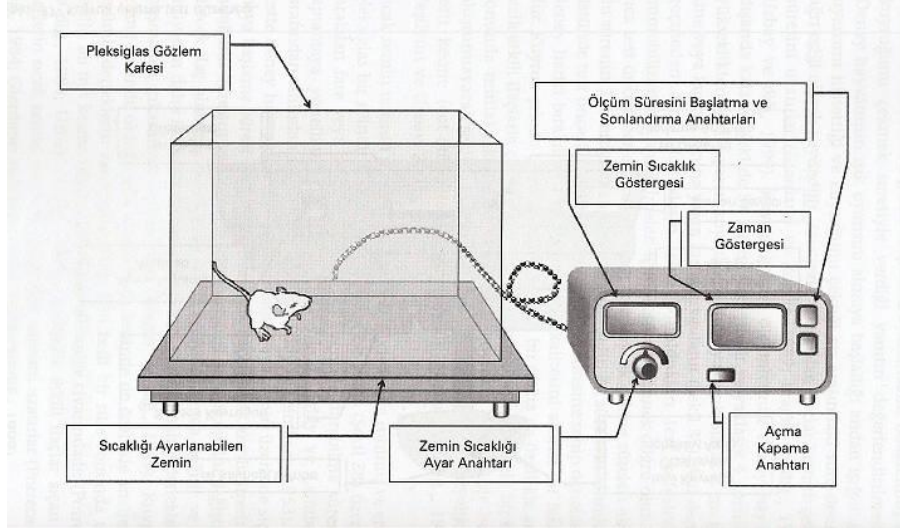
(157). Bu nedenle yaptığımız araştırmada Alzheimer modeli olarak alınan overektomi sonrası uzun dönem D-galaktoz uygulaması yapılmış dişi Sprague-Dawley sıçanları kullanılmıştır.

Sıçanlarda bilişsel ve motor yetilerin değerlendirilmesi amacıyla pek çok farklı düzenek kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları rotarot düzeneği, sekiz kollu ışınsal labirent, T labirent, yükseltilmiş artı labirent, açık alan ve Morris su tankıdır. Sıçanların duygusal durumunu, sedasyonunu, lokomotor aktivitesini ölçmede açık alanın kullanılması ve çalışmanın doğumu takiben 10. haftada yapılması önerilmektedir (174, 175). Morris su tankı Prof. Richard Morris tarafından tanımlandığından bu yana kemirgenlerin öğrenme ve hafıza çalışmalarında sıkça kullanılmaktadır.

Bu çalışmada açık alan ve morris su tankı deneyleri gerçekleştirilmiştir.

## **2.8. Sıçanların Ağrıya Yanıtların Değerlendirilmesi-Sıcak Plaka (Hot Plate) Testi**

İlk olarak 1953 yılında Eddy ve Leimback tarafından tanımlanmış ve kullanıma girmiştir (176). Hot plate testi rodentlerin ağrı eşiğinin değerlendirilmesinde halen en çok kullanılan yöntemlerdendir. Temel olarak 50-56°C'ye kadar ısıtılmış bir bakır veya alüminyum yüzeyden oluşur. Hayvanın ısıtılan yüzey üzerinde belli bir bölge sınırlarında kalması için hareket kabiliyetini sınırlamayacak büyüklükte cam veya pleksiglas silindirler kullanılır. Yüzeye bırakılmasından hayvanın arka ayağını çekmesine kadar olan süre hesap edilir. Literatürde en çok kullanılan yöntemlerden biri olmasına rağmen hayvanın ağrıyı algıladığı gözlemlene kriteri çeşitlilik gösterir, hangi davranışın ağrı belirtisi olarak kabul edileceği konusunda sorunlar vardır ve zor bir deney metodudur. Davranış sadece arka ayağın çekilmesi olabileceği gibi ayak çekme ve yalama, sallama veya sıçrama şeklinde olabilir. Nadiren hayvan sadece ön ayaklarını yalayabilir veya ön ayaklarla başlayan reaksiyon arka ayağın yalanmasıyla sonlanabilir. Bir farenin normal reaksiyon süresi ortalama 5 ile 20 saniye arasında değişir. Doku hasarına neden olacağı için test 30 s'den fazla uygulanmamalıdır (177).



**Şekil 2.14.** Sıcak plaka (Hot plate) cihazı test düzeneği (178)



### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. Deneysel Hayvanlarının Sağlanması

Ankara Kobay Deneysel Hayvanları Laboratuvar Merkezinden sağlanan 68 adet 13 haftalık dişi Sprague–Dawley sıçanlar (250-300 g) ile çalışma grupları oluşturulmuştur. Çalışmaya başlamadan önce Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu onayı (2012/HADYEK/24) alınmıştır. Bu sıçanlar sirkadyen ritme uygun olarak 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık döngüsünde, uygun nem ve sıcaklık (22-25 °C) koşullarının kontrol altında tutulduğu bir ortamda muhafaza edilmiştir. Ortam koşullarına uyum sağlamaları için 1 hafta bekletilmişlerdir. Mevsimsel koşullarda, her kafeste 6 adet olacak biçimde plastikten yapılmış kafeslerde (20x35x45 cm boyutlarında) tutulmuşlardır. İçme suyu yukarıdan sarkıtılan, ucunda pipet bulunan cam şişelerde istenildiğinde ulaşılabilecek biçimde verilmiş, hazır palet yem kullanılmış ve haftada 2 gün sıçanların kafesleri temizlenmiştir. Çalışmanın başlangıcında, bitiminde ve her hafta olacak şekilde sıçan kütleleri kaydedilmiştir.

#### 3.2. Ön Çalışma

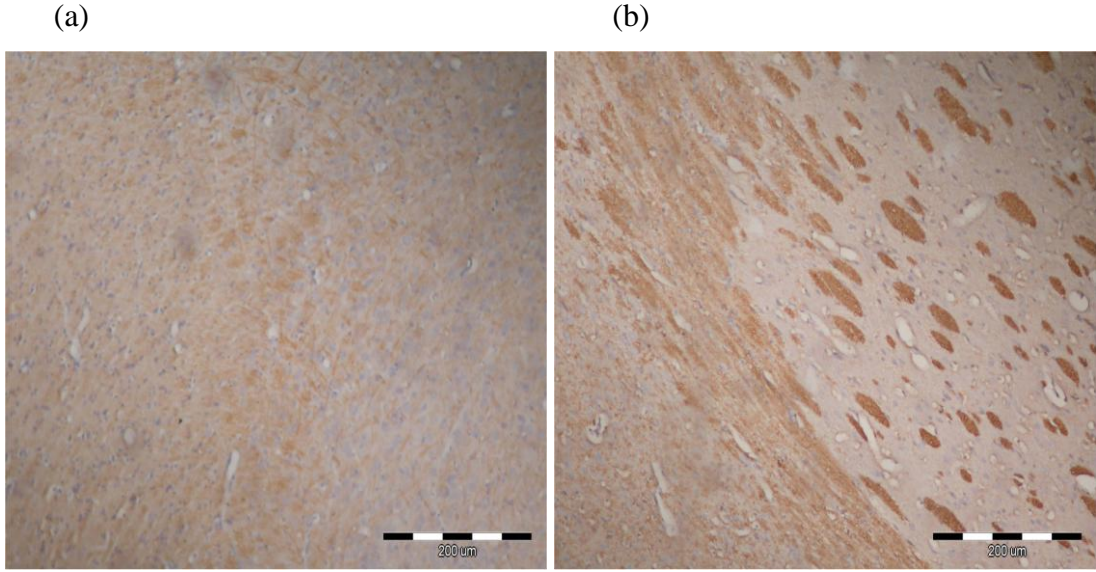
Ön çalışmanın amacı, öncelikle AH'nın patolojik bulgularını beyin dokusunda histolojik yöntemlerle belirlemektir. Sonrasında, AH'nın ilerleyişine paralel olarak, beyinde oluşan A $\beta$  plakların hücre dışında yayılıp yayılmadığını da belirleyerek ilerlemiş Alzheimer patolojisinin ICM kas hastalığını da tetikleyebileceğini gösterebilmek için, bu araştırmaya ayrılan süre içerisinde en uygun ve etkili enjeksiyon zamanını belirlemektir. Bu doğrultuda istediğimiz olguların oluşumu için bilateral overektominin ardından yapılan D-galaktoz enjeksiyonunun zaman aralığını belirleyebilmek için ön çalışma yapıldı.

Mersin Üniversitesi Deneysel Hayvanları Araştırma Laboratuvar'ından sağlanan 2 adet 13 haftalık dişi Sprague–Dawley sıçanlar sirkadyen ritme uygun olarak 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık döngüsünde, uygun nem ve sıcaklık (22-25 °C) koşullarının kontrol altında tutulduğu bir ortamda muhafaza edildi. Ortam koşullarına uyum

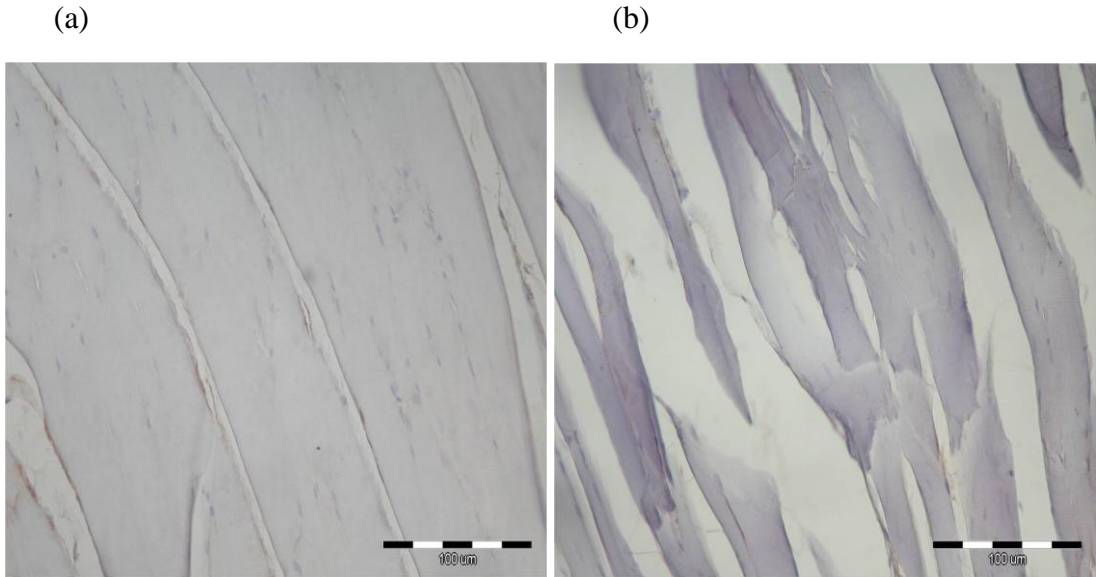
sağlamaları için 1 hafta bekletildiler. İçme suyu yukarıdan sarkıtılan, ucunda pipet bulunan cam şişelerde istenildiğinde ulaşılabilecek biçimde verildi, hazır palet yem kullanıldı ve haftada 2 gün sıçanların kafesleri temizlendi.

Alzheimer hastalık bulgularını oluşturmak için seçilen modelin birinci aşaması, sıçanlara ketamine HCl (Ketalar) 80 mg/kg ve xylazine HCl (Rompun) 10 mg/kg intraperitonel (i.p.) yolla uygulanarak anestezinin sağlanmasını takiben aşağıda cerrahi prosedür kısmında belirtildiği gibi bilateral overektomi yapıldı. Bir hafta iyileşme sürecinin ardından sıçanların birine 8 hafta diğerine 10 hafta her gün, serum fizyolojik (SF) solüsyonu içinde çözdürülen, 100 mg/kg dozda D-galaktoz i.p. yolla uygulandı. 8. haftayı tamamlayan sıçana ketamine HCl (Ketalar) 80 mg/kg ve xylazine HCl (Rompun) 10 mg/kg i.p. yolla uygulanarak anestezi sağlandıktan sonra vasküler perfüzyonla tespit işlemini takiben kas ve beyin dokusundan biyopsi alındı. Alınan dokular aynı tesbit solüsyonunda bekletildi. İmmünohistokimyasal işaretleme ile A $\beta$  plakların oluşumunu belirlemek için ışık mikroskopik doku takibi ve immünohistokimyasal işaretleme protokolü aşağıda belirtilmiş olduğu şekilde gerçekleştirildi. Aynı işlem sırası 10. haftayı tamamlayan sıçan için de uygulandı. Uygulamalar sonucunda 8. ve 10 haftasını tamamlayan sıçanların frontal korteksinde görülen A $\beta$  plakların yoğunluğuna bakılarak sırasıyla; Alzheimer patolojisinin başlangıç evresinde ve Alzheimer patolojisinin ilerlemiş evrede olduğu sonucuna ulaşıldı.

Her iki sıçanın EDL kas dokusuna da aynı sırayla işlemler uygulanıp ışık mikroskopunda incelendiğinde, beyinde (şekil 3.1) gözlenen patolojik bulgular kasta (Şekil 3.2) görülmedi.



**Şekil 3.1.** (a) 8 hafta ve (b) 10 hafta boyunca D-galaktoz enjeksiyonu yapılan sıçan frontal korteksinde immünohistokimyasal işaretleme ile elde edilen A $\beta$  peptitlerin ekspresyon düzeylerinin ışık mikroskopundaki görüntüleri (büyütme gücü: x40 )



**Şekil 3.2.** (a) 8 hafta ve (b)10 hafta boyunca D-galaktoz enjeksiyonu yapılan sıçan EDL kas dokusunda immünohistokimyasal işaretleme ile ışık mikroskopundaki görüntüleri (büyütme gücü: x40) Her iki uygulama sonucunda da A $\beta$  peptitlerin oluşmadığı görülmektedir.

### 3.3. Çalışma Gruplarının ve Alzheimer Hayvan Modelinin Oluşturulması

Çalışmaya alınan 68 adet 13 haftalık dişi Sprague–Dawley sıçanlar (250-300 g) rastlantısal olarak beş gruba ayrıldı (Çizelge 3.1).

K: Kontrol (n=12)

SH: Sham (n=14)

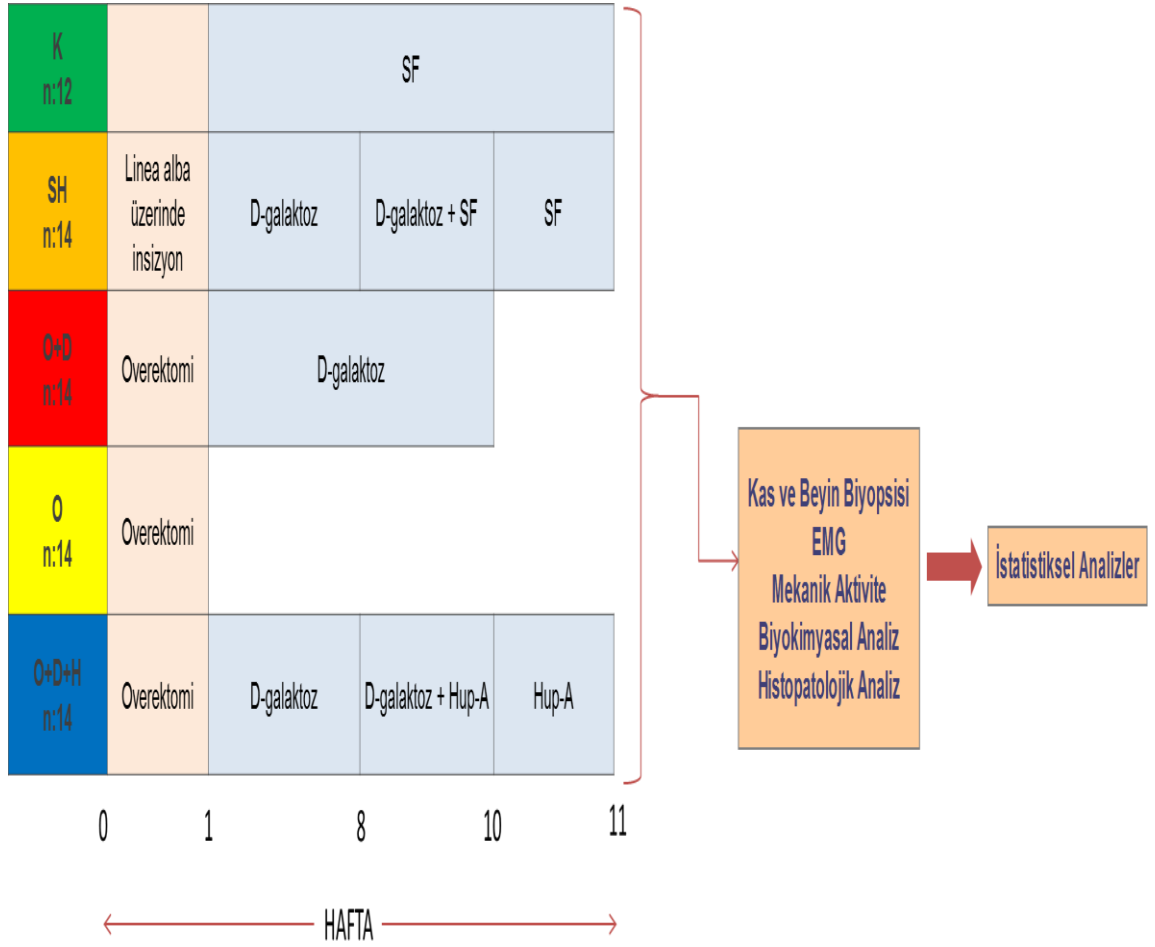
O+D: Overektomi + D-galaktoz (n=14)

O: Overektomi (n=14)

O+D+H: Overektomi + D-galaktoz + Hup A (n=14)

Sıçanlar Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvar'ında bir hafta ortama uyum sağladıktan sonra kütleleri tartıldı. Aynı gün içerisinde O+D; Overektomi + D-galaktoz, O+D+H; Overektomi + D-galaktoz + Hup A ve O; Overektomi gruplarındaki sıçanlara ketamine HCl (Ketalar) 80 mg/kg ve xylazine HCL (Rompun) 10 mg/kg i.p. yolla uygulanarak anestezisinin sağlanmasını takiben bilateral overektomi yapıldı. Bir hafta iyileşme sürecinin ardından kütle tartımı gerçekleştirildi. Alzheimer patolojisinin gerçekleşip gerçekleşmediğinin kontrolü açısından, deneylere başlamadan önce yapılan ön çalışmaya dayanarak, O+D ve O+D+H gruplarındaki sıçanlarda Alzheimer hayvan modelini oluşturabilmek için overektominin ardından 10 hafta boyunca her gün 100 mg/kg dozda D-galaktoz i.p. yolla uygulandı. 10 haftalık D-galaktoz uygulamasının 8. haftasında ön çalışmamızda görüldüğü üzere frontal korteks dokusundaki amiloid plakların varlığı patoloji başlangıcı olarak ele alındı. Ön çalışmamızın 10. haftasında elde ettiğimiz ilerlemiş patolojik bulguyu hedeflemek amacı ile 8. haftadan itibaren O+D grubu sıçanlarına i.p. yolla D-galaktoz uygulaması, 10. haftaya tamamlamak koşulu ile devam edilirken, O+D+H tedavi grubunda ise 10. haftaya kadar uygulanan D-galaktozla birlikte SF solüsyonu içinde çözdürülen 0,1 mg/kg'lık dozda Hup A uygulanıp, ek olarak 11. haftaya kadar devam edildi. O grubundaki sıçanlara sadece bilateral overektomi yapıldı. SH grubundaki sıçanlara 0,5-1,0 cm'lik bir insizyon açılarak, overektomi yapılmayıp emilemeyen iplikle dikildi. SH grubundaki sıçanların iyileşmesini takiben, O+D ve O+D+H ile aynı süreyle 10 hafta boyunca her gün 100 mg/kg dozda D-galaktoz i.p. yolla uygulanmış olup, HupA yerine de 5 ml SF uygulaması yapıldı. K grubuna da 11 hafta boyunca, 5 ml SF enjeksiyonu yapılan sağlıklı sıçanlardan oluşturuldu (157).

**Çizelge 3.1.** Deney şeması: Kontrol ve deney grupları. K: Kontrol; SH: Sham; O+D: Overektomi + D-galaktoz; O: Overektomi; O+D+H: Overektomi + D-galaktoz + Hup A.



Grup O+D ve O+D+H'da yer alan tüm sıçanlarda AH oluşturmak için seçilen modelleme protokolü yerine getirildikten sonra, nörodejeneratif patolojinin etkilerini saptamak için, çalışmada yer alan tüm sıçanların,

1. Açık alan deneyi ile lokomotor aktivitesine,
2. Morris su tankı deneyi ile spasyal bellek performansına,
3. Hot plate deneyi ile ağrı eşğine olan etkisine bakıldı.

Buna ek olarak bu çalışmada;

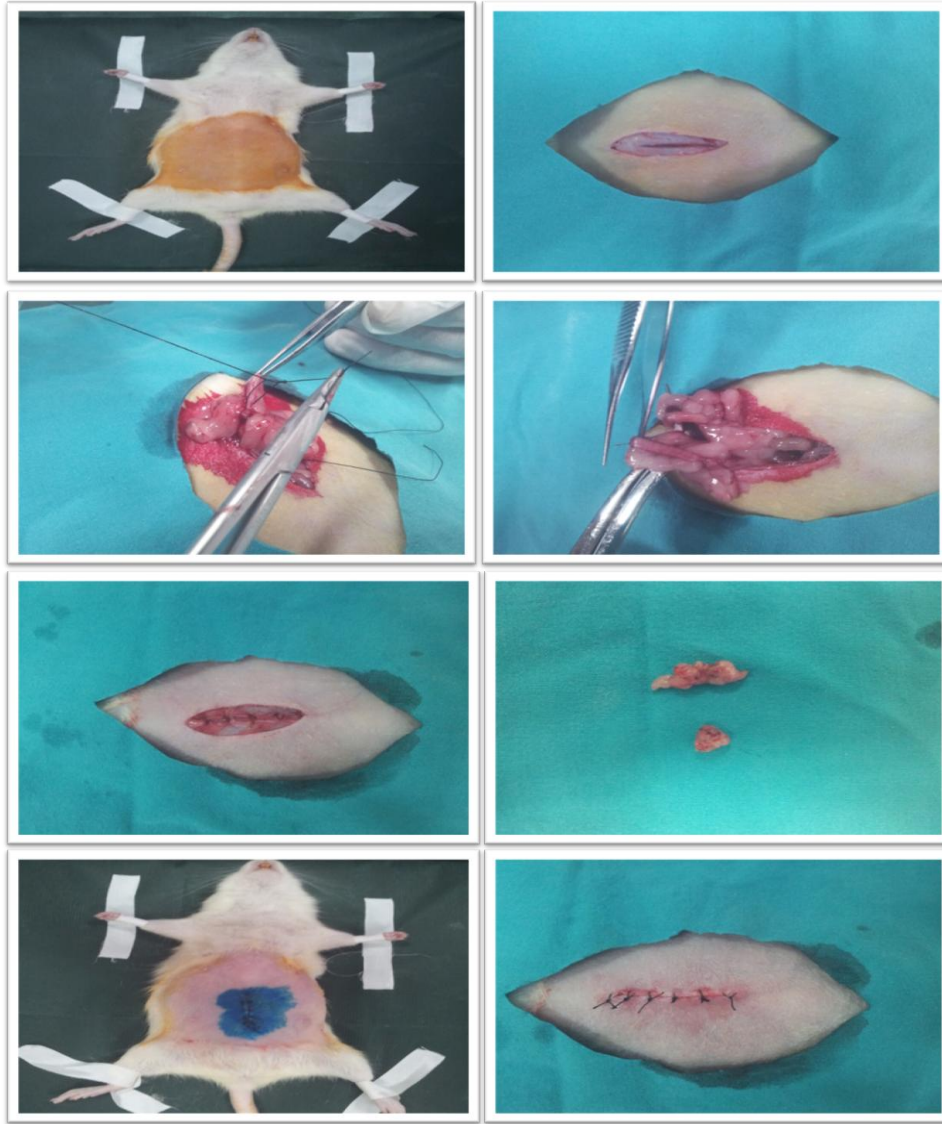
4. Sıçan hipokampus ve frontal korteksinde oluşan A $\beta$  peptitlerin ekspresyonlarının ve AChE aktivitelerindeki değişikliklerin immünohistokimyasal işaretleme ile ışık mikroskobunda boyama yapılarak görüntülenmesi gerçekleştirildi.
5. AH'nın ilerleyen evrelerinde gelişebilen ICM hastalığı neticesinde oluşan patolojinin kas üzerine etkilerini incelemek için, biyokimyasal olarak serum ve kas dokusunda TOK ve TAK parametreleri ölçüldü.
6. EDL kasının elektriksel ve mekanik aktivite kayıtları incelendi.

Bu amaçla, öncelikle, çalışmada oluşturulan kontrol ve deney gruplarında yer alan sıçanların tamamında davranış testleri ve hot plate testi yapılmış ve sonrasında, her grupta yer alan sıçanların 6 tanesi histolojik analizler için, her bir gruptan geri kalan sıçanlar ise biyopotansiyel ve biyomekanik kayıtlarda ve biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere ayrıldı.

Tüm incelemeler ve kayıtlar yapıldıktan sonra sıçanlar anestezi altında eksanguinasyon yöntemiyle sakrifiye edildi.

### **3.4. Cerrahi Prosedür: Overektomi**

Sıçanlar Ankara Kobay Deney Hayvanları Laboratuvar'ından getirildikleri günden itibaren 1 hafta Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvar'ına uyum sağlamaları için bekletildikten sonra, ketamine HCl (Ketalar) 80 mg/kg ve xylazine HCl (Rompun) 10 mg/kg i.p. yolla uygulanarak anestezinin sağlanmasını takiben 2. ve 5. lumbar vertebralar hizasında linea alba üzerinde 0,5-1,0 cm'lik bir insizyon açıldı. Sıçanlarda deri esnek olduğu için ovaryumlar alınırken, uygun tarafa doğru çekilip esnetildi. Hafif bir manipülasyon ile ovaryumlar ve etrafındaki yağ doku saptanıp dışarı çıkartıldı. Operasyonda oviduktun tamamı alınmadığı durumda östrus döngüsü devam edebileceğinden ovaryumdan hiçbir parça bırakılmadı. 4-0 emilebilir bir iplik ile uterus ve damarlarının kranial kısmı ligatüre edildi. Peritoneal ve mükölar açıklık aynı sutur içerisine alınarak emilebilir iplikler ile dikildi. Deri insizyonu emilemeyen iplikle dikildi. Anesteziden uyanmanın uzun süreceğini öngördüğümüz için deri altı sıvı takviyesi (SF) yapıldı (179-182) (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Sıçanların overektomi görüntüleri

### 3.5. Davranış Deneyleri

Ortama uyum sağlamaları ve aynı streslere maruz kalmaları için davranış deneylerine başlamadan bir hafta önce tüm sıçanlar Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Davranış Deneyleri Laboratuvar'ına alındı. Davranış deneyleri 27. haftasını tamamlamış sıçanlara uygulandı.

Davranış deneyleri, camlarına hem ışık hem de ses yalıtımı amacıyla köpükle izolasyon uygulanan bir odada (2,9 mx3,9 mx3,1 m) yapıldı. Bu odanın, oda sıcaklığını

sabitlemek için dijital olarak sıcaklığı ayarlanabilen klima yerleştirildi. Oda sıcaklığı 23°C'de sabit tutuldu. Ayrıca deney sırasında ışık şiddeti ayarlanabilen dört adet halojen lamba ile 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık ritmi, otomatik bir ayarlayıcı ile sağlandı. Tüm deneyler Noldus Ethovision XT yazılımı vasıtasıyla kaydedildi.

Tüm deneyler süresince sıçanlar aynı araştırmacı tarafından düzeneklere kuyruklarından tutularak bırakıldı. Bir deneyin bütün gruplara uygulanışı süresince araştırmacı aynı renk kıyafet giydi ve odada aynı yerde durdu. Davranış deneylerine sabah saat 09:00'da başlandı ve en geç saat 16:00'da bitirildi. Dört adet şeffaf plastikten yapılmış, talaşsız ve kuru kap bekleme kafesi olarak kullanıldı. Her sıçan düzeneklere bırakılmadan önce 5 dakika süreyle bu kaplarda bekletildi. Deney süresince her kafes değişiminde bu kaplar yıkandı. Açık alan deneylerinde her sıçanın bırakılmasından önce alan temizlendi. Morris Su tankının dibinde biriken kirler, her gün deney bitiminde vakumlu bir sistemle temizlendi. Hayvan kafesleri haftada iki gün düzenli olarak temizlendi.

### **3.5.1. Lokomotor Aktivite Deneyi (Açık Alan)**

Sıçanların lokomotor aktivitesinin değerlendirilmesi için açık alan deneyi yapıldı (Şekil 3.4). Deney, tüm sıçanlara 27. haftayı tamamlamalarından sonra bir gün, sadece bir defa ve 5 dk süreyle, saat 09:00 ile 15:00 arasında uygulandı. Ekrandaki görüntüye göre merkez başlangıç alanı olarak belirlendi ve kuyruklarından tutulan sıçanlar yüzleri alanın duvarına bakacak şekilde bırakıldı. 100x100 cm<sup>2</sup> ölçülerindeki zeminde beş dakika boyunca kat ettikleri mesafe (cm) ve hareket hızları (cm/s) türünden kaydedildi. Deney bitiminde sıçanların kütleleri ölçüldü.





Şekil 3.4. Açık Alan Düzeneği (100x100 cm<sup>2</sup>)

### 3.5.2. Öğrenme ve Hafıza Deneyleri (Morris Su Tankı)

Sıçanların spasyal bellek performansının ölçümü D-galaktoz ve Hup A enjeksiyonlarının bitiminden sonra doğumlarının 27. haftasında yapıldı. R=150 cm çaplı, h=60 cm derinliğinde, sıcaklık kontrollü, paslanmaz çelik bir su tankı kullanıldı (Şekil 3.5).



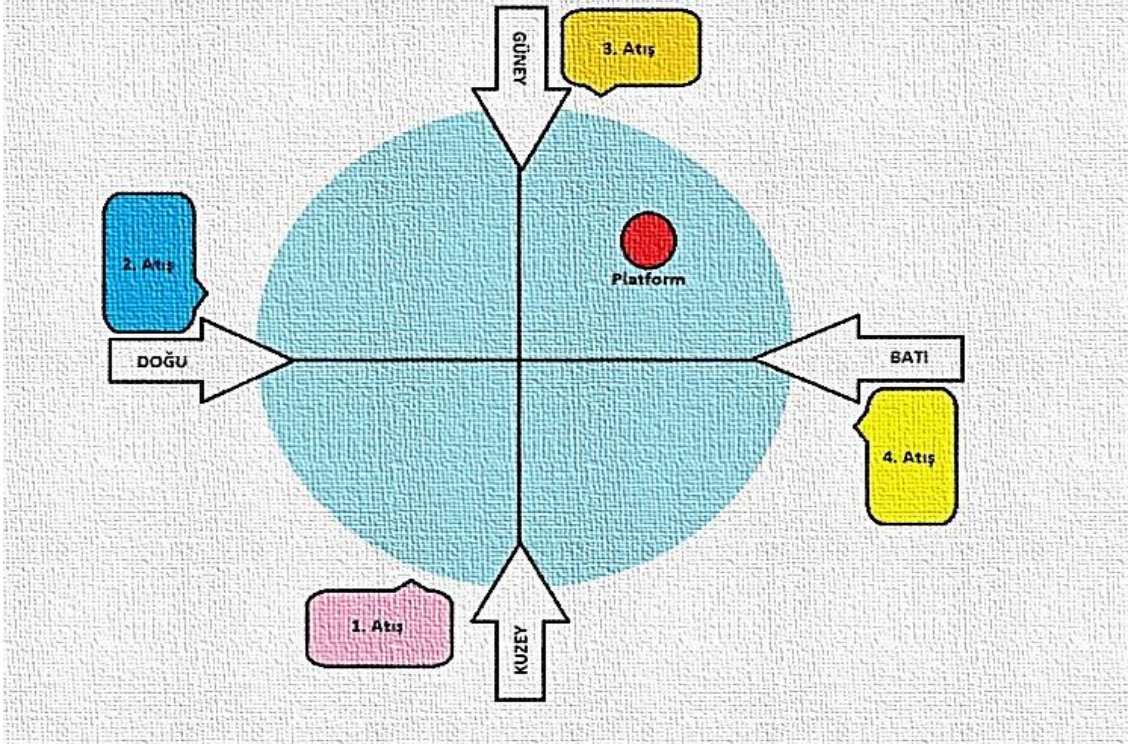
Şekil 3.5. Morris su tankının üstten ve yandan görünümü. (R=150 cm, h=60 cm)

Tankın çevresine görülebilir ve yerleri sabit görsel ipuçları yerleştirildi (Şekil 3.6). Deneyler hergün saat 09:00-15:00 arasında uygulandı. Bilgisayar ekranındaki görüntü üzerinden su tankı güney batı, kuzey batı, güney doğu ve kuzey doğu olmak üzere dört eşit kadrana bölündü. Tank 42 cm derinlik olacak şekilde ve  $22\pm 1$  °C sıcaklığında suyla dolduruldu.



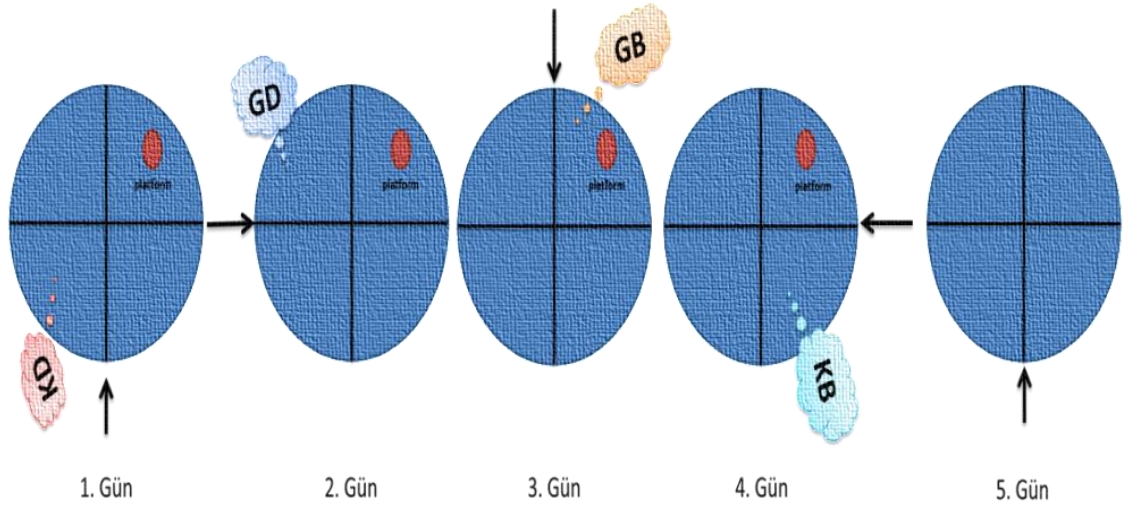
**Şekil 3.6.** Morris su tankı deneyine ait sabit görsel ipuçları.

Deneyin ilk gününde 15 cm çaplı platform ilk dört gün gizlenecek biçimde 40 cm yüksekliğe ayarlanıp, yeri sabit olarak güney batı kadrınının orta noktasına yerleştirildi. Deneyin ilk günü tüm sıçanlar kuzeyden başlanıp saat yönünde ilerleyerek her yönden bir kez olmak koşuluyla toplam dört kez, başları su tankı duvarına dönük olacak şekilde suya bırakıldı (Şekil 3.7).



**Şekil 3.7.** Spasyal hafıza deneyinde 1. günde sıçanların suya atılış şeması (İlk atış kuzey kadrından yapılır ve saat yönünde ilerleyerek her sıçan için günlük toplam 4 atışla deney tamamlanır).

Deneyin 1, 2, 3 ve 4. günlerinde hergün kuzey, doğu, güney ve batı noktalarından atışların yapılması sağlandı (Şekil 3.8).



**Şekil 3.8.** Spasyal hafıza deneyi günlere göre uygulama şeması (KD:Kuzey-Doğu (KD3), GD:Güney-Doğu (KD4), GB:Güney-Batı (KD1), KB:Kuzey-Batı (KD2) kadrantını, oklar ise her günün ilk atış yapılan yönünü göstermektedir).

Sıçanlar her atışta 60 saniye (s) süre ile yüzdürüldü, bu süre içinde platform üzerine çıkıp 5 s orada kalan sıçanlar deneyin bu aşamasını tamamlamış olarak kabul edildi ve 15 s süreyle platform üzerinde kalmalarına izin verildi (Şekil 3.9).



**Şekil 3.9.** Morris su tankında platformu bulan bir sıçanın üstten görünümü.

60 s içinde platformu bulamayan sıçanlar elle yönlendirilerek yükseltiyi bulmaları ve 15 s süreyle platform üzerinde kalmaları sağlandı. Dört gün boyunca her atışta platformu bulma süreleri kaydedildi. Deneyin 5. günü platform çıkarılarak batı kadranından tek atış yapıp 60 s süresince kayıt alındı. Bu süre sonunda eskiden yükseltinin olduğu güney batı kadranında ortalama geçirdikleri süre (s), yüzme hızları (cm/s) ve katettikleri mesafeler (cm) türünden kaydedildi.

### 3.5.3. Ağrı Eşiğini Saptama Deneyi (Sıcak Plaka-Hot Plate)

Bu yöntemde, denekler sıcaklığı 52°C'ye ayarlanan metal zeminli bir pleksiglas silindirik ortama bırakıldıktan sonra arka ayağını çekme davranışı kriter olarak alındı ve bu davranışı gösterdikleri zamana kadar geçen sürenin ölçümü yapıldı. Doku zedelenmesini önlemek için cut-off değeri olarak 30 s belirlenmiş olup, bu süre içinde teste yanıt vermeyen hayvanlar cihazdan alındı (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Sıcak plaka (Hot plate) sistemi

### 3.6. Biyopotansiyel ve Biyomekanik Kayıtlar

Çalışmada bulunan bütün sıçanların, önce sol bacaklarından kas elektriksel aktivite kaydı, hemen sonrasında ise sağ bacaklarından kas mekanik aktivite kayıtları alındı. Bu amaçla sıçanların rektal prob ile vücut sıcaklığının ölçülmesinden sonra ketamine HCl (Ketalar) 80mg/kg ve xylazine HCl (Rompun) 10 mg/kg i.p. yolla uygulanarak anestezisinin sağlanmasını takiben kiloları tartılıp, elektrikle ısıtılan AOT0801-DC Hayvan Operasyon masasına (DC-Heated) yüz üstü yatar pozisyonda tutturuldu (Şekil 3.11). Böylece kas diseksiyonu, elektriksel ve mekanik aktivite kaydı süresince rektal sıcaklığın 37-38 °C'de tutulması sağlandı. EDL kasının mekanik aktivitesini kayıtlamak için sıçanların sağ bacağı traşlanarak EDL kası fasyasından ayrılıp, tendon kısımlarından 2-0'lık ipek süturla bağlanarak izole edildi (Şekil 3.12). İzole edilen EDL kası tendonlarına bağlanan 2-0'lık ipek süturlarla bir ucu izometrik kuvvet çevirecine ve diğer ucu da 10 ml'lik Krebs solüsyonu içeren organ banyosuna yerleşecek şekilde bağlanarak asıldı ve kayıt alınıncaya kadar bu koşullarda bekletildi.

Sağ EDL kasının izole edilmesi ve organ banyosunun içinde beklemeye alınmasını takiben, EMG kaydı için sol EDL kası etrafındaki dokulardan ayrılarak görülebilir duruma getirildi.



Şekil 3.11. Isıtılmalı operasyon masasına yatırılmış sıçanın üstten görünümü.



Şekil 3.12. Sıçanların EDL kası diseksiyonu.

### 3.6.1. EDL Kasının Elektriksel Aktivite Kaydı (EMG-BKAP)

Etrafındaki dokulardan ayrılarak görülebilir duruma getirilen sol EDL kasının 1/3 proksimal kısmına bipolar uyarıcı elektrotları ve aynı anda sol EDL kasının 1/3 distal kısmına bipolar yüzeyel disk kaydedici elektrotları yerleştirildi (Şekil 3.13), toprak elektrodu ise uyarı verilmeyen diğer uyluğa yerleştirildi. EDL kasına ait bileşik kas aksiyon potansiyeli (BKAP) kayıtları alındı. Çalışmada, elde edilen BKAP'lara ait tepeden tepeye genlik, motor latans, alan, süre ve pik latans parametreleri BIOPAC Veri Toplama ve Analiz Programı ile (Santa Barbara, USA) ölçüldü.

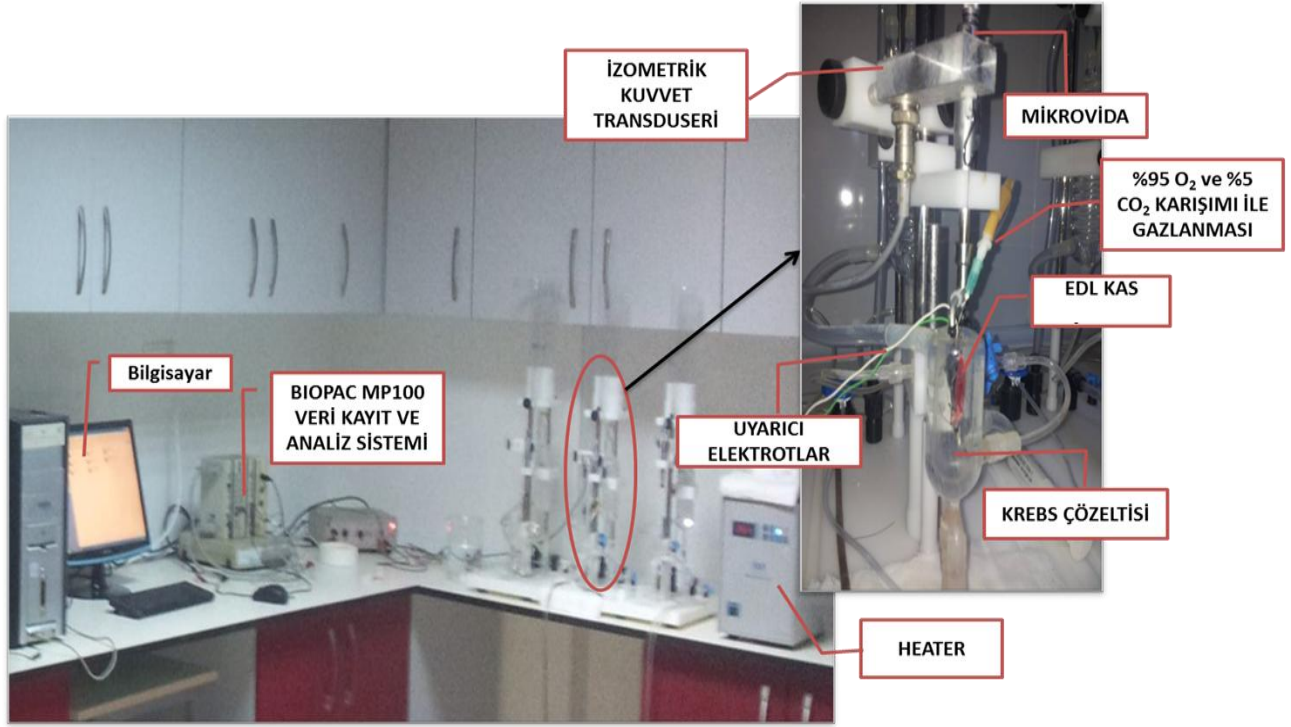


Şekil 3.13. EMG kaydı için bipolar yüzeyel disk elektrotlarının yerleşimi.

### 3.6.2. EDL Kası Mekanik Yanıtlarının Kayıt Tekniği

EDL kası mekanik yanıtlarının kayıtlanmasında izole organ banyosu (Isolated Organ Bath Stand Set-IOB S99) ve izometrik kuvvet transduseri (çevireci) (FDT 05 Force Displacement Transducer) kullanılmıştır (Şekil 3.14). Organ banyosunda bulunan Krebs çözeltisinin içeriği mM/L; 118 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM glukoz, 23,7 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>'den oluşturulmuştur. EDL kası, iki adet platin tel elektrot arasına yerleştirilerek, elektrotların direkt olarak dokuya temas etmesi sağlanmıştır.





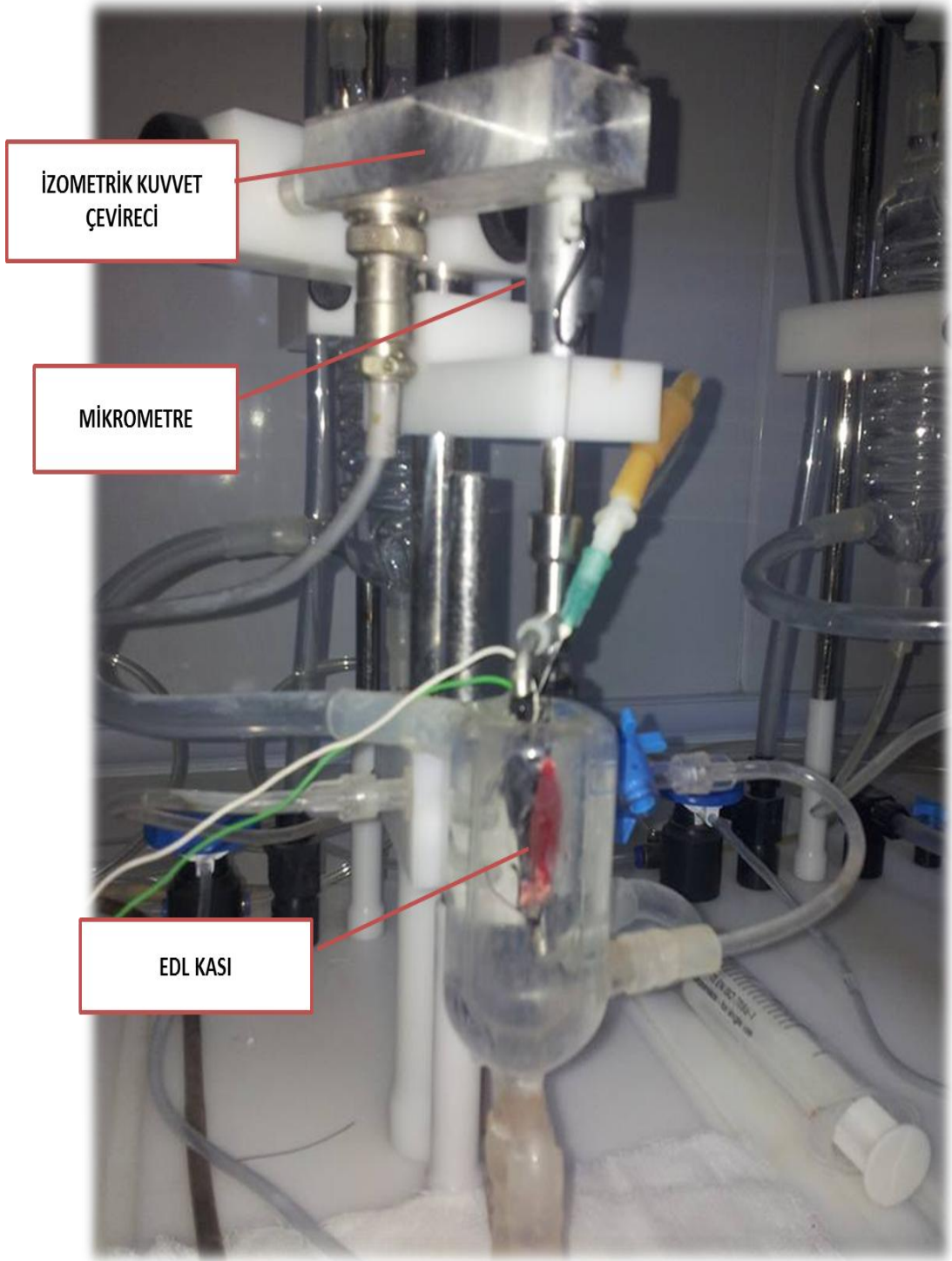
**Şekil 3.14.** Kas mekanik yanıtlarının kaydedilmesinde kullanılan izole organ banyosu sistemi.

Banyo solüsyonu, sıcaklığın kontrol edilebilmesini sağlayan ısıtıcı sirkülatör (Heating Circulator/Model MAY WBC 3044-PR) ile 37 °C’de tutulup, sürekli olarak %95O<sub>2</sub> ve %5CO<sub>2</sub> karışımı ile gazlandı. EDL kasının bulunduğu Krebs solüsyonu 15'er dakikada bir değiştirildi ve kas, banyo ortamına adapte olarak dengeye gelebilmesi için bu ortamda 30 dakika bekletildi (183, 184). İzole organ banyosuna asılı doku preparatlarının elektriksel stimülasyona (0,5 ms süreli, supramaksimal genlikli kare puls) verdiği kuvvet yanıtları, izometrik kuvvet çevirecinden iletilen yanıtları fark amplifikatörü aracılığıyla bilgisayar ortamına aktaran veri kayıt ve analiz sisteminde (BIOPAC MP100 Systems Inc. Santa Barbara, ABD) kaydedildi. BIOPAC MP100 sistemindeki stimulatörün maksimum uyarı çıkışı ±5 V değerindedir. Bu değer, kasların uyarılması için gereken supramaksimal uyarı voltajına uygun bir aralıkta olmadığı saptanmıştır. Bu nedenle BIOPAC MP100 sistemindeki stimulatör, çıkış voltajı 150 V’a kadar ayarlanabilen bir stimulus izolatöre bağlanarak ön denemeler yapılmış ve sonuç olarak EDL kasının yaklaşık 40 V ile supramaksimal genliğe ulaştığı

gözenmiştir. Böylece çalışma boyunca EDL kaslarında supramaksimal genlikte mekanik aktivite kayıtları elde edebilmek amacıyla uyarı voltajının genliği 40 V olarak kullanıldı. Kas mekanik sinyalleri, deney sonrası analizlerinin yapılması için, 16 bitlik bir A/D çevirici ünitesi yardımıyla ve uygun örnekleme aralığı (15000 örnek/s) kullanılarak dijital değerlere çevrildi.

### **3.6.3. Optimum Kas Boyunun ( $L_0$ ) Belirlenmesi**

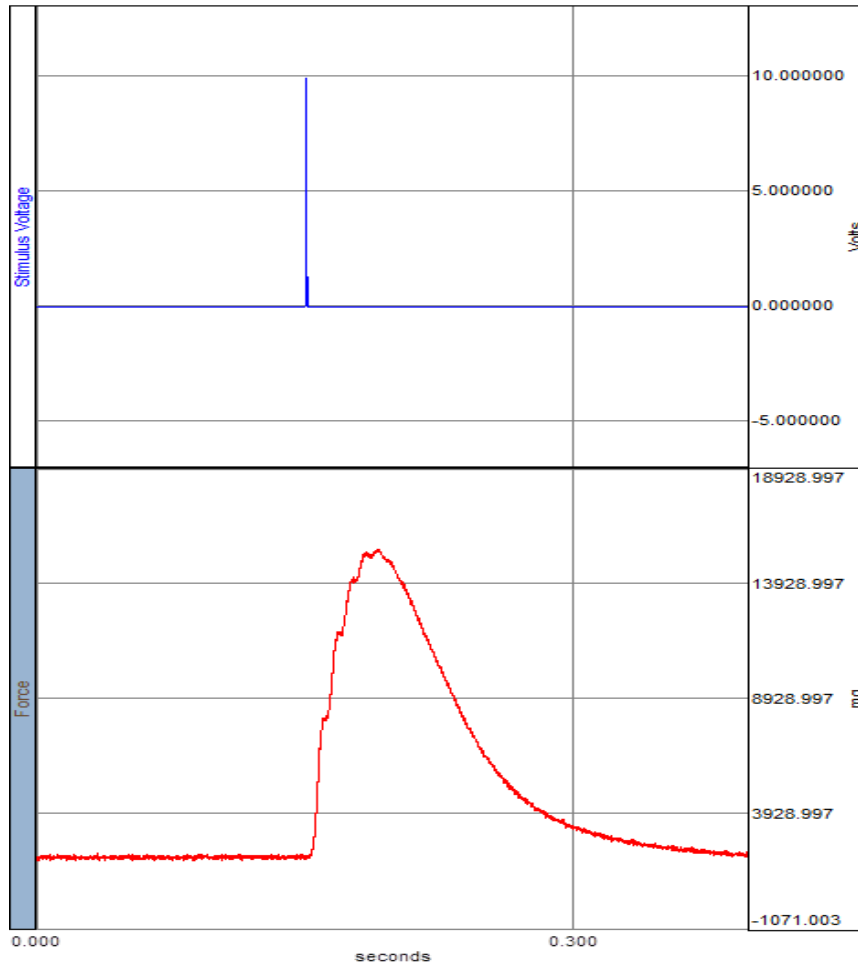
Krebs solüsyonundaki dengeleme periyodundan sonra, her bir EDL kası için, maksimum kasılma kuvvetinin elde edildiği optimum kas boyu ( $L_0$ ) belirlendi (Şekil 3.15).



Şekil 3.15. Optimum boyu ( $L_0$ ) belirlenmiş sıçan EDL kası.

Her bir EDL kasının tek ve farklı frekanslarda (10, 20, 40, 80, 100 ve 150 Hz) uyarılar için oluşturacağı izometrik kuvvet yanıtlarını kaydetmeden önce, her bir kası optimum  $L_0$  boyuna getirecek olan ön gerim değerleri saptandı ve her bir uyarı protokolü uygulanmadan önce kas preparatını optimum boya getirecek olan uygun ön gerim değerleri, kasın bir ucuna bağlı olan bir mikrometre aracılığı ile ayarlandı.

Optimum uzunluğa getirilmiş olan kas preparatına ait örnek izometrik sarsı eğrisi Şekil 3.16'da görülmektedir.

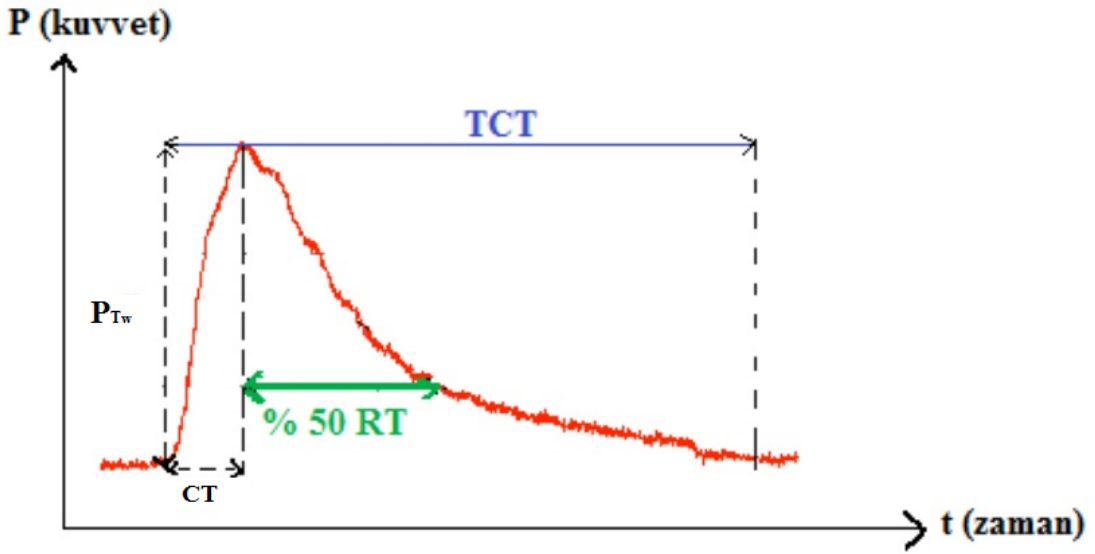


**Şekil 3.16.** Maksimum kasılma kuvvetinin elde edilebileceği optimum kas boyuna ( $L_0$ ) getirebilmek için öngerim (yaklaşık 2-3 g) uygulanmış bir sıçan EDL kasından, tek bir uyarı uygulanması sonucu elde edilen izometrik sarsı eğrisi için örnek bir kayıt.

### 3.6.4. Uyarı Protokolü ve Ölçülen İzometrik Sarsı Eğrisi Parametreleri

Tek bir uyarıya yanıt olarak EDL kası için kaydedilen izometrik sarsı eğrilerinden;

- ❖ Maksimum kasılma kuvveti ( $P_{Tw}$ ),
- ❖ Kasılma süresi (CT),
- ❖ Yarı gevşeme süresi (%50 RT) ve
- ❖ Toplam sarsı süreleri (TCT) ölçüldü (Şekil 3.17).



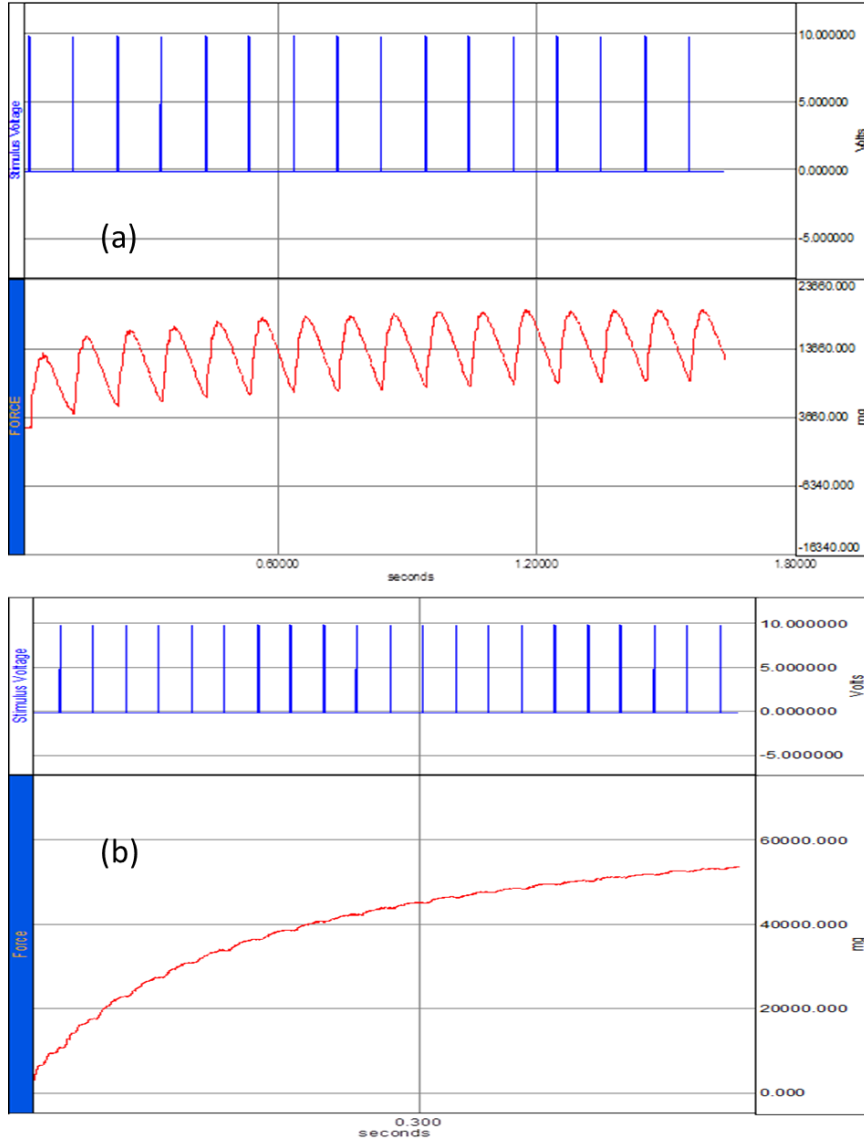
Şekil 3.17. Tek bir uyarıya yanıt olarak kaydedilmiş EDL kası eğrisinden ölçülen parametreler ( $P_{Tw}$ : maksimum kasılma kuvveti, CT: kasılma süresi, %50 RT: yarı-gevşeme süresi ve TCT: toplam sarsı süresi).

Her bir EDL kasını, kendi optimum boyuna getiren uygun ön gerimler saptanarak kasa uygulandıktan sonra, 5'er dakika ara ile tek uyarı, 10, 20, 40, 80, 100 ve 150 Hz frekanslı uyarılar verildi ve kas mekanik yanıtları kayıtları (185-187). EDL kası kuvvet yanıtları için örnek kayıtlar Şekil 3.18-3.19 ve 3.20'de görülmektedir.

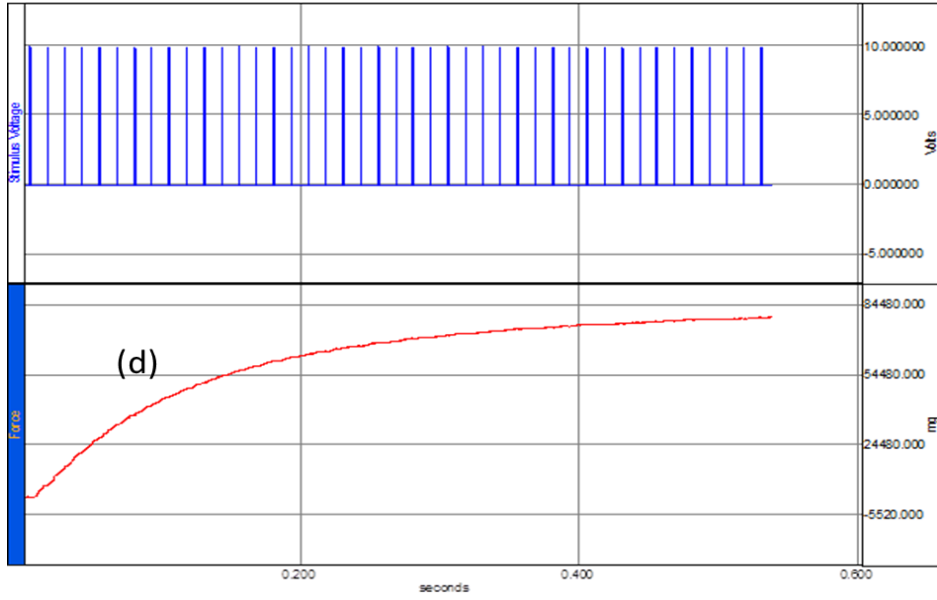
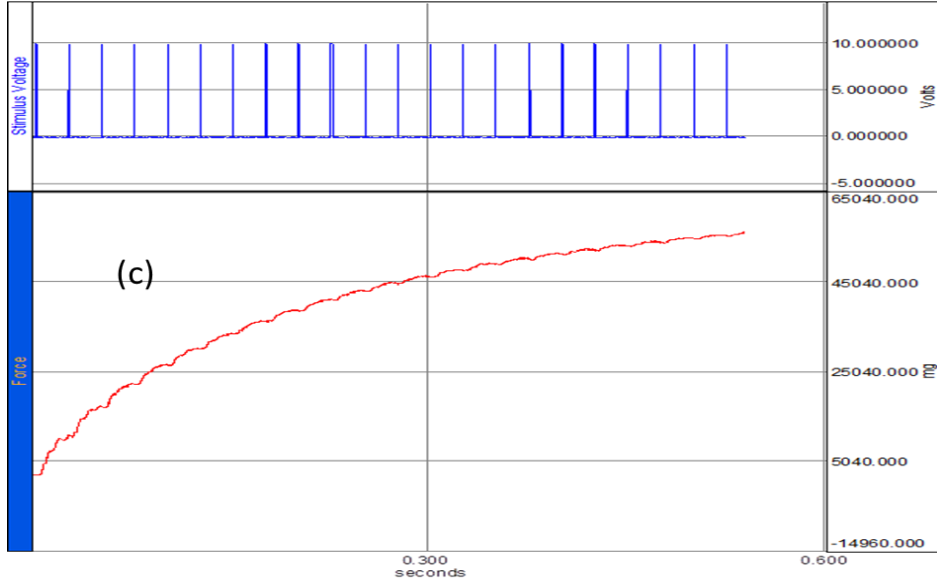
Kayıtlar alındıktan sonra izole organ banyosundan alınan kas preparatları kurutma kâğıtları ile kurutulup, kütleleri hassas terazide, boyları ise bir cetvelle ölçüldü. Kas yoğunluğu  $1,056 \text{ g/cm}^2$  alınarak kas kesit alanı (CSA), aşağıda verilen (1) numaralı formül ile hesaplandı (188-190).

$$\text{CSA (cm}^2\text{)} = \frac{\text{kas kütlesi (g)}}{L_0(\text{cm}) \times 1.056 \text{ g/cm}^3} \quad (1)$$

Her bir uyarı protokolü için kaydedilen izometrik sarsı eğrilerinden kuvvet değerleri ölçüldü ve her bir değer CSA'ya bölünerek normalize edildi. İstatistiksel analizlerde, normalize edilmiş tepe sarsı kuvvetleri  $P_i$  ( $i=Tw, 10, 20, 40, 80, 100$  ve  $150$  Hz), maksimum tetanik kuvvet  $P_0$  ( $150$  Hz frekansındaki uyarıya karşı oluşan kuvvet) ve her bir frekans değeri için hesaplanmış olan  $P_i/P_0$  oranları değerlendirilmeye alındı.

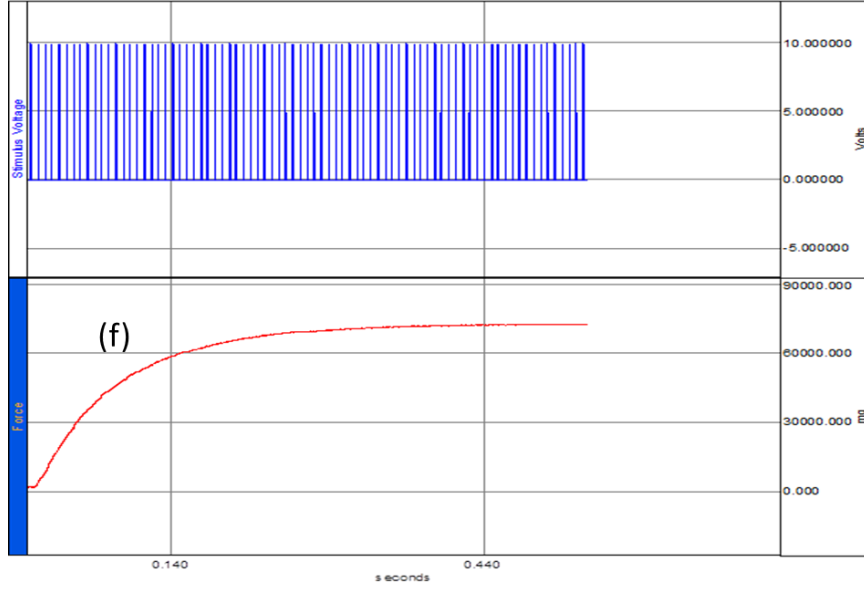
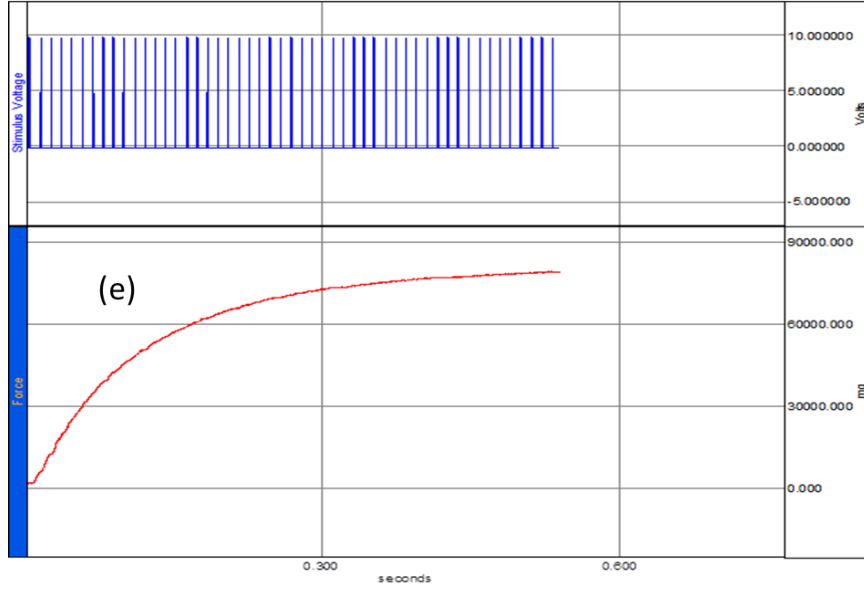


**Şekil 3.18.** Sıçan EDL kasının (a) 10 Hz ve (b) 20 Hz frekanslı uyarılara karşı oluşturduğu sarsı eğrileri için örnek kayıtlar.



**Şekil 3.19.** Sıçan EDL kasının (c) 40 Hz ve (d) 80 Hz frekanslı uyarılara karşı oluşturduğu sarsı eğrileri için örnek kayıtlar.





**Şekil 3.20.** Sıçan EDL kasının (e) 100 Hz ve (f) 150 Hz frekanslı uyarılara karşı oluşturduğu sarsı eğrileri için örnek kayıtlar.

### 3.7. Davranış, Biyopotansiyel ve Biyomekanik Deney Sonuçlarının İmmünohistokimyasal Yöntemle Desteklenmesi için Doku Fiksasyon İşlemi (Perfüzyon Yöntemi)

Işık mikroskopik doku takibi ve immünohistokimyasal işaretleme ile beynin hipokampus ile frontal korteksinde A $\beta$  peptitlerinin oluşturduğu agregatları ve AChE aktivitesini belirlemek için perfüzyon yöntemi uygulandı (191).

Bu yöntemi uygulamak için, öncelikle sıçanlara ketamine HCl (Ketalar) 80 mg/kg ve xylazine HCl (Rompun) 10 mg/kg i.p. yolla uygulanarak derin anestezi altına alındı. Toraks duvarı processus xiphoideus'dan başlanıp, kostaların iki yanından, parasternal çizgi hizasından kesilerek açıldı ve cranial yönde kaldırılıp, sabitlendi. Diyafram ve perikardium kesildi. 5000 ünite sodyum heparin, 1 ml % 0.9'luk serum fizyolojik içinde eritilerek sol ventrikülden dolaşıma verildi. Sonra sağ atriuma ensizyon yapılarak kanın dışarı akışı sağlandı. Kalp kontraksiyona devam ederken kanül ile apeks tarafından sol ventrikül içine girildi (Şekil 3.21).



Şekil 3.21. Doku fiksasyon işlemi için kullanılan perfüzyon yöntemi

Kanül vasıtasıyla kan vücuttan uzaklaşınca kadar sol ventrüküle %0,9'luk serum fizyolojik solüsyonu ( yaklaşık 100 ml) verildi. Perfüzyonun başlamasından 5-10 dakika sonra sıçanın tüm kanı dışarı akıtıldı ve organlar soluklaştı. Ardından aynı şekilde 0.1 M A+B tamponlu (pH:7.4) % 4 paraformaldehit tespit solusyonu ventrükülden dolaşıma verildi. Şişeler deney hayvanından yaklaşık 1-1,5 m yüksekte tutuldu (Şekil 3.22). Kalp kontraksiyonu durduğunda sıvıların vücuda verilmesinde bu yükseklikten yararlanıldı. Sıçana 15 dakika içinde yaklaşık 200 ml tespit solusyonu verildi. Perfüzyona bütün vücut sertleşinceye ve özellikle organlar (karaciğer, akciğer v.s.) beyazlaşınca kadar devam edildi.



**Şekil 3.22.** Dokuların ışık mikroskopik incelemesinde kullanılan fiksasyon işlemi sırasında (perfüzyon fiksasyon yöntemi) solusyonların yaklaşık 1-1,5 m yükseklikten deney hayvanının dolaşımına verilmesi

Vasküler perfüzyonla tespit işlemini takiben beyin (Şekil 3.23) ve EDL kasından biyopsi alındı. Alınan dokular aynı tespit solüsyonunda boğçalanmış bir şekilde bekletildi.

Daha sonra ışık mikroskobu için dokular fikse edilmelerini takiben akarsuda yıkandı. Artan derecelerde alkollerden geçirildi (%70, 80, 90, 96). Ksilol ile şeffaflandırma işlemi yapıldı. Ksilol + sıvı parafin karışımında bekletildikten sonra dokular sıvı parafine gömüldü. Mikrotomla adeziv lamlara 5 µm kalınlığında kesitler alınıp, deparafinizasyon işlemi için 60°C etüvde 1 saat bekletildikten sonra oda ısısında 3X10 dakika ksilolden geçirildi. Rehidratasyon işlemi için derecesi giderek azalan alkol serilerinden geçirilerek distile suya alındı. Fiksasyon ve parafine gömülmekten kaynaklanan antiijen maskelenmesini ortadan kaldırmak için tripsin (pH:7,6) içinde 37°C’de (Bio-Optica Milano Spa®) 30 dakika muamele edilip, bu işlemden sonra taze hazırlanmış fosfatlı tuz tamponu (PBS) ile 3X5 dakika yıkandı.



**Şekil 3.23.** Doku fiksasyon işlemi için yapılan perfüzyon işlemi sonucu diseke edilen beyin dokusu.

Endojen peroksidaz aktivitesinin yok edilmesi için distile suda %12,5'lük olarak hazırlanmış hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ile 10 dakika inkübe edildi. Tekrar PBS ile 3X5 dakika yıkandı. Nonspesifik antikor bağlanmasını ve bundan dolayı oluşabilecek zemin boyamasını engellemek için Novocastra TM Protein Block ile 8 dakika inkübe edildi. Dokuların üzerindeki protein blok uzaklaştırıldı ve yıkama yapılmadan PBS içinde %0,5'lik sığır serum albumin (BSA) ile sulandırılmış Amyloid beta precursor protein antikoruna Abcam (ab32136) veya asetilkolin esteraz antikoruna Abcam (ab2802) 1/25 dilüsyonunda damlatılıp, kesitler nemlendirilmiş kapalı bir kap içinde oda ısısında 1 gece inkübe edildi. Bir kez daha PBS ile 3x5 dakika yıkandı. Biotin ile bağlanmış polivalan sekonder antikor (Scytek®) damlatılarak oda ısısında 10 dakika bekletildi. Yeniden PBS ile 3x5 dakika yıkandı. Streptavidin peroksidaz enzim solüsyonu ile 10 dakika inkübe edildi. PBS ile tekrar 3X5 dakika yıkandıktan sonra peroksidaz substratı olan diaminobenzidin (DAB) damlatılıp, boyanma yoğunluğu mikroskop altında kontrol edilerek 3-5 dakika inkübe edildi. Bu işlemden sonra distile suda 5 dakika yıkandı. Hematoksilen ile 5-10 saniye zıt boyama yapıldı, akarsuda berraklaşana kadar yıkandı. Kesitler derecesi artan alkollerden geçirilerek dehidrate edildi. Ksilolden 3x5 dakika geçirildikten sonra entellan ile kapatıldı. Kontrol amacıyla ayrılan kesitlere primer antikor içermeyen %0,5 PBS-BSA damlatıldı ve daha sonra protokole aynı şekilde devam edildi. Dokular, ışık mikroskobu (Olympus®BX50 Olympus GmbH, Almanya) ile incelendi. Aynı mikroskoba eklenmiş dijital kamera (Nikon®Coolpix5000, Nikon Corp. Tokyo, Japonya) ile fotoğrafları çekilerek AH patolojisinin temel bulgularından birisi olan ve birçok sistemi etkileyebilen A $\beta$  birikiminin gösterilmesiyle AH oluşum ispatına gidildi ve ayrıca AChE aktivitesi gösterilmesiyle de Hup-A tedavisinin etkinliği değerlendirildi.

### **3.7.1. Işık Mikroskopik Değerlendirme**

Işık mikroskopik düzeyde, immünohistokimyasal işaretleme ile beynin frontal korteksinde meydana gelen A $\beta$  peptitlerinin oluşturduğu agregatlar ve AChE aktivitesi, Amyloid beta precursor protein antikoruna Abcam (ab32136) veya asetilkolin esteraz

antikoru Abcam (ab2802) ile işaretlenme düzeyine bakılarak boyanma yoğunluğu değerlendirildi.

Değerlendirme:

Hiç işaretlenme yok: 0

Yer yer işaretlenme var: +

Orta düzeyde işaretlenme var: ++

Kuvvetli işaretlenme var: +++

şekilde yapıldı.

### **3.8. Biyokimyasal Analizler**

AH'nın oluşum mekanizmasını açıklayabilmek amacıyla, tüm grupların serum örneklerinde ve EDL kas dokusunda serbest radikal metabolizması (Total Antioksidan Kapasite (TAK) ve Total Oksidan Kapasite (TOK) incelendi. İnceleme Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Bu amaçla elektrofizyolojik kayıtları takiben sıçanların kalpleri içine girilerek alınan kan örnekleri 20 dakika oda ısısında bekletildikten sonra, 4000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi (192). Dokular serum fizyolojik ile 1/10 oranında seyreltilerek homojenize edildi. Analiz yapılana kadar serum ve doku örnekleri -80°C'de bekletildi. Tüm analizler Abbott Architect Plus C 8000 Auto analyzer cihazı kullanılarak yapıldı.

TOK analizlerinde örnekteki oksidanlar ferröz iyon-şelatör kompleksini ferrik iyonlara okside ederler. Reaksiyon ortamındaki artırıcı moleküller tarafından oksidasyon reaksiyonu uzatılır. Ferrik iyonlar, asidik ortamdaki kromojenlerle renkli kompleks oluştururlar. Spektrofotometrik olarak ölçülebilen renk yoğunluğu örnekteki total oksidan molekül miktarıyla ilişkilidir (193). Yöntem hidrojen peroksitle kalibre edildi ve sonuçlar litrede mikromolar hidrojen peroksit ekivalan olarak verildi ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  Equiv. /L) (Rel Assay Diagnostics).

TAK analizlerinde örnek içindeki antioksidanlar koyu mavi-yeşil renkli ABTS radikallerini renksiz ABTS formuna indirgerler. 660 nm'de ölçülen absorbans değişikliği örnekteki total antioksidan düzeyi ile ilişkilidir (194). Yöntem bir stabil

antioksidan solüsyonu olan vitamin E analogu Trolox Equivalan ile kalibre edildi (Rel Assay Diagnostics).

### **3.9. İstatiksel Analizler**

Veriler SPSS 21, Statistica 8.0 ve Medcalc v13.2.2 paket programı kullanılarak değerlendirildi. Sürekli ölçümlere ait normallik kontrolleri Shapiro Wilk testi ile test edildi ve verilerin normal dağılım gösterip göstermediğine bakıldı. Normal dağılım gösteren verilerde varyansların homojenliğinin kontrolü Levene testi ile yapıldı. Çalışmada 2'den fazla bağımsız grup olduğundan normal dağılım gösteren verilerde gruplar arası farklılık olup olmadığı Varyans Analizi (One Way ANOVA) ile test edildi. İstatistiksel olarak anlamlı fark bulunmasını takiben, varyansları homojen ise bu farklılığın hangi gruplar arasında olduğuna Bonferonni Post Hoc testi ile fakat varyansları homojen değilse Dunnett's T3 Post Hoc testi ile karar verildi. Normal dağılım göstermeyen verilerde ise gruplar arasında farklılık olup olmadığı Kruskal Wallis testi kullanılarak saptandı. Kruskal Wallis testi sonucu anlamlı çıkan verilerde, farklılığın hangi gruplar arasında olduğuna Dunn testi ile karar verildi. Spasyal hafıza deneyinde her bir gruba ait günler arasındaki farklılıklar tekrarlanan ölçümlü deneme düzenlerinin analizi ile (Repeated measures ANOVA) incelendi. Tanımlayıcı istatistik olarak normal dağılım gösteren verilerin analiz sonuçları ortalama ve standart sapma ( $\text{ort} \pm \text{ss}$ ) değerleri ile, normal dağılım göstermeyen verilerin tanımlayıcı istatistikleri ise medyan ve çeyreklikler (Q1-Q3) ile verildi. İstatistiksel anlamlı farklılık olarak  $p < 0,05$  alındı.

## 4. BULGULAR

Çalışmaya alınan 68 adet 13 haftalık dişi Sprague-Dawley sıçanlardan iki tanesi anestezi, iki tanesi overektomi sırasında, bir tane sıçan da davranış deneylerini yapmak üzere getirildiği fizyoloji laboratuvarında ortam koşullarının değişmesinden dolayı öldü. Böylece bütün deneyler 63 sıçanla yapıldı.

### 4.1. Sıçanların Vücut Kütlesi

Her bir grupta yer alan sıçanların ilk kütle ölçüm değerleri (ort±ss) ve dekapite edilmeden hemen önce alınan son kütle ölçüm (ort±ss) değerleri Çizelge 4.1’de görülmektedir. İlk vücut kütle değerleri gruplar arası karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülürken ( $p<0,001$ ), son vücut kütle değerleri için gruplar arası karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi ( $p=0,393$ ) (Çizelge 4.1).

Her bir grup için ilk kütle değerleri ile son kütle değerleri karşılaştırıldığında ise K grubu hariç diğer gruplarda istatistiksel olarak anlamlı farklılık görüldü (Çizelge 4.2).



**Çizelge 4.1.** Sıçanların ilk kütle ve son kütle ölçüm değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması.  
(ortalama±standart sapma)

GRUP	İlk Vücut Kütlesi (g)	Son Vücut Kütlesi (g)
<b>K</b> n=12	332 ± 23	360 ± 59
<b>SH</b> n=14	271 ± 19 *	335 ± 32
<b>O+D</b> n=12	270 ± 19 *	359 ± 53
<b>O</b> n=13	266 ± 15 *	374 ± 44
<b>O+D+H</b> n=12	263 ± 13 *	352 ± 52
<b>P</b> Değerleri	0,000	0,393

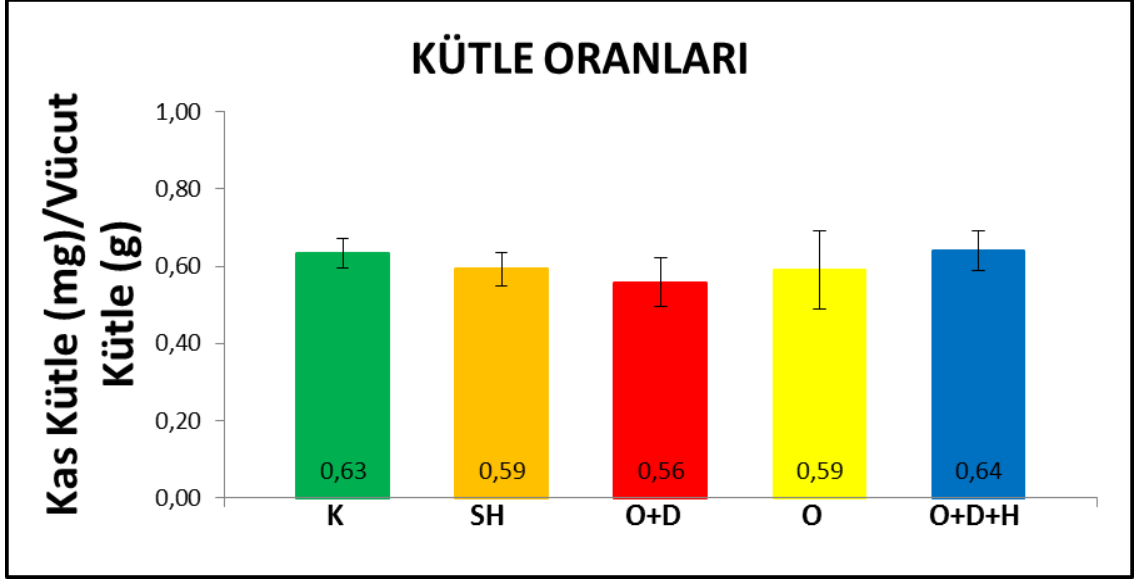
\*: K ile karşılaştırıldığında  $p < 0,001$

**Çizelge 4.2.** Her bir grup için ilk vücut kütlesi ile son vücut kütlesi ölçüm değerlerinin karşılaştırılması.  
(ortalama±standart sapma)

GRUP	İlk Vücut Kütlesi (g)	Son Vücut Kütlesi (g)	P Değerleri
K n=12	332 ± 23	360 ± 59	0,121
SH n=14	271 ± 19	335 ± 32	0,000
O+D n=12	270 ± 19	359 ± 53	0,000
O n=13	266 ± 15	374 ± 44	0,000
O+D+H n=12	263 ± 13	352 ± 52	0,000

#### 4.2. EDL Kas Kütlesi/Sıçan Vücut Kütlesi Oranı Bulguları

Her bir grupta yer alan sıçanların EDL kas kütlelerinin (mg) vücut kütlelerine (g) oranı hesaplandı (Şekil 4.1). Kas kütle (mg) / Sıçan Vücut kütle (g) oranları gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ( $p=0,177$ ) saptanmadı.



Şekil. 4.1. Sıçanların gruplara göre kütle oran (EDL kas kütlesi/vücut kütlesi) değerlerinin dağılımı (ortalama±standart sapma) ( $p=0,177$ ).

### 4.3. Davranış Deneyleri ile İlgili Bulgular

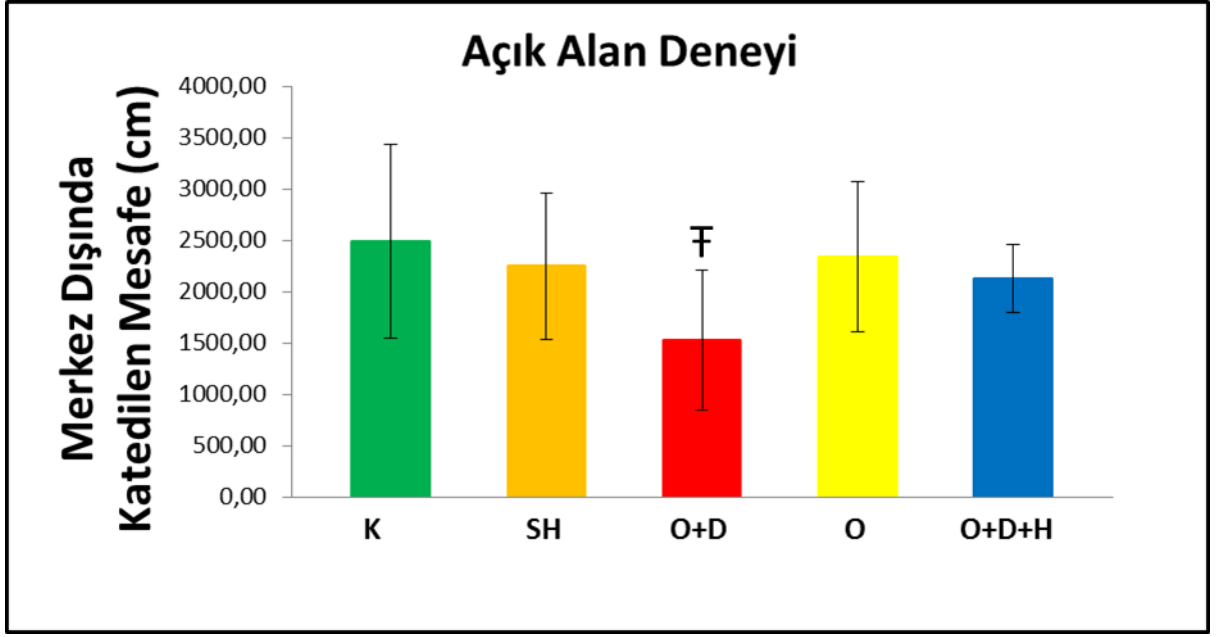
#### 4.3.1. Açık Alan Lokomotor Aktivite Deneyi

Açık alan deneyinde her grubun 5 dakikada ortalama katettiği mesafe, hareket hızları ve merkezde katettiği mesafe ölçüldü (Çizelge 4.3). Merkez dışında ortalama katedilen mesafe (cm), hareket hızları (cm/s) ve merkezde katedilen mesafe (cm) için gruplar arası karşılaştırmada her üç parametre için de istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4). Buna göre merkez dışında katedilen mesafe ve hareket hızları açısından yapılan gruplar arası karşılaştırmada, O+D grubunun diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdiği saptanmıştır. Buna ek olarak, merkezde katedilen mesafe açısından yapılan gruplar arası karşılaştırmada ise O+D, O ve O+D+H grupları K ve SH gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir.

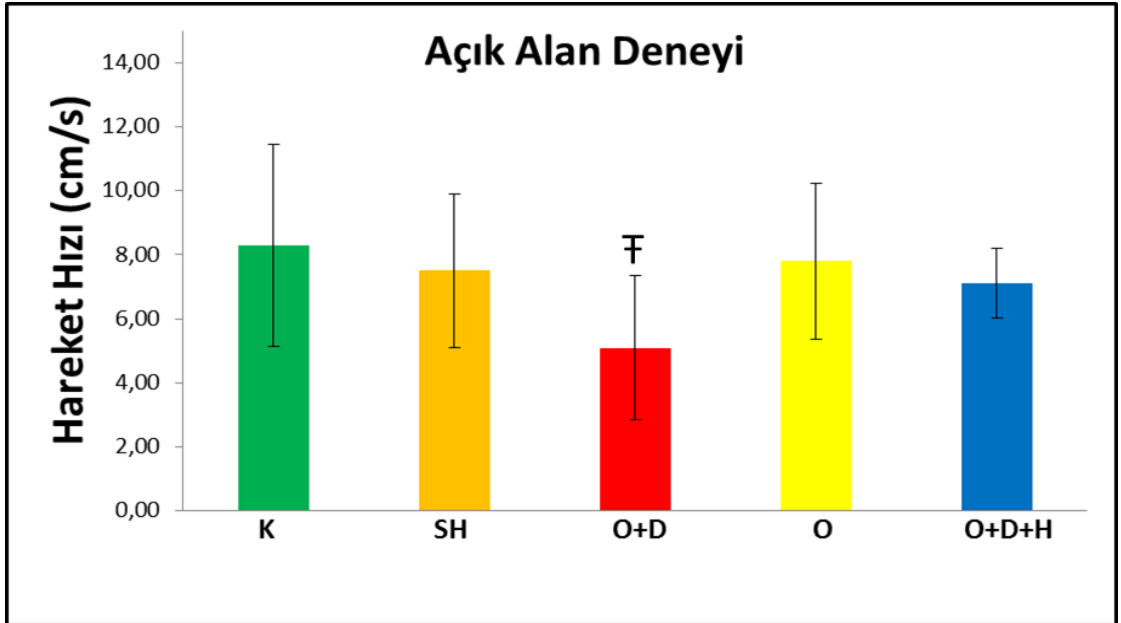
**Çizelge 4.3.** Açık alan deneyinde grupların merkez dışında katettikleri ortalama mesafe, hareket hızı ve merkezde katettikleri mesafe değerleri ve bu değerler için gruplar arası karşılaştırmalar. (ort±ss)

	K (n=12)	SH (n=14)	O+D (n=12)	O (n=13)	O+D+H (n=12)	P değerleri
Merkez Dışında Katedilen Mesafe (cm)	2486 ± 943	2248 ± 716	1528 ± 677 ‡	2337 ± 730	2130 ± 329	0,017
Hareket Hızı (cm/s)	8,30 ± 3,14	7,50 ± 2,39	5,10 ± 2,26 ‡	7,80 ± 2,43	7,11 ± 1,09	0,017
Merkezde Katedilen Mesafe (cm)	36795 ± 5389	37412 ± 2787	22821 ± 2468 *‡	21182 ± 3267 *‡	22646 ± 2736 *‡	0,000

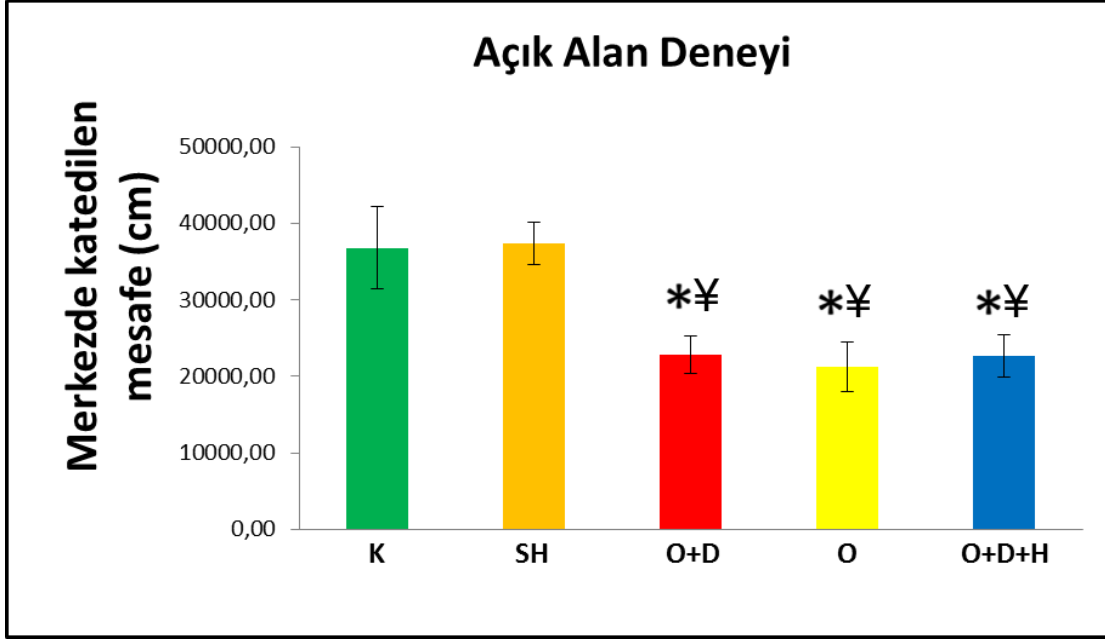
‡: K ile karşılaştırıldığında p<0,05, \*: K ile karşılaştırıldığında p<0,001, ‡: SH ile karşılaştırıldığında p<0,001.



Şekil 4.2. Açık alan deneyinde sıçanların katettikleri ortalama mesafenin (ort±ss) gruplar arası karşılaştırılması. F: K ile karşılaştırıldığında  $p<0,05$ .



Şekil 4.3. Açık alan deneyinde sıçanların ortalama hızlarının (ort±ss) gruplar arası karşılaştırılması. F: K ile karşılaştırıldığında  $p<0,05$ .



**Şekil 4.4.** Açık alan deneyinde sıçanların katettikleri ortalama mesafenin (ort±ss) gruplar arası karşılaştırılması.\*: K ile karşılaştırıldığında  $p<0,05$ , †: SH ile karşılaştırıldığında  $p<0,001$ .

#### 4.3.2. Morris Su Tankı (MST) Spasyal Hafıza Deneyleri

##### 4.3.2.1. Dört Günlük Öğrenme Sürecinde Elde Edilen Bulgular

Morris su tankı deneyinin öğrenme sürecini oluşturan birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü günlerinde her bir sıçanın yükseltiyi (platformu) bulmaları için ortalama katettikleri mesafe, yüzme hızları ve yükseltiyi bulmaları için geçen süreler hesaplandı.

##### 4.3.2.1.1. MST Deneyinde Ortalama Katedilen Mesafe

Bu parametrelerin karşılaştırılmasında birinci günden dördüncü güne kadar tüm gruplarda her bir günde yükseltiyi (platformu) bulmaları için ortalama katedilen mesafeler hesaplandı (Çizelge 4.4.). Güne göre katettikleri mesafelerin gruplar arasında

karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı (Çizelge 4.4, Şekil 4.5).

Güne göre sıçanların yükseltiyi bulmaları için katettikleri mesafelerin gruplar arasında karşılaştırılmasında 1. ve 2. gün açısından anlamlı bir fark saptanmazken, 3. ve 4. günler için gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı (Çizelge 4.4).

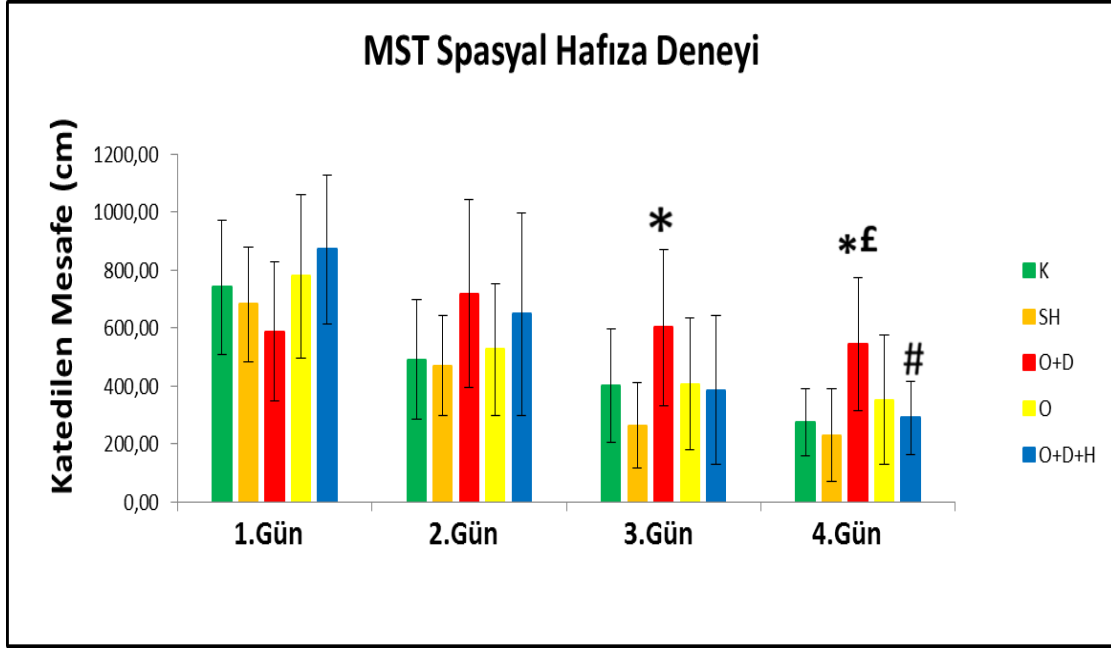
Buna göre 3. gün MST’ında platformu bulabilmek için katedilen ortalama mesafe, O+D grubunda tüm diğer gruplardan daha fazla olmasına karşın, istatistiksel olarak anlamlı farklılık sadece Sham grubu ile bulundu. Aynı parametrenin 4. gün değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması sonucunda, O+D grubunun ortalama değeri K, SH ve O gruplarından daha büyük olup, bunlardan O grubu dışındakilerle olan farkın anlamlı olduğu bulundu (Çizelge 4.4).

**Çizelge 4.4.** MST spasyal hafıza deneyinde sıçanların yükseltiyi bulmaları için katettikleri mesafenin (ort±ss) günlere göre gruplar arası değerleri

Katedilen mesafe (cm)	K n=12	SH n=14	O+D n=12	O n=13	O+D+H n=12	P Değerleri
1. Gün	741 ± 231	681 ± 196	587 ± 240	778 ± 281	871 ± 257	0,065
2. Gün	490 ± 206	469 ± 171	717 ± 324	525 ± 226	647 ± 349	0,092
3. Gün	402 ± 195	263 ± 146	601 ± 268 *	407 ± 225	386 ± 255	0,008
4. Gün	274 ± 116	230 ± 160	543 ± 228 *£	352 ± 221	291 ± 126 #	0,009

\*: SH ile karşılaştırıldığında p<0,05, £: K ile karşılaştırıldığında p<0,05, #: O+D ile karşılaştırıldığında p<0,05. (MST:Morris Su Tankı)

Ancak tedavi (O+D+H) grubunda, platformu bulmak için katedilen mesafe açısından AH modeli oluşturulmuş (O+D) gruba göre anlamlı azalma olduğu saptanmıştır. (Şekil 4.5)



Şekil 4.5. Güne göre platformu bulmak için sıçanların katettikleri mesafenin (ort±ss) gruplar arasında karşılaştırılması \*: SH ile karşılaştırıldığında  $p<0,05$ , £: K ile karşılaştırıldığında  $p<0,05$ , #: O+D ile karşılaştırıldığında  $p<0,05$ . (MST:Morris Su Tankı)

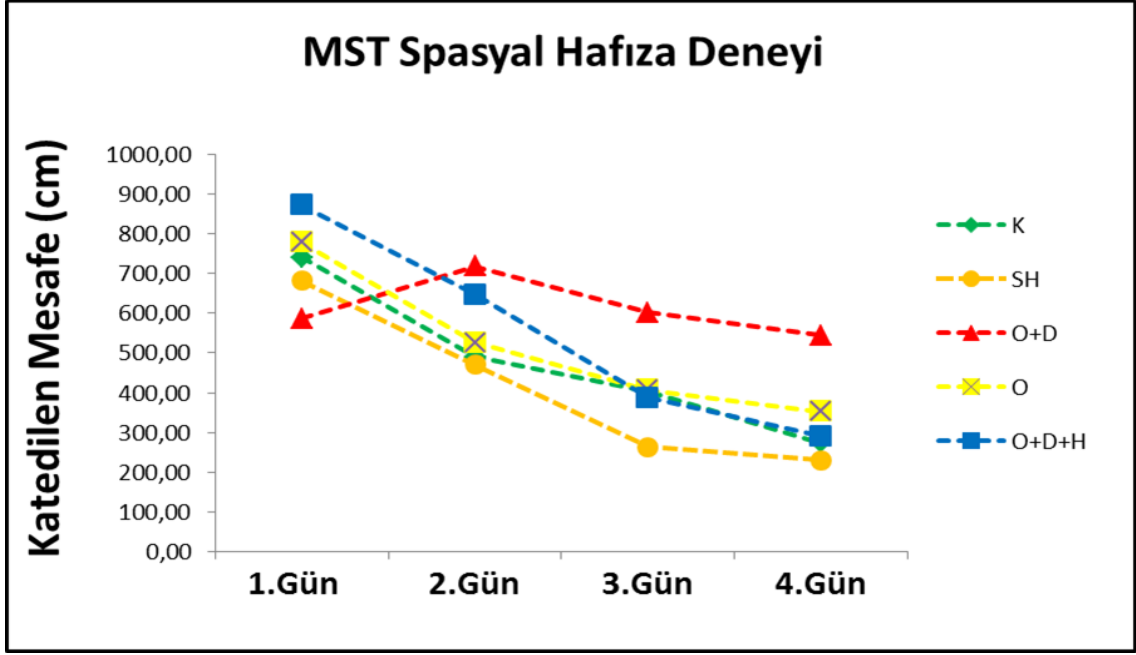
MST'de platformu bulmak için ortalama katedilen mesafenin her bir grup için günlere göre karşılaştırılması amacıyla yapılan tekrarlanan ölçümlü varyans analizine göre; O+D grubu dışında diğer gruplarda günlere göre katedilen ortalama mesafelerin istatistiksel olarak gün geçtikçe azaldığı saptandı ( $p<0,001$ ). O+D grubunda ise günler arasında katedilen ortalama mesafe karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ( $p=0,417$ ) (Çizelge 4.5) (Şekil 4.6).



**Çizelge 4.5.** MST spasyal hafıza deneyinde platformu bulmak için grupların günlere göre ortalama katettikleri mesafe (ort±ss)

Katedilen mesafe (cm)	K n=12	SH n=14	O+D n=12	O n=13	O+D+H n=12
1. Gün	741 ± 231	681 ± 196	587 ± 240	778 ± 281	871 ± 257
2. Gün	£ 490 ± 206	£ 469 ± 171	717 ± 324	£ 525 ± 226	647 ± 349
3. Gün	£ 402 ± 195	*# 263 ± 146	601 ± 268	£ 407 ± 225	*¥ 386 ± 255
4. Gün	*#F 274 ± 116	*# 230 ± 160	543 ± 228	*¥ 352 ± 221	*¥ 291 ± 126
P Değerleri	0,000	0,000	0,417	0,000	0,000

\*: 1. gün ile karşılaştırıldığında  $p < 0,001$ , #: 2. gün ile karşılaştırıldığında  $p < 0,001$ , F: 3. gün ile karşılaştırıldığında  $p < 0,05$ , £: 1. gün ile karşılaştırıldığında  $p < 0,05$ , ¥: 2. gün ile karşılaştırıldığında  $p < 0,05$ .



Şekil 4.6. Morris su tankı (MST) spasyal hafıza deneyinde grupların platformu bulmak için günlere göre katettiği mesafenin (ort±ss) ve günler arasındaki değişimin karşılaştırması.

#### 4.3.2.1.2. MST Deneyinde Ortalama Yükseltiyi Bulma Süreleri

Birinci günden dördüncü güne kadar her bir gün için ortalama yükseltiyi bulma sürelerinin gruplara göre değerleri hesaplandı ve gruplar arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.7) bulundu.

Güne göre sıçanların ortalama yükseltiyi bulma sürelerinin gruplar arasında karşılaştırılmasında 1. gün anlamlı bir fark saptanmazken, 2. 3. ve 4. günler için gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı (Çizelge 4.6). Buna göre 2. gün ortalama yükseltiyi bulma süreleri, O+D+H grubunda tüm diğer gruplardan daha fazla olmasına karşın, istatistiksel olarak anlamlı farklılık sadece SH grubu ile bulundu ( $p < 0,05$ ) Aynı parametrenin 3. ve 4. gün değerleri açısından AH modeli oluşturulmuş (O+D) grubunun tedavi (O+D+H) grubuna göre daha geç yükseltiyi bulmasına rağmen istatistiksel bir anlamlı farklılık saptanmadı. Çizelge 4.6'da, O+D grubu için MST deneyinin 3. gününde elde edilen ortalama yükseltiyi bulma süresinin K, SH ve O

gruplarına göre daha büyük olduğu, ancak bunlardan sadece SH grubu ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ( $p<0,05$ ) saptandığı görülmektedir.

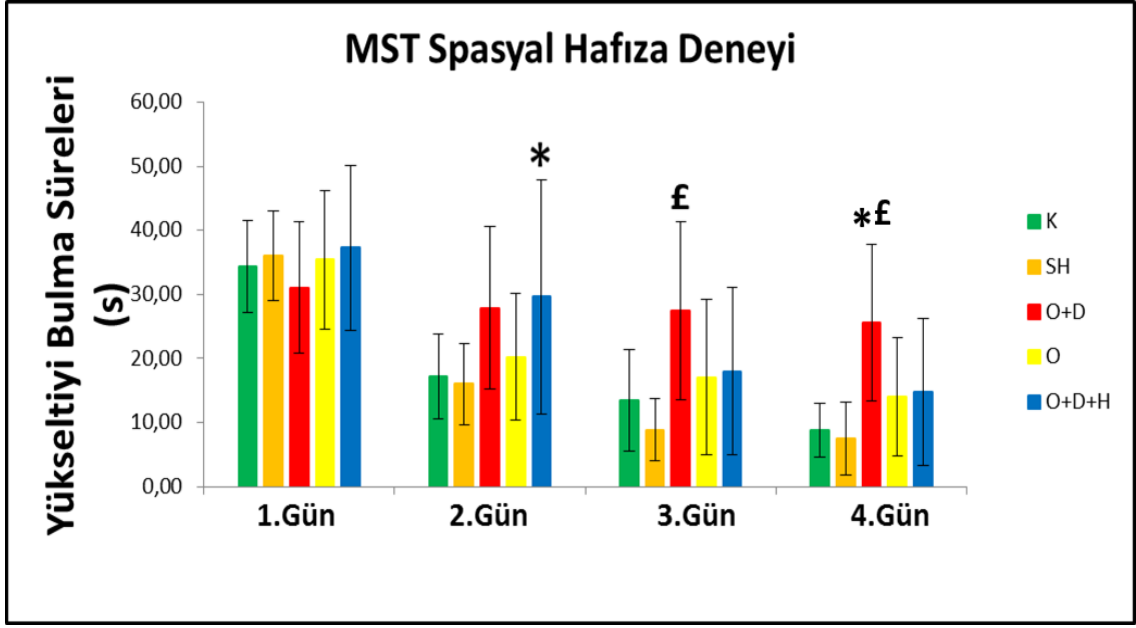
Aynı parametrenin 4. gün değerleri açısından AH oluşturulmuş (O+D) grubun değerinin K, SH ve O gruplarına göre daha büyük olduğu, ancak bunlardan sadece kontrol ve SH grubu ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ( $p<0,05$ ) saptandığı Çizelge 4.6 ve Şekil 4.7 'de görülmektedir.

Keza, hem 3. ve hem de 4. günlerde bulunan ortalama yükseltiyi bulma süreleri tedavi (O+D+H) grubunda hasta (O+D) gruba göre azalma göstermiş ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur.

**Çizelge 4.6.** MST spasyal hafıza deneyinde, her bir gün için ortalama yükseltiyi bulma sürelerinin gruplara göre değerleri (ort $\pm$ ss).

Yükseltiyi Bulma Süreleri (s)	K n=12	SH n=14	O+D n=12	O n=13	O+D+H n=12	P Değerleri
1. Gün	34,31 $\pm$ 7,2	36,02 $\pm$ 7,03	31,06 $\pm$ 10,31	35,42 $\pm$ 10,80	37,25 $\pm$ 12,90	0,600
2. Gün	17,15 $\pm$ 6,5	15,98 $\pm$ 6,3	27,87 $\pm$ 12,7	20,23 $\pm$ 9,8	29,61 $\pm$ 18,3 *	0,026
3. Gün	13,45 $\pm$ 7,99	8,83 $\pm$ 4,85	27,43 $\pm$ 13,8 *	17,07 $\pm$ 12,08	18,02 $\pm$ 13,11	0,001
4. Gün	8,82 $\pm$ 4,23	7,54 $\pm$ 5,72	25,62 $\pm$ 12,22 *£	13,99 $\pm$ 9,26	14,77 $\pm$ 11,47	0,001

\*: SH ile karşılaştırıldığında  $p<0,05$ , £: K ile karşılaştırıldığında  $p<0,05$ .



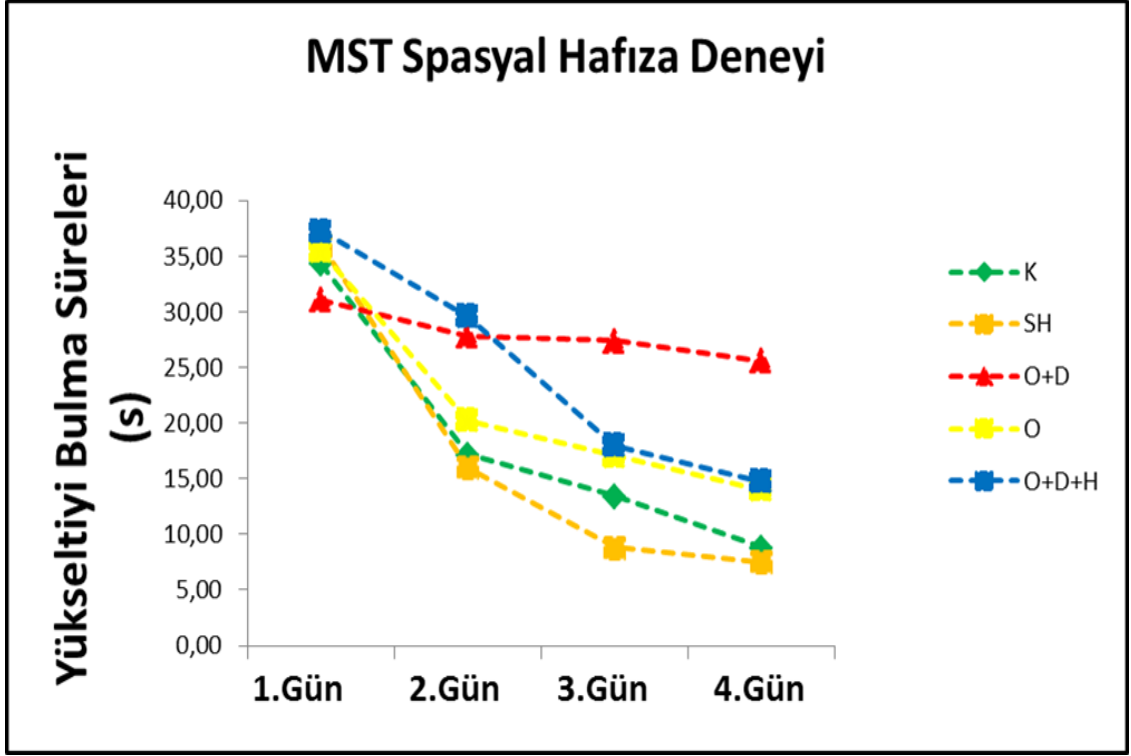
**Şekil 4.7.** Güne göre yükseltiyi bulma sürelerinin (ort±ss) gruplar arası karşılaştırılması. \*: SH ile karşılaştırıldığında  $p<0,05$ , £: K ile karşılaştırıldığında  $p<0,05$ . (MST:Morris Su Tankı)

Her bir grup için günlere göre elde edilen ortalama yükseltiyi bulma sürelerinin tekrarlanan ölçümlü varyans analizi ile karşılaştırılması sonucu; O+D hariç diğer diğer dört grupta (K, SH, O ve O+D+H) istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,001$ ) bir azalma saptandı (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.8).

**Çizelge 4.7.** Grupların günlere göre ortalama yükseltiyi bulma süreleri. (MTS Spasyal Hafıza Deneyi) (ortalama±standart sapma)

Yükseltiyi Bulma Süreleri (s)	K n=12	SH n=14	O+D n=12	O n=13	O+D+H n=12
1. Gün	34,31 ± 7,2	36,02 ± 7,03	31,06 ± 10,31	35,42 ± 10,80	37,25 ± 12,90
2. Gün	17,15 ± 6,5 *	15,98 ± 6,3 *	27,87 ± 12,7	20,23 ± 9,8 £	29,61 ± 18,3
3. Gün	13,45 ± 7,99 *	8,83 ± 4,85 *¥	27,43 ± 13,8	17,07 ± 12,08 *	18,02 ± 13,11 *¥
4. Gün	8,82 ± 4,23 *#	7,54 ± 5,72 *¥	25,62 ± 12,22	13,99 ± 9,26 *¥	14,77 ± 11,47 *¥
P Değerleri	0,000	0,000	0,674	0,000	0,000

\*: 1. gün ile karşılaştırıldığında  $p < 0,001$ , #: 2. gün ile karşılaştırıldığında  $p < 0,001$ , £: 1. gün ile karşılaştırıldığında  $p < 0,05$ , ¥: 2. gün ile karşılaştırıldığında  $p < 0,05$ .



Şekil 4.8. Grupların günlere göre yükseltiyi bulma sürelerinin ortalama değerlerinin ve günler arasındaki değişimin karşılaştırması (MST:Morris Su Tankı)

#### 4.3.2.1.3. MST Deneyinde Ortalama Yüzme Hızları

Birinci günden dördüncü güne kadar her bir gün için elde edilen yüzme hızlarının gruplara göre ortalama değerleri hesaplandı ve gruplar arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.9) bulundu.

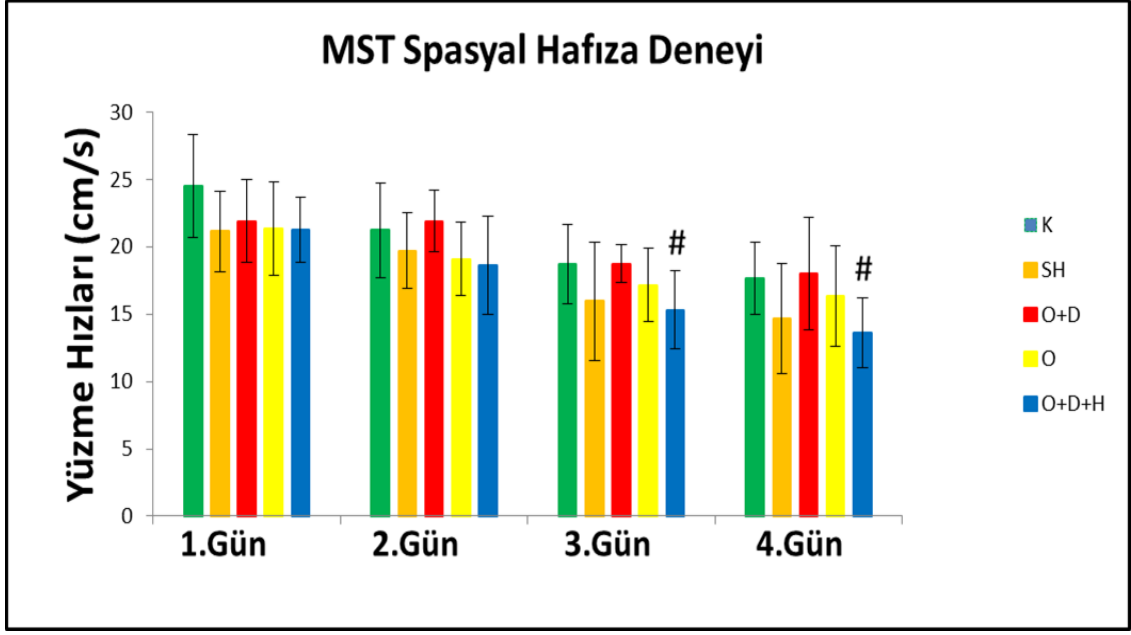
Güne göre sıçanların ortalama yüzme hızlarının gruplar arasında karşılaştırılmasında 1. ve 2. gün anlamlı bir fark saptanmazken, 3. ve 4. günler için gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı (Çizelge 4.8).

**Çizelge 4.8.** MST spasyal hafıza deneyinde ortalama yüzme hızlarının ( $\text{ort} \pm \text{ss}$ ) günlere göre gruplar arası değerleri

Yüzme Hızları (cm/s)	K n=12	SH n=14	O+D n=12	O n=13	O+D+H n=12	P Değerleri
1. Gün	24,5 ± 3,78	21,15 ± 3,01	21,9 ± 3,08	21,36 ± 3,46	21,2 ± 2,41	0,059
2. Gün	21,23 ± 3,54	19,73 ± 2,81	21,93 ± 2,27	19,12 ± 2,71	18,64 ± 3,68	0,046
3. Gün	18,73 ± 2,93	15,95 ± 4,39	18,74 ± 1,39	17,16 ± 2,70	# 15,31 ± 2,91	0,008
4. Gün	17,65 ± 2,70	14,70 ± 4,08	18,00 ± 4,20	16,31 ± 3,73	# 13,62 ± 2,56	0,014

#: O+D ile karşılaştırıldığında  $p < 0,05$ .

Buna göre 3. ve 4. gün MST'ında ortalama yüzme hızları, tedavi (O+D+H) grubunda tüm diğer gruplardan daha düşük olmasına karşın, istatistiksel olarak anlamlı fark sadece AH modeli oluşturulmuş (O+D) grubu ile saptandı ( $p < 0,05$ ) (Şekil 4.9).



**Şekil 4.9.** Günlere göre yüzme hızlarının (ort±ss) gruplar arası karşılaştırılması #: O+D ile karşılaştırıldığında  $p < 0,05$ . (MST:Morris Su Tankı)

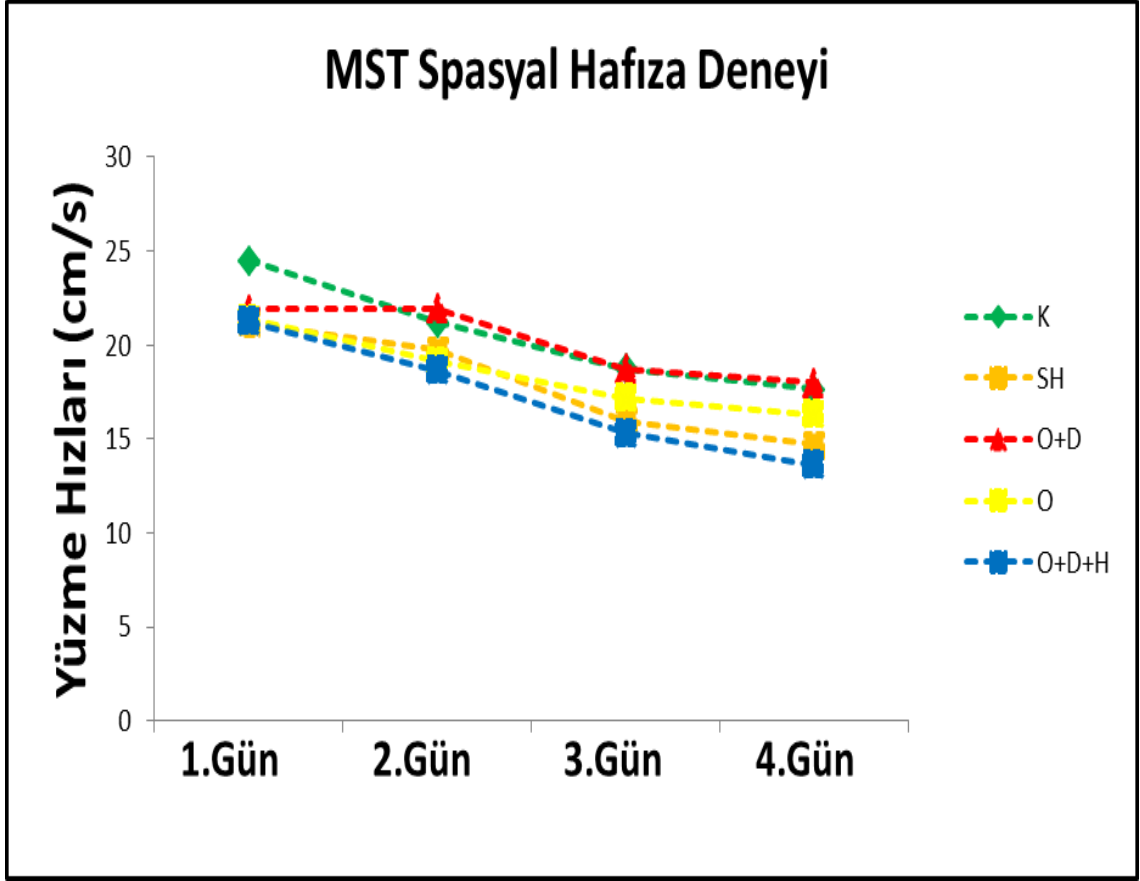
Her bir grup için günlere (1., 2., 3. ve 4. gün) göre elde edilen ortalama yüzme hızlarının tekrarlanan ölçümlü varyans analizi ile karşılaştırılması sonucu, tüm gruplarda gün geçtikçe yüzme hızlarının önceki günlere göre azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu (Çizelge 4.9 ve Şekil 4.10) bulundu.



**Çizelge 4.9.** Grupların günlere göre ortalama yüzme hızları (ort±ss) (MST Spasyal Hafıza Deneyi)

Yüzme Hızları (cm/s)	K n=12	SH n=14	O+D n=12	O n=13	O+D+H n=12
1. Gün	24,5 ± 3,78	21,15 ± 3,01	21,9 ± 3,08	21,36 ± 3,46	21,2 ± 2,41
2. Gün	£ 21,23 ± 3,54	19,73 ± 2,81	21,93 ± 2,27	19,12 ± 2,71	£ 18,64 ± 3,68
3. Gün	*¥ 18,73 ± 2,93	*¥ 15,95 ± 4,39	£# 18,74 ± 1,39	£¥ 17,16 ± 2,70	*¥ 15,31 ± 2,91
4. Gün	*¥ 17,65 ± 2,70	*¥ 14,70 ± 4,08	£¥ 18,00 ± 4,20	£¥ 16,31 ± 3,73	*# 13,62 ± 2,56
P Değerleri	0,000	0,000	0,005	0,001	0,000

\*: 1. gün ile karşılaştırıldığında p<0,001, #: 2. gün ile karşılaştırıldığında p<0,001, £: 1. gün ile karşılaştırıldığında p<0,05, ¥: 2. gün ile karşılaştırıldığında p<0,05.



Şekil 4.10. Grupların günlere göre elde edilen ortalama yüzme hızı değerleri ve günler arasındaki değişimin karşılaştırması (MST:Morris Su Tankı)

#### 4.3.2.2. Spasyal Hafızanın (Hatırlamanın) Test Edildiği Son Gün (5.Gün) Bulguları

Spasyal hafıza deneyinin beşinci gününde sıçanların daha önceki günlerde (1, 2, 3, 4) yükseltinin olduğu Güney-Batı kadranda (KD1) geçirdikleri ortalama süre, ile katettikleri mesafe ve yüzme hızları hesaplandı.

#### 4.3.2.2.1. MST Deneyinde (5.Gün) Yükseltinin Bulunduğu Kadrandaki Geçirilen Ortalama Süre

Güney-Batı kadranında (KD1) geçirilen ortalama sürenin gruplar arası karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ( $p=0,630$ ) saptanmadı (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.11).

Morris su tankı spasyal hafıza deneyinde grupların 5. günde kadranlarda (KD1, KD2, KD3 ve KD4) geçirdikleri ortalama süre değerleri ve her bir kadran için gruplar arası karşılaştırmaları Çizelge 4.11’de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.10.** MST spasyal hafıza deneyinde grupların 5. günde KD1’de geçirdikleri sürenin yüzde olarak değerleri (ort±ss).

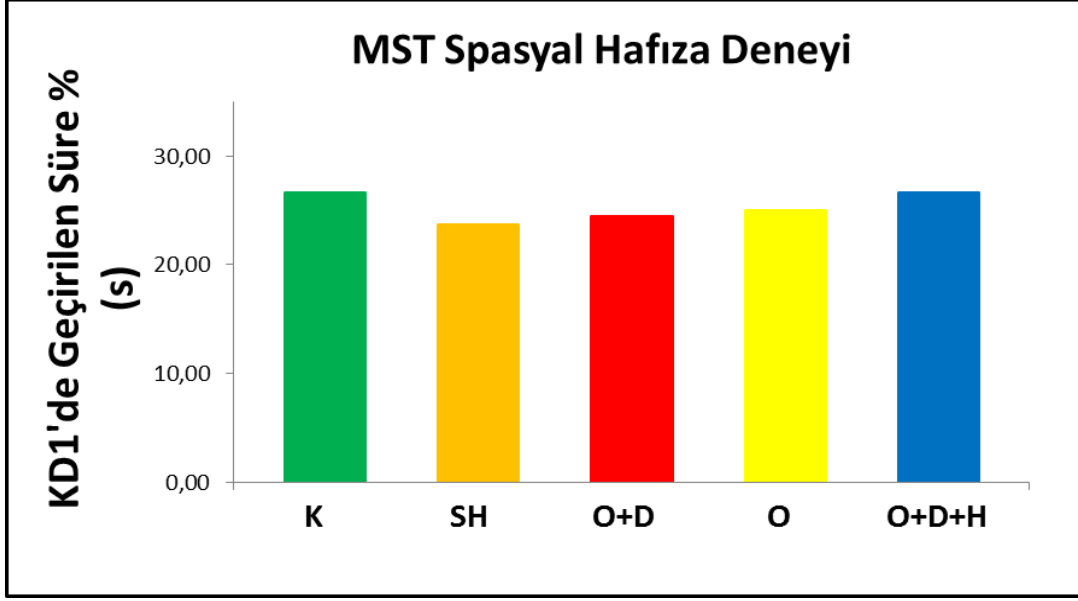
	<b>KD1’de Geçirilen Süre ( % ) (s)</b>
<b>K n=12</b>	<b>26,60 ± 4,62</b>
<b>SH n=14</b>	<b>23,70 ± 4,31</b>
<b>O+D n=12</b>	<b>24,48 ± 8,14</b>
<b>O n=13</b>	<b>25,04 ± 3,32</b>
<b>O+D+H n=12</b>	<b>26,58 ± 7,03</b>
<b>P Değerleri</b>	<b>0,630</b>

KD1: Güney-Batı Kadranı

**Çizelge 4.11.** MST spasyal hafıza deneyinde grupların 5. günde kadrarlarda geçirdikleri sürelerin (ort±ss) gruplar arası karşılaştırılması.

Geçirilen Süreler % (s)	K n=12	SH n=14	O+D n=12	O n=13	O+D+H n=12	P Değerleri
KD1	26,60 ± 4,62	23,70 ± 4,31	24,48 ± 8,14	25,04 ± 3,32	26,58 ± 7,03	0,630
KD2	22,50 ± 4,48	20,97 ± 3,52	25,63 ± 6,00	22,97 ± 4,45	23,30 ± 5,54	0,201
KD3	27,75 ± 2,76	28,66 ± 2,71	23,93 ± 4,97	30,89 ± 4,08	28,53 ± 7,52	0,011
KD4	31,43 ± 2,20	31,49 ± 2,29	32,32 ± 4,46	33,25 ± 5,00	32,97 ± 6,12	0,746

∅:O grubu ile karşılaştırıldığında (p<0,05), KD1: Güney-Batı Kadranı (yükseltinin olduğu kadrar), KD2:Kuzey-Batı Kadranı, KD3: Kuzey-Doğu Kadranı, KD4: Güney-Doğu Kadranı.



**Şekil 4.11.** Beşinci günde KD1 (Güney-Batı) kadrında geçirilen sürenin (ort) gruplara göre dağılımı (MST: Morris Su Tankı)

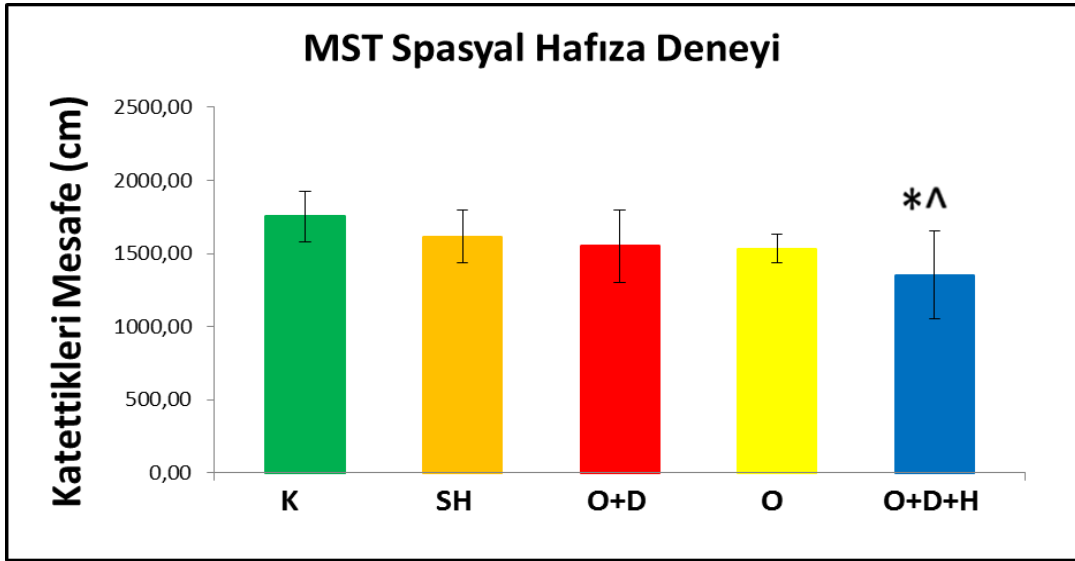
#### 4.3.2.2.2. MST Deneyinde (5.Gün) Ortalama Katedilen Mesafe

Spasyal hafıza deneyinin beşinci gününde katedilen mesafenin gruplar arası karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0,001$ ) bir fark saptandı (Çizelge 4.12 ve Şekil 4.12).

**Çizelge 4.12.** MST spasyal hafıza deneyinde grupların 5. günde katettikleri mesafenin (ort±ss) gruplar arası karşılaştırmaları.

	K n=12	SH n=14	O+D n=12	O n=13	O+D+H n=12	P Değerleri
Katettikleri Mesafe (cm)	1752 ± 172	1617 ± 181	1551 ± 249	1533 ± 98	1353 ± 298 *^	0,001

\*: K ile karşılaştırıldığında  $p<0,001$ , ^: SH ile karşılaştırıldığında  $p<0,05$ .



**Şekil 4.12.** Morris su tankı (MST) deneyinin beşinci gününde katedilen mesafenin (ort±ss) gruplara göre dağılımı.. \*: K ile karşılaştırıldığında  $p<0,001$ , ^: SH ile karşılaştırıldığında  $p<0,05$ .

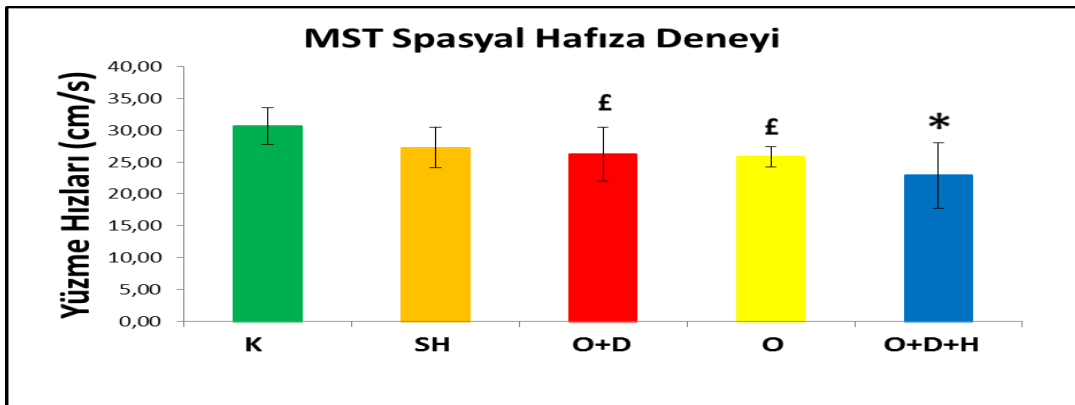
#### 4.3.2.2.3. MST Deneyinde (5.Gün) Ortalama Yüzme Hızları

Spasyal hafıza deneyinin beşinci gününde yüzme hızlarının gruplar arası karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0,001$ ) bir fark saptandı (Çizelge 4.13 ve Şekil 4.13).

**Çizelge 4.13.** MST spasyal hafıza deneyinde grupların 5. günde yüzme hızlarının (ort $\pm$ ss) gruplar arası karşılaştırmaları.

	K n=12	SH n=14	O+D n=12	O n=13	O+D+H n=12	P Değerleri
Yüzme Hızları (cm/sn)	30,67 $\pm$ 2,87	27,26 $\pm$ 3,15	26,20 $\pm$ 4,24 $\text{£}$	25,81 $\pm$ 1,59 $\text{£}$	22,91 $\pm$ 5,13 *	0,000

.\*: K ile karşılaştırıldığında  $p < 0,001$ , £: K ile karşılaştırıldığında  $p < 0,05$ .



**Şekil 4.13.** Morris su tankı (MST) deneyinin beşinci gününde yüzme hızlarının (ort $\pm$ ss) gruplara göre dağılımı. \*: K ile karşılaştırıldığında  $p < 0,001$ , £: K ile karşılaştırıldığında  $p < 0,05$ .

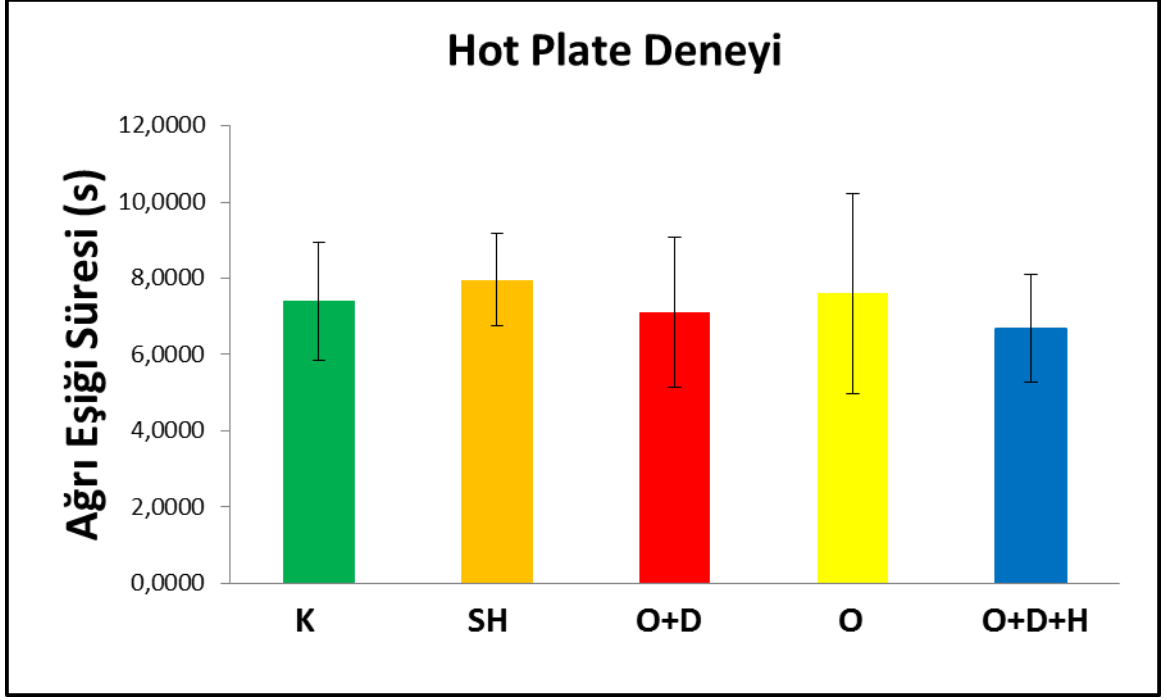
#### 4.4. Sıcak Plaka (Hot Plate) Deneyi

Hot plate deneyi sıçanların doğumunu takiben 28. haftasında gerçekleştirildi. Ağrı eşiğinin değerlendirilmesinde, hayvanın ağrıyı algıladığını gözleme kriteri olarak arka ayağını çekme davranışı esas alındı. Her grupta ağrı eşiği süreleri ölçüldü. Gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (Çizelge 4.14 ve Şekil 4.14).

**Çizelge 4.14.** Sıcak plaka (Hot plate) deneyi ile elde edilen gruplara ait ağrı eşiği sürelerinin (ort $\pm$ ss) değerleri.

	<b>Ağrı Eşiği Süresi (s)</b>
<b>K</b> <b>n=12</b>	<b>7,4 <math>\pm</math> 1,55</b>
<b>SH</b> <b>n=14</b>	<b>7,9 <math>\pm</math> 1,2</b>
<b>O+D</b> <b>n=12</b>	<b>7,1 <math>\pm</math> 1,9</b>
<b>O</b> <b>n=13</b>	<b>7,6 <math>\pm</math> 2,6</b>
<b>O+D+H</b> <b>n=12</b>	<b>6,6 <math>\pm</math> 1,4</b>
<b>P</b> <b>Değeri</b>	<b>0,504</b>





Şekil 4.14. Ağrı eşiği süresinin (ort $\pm$ ss) gruplara göre dağılımı

#### 4.5. EDL Kası Elektriksel ve Mekanik Aktivite Bulguları

AH'nın ilerleyen sürecinde A $\beta$  plakların kas dokusunda aşırı birikmesi sonucu gelişebilen ve AH patofizyolojisine çok benzerlik gösteren ICM'nin, bu çalışmada oluşturulan sıçan modelinde gelişip gelişmediği EDL kasının elektriksel ve mekanik aktivite kayıtları ve histolojik analizlerle değerlendirildi.

##### 4.5.1. EDL Kası Elektriksel Bulguları (EMG)

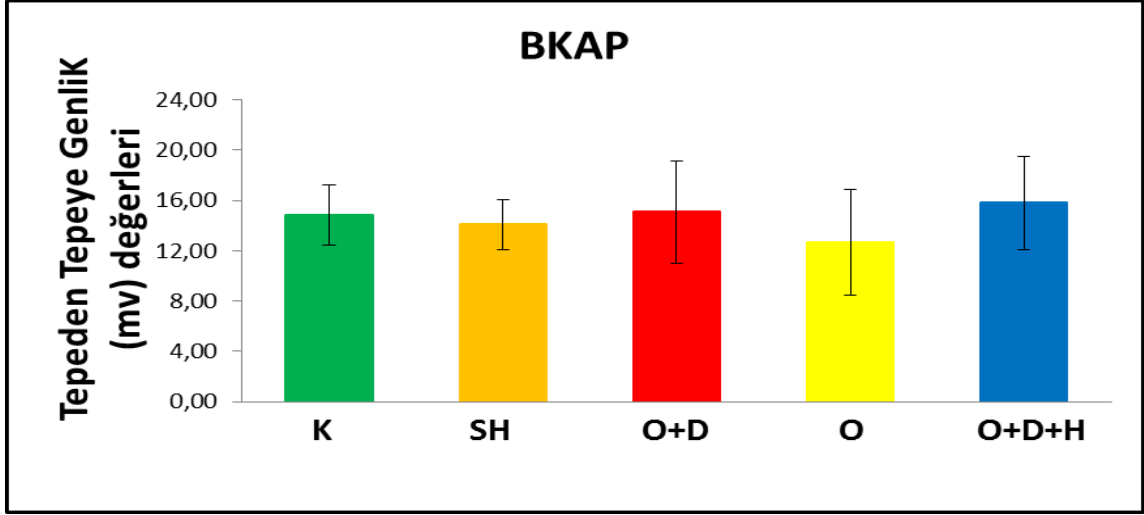
Araştırmamızda tüm gruplardan BKAP eğrileri EMG kullanılarak kayıtlandı. Çizelge 4.15'de BKAP eğrisinden ölçülen parametrelerin ortalama ve standart sapma değerleri görülmektedir.

**Çizelge 4.15.** Gruplara göre bileşik kas aksiyon potansiyeli (BKAP) parametrelerine ait değerler (ort±ss).

BKAP Parametreleri	K n=6	SH n=6	O+D n=6	O n=7	O+D+H n=6	P Değerleri
Tepeden tepeye genlik (mv)	14,84 ± 2,36	14,11 ± 1,99	15,07 ± 4,08	12,68 ± 4,21	15,80 ± 3,69	0,55
Genlik (mv)	6,20 ± 1,77	7,29 ± 1,71	7,78 ± 2,61	5,97 ± 2,03	7,63 ± 1,50	0,358
Tepe latans (ms)	4,37 ± 0,59	2,98 ± 1,44	3,54 ± 0,48	3,33 ± 1,08	3,38 ± 0,32	0,123
Toplam Süre (ms)	5,09 ± 0,68	4,24 ± 1,96	4,19 ± 0,88	4,01 ± 0,92	4,15 ± 0,64	0,179
Depolarizasyon süresi (ms)	1,42 ± 0,44	0,87 ± 0,49	0,89 ± 0,25	0,85 ± 0,44	0,76 ± 0,16	0,096
%50 repolarizasyon süresi (ms)	1,84 ± 0,22	1,68 ± 0,81	1,65 ± 0,46	1,58 ± 0,32	1,69 ± 0,25	0,634
Alan (mV.ms)	0,009 ± 0,003	0,007 ± 0,004	0,009 ± 0,003	0,006 ± 0,003	0,008 ± 0,002	0,477

#### 4.5.1.1. BKAP Tepeden Tepeye Genlik (Peak to Peak Amplitude)

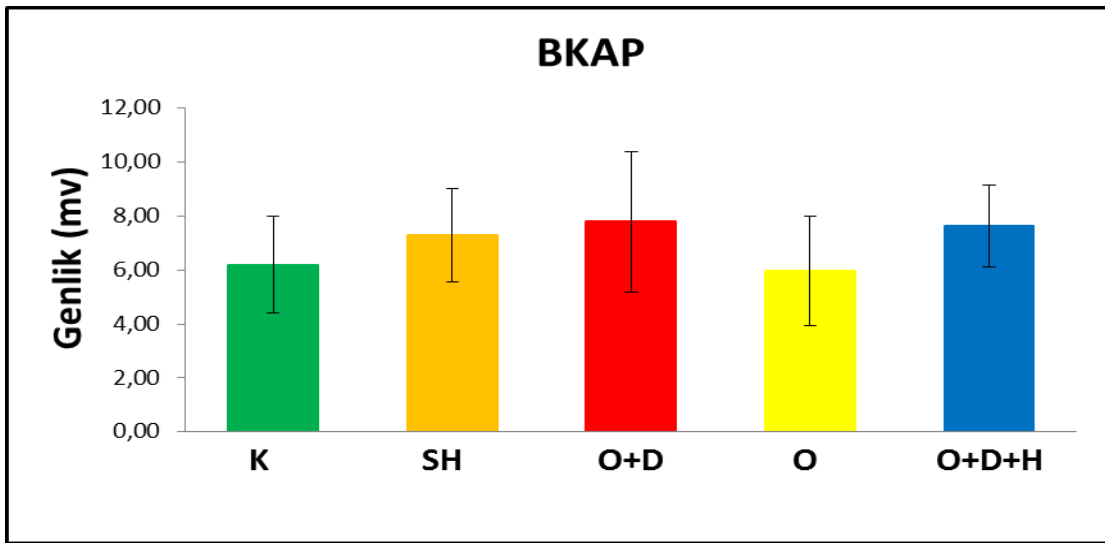
BKAP’i tepeden tepeye genlik değerinde, istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı (p=0,55) (Çizelge 4.15 ve Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Bileşik kas aksiyon potansiyeli (BKAP) tepeden tepeye genliğinin (ort±ss) gruplara göre dağılımı

#### 4.5.1.2. BKAP Genlik (Amplitude)

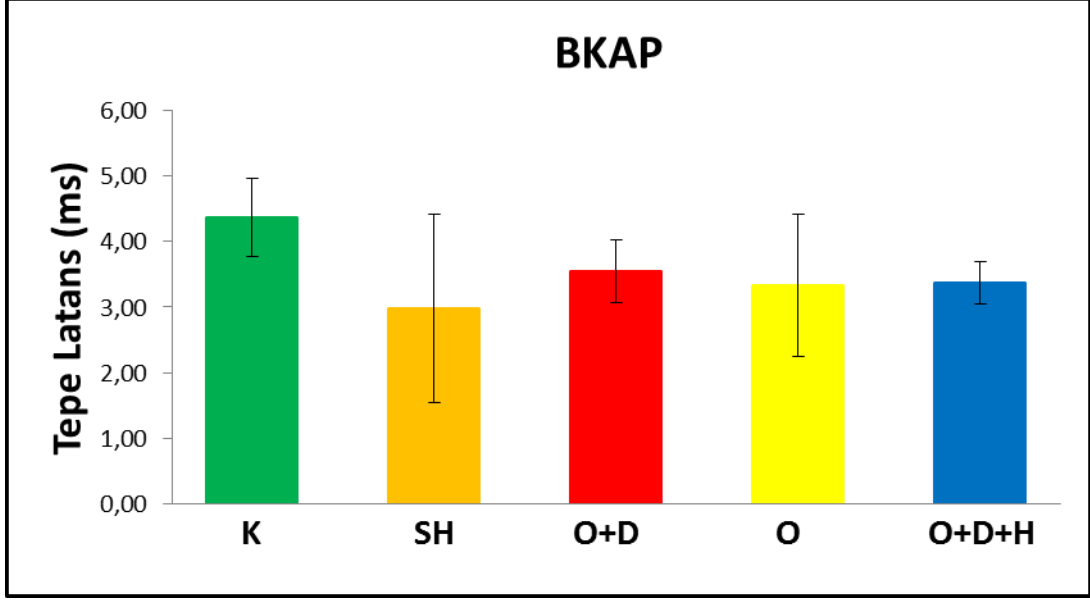
BKAP'i genlik değerinde, istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı ( $p=0,358$ ) (Çizelge 4.15 ve Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Bileşik kas aksiyon potansiyeli (BKAP) genliğinin (ort±ss) gruplara göre dağılımı.

#### 4.5.1.3. BKAP Tepe (Peak) Latansı

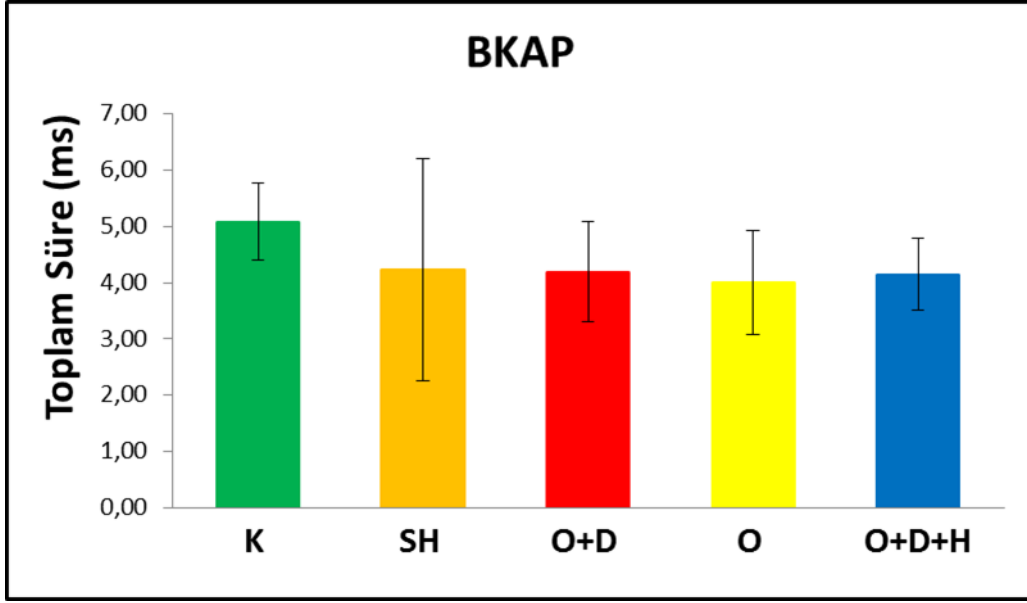
BKAP’i tepe latans değerinde, istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı ( $p=0,123$ ) (Çizelge 4.15 ve Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Bileşik kas aksiyon potansiyeli (BKAP) tepe latansının ( $ort\pm ss$ ) gruplara göre dağılımı

#### 4.5.1.4. BKAP Toplam Süre (Duration)

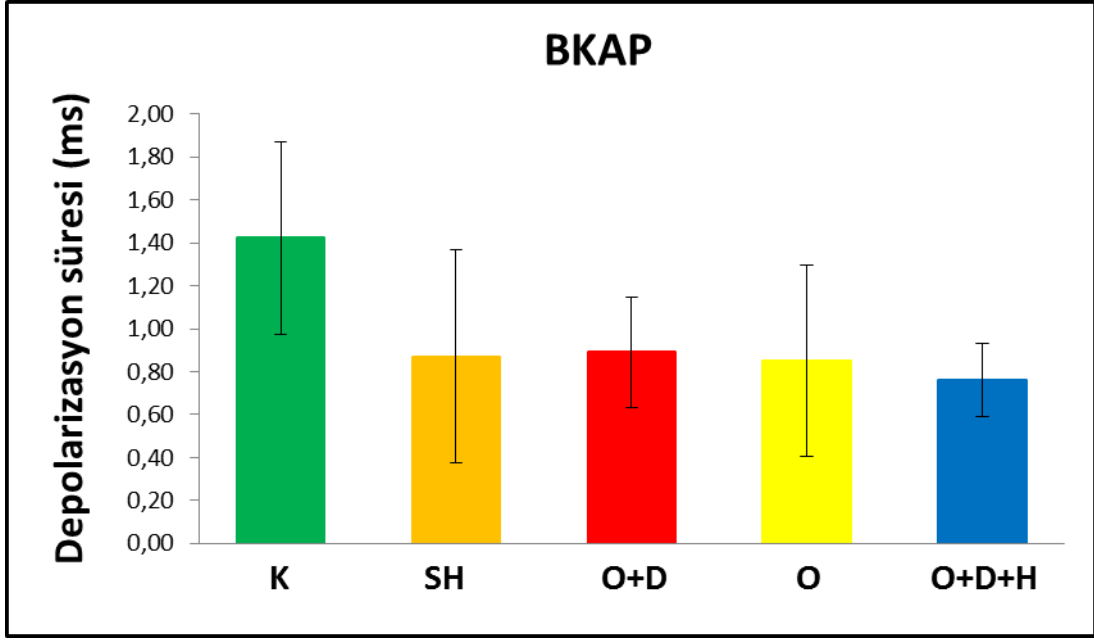
BKAP’nin toplam süre değerinde, istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı ( $p=0,179$ ) (Çizelge 4.15 ve Şekil 4.18).



**Şekil 4.18.** Bileşik kas aksiyon potansiyeli (BKAP) toplam süresinin (ort $\pm$ ss) gruplara göre dağılımı.

#### 4.5.1.5. BKAP Depolarizasyon Süresi

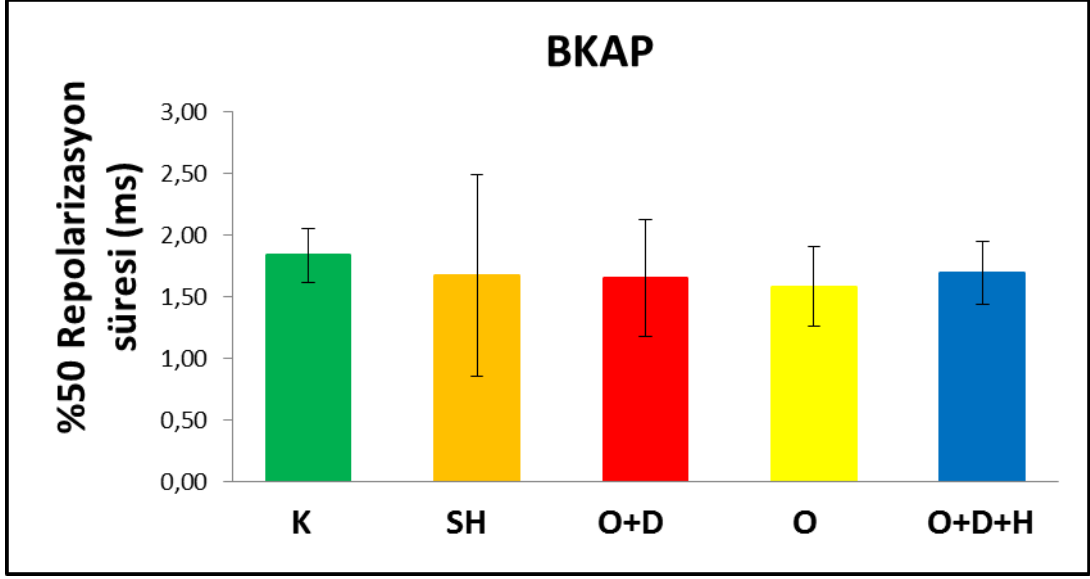
BKAP'nin depolarizasyon süresinde, istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı ( $p=0,096$ ) (Çizelge 4.15 ve Şekil 4.19).



**Şekil 4.19.** Bileşik kas aksiyon potansiyeli (BKAP) depolarizasyon süresinin (ort±ss) gruplara göre dağılımı.

#### **4.5.1.6. BKAP %50 Repolarizasyon Süresi**

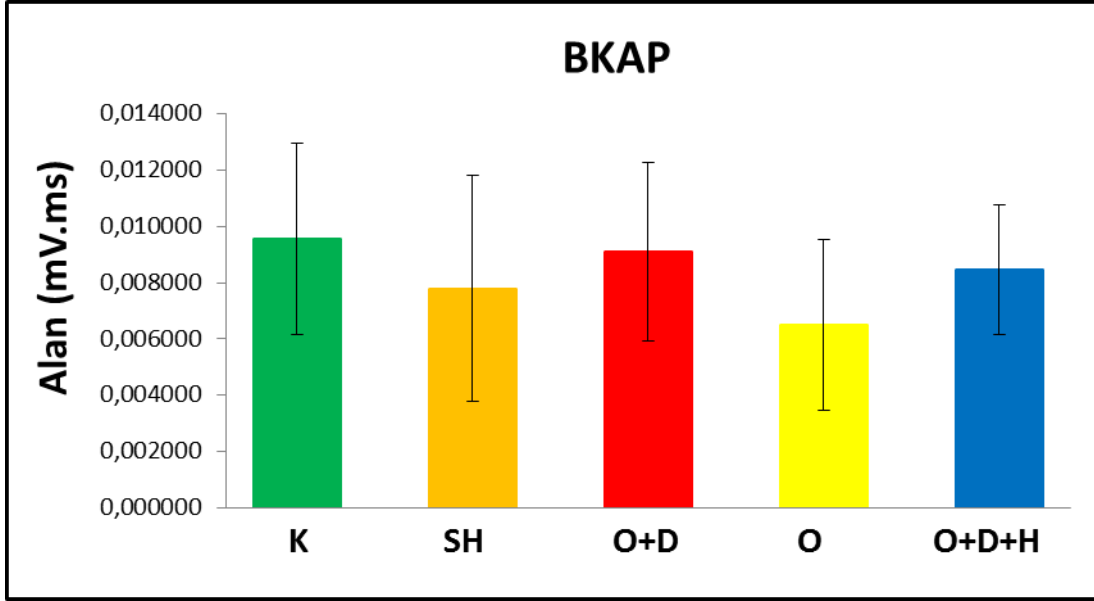
BKAP %50 repolarizasyon süresinde, istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı ( $p=0,634$ ) (Çizelge 4.15 ve Şekil 4.20).



Şekil 4.20. Bileşik kas aksiyon potansiyeli (BKAP) %50 repolarizasyon süresinin (ort±ss) gruplara göre dağılımı.

#### 4.5.1.7. BKAP Alan

BKAP alan değerinde, istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı ( $p=0,477$ ) (Çizelge 4.15 ve Şekil 4.21).



**Şekil 4.21.** Bileşik kas aksiyon potansiyeli (BKAP) alan değerlerinin (ort±ss) gruplara göre dağılımı.

#### 4.5.2. EDL Kasının Mekanik Bulguları

##### 4.5.2.1. EDL Kasını Optimum Boyuna Getiren Ön Gerim Değerleri

EDL kasında maksimum kasılma kuvveti oluşturmak için kası optimum boya getiren ön gerimler uygulandı (Çizelge 4.16 ve Şekil 4.22). Uygulanan ön gerimler için, gerek her bir uyarı protokolü için yapılan gruplar arası karşılaştırmalarda (Çizelge 4.16) ve gerekse her bir grup için uyarı protokolleri arası yapılan karşılaştırmalarda (Çizelge 4.17) istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı.

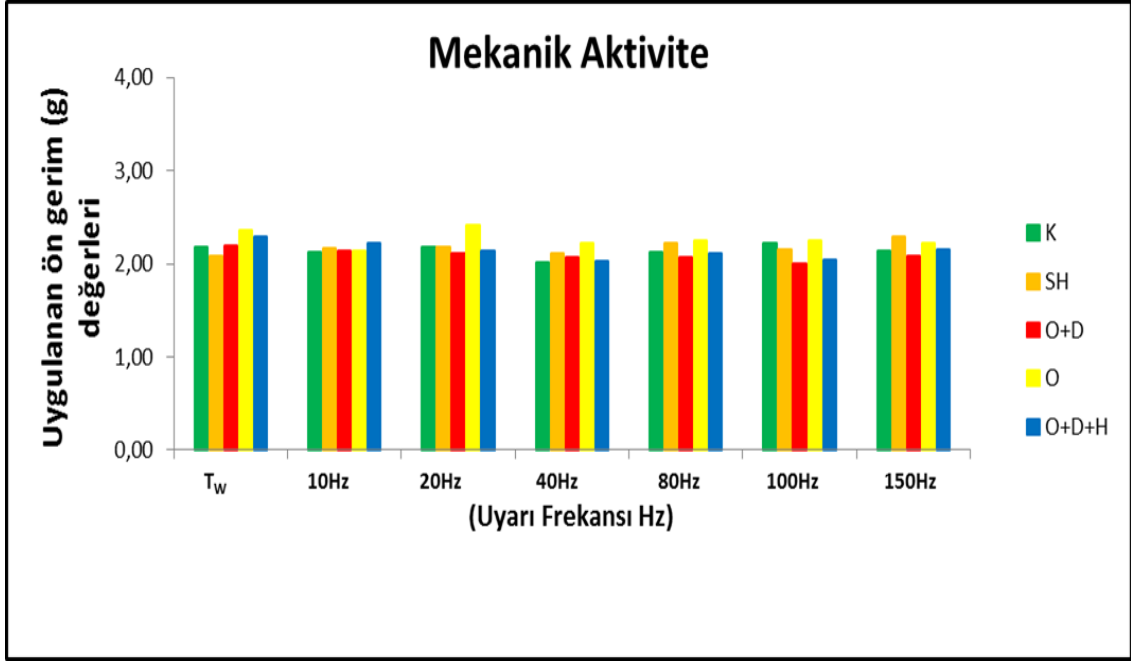


**Çizelge 4.16.** Kas mekanik aktivitesinde her bir uyarı protokolü için uygulanan ön gerim (g) değerlerinin (ort±ss) gruplar arası karşılaştırılması Tw:Tek uyarı.

	Tw	10 Hz	20 Hz	40 Hz	80 Hz	100 Hz	150 Hz
<b>K</b> n=6	2,19 ± 0,31	2,12 ± 0,15	2,19 ± 0,32	2,01 ± 0,09	2,12 ± 0,13	2,22 ± 0,26	2,13 ± 0,04
<b>SH</b> n=6	2,09 ± 0,17	2,17 ± 0,10	2,18 ± 0,08	2,12 ± 0,08	2,23 ± 0,21	2,16 ± 0,15	2,29 ± 0,10
<b>O+D</b> n=6	2,19 ± 0,14	2,14 ± 0,10	2,11 ± 0,11	2,07 ± 0,06	2,07 ± 0,10	2,01 ± 0,23	2,09 ± 0,27
<b>O</b> n=7	2,36 ± 0,23	2,14 ± 0,19	2,42 ± 0,48	2,22 ± 0,94	2,25 ± 0,30	2,25 ± 0,19	2,22 ± 0,13
<b>O+D+H</b> n=6	2,29 ± 0,13	2,22 ± 0,16	2,13 ± 0,07	2,04 ± 0,19	2,11 ± 0,07	2,04 ± 0,20	2,16 ± 0,16
<b>P</b> Değerleri	0,209	0,817	0,237	0,907	0,471	0,205	0,110

**Çizelge 4.17.** Kas mekanik aktivitesinde her bir grup için uygulanan ön gerim (g) değerlerinin (ort±ss) uyarı protokolleri arası karşılaştırılması Tw:Tek uyarı.

	Tw	10 Hz	20 Hz	40 Hz	80 Hz	100 Hz	150 Hz	P Değerleri
<b>K</b> n=6	2,19 ± 0,31	2,12 ± 0,15	2,19 ± 0,32	2,01 ± 0,09	2,12 ± 0,13	2,22 ± 0,26	2,13 ± 0,04	0,538
<b>SH</b> n=6	2,09 ± 0,17	2,17 ± 0,10	2,18 ± 0,08	2,12 ± 0,08	2,23 ± 0,21	2,16 ± 0,15	2,29 ± 0,10	0,317
<b>O+D</b> n=6	2,19 ± 0,14	2,14 ± 0,10	2,11 ± 0,11	2,07 ± 0,06	2,07 ± 0,10	2,01 ± 0,23	2,09 ± 0,27	0,313
<b>O</b> n=7	2,36 ± 0,23	2,14 ± 0,19	2,42 ± 0,48	2,22 ± 0,94	2,25 ± 0,30	2,25 ± 0,19	2,22 ± 0,13	0,585
<b>O+D+H</b> n=6	2,29 ± 0,13	2,22 ± 0,16	2,13 ± 0,07	2,04 ± 0,19	2,11 ± 0,07	2,04 ± 0,20	2,16 ± 0,16	0,160



Şekil 4.22. Tek ( $T_w$ ) ve farklı frekanslı uyarı protokollerinde gruplara uygulanan ortalama ön gerim değerleri

#### 4.5.2.2. Kas Mekanik Aktivite Parametreleri

Her bir EDL kasını kendi optimum boyuna getiren uygun ön gerimler kasa uygulandıktan sonra, 5'er dakika ara ile tek uyarı, 10, 20, 40, 80, 100 ve 150 Hz frekanslı uyarılar verildi ve her bir uyarı için kas mekanik aktivite yanıtları kayıtları (Çizelge 4.18).

**Çizelge 4.18.** Kas mekanik aktivite parametrelerinin değerleri (ort±ss)

	K n=6	SH n=6	O+D n=6	O n=7	O+D+H n=6	P Değerleri
Uygulanan ön gerim (g)	2,14 ± 0,18	2,17 ± 0,13	2,10 ± 0,14	2,27 ± 0,35	2,14 ± 0,14	0,306
TW için kasılma süresi (CT) (ms)	38,02 ± 5,40	30,53 ± 3,76	30,52 ± 7,43	£ 27,69 ± 3,53	36,79 ± 7,22	0,013
TW için yarı gevşeme süresi (%50 RT) (ms)	81,04 ± 14,06	£ 47,08 ± 9,39	60,33 ± 12,3	£ 48,59 ± 16,1	63,56 ± 25,4	0,008
TW için toplam sarsı süresi (TCT) (ms)	200,10 ± 24,9	£ 124,69 ± 17,1	151,18 ± 24,4	£ 124,87 ± 32,8	163,91 ± 55,5	0,003
$P_{TW}$ (N/cm <sup>2</sup> )	1,93 ± 0,36	£ 0,69 ± 0,20	* 0,64 ± 0,25	* 0,57 ± 0,30	¥ 1,45 ± 0,95	0,000
$P_0$ (N/cm <sup>2</sup> )	9,44 ± 2,06	6,39 ± 1,53	£ 4,46 ± 1,65	£ 5,08 ± 2,77	7,30 ± 3,01	0,007

Tw: Tek uyarı ile oluşan sarsı eğrisi.

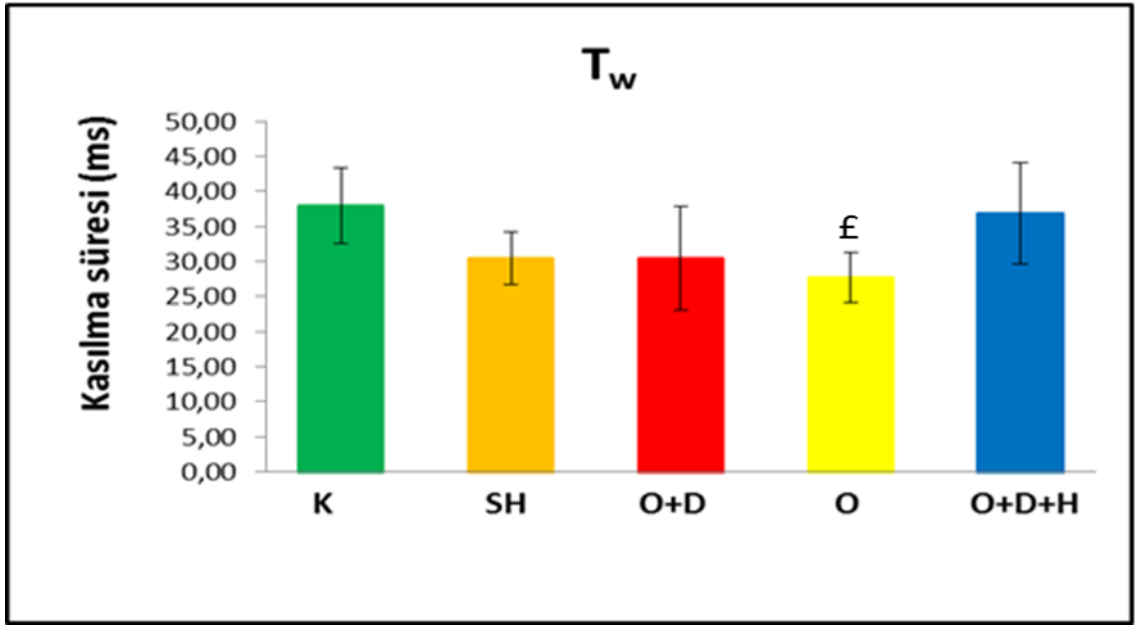
$P_{TW}$  : Tek uyarı ile oluşan sarsı eğrisinden elde edilen tepe sarsı kuvvet değerinin kas birim yüzey alanına bölünerek elde edilen değeri.

$P_0$  : Frekansı 150 Hz olan uyarı katarma karşı oluşan maksimum tetanik kuvvet değerinin kas birim yüzey alanına bölünerek elde edilen değeri.

\*: K ile karşılaştırıldığında  $p < 0,001$ , £: K ile karşılaştırıldığında  $p < 0,05$ , ¥: O ile karşılaştırıldığında  $p < 0,05$ .

#### 4.5.2.2.1. Tek Bir Uyarıya (Tw) Yanıt Olarak Kaydedilen Sarsı Eğrisinin Kasılma Süresi (CT)

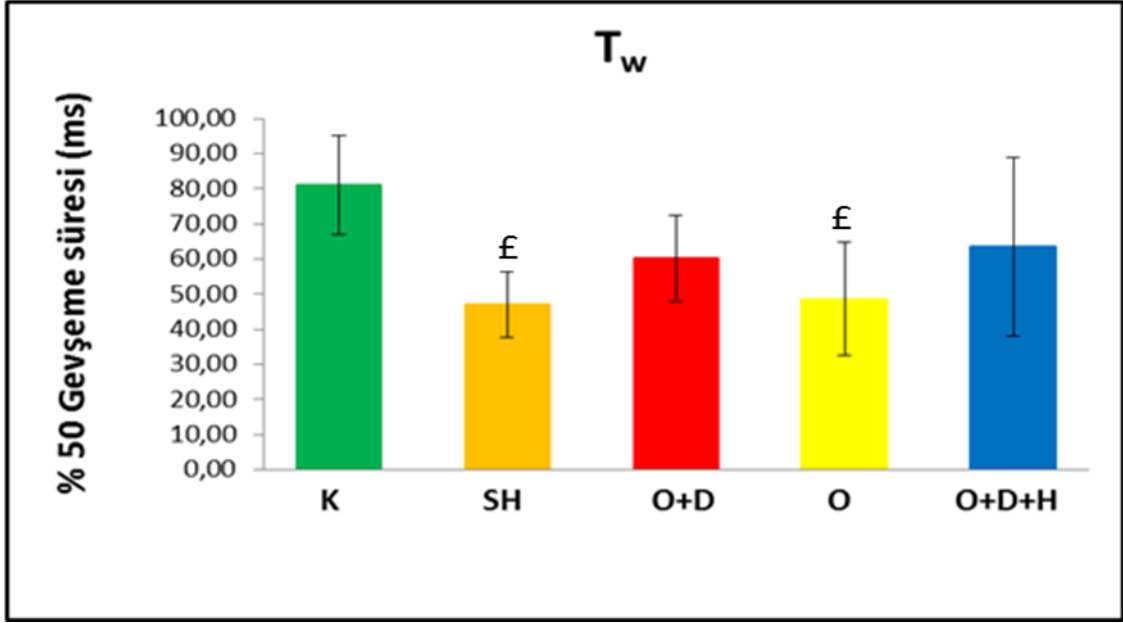
Tek bir kare puls (0,5 ms süre ve supramaksimal genlik) uygulanan kaslardan kayıtlanmış sarsı eğrilerinin kasılma süresinin gruplar arası karşılaştırma sonuçlarında, O grubunun K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma ( $p<0,05$ ) gösterdiği saptandı (Çizelge 4.18 ve Şekil 4.23).



Şekil 4.23. Tek kare puls (Tw) uygulanan grupların kasılma süreleri (ort±ss) değerleri. £: K ile karşılaştırıldığında  $p<0,05$ .

#### 4.5.2.2.2. Tek Bir Uyarıya Yanıt Olarak Kaydedilen Sarsı Eğrisinin Yarı Gevşeme Süresi (%50 RT)

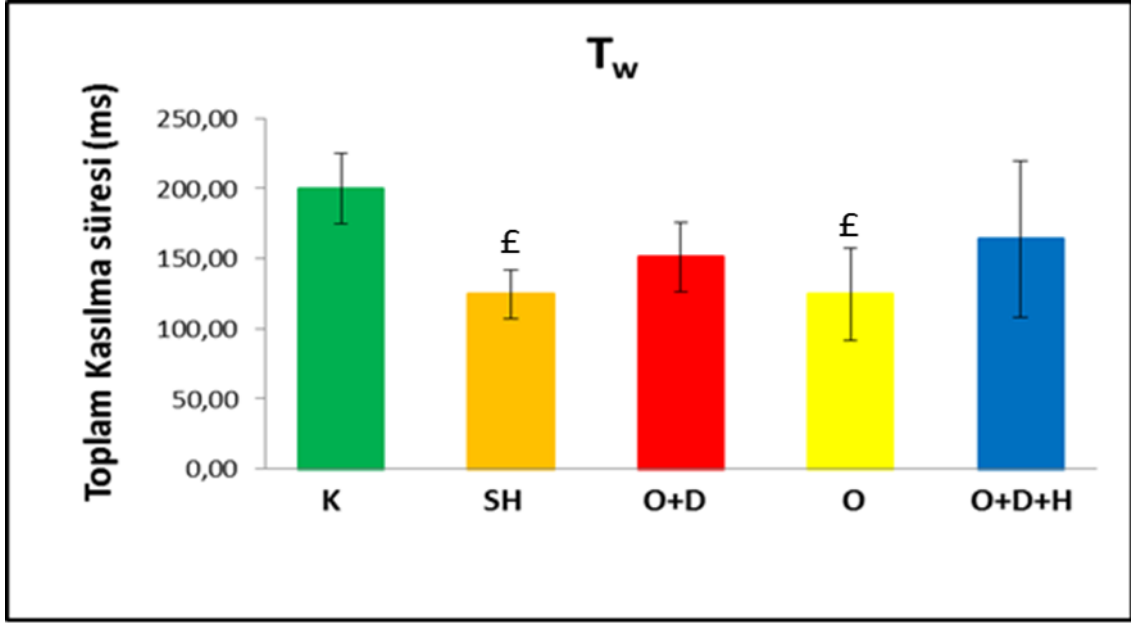
Tek bir kare puls (0,5 ms süre ve supramaksimal genlik) uygulanan kaslardan kayıtlanmış sarsı eğrilerinden ölçülen yarı gevşeme süresinin, SH ve O gruplarında K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,05$ ) bir azalma saptandı (Çizelge 4.18 ve Şekil 4.24).



Şekil 4.24. Tek kare puls uygulanan grupların yarı gevşeme süreleri (ort±ss). £: K ile karşılaştırıldığında  $p<0,05$ .

#### 4.5.2.2.3. Tek Bir Uyarıya Yanıt Olarak Kaydedilen Sarsı Eğrisinin Toplam Süresi (TCT)

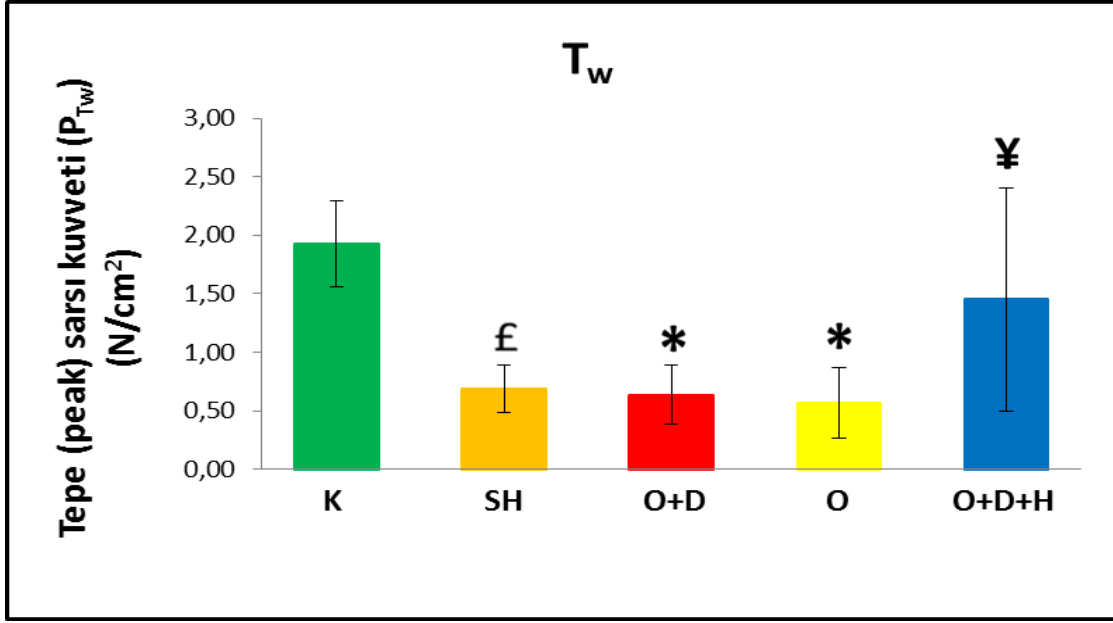
Tek bir kare puls (0,5 ms süre ve supramaksimal genlik) uygulanan kaslardan kayıtlanmış sarsı eğrilerinden ölçülen toplam sürenin (kasılma+gevşeme süresi), SH ve O gruplarında K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,05$ ) bir azalma gösterdiği saptandı (Çizelge 4.18 ve Şekil 4.25).



Şekil 4.25. Tek kare puls uygulanan grupların toplam kasılma süreleri (ort±ss). £: K ile karşılaştırıldığında  $p < 0,05$ .

#### 4.5.2.2.4. Tek Bir Uyarıya Yanıt Olarak Kaydedilen Sarsı Eğrisinin Tepe (Peak) Sarsı Kuvveti ( $P_{Tw}$ )

Tek bir kare puls (0,5 ms süre ve supramaksimal genlik) uygulanan kaslardan kayıtlanmış sarsı eğrilerinden ölçülen tepe sarsı kuvvetinin gruplar arası karşılaştırılmasında, K grubuna göre SH, O+D ve O gruplarında istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0,05$ ) bir azalma olduğu saptandı. Ayrıca, O+D+H grubuna ait ortalama sarsı kuvvetinin SH, O+D ve O gruplarına göre bir artış gösterdiği, ancak bu artışın sadece O grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0,05$ ) olduğu bulundu (Çizelge 4.18 ve Şekil 4.26).

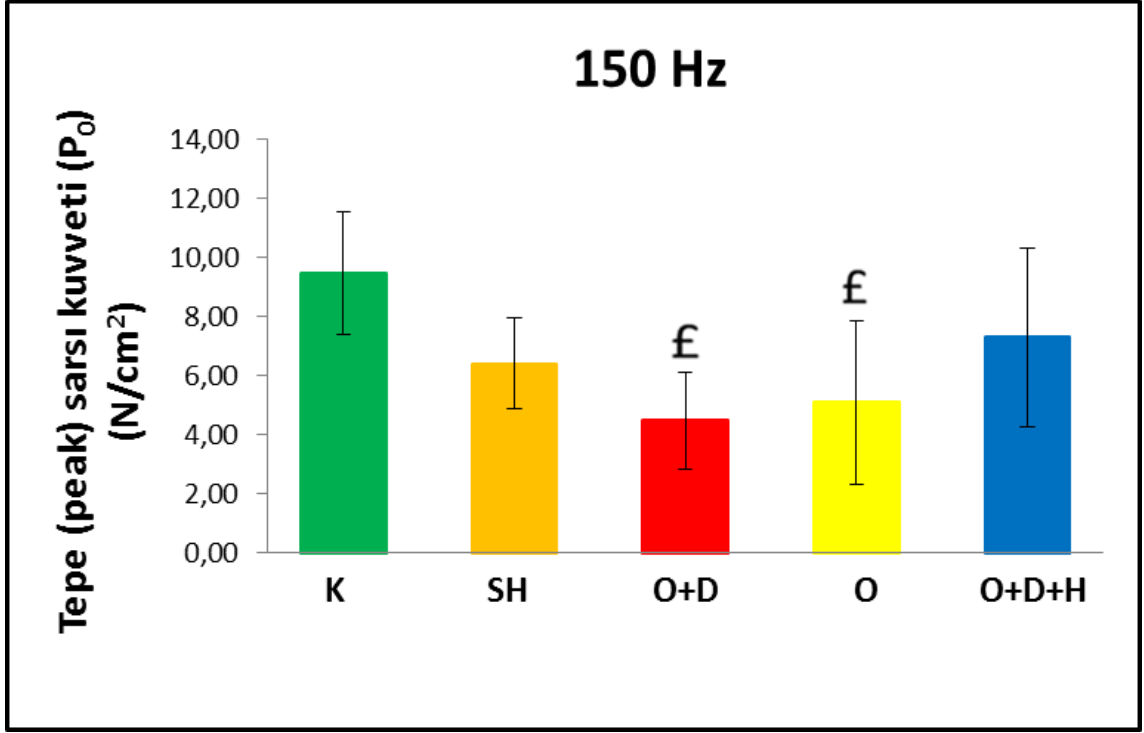


**Şekil 4.26.** Tek kare puls uygulanan grupların tepe sarsı kuvvetleri (ort±ss). \*: K ile karşılaştırıldığında  $p<0,001$ , £: K ile karşılaştırıldığında  $p<0,05$ , ¥: O ile karşılaştırıldığında  $p<0,05$

#### 4.5.2.2.5. Maksimum Tetanik Kuvvet (P<sub>0</sub>)

Tüm gruplardaki sıçanlardan izole edilen her bir EDL kasına, 0,5 ms süreli ve supramaksimal genlikli kare pulsların oluşturduğu frekansı 150 Hz'lik bir uyarı katarı verildiğinde, tüm kas preparatlarında tam tetanik kasılma olduğu gözlemlendi. Gruplar arası yapılan karşılaştırmalarda, O+D ve O gruplarına ait P<sub>0</sub> değerlerinin K grubuna göre, istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,05$ ) bir azalma gösterdiği saptandı (Çizelge 4.18 ve Şekil 4.27). Tedavi grubuna ait maksimum tetanik kuvvet değerinde, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmasa bile O+D ve O gruplarına göre bir artış olduğu bulundu.





Şekil 4.27. Frekansı 150 Hz olan uyarı protokolünün uygulandığı grupların tepe sarsı kuvvetleri (ort±ss). £: K ile karşılaştırıldığında p<0,05.

#### 4.5.2.2.6. Belirli Frekans Aralığında (T<sub>w</sub>, 10-150 Hz) Uyarılara Karşı Oluşan Maksimum Kasılma Kuvvetleri

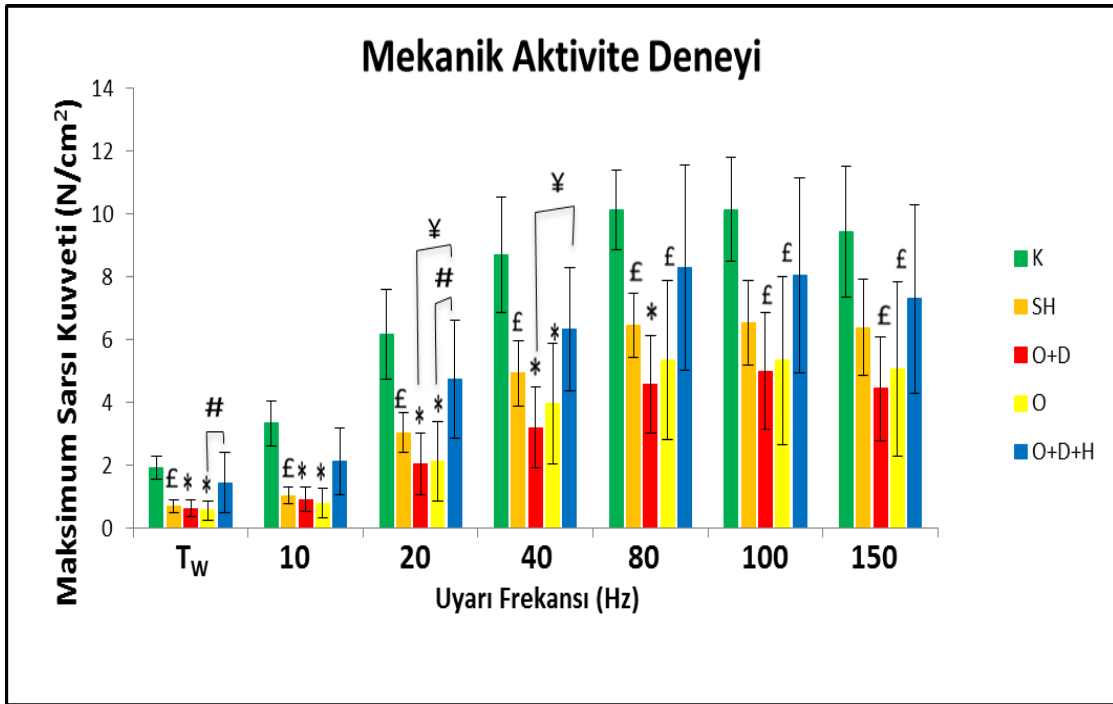
Çizelge 4.19 ve Şekil 4.28, tek ve farklı frekanslarda uyarılar (0,5 ms süreli ve supramaksimal genlikli) için kaydedilen izometrik sarsı eğrilerinden ölçülen kasılma kuvvetlerinin, her bir kas için hesaplanan kesit alanına bölerek normalize edilmiş değerlerini (N/cm<sup>2</sup>) bir arada göstermektedir.

**Çizelge 4.19.** Kas mekanik aktivitesinde tek uyarı ( $T_w$ ) ve farklı frekanslarda uyarılar için elde edilen maksimum sarsı kuvvetleri ( $ort \pm ss$ ).

Uyarı Frekans (Hz)	K ( $N/cm^2$ )	SH ( $N/cm^2$ )	O+D ( $N/cm^2$ )	O ( $N/cm^2$ )	O+D+H ( $N/cm^2$ )	P Değerleri
$T_w$	$1,93 \pm 0,36$	$0,69 \pm 0,20$ £	$0,64 \pm 0,25$ *	$0,57 \pm 0,30$ *	$1,45 \pm 0,95$ #	0,000
10	$3,35 \pm 0,71$	$1,05 \pm 0,28$ £	$0,93 \pm 0,37$ *	$0,80 \pm 0,47$ *	$2,15 \pm 1,06$	0,000
20	$6,18 \pm 1,41$	$3,05 \pm 0,62$ £	$2,06 \pm 0,96$ *	$2,14 \pm 1,26$ *	$4,75 \pm 1,87$ ¥#	0,000
40	$8,72 \pm 1,83$	$4,94 \pm 1,03$ £	$3,21 \pm 1,28$ *	$3,97 \pm 1,91$ *	$6,34 \pm 1,94$ ¥	0,000
80	$10,12 \pm 1,26$	$6,47 \pm 1,01$ £	$4,58 \pm 1,53$ *	$5,36 \pm 2,54$ £	$8,30 \pm 3,26$	0,000
100	$10,15 \pm 1,64$	$6,55 \pm 1,35$	$5,00 \pm 1,84$ £	$5,34 \pm 2,68$ £	$8,05 \pm 3,09$	0,002
150	$9,44 \pm 2,06$	$6,39 \pm 1,53$	$4,46 \pm 1,65$ £	$5,08 \pm 2,77$ £	$7,30 \pm 3,01$	0,007

\*: K ile karşılaştırıldığında  $p < 0,001$ , £: K ile karşılaştırıldığında  $p < 0,05$ , ¥: O+D ile karşılaştırıldığında  $p < 0,05$  #: O ile karşılaştırıldığında  $p < 0,05$ .

Her bir uyarı protokolü frekans için elde edilen kasılma kuvvetleri gruplar arası karşılaştırıldığında, O+D grubunun tüm uyarı protokollerinde K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdiği saptandı. Benzer şekilde, O grubu da tüm uyarı protokollerinde K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir. O+D+H grubunun maksimum kasılma kuvvetleri, 20 ve 40 Hz uyarı protokollerinde O+D grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış oluşturmuştur. Keza, O+D+H grubunun Tw ve 20 Hz frekans uyarılarındaki değerlerinin O grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği saptandı. Buna ek olarak, SH grubunda TW, 10, 20, 40 ve 80 Hz uyarı frekanslarında elde edilen maksimum kasılma kuvvetleri K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir.



**Şekil 4.28.** Tek ( $T_w$ ) ve belirli frekans aralığındaki ( $T_w$ , 10-150 Hz) uyarılara karşı oluşan maksimum kasılma kuvvetleri (ort±ss), £: K ile karşılaştırıldığında  $p<0,05$ , ¥: O+D ile karşılaştırıldığında  $p<0,05$ , #: O ile karşılaştırıldığında  $p<0,05$ .

#### 4.5.2.2.7. $P_i/P_0$ Oranları ( $i=Tw, 10, 20, 40, 80, 100$ ve $150$ Hz)

Her bir grup için tek bir kare puls ve farklı frekanslı uyaranlar uygulandı ve her biri için kaydedilen kasılma kuvvetleri kullanılarak  $P_i/P_0$  oranları hesaplandı (Çizelge 4.19).  $P_i/P_0$  oranları gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı (Çizelge 4.20).

$P_{Tw}/P_0$  için gruplar arası karşılaştırmada; SH grubunda K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,05$ ) bir azalma, O+D+H grubunda ise hem SH hem de O grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,05$ ) bir artış saptandı.

**Çizelge 4.20.** Kas mekanik aktivite parametrelerinden hesaplanan  $P_i/P_0$  oranları ( $ort \pm ss$ ). ( $i=Tw, 10, 20, 40, 80, 100$  ve  $150$  Hz;  $P_{Tw}$ : Tek uyarı için oluşan maksimum kasılma kuvveti,  $P_0$ : 150 Hz frekansındaki uyarıya karşı oluşan maksimum kasılma kuvveti).

$P_i/P_0$	K n=6	SH n=6	O+D n=6	O n=7	O+D+H n=6	P Değerleri
$P_{Tw}/P_0$	$0,22 \pm 0,07$	$0,11 \pm 0,01$ £	$0,15 \pm 0,03$	$0,12 \pm 0,04$ ¥	$0,22 \pm 0,11$ ₣	0,019
$P_{10}/P_0$	$0,38 \pm 0,13$	$0,17 \pm 0,03$ £	$0,21 \pm 0,04$ £	$0,16 \pm 0,03$ *	$0,32 \pm 0,14$ #₣	0,009
$P_{20}/P_0$	$0,67 \pm 0,16$	$0,48 \pm 0,07$ £	$0,46 \pm 0,11$ £	$0,42 \pm 0,05$ £	$0,67 \pm 0,14$ #¥₣	0,008
$P_{40}/P_0$	$0,94 \pm 0,15$	$0,78 \pm 0,07$	$0,73 \pm 0,15$ £	$0,80 \pm 0,07$	$0,91 \pm 0,17$	0,044
$P_{80}/P_0$	$1,10 \pm 0,06$	$1,03 \pm 0,04$	$1,04 \pm 0,06$	$1,09 \pm 0,05$	$1,16 \pm 0,06$	0,441
$P_{100}/P_0$	$1,09 \pm 0,08$	$1,03 \pm 0,04$	$1,12 \pm 0,08$	$1,07 \pm 0,07$	$1,12 \pm 0,08$	0,229
$P_{150}/P_0$	$1,00 \pm 0,00$	$1,00 \pm 0,00$	$1,00 \pm 0,00$	$1,00 \pm 0,00$	$1,00 \pm 0,00$	

\*: K ile karşılaştırıldığında  $p < 0,001$ , £: K ile karşılaştırıldığında  $p < 0,05$ , ¥: O+D ile karşılaştırıldığında  $p < 0,05$ , ₣: SH ile karşılaştırıldığında  $p < 0,05$ , #: O ile karşılaştırıldığında  $p < 0,05$ .

$P_{10}/P_0$  için gruplar arası karşılaştırmada; K grubuna göre SH, O+D ve O gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı. O+D+H grubunda ise, hem SH hem de O grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı.

$P_{20}/P_0$  için gruplar arası karşılaştırmada; K grubuna göre SH, O ve O+D gruplarının istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdiği saptandı. O+D+H grubunda ise, SH, O+D ve O gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış ( $p<0,05$ ) elde edildi.

$P_{40}/P_0$  için gruplar arası karşılaştırmada ise, sadece O+D grubunun K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,05$ ) bir azalma gösterdiği bulundu.

#### **4.5.2.2.8. Belirli Frekans Aralığındaki (10-150 Hz) Uyaranlarda Maksimum Kasılma Genliğine Ulaşma Süreleri**

Farklı frekanslarda uyaranlar için elde edilen izometrik sarsı eğrilerinden maksimum kasılma genliğine ulaşma süreleri ölçüldü. (Çizelge 4.21 ve Şekil 4.29)

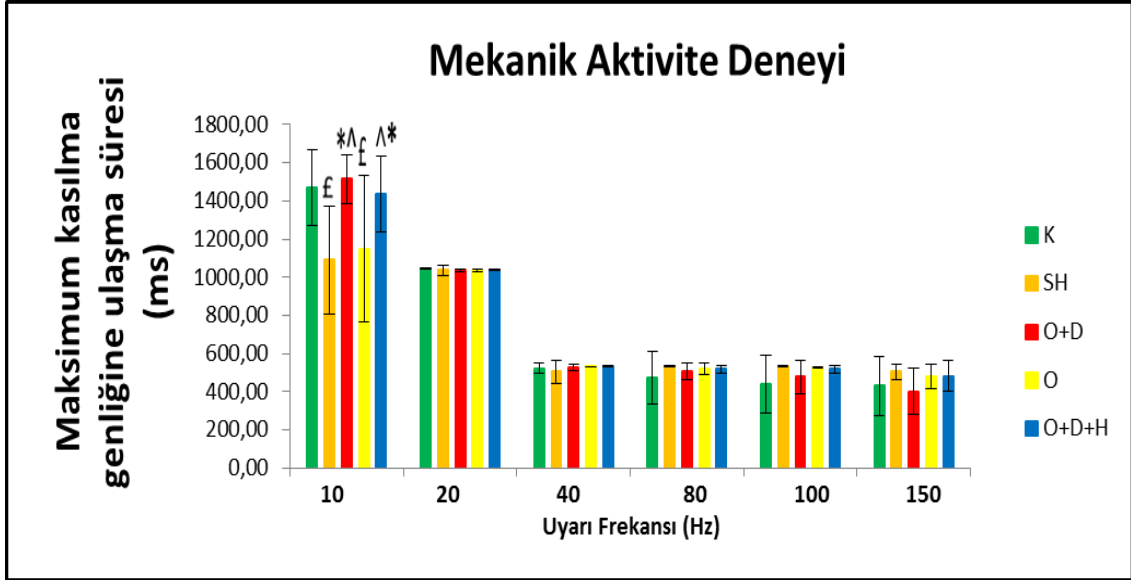
**Çizelge 4.21.** Her bir grup için farklı frekanslarda uyarılara yanıt olarak kaydedilen kas mekanik aktivite yanıtlarında maksimum sarsı kuvvetlerine ulaşma süreleri (ms) ( $\text{ort} \pm \text{ss}$ )

Uyarı Frekans (Hz)	K	SH	O+D	O	O+D+H	P Değerleri
10	1468 ± 81,4	1091 ± 115,1 <sup>£</sup>	1514 ± 53,4 <sup>*Λ</sup>	1148 ± 145,4 <sup>£</sup>	1435 ± 81,6 <sup>Λ*</sup>	0,009
20	1043 ± 3,71	1036 ± 25,9	1038 ± 6,02	1036 ± 4,45	1042 ± 3,42	0,067
40	523 ± 29,6	505 ± 59,3	525 ± 17,15	533 ± 0,64	533 ± 2,01	0,067
80	473 ± 136	531 ± 2,48	507 ± 46,8	518 ± 30,4	519 ± 20,5	0,448
100	441 ± 150	532 ± 2,61	479 ± 87,5	527 ± 5,35	517 ± 20,1	0,501
150	430 ± 155	505 ± 39,9	401 ± 120	478 ± 63,4	483 ± 78,4	0,584

£: K ile karşılaştırıldığında  $p < 0,05$ , \*: SH ile karşılaştırıldığında  $p < 0,05$ , ^: O ile karşılaştırıldığında  $p < 0,05$ .

Sarsı eğrilerinin maximum kasılma kuvvetine ulaşma süreleri her uyarı frekansı için gruplar arası karşılaştırıldığında, sadece 10 Hz frekansında istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0,05$ ) farklılıklar saptandı. Buna göre, K grubuna göre SH ve O grubunda istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0,05$ ) bir azalma, O+D grubunda ise SH ve O grubuna

göre istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,05$ ) bir artış görüldü. O+D+H grubunda ise, SH ve O gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,05$ ) bir artış elde edildi.



Şekil. 4.29. Maksimum kasılma genliğine ulaşma sürelerinin (ort±ss) gruplara göre dağılımı £: K ile karşılaştırıldığında  $p<0,05$ , \*: SH ile karşılaştırıldığında  $p<0,05$ , ^: O ile karşılaştırıldığında  $p<0,05$ .



## 4.6. Biyokimyasal Bulgular

### 4.6.1. Total Oksidan Kapasite (TOK) ve Total Antioksidan Kapasite (TAK) Bulguları

Bütün gruplarda hem serum hem de doku TAK ve TOK verileri hesaplandı (Çizelge 4.22). TOK parametresi bakımından gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı ( $p<0,05$ ).

Çizelge 4.22’de görüldüğü gibi O+D grubunda  $1,53\pm 0,07$  mmol Trolox Eq/l olan doku TAK miktarının, O+D+H grubunda  $1,27\pm 0,16$  mmol Trolox Eq/l ve O grubunda  $1,32\pm 0,15$  mmol Trolox Eq/l olduğu ve bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ( $p<0,05$ ).

Doku TOK ve Serum TOK düzeyi dikkate alındığında, O grubu ile K grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı ( $p<0,05$ ) (Çizelge 4.22).

Çizelge 4.22’de görüldüğü gibi, K grubuna göre, O+D grubuna ait serum ve kas dokusu TOK değerleri istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemektedir.

**Çizelge 4.22.** Grupların doku TAK, serum TAK ve doku TOK, serum TOK parametre değerleri (ort±ss)

	K n:6	SH n:6	O+D n:6	O n:7	O+D+H n:6	P Değerleri
Doku_TAK (mmol Trolox Eq/l)	1,46 ± 0,06	1,41 ± 0,04	1,53 ± 0,07 <sup>Λ</sup>	1,32 ± 0,15	1,27 ± 0,16 <sup>*</sup>	0,003
Serum_TAK (mmol Trolox Eq/l)	0,07 ± 0,09	0,08 ± 0,08	0,18 ± 0,33	0,17 ± 0,06	0,10 ± 0,10	0,157
Doku_TOK (mmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Eq/l)	7,56 ± 1,37	5,23 ± 1,82	7,46 ± 3,64	4,29 ± 1,95 <sup>£</sup>	6,53 ± 1,09	0,038
Serum_TOK (mmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Eq/l)	4,22 ± 0,23	4,38 ± 0,82	4,21 ± 1,05	3,75 ± 0,71 <sup>*</sup>	5,32 ± 1,23	0,046

\*:O+D ile karşılaştırıldığında p<0,05, £: K ile karşılaştırıldığında p<0,05, ^:O ile karşılaştırıldığında p<0,05.

#### 4.7. Işık Mikroskobu Bulguları

Çalışmada yer alan bütün grupların EDL kası ve beyin doku örnekleri ışık mikroskobunda x40 büyütmede incelenmiştir.

##### 4.7.1. İmmünohistokimyasal İşaretleme ile AH Patolojisinin Doğrulanması

Işık mikroskobik doku takibi ve immünohistokimyasal işaretleme ile frontal korteks dokusunda Aβ hücre sayısında artış olduğu gözlemlendi. AH gelişimi esnasında

gelişebileceğini düşündüğümüz ICM kas hastalığı patolojisi içinde geçerli olan A $\beta$  birikimi sıçan EDL kas dokusunda gözlenmedi.

AH patolojilerinden bir diğeri olan beyindeki kolinerjik sistemin bozulması açısından yapılan inceleme sonucu, immünohistokimyasal işaretleme ile frontal kortekste AChE aktivitesinde artış gözlenirken, bu artış EDL kas dokusunda gözlenmemiştir. Keza, frontal kortekste saptanan AChE aktivitesinde gözlenen artışın Hup A ile inhibe edildiği saptanmıştır.

#### **4.7.1.1. Sıçan Frontal Korteksinde ve EDL Kasında A $\beta$ Ekspresyonunun Değerlendirilmesi**

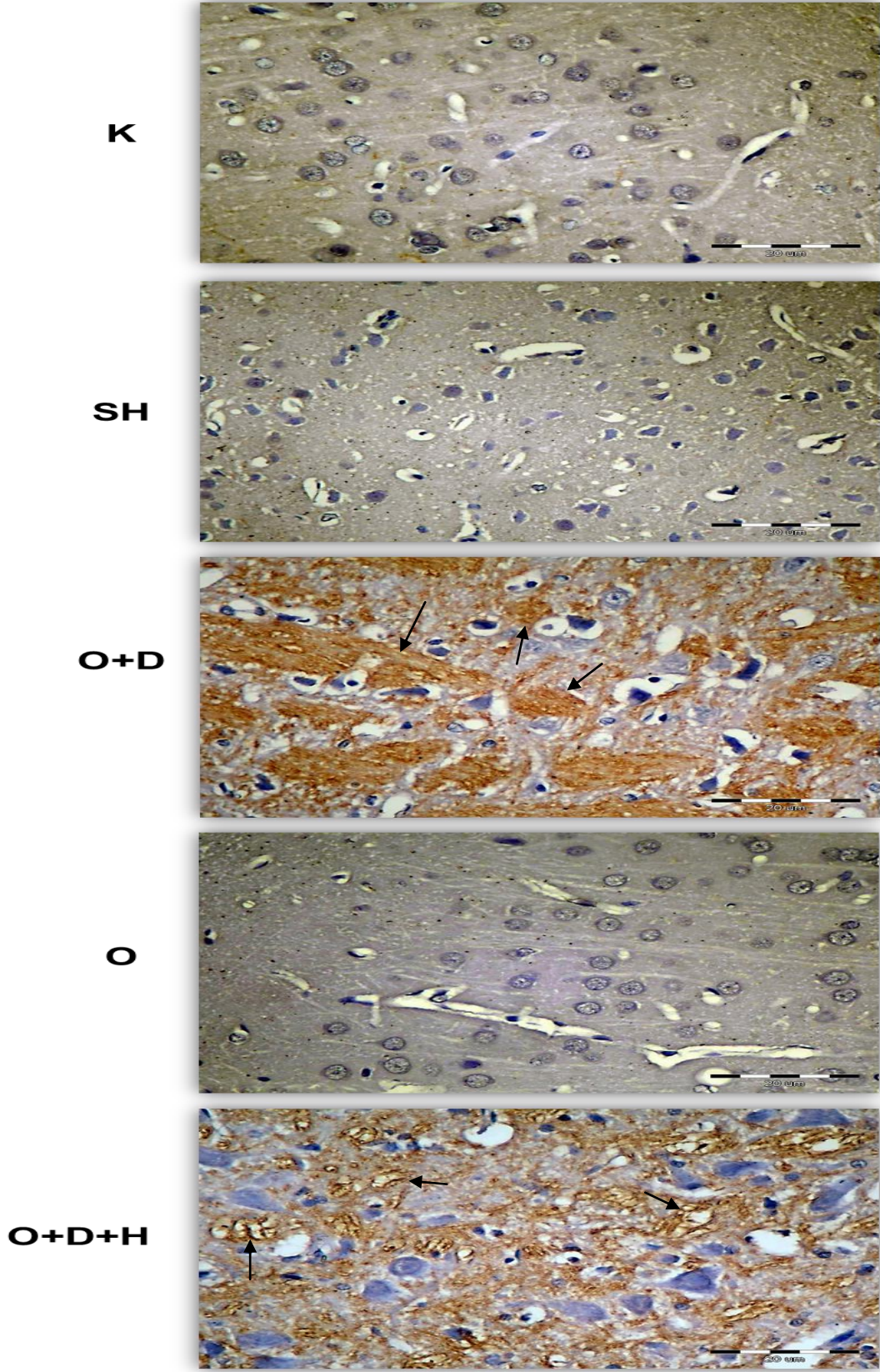
AH oluşturulan grup (O+D) ile K, SH ve O gruplarında ise A $\beta$  birikimi saptanmamıştır (Şekil 4.30). AH oluşturulan grup (O+D) ile K, SH ve O gruplarının karşılaştırılması sonucu O+D grubunda A $\beta$  birikiminde anlamlı (sırasıyla;  $p<0,01$ ,  $p<0,01$ ,  $p<0,01$ ) bir artış olduğu saptandı. Tedavi grubu (O+D+H) ile AH oluşturulan model grup karşılaştırıldığında ise, tedavi grubunda oluşan A $\beta$  birikiminin azalmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı ( $p=1,000$ ) bir farklılık saptanmadı (Çizelge 4.23 ve Şekil 4.30). K ve SH gruplarında ise A $\beta$  birikimi saptanmamıştır (Şekil 4.30).

ICM patolojisi için incelenen her gruptaki sıçanların EDL kas dokusunda A $\beta$  birikimi gruplar arası karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ( $p=1,000$ ) bir farklılık saptanmadı (Şekil 4.31).

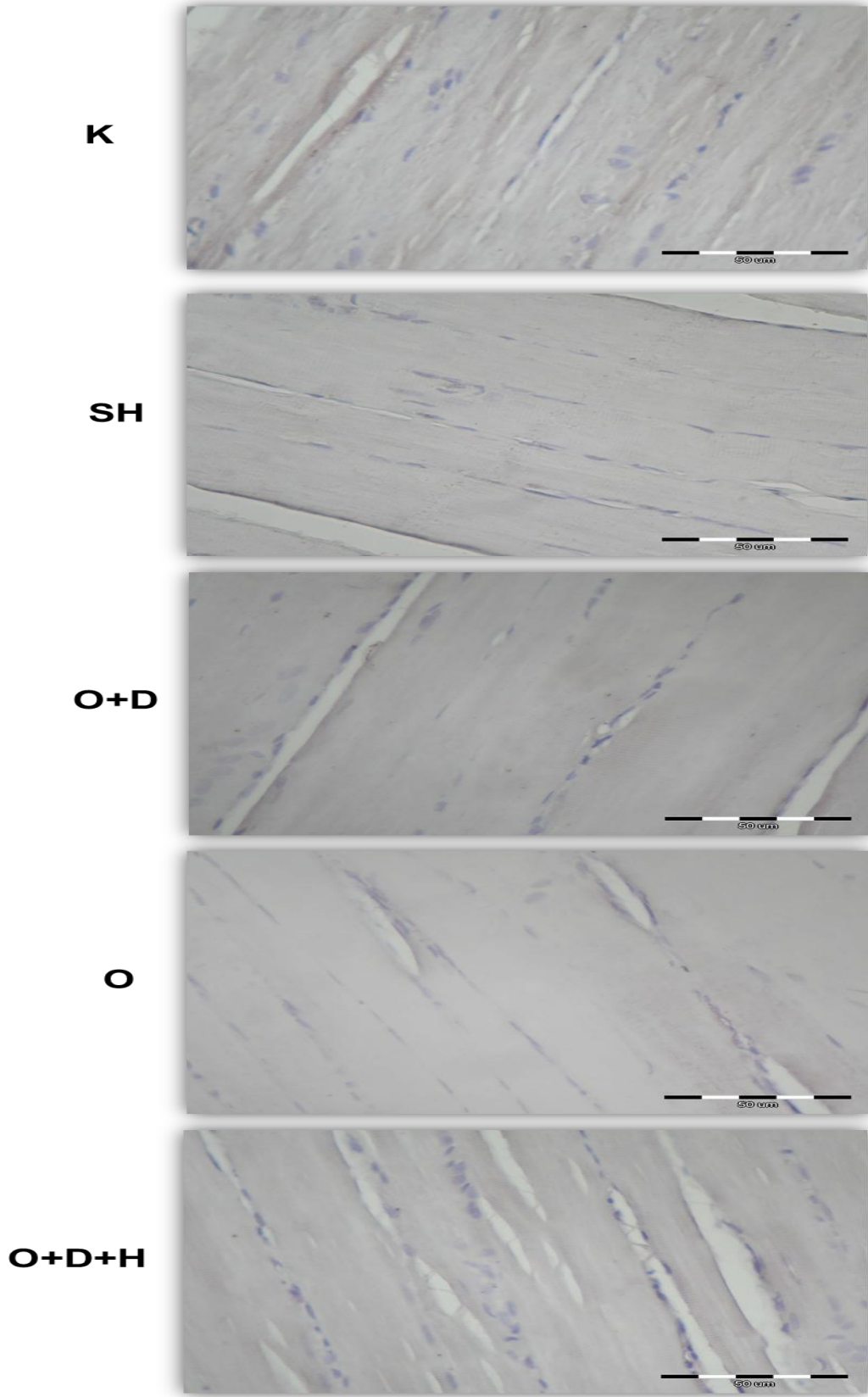
**Çizelge 4.23.** Beynin frontal korteksinde A $\beta$  ekspresyon miktarının gruplar arası karşılaştırılması (ort $\pm$ ss)

BEYİN DOKUSU	Grup	Medyan	25%	75%	P
A $\beta$ Ekspresyon Değerleri	K n:6	0,00	0,00	0,00	0,000
	SH n:6	0,00	0,00	0,00	
	O+D n:6	3,00 <sup>¥#F</sup>	3,00	3,00	
	O n:6	0,00	0,00	0,25	
	O+D+H n:6	2,00	2,00	2,00	

¥:K ile karşılaştırıldığında  $p<0,01$ , #: SH ile karşılaştırıldığında  $p<0,01$ , F:O ile karşılaştırıldığında  $p<0,01$ .



Şekil 4.30. İmmünohistokimyasal işaretleme ile sıçan frontal korteksinde A $\beta$  ekspresyonu



Şekil 4.31. İmmünohistokimyasal işaretleme ile sıçan EDL kasında Aβ ekspresyonu

#### **4.7.1.2. Sıçan Frontal Korteksinde ve EDL Kasında AChE Aktivitesinin Değerlendirilmesi**

ACh'in sinapstaki varlığı, asetilkolini sentezleyen ChAT ve asetilkolini parçalayan AChE enzimlerinin etkinliğine bağlıdır. Bizim çalışmamızda AChE enzimi frontal kortekste ve EDL kasında immünohistokimyasal işaretleme ile incelendi. AH modeli oluşturulan O+D grubunun frontal korteksindeki AChE aktivitesinde diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,001$ ) bir artış saptandı (Çizelge 4.24). Tedavi grubu olan O+D+H ile AH modeli oluşturulan O+D grubu karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,01$ ) bir farklılık saptanmış olup, tedavi grubunda AChE aktivitesi gözlenmemiştir. K, SH ve O gruplarında ise AChE aktivitesi gözlenmedi (Şekil 4.32).

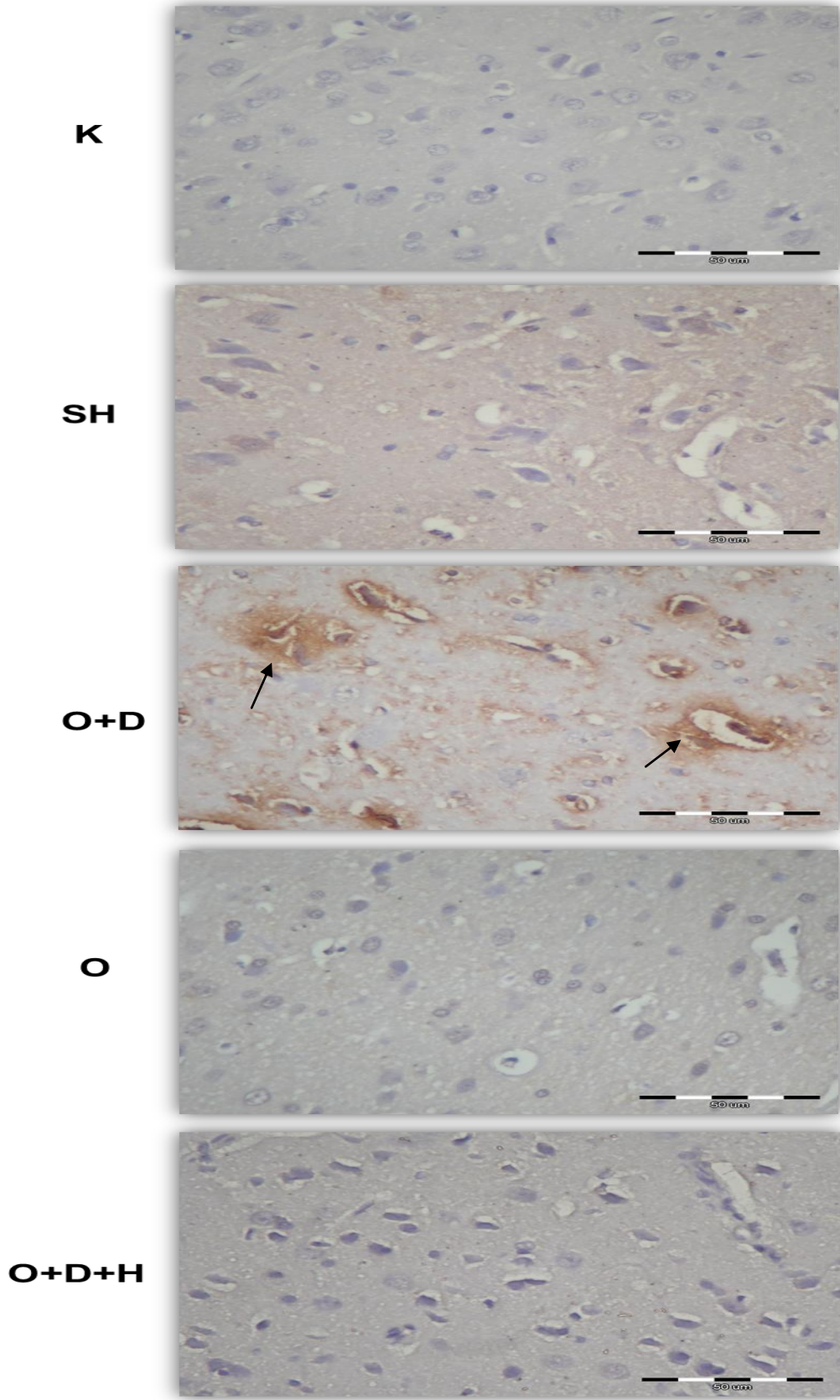
ICM patolojisi açısından incelenen her gruptaki sıçanların EDL kas dokusunda AChE aktivitesi gruplar arası karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ( $p=1,000$ ) bir farklılık saptanmadı (Şekil 4.33).

**Çizelge 4.24.** Beynin frontal korteksinde AChE aktivitesinin gruplar arası karşılaştırılması (ort±ss)

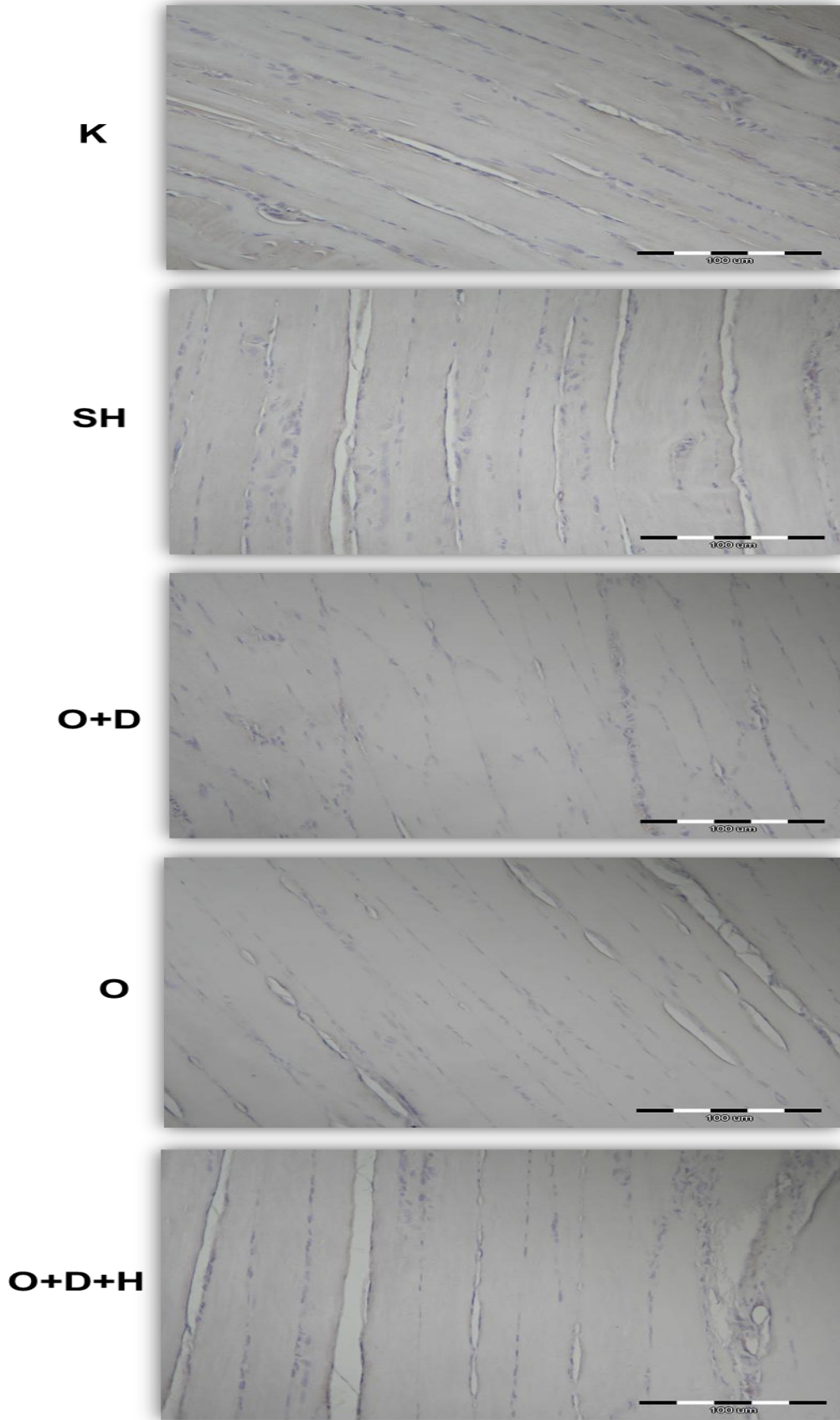
BEYİN DOKUSU	Grup	Medyan	25%	75%	P
AChE Aktivite Değerleri	K n:6	0,00	0,00	0,00	0,000
	SH n:6	0,00	0,00	0,00	
	O+D n:6	3,00 <sup>¥#F</sup>	2,75	3,00	
	O n:6	0,00	0,00	0,25	
	O+D+H n:6	0,00 <sup>Λ</sup>	0,00	0,00	

¥:K ile karşılaştırıldığında  $p<0,01$ , #: SH ile karşılaştırıldığında  $p<0,01$ , F:O ile karşılaştırıldığında  $p<0,01$ , Λ: O+D ile karşılaştırıldığında  $p<0,01$ .





Şekil 4.32. İmmünohistokimyasal işaretleme ile sıçan frontal korteksinde AChE aktivitesi



Şekil 4.33. İmmünohistokimyasal işaretleme ile sıçan EDL kasında AChE aktivitesi

## 5. TARTIŞMA

AH yaşıllıkla beraber ortaya çıkan ve başta unutkanlık olmak üzere çeşitli zihinsel ve davranışsal bozukluklara yol açan ilerleyici bir nörolojik hastalıktır. Demans sebepleri arasında birinci sırada gelir. Bellek ve bilişsel işlevlerde günlük yaşam aktivitelerini kısıtlayacak derecede kronik ve ilerleyici kayıpla karakterizedir. Yaşamın orta ve ileri evrelerinde ortaya çıkar ve 50 yaş altında görülmesi pek nadirdir. Yaşıllıkla birlikte ortaya çıkan bir hastalık olmakla birlikte, AH'nın patogenezi anormal beyin süreçlerinin bir sonucu olarak gelişir. AH'nın histopatolojisini, beynin belirli bölgelerinde fazla miktarda oluşan senil amiloid plaklar, nörofibriler yumak yapısı ile belirgin düzeyde sinaps ve nöron atrofisi oluşturur. Hastalığın erken evrede tanımlanması oldukça zordur ve henüz bir tedavisi yoktur. Bu nedenle hem tanı hem de tedaviyi hedef alan çalışmalar AH için çok önemlidir. Bu tür çalışmaların birçoğu farklı yöntemlerle geliştirilen hayvan modelleri kullanılarak yapılmaktadır. AH'nın kökten tedavisine yönelik daha özgün ilaçlar geliştirmek ve hastalığın fizyopatolojisini, davranışsal değişiklikler ile beyindeki nörokimyasal veya nöropatolojik değişiklikler arasındaki ilişkiyi inceleyerek hem tanı hem de tedaviye yönelik olarak kullanılmak üzere AH'nın bazı patofizyolojik özelliklerini taklit eden kemirgen hayvan modelleri oluşturulmuştur. AH'da kullanılan mevcut modeller beynin korteks, hipokampus ve ön beynin meynert bazal nükleus bölgesi gibi bölgelerinde stereotaksik cerrahi yöntemlerle lezyon oluşturma, nörotoksik ajanlarla AH'dakine benzer nitelikte nöron harabiyeti oluşturma ve AH'dakine benzer genetik patolojilerin taklit edilmesi esaslarına dayanır (150). Çalışmada kullandığımız hayvan modeli de bu amaçlara yönelik olarak geliştirilen ve AH'nın patolojik gelişiminde rol oynayan östrojen kaybı ve oksitativ stresin oluşturulmasını temel alan hayvan modellerinden birisidir. Bu hayvan modeli, overektomi yapılarak östrojen kaybına uğratılan sıçanlara D-galaktoz uygulanarak serbest radikal üretiminin arttırılması esasına dayanan bir modeldir. Aynı zamanda bu model kapsamında hem östrojen kaybı hem de D-galaktoz uygulamasının her biri tek başlarına uygulandıklarında iskelet kaslarının fonksiyonunu da etkilemektedir. D-galaktoz vücudun normal bir bileşeni olmakla birlikte, vücuttaki seviyesinin

yükselmesinin sonucunda galaktoz oksidaz enziminin katalizlemesiyle aldoz ve hidroperokside dönüşerek süperoksid anyon ve oksijen türevli serbest radikallerin oluşumuna yol açar (195). Hem östrojen kaybı hem de uzun süreli D-galaktoz uygulaması metabolik anomalilere yol açarak serbest radikal üretimini artırır ve bu süreçlerin bir sonucu olarak da nöronal hasara yol açar. Serbest radikaller hücrenin bileşenleri ile etkileşerek onların yapılarını bozar, çeşitli patofizyolojik değişimlere yol açarlar ve bu nedenle toksiktirler. D galaktoz uygulamasının serbest radikal oluşumuna yol açmasının yanı sıra, hipokampal nöronlarda apoptozisi indükleyerek nöron kaybına yol açtığı da gösterilmiştir (196).

Kronik D-galaktoza maruz bırakılması neticesinde hayvanlarda doğal yaşlanmaya benzeyen semptomları indüklediğiyle ilgili çalışmalar giderek artmaktadır. Bu nedenle D-galaktoza maruz bırakılan hayvanlarla oluşturulan modeller yaşlanma ve yaşlanmanın farmakolojik geciktirilmesi çalışmalarında kullanılmaktadır. D-galaktoza maruziyetin mitokondrial fonksiyon kaybına neden olarak yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı hastalıklarda hayati rol oynadığı düşünülmektedir (197). Bu modelleme araştırma hedefimiz doğrultusunda, başta beyin olmak üzere periferal dokularda da patolojiye neden olabileceğinden dolayı seçilmiştir.

Sunulan tez çalışması için seçilen bu model AH patolojik bulguların hepsini kliniksel olarak karşılamaktadır. Birçok araştırmada AH için kemirgen model yapısını destekleyici davranış deneyleri yapılmaktadır. Davranış deneylerinde en yaygın kullanılanlar lokomotor aktivite için Açık Alan ve spasyal hafıza için ise Morris Su Tankı deneyleridir. Bu nedenle tez araştırmamızda oluşturduğumuz AH kemirgen modeli için sıçanlarda Açık Alan ve Morris Su Tankı Deneyleri yapılmıştır. Hayvan davranış deneylerinde, sıçanların stres ve anksiyeteye girerek beklenenden farklı davranışlar sergiledikleri bilinmektedir. Daha önce yapılmış çalışmaların bulguları doğrultusunda Ehman ve Moser, bu durumu en aza indirmek amacıyla düzeneklerin siyaha boyanmasını, deneyin yapıldığı odanın loş bir şekilde aydınlatılmasını, aynı gün içinde tekrarların yapıldığı çalışmalarda sıçanların yorulmaması için atışlar arasında yeterince süre bırakılmasını, su tankı deneyinde yükseltinin sıçanın büyüklüğüne uygun olacak şekilde su altına gizlenmesini ve sıçanların vücut sıcaklıklarının korunmasını sağlamak amacıyla önlem alınmasını önermiştir (198).

Açık alan, sıçanların lokomotor aktiviteyi değerlendirmede en sık kullanılan düzendir. Locomotor aktivite; katedilen mesafe ve hareket hızının ölçümüyle değerlendirilebilmektedir (199). Yapılan çalışmalarda, lokomotor etkilenmesi olan sıçanların açık alan deneyinde kontrol grubuna göre daha yavaş hareket ettikleri ve daha az mesafe katettikleri gösterilmiştir. Açık alana bırakılan hayvanın kendi ortamından alınıp tek başına bilmediği farklı bir ortama bırakılması sıçanlarda anksiyete meydana getirir. Stresin sıçanların köşelerde donup kalmasına neden olacağı gibi aşırı hareketli olmasına da sebep olabileceği iddia edilmektedir (200, 201). Ancak çalışmamızın bu aşaması, bütün sıçanlar için eşit şartların oluşturulduğu bir odada yapılmıştır. Uygulamalar aynı kişi tarafından yapıldığından, anksiyete-stres gibi problemlerin tüm sıçanları eşit düzeyde etkilemesi sağlanmıştır.

Hua ve ark. (157) çalışmasında, overektomi yaptıkları ve D-galaktoz uyguladıkları sıçanlarda AH'nın davranışsal, bilişsel, nörokimyasal ve histopatolojik bulgularının varlığını ortaya koymuşlardır. Açık alan deneyinin sonuçları, özellikle K grubu ile karşılaştırıldığında O+D grubunun lokomotor aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,01$ ) bir azalma gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu tez çalışmasında da açık alan testi sonucunda O+D grubunun lokomotor aktivitesinde K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,05$ ) azalma olduğu bulunmuştur. Bizim çalışmamızdaki bu bulgumuz, Hua ve ark.'nın (157) çalışmalarıyla birbirini desteklemektedir ve sıçanlara overektomi ve ardından D-galaktoz uygulanmasının anksiyete bulguları ortaya çıkardığını göstermiştir. Bu çalışmaya ek olarak, bizim çalışmamızda sıçanların açık alan deneyinde merkezde katettikleri mesafe bakımından O+D grubunda, hem K hem de SH grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanmıştır ( $p<0,001$ ). Benzer azalma tedavi grubu (O+D+H) ve O grubunda da belirlenmiştir. Bu bulgumuz, overektomi ve D galaktoz uygulamasıyla birlikte sıçanlarda strese bağlı anksiyetenin oluştuğunu, ancak tedavinin etkili olmadığını ortaya koymaktadır.

Spasyal hafızayı değerlendirmek için uyguladığımız Morris Su Tankı deneyleri 1981 yılında Morris (202) tarafından tanımlandığından bu yana kemirgenlerin öğrenme ve hafıza çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (203). Çalışmamız sonucunda; yükseltiyi bulma süreleri bakımından güne göre gruplar karşılaştırıldığında 1. gün için gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmazken, 2., 3. ve 4. günde istatistiksel olarak

anlamli farklar saptanmifstir. Buna göre 2. gün Morris su tankında ortalama yükseltiyi bulma süreleri tedavi grubunda (O+D+H) diğer tüm gruplardan daha fazla olmasına karşın istatistiksel olarak anlamli farklılık sadece SH grubu ile tedavi grubu O+D+H arasında bulunmuştur. Aynı parametrenin 3. ve 4. gün değerleri açısından AH modeli oluşturulan O+D grubunun tedavi grubuna göre yükseltiyi bulma süresi daha geç olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamli bir farklılık saptanmamıştır. 3. gün ortalama yükseltiyi bulma süreleri gruplar arasında karşılaştırıldığında O+D grubunun ortalama değerinin K, SH ve O gruplarından daha büyük olduğu ve özellikle de SH grubu ile arasında istatistiksel olarak anlamli bir farklılık saptanmıştır. Ancak 4. gün ortalama yükseltiyi bulma süreleri bakımından gruplar karşılaştırıldığında AH modeli oluşturulan O+D grubunun hem K hem de SH grubu ile arasında istatistiksel olarak anlamli bir fark olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak O+D grubundaki sıçanların platformu bulma süresinin 3. ve 4. günde diğer gruplara göre daha uzun olduğu gözlendi. AH patogenezinin astrogliaların potansiyel katkısının araştırıldığı ve overektomi ardından D-galaktoz uygulamasıyla AH sıçan modeli oluşturulan Hua ve ark.'larının (157) yaptığı çalışmada, sıçanların spasyal hafızaları Morris su tankı deneyi ile incelenmiştir. AH modeli oluşturulmuş O+D grubundaki sıçanların platformu bulma süreleri, K grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda elde edilen bulguların, Hua ve ark.'larının çalışma sonuçları ile uyumlu olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda, ilk 4 günde yükseltiyi bulma süreleri incelendiğinde, tüm gruplar için yükseltiyi bulma sürelerinin günler ilerledikçe anlamli olarak düştüğü gözlenmiştir. K, SH, O ve O+D+H grupları için 4. gün ve 1. gün karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamli bir düşüş olduğu saptanmıştır ( $p < 0,001$ ). Fakat AH oluşturulmuş grupta günler arasında istatistiksel olarak anlamli bir farklılık grlmemiştir.

Spasyal hafıza deneylerinin 5. gününde sıçanların yükseltinin yerini bulmayı öğrendiklerini teyit etmek ve yükseltiyi bulmalarının tesadüf olmadığını göstermek için yükselti çıkarılmıştır. Hatırlama deneyi olan 5. gün deneyinde, sıçanların eskiden yükseltinin olduğu güney-batı kadranda geçirdikleri süre incelenmiş ve gruplar arasında yükseltinin bulunduğu kadranda geçirilen süre bakımından bir farklılık bulunmamıştır. Hua ve ark (157) yaptıkları çalışmada, platform kaldırıldığında O+D grubundaki sıçanların platformun bulunduğu kadranda geçirdikleri süre ile K grubunun

kadranda geçirdikleri süre karşılaştırıldığında O+D grubunun daha az süre geçirdiği belirlenmiştir.

İlk 4 gün yükseltiyi bulma süresi ve güney-batı kadranda geçirilen süre parametrelerinin hepsi birlikte değerlendirildiğinde oluşturulan AH modelinin sadece öğrenim süreci olan ilk 4 gün AH patolojisine uygun davranışlar sergilediği görülmesine karşın son gün görülememiştir. Histolojik incelemeler, sıçan ratlarının frontal korteksinde A $\beta$  birikimi olduğunu, hipokampusta ise A $\beta$  plak oluşumunun gerçekleşmediğini göstermiştir. Öğrenme ve hatırlama sürecinde sağlam ve fonksiyonel bir hipokampusun bulunması gerektiği bilinmektedir. O nedenle, hatırlama deneyi olan MST deneyinin 5. gününde elde edilen bulgular ile histolojik veriler birbirini desteklemektedir.

Yaşın Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda primer risk faktörü olduğu düşünülür. Ayrıca yaşla birlikte meydana gelen mitokondriyal fonksiyon bozukluklarının arttığı da birçok çalışmada gösterilmiştir. İnsan otopsi dokularından ve hastalık taşıyan transgenik sıçanlardan elde edilen beyindeki mitokondriyal hasarlar daha önceden gösterilmiştir. Fakat, santral sinir sistemi dışındaki dokulardaki mitokondriyal fonksiyondaki bozulmalar kesin olarak açıklanmamıştır. Schuh ve ark. (5) tarafından yapılan çalışmada çok iyi karakterize edilmiş bir transgenik AH modelinde hem beyin hem de kas dokusundaki mitokondriyal solunum bozuklukları araştırılmıştır. Ayrıca, bu hayvanların beyin ve kas dokusundan izole edilen homojenatlarda APP proteini seviyeleri incelenmiştir. Sonuç olarak, bu hayvanlardan izole edilen iskelet kaslarında kas tipine bağlı olarak farklı düzeylerde mutant APP proteinleri gösterilmiştir. Ayrıca, daha önce benzer şekilde beyin dokusunda gösterilmiş olduğu gibi, AH modeli olan genç transgenik sıçanlardan (3 aylık) izole edilen kas liflerinde aynı yaştaki transgenik olmayan sağlıklı sıçanlarla karşılaştırıldığında maksimum mitokondriyal oksijen tüketiminin azalmış olduğu belirlenmiştir.

AH'nda görülen bilişsel bozukluklar dışındaki diğer bir anahtar katılımcı, kas fonksiyonlarının kaybıdır. Yakın zaman önce, kaslardaki anomalilerin AH'nın içsel bir görüntüsü olabileceği ortaya konulmuştur. Beyine manyetik rezonans görüntüleme (MRI) yapılarak ve çift enerjili x ışını soğurma cihazı (DEXA) kullanılarak yapılan çalışmalar, AH'nda yağsız kitle kaybının hızlandığını ve bunun beyin atrofisi ve muhtemelen AH'nın patofizyolojisinin doğrudan veya dolaylı bir sonucu olarak bilişsel

performans ile ilişkili olduğunu göstermiştir (204). AH'da kas kütlesi kaybının, beyin hacminden bağımsız şekilde yağ kitlesi ile bilişsel performans ve hipokampal atrofiyle ilişkili olarak hızlandığı gösterilmiştir (204).

Egzersiz, depresyon veya birbiri ile ilişkisi olmayan kas anomalilerinin seviyesindeki değişiklikler gibi çeşitli değişkenleri bu popülasyondaki yağ kas kütlelerini etkiliyor olabilmesine rağmen, bu çalışmalar vücutta yağ kütlesi kaybı veya kaslarda fonksiyon bozukluğu gelişmesinin AH patolojisinin bir parçası olduğunu öne sürmüştür. AH'da hem kas fonksiyonları hem de bilişsel fonksiyonların her ikisinde de meydana gelen bozulmaların biyolojik temeli için, mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna bağlı enerji metabolizmasındaki geniş ölçüde görülen anomalilerin test edilebilen bir hipotez olarak sunulabileceği düşünülmüştür (205). Sitokrom C oksidaz aktivitesindeki bozukluklar, yapısal defektler ve mitokondriyal DNA delesyonları gibi mitokondriyal anomaliler ICM hastalarının kaslarında da belirlenmiştir (206, 207, 208).

Boncompagni ve ark. (209) çalışmasında, sıçanlardan elde edilen kaslarda elektron mikroskobu, değişen krebs aktivitesi ve redoks durumuna bakılarak mitokondriyal anomaliler olduğu gösterilmiştir. Askanas ve ark. (210) çalışmasında ayrıca, adenovirüslerle  $\beta$ APP gen transferi yapılan normal kas hücre kültürlerinde de benzer mitokondriyal anomalileri göstermişlerdir.

Kaslardaki anomaliler, AH için bir içsel belirteç olarak düşünülmeyle birlikte, henüz yeterli düzeyde açıklanamamıştır. AH'daki bilişsel fonksiyonun kas fonksiyonuyla ilişkisinin biyolojik temeli için geçerli bir hipotez geliştirme çabaları, mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna bağlı enerji metabolizmasındaki anomaliler üzerine yoğunlaşmıştır. APP'nin mutajenik formunun aşırı eksprese edilmesinin hem beyin hem de kastaki oksidatif metabolizma defektlerine yol açabileceği ve bu defektlerin hastalığın erken evresindeki bir kanıt olduğu hipotezini desteklemektedir (211).

Transgenik hayvanlarda mutant APP uzunluğu, farklı derecelerde lif tipi içeren kaslara bağlı olarak değişkenlik göstermiştir. APP'nin tam uzunluğu için en düşük bant, çoğunlukla yavaş kasılan liflerden (örneğin tip I lifler) oluşmuş soleus kasından elde edilen homojenatlarda belirlenmiştir (205). Aksine, çoğunlukla hızlı kasılan liflerden (örneğin tip II) oluşan plantaris kasında daha yoğun olarak tam uzunlukta APP bantları görülmüştür. Hem yavaş hem de hızlı kasılan liflerden oluşan gastrokinemus ve tibialis



anterior kaslarında ise orta düzeyde tam uzunlukta APP bantları belirlenmiştir. AH'dakinin aynısı olan A $\beta$ 42 peptidi içeren amiloid depositleri yaşla ilişkili bir kas hastalığı olan ICM hastalarının kaslarında da ortaya çıkmaktadır (212).

A $\beta$  peptidi, Alzheimer hastalarının beyinlerinde olduğu gibi deri ve kas da dahil olmak üzere diğer bazı dokularında da uzun, çözölemeyen fibriller oluşturarak birikir (16). A $\beta$ 'nin nöronal fonksiyonlar üzerine etkileri çok geniş bir şekilde araştırılmıştır, fakat iskelet kas hücreleri gibi diğer uyarılabilir hücreler üzerine etkileriyle ilgili bilgiler kısıtlıdır. Başlangıç seviyesindeki Alzheimer hastalarında, fitness ve bilişsel bozuklukların araştırıldığı bir çalışmada bilişsel hastalıkların gelişim sürecinde fiziksel fitness'ın koruyucu bir faktör olduğu bildirilmiştir (213). Kasta A $\beta$  birikmesinin Ca<sup>+2</sup> salınımı ve kas kasılması üzerine etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada da, iskelet kası üzerinde kuvvet çevirici ile kas sarsı eğrilerinin kasılma kuvvetlerine bakılmış ve A $\beta$ 'nin kas kuvvetini azalttığı belirlenmiştir (214).

Kuo ve ark. (215) yaptığı bir çalışmada, A $\beta$ 'nin Alzheimer hastalarının beyinlerinde bulunduğu bilinen formunun (A $\beta$ <sub>42</sub>), hastaların iskelet kaslarında da önemli ölçüde artmış olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, yaşlılıkta ortaya çıkan en yaygın kas hastalığı olan ICM hastalığında, A $\beta$  öncü proteini (APP) ekspresyonunun bozulduğu ve intraselüler olarak A $\beta$  birikiminin olduğu ve bu hastalarda A $\beta$ 'nin Ca<sup>+2</sup> kanallarından Ca<sup>+2</sup> salınımını ve iskelet kasındaki kasılmayı azalttığı gösterilmiştir (214).

AH'nın beyin dokusunda ve serebral damarlarında A $\beta$ 'nin aşırı birikmesi, nörovasküler fonksiyonların bozulmasına ve kronik nörodejenerasyonun artmasına yol açacak şekilde periferik sinirlere de yayılarak uzun çözölemeyen fibriller yapılar oluşturmaktadır. Oluşan bu A $\beta$  plaklar nöron membranındaki iyon kanallarının yapısını da bozarak uzun süreli elektriksel aktivitenin bozulmasını tetiklemektedir. Aynı zamanda bu birikimin kas liflerinin kasılmasından sorumlu olan asetilkolin sentezini, salınımını ve postsinaptik etkinliğini azaltabileceği ortaya konulmuştur (116).

Sunulan tez çalışmasında AH oluşturulan model (O+D) grubunda A $\beta$  birikiminin periferik sinirlere de yayılabileceği düşünülerek ortaya çıkabilecek iletimdeki bozukluğu görebilmek için Hot Plate Deneyi yapılmıştır. Sıçanların ağrı eşiği süre değerleri incelendiğinde gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,504).

AH kemirgen modellerinde AH'nın bir iç yansıması olarak düşünölen kaslardaki anomaliler ve bunların patofizyolojiye katkısının olabileceği bilinmektedir. Beyinde olduğu gibi, kaslardaki bu bozukluklar da amiloid plakların ortaya çıktığı evrelerde meydana gelmektedir (5, 204). AH'nda gelişim gösteren A $\beta$  plak oluşumlarının aynı zamanda iskelet kas dokusunu da etkileyebileceğini belirtmişlerdir (16, 216, 217). A $\beta$  peptidinin, iskelet kas liflerinin belirgin şekilde depolarizasyonuna yol açarak dinlenim membran potansiyelini bozduğu gösterilmiştir. Bu, Na<sup>+2</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaz inhibisyonuna ilaveten A $\beta$ 'nin membranda por yapısı oluşturarak membran geçirgenliğini arttırmasına bağlı olarak gerçekleşmektedir (14, 217).

Bu doğrultuda çalışmamızda, AH'nın homoloğu olarak bilinen ve AH patolojisini takiben gelişebileceği düşünölen ICM kas patolojisinde de yer alan A $\beta$  plak birikiminin overektomize sıçanlarda daha uzun süre D-galaktoz uygulaması yaparak ICM kas patolojisi veya kas bozukluğu oluşturulmaya çalışılmıştır. AH ilerleyen sürecinde A $\beta$  plakların kas dokusunda aşırı birikmesi sonucu gelişebilen ve AH patofizyolojisine çok benzerlik gösteren ICM'nin, bu çalışmada oluşturulan sıçan modelinde gelişip gelişmediği EDL kasının biyoelektriksel ve biyomekanik aktivite kayıtları ve histolojik analizlerle değerlendirilmiştir. EDL kasının elektriksel aktivitesinin değerlendirilmesinde tüm gruplardan EMG yapılarak elde edilen BKAP'i kullanılmıştır. EMG, miyopatileri içeren kas hastalıkları da dahil olmak üzere periferel sinir sistemi hastalıklarının tanısında en sık kullanılan yöntemlerden birisidir (218). Bu yöntemde, kasların üzerine yerleştirilen elektrotlarla ilgili sinire çok hafif bir elektriksel uyarım verilerek sinirlerin ne kadar hızla iletim yaptığı hesaplanır. Çalışmamızda yaptığımız EMG kaydında, etrafındaki dokulardan açığa çıkarılan sol EDL kasının 1/3 proksimal kısmına bipolar uyarıcı elektrotları ve aynı anda 1/3 distal kısmına bipolar yüzeysel disk kaydedici elektrotları yerleştirilerek BKAP kayıtları alınmıştır.

Bu tez araştırmasında elde edilen EMG sonuçlarına göre; BKAP tepeden tepeye genlik, genlik, tepe latans, süre değerlerinde, istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. BKAP eğrisinin depolarizasyon ve % 50 repolarizasyon süre değerinde, istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı farklılık görölmemiştir. BKAP'i alan değerinde, istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

Çalışmamızda Hua ve ark. (157) oluşturmuş oldukları AH modellemesi kullanılarak daha uzun D-galaktoz uygulaması sonucu oluşturulmaya çalışılan ICM kas hastalığının moleküler alt yapısında yer alabileceği düşünülen A $\beta$  plakların birikimi sıçanların EDL kasında immünohistolojik işaretleme ile görülmemiştir. Bu nedenle EMG ve histokimyasal bulgular birbirlerini desteklemektedir. Fakat bu modellemede Alzheimer patolojisi, overektomi sonrası uzun dönem D-galaktoz uygulaması neticesinde oluşmasından dolayı, bazı iskelet kaslarında sadece overektomi kaynaklı EMG aktivitesini düşürdüğü üzerine çalışmalar da vardır.

Liua ve ark. (219) çalışmasında overektominin sıçan genioglossus (GG) kasının kasılması üzerine etkisi olmadığı hipotezini test etmişlerdir. Sonuç olarak; overektomi EMG aktivitesini ve GG kasının kasılma özelliklerini düşürmüş ve hipotez reddedilmiştir. GG kasının kontraktıl özelliklerinin overektomiye duyarlı olduğunu ve bu değişikliklerin, kısmen de olsa, kontraktıl proteinlerin tipleri ve miktarlarındaki değişikliklerle ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır. Bizim çalışmamızdaki EMG sonuçları, Liua ve ark. (219) bulgusuyla karşılaştırıldığında EDL kasının biyoelektriksel özelliklerinin overektomiye duyarlı olmadığı sonucunu göstermiştir.

Bu bulgular ışığında immünohistolojik işaretleme ile EDL kasında histolojik olarak A $\beta$  birikiminin de görülememiş olması, Hot Plate ve EMG bulgularını desteklemektedir. A $\beta$  birikimi beyin dokusu haricinde periferal dokulara yayılmamıştır.

Keza oluşabileceği düşünülen kas bozukluğunu belirleyebilmek için sıçanların EDL kası biyomekanik aktiviteleri üzerine kullanılan AH modelinin etkileri izometrik kasılma parametreleri kullanılarak incelenmiştir. Bunun için, EDL kası supramaksimal elektriksel pulslarla uyarılarak, kas cevaplarındaki izometrik kasılma eğrileri analiz edilip, kasın kasılabilirlik fonksiyonu araştırılmıştır

EDL kasının mekanik aktivitesinin değerlendirilmesinde tüm gruplardan elde edilen kas sarsı eğrileri kullanılmıştır. Kas tarafından oluşturulan kuvvetin miktarı kasın uyarılmadan önceki uzunluğuna bağlıdır. Gerim ve dinlenim uzunluğunun yüzdesi olarak hesaplanan sarkomer uzunluğu ile kuvvet arasında bir korelasyon vardır. Sarkomerlerin boyu, dolayısıyla da kas fibrilinin boyu dinlenim uzunluğunun %80-120 arasıdayken aktin ve miyozin filamentleri arasındaki etkileşim maksimum düzeyde olduğu için kuvvet üretebilme yeteneği de maksimum seviyededir. Çalışmamızda, EDL kasının maksimum kasılma kuvvetini oluşturacak optimum boya getiren ön gerimler

uygulanmıştır ve uygulanan ön gerimlerde gruplar arası karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

Ön gerim uygulamasının ardından 5'er dakika ara ile  $T_w$ , 10, 20, 40, 80, 100 ve 150 Hz frekanslı uyarılar verilerek kas mekanik yanıtları kaydedilmiştir. Tek bir kare puls ( $T_w$ ) (supramaksimal genlikli ve 0,5 ms süreli) uygulanan kaslardan kayıtlanmış sarsı eğrilerinin kasılma süresinde, O grubu K grubu ile karşılaştırıldığında, O grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir.  $T_w$  için yarı gevşeme süreleri gruplar arası karşılaştırıldığında; O grubu ile SH grubunun, K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha hızlı olduğu saptanmıştır. Jonathan ve ark. (220) yaptıkları çalışmada overektomi yaptıkları sıçanların EDL kasında baktıkları mekanik aktivite parametrelerinde,  $T_w$  için kasılma süresi overektomi grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında overektomi grubunda anlamlı bir azalma saptamışlardır. Yarı gevşeme süresi için ise overektomi grubunun kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha hızlı olduğunu görmüşlerdir. Jonathan ve ark. (220) elde ettikleri veriler ve bizim araştırmamızda elde edilen  $T_w$  için kasılma süresi ve yarı gevşeme süre sonuçları birbirini desteklemektedir.

Her bir gruptaki sıçanların EDL kas kuvvet değerlerini uygulanan her frekans protokolünde incelediğimizde, tek bir kare puls (supramaksimal genlikli ve 0,5 ms süreli) uygulanan kaslardan kayıtlanmış sarsı eğrilerinden ölçülen tepe sarsı kuvvetinde, SH grubunda K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir. K ile O ve O+D grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak O ve O+D gruplarında anlamlı bir azalma olduğu saptanmıştır. Liua ve ark. (219) ile Hou ve ark. (221) yaptıkları iki farklı çalışmada overektomi yapılmış sıçanların iskelet kasından alınan  $T_w$  için tepe sarsı kuvvet değerleri gruplar arası karşılaştırıldığında, overektomi grubunun kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığını görmeleri, bizim çalışmamızda  $T_w$  için elde ettiğimiz kasılma kuvveti değeri bulgumuzu desteklemektedir. AChE inhibitörü olan Hup A uygulanan tedavi grubu (O+D+H) ile O grupları karşılaştırıldığında ise O grubunda O+D+H grubuna göre kasılma kuvvetinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür. Bizim çalışmamızda overektomize sıçanların iskelet kasında gözlenen kasılma kuvvetlerindeki azalma için de AChE inhibitörü olan Hup A'nın etkili bir tedavisi olduğu saptanmıştır.

Farklı frekanslarda uyarılar için kaydedilen izometrik sarsı eğrilerinden kasılma kuvvetleri ölçülmüş ve her frekans için gruplar karşılaştırıldığında, O+D grubunun tüm uyarı frekansları için elde edilen kas sarsı kuvvetlerinin K grubuna göre azalmış olduğu belirlenmiştir. Keza, O grubu ile K grubu, tüm uyarı frekansları için kasılma kuvvetleri açısından karşılaştırıldıklarında, O grubunda istatistiksel olarak azalma saptanmıştır. O grubu ile O+D+H grubunu, 20 Hz frekansında karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanmıştır.

Tüm gruplardaki sıçanlardan izole edilen her bir EDL kasına, frekansı 150 Hz'lik uyarı katarı verildiğinde, tüm kas preparatlarından tam tetanik kuvvet elde edilmiştir. Maksimum tetanik kuvvet ( $P_0$ ) bakımından özellikle O ve O+D gruplarında K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanmıştır.

Sunulan tez çalışmasında  $T_w$ , 10, 20, 40, 80, 100 ve 150 Hz frekans protokollerinde EDL kasına uygulanan uyarının overektomi yapılmış sıçanlarda K grubuna göre anlamlı bir azalma olduğu, ayrıca AH modeli oluşturulmuş O+D grubunda, O ve tedavi O+D+H gruplarına göre kasılma kuvvetinde anlamlı olmamakla beraber bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Tedavi grubunun bütün frekans protokollerinde kasılma kuvvet değerlerinin anlamlı olmamakla birlikte K grubuna yakın, 10, 20, 40, 80, 100 ve 150 Hz frekans protokollerinde ise diğer gruplardan anlamlı olmamakla beraber artmış olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda AH oluşturmak için kullandığımız model kapsamında, sadece overektomi yapılan ve sadece kronik D-galaktoz uygulanan gruplarda da, O+D grubunda elde edilene benzer şekilde kas fonksiyon kayıpları gözlenmiştir. Kısaca, çalışmamızda tüm uyarı protokolleri için elde edilen kasılma kuvvetleri, sadece D-galaktoz uygulanan, sadece overektomi yapılan ve her iki işlemin birlikte uygulandığı gruplarda kontrole göre azalma göstermiş, Hup-A verilen grup ise tüm uyarı protokollerinde kontrole yakın değerlerde kasılma kuvveti oluşturmuş ve bu grupta oluşan kasılma kuvveti değerleri sözü edilen üç gruba göre daha fazla olmuştur. Bu nedenle de Hup-A'nın tedavi edici etkisi olduğu sonucunu çıkarabiliriz. Buna ek olarak, çalışmamızda, 20 Hz ve üzeri frekanslarda elde edilen kasılma kuvveti değerlerinin O+D grubunda diğer gruplara göre en düşük değere (K'e göre anlamlı, O ve SH gruplarına göre anlamlı olmayan farklarla) sahip olduğu bulunmuştur. Bu sonuç bize, çalışmada kullandığımız modelin bazı modifikasyonlarla (D-galaktoz dozunun ve/veya

uygulama süresinin arttırılması gibi) kasta da AH'na bađlı fonksiyon bozukluđu oluřturabileceđini dűřündürmektedir.

Chang ve ark. (197) yaptıkları bir araştırmada, D-galaktoza maruz bırakılan farelerde mitokondrial kompleks I bozukluğunun ortaya çıktığı, spasyal hafıza ve lokomotor fonksiyonda bozulmanın olmadığı fakat kas gücünde ciddi bozukluklara yol açtığı bildirilmiştir.

Dione ve ark. (222) ile Smith ve ark. (223) iskelet kaslarında yaptıkları çalışmada östrojen hormonuna ait reseptörler olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca yapılan bir diğer araştırmada östrojenin koyun ve sığır iskelet kaslarında anabolik bir etkiye sahip olduğu (224) ancak büyüme çağındaki sıçanlarda iskelet kas gelişimini inhibe ettiği rapor edilmiştir Erişkin sıçanlarda yapılan bir çalışmada ise östrojen eksikliğinin kasta atrofiye neden olduğu bulunmuştur (225, 226).

Diğer bir araştırmada ise menopoza giren kadınlar ile menopoza öncesi ve menopoza sonrası hormon tedavisi gören kadınlar karşılaştırıldığında birim kesit alana düşen kas kuvvetinin azaldığı gözlenmiştir (227-17).

Çalışmamızda hem sadece D-galaktoz uygulanan hem de sadece overektomi yapılan gruplardaki sıçanların EDL iskelet kas gücünde azalma görülmüştür. Ayrıca hem D-galaktoz hem de overektomi yapılan AH modeli oluşturulmuş gruptaki sıçanların EDL kas gücünün sadece D-galaktoz ve sadece overektomi yapılan gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte daha düşük olduğu saptanmıştır. Sonuçta overlerle ilgili hormonların uzaklaştırılması neticesinde ve sadece D-galaktoz uygulanması durumunda kas fonksiyonunda azalma oluştuğunu rapor eden araştırmalar, çalışmamızdaki biyomekanik aktivitesinde görülen azalmayı da destekler niteliktedir.

Bu azalmaya yol açan mekanizmaların araştırıldığı bir çalışmada, overektominin iskelet kas fonksiyonunu düzenleyen sinyal yollarından olan ve glukoz homeostazının düzenlenmesinde rol oynayan AMP-aktifli protein kinaz (AMPK) ve mitojen-aktifli protein kinaz (MAPK) yollarını etkileyerek iskelet kaslarında fonksiyon kaybına yol açtığı bildirilmiştir (228). Sonra diğer bir çalışmada overektomiye bağlı olarak iskelet kası hücresi içinde lipid metabolizmasının da olumsuz yönde etkilendiği ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ile birlikte iskelet kaslarının metabolik profilini değiştirerek fonksiyon bozukluğuna yol açtığı gösterilmiştir (229). Hücrelerdeki Enerji

metabolizmasındaki düzensizlikler iyon dengesini de bozabilmektedir. Fares ve ark. (230) yaptıkları bir çalışmada uzun dönem overektominin kalp kasının hücre içi  $Ca^{+2}$  dengesini bozduğu, sarkoplazmik retikulumdan  $Ca^{+2}$  salınımını arttırdığı ve miyofilamentlerin  $Ca^{+2}$  duyarlılığının azaldığı gösterilmiştir. Bu bilgiler ışığında bizim çalışmamızda overektomi sonrası belirlediğimiz kas gücündeki azalma bu yollarda meydana gelen bozukluklar ile ilişkili olabilir.

Çalışmamızda hasta grubuna ait gerek kas dokusu ve gerekse serum içeriği TOK değerleri kontrol grubundan farklı çıkmamıştır. Bu, çalışmada kullandığımız modelle kas dokusunda ICM oluşumunun gerçekleşmemesi sonucu ile uyumludur. Sonraki çalışmalarda A $\beta$  oluşumunu gösterdiğimiz beyin dokusundan elde edilecek TOK değerleri, beyinde gözlenen AH patolojisine ilişkin sonuçlarımızı serbest radikaller açısından değerlendirmemize yardımcı olacaktır.

AH'ndaki patolojilerden bir diğeri ise beyindeki kolinerjik sistemdeki bozulmadır. Bu bozulma, beyin özellikle öğrenme ve hafıza ile ilgili merkezlerinde görülür. Asetilkolin belli nöronlarda kolin asetil transferaz enzimi tarafından, kolin ve asetil-CoA'dan sentezlenir ve bu enzimin seviyesinin Alzheimer hastalarının beyinlerinde, özellikle hipokampus ile neokorteksinde azaldığı bildirilmiştir (113, 114). Asetilkolin, merkezi sinir sisteminde yer alan bir kimyasal iletili olarak görev yapar ve iskelet kası liflerindeki asetilkolin reseptörlerine bağlanarak kas lifinin kasılmasını uyarır. Öğrenme ve hafıza üzerine olan etkisini ise, postsinaptik nöron membranlarındaki nikotinik ve muskarinik reseptörlere bağlanarak gerçekleştirir. Asetilkolinin sentezi asetilkolin transferaz enzimi tarafından katalizlenen kolin ve Asetil Co-A arasındaki reaksiyonla, sinaptik boşluğa salınıp işlevini gerçekleştiren asetilkolinin yıkımı ise Asetilkolin esteraz enziminin katalizlediği reaksiyonla kolin ve asetata çevrilerek gerçekleşir. Bu nedenle, asetilkolinin yapımı ve yıkımını katalizleyen enzimlerin aktivasyonları arasındaki denge, hücrelerdeki asetilkolin düzeyinin korunması ve fonksiyonlarının sağlıklı bir şekilde gerçekleşebilmesi için çok önemlidir.

Bu tez çalışmasında, AH'nın terapisindeki etkinliğini araştırdığımız Hup A, doğal olarak elde edilen bir asetilkolin esteraz inhibitörüdür. AH'nın tedavisinde geliştirilen stratejilere ve bu stratejiler doğrultusunda geliştirilen ilaçlara baktığımızda, hemen hepsinin beyindeki asetilkolin seviyesinin korunmasına yönelik olarak yıkımını engellemek üzerine kurulmuş olduğunu görmekteyiz. Günümüzde FDA onayı alarak

piyasaya sürülen, AH tedavisinde kullanılan bu ilaçlar, asetilkolin esteraz inhibitörü fonksiyonuna sahip olan ve bu fonksiyonlarını yerine getirerek, AH tedavisindeki etkinlikleri kanıtlanmış olan ilaçlardır. Ancak bu ilaçları kullanan Alzheimer hastalarında görülen yan etkiler ve daha da önemlisi bu ilaçların kan-beyin bariyerini geçmelerindeki sıkıntı, kullanımlarını kısıtlamaktadır. Bu tez çalışmasında, AH tedavisindeki etkinliğini değerlendirmek üzere çalışmayı seçtiğimiz Hup A'nın tercih edilmesindeki en önemli neden de budur. Hup A, özellikle doğal olarak yetiştiği Uzak Doğu ülkelerinde AH tedavisinde kullanılan ve bu yöndeki etkinliği birçok çalışmayla belirlenmiş bir asetilkolin esteraz inhibitörüdür. Tedavi edici özelliğini belirginleştiren en önemli nedenin kan-beyin bariyerini çok hızlı olarak geçebilmesi ve aktivitesini beyin hafıza ve öğrenmeyle ilgili kısımlarda çok hızlı bir şekilde gerçekleştirebilmesi olduğu bildirilmiştir. Hup A'nın asetilkolin esteraz inhibisyonu, spektrofotometrik yöntemlerle hem in vivo hem de in vitro değerlendirilmiştir ve diğer asetilkolin esteraz inhibitörleri ile karşılaştırıldığında Hup A'nın kan-beyin bariyerine penetrasyonunun daha iyi ve inhibitör olarak etki süresinin çok daha uzun olduğu belirlenmiştir (231).

Hup A'nın in vitro asetilkolin esteraz inhibisyon aktivitesi, oral yolla verildiğinde kortekse, günümüzde AH tedavisinde kullanılan donepezil ve takrinden sırasıyla 24 ve 180 kat fazla olduğu bulunmuştur (17). Mikrodiyaliz teknikleri kullanılarak yapılan çalışmalarda, Hup A'nın doza bağlı olarak korteks ve hipokampusta asetilkolin seviyesini arttırdığı gösterilmiştir. Hup A, asetilkolin düzeyini donepezilden 8 kat, rivastigmininden 2 kat daha fazla arttırmış ve etkisini daha uzun süre korumuştur (131). Hup A'nın en önemli asetilkolin esteraz inhibitör aktivitesinin sıçanlarda kortekste, hipokampusta, striatumda, medial septumda, medulla oblongatada ve hipotalamusta olduğu bilinmektedir. Hup A uygulamasıyla, ilk 30-60 dakikada kortekste ve serumda yüksek düzeyde asetilkolin esteraz inhibisyonu olduğu ve bu aşırı inhibisyonun kortekste uzun süre devam ettiği belirlenmiştir (132).

AH sıçan modeli geliştirmek üzere sıçanlara yapılan overektomi ve D-galaktoz uygulamaları sonucunda, hem beyin hem de kas dokusunda AH patolojisi oluşup oluşmadığını belirlemek üzere A $\beta$  plaklarının varlığı test edilmiştir. Bu amaçla uyguladığımız immünohistokimyasal işaretleme yöntemi ile O+D grubunda beyin frontal korteksinde A $\beta$  plak oluşumunun anlamlı olarak artmış olduğu gösterilmiştir ( $p<0,001$ ). Tedavi grubu olan O+D+H ile O+D grubu karşılaştırıldığında ise, O+D+H



grubundaki A $\beta$  plak birikiminin O+D grubuna göre azalmış olduğu saptanmıştır. Bu azalmada Hup A'nın etkisi olabileceği düşünölmüştür. Bu nedenle, Hup A'nın AH'da görölen kolinerjik sistemdeki bozukluklar üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla, bütün gruplarda beynin frontal korteks kısmındaki asetilkolin esteraz aktivitesi, immünohistokimyasal yöntemlerle incelenmiştir. Bulgular değerlendirildiğinde, AH oluşturulan ve Hup A uygulaması yapılan O+D+H grubundaki asetilkolin esteraz aktivitesinin, AH oluşturulan O+D grubuyla karşılaştırıldığında daha düşük olduğu saptanmıştır ( $p<0,05$ ). Elde ettiğimiz bu sonuç, Hup A için düşünmüş olduğumuz yüksek asetilkolin esteraz inhibitör etkisini, AH oluşturduğumuz sıçanlarda yerine getirdiği ve iyileşme sürecinde rol oynadığını çok net bir şekilde göstermektedir. Fakat sıçanlarda elde edilen EDL kas dokusunda hem A $\beta$  plakları hem de AChE aktivitesi görölememiştir.

Bu doğrultuda AH'na özgü beynin belli anatomik alanlarında birikim gösteren A $\beta$  plak oluşumlarının sadece frontal kortekste elde edilebilmesi neticesinde, beynin diğer ilgili alanları olan hipokampus ve dentat girusunda yayılmamış olması bizim yaptığımız davranış deneylerinden spasyal hafıza testi olan Morris Su tankı deneyinin son gün bölümünde, daha önce platformun bulunduğu kadranda grupların geçirdikleri süre değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç saptayamadığımız bulgumuzu destekler niteliktedir. Ayrıca A $\beta$  birikimini EDL kas dokusunda histokimyasal yöntemle saptayamamış olmamız ve yaptığımız ağrı eşiği süre değerleri için hot plate deneyi bulguları, EDL kasının biyoelektriksel özellikleri için EMG bulguları ve biyomekanik özellikleri için kas sarsı eğrileri parametre bulguları bu bağlamda birbirlerini destekler nitelikte olup, periferal dokulara yansımamış olduğunu göstermektedir. Ek olarak bizim çalışmamızda EDL kası sarsı eğrilerinden farklı frekans protokollerinden elde edilen parametreler arası farklılıkların overektomi kaynaklı olabileceği düşünölmektedir.

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, 68 adet 13 haftalık dişi Sprague–Dawley sıçan (250-300 g), AH patolojisini taşıyan bir kemirgen modeli oluşturmak ve oluşturulan bu modelde AH ile ilişkili olduğu düşünülen ve çok benzer patolojiye sahip ICM hastalığının gelişip gelişmediğini değerlendirmek üzere rastgele olarak gruplara ayrıldı. Ayrıca, AH modeli oluşturulan sıçanlarda doğal bir asetilkolin esteraz inhibitörü olan Hup A'nın iyileştirici özelliği araştırıldı. Hedefleri gerçekleştirmek için açık alan ve morris su tankı deneyleri ile hot plate, biyopotansiyel, biyomekanik, histolojik ve biyokimyasal yöntemlerden yararlandı. Kurulan hipotez ve deney protokülünün ardından yapılan istatistiksel analizlerde şu sonuçlar elde edildi:

1. Overektomi ve ardından uzun süre (10 hafta) D-galaktoz uygulaması, sıçan beyinde, özellikle de frontal kortekste AH'nın en yaygın patolojik bulgusu olan A $\beta$  plaklarının oluşumunu indüklemiştir.
2. Frontal kortekste belirlenen A $\beta$  plakları, hipokampus ve dendrat girusta görülmemiştir.
3. Overektomi ve ardından uzun süre (10 hafta) D galaktoz uygulaması sonucu meydana gelen A $\beta$  plaklarındaki artış periferik dokularda (EDL kası) görülmemiştir.
4. Uygulanan AH sıçan modeli histolojik bulguların ışığında beyinde A $\beta$  birikiminin başarılı olduğu görülmüştür.
5. AH modeli oluşturan sıçanlara Hup A uygulaması sonucunda, frontal korteksteki A $\beta$  plaklarında azalma olduğu saptanmıştır.
6. Hup A, AH oluşturduğumuz sıçanlarda AH'nın en belirgin nöropatolojik semptomu olan A $\beta$  plakları azaltarak iyileşme sürecine katkıda bulunmuştur.

Bu bulgular ışığında, çalışmada kullanılan modelin moleküler alt yapısını beyin AH ile ilgili tüm anatomik alanlarında görebilmek ve oluşan patolojinin periferik dokulara da yansımaları sağlamak amacıyla sonraki çalışmamızda D-galaktoz

uygulamasý bitiminden sonra sýçanların kendi halinde yaşlanmaya bırakılması ya da D-galaktoz uygulama süresinin ve/veya doz miktarının arttırılması düşünölmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. **Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA.** Alzheimer Disease. *Dis Mon*,**2010**;56 (9):484-546.
2. **Selekler K.** Alois Alzheimer ve Alzheimer Hastalığı. *Turkish Journal of Geriatrics*,**2010**;13 (3):9-14.
3. **Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Sczufca M, Alzheimer's Disease International.** Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*,**2005**;366 (9503):2112–2117.
4. **Lin MT, Beal MF.** Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, **2006**;443 (7113):787–795.
5. **Schuh RA, Jackson KC, Schlappal AE, Spangenburg EE, Ward CW, Park JH, Dugger N, Shi GL and Fishman PS.** Mitochondrial oxygen consumption deficits in skeletal muscle isolated from an Alzheimer's disease-relevant murine model. *BMC Neuroscience*,**2014**;15 (24):1471-2202.
6. **Askarova S, Yang X, Lee J.** Impacts of Membrane Biophysics in Alzheimer's Disease: From Amyloid Precursor Protein Processing to A $\beta$  Peptide-Induced Membrane Changes. *International Journal of Alzheimer's Disease*, **2011**;10 (4061):1-12.
7. **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):1372-1384.
8. **Glenner GG, Wong CW.** Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*, **2012**;425 (3):9-534.
9. **Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, Mcdonald L. B, Beyreuther K.** Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*,**1985**;82:4245-4249.
10. **Yang X, Askarova S, Lee J.** Membrane Biophysics and Mechanics in Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol*,**2010**;41:138–148.
11. **Wong PT, Schauerte JA, Wisser KC, Ding H, Lee EL, Steel DG and Gafni A.** Amyloid- $\beta$  Membrane Binding and Permeabilization are Distinct Processes Influenced Separately by Membrane Charge and Fluidity. *J Mol Biol*, **2009**;386:81–96.

12. **Mukhamedyarov MA, Volkov EM, Khaliullina DF, Grigoryev PN, Zefirov AL, Palotás A.** Impaired electro-genesis in skeletal muscle fibers of transgenic Alzheimer mice. *Neurochem Int*, **2014**;64:24-8.
13. **Turdi S, Guo R, Huff AF, Wolf EM, Culver B, Ren J.** Cardiomyocyte Contractile Dysfunction in the APP<sup>swE</sup>/PS1<sup>dE9</sup> Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Plos one*, **2009**;4 (6):e6033.
14. **Mukhamediarov MA, Volkov EM, Leushina AV, Kochunova IuO, Palotas A, Zefirov AL.** Ionic and molecular mechanisms of beta-amyloid-induced depolarization of the mouse skeletal muscle fibres. *Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova*, **2011**;97 (8):795-803.
15. **Burns JM, Johnson DK, Watts A, Swerdlow RH, Brooks WM.** Reduced lean mass in early Alzheimer disease and its association with brain atrophy. *Arch Neurol*, **2010**;67 (4):428–433.
16. **Mukhamedyarov MA, Grishin SN, Yusupova ER, Zefirov AL, Palotás A.** Alzheimer's  $\beta$ -Amyloid-Induced Depolarization of Skeletal Muscle Fibers: Implications for Motor Dysfunctions in Dementia. *Cell Physiol Biochem*, **2009**;23 (1-3):109-114.
17. **Wang R, Yan H, Tang X.** Progress in studies of huperzine A, a natural cholinesterase inhibitor from Chinese herbal medicine. *Acta Pharmacologica Sinica*, **2006**;27 (1):1–26.
18. **Haviv H, Wong DM, Silman I and Sussman JL.** Bivalent Ligands Derived from Huperzine A as Acetylcholinesterase Inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **2007**;7 (4):375-387.
19. **Kidd PM.** Alzheimer's Disease, Amnestic Mild Cognitive Impairment, and Age-Associated Memory Impairment: Current Understanding and Progress Toward Integrative Prevention. *Alternative Medicine Review*, **2008**;13 (2):85-115.
20. **Shampo MA, Kyle RA, Steensma DP.** Alois Alzheimer--Alzheimer disease. *Mayo Clin Proc.* **2013**;88 (12):e155.
21. **Gao S, Hugh CH, Kathleen SH, Siu H.** The Relationships Between Age, Sex, and the Incidence of Dementia and Alzheimer Disease *Arch Gen Psychiatry* **1998** ;55:809-815
22. **Reitz C, Mayeux R.** Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol*, **2014**;88 (4):640-51.
23. **Gürvit H, Emre M, Tinaz S, Bilgic B, Hanagasi H, Sahin H, Gurol E, Kvaloy JT, Harmanci H.** The prevalence of dementia in an urban Turkish population. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*, **2008**;23 (1):67-76.
24. **Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, Johansson B, Mortimer JA, Berg S, Fiske A, Pedersen NL.** Role of Genes and Environments for Explaining Alzheimer Disease. *Arch Gen Psychiatry*, **2006**;63 (2):168-174.

25. **Bettens K, Sleegers K and Van Broeckhoven C.** Current status on Alzheimer disease molecular genetics: from past, to present, to future. *Human Molecular Genetics*,**2010**;19 (1):4-11.
26. **Schellenberg GD.** Genetic dissection of Alzheimer disease, a heterogeneous disorder. *Proc Natl Acad Sci*,**1995**;92 (19):8552-8559.
27. **Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, Mant R, Newton P, Rooke K, Roques P, Talbot C, Vance M, Roses A, Williamson R, Rossor M, Owen M, Hardy J.** Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* **1991**; 349 (6311): 704–706.
28. **Theuns J, Marjaux E, Vandenbulcke M, Laere K. V, Singh S. K, Bormans G, Brouwers N, Broeck M. V, Vennekens K, Corsmit E, Cruys M, De Strooper B, Broeckhoven C, Vandenberghe R.** Alzheimer dementia caused by a novel mutation located in the APP C-terminal intracytosolic fragment. *Hum Mutat* **2006**; 27(9): 888–896.
29. **Goedert M, Spillantini MG.** A century of Alzheimer's Disease. *Science*, **2006**;314 (5800):777-781.
30. **Campion D, Dumanchin C, Hannequin D, Dubois B, Belliard S, Puel M, Thomas C, Michon A, Martin C, Charbonnier F, Raux G, Camuzat A, Penet C, Mesnage V, Martinez M, Clerget F, Brice A, Frebourg T.** Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am J Hum Genet*,**1999**;65 (3): 664–670.
31. **Hutton M, Busfield F, Wragg M, Crook R, Perez-Tur J, Clark RF, Prihar G, Talbot C, Phillips H, Wright K, Baker M, Lendon C, Duff K, Martinez A, Houlden H, Nichols A, Karran E, Roberts G, Roques P, Rossor M, Venter JC, Adams MD, Cline RT, Phillips CA, Goate A.** Complete analysis of the presenilin 1 gene in early onset Alzheimer's disease. *Neuroreport*,**1996**;7 (3):801–805.
32. **Cruys M, van Duijn CM, Backhovens H, Broeck M, Wehnert A, Serneels S, Sherrington R, Hutton M, Hardy J, George P, Hofmen A, Broeckhoven C.** Estimation of the genetic contribution of presenilin-1 and -2 mutations in a population-based study of presenile Alzheimer disease. *Hum Mol Genet*,**1998**; 7 (1):43–51.
33. **Citron M, Westaway D, Xia W, Carlson G, Diehl T, Levesque G, Johnson K, Wood K, Lee M, Seubert P, Davis A, Kholodenko D, Motter R, Sherrington R, Perry B, Yao H, Strome R, Lieberburg I, Rommens J, Kim S, Schenk D, Fraser P, George P, Selkoe D.** Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med*, **1997**;3 (1):67-72
34. **Lippa CF, Nee LE, Mori H, George P.** Abeta-42 deposition precedes other changes in PS-1 Alzheimer's disease. *Lance*,**1998**;352 (9134):1117-1118

35. **Smith MJ1, Kwok JB, McLean CA, Kril JJ, Broe GA, Nicholson GA, Cappai R, Hallupp M, Cotton RG, Masters CL, Schofield PR, Brooks WS.** Variable phenotype of Alzheimer's disease with spastic paraparesis. *Ann Neurol*, **2001**;49 (1):125-9.
36. **Doglio LE, Kanwar R, Jackson GR, Perez M, Avila J, Dingwall C, Dotti CG, Fortini ME, Feiguin F.** Gamma-cleavage-independent functions of presenilin, nicastrin, and Aph-1 regulate cell-junction organization and prevent tau toxicity in vivo. *Neuron*, **2006**;50 (3):359-75.
37. **Ertekin-Taner N.** Genetics of Alzheimer's Disease: A Centennial Review. *Neurol Clin.*, **2007**;25 (3):611.
38. **Wilbert ML, Yeo GW.** Genome-wide approaches in the study of microRNA biology. *WIREs Syst. Biol. Med.*, **2011**;3 (5):491-512.
39. **Qin Y, Qi JS, Qiao JT.** Apolipoprotein E4 suppresses delayed-rectifier potassium channels in membrane patches excised from hippocampal neurons. *Synapse*, **2006**;59 (2):82–91.
40. **Kawas C, Gray S, Brookmeyer FJ, Zonderman A.** Age specific incidence rates of Alzheimer's disease: The Baltimore Longitudinal Study. *Neurology*, **2000**;54 (11):2072-2077.
41. **Miech R.A., Breitner J.C.S., Zandi P.P., Khachaturian A.S., Anthony J.C., Mayer L.** Incidence of AD may decline in the early 90s for men, later for women: The Cache County study. *Neurology*, **2002**;58 (2):209-18.
42. **Ganguli M, Dodge HH, Chen P, Belle S, DeKosky ST.** Ten-year incidence of dementia in a rural elderly US community population: the MoVIES Project. *Neurology*, **2000**;54 (5):1109–16.
43. **Tyas SL.** Alcohol use and the risk of developing Alzheimer's disease. *Alcohol Res Health*, **2001**;25 (4):299–306.
44. **Carrasquillo MM, Khan QU, Murray ME, Krishnan S, Aakre J, Pankratz SV, Nguyen T, Ma L, Bisceglia G, Peterson RC, Yaunkin SG, Dickson DW, Boeve BF, Radford NR, Radford G, Taner N, Taner E.** Late-onset Alzheimer disease genetic variants in posterior cortical atrophy and posterior AD., **2014**;82 (16):1455-1462.
45. **Nazef K, Khelil M, Chelouti H, Kacimi G, Bendini M, Tazir M, Belarbi S, Cherifi MEH, Djerdjouri B.** Hyperhomocysteinemia Is a Risk Factor for Alzheimer's Disease in an Algerian Population. *Arch Med Res.*, **2014**;45 (3):247-250.
46. **Nelson L, Gard P, Tabet N.** Hypertension and Inflammation in Alzheimer's Disease: Close Partners in Disease Development and Progression! *J Alzheimers Dis.*, **2014**;41 (2):331-343.

47. **Mok KY, Jones EL, Hanney M, Harold D, Sims R, Williams J, Ballard C, Hardy J.** Polymorphisms in BACE2 may affect the age of onset Alzheimer's dementia in Down syndrome. *Neurobiol Aging*, **2014**;35 (6):1513.e1-5.
48. **Wilcock DM, Griffin WS.** Down's syndrome, neuroinflammation, and Alzheimer neuropathogenesis. *J Neuroinflammation*, **2013**;10:84.
49. **Cárdenas AM, Ardiles AO, Barraza N, Baéz-Matus X, Caviedes P.** Role of tau protein in neuronal damage in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Arch Med Res.*, **2012**;43 (8):645-654
50. **Jamshed N, Ozair FF, Aggarwal P, Ekka M.** Alzheimer disease in post-menopausal women: Intervene in the critical window period. *J Midlife Health*, **2014**;5 (1):38-40.
51. **Kunzler J, Youmans KL, Yu C, Ladu MJ, Tai LM.** APOE modulates the effect of estrogen therapy on A $\beta$  accumulation EFAD-Tg mice. *Neurosci Lett.*, **2014**;560:131-136.
52. **Xing Y, Jia JP, Ji XJ, Tian T.** Estrogen associated gene polymorphisms and their interactions in the progress of Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol.*, **2013**;111:53-74.
53. **El Khoury NB, Gratuze M, Papon MA, Bretteville A, Planel E.** Insulin dysfunction and Tau pathology. *Front Cell Neurosci.*, **2014**;8:22.
54. **Richardson JR, Roy A, Shalat SL, von Stein RT, Hossain MM, Buckley B, Gearing M, Levey AI, German DC.** Elevated serum pesticide levels and risk for Alzheimer disease. *JAMA Neurol.*, **2014**;71 (3):284-290.
55. **Grammas P.** Neurovascular dysfunction, inflammation and endothelial activation: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, **2011**;26:2-12.
56. **Parihar MS, Hemnani T.** Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic Interventions. *Journal of Clinical Neuroscience*, **2004**;11 (5):456-467.
57. **Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK.** The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **1999**;66 (2):137-147.
58. **Turner PR, O'Connor K, Tate WP, Abraham WC.** Roles of Amyloid Precursor Protein and its Fragments in Regulating Neural Activity, Plasticity and Memory. *Prog. Neurobiol*, **2003**;70 (1):1-32.
59. **Priller C, Bauer T, Mitteregger G, Krebs B, Kretschmar HA, Herms J.** Synapse Formation and Function is Modulated by the Amyloid Precursor Protein. *J. Neurosci*, **2006**;26 (27):7212-7221.



60. **Hooper NM.** Roles of proteolysis and lipid rafts in the processing of the amyloid precursor protein and prion protein. *Biochemical Society Transactions*, **2005**;33 (2):335-338.
61. **Ohnishi S, Takano K.** Amyloid Fibrils from the Viewpoint of Protein Folding. *Cell. Mol. Life Sci*, **2004**;61 (5):511–24.
62. **Hardy J, Selkoe DJ.** The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, **2002**;297 (5580):353-356.
63. **Selkoe DJ.** The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron*, **1991**;6 (4):487-498.
64. **Braak H, Braak E.** Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*, **1991**;82 (4):239–259.
65. **Morgan C, Colombres M, Nunez MT, Inestrosa NC.** Structure and function of amyloid in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*, **2004**;74 (6):323-49.
66. **Taşkıran ZE, Yılmaz E.** Amiloid birikiminin moleküler temeli ve yeni tedavi yaklaşımları. Derleme. *Hacettepe Tıp Dergisi*, **2007**;38:20-25.
67. **Selkoe DJ.** Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature*, **1999**;399 (6738):23-31.
68. **Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y.** Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron*, **1994**;13 (1):45-53.
69. **Di Carlo M, Giacomazza D, San Biagio PL.** Alzheimer's disease: biological aspects, therapeutic perspectives and diagnostic tools. *J. Phys.: Condens. Matter*, **2012**;24 (24):1-17.
70. **Cummings JL.** Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, **2004**;351 (1):56-67.
71. **Verdier Y, Arta Zar M and Penke B.** Amyloid  $\beta$ -Peptide Interactions with Neuronal and Glial Cell Plasma Membrane: Binding Sites and Implications for Alzheimer's Disease. *J. Peptide Sci.*, **2004**;10 (5):229–248.
72. **Ferreiro E, Oliveira CR, Pereira CMF.** The release of calcium from the endoplasmic reticulum induced by amyloid-beta and prion peptides activates the mitochondrial apoptotic pathway. *Neurobiology of Disease*, **2008**;30 (2008):331–342.
73. **Abramov AY, Canevari L, Duchen MR.** Calcium signals induced by amyloid beta peptide and their consequences in neurons and astrocytes in culture. *Biochim Biophys Acta*, **2004**;1742 (1-3):81–87.

74. **Wu J, Anwyl R, Rowan MJ** (1995)  $\beta$ -amyloid selectively augments NMDA receptor-mediated synaptic transmission in rat hippocampus. *Neuroreport*, **1995**;6 (17):2409-2413.
75. **Yang X, Askarova S, Lee J.** Membrane Biophysics and Mechanics in Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol*, **2010**;41 (2-3):138–148.
76. **Wong PT, Schauerte JA, Wisser KC, Ding H, Lee EL, Steel DG and Gafni A.** Amyloid- $\beta$  Membrane Binding and Permeabilization are Distinct Processes Influenced Separately by Membrane Charge and Fluidity. *J. Mol. Biol.*, **2009**;386 (1):81–96.
77. **Blanchard BJ, Thomas VL, Ingram VM.** Mechanism of membrane depolarization caused by the Alzheimer Abeta1–42 peptide. *Biochem Biophys Res Commun*, **2002**;293 (4):1197–1203.
78. **Piecznik SR, Neustadt J.** Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. *Experimental and Molecular Pathology*, **2007**;83 (1):84-92.
79. **Mattson MP.** Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*, **2004**;430 (7000):631-639.
80. **Defeng W, Cederbaum AI.** Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Alcohol Res Health*, **2003**;27 (4):277-284.
81. **Goedert M, Spillantini MG, Crowther RA.** Tau Proteins and Neurofibrillary Degeneration. *Brain Pathol.*, **1991**;1 (4):279-286.
82. **Iqbal K.** Tau Pathology in Alzheimer Disease and Other Tauopathies. *Biochim Biophys Acta*. **2005**;1739 (2-3):198–210.
83. **Mandelkow EM and Mandelkow E.** Tau Protein and Alzheimer's Disease. *Neurobiology of Aging*, **1994**;15 (2):85-86.
84. **Chun W, Johnson GV.** The Role of Tau Phosphorylation and Cleavage in Neuronal Cell Death. *Front Biosci.*, **2007**;12:733–756.
85. **Hanger DP, Lau DH, Phillips EC, Bondulich MK, Guo T, Woodward BW, Pooler AM, Noble W.** Intracellular and Extracellular Roles for Tau in Neurodegenerative Disease. *J Alzheimers Dis.*, **2014**;40 (1):37-45
86. **Duff K and Planel E.** Untangling memory deficits. *Nature Medicine*, **2005**;11 (8):826-827.
87. **Köpke E, Tung YC, Shaikh S, Alonso ADC, 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):24374–24384.

88. **Tanzi RE.** Tangles and neurodegenerative disease a surprising twist. *N Engl J Med.*, **2005**;353 (17):1853-1855
89. **Khatoun S, Grundke-Iqbal I, Iqbal K.** Brain levels of microtubule associated protein tau are elevated in Alzheimer's disease brain: a radioimmunoslot-blot assay for nanograms of the protein. *J. Neurochem.*, **1992**;59 (2):750– 753.
90. **Alonso ADC, Grundke-Iqbal I, Iqbal K.** Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat. Med.*, **1996**;2 (7):783– 787.
91. **Alonso ADC, Grundke-Iqbal I, Barra HS, Iqbal K.** Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of MAP1 and MAP2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1997**;94 (1):298-303.
92. **Coleman P, Federoff H and Kurlan R.** A focus on the synapse for neuroprotection in Alzheimer disease and other dementias. *Neurology*, **2004**;63 (7):1155–1162.
93. **Masliah E, Mallory M, Alford M, et al.** Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology*, **2001**;56 (1): 127–129.
94. **Honer WG, Dickson DW, Gleeson J, Davies P.** Regional synaptic pathology in Alzheimer's disease, *Neurobiol Aging*, **1992**;13 (3):375–382.
95. **Lassmann H, Fischer P, Jellinger K.** Synaptic pathology of Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci*, **1993**;24 (695):59–64.
96. **Khan UA, Liu L, Provenzano FA, Berman DE, Profaci CP, Sloan R, Mayeux R, Duff KE, Small SA.** Molecular drivers and cortical spread of lateral entorhinal cortex dysfunction in preclinical Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience*, **2014**;17 (2):304–311.
97. **Bertoni-Freddari C, Fattoretti P, Casoli T, Caselli U, Meier-Ruge W.** Deterioration threshold of synaptic morphology in aging and senile dementia of Alzheimer's type. *Anal Quant Cytol Histol*, **1996**;18 (3):209–213.
98. **Yao PJ, Zhu M, Pyun EI, et al.** Defects in expression of genes related to synaptic vesicle trafficking in frontal cortex of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.*, **2003**;12 (2): 97–109.
99. **Liu X, Passant U, Risberg J, Warkentin S, Brun A.** Synapse density related to cerebral blood flow and symptomatology in frontal lobe degeneration and Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*, **1999**;10 (1): 64–70.

100. **Li Y, Liu L, Barger SW, Griffin WS.** Interleukin-1 mediates pathological effects of microglia on tau phosphorylation and on synaptophysin synthesis in cortical neurons through a p38-MAPK pathway. *J Neurosci.*, **2003**;23 (5):1605–1611.
101. **Ji D, Lape R, Dani JA.** Timing and location of nicotinic activity enhances or depresses hippocampal synaptic plasticity. *Neuron*, **2001**;31 (1):131–141.
102. **Powers RE.** Theories of neurological aging and dementia. *Bureau of Geriatric Psychiatry*, **2005**:1-5.
103. **Terzi E, Holzemann G, Seelig J.** Interaction of Alzheimer beta-amyloid peptide (1–40) with lipid membranes. *Biochemistry*, **1997**;36 (48):14845–14852.
104. **Kremer JJ, Pallitto MM, Sklansky DJ, Murphy RM.** Correlation of beta-amyloid aggregate size and hydrophobicity with decreased bilayer fluidity of model membranes. *Biochemistry*, **2000**;39 (33):10309-10318.
105. **Michikawa M, Gong JS, Fan QW, Sawamura N, Yanagisawa K.** A novel action of Alzheimer's amyloid beta-protein (Abeta): oligomeric Abeta promotes lipid release. *J. Neurosci.*, **2001**;21 (18):7226-7235.
106. **Kourie JI, Henry CL, Farrelly P.** Diversity of amyloid beta protein fragment [1–40]-formed channels. *Cell Mol. Neurobiol.*, **2001**;21 (3):255–284.
107. **Kagan BL, Hirakura Y, Azimov R, Azimova R, Lin MC.** The channel hypothesis of Alzheimer's disease: current status. *Peptides* **2002**;23 (7): 1311-1315.
108. **Ye C, Ho-Pao CL, Kanazirska M, Quinn S, Rogers K, Seidman CE, Seidman JG, Brown EM, Vassilev PM.** Amyloid-b Proteins Activate Ca<sup>2+</sup>-Permeable Channels Through Calcium-Sensing Receptors. *Journal of Neuroscience Research*, **1997**;47 (5):547-554.
109. **Lecanu L, Greeson J, Papadopoulos V.** Beta-Amyloid and Oxidative Stress Jointly Induce Neuronal Death, Amyloid Deposits, Gliosis, and Memory Impairment in the Rat Brain. *Pharmacology*, **2006**;76 (1):19-33.
110. **Pratico D, Uryu K, Sung S, Tang S, Trojanowski JQ, Lee VMY.** Aluminum modulates brain amyloidosis through oxidative stress in APP transgenic mice. *FASEB J*, **2002**;16 (9):1138–1140.
111. **Abramov AY, Canevarib L, Duchen MR.** Calcium signals induced by amyloid  $\beta$  peptide and their consequences in neurons and astrocytes in culture. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2004**;1742 (1-3):81-87.
112. **Pillay R, Maharaj DS, Daniel S, Daya S.** Acetylcholine reduces cyanide-induced superoxide anion generation and lipid peroxidation in rat brain homogenates. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **2003**;27 (1): 61-64.

113. **James BR.** Acetylcholine. *WormBook*, ed *The C. elegans Research Community*, **2007**;1-21.
114. **Wenk GL.** Neuropathologic changes in Alzheimer's disease. *J. Clin. Psychiatry*, **2003**;64 (9):7-10.
115. Erişim: [http://faculty.pasadena.edu/dkwon/chap%208\\_files/textmostly/slide58.html](http://faculty.pasadena.edu/dkwon/chap%208_files/textmostly/slide58.html). Erişim tarihi:15.03.2014.
116. **Morrison A, Lyketsos C.** The pathophysiology of Alzheimer's disease and directions in treatments. *Advanced Studies in Nursing*, **2005**;3 (8):256-270.
117. **Wang R, Tang C.** Neuroprotective Effects of Huperzine A: A Natural Cholinesterase Inhibitor for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Neurosignals*, **2005**;14 (1-2):71-82.
118. **Chaudiere J, Ferrari I.** Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms, *Food And Chem. Toxicol*, **1999**;37 (9-10):949-962.
119. **şahin HA.** Asetilkolin, kolinesterazlar ve alzheimer hastalığı. *Demans Dergisi*, **2002**;2:69-73.
120. **Tabet N.** Acetylcholinesterase inhibitors for alzheimer's disease, anti-inflammatories in acetylcholine clothing! *Age And Aging*, **2006**;35 (4):336-338.
121. **Birks J.** Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *The Cochrane Library*, **2012**;5:1-96.
122. **Çokuğraş AN.** Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance. *Turk J Biochem*, **2003**; 28 (2): 54-61.
123. **Rao AA, Sridhar GR, Das UN.** Elevated butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase may predict the development of type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease. *Medical Hypothesis*, **2007**;69 (6):1272-1276.
124. **Greig NH, Utsuki T, Yu Q ve ark.** A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: Attention to butyrylcholinesterase *Curr Med Res Opin*, **2001**;17 (3):159-165.
125. **Talesa VN.** Acetylcholinesterase in alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev*, **2001**;122:1961-1969.
126. **M Bond, G Rogers, J Peters, R Anderson et al.** The effectiveness and cost-effectiveness of donepezil, galantamine, rivastigmine and memantine for the treatment of Alzheimer's disease (review of Technology Appraisal No. 111): a systematic review and economic model. *Health Technology Assessment*, **2012**;16 (21):1-470.

127. **Watkins PB, Zimmerman HJ, Knapp MJ, Gracon SI, Lewis KW.** Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. *JAMA*, **1994**;271 (13):992-998.
128. **Nordberg A, Svenssen AL.** Cholinesterase inhibitors in the treatment of alzheimer's disease. *Drug Exp*, **1998**;19 (6):465-480.
129. **Foster PS, Branch KK, Witt JC, Giovannetti T, Libon D, Heilman KM, Drago V.** Acetylcholinesterase inhibitors reduce spreading activation in dementia. *Neuropsychologia*, **2012**;50 (8):2093-2099.
130. **Ha GT, Ryan KW, Zhang Y.** Huperzine A as Potential Treatment of Alzheimer's Disease: An Assessment on Chemistry, Pharmacology, and Clinical Studies. *Chemistry & Biodiversity*, **2011**; 8 (7): 1189-1204.
131. **Liang Y. Q, Tang C.** Comparative effects of huperzine A, donepezil and rivastigmine on cortical acetylcholine level and acetylcholinesterase activity in rats. *Neuroscience Letters*, **2004**; 361 (1-3):56-59.
132. **Cheng DH and Tang XC.** Comparative Studies of Huperzine A, E2020, and Tacrine on Behavior and Cholinesterase Activities. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **1998**;60 (2): 377-386.
133. **Wang ZF, Wang J, Zhang HY, Tang XC.** Huperzine A exhibits anti-inflammatory and neuroprotective effects in rat model of transient focal cerebral ischemia. *Journal of Neurochemistry*, **2008**;106 (4):1594-1603.
134. **Jun L, Hong MW, Rongle LZ, Guan JL, Bi RD.** Huperzine A for Alzheimer's disease. *The Cochrane Library* **2009**;1:1-36.
135. **Pehlivan F.** Biyofizik. Ankara: Hacettepe Taş Kitapçılık, 2. Baskı, **1997**.
136. **Çağlayan Yeğen B, Alican İ, Solakoğlu Z.** Guyton Tıbbi Fizyoloji, **2014**.
137. **Elaine N. Marieb, Katja Hoehn.** Anatomy & Physiology, 5th Edition, Pearson Education, **2013**.
138. **Solorzano GE, Phillips LH.** Inclusion body myositis: diagnosis, pathogenesis, and treatment options. *Rheum Dis Clin North Am.*, **2011**;37 (2):173-83.
139. **Dimachkie MM, Barohn RJ.** Inclusion body myositis. *Curr Neurol Neurosci Rep.*, **2013**;13 (1):321.
140. **Dézsai L, Danielsson O, Gáti I, Varga ET, Vécsei L.** Inclusion body myositis--a rarely recognized disorder. *Ideggyogy Sz.*, **2013**;66 (3-4):89-101.

141. **Askanas V, Engel WK.** Proposed pathogenetic cascade of inclusion-body myositis: importance of amyloid-beta, misfolded proteins, predisposing genes, and aging. *Curr Opin Rheumatol.*, **2003**;15 (6):737-44.
142. **Askanas V, Engel WK.** Newest pathogenetic considerations in inclusion-body myositis: possible role of amyloid-beta, cholesterol, relation to aging and to Alzheimer's disease. *Curr Rheumatol Rep.*, **2002**;4 (5):427-33.
143. **Askanas V, Engel WK.** Molecular pathology and pathogenesis of inclusion-body myositis. *Microsc Res Tech.*, **2005**;67 (3-4):114-20.
144. **Askanas V, Engel WK, Nogalska A.** Inclusion body myositis: a degenerative muscle disease associated with intra-muscle fiber multi-protein aggregates, proteasome inhibition, endoplasmic reticulum stress and decreased lysosomal degradation. *Brain Pathol.*, **2009**;19 (3):493-506.
145. **Conrad C. Wehl and Alan Pestronk.** Sporadic Inclusion Body Myositis: Possible pathogenesis inferred from biomarkers., *Curr Opin Neurol.*, **2010**;23 (5):482-488.
146. **Salajegheh M, Pinkus JL, Taylor JP, Amato AA, Nazareno R, Baloh RH, et al.** Sarcoplasmic redistribution of nuclear TDP-43 in inclusion body myositis. *Muscle Nerve.*, **2009**;40 (1):19- 31.
147. **Mirabella M, Alvarez RB, Bilak M, Engel WK, Askanas V.** Difference in expression of phosphorylated tau epitopes between sporadic inclusion-body myositis and hereditary inclusionbody myopathies. *J Neuropathol Exp Neurol.*, **1996**;55 (7):774-86
148. **Vattemi G, Nogalska A, King Engel W, D'Agostino C, Checler F, Askanas V.** Amyloid-beta42 is preferentially accumulated in muscle fibers of patients with sporadic inclusion-body myositis. *Acta Neuropathol.*, **2009**;117 (5):569-74.
149. **Roos PM, Vesterberg O, Nordberg M.** Inclusion body myositis in Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand.*, **2011**;124 (3):215-217.
150. **Uzbay İT.** Alzheimer Hastalığına Yönelik Çalışmalarda Kullanılan Deneysel Hayvan Modelleri. *Demans Dergisi*, **2003**;1:5-14.
151. **Götz J and Ittner LM.** Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nature Reviews*, **2008**;9 (7):532-544.
152. **Bales KR, Liu F, Wu S, Lin S et al.** Human APOE Isoform-Dependent Effects on Brain  $\beta$  Amyloid Levels in PDAPP Transgenic Mice. *The Journal of Neuroscience*, **2009**;29 (21):6771-6779.

153. **Hsiao, K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G.** Correlative memory deficits, Ab elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*, **1996**;274:99-102.
154. **James A. Richardson and Dennis K. Burns.** Mouse Models of Alzheimer's Disease: A Quest for Plaques and Tangles. *ILAR Journal*, **2002**;43 (2): 89-99.
155. **Holden HM, Rayment I, Thoden JB.** Structure and function of enzymes of the Leloir pathway for galactose metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, **2003**; 278 (45):43885–43888.
156. **Xu XH, Zhao TQ.** Effects of puerarin on D-galactose-induced memory deficits in mice. *Acta Pharmacologica Sinica*, **2002**;23 (7):587–590.
157. **Hua X, Lei M, Zhang Y, Ding J, Han Q, Hu G, Xiao M.** Long-term D-galactose injection combined with ovariectomy serves as a new rodent model for Alzheimer's disease. *Life Sciences*, **2007**;80 (20):1897-1905.
158. **Hua X, Lei M, Ding J, Han Q, Hu G, Xiao M.** Pathological and biochemical alterations of astrocytes in ovariectomized rats injected with D-galactose: A potential contribution to Alzheimer's disease processes. *Experimental Neurology*, **2008**;210 (2):709–718.
159. **Webber KM, Bowen R, Casadesus G, Perry G, Atwood CS, Smith MA.** Gonadotropins and Alzheimer's disease: the link between estrogen replacement therapy and neuroprotection. *Acta Neurobiol Exp*, **2004**;64 (1):113-118.
160. **Büyükdereli Z.** Hipoksik İskemik Beyin Hasarı Oluşturulmuş Yenidoğan Sıçanlarda Trombosit Uyarıcı Faktör Antagonisti Uygulamasının Bilişsel ve Motor Yetiler Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri Anabilim Dalı, Mersin, **2008**.
161. **Pereria LO, Arteni NS, Peterson RC, Padilha da Rocha A, Achaval M, Netto CA.** Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, **2007**;87 (1):101-8.
162. **Szyndler J, Piechal A, Blecharz-Klin K, Skórzewska A, Maciejak P, Walkowiak J, Turzyńska D, Bidziński A, Płaźnik A, Widy-Tyszkiewicz E.** Effect of kindled seizures on rat behavior in water Morris maze test amino acid concentrations in brain structures. *Pharmacological Reports*, **2006**;58 (1):75-82.
163. **Nowakawska E, Kus K, Czubak A, Glowacka D, Matschay A.** Some Behavioural effects of carbamazepin-comparison with haloperidol. *Journal of Physiology and Pharmacology*, **2007**;58 (2):253-64.
164. **Nicholas A, Munhoz CD, Ferguson D, Campbell L, Sapolsky R.** Enhancing Cognition after stress with Gen Therapy. *The Journal of Neuroscience*, **2006**;26 (45):11637-11643.



165. **Voyer D, Voyer S, Bryden MP.** Magnitude of sex differences in spatial abilities: a meta-analysis and consideration of critical variables. *Psychol Bull*, **1995**;117 (2):250-70.
166. **Bucci DJ, Chia AA, Gallegher M.** Spatial learning in male and female long-evans rats. *Behav Neurosci*, **1995**;109 (1):180-3.
167. **Jonasson Z.** Meta-analysis of sex differences in rodent models of learning and memory: a review of behavioral and biological data. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, **2005**;28 (8):811-25.
168. **Paganelli RA, Benetolli A, Lima KC, Cestari-Junior LA, Favero Filho LA, Milani H.** A Novel Version of The 8-Arm Radial Maze: Effects of Cerebral Ischemia on Learning and Memory. *Journal of Neuroscience Methods*, **2004**;132 (1):9-18.
169. **Albensi, B.C.,** Models of brain injury and alterations in synaptic plasticity. *Journal of Neuroscience Research*, **2001**;65 (4):279–283
170. **Dykens JA, Moos WH, Howell N.** Development of 17 alpha-estradiol As a neuroprotective the rapeutic agent: rationale and results from a phase I clinical study. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **2005**;1052:116–135.
171. **Gibbs RB.** Impairment of basal forebrain cholinergic neurons associated with aging and long-term loss of ovarian function. *Experimental Neurology*, **1998**;151 (2):289–302.
172. **Mufson EJ, Cai WJ, Jaffar S, Chen E, Stebbins G, Sendera T, Kordower JH.** Estrogen receptor immuno reactivity with in subregions of the rat forebrain: Neuronal distribution and association with perikarya containing choline acetyltransferase. *Brain Research*, **1999**;849 (1-2):253–274
173. **Simpkins JW, Green PS, Gridley KE, Singh M, de Fiebre NC, Rajakumar G.** Role of estrogen replacement the rapyin memory enhance mentand the prevention of neuronal loss associated with Alzheimer's disease. *The American Journal of Medicine*, **1997**;103 (3A):19–25.
174. **Prut L, Belzung C.** The open field as a paradigm measure. *Eur J Pharmacology*, **2003**;463 (1-3):3-33.
175. **Lieben CKJ, Oorsouw KV, Deutz NEP, Blokland A.** Acute tryptophan depletion induced by a gelatin-based mixture impairs object memory but not affective behavior and spatial learning in the rat. *Behav Brain Res*, **2004**;151 (1-2):53-64.
176. **Eddy NB, Leimback D.** Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutenylamines. *J Pharmacol Exp Ther*, **1953**;107 (3):385-93.

177. **Bispo MD, Mourão RH, Franzotti EM, Bomfim KB, Arrigoni-Blank MF, Moreno MP, Marchioro M, Antonioli AR.** Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. *J Ethnopharmacol.*, **2001**;76 (1):81-6.
178. **Uzday İT.** Psikofarmakolojinin temelleri ve deneysel araştırma teknikleri. 1.Baskı, Ankara: Çizgi Tıp Yayınevi, **2004**: 142.
179. **Olson ME, Bruce J.** Ovariectomy, Ovariohysterectomy and Orchidectomy in Rodents and Rabbits. *Can Vet J.*, **1986**;27 (12):523-527.
180. **Castro JE.** Surgical procedures in small laboratory animals. *J Immunol Methods*, **1974**;4 (2):212-216.
181. **Brouwer EA, Dailey R, Brouwer JB.** Ovariectomy of newborn rats: a descriptive procedure. *Lab Anim Sci.*, **1980**;30 (3):546-548.
182. **Leonard EP.** Fundamentals of small animal surgery. *Philadelphia: WB Saunders* **1968**. p. 215-248.
183. **Souccar C, Lima-Landman MT, Ballejo G, Lapa AJ.** Mechanism of neuromuscular blockade induced by phentonium, a quaternary derivative of (-)-hyoscyamine, in skeletal muscles. *Br J Pharmacol*, **1998**;124 (6):1270-1276.
184. **Orliaguet G, Langeron O, Coirault C, Fratea S, Coriat P, Riou B.** Effects of dantrolene on rat diaphragm muscle during postnatal maturation. *Anesthesiology*, **2001**;94 (3):468-474.
185. **Güneş S.** Düşük frekanslı sinüzoidal manyetik alanın sıçan kas elektriksel ve mekaniksel aktiviteleri üzerine etkileri. Doktora tezi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin, **2013**.
186. **Sara Y, Ertunc M, Onur R.** The role of nitric oxide on contractile impairment during endotoxemia in rat diaphragm muscle. *Eur J Pharmacol*, **2004**;505 (1-3):177-186.
187. **Roy RR, Zhong H, Monti RJ, Vallance KA, Edgerton VR.** Mechanical properties of the electrically silent adult rat soleus muscle. *Muscle Nerve*, **2002**;26 (3):404-412.
188. **Van Balkom RH, Zhan WZ, Prakash YS, Dekhuijzen PN, Sieck GC.** Corticosteroid effects on isotonic contractile properties of rat diaphragm muscle. *J Appl Physiol*, **1997**;83 (4):1062-1067.
189. **Koerts-De Lang E, Schols AM, Wouters EF, Gayan-Ramirez G, Decramer M.** Contractile properties and histochemical characteristics of the rat diaphragm after prolonged triamcinolone treatment and nutritional deprivation. *J Muscle Res Cell Motil*, **1998**;19 (5):549-555.

190. **Nethery D, DiMarco A, Stofan D, Supinski G.** Sepsis increases contraction-related generation of reactive oxygen species in the diaphragm. *J Appl Physiol*, **1999**;87 (4):1279-1286.
191. **Köktürk S, Ceylan S, Yardımoğlu M, Dalçık H, Gonca S.** Farklı tespit solüsyonlarıyla perfüzyon ve immersiyon tespit yöntemlerinin değişik dokularda ışık mikroskopik düzeyde karşılaştırılması. *Genel Tıp Derg.*, **1999**;4:135-139.
192. **Eraslan G, Akdoğan M.** The effect of an electromagnetic field (60-90 Hz and 5 mT) on blood electrolyte (Ca<sup>++</sup>, P<sup>+++</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>) levels in male mice. *Türk J.Vet Anim Sci*, **2002**;26 (6):1233-1236.
193. **Erel O.** A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.* **2005**;38 (12):1103-1111.
194. **Erel O.** A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem.*, **2004**;37 (2):112-119.
195. **Zhang, C., Wang, S.Z., Zuo, P.P., Cui, X., Cai, J.** Protective effect of tetramethylpyrazine on learning and memory function in D-galactoselesioned mice. *Chinese Medical Sciences Journal*, **2004**;19 (3):180-184.
196. **Chui DH, Tanahashi H, Ozawa K, Ikeda S, Checler F, Ueda, O, Suzuki, H, Araki,W, Inoue, H, Shirotani, K, Takahashi, K, Gallyas, F, Tabira, T.** Transgenic mice with Alzheimer presenilin 1 mutations show accelerated neurodegeneration without amyloid plaque formation. *Nature Medicine*, **1999**;5 (5):560–564.
197. **Chang L, Liu X, Liu J, Li H, Yang Y, Liu J, Guo Z, Xiao K, Zhang C, Liu J, Zhao-Wilson X, Long J.** D-galactose induces a mitochondrial complex I deficiency in mouse skeletal muscle: potential benefits of nutrient combination in ameliorating muscle impairment. *J. Med Food*, **2014**;17 (3):357-64.
198. **Ehman KD, Moser VC.** Evaluation of cognitive function in weanling rats: A review of methods suitable for chemical screening. *Neurotoxicology and Teratology*, **2006**;28 (1):144-161.
199. **Lieben CKJ, Oorsouw KV, Deutz NEP, Blokland A.** Acute tryptophan depletion induced by a gelatin-based mixture impairs object memory but not affective behavior and spatial learning in the rat. *Behav Brain Res*, **2004**;151 (1-2):53-64.
200. **Candland DK.** The open field: some comparative data. *Annals New York Academy of Sciences*, **1969**;159 (3): 831-851.
201. **Phillips KM.** Effects of time and administration of ethanol on open field behavior in hamsters. *Physiology & Behavior*, **1982**;29 (5):785-787.
202. **Morris RGM.** Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn Motiv*, **1981**;12:239-60.

203. **D' Hooger D, De Deyn PP.** Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Rev*, **2001**; 36 (1): 60-90.
204. **Burns JM, Johnson DK, Watts A, Swerdlow RH, Brooks WM.** Reduced lean mass in early Alzheimer disease and its association with brain atrophy. *Arch Neurol.*, **2010**,67 (4):428–433.
205. **Burkholder TJ, Fingado B, Baron S, Lieber RL.** Relationship between muscle fiber types and sizes and muscle architectural properties in the Mouse hindlimb. *J Morphol*, **1994**;221 (2):177–190.
206. **Moslemi AR, Lindberg C, Oldfors A.** Analysis of multiple mitochondrial DNA deletions in inclusion body myositis. *Hum Mutat*, **1997**;10 (5):381–386.
207. **Horvath R, Fu K, Johns T, Genge A, Karpati G, Shoubridge EA.** Characterization of the mitochondrial DNA abnormalities in the skeletal muscle of patients with inclusion body myositis. *J Neuropathol Exp Neurol*, **1998**;57 (5):396-403.
208. **Oldfors A, Moslemi AR, Jonasson L, Ohlsson M, Kollberg G, Lindberg C.** Mitochondrial abnormalities in inclusion body myositis. *Neurology*, **2006**;66 (2):49–55.
209. **Boncompagni S, Moussa CE, Levy E, Pezone MJ, Lopez JR, Protasi F, Shtifman A.** Mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of amyloid precursor protein (APP) overexpressing mice. *J Biol Chem.*, **2012**;287 (24):20534–20544.
210. **Askanas V, McFerrin J, Baque S, Alvarez RB, Sarkozi E, Engel WK.** Transfer of  $\beta$ -amyloid precursor protein gene using adenovirus vector causes mitochondrial abnormalities in cultured normal human muscle. *PNAS*, **1996**;93:1314–1319.
211. **Machova E, Rudajev V, Smyckova H, Koivisto H, Tanila H, Dolezal V.** Functional cholinergic damage develops with amyloid accumulation in young adult APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> transgenic mice. *Neurobiol Dis*, **2010**;38:27–35.
212. **Askanas V, Engel WK.** Inclusion-body myositis: muscle-fiber molecular pathology and possible pathogenic significance of its similarity to Alzheimer's and Parkinson's disease brains. *Acta Neuropathol*, **2008**;116 (6):583–595.
213. **Sattler C, Erickson KI, Toro P, Schröder J.** Physical fitness as a protective factor for cognitive impairment in a prospective population-based study in Germany. *J Alzheimers Dis.*, **2011**;26 (4):709-18.
214. **Shtifmana A, Ward CW, Laver DR, Bannisterd ML, Lopez JR, Kitazawa M, Ferla FM, Ikemoto N, Querfurth HW.** Amyloid- $\beta$  protein impairs Ca<sup>2+</sup> release and contractility in skeletal Muscle. *Neurobiol Aging*, **2010**;31 (12):2080–2090.

215. **Kuo YM, Kokjohn TA, Watson MD, Woods AS, Cotter RJ, Sue LI, Kalback WM, Emmerling MR, Beach TG, Roher AE.** Elevated Ab42 in Skeletal Muscle of Alzheimer Disease Patients Suggests Peripheral Alterations of AbPP Metabolism. *American Journal of Pathology*, **2000**;156 (3):797-805.
216. **Leushina AV, Gaifullina RF, Zefirov AL, Palotás A, Mukhamedyarov MA.,** Cellular and receptor mechanisms of impairment of myocardium and aorta contractility at Alzheimer's disease model. *Cell. Transpl. Tissue Eng.*, **2012**;7 (3):98–100.
217. **Mukhamedyarov MA, Teplov AY, Grishin SN, Leushina AV, Zefirov AL, Palotás A.** Extraneuronal toxicity of Alzheimer's b-amyloid peptide: comparative study on vertebrate skeletal muscles. *Muscle Nerve*, **2011**;43 (6):872–877.
218. **Preston DC and Shapiro BE.** Electromyography and Neuromuscular Disorders: Clinical-Electrophysiologic Correlations (Expert Consult - Online) (Google e-Kitap), **2012**, 3rd Edition.
219. **Liu Y, Jiab S, Hou Y.** Effects of Ovariectomy on Rat Genioglossal Muscle Contractile Properties and Fiber-Type Distribution. *Angle Orthodontist*, **2009**;79 (3):509-514.
220. **Jonathan S. Fisher, Eileen M. Hasser and Marybeth Brown.** Effects of ovariectomy and hindlimb unloading on skeletal muscle. *J Appl Physiol*, **1998**;85 (4):1316-1321.
221. **Hou Y, Jia S, Liu Y.** 17b-Estradiol accentuates contractility of rat genioglossal muscle via regulation of estrogen receptor  $\alpha$ . *Archives of Oral Biology*, **2010**;55 (4):309-317.
222. **Dionne FT, Lesage RL, Dube JY, Tremblay RR.** Estrogen binding proteins in rat skeletal and perineal muscles: invitro and invivo studies. *J.Steroid Biochem.*, **1979**;11 (2):1073–1080.
223. **Smith,P., Heimer G, Norgren A, Ulmsten U.** Localization of steroid hormone receptors in the pelvic muscles. *Eur.J.Obstet.Gynecol.Reprod.Biol.*, **1993**;50 (1):83–85.
224. **Trenkle,A.** The anabolic effect of estrogens on nitrogen metabolism of growing and finishing cattle and sheep. In: *Anabolic Agents in Animal Production*, edited by F.C. Lu and J.Rendel. Stuttgart, Germany: Thieme, **1976**;(5):79–88.
225. **Kobori M, Yamamuro T.** Effects of gonadectomy and estrogen administration on rat skeletal muscle. *Clin.Orthop.*, **1989**;243:306–311.
226. **Suzuki S, Yamamuro T.** Long-term effects of estrogen on rat skeletal muscle. *Exp.Neurol*, **1985**;87 (2):291–299.
227. **Phillips S, Rook KK.M, Siddle NC, Bruce SA, Woledge RC.** Muscle weakness in women occurs at an earlier age than in men, but strength is preserved by hormone replacement therapy. *Clin.Sci.(Colch.)*, **1993**;84 (1):95–98.

228. **Wohlers LM, Sweeney SM, Ward CW, Lovering RM, Spangenburg EE.** Changes in contraction-induced phosphorylation of AMP-activated protein kinase and mitogen-activated protein kinases in skeletal muscle after ovariectomy. *J Cell Biochem.* **2009**; 107 (1):171-8.
229. **Jackson KC, Wohlers LM, Lovering RM, Schuh RA, Maher AC, Bonen A, Koves TR, Ilkayeva O, Thomson DM, Muoio DM, Spangenburg EE.** Ectopic lipid deposition and the metabolic profile of skeletal muscle in ovariectomized mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **2013**; 304 (3):206-17.
230. **Fares E, Pyle WG, Ray G, Rose RA, Denovan-Wright EM, Chen RP, Howlett SE.** The Impact of Ovariectomy on Calcium Homeostasis and Myofilament Calcium Sensitivity in the Aging Mouse Heart. *Plos One* **2013**;8 (9):1-18.
231. **Bai D.L, Tang X.C, He X.C.** Huperzine A, A Potential Therapeutic Agent for Treatment of Alzheimer's Disease. *Current Medicinal Chemistry,* **2000**:7 (3):355-374.

## ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Trabzon'da doğdu. Lise eğitimini Mehmet Adnan Özçelik Anadolu Lisesi'nde tamamladı.

2008 yılında İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümünden mezun oldu. 2009 yılında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2011 yılı Şubat ayında aynı Anabilim Dalına Araştırma Görevlisi olarak atandı. 2013 yılında Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğünde göreve başladı. Halen Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.

