

DENEYSEL OLARAK ALZHEİMER BENZERİ DEMANS
OLUŞTURULAN RATLARDA PİPERİNE ve BETAİN'İN
TEDAVİDEKİ ROLÜ
AYHAN VURMAZ
MEDİKAL BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Mine DOSAY AKBULUT

TEZ NO: 2015-007

2015-AFYONKARAHİSAR

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DENEYSEL OLARAK ALZHEİMER BENZERİ DEMANS
OLUŞTURULAN RATLARDA PİPERİNE VE BETAİN'İN
TEDAVİDEKİ ROLÜ**

Ayhan VURMAZ

**MEDİKAL BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mine DOSAY AKBULUT

Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından
12.SAĞ.BİL.22 proje numarası ile desteklenmiştir.

Tez No: 2015-007


2015-Afyonkarahisar


KABUL ve ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Medikal Biyoloji ve Genetik Programı
çerçevesinde yürütülmüş bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 18/11/2015


Prof. Dr. Tülay KÖKEN
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Jüri Başkanı


Prof. Dr. Cevdet UĞUZ
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye


Doç. Dr. Mine DOSAY AKBULUT
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye


Doç. Dr. Metin ERDOĞAN
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye


Yrd. Doç. Dr. Özgecan KORKMAZ AĞAOĞLU
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Üye

Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Ayhan VURMAZ'ın 'Deneysel Olarak Alzheimer Benzeri Demans Oluşturulan Ratlarda Piperine ve Betain'in Tedavideki Rolü' başlıklı tezi 26.11.2015 günü, saat 15:00 da Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Abdullah ERYAVUZ
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Doktora eğitimime başladığım günden itibaren derslerde ve tez çalışması esnasında yardımlarıyla yanımda olan danışman hocam Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Mine DOSAY AKBULUT'a saygı, sevgi ve şükranlarımı sunarım. Yüksek lisans ve doktora eğitimim süresince ve çalışma hayatımda destekleriyle hep yanımda olan Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Tülay KÖKEN'e saygı, sevgi ve şükranlarımı sunarım. Doktora eğitimi süresince bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Cevdet UĞUZ'a saygı, sevgi ve şükranlarımı sunarım. Doktora eğitimi süresince bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Metin ERDOĞAN'a saygı, sevgi ve şükranlarımı sunarım. Yüksek lisans ve doktora eğitimim süresince ve çalışma hayatımda destekleriyle hep yanımda olan Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Mustafa SERTESER'e saygı, sevgi ve şükranlarımı sunarım. Tez çalışması sırasında dokuların patolojik incelesinde yardımlarını esirgemeyen Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet Fatih BOZKURT'a teşekkür ederim. Değerli katkılarından dolayı Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Zootekni Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Özgecan KORKMAZ AĞAOĞLU'na saygı, sevgi ve şükranlarımı sunarım. Tez çalışmalarını sırasında yardımlarıyla hep yanımda olan Arş. Gör. Dr. Halit Buğra KOCA, Uzm. Dr. Abdulkadir ÇAT, Arş. Gör. Dr. Mehmet Cem SABANER ve Uzm. Bio. Hasan ACAR'a teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca yardımlarıyla her zaman maddi manevi desteklerini esirgemeyen sevgili aileme en derin saygı, sevgi ve şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.	SAYFA
ÖNSÖZ		ii
İÇİNDEKİLER		iv
SİMGELER ve KISALTMALAR		vi
ŞEKİLLER		ix

1. GİRİŞ	1
1.1. Demans	1
1.1.1. Alzheimer Hastalığı (AH)	2
1.1.1.1. Normal Beyin Yaşlanması'nın AH'dan Ayrımı	3
1.1.1.2. Alzheimer Risk Faktörleri	6
1.1.1.3. Presenilin ve APP (Amiloid Prekürsör Protein)	6
1.1.1.4. AH'deki tau β -amiloidin Nöropatolojik Ayırıcı Özellikleri ve Moleküler Patolojisi	8
1.1.1.5. Amiloid Kaskad Hipotezi	9
1.1.1.6. Alfa (α) Sekretaz	10
1.1.1.7. β -Sekretaz	11
1.1.1.8. γ -sekretaz	12
1.1.1.9. Amiloid Prekürsör Protein (APP)	13
1.1.1.10. A β Fonksiyonu	14
1.1.1.11. A β 'nin Sinaptik Disfonksiyon Üzerine Etkisi	15
1.1.1.12. Tau Protein (Mikrotübül İlişkili Tau Protein (MAPT))	16
1.1.1.13. Alzheimer Hastalığının Genetiği	17
1.1.1.14. Familial Alzheimer Hastalığı (FAH)	19
1.1.1.15. Apolipoprotein E	19
1.1.2. Ethylcholine Aziridinium(AF64A)	21
1.1.2.1. AF64A'nın Kolinoselektivitesi	22
1.1.2.2. AF64A'nın in vivo Nörokimyasal Etkileri	22
1.1.2.3. AF64A'nın Diğer Olası Potensiyel Etki Mekanizmaları	23
1.1.2.4. İn Vivo AF64A Uygulaması Nasıl Etki Eder?	23
1.1.3. Betain	24
1.1.3.1. Klasik Homosisteinüride Betain Kullanımı	27
1.1.3.2. Orta Hiperhomosisteinemi	27
1.1.4. Karabiber	28
1.1.4.1. Piperine	29
1.1.4.2. Antioksidan Potansiyeli	30
1.1.4.3. Karabiberin Nörolojik Koruyucu Potansiyeli	31
1.1.5. MAPK (Mitojen Aktive Protein Kinaz)	32
1.1.5.1. Alzheimer Hastalığı MAPK sinyalleri	34
1.1.5.1.1. A β Sitotoksitesinde MAPK'lar	37
1.1.6. Alkol	39
1.1.6.1. Alkolik Demans	39
1.1.6.2. Alkol Metabolizması	41
1.1.6.3. Oksidatif Yol	42
1.1.6.3.1. ADH:	42
1.1.6.3.2. Mikrozomal Etanol Okside Edici Sistem (CYP2E1):	43
1.1.6.3.3. Katalaz (CAT):	43
1.1.6.4. Alkol Oksidatif Metabolizma Ürünleri	43
1.1.6.4.1. Asetaldehit	43
1.1.6.4.2. Asetat:	44
1.1.6.5. Alkol ve Oksidatif Stres	44

2. MATERYAL ve METOD.....	46
2.1. Hayvan Materyali	46
2.2. Biyokimyasal Analizler	48
2.2.1. Örneklerin Hazırlanması.....	48
2.2.2. Karaciğer Doku Homojenatı Hazırlanması.....	49
2.2.3. Doku Protein Ölçüm Yöntemi.....	49
2.2.4. Eritrosit Hemoglobin Tayini:.....	49
2.2.5. Redükte Glutasyon (GSH) Ölçümü	51
2.2.6. Malondialdehit (MDA) Ölçümü (2.2.6)	51
2.3. Patolojik İnceleme	52
2.4. Genetik Analizler.....	53
2.4.1. Dokudan RNA İzolasyonu.....	53
2.4.2. cDNA Sentezi	53
2.4.3. Primer Tasarımı	54
2.4.4. β -sekretaz (BACE) mRNA Seviyelerinin Belirlenmesi.....	55
2.4.5. Mitojen-Aktiviteli Protein Kinaz (MAPK) mRNA Seviyelerinin Belirlenmesi	57
2.5. Morris Su Labirenti (Öğrenme Testi)	58
3. BULGULAR	61
3.1. Karaciğer ve Plazma MDA Seviyeleri.....	61
3.2. Plazma MDA Seviyeleri	62
3.3. Karaciğer Redükte Glutasyon (GSH) Seviyeleri.....	63
3.5. Moris Water Maze Test	65
3.6. Patolojik İnceleme Sonuçları.....	79
3.7. Hippokampus MAPK mRNA Seviyeleri.....	81
3.8. Hippokampus BACE mRNA Seviyeleri.....	83
4. TARTIŞMA	84
4.1. Moris Water Maze Test	84
4.2. AF64A Seviyeleri	87
4.4. MAPK Seviyeleri	90
5. SONUÇ.....	94
ÖZET	95
SUMMARY	97
KAYNAKLAR	99
ÖZGEÇMİŞ.....	108

SİMGELER ve KISALTMALAR

5-metil-THF:	5-metil tetrahidrofolat
α Sekretaz:	Alfa-sekretaz
ACh:	Asetilkolin
AChE:	Asetilkolinesteraz
ADH:	Alkol dehidrogenaz
AF64A:	Ethylcholine aziridinium
AH:	Alzheimer Hastalığı
AICD:	APP intrasellüler alanı
AOA:	Antioksidan aktivite
Apo-E:	Apolipoprotein E
ApoE4:	Apolipoprotein alleli ϵ 4
APP :	Amiloid Prekürsör Protein
APS :	American Psychiatric Association
ASK1:	Apoptosis sinyali düzenleyen kinaz 1
A β :	Amiloid- β
BACE:	β doku APP ayırıcı enzim
BChE:	Butirilkolinesteraz
β -Sekretaz:	Beta Sekretaz
Betan:	N,N,N,-trimetilglisin
BHMT:	Betain homosistein metil transferaz
BIN1:	Bridge integrator 1
BOS:	Beyin omurilik sıvısı
CAT:	Katalaz
CBS:	Sistasyonin β sentaz
CERAH :	Consortium to Establish a Registry of Alzheimer's Disease
ChAT:	Kolin asetiltransferaz
CLU:	Klusterin
CNS:	Merkezi Sinir Sistemi
CO2:	Karbondioksit
CRMP2:	Kollapsin cevap mediatör protein 2
CTH:	Sistasyonin sistasyonin- γ -liyaz
CVH:	Kardiovasküler hastalık
CYP2E1:	Sitokrom P450 2E1
DMG:	Dimetilglisin
DNA:	Deoksiribonükleik asit
DSM:	Diagnostik ve Statistical Manual of Mental Disorder

EGF:	Epidermal growth faktör
EOAH :	Early Onse Alzheimer Dissease
ER :	Endoplazmik retikulum
ERK:	Extracellular signal-regulated kinase
FAEE:	Fatty acid ethyl esters
FAH:	Ailesel alzheimer hastalığı (familial alzheimer disease)
FAH:	Familiyal AH
G:	Guanin
γ -sekretaz:	Gamma sekretaz
GPx:	Glutasyon peroksidaz
GSH:	Glutasyon
GSK3:	Glikojen Sentaz Kinaz 3
GSSG:	Okside glutasyon
GST:	Glutasyon-S-transferaz
GWAS:	Genom Boyu Assosiyon Çalışmaları
H ₂ O ₂ :	Hidrojen peroksit
HACHT:	Yüksek afinite kolin
Hcy:	Homosistein
HHcy:	Hiperhomosisteinemi
HMGB1:	High mobility group box protein-1
IgM:	İmmünoglobulin M
IL-1 β :	İnterlökin-1 β
JIP:	JNK ile etkileşen proteinler
JNK:	C-Jun NH ₂ -terminal kinazını
KAH:	Koroner arter hastalığı
KSR:	Ras-1'in kinaz süpressörü
LACHT:	Düşük affiniteli Ch geri alım sistemi
LOAH:	Late onseve arkzheimer Disease (geç başlangıçlı alzheimer hastalığı)
LPS:	Lipopolisakkarid
MAM:	Mitochondria-associated membranes
MAP2K:	MAPK kinazı
MAP3K:	MAPK kinaz kinazı
MAPK:	Mitojen aktive protein kinaz
MAPT:	Mikrotübül İlişkili Tau Protein
MAT:	Metionin adenosil transferaz
MEOS:	Mikrozomal etanol okside edici sistem
MP1:	MEK partner 1
MR:	Manyetik rezonans
MS:	Metionin sentaz
MSS:	Merkezi sinir sistemi
MTHFR:	Metilentetrahidrofolat redüktaz

NAA:	N-asetil aspartatı
Nav:	Voltaj bağımlı sodyum kanalı
NFTs :	Nörofibriler yumaklar
NINCDS-AHRDA:	The National Institute of Neurological and Communicative Disorders Association
NMDA:	N-metil-D-aspartat
NMDARs:	N-metil-D-aspartat reseptörlerini
NOS:	Nitrik oksit sentaz
PA:	Fosfolitik asit
PEMT:	Fosfolidiletanolamin metiltransferaz
PEN-2:	Presenilin enhancer-2
PET:	Pozitron emisyon tomografisi
PICALM:	Fosfatidilinositol bağlayıcı klatrin birleştirme proteini
PP2A:	Protein fosfotaz 2A
PS:	Presenilin
PSD95:	Post sinaptik density protein 95
RNA:	Ribonükleik asit
ROS:	Reaktif oksijen türleri
SAM:	S-adenozil metionin
SERCA:	Sarko ER Ca ²⁺
SOD:	Süperoksid dismutaz
SORL1:	Sortilin ilişkili reseptör
SPs :	Senil Plak
SSS:	Santral sinir sistemi
TNF- α :	Tümör nekrosis faktör alfa
WAVE:	Wiskott-Aldrich Familial Verprolin-Homolog Protein
WHO:	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	Senil plaklar ve Nörofibriler yumak görüntüsü	3
Şekil 1.2	Sağlıklı ve Alzheimerli beyin görüntüsü.....	4
Şekil 1.3.	Yaşlanma ve Alzheimer Hastalığı	5
Şekil 1.4.	Gamma-sekretaz enzim kompleksi.	8
Şekil 1.5.	APP protein yapısı ve işlenmesi.	13
Şekil 1.6.	Alzheimer hastalığında otozomal dominant gen bölgeleri	18
Şekil 1.7.	ApoE gen ve $\epsilon 2/\epsilon 3/\epsilon 4$ allel yapısı	20
Şekil 1.8.	AF64A'nın moleküler yapısı.....	22
Şekil 1.9.	Betain yapısı.....	25
Şekil 1.10.	Glisin oluşumu	26
Şekil 1.11.	Piperine Kimyasal Yapısı.....	30
Şekil 1.12.	MAPK sinyal yolağı.....	32
Şekil 1.13.	JNK Etkileşimi	33
Şekil 1.14.	A β ve Tau Yumağı	34
Şekil 1.15.	APP dimerizasyonu	35
Şekil 1.16.	Proinflamatuvar sitokin üretimi	36
Şekil 1.17.	ERK1/2, β -sekretazı ekspresyonu olumsuz yönde düzenler	37
Şekil 1.18.	Alkolün DNA hasarı üzerine etkisi	41
Şekil 1.19.	Alkol metabolizması	42
Şekil 2.1.	Ratların gruplara göre sınıflandırılması	48
Şekil 2.2.	Drabkin hemoglobin kalibrasyon grafiği	50
Şekil 2.3.	HPLC Redükte Glutasyon	51
Şekil 2.4.	HPLC Malondialdehit (MDA) kalibrasyon grafiği.	52
Şekil 3.1.	Karaciğer MDA seviyeleri	61
Şekil 3.2.	Plazma MDA seviyeleri	62
Şekil 3.3.	Karaciğer redükte glutasyon (GSH) seviyeleri	63
Şekil 3.4.	Eritrosit redükte glutasyon (GSH) seviyeleri.....	64
Şekil 3.5.	Moris water maze testi birinci hafta sonuçları.	66
Şekil 3.6.	Moris water maze testi ikinci hafta sonuçları.....	67
Şekil 3.7.	Moris water maze testi üçüncü hafta sonuçları	67
Şekil 3.8.	Moris water maze testi dördüncü hafta sonuçları.....	68
Şekil 3.9.	Moris water maze testi beşinci hafta sonuçları.....	69
Şekil 3.10.	Moris water maze testi kontrol grubu haftalar arası kıyaslaması	71
Şekil 3.11.	Moris water maze testi Alkol grubu haftalar arası kıyaslaması.....	72
Şekil 3.12.	Moris water maze testi Alkol + Betain grubu haftalar arası kıyaslaması	73
Şekil 3.13.	Moris water maze testi Alkol + Piperine grubu haftalar arası kıyaslaması	74
Şekil 3.14.	Moris water maze testi AF64A grubu haftalar arası kıyaslaması	75
Şekil 3.15.	Moris water maze testi AF64A + Betain grubu haftalar arası kıyaslaması	76
Şekil 3.16.	Moris water maze testi AF64A + Piperine grubu haftalar arası kıyaslaması.....	77
Şekil 3.17.	Tüm grupların beş haftalık morris su tankı sonuçları.....	78
Şekil 3.18.	Patolojik skorlama sonuçları	79
Şekil 3.19.	A-G hipokampusün CA1 bölgesinde gruplara göre görülen değişiklikler	80
Şekil 3.20.	Rat ACTB gen çalışma görünümü.....	81
Şekil 3.21.	Rat MAPK-1 gen çalışma görünümü.	81
Şekil 3.22.	Hippokampus MAPK mRNA seviyelerinin AF64A ile kıyaslama sonuçları.....	82
Şekil 3.23.	Hippokampus MAPK mRNA seviyelerinin alkol ile kıyaslama sonuçları.	82

TABLULAR

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. Drabkin reaktifinin bileşenleri	49
Tablo 2.2. Hemolizat hemoglobinin ölçümü	50
Tablo 3.1. Grupların karaciğer MDA ortalamaları	61
Tablo 3.2. Grupların plazma MDA ortalamaları	62
Tablo 3.3. Grupların karaciğer ortalama GSH değerleri	64
Tablo 3.4. Grupların ortalama eritrosit GSH değerleri	64
Tablo 3.5. Grupların birinci hafta ortalama süreleri	66
Tablo 3.6. Grupların ikinci hafta ortalama süreleri	67
Tablo 3.7. Grupların üçüncü hafta ortalama süreleri	68
Tablo 3.8. Grupların dördüncü hafta ortalama süreleri	68
Tablo 3.9. Grupların beşinci hafta ortalama süreleri	69
Tablo 3.10. Kontrol grubu haftalar arası ortalama	71
Tablo 3.11. Alkol grubu haftalar arası ortalaması	72
Tablo 3.12. Alkol + Betain grubu haftalar arası ortalaması	73
Tablo 3.13. Alkol + Piperine grubu haftalar arası ortalaması	74
Tablo 3.14. AF64A grubu haftalar arası ortalaması	75
Tablo 3.15. AF64A + Betain grubu haftalar arası ortalaması	76
Tablo 3.16. AF64A + Piperine grubu haftalar arası ortalaması	77

RESİMLER

Resim 1. Morris su testi görünümü.....	<u>Sayfa</u> 59
--	--------------------

1. GİRİŞ

1.1. Demans

Demans kişinin günlük aktivitelerini yerine getirmede yetersizlik, düşünsel becerilerin kaybı ve ciddi  l de bellek kaybına yol açan ilerleyici organik hastalıklar için kullanılan genel bir terim ve isimlendirilmez. Demans beyinde bulunan ve nöron olarak isimlendirilen hücrelerin zarar görmesidir. Zararın Őiddetine bağlı olarak nöron, normal fonksiyonlarını yerine getirme yeteneğini kaybeder veya ölebilir. Bu durum kişinin hafızasını, davranışlarını, yeteneklerini ve düşüncelerini değiştirebilir. Doktorlar genellikle Mental Bozukluklar Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı (Diagnostik ve Statistical Manual of Mental Disorder (DSM))'in kriterlerine göre tanı koyarlar. Amerikan Psikiyatri Birliği (American Psychiatric Association (APS)) 2013 yılında DSM'nin 5. baskısında demansı majör ve hafif bilişsel hastalık olarak kategorize edilmiştir (Fargo ve Bleiler, 2014).

Demans oluşumuna yol açan sebepler:

Alzheimer Hastalığı (AH)	Normal Basınçlı Hidrosefali
Vasküler Demans	Huntington Hastalığı
Lewy body ile olan Demans	Kronik Subdural Hematom
Frontatemporal Demans	Serebral tümörler
Parkinson Hastalığı	Hipotroidizm
Creutzfeld-Jakob Hastalığı	Alkolizm
HIV	İlerleyici Supranükleer Palsy
Multiple Seclerozis	Tüberküloz
Neurosyphilis	Wilson Hastalığı

Demans hastalarının büyük bir çoğunluğunu (yaklaşık %60-70) Alzheimer hastalığı oluşturur. Vasküler demans yaklaşık %20'lik kısmını, Lewy body ile olan demans % 10'luk kısmını ve yaklaşık %2 'lik kısmını ise Frontotemporal demanslı hastalar oluşturur (Holmes, 2012; Arlt, 2013; Fargo ve Bleiler, 2014).

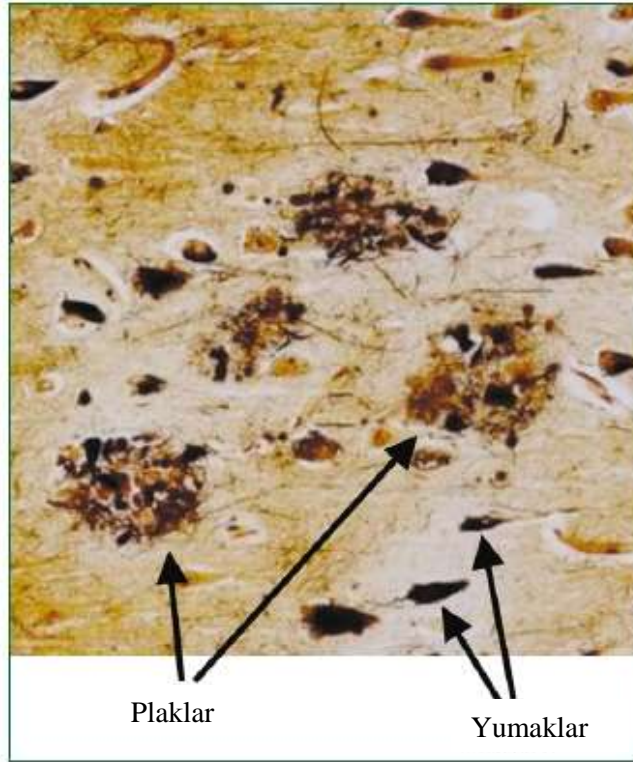
1.1.1. Alzheimer Hastalığı (AH)

Alzheimer hastalığı (AH) ilk kez Alman Psikiyatrist Alois Alzheimer tarafından Presenil Demans olarak 1906'da tanımlanmıştır (Kidd, 2008; Sery ve ark. 2013; Mosher ve Wyss-Coray, 2014). 1901 yılında Alzheimer Auguste D. AH'lı hastada ilerleyici bilişsel kaybı gözlemlemiştir. Auguste D. 1906 yılında ölmüş olup, ölümü sonrasında otopside histolojik yöntemler kullanılarak beyin incelemesi yapılmış ve çok sayıda miliyer küçük odaklar tespit edilmiştir (Sery ve ark 2013).

Küresel olarak 26 milyondan fazla kişi AH teşhisi almıştır. Yaklaşık %5'lik bir kısmını oluşturan 500 bin kişi 65 yaş altı (Early Onset Alzheimer Disease (EOAH)) hasta grubunu oluşturmaktadır. Geri kalan ve büyük bir çoğunluğunu oluşturan grup ise 65 yaş üzeridir. Bugün herhangi bir ülkede her 67 saniyede bir kişi AH teşhisi almaktadır. Bu süre 2050 yılı tahmini öngörülen sıklığı ise her 33 saniyede bir bu hastalığın ortaya çıkması ve ilerlemesi şeklindedir. Nüfus yaşlandıkça 2050 yılı tahmini rakamlarına göre AH teşhisi konan hasta sayısının 100 milyon olacağı tahmin edilmektedir (Fargo ve Bleiler, 2014; Ferreira ve ark 2014). AH ve onların ailelerinin çektiği sıkıntının yanı sıra toplum için büyük bir ekonomik yük oluşturmaktadır. Kanserden sonraki tedavi maliyeti en yüksek hastalık olan AH için etkili bir tedavinin olmamasına rağmen risk faktörlerine müdahale edilerek (yüksek kan basıncı ve yüksek kolesterol seviyeleri gibi) sebepler azaltılabilir ve tedavi maliyetleri düşürülebilir. AH çoğunlukla 65 yaş üstü bireyleri etkilediği gerçeği göz önüne alındığında hastalığın başlangıç yaşındaki 1 yıllık gibi küçük bir değişiklik bile 2050 yılına kadar 9,2 milyon daha az vaka karşılaşımla şansı ve milyarlarca dolarlık maliyetin önüne geçilmesi anlamına gelmektedir. AH için risk faktörlerinin belirlenmesi ve tedavi yollarının geliştirilmesi için muazzam bir efor harcanmaktadır (Sery ve ark 2013; Agis-Torres ve ark 2014; Fargo ve Bleiler, 2014; Ferreira ve ark 2014; Pimplikar, 2014).

100 yıldan fazladır tanımlanan Alzheimer hastalığının kendine has patolojik bulguları şunlardır; senil plaklar (SPs), nörofibriler yumaklar (NFTs), sinaptik kayıp ve nörodejenerasyon. Senil plaklar amiloid- β ($A\beta$)'dan oluşmuştur ve santral sinir

sistemindeki primer immün efektör hücre olan mikroglia tarafından çevrenmiştir. Nörofibriler yumaklar ise hiperfosforilize olmuş tau proteinin nöronlar arası birikimiyle oluştuğu rapor edilmiştir. AH'daki bilişsel eksiklik ilerleyici sinaptik ve nöronal kayıplar ile ilişkilidir (Kidd, 2008; Ferrer, 2012).



Şekil 1.1. Senil plaklar ve Nörofibriler yumak görüntüsü (Blennow ve ark, 2006).

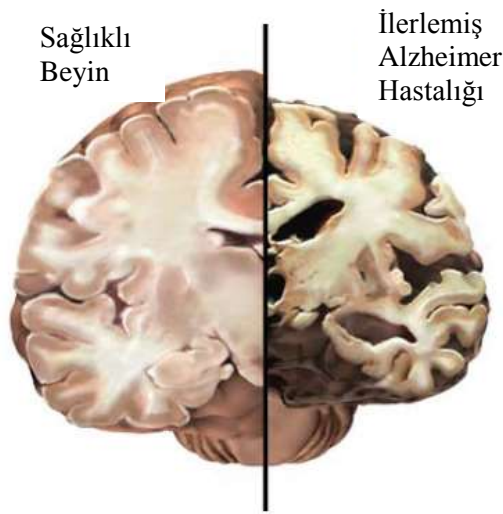
Amiloid beta ve tau protein birikimine sebep olan moleküler genetik ve epidemiyolojik hipotezlerin var olduğu rapor edilmiştir. Alzheimer hastalığının patofizyolojisinin açıklanmasındaki temel sorun; hastalığa sebep olan anahtar patolojik mekanizmanın halen açıklanamamasıdır (Kiddve ark,2008; Chai ve ark, 2013; Agis-Torres ve ark 2014).

1.1.1.1. Normal Beyin Yaşlanmasının AH'dan Ayrımı

Birçok sınıflandırma, sadece AH'na özel belirli bir yaşta ve bölgedeki plakların kesin bir sayısının varsayımı baz alınarak yapılmaktayken yaşlılardaki lezyonların sayısı

baz alınmamıştır. Khachaturian ve CERAH (Consortium to Establish a Registry of Alzheimer's Disease) kodlanmaları da seçilmiş kortikal bölgelerde plakların gümüş veya amiloid lekeleri (Khachaturian) ile ya da distrofik nöronların Bielchowski lekeleri (CERAH) kullanılarak sayılmasını esas alır. Hastadaki yaşa bağlı lezyonlarının sayısı, AH tanısı koymaya hizmet edmektedir. Bielchowski lekelerinin boyanması ve yorumlanmasından öte, Khachaturian ve CERAH sınıflandırmaları, AH'ni sınıflandırmak için kullanılan yaklaşımsal yöntemler olmayıp daha çok SPs birlikteliğindeki normal yaşlanmadan AH'ni ayırt etmeyi amaçlayan yöntemlerdir, (Kidd 2008; Obulesu ve ark 2011; Ferrer,2012; Takata ve Kitamura 2012; Sery ve ark 2013; Mosher ve Wyss-Coray, 2014).

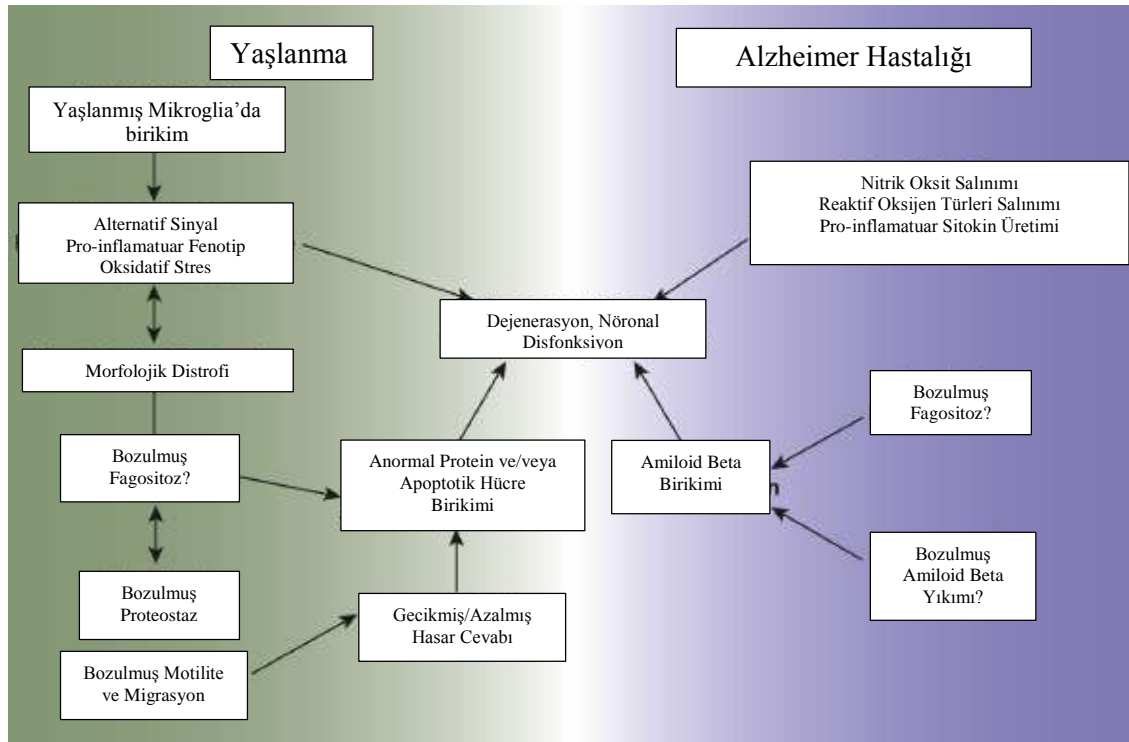
AH ilişkili patolojinin evreleri olan entorinal ve transentorinal korteksten hipokampus ve limbik beyne ve nihayetinde tüm serebral kortekse kadar olduğu kabul edilen nörofibriler yumak patolojisini baz alan, ilerleyici AH hipotezi desteklemektedir. Benzer şekilde, amiloid plakların orbital ve temporal kortekslerden tüm beyin ve son olarak da serebelluma yayıldığı gösterilmiştir. Seminal gözlemler, AH'nin serebral korteksin bazı bölgelerindeki ilk tangle veya amiloid plağından geliştiği fikri temeline dayanmaktadır (Obulesu ve ark., 2011; Ferrer,2012; Takata ve Kitamura 2012; Sery ve ark., 2013).



Şekil 1.2. Sağlıklı ve Alzheimerli beyin görüntüsü (Kidd, 2008)

AH ile çeşitli sayılarda senil plaklar ve nörofibriler yumaklar (AH ilişkili patoloji)'in eşlik ettiği normal yaşlanma arasındaki şu andaki ayırımı, sirkülerdir. Tipik formlar ve sosyal davranışların frekanslarına bakıldığında normal mental performans olarak değerlendirilen istatistiksel ölçümler baz alınarak değerlendirilen nörofibriler yumaklar ve senil plakların rastgele sayı ve genişliğine bağlıdır (Ferrer, 2012; Fjell ve ark., 2014; Kovacs ve ark., 2014).

AH'nin nöropatolojik olarak değerlendirilmesini kolaylaştırmayı hedefleyen güncel yaklaşımlar, AH ilişkili değişiklikleri ve vasküler hastalık, Lewi cisimcikli demans, TDP-43 inklüzyonları ve mesiyal skleroz gibi birliktelik gösteren patolojileri ortaya çıkarmak için belli bölgeleri seçip kesitlerin boyanması gerektiğini önermektedir (Ferrer, 2012; Fjell ve ark., 2014; Kovacs ve ark., 2014; Mosher ve Wyss-Coray, 2014).



Şekil 1. 3. Yaşlanma ve Alzheimer Hastalığı (Mosher and ve Wyss-Coray, 2014)

1.1.1.2. Alzheimer Risk Faktörleri

Alzheimer hastalığı genetik mutasyonlar yanı sıra yaygın olarak kronik hastalıkların gelişimi sonucunda tek sebep yerine çoklu faktörlerin biraraya gelmesi ile oluşmaktadır (Kidd, 2008; Holmes , 2012; Fargo ve Bleiler, 2014; Ferreira ve ark., 2014).

Bu faktörler yaş ile, aile hikayesi, apo E4 geni, orta bilişsel kayıp, kardiovasküler hastalık risk faktörleri, sosyal ve bilişsel yükümlülük, eğitim, travmatik beyin hasarı olarak sayılabilir. Farklı kaynaklarda 65 yaştan küçükler yaklaşık %5, 65-74 yaş grubunda %2-%15, 75-84 yaş grubunda %19-%44 ve 85 yaştan büyüklerde ise %42-%38 şeklinde verilmiştir. Literatürde 65 yaşından sonraki hastalık görülme oranı logaritmik olarak artmakta olduğu rapor edilmiştir (Kidd, 2008; Chen ve ark., 2009; Holmes, 2012; Agis-Torres ve ark., 2014; Fargo ve Bleiler, 2014; Ferreira ve ark., 2014; Rocca ve ark., 2014).

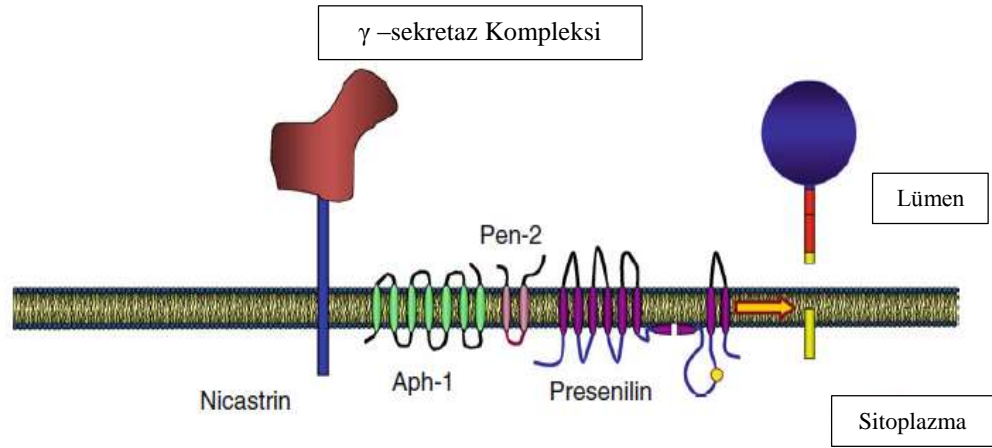
1.1.1.3. Presenilin ve APP (Amiloid Prekürsör Protein)

Hemen her yerde bulunan bir membran proteini olan amiloid prekürsör protein (APP), doku spesifik proteolizler tarafından başlangıçta APP'nin ekstrasellüler dizilerinin küçük bir uzantısını, APP'nin transmembran bölgesini ve sitoplazmik kuyruğunu (APP intrasellüler alanı [AICD]) içeren, APP(S) olarak adlandırılan büyük bir fragmanı serbestleştiren α - veya β - sekretazlar tarafından üretilmektedir. Bunlar, transmembran bölgesindeki manifold alanlarında AH ilişkili amiloid fibrillerinin primer komponentleri olan $A\beta(1-40)$ ve $A\beta(1-42)$ gibi küçük peptitleri serbestleştiren gamma-sekretaz tarafından parçalanmaktadır. β doku APP ayırıcı enzimi (BACE1) ilk başta APP'nin ekstrasellüler bölümünü ve sonra çözünebilir ektodomainin (APPs β) ayrılmasını teşvik etmektedir. PS/ γ sekretaz, APP C-terminal fragmanının transmembran alanını değişik uzunluklarda $A\beta$ peptitleri (39-43 aminoasitlik) üretmek için bölmektedir. Daha sonra, PS/ γ sekretaz, APP'yi ϵ -

klivaj alanında AICD çekirdeğe transloke olmakta, gen ekspresyonunu tetiklemekte ve apoptotik hücre ölümüne aracılık etmektedir (Şekil 1. 4.) (Obulesu ve ark.2011).

Piresenilinlerin mitokondri ilişkili membran (mitochondria-associated membranes MAM) fonksiyonunu sürdürmek için hayati bir rolü olduğu ve piresenilinler hasarlanmasının değişmiş A β seviyeleri, hiperfosforize tau, fosfolipid, kolesterol metabolizması, membran kalsiyum homeostazı ve anormal mitokondriyal dinamikler gibi AH karakteristiklerine yol açtığı gösterilmiştir (Kidd, 2008; Sery ve ark., 2013). Piresenilinler in vivo olarak enzimatik kompleks içerisinde artan ana Piresenil örnekleri olan N- ve C- fragmanlarını oluşturmak üzere senkronize endoproteolizise maruz kalır. Fonksiyonel olarak aktif gama-sekretaz (γ -sekretaz) kompleksi, piresenilin dimerleri ve nicastrin, Pen-2 ve Aph1 gibi diğer komponentlerden oluşmaktadır. Bu komponentler arasında Aph1/nicastrin, piresenilin endoproteolizisine yardım eden tam uzunluktaki piresenilin-1 ve piresenilin-2'nin stabilizasyonunda rol oynamaktadır. Bu sayede γ -sekretaz aktivitesine katkıda bulunur. Memelilerde sırasıyla 14q24.3 ve 1q31-q42 kromozomlarda lokalize piresenilin 1 ve piresenilin 2'lere sahiptir. Piresenilin1 proteini, insan beyinde ağırlıklı olarak hipokampus ve neokorteksin piramidal nöronlarında, bazal ön beyin magnosellüler nöronlarında, beyin sapı motor nöronlarında ve bazı internöron gruplarında bulunmaktadır. Piresenilinler, intrasellüler hücrelerin sayısız etkileşimi için gereklidir fakat bu etkileşimlerin önemi henüz anlaşılmış değildir. Gama-sekretaz, AH'nin patogenezinde amiloidogenik A β -42 peptitlerinin üretimi aracılığıyla önemli bir rol oynamaktadır. Gama-sekretazın katalitik merkezi olan piresenilin mutasyona uğradığında, A β 42:A β 40 oranını artırmak suretiyle AH patolojilerini çoğaltmaktadır. Piresenilinler, membran proteinlerinin trafiği ve maturasyonunun transformasyonunda henüz çözümlenmemiş olmasına rağmen anahtar rol oynadığı düşünülmektedir. Piresenilin-1, nörogenesis prosesine hem gelişim süresince hem de erişkinlerde aracılık eder. Proliferasyonun ve nörogenesisin disregülasyonu, familial AH ilişkili (FAH) piresenilin-1 varyantlarını arz eden mikroglialardan sekrete edilen spesifik kemokinlerin ve büyüme faktörlerinin seviyelerindeki varyasyonlara kısmen bağımlıdır. Piresenilin-1 ve Piresenilin-2'nin, birçok sekretaz tip 1 proteininin Notch 1 reseptörleri ve onun

ligandları için merkezi bir rol oynadıkları bildirilmiştir (Obulesu ve ark.2011; Schellenberg ve Montine, 2012). Gama sekretazın katalitik subunitinin presenilin-1 veya presenilin-2'ye bağımlı olduğu biyokimyasal olarak saptanmıştır. Reaktif astrositlerde ve aktive mikroglialardaki presenilin-1 üretiminin artması, AH gibi patolojik durumlara yol açmaktadır. Ayrıca B hücre fonksiyonunda anahtar bir rol oynarlar. Farklı uzunluklardaki A β 'nın gama-sekretaz tarafından gizli bir mekanizma aracılığıyla üretimine rağmen sadece A β -42'nin AH patolojisinde yer aldığı düşünülmektedir (Blennow ve ark., 2006; Kidd, 2008; Obulesu ve ark.2011; Pluta ve ark., 2012; Schellenberg ve Montine, 2012; Takata ve Kitamura, 2012; Sery ve ark., 2013; Agis-Torres ve ark., 2014).



Şekil 1.4. Gamma-sekretaz enzim kompleksi. Kompleks nicatrin, aph-1, Pen-2 ve presenilin (1veya 2) olmak üzere 4 membran proteini içerir (Schellenberg ve Montine, 2012).

1.1.1.4. AH'deki tau β -amiloidin Nöropatolojik Ayırıcı Özellikleri ve Moleküler Patolojisi

İlk elektron mikroskobu çalışmaları β -amiloid yapısını ve normal hücre iskeletinin disorganizasyonu ve nörofibriler yumakların bölünmüş helikal filamentlerin kümelenmesi ile birlikte olduğunu birikimleri kuşatan senil plakları göstermiştir. Değişikliğe uğramış mitokondri, rezidual cisimler ve anormal filamentlerle dolu distrofik nöritlerin varlığı ortaya konulmuştur. Senil plaklar ve nörofibriler

yumaklarda ana değişikliklerin biyokimyasal karakteristikleri 1980'lerde ortaya çıkmış ve β -amiloidin senil plakların ana komponenti olduğunu ve hiperfosforalize taunun da nörofibriler yumakların ana komponenti olduğunu kesin bir şekilde gösterilmiştir (Kidd, 2008; Obulesu ve ark., 2011; Pluta ve ark., 2012; Schellenberg ve Montine, 2012; Sery ve ark., 2013).

Senil plaklar, β -amiloidlerin değişik örneklerinden oluşmaktadır. Bunlar nöronal proseslerin noktalı değişiklikleriyle birlikte olan diffüz plaklar, β -amiloidin merkezi bir çekirdeği ile hiperfosforalize tau, değişikliğe uğramış mitokondri ve diğer hüresel artıklarıyla birlikte olan nöritik plaklar olduğu ileri sürülmüştür. Bunlara ek olarak kan damarı duvarında β -amiloid birikimi β -amiloid anjiyopatisi de AH'daki yaygın değişikliklerdendir (Blennow ve ark., 2006; Kidd, 2008; Pluta ve ark., 2012; Schellenberg ve Montine, 2012; Takata ve Kitamura, 2012; Sery ve ark., 2013).

APP, β -sekretazlar ve γ -sekretazlar tarafından yapılan proteolitik kesimi sonucu oluşan ve presenilinlerdeki bir kompleksin devamı olan β -amiloid birikimleri de bu komponentlerden birisidir. β -amiloid, senil plaklardaki fibriler β -amiloidin temel elemanları olan çeşitli ayrıştırılmış üründen ana olarak da β -amiloid1-40 ve β -amiloid1-42 oluşmaktadır (Blennow ve ark., 2006; Kidd, 2008; Obulesu ve ark., 2011; Pluta ve ark., 2012; Schellenberg ve Montine, 2012; Takata ve Kitamura, 2012; Sery ve ark., 2013; Agis-Torres ve ark., 2014; Overk ve Masliah 2014; Wischik ve ark., 2014).

1.1.1.5. Amiloid Kaskad Hipotezi

İnsan amiloid prokersür protein (APP) 21. kromozom üzerinde bulunmaktadır. APP'nin 19 exon içerdiği ve 170 kb'dan daha fazla genişlikte olduğu belirlenmiş olup, alternatif 1-13, 13a ve 14-18 exonların splicing (yapışma) alternatifleriyle, birkaç izoformu bulunmaktadır. Baskın transkriptler APP695 (ekzon 1-6, 9-18 13a

yok), APP751 (ekzon 1-7, 9-18, 13a yok) ve APP770 (ekzon 1-8 13a yok)'dur (Sery ve ark., 2013).

Amiloid prokürsör protein tip 1 transmembran proteindir. APP endoplazmik retikulum (EPR) 'da sentezlenmektedir. Daha sonra trans-golgi ağı ile yüksek konatrasyonda kararlı halde golgi aparatında saklanmaktadır (Khachaturain, 2007; Ferrer, 2012; Sery ve ark., 2013; Pimplikar, 2014).

Erken başlangıçlı ailesel AH'da APP mutasyonlarının oranı %10-15 olduğu tahmin edilmektedir. APP mutasyonlarının sebep olduğu AH ortalama 40-50 yaşlarda başlamaktadır. Down sendromlularda (trizomi 21) amiloid birikimi gözlenmektedir. Amiloid birikimi AH hastalarında nöropatolojik sebeplere yol açmaktadır. AH beyinde 3 morfolojik özellikli amiloid birikimi gözlenmektedir. Amiloid prokürsör proteinlerin biyolojik fonksiyonları farklı birkaç proteaz ile bölümlere ayrılarak incenebilir. Amiloid prokürsör protein birkaç sekretaz tarafından post-ranslasyonel proteolitik işleme tabi tutulmakta ve α -sekretaz solibl amiloid protein oluşumu, β ve γ sekretaz APP komponentlerin amiloidik özelliklerinin kazanmasını sağlanmaktadır (Khachaturain, 2007; Sery ve ark., 2013; Bayer ve Wirths, 2014; Pimplikar, 2014).

1.1.1.6. Alfa (α) Sekretaz

Alfa (α)- sekretaz tarafından Amiloid prekürsör proteinin (APP) işlenmesi ile β -amiloid AH'ı verilen küçük peptid yapının oluşumu engellenmektedir. APP, plazma membran boyunca bulunur ve α - sekretaz tarafından proteolitik işlemde geçmektedir. AH'ı sAPP α olarak adlandırılan bir solible molekül bölünme sonrası salınmaktadır. sAPP α , nöronal plastisite/hayatta kalma da önemli rol oynar ve ekzotoksositeye karşı koruma da görev aldığı ifade edilmiştir. sAPP α bir de stem cell proliferasyonunu düzenler ve erken CNS (Merkezi Sinir Sistemi) gelişiminde önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Khachaturain, 2007; Sery ve ark., 2013; Bayer ve Wirths, 2014; Choi ve ark., 2014; Pimplikar, 2014).

1.1.1.7. β -Sekretaz

Alfa-sekretaz bölünmesinin olmaması β -ve γ -sekretazın $A\beta$ oluşturmak üzere bölünmeye tabi tutulduğu endositik kompartmanda APP moleküllerinin hücre içine alınımına sebep olduğu bildirilmiştir (Sery ve ark., 2013). Amiloid prekürsör protein için β -sekretaz 1 (BACE1) tespit edilmiş ve tanımlanmıştır. β -sekretaz 1, APP metabolizmasıyla ilgili β -sekretazdır. β -sekretaz-1, membran-bağlı kısmen proteaz aktivitesine sahip C-terminaline yakın karakteristik tip I transmembran proteazı olup 11. kromozomda bulunan gen 9 ekzon içeren 501 amino asit içeren bir proteindir. Endoplazmik retikulumda sentezlendikten sonra, BACE1 endosomal kompartmana dahil edildiği plazma membranına salgı güzergahı yoluyla taşınır. β -sekretaz-1 optimum aktivitesi için asidik bir ortam gerektiği bildirilmiştir. Bu uygun ortam endozomlar tarafından sağlanır (Khachaturain, 2007; Sery ve ark., 2013; Bayer ve Wirths, 2014; Pimplikar, 2014).

β -sekretaz ekspresyonu yaşla beraber artar ve özellikle AH olan kişilerin beyin korteksinde artış gösterdiği ileri sürülmüştür. Bu artışı açıklamak için birkaç mekanizma ileri sürülmüştür (Sery ve ark., 2013; Pimplikar, 2014; Khachaturain, 2007). BACE ekspresyonunun yaşa bağlı artışını açıklayan mekanizmalardan biri BACE mRNA translasyonunun kontrolden çıkması veya BACE trafinin bozulması olarak ileri sürülmekte ve hücre içi BACE ekspresyonunun artış mekanizmaları arasında hipoksi, iskemi gibi oksidatif durumlar bulunduğu bildirilmiştir. Halen β -sekretaz 1 AH'nın tedavisinde kullanılan ilaçlar için hedef durumundadır (Sery ve ark., 2013; Khachaturain, 2007; Bayer ve Wirths, 2014). Bir diğer β -sekretaz da β -sekretaz-2 (BACE2) dir ve BACE1 den daha etkin şekilde α -sekretaz yakın APP'yi kestiği ve BACE1 primer β -sekretaz olduğu rapor edilmiştir (Khachaturain, 2007; Sery ve ark., 2013; Bayer ve Wirths, 2014; Pimplikar, 2014).

APP BACE1 tarafından kesilmesinden sonra APP'nin ektodomaini sAPP β AH'ı verilen çözünür peptid salındığı rapor edilmiştir (Sery ve ark., 2013; Pimplikar, 2014). sAPP α ve sAPP β arasındaki farklılık sAPP β da 1-16 karboksil terminal bölgesi yoksun olduğu rapor edilmiştir. Dramatik olarak her iki peptidin rolleri

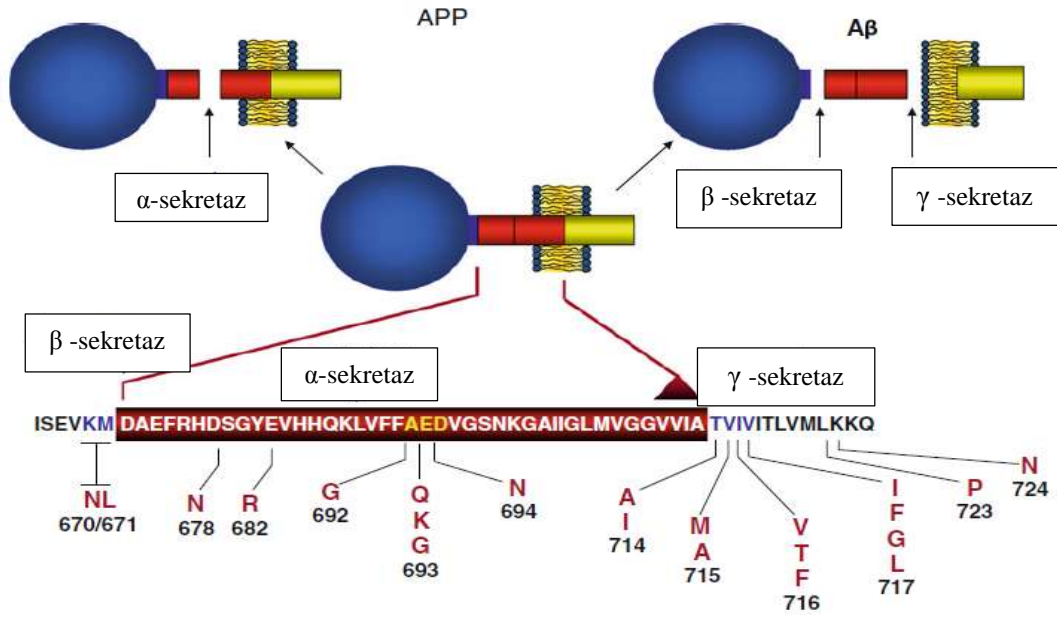
önemli ölçüde farklıdır. sAPP β nöronal hücre ölümü ve aksonal budamaya aracılık eden ölüm reseptör-6'nın ligandı olarak fonksiyon gördüğü rapor edilmiştir (Khachaturain, 2007; Sery ve ark., 2013; Bayer ve Wirths, 2014; Pimplikar, 2014).

1.1.1.8. γ -sekretaz

α CFT, γ -sekretaz tarafından p83 peptide işlenir ve bu hızlı bir şekilde bozunuma uğradığı rapor edilmiştir (Sery ve ark., 2013). Ayrıca p83'ün fonksiyonu henüz tanımlanamamıştır. β CFT, γ -sekretaz tarafından A β 40 ve A β 42'ye parçalanmakta olduğu bildirilmiştir (Khachaturain, 2007; Sery ve ark., 2013; Bayer ve Wirths, 2014; Pimplikar, 2014).

γ -sekretaz komponentleri olan büyük kompleks bir yapıdır ve başlıca 4 protein yapıdan oluşmaktadır. Bunlar; presenilin (PS, PS1 veya PS2), nicastrin olarak yer almaktadır, Anteriör Farinks-defective-1 (APH-1) ve presenilin enhancer-2 (PEN-2). γ -sekretaz kompleksi endoplazmik retikulum, golgi kompleksi ve trans-golgi ağında lokalize olduğu gösterilmiştir (Khachaturain, 2007; Sery ve ark., 2013; Bayer ve Wirths, 2014; Pimplikar, 2014).

İnsanda presenilin-1 ve presenilin-2 olmak üzere 2 homologu tanımlanmıştır. Ailesel AH formunda PS-1 ve PS-2'de mutasyonlar belirlenmiştir (Khachaturain, 2007; Sery ve ark., 2013; Bayer ve Wirths, 2014; Pimplikar, 2014).



Şekil 1.5. APP protein yapısı ve işlenmesi. Ekstraselüler bölge mavi ile A β bölgesi kırmızı ile gösterilmiştir. α -, β - ve γ –sekretaz etki bölgeleri görülmekte (Schellenberg ve Montine, 2012).

1.1.1.9. Amiloid Prekürsör Protein (APP)

Amiloid prekürsör protein endoplazmik retikulum (ER) da sentezlenmektedir. Daha sonra golgi aparatına ve oradan trans-golgi ağı ile veziküllere taşındığı ve APP trans-golgi ağında çeşitli postranslasyonel modifikasyonlar (fosforilasyon, tirozin sülfasyonu, N ve O- glikozilasyon) geçirmektedir. Son zamanlardaki araştırmalar APP'nin axon boyunca calistenin-1 ile taşındığını göstermiştir. Alzheimerli hastalarda beyin hücrelerinde azalmış calistenin-1 seviyeleri gözlenmiş ve A β 'nin artmış seviyeleri ile azalmış calistenin-1 seviyeleri arasında korelasyon olduğu belirlenmiştir (Blennow ve ark., 2006; Kidd., 2008; Chai ve ark., 2013;). Plazma membranına APP'nin insersiyonu sonrasında klatriin aracılı hızlı bir endositoz gerçekleşmektedir (Kidd., 2008; Chai ve ark., 2013; Blennow ve ark., 2006). APP'nin C-terminal bölgesinde bulunan 4 aminoasit dizilimi klatriin aracılı APP endositozu için majör signal olduğu, APP'nin C-terminal bölümü başlıca intraselüler adaptörlere bağlandığı gösterilmiştir (Kidd., 2008; Pluta ve ark., 2012; Morley ve Farr. 2014). Lipoprotein reseptör ilişkili protein (LRP1) ve apolipoprotein E reseptör

2 APP ile direk etkileşime girebilme yeteneğinde olduğu bildirilmiştir. Bağlayıcı protein içeren APP ve apolipoprotein E reseptör 2 F-spondin, Fe65, Mint1 Dab1 aracılığıyla intraselüler etkileşim olduğu ve burada içeri alınma sonrası APP nin alternatif yollarının olduğu gösterilmiştir. APP hücre yüzeyinden lizozoma direk ve hızlı taşınımı gerçekleşir. Ayrıca APP proteozomda degrade olabilir veya APP endozomdan golgi aparatı aracılığıyla plazma membranına geri taşınabildiği ifade edilmiştir (Blennow ve ark., 2006; Kidd., 2008; Pluta ve ark., 2012; Chai ve ark., 2013; Agis-Torres ve ark., 2014; Bayer ve Wirths., 2014; Kim ve ark., 2014; Kovacs ve ark., 2014; Morley ve Farr., 2014).

1.1.1.10. A β Fonksiyonu

APP'nin ekstraselüler domaini sinaptik formasyonun sürdürülmesinde özellikle önem taşımakta olduğu ve sinapsların Pre ve post-sinaptik etkileşimler için APP katkıda bulunduğu rapor edilmiştir (Sery ve ark., 2013; Agis-Torres ve ark., 2014). APP ve BACE1 fare hafızasında yıkıcı bir kayıp etkisine yol açtığı gösterilmiş olup bunun da A β 'nin öğrenme ve bellekte önemli bir rolü olduğu rapor edilmiştir (Ferrer., 2012; Takata ve Kitamura., 2012; Sery ve ark., 2013). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, A β 'nin düşük seviyeleri uzun süreli hipokampus atıvitesi, sinir iletisi ve hafıza için etkin olduğunu göstermiştir. Çok düşük konsantrasyonda A β sağlıklı bireylerin hem serobrospinal sıvısında hem de plazmasında bulunduğu rapor edilmiştir (Ferrer., 2012; Takata ve Kitamura., 2012; Sery ve ark., 2013; Overk ve Masliah., 2014). Bu A β 'nin düşük konsantrasyonlarında uzun dönem hafıza için belirgin bir artan potansiyalizasyona sahip iken artan A β konsantrasyonlarında hipokampus potansiyalizasyonunda düşme gösterilmiştir (Ferrer., 2012; Takata ve Kitamura., 2012; Schellenberg ve Montine., 2012; Sery ve ark., 2013; Agis-Torres ve ark., 2014; Overk ve Masliah., 2014; Wischik ve ark., 2014).

Başlıca A β ; A β 40 ve A β 42 olmak üzere iki adet toksik tür bulunduğu ve A β 42/ A β 40 oranındaki artış AH için tipik olduğu ileri sürülmüştür (Ferrer., 2012; Takata ve Kitamura., 2012; Sery ve ark., 2013). A β peptidin çoğunluğu A β 40 olarak

nöronlardan sekrete olmakta, A β 42'nin küçük bir fraksiyonu, Alzheimer hastalığı olanlarda amiloid fibrillerin üretiminden sorumlu olan başlıca amiloid peptid A β 42'nin kesilmesiyle oluştuğu rapor edilmiştir (Sery ve ark., 2013; Overk ve Masliah., 2014; Wischik ve ark., 2014). Fibrillerin çözünmez agregatları, çözünür oligomerleri ve dimerleri A β 42 ile ilişkili olduğu ifade edilmiştir. Ekstraselüler A β neripsilin ve insülin bozucu enzimlerle intraselüler agregasyon için hücreler tarafından hücre içine alınabildiği rapor edilmiştir. İntraselüler amiloid ürünlerin hepsi ekstraselüler aralığa boşalır ve sonunda hücre ölümünün gerçekleştiği rapor edilmiştir (Ferrer., 2012; Schellenberg ve Montine., 2012; Takata ve Kitamura., 2012; Sery ve ark., 2013; Overk ve Masliah., 2014; Wischik ve ark., 2014).

A β 40 ve A β 42'nin plazma seviyeleri biyolojik risk faktörlerin belirlenmesi için çok sayıda araştırma yapılmıştır. A β 42 ve A β 42/ A β 40 oran seviyeleri mutasyon olan ve olmayan ailesel alzheimerli bireylerde daha yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte A β 42 seviyeleri yeni başlayan mutasyonlu alzheimerli bireylerde daha düşük seviyede gözlenmiştir. Son çalışmalar A β 'nin nöronlar arasında transfer edildiğini göstermiştir. Bu transfer nöronlar arasındaki snaptik bağlantıya bağlı olduğu ve alzheimer hastalığının başlangıç aşaması entorinal cortexin dejenerasyonu ile başlar daha sonra ise ilişkili bölgelere dejenerasyonun yayıldığı şeklinde tanımlanmıştır (Thambisetty ve Lovestone, 2010; Ferrer., 2012; Schellenberg ve Montine, 2012; Takata ve Kitamura, 2012; Bignante ve ark., 2013; Sery ve ark., 2013; Agis-Torres ve ark., 2014; Bayer ve Wirths 2014; Morley ve Farr., 2014; Overk ve Masliah., 2014; Wischik ve ark., 2014; Yan ve Vassar 2014).

1.1.1.11. A β 'nin Sinaptik Disfonksiyon Üzerine Etkisi

Sinaptik fonksiyonun bütünlüğü, sinaptik temasın majör dokuları olan dendritik uçlarının belirli formasyonu tarafından sürdürülmektedir Yapısal olarak aktin filament tarafından regüle edilmektedir. AH olan bireylerin beyinde progresif sinaptik disfonksiyon ve kayıp saptanmıştır. Bu durum kognitif eksiklikle yakından ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Blennow ve ark., 2006; Ferrer, 2012; Takata ve

Kitamura, 2012). Aktin filamentin bozulmasının aynen mikrotübülde olduğu gibi AH'deki gelişimsel kaskad ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte mikrotübül ve aktin filament yapısının bozulması ile A β ve tau patolojilerinin beraberliği ile olan ilişkisi yeterli olarak anlaşılamadığı rapor edilmiştir (Blennow ve ark., 2006; Khachaturian, 2007; Ferrer, 2012; Takata ve Kitamura, 2012; Bayer ve Wirths, 2014; Overk ve Masliah, 2014; Wischik ve ark., 2014).

1.1.1.12. Tau Protein (Mikrotübül İlişkili Tau Protein (MAPT))

Tau protein geni insanda 17. kromozom üzerinde lokalize ve 15 exon içermekte. Exon 2, 3 ve 10'nun alternatif splice etkileşimi ile 6 izoformu bulunmaktadır. Taunun uzun izoformunda fosfat alıcı olarak 9 potansiyel serin ve treonin bulunmakta ve 30'dan fazla fosforile edilmiş bölgeye sahiptir. Normal tau proteini nöronların sitoskeletoninde stabilize edici mikrotübül olarak işlev görmektedir. Membran etkileşimi, enzimlerin sabitlenmesinde yardımcı olur ve axonal transportta da görev alır (Ferrer, 2012; Sery ve ark., 2013; Fargo ve Bleiler, 2014). Tau proteinin fosforilasyonu ile mikrotübüllerin bağlanması ve montajlanması regüle edilir. Sıvı çözelti içerisinde normal tau proteinin hiperfosforilasyonu ile filament yumakları oluştuğu gösterilmiştir (Fargo ve Bleiler, 2014). AH olan bireylerde tau proteini hiperfosforiledir ve bu yüzden helikal filament çiftleri ve birikmiş nöronlar gözlenmektedir. Mikrotübüller tau protein bağlama kapasitesini kaybeder bu yüzden nörodejenerasyon gözlenmektedir. A β 'nın indüklediği tau fosforilasyonu primer astrosit nöronlarda tanımlanmakta ve tau fosforilasyonuna neden olan sebepler tam anlaşılamamıştır fakat gözlemler birçok faktörün bu süreçte rol oynadığını ifade etmiştir (Ferrer, 2012; Schonrock ve Götz, 2012; Villaflores ve ark., 2012; Hochgräfe ve ark., 2013; Sery ve ark., 2013; Agis-Torres ve ark.2014; Fargo ve Bleiler, 2014; Medina ve Avila, 2014; Overk ve Masliah, 2014).

Alzheimer hastalarında tipik mikrotübüllerinde tau proteinin hiperfosforilasyonuna bağlı anormal bağlanmalar gözlenmektedir. Bu da mikrotübüllere bağlı anormal aksonal transporta yol açtığı rapor edilmiştir. Tau

proteininde AH ile ilişkili herhangi mutasyon bulunamamıştır (Ferrer, 2012; Schonrock ve Götz, 2012; Villaflores ve ark., 2012; Hochgräfe ve ark., Sery ve ark., 2013; 2013; Agis-Torres ve ark.2014; Fargo ve Bleiler, 2014; Medina ve Avila, 2014; Overk ve Masliah, 2014).

1.1.1.13. Alzheimer Hastalığının Genetiği

Aile öyküsü, ilerlemiş yaştan sonra AH için en güçlü ikinci faktördür. İkizler ve aileler üzerine yapılan çalışmalar, genetik faktörlerin AH vakalarının en az %80'inde rol oynadığını göstermiştir. AH kalıtımı, ikili bir patern göstermektedir. Genetik olarak ortaya çıkan AH, down sendromunda (kromozom 21 trizomisi) ve kromozom 21 üzerindeki amiloid prekürsör proteini (APP) geni, kromozom 14 üzerindeki presenilin-1 (PSEN1) geni ve kromozom 1 üzerindeki presenilin-2 (PSEN2) genindeki mutasyonların neden olduğu otozomal dominant kalıtmı ailesel vakalarda olduğu gibi baskın genler tarafından tetiklenmektedir (Blennow ve ark.2006; Obulesu ve ark., 2011; Ferrer, 2012; Schellenberg ve Montine 2012; Agis-Torres ve ark., 2014; Fargo ve Bleiler, 2014).

Transmembran protein ailesinin üyelerinden olan presenilin proteinlerini kodlayan presenilin geni, mutasyona uğradığında hafıza kaybı, A β plaklarının çoğalması, nörofibriler yumak formasyonu ve kalsiyum homeostazının hasarlanması gibi AH'nin patolojik karakteristiklerini tetiklediği ileri sürülmüştür (Obulesu ve ark., 2011; Ferrer, 2012; Schellenberg ve Montine 2012; Fargo ve Bleiler, 2014). PS1'deki mutasyon, 42 aminoasitli A β peptidinin AH patogeneziindeki rolünü doğrulamaktadır. PS1, APP'den A β 'ya olan prosesinden sorumlu gen olduğu ve buradaki bir mutasyon A β oluşumunun yaklaşık iki kat artışına yol açtığı rapor edilmiştir (Fargo ve Bleiler, 2014). AH etyolojisinde küçük delesyonlar ve insersiyonlar tetikleyici olsa da tek nükleotid değişikliklerinin PS mutasyonlarında kritik bir rol oynadıkları bulunmuştur (Blennow ve ark.2006; Obulesu ve ark., 2011; Ferrer, 2012; Schellenberg ve Montine 2012; Agis-Torres ve ark., 2014; Fargo ve Bleiler, 2014).

Gen ismi	Gen Sembolü	Kalıtım	Lokasyon	Başlangıç aralığı
Amiloid prekürsör protein	<i>APP</i>	Otozomal Dominant	21q21.3	38-69
Presenilin 1	<i>PSEN1</i>	Otozomal Dominant	14q24.2	25-65
Presenilin 2	<i>PSEN2</i>	Otozomal Dominant, azalmış penetrans	1q42.13	41-88

Şekil 1.6. Alzheimer hastalığında otozomal dominant gen bölgeleri (Schellenberg ve Montine, 2012).

Presenilin-1 veya presenilin-2'nin mutasyonu, A β 42/A β 40 oranının artmasına neden olur ve böylece AH'nın erken başlangıçlı otozomal dominant formlarının gelişmesi için katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür (Wakutani ve ark.2002; Obulesu ve ark., 2011; Bertram ve Tanzi, 2012; Fargo ve Bleiler, 2014; Zou ve ark., 2014).

SporadikAH (sAH), şunlar tarafından belirlenmektedir:

(a) Apolipoprotein alleli ϵ 4 (ApoE4), α 2-makroglobulin, düşük ağırlıklı lipoprotein reseptörü 1 (her ikisi 12. kromozomda), çok düşük ağırlıklı lipoprotein R (kromozom 9), interlökin 1 α (kromozom 2), klusterin (kromozom 8), fosfatidilinositol bağlayıcı klatrin birleştirme proteini (PICALM, kromozom 11) ve kompleman komponenti (3b/4b) reseptör 1 (CR1 kromozom 1) ve diğerleri gibi tekil veya kombine düşük etkili genetik faktörler;

(b) Tekrarlayan beyin travması gibi çevresel faktörler (örnek: pugilistik demans)

(c) Ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalık, orta yaşlarda artmış serum homosistein seviyeleri ve hiperkolesterolemi ve ailede demans öyküsü gibi kombine metabolik sistemik faktörler olduğu raporl edilmiştir (Blennow ve ark.2006; Obulesu ve ark., 2011; Ferrer, 2012; Schellenberg ve Montine 2012; Agis-Torres ve ark., 2014; Fargo ve Bleiler, 2014; Loy ve ark., 2014).

Vakaların yaklaşık %1-6 sı erken başlangıçlıdır (65 yaşın altı: EOA) ve bunların yaklaşık %70'i APP, presenilin-1 veya presenilin-2'deki mutasyonlarla

birlikte olduğu ve bu mutasyonlar familiyal AH'nın (FAH) majör nedeni olduğu ifade edilmiştir (Fargo ve Bleiler, 2014; Wakutani ve ark.2002; Zou ve ark., 2014). Bunun aksine geç başlangıçlı AH (65 yaştan sonra: LOAH), LOAH hastalarının % 40'ında en az bir adet ApoE4 alleli bulunmasına rağmen büyük oranda sporadik olduğu ileri sürülmüştür (Parvathy ve Buxbaum, 2002; Wakutani ve ark.2002; Blennow ve ark.2006; Obulesu ve ark., 2011; Bertram ve Tanzi, 2012; Ferrer, 2012; Schellenberg ve Montine 2012; Agis-Torres ve ark., 2014; Fargo ve Bleiler, 2014; Loy ve ark., 2014; Zou ve ark., 2014).

1.1.1.14. Familiyal Alzheimer Hastalığı (FAH)

APP geni, presenilin-1 geni ve presenilin-2 geninin AH'nın nadir erken başlangıçlı formlarıyla ilişkili olmasına rağmen, presenilin-1'in tek başına FAH ile ilişkili 170 den fazla mutasyon gösterdiği bulunmuştur. Bu mutasyonlar, toplam AH vakalarının sayısını yaklaşık %5 oranında artırmaktadır. Bu vakalar arasında presenilin-1 mutasyonlarının daha fazla olduğu varsayılmaktadır. Ek olarak, APP'nin FAH ilişkili mutasyonları arasında İzölosin (I), Fenilalanin (F) ve Glisin (G) ile olan V642 mutasyonları, AH patogeneğinde majör bir rol oynadığı ileri sürülmüştür. (Obulesu ve ark., 2011; Bertram ve Tanzi, 2012; Fargo ve Bleiler, 2014; Zou ve ark., 2014).

1.1.1.15. Apolipoprotein E

Apolipoprotein E 299 amino asitlik glikoprotein (apoE = protein; APOE = gen), esas olarak beyinin gliyası tarafından oluşturulmakta ve sekrete edilmektedir. Apolipoprotein E'nin kolesterol ve diğer lipidleri nöronlara taşıyan lipoprotein partikülleriyle bağlantılı olduğu bulunmuştur (Sery ve ark., 2013; Fargo ve Bleiler, 2014). ApoE, 19q13.32 kromozomundaki, insanlarda sadece bir aminoasit ile ayrılan, üç adet polimorfik allel ($\epsilon 2$ - Cys112/Cys158, $\epsilon 3$ - Cys112/Arg158 ve $\epsilon 4$ - Arg112/Arg158) insanlarda iki polimorfik bölgede kombinasyonlar tanımlanmıştır (Wakutani ve ark., 2002; Fargo ve Bleiler, 2014; Kim ve ark., 2014).

Apo E'nin önemli olduğu durumlar;

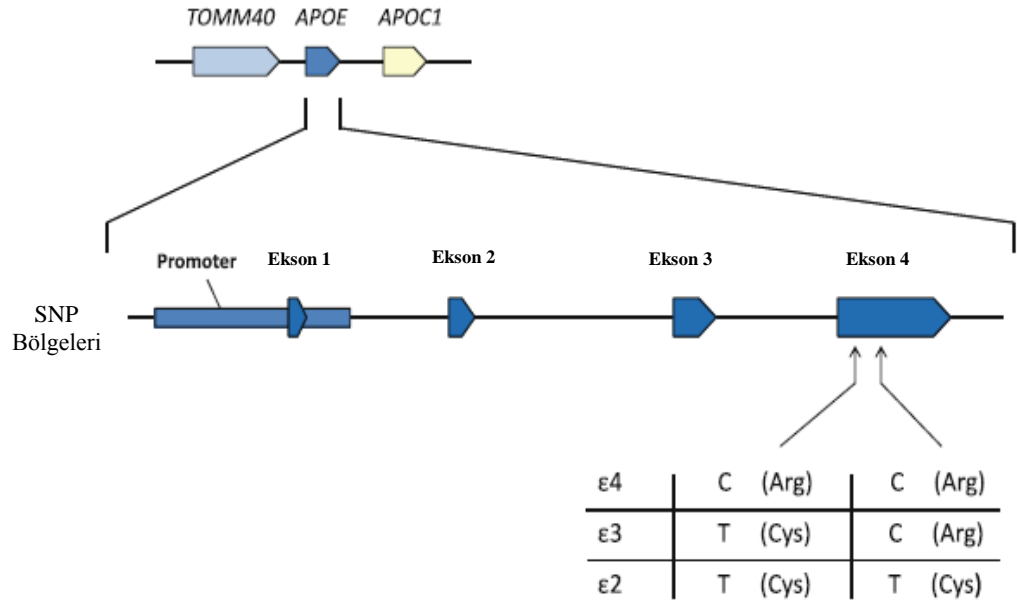
(1): Nöronal lipidleri harekete geçirmek için ve dinamik membran sentezi için düzenli destek sağlamak,

(2): Substantinal nörotransmitter salınımını sağlamak

(3): Aksiyon potansiyelinin yayılmasını sağlamak,

(4): A β 'yi uzaklaştırmak,

(5): Nöronal membran homeostazını sağlandığı şeklinde ifade edilmektedir (Şekil 1. 7) (Wakutani ve ark., 2002; Obulesu ve ark., 2011; Schellenberg ve Montine, 2012; Sery ve ark., 2013; Fargo ve Bleiler, 2014; Lim ve ark., 2014; Poirier ve ark., 2014).



Şekil 1.7. ApoE gen ve ε2/ε3/ε4 allel yapısı (Schellenberg ve Montine 2012).

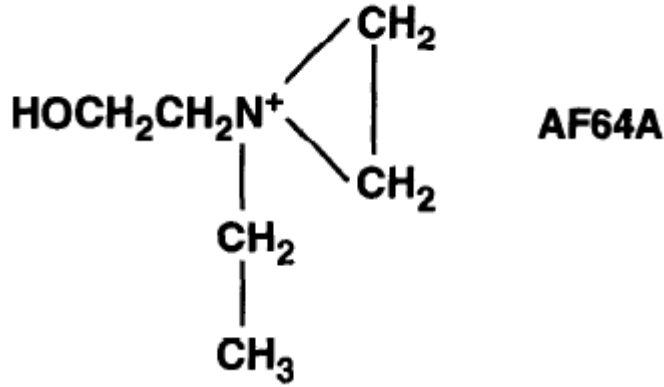
1.1.2. Ethylcholine Aziridinium(AF64A)

Kolinerjik nöron sistemleri, yaşlanma ve nörodejeneratif hastalıklar ile ilişkilendirilen bilişsel bozuklukların ortaya çıkmasında önemli bir role sahip olduğu rapor edilmiştir. Alzheimer hastalarının beyindeki hem müskaridik bağlanma bölgeleri hem de nikotin bölgelerinin sayısında ciddi bir azalma görüldüğü bildirilmiştir (Hanin, 1996; Rose ve ark., 2004).

Seçici bir kolino toksin ve etilkolin mustard aziridinium iyonu (AF64A) modelinde yapılan birçok gözlem Alzheimer hastalığının ilerleyişini anlayabilmek için oldukça önemli olduğu ifade edilmiştir. Rat hipokampüsünde oluşan AF64A kaynaklı kolinerjik fonksiyon geri çekilmesi, noradrenalin, serotonin, somatostatin ve glutamatı kapsamak üzere diğer nörotransmitterlerde gerçekleşen reverzibl fonksiyon değişimleriyle AH'ğın taklit eden değişimlerle ilişkilendirilmiştir. Sinaptik vezikül belirteçlerindeki benzer değişimler, Alzheimer hastalığı ve AF64A modelinde de görüldüğü ileri sürülmüştür (Hanin, 1996; Rose ve ark., 2004).

Asetilkolin (ACh) seviyelerinde derin bir azalma, asetilkolinesteraz (AChE), kolin asetiltransferaz (ChAT) ve yüksek afinite kolin alımı (HACHT)'in, ACh sentezi için sınırlandırıcı aşama hem otopside hem de hastaların beyin korteks ve hipokampüs örneklerinde gösterilmiştir. Daha sonraki çalışmalar AH olan bireylerde kolinerjik eksikliğinde Meynert-frontal korteks bazal nükleosu ve septo-hipokampal kolinerjik yolun karıştığını göstermekte olduğu ve AH ile öğrenme eksiliği, hafıza ve kolinerjik eksiklik arasında güçlü bir korelasyon bulunduğunu ifade edilmiştir (Hanin, 1996; Rose ve ark., 2004).

Normal kolinerjik sistemde yetersizlik iyileşme periyodu kısa olmadığından bu oldukça güçtür. İn vivo kolinerjik nöronların dejeneratif lezyon ürünlerini geliştirmek amacıyla birkaç farklı yaklaşım bulunmaktadır. AF64A molekülünde sitotoksik aziridinium kısmının varlığı, kolin (Ch)'ne olan yakın benzerliği, kolinerjik sistem lezyonlarına selektivitesinin bulunması ve uzun ömürlü olması sebebiyle tercih edilmektedir (Şekil 1.8) (Hanin, 1996; Rose ve ark., 2004).



Şekil 1.8. AF64A'nın moleküler yapısı (Hanin, 1996).

1.1.2.1. AF64A'nın Kolinoselektivitesi

AF64A'nın kolinoselektivitesi aslında *in vivo* olmasına bağlı ve etkisi hem doza hem de uygulanan bölgeyle ilişkilidir. AF64A uygulaması ile doğru şartlarda ACh, AChE, ChAT, HAcHT seviyelerinin azalması zaman alır ve M2 reseptör yoğunluğu, M1 reseptör bağlanması ve ACh'nin salınımını K⁺-oubain stimüle etmektedir. ACh'nin dışındaki diğer nörotransmitterler AF64A rat beynine uygulandığında aynı etkiyi gösterebilirler ama bu etki sadece geçici sürelik olduğu ifade edilmiştir (Hanin, 1996; Hiramatsu ve ark., 2002; Rose ve ark., 2004).

1.1.2.2. AF64A'nın *in vivo* Nörokimyasal Etkileri

AF64A kan-beyin bariyerini geçemediği ve bu yüzden merkezi sinir sistemine direk olarak uygulanması gerektiği rapor edilmiştir. Bu sebeple beyin de farklı uygulama alanları mevcuttur ve ilacın uygulanma bölgesine bağlı olarak farklı etkileri ortaya çıkmakta olduğu ifade edilmiştir. Hipokampüste ChAT ve AChE aktiviteleri azalırken septum da ChAT aktivitesi artmakta; AChE aktivitesi ise değişmemektedir. Buna ek olarak bu iki beyin bölgesinde zaman sıkalası farklıdır. Yüksek doz AF64A (2 nmol/ ventrikül) uygulamasının hipokampüsteki etkilerinin normale dönmesi 1 yıla kadar uzayabilmektedir. Diğer yandan septumdaki etkileri geçicidir, 7 günde pik

yaparken 14 gün sonunda normale dönmektedir. Ayrıca her olasılık, AF64A'nın uygulanmasından sonraki 2-3 gün içerisinde gerçekleşmemektedir (Hanin, 1996; Hiramatsu ve ark., 2002).

İn vivo hipokampus ve septum arasındaki dinamik etkileşim ile açıklanabilir. Septum da AChE ve ChAT için gen transkripsiyonunun azalması sonucunda enzim sentezinde azalma olduğu, bu nedenle hipokampüste de ACh üretiminin azaldığı düşünülmektedir. Kolinerjik hipofonksiyonu azalmasının sonucunda, azalmayı dengelemek için hipokampüste kolinoseptif hücrelerde AChE mRNA transkripsiyon seviyesindeki artış gerçekleşmektedir (Hanin, 1996; Hiramatsu ve ark., 2002).

1.1.2.3. AF64A'nın Diğer Olası Potensiyel Etki Mekanizmaları

AF64A sinir hücresi kolinerjik markerları üzerine olan etkisine ek olarak birde serbest radikaller aracılığıyla bazı toksik etkileri sonucunda oksidatif strese yol açabilmektedir. Hipokampüste AF64A uygulamasını takip eden 1 saat içerisinde çarpıcı olarak glutatyon (GSH) seviyesinde artış gözlenmektedir. GSH invivo oksidatif strese yanıt olarak endojen üretilen hücrel toksisiteyi sınırlamak için hizmet etmektedir. Güçlü bir antioksidan olan vitamin E kolinetoksik olan AF64A uygulaması öncesinde verildiğinde ratlarda öğrenme yetersizliğini ve bunun davranışsal etkilerini zayıflatmaktadır. AF64A'nın etkisi presinaptik kolinerjik nöronları etkisiz hale getirdiğinden kaynaklanmakta olduğu ileri sürülmüştür (Hanin, 1996; Hiramatsu ve ark., 2002).

1.1.2.4. İn Vivo AF64A Uygulaması Nasıl Etki Eder?

Yukarıda incelenen tüm bulgular ışığında AF64A'nın etkileri şu şekilde açıklanabilir. Koline olan yakın benzerliğinden dolayı AF64A in vivo Ch gibi biyolojik bölgelere taşınabilir. Düşük konsantrasyonlarda primer olarak HACHT bölgesine affinitesi vardır bu yüzden kolinerjik sistem için CH ve HC-3 ile yarışır.

AF64A kolinerjik hücre içinde bir ya da daha fazla yoldan etkisini gösterebilir. Mevcut bilgiler ışığında AF64A aşağıdaki yollardan bir veya daha fazla yoldan etkilerini gösterebildiği açıklanmıştır (Hanin, 1996; Rose ve ark., 2004).

a) Hücrelerde ACh ürünlerinin regülasyonu için enzimler gerekir, AF64A hücrede nükleer DNA da Guanin (G)'ler ile etkileşime girip gen transkripsiyonunu etkilediği için bu gerçekleşemez,

b) AF64A serbest radikal oluşturabilir ve lipit peroxidasyona yolu ile hücresel hasara yol açarak oksidatif stresi tetikleyebilir

c) Bazı konsantrasyonlarda AF64A Ch'nin nöron terminaline taşınımını geri dönüşümsüz inhibe edebilir, nöronun bundan nasıl etkilendiği fonksiyonu ve canlılığı üzerindeki etkisi henüz açıklanamamıştır.

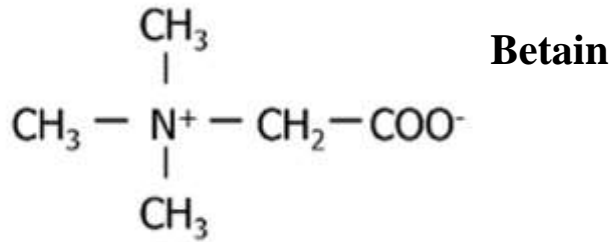
d) AF64A enzimlerin hücre gövdesinden terminal bölgesine aksonaltasınımını etkileyebilir.

e) Yüksek konsantrasyonlarda AF64A LChT bölgesi ile etkileşime girebilir kolinerjik sistem kadar nonkolinerjik sistemde etkiliyebilir bazan seçici olmayan doku hasarlarına da yol açabilir (Hanin, 1996; Rose ve ark., 2004).

1.1.3. Betain

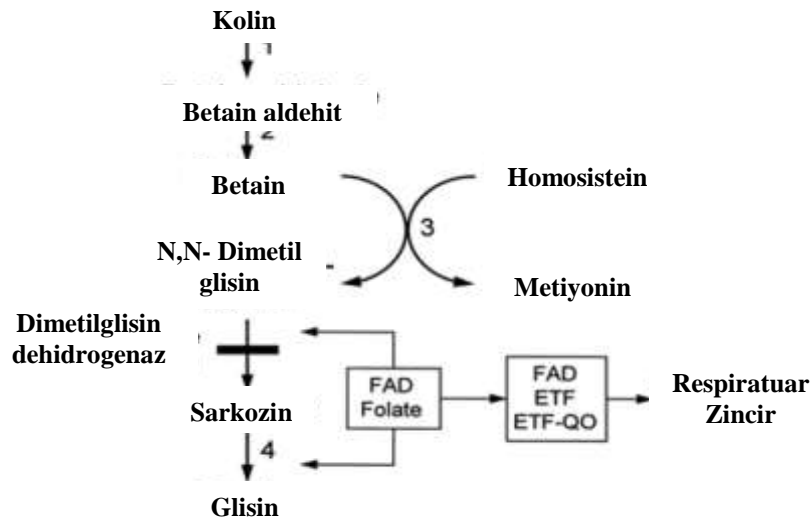
Betain (N,N,N,-trimetilglisin), betain homosistein metil transferaz (BHMT) yolağında metil vericisi olarak görev gören, azot atomu ve ona bağlı kimyasal olarak reaktif üç metil grubu bağlı olan bir metilamindir. Betain, böbrek ve karaciğerde colin dehidrogenaz aracılığıyla colinin oksidasyonu ile oluşmaktadır. Buğday, ıspanak ve pancar betain bakımından zengin olduğu gösterilmiştir (Obeid ve Herrmann, 2009; Zhang ve ark., 2013). Populasyonlar arası betain alımı farklılık göstermektedir (range: 100-400mg/gün). Çevresel faktörler ve yaşam tarzlarına göre metilasyon

siklüsünün farklılıkları ortaya çıkabilir. Ayrıca popülasyonlar arasındaki bu farklılık, besinlerin kolin ve betain içeriklerinin tahmini hesaplamalarındaki farklılıkla bağlantılı olabilir. Besin kaynaklarına ek olarak betain, kolinin kolin dehidrogenaz ve betain aldehidrogenaz aracılığıyla irreversible oksidasyonu sonucunda da oluşabildiği rapor edilmiştir (Lawson-Yuen ve Levy, 2006; Slow ve ark., 2009; Obeid ve Herrmann, 2009; Zhang ve ark., 2013).



Şekil 1.9. Betain yapısı (Lawson-Yuen ve Levy, 2006).

Betain Hcy'ne bir metil grubu vererek kendisi Dimetilglisin (DMG)'ne dönüşür, bu esnada Hcy ise metionine dönüşür. Bu yolakta BHMT enzim aktivitesi betain tarafından indüklenirken SAM ve DMG tarafından ise inhibe olmaktadır. DMG'nin az bir miktarı idrarla atılır, büyük bir kısmı ise DMG-dehidrogenaz enzimi aracılığıyla sarkozin ve glisine dönüşür. DMG-dehidrogenaz mitokondrial bir flavoprotein olup folat bağlar (Lawson-Yuen ve Levy, 2006; Obeid ve Herrmann, 2009; Zhang ve ark., 2013). Ayrıca 5,10-metilentetrahidrofolatı oluşturmak için bir karbon içeriğini tetrahidrofolata aktarır. Metil grupların BHMT aracılığıyla akış yolu vitamin B12 veya folata bağımlı değildir fakat folat yolu ve BHMT yolu arasında çapraz mekanizmalar bulunmaktadır. Kolinin Hcy metilasyonunu dolaylı olarak desteklediği gösterilmiştir (Lawson-Yuen ve Levy, 2006; Atkinson ve ark., 2009; Obeid ve Herrmann, 2009; Slow ve ark., 2009; Lever ve Slow, 2010; Obeid 2013).



Şekil 1.10. Glisin oluşumu (Obeid 2013).

Kırmızı et, kümes hayvanları, süt ve yumurta kolin açısından zengindir. Diyete ek olarak başlıca kolin kaynağı CDP yolu ile fosfotidilkolinden de-nova sentezlenmektedir. Fosfotidilkolin fosfotidiletanolaminden, fosfotidiletanolamin metiltransferaz (PEMT) yolu ile oluşur (Lawson-Yuen ve Levy, 2006; Atkinson ve ark., 2009; Obeid ve Herrmann, 2009; Slow ve ark., 2009; Lever ve Slow, 2010; Obeid 2013; Zhang ve ark., 2013).

Klasik homosisteinüriye tedavisinde amaç homosistein birikimini azaltmaktır. İlk girişimler metioninden yoksun diyet fikri üzerine olabileceği ileri sürülmüştür. Daha sonra hastalığın bir alt sınıfı olan C β S'in kofaktörü olan pridoksin (Vitamin B6) eksikliğinde pridoksin destek tedavisi şeklinde olmuştur. Pridoksine duyarlı hastalarda C β S mutasyonları veya yetersizliği pridoksin miktarıyla uyarılmaktadır. Bununla birlikte optimal pridoksin stimülasyonunun optimasyonu yetersizliği, diyet uyumunun zorluğu ve yetersizliği klasik HHcy tedavisinde ek yollar arayışına yönlendirmiştir. Betain bunların içerisinde en etkilili olarak ortaya çıkmıştır (Lawson-Yuen ve Levy, 2006; Atkinson ve ark., 2009; Obeid ve Herrmann, 2009; Slow ve ark., 2009; Lever ve Slow, 2010; Obeid 2013; Zhang ve ark., 2013).

1.1.3.1. Klasik Homosisteinüride Betain Kullanımı

Klasik HHcy yönetiminde betain kullanımının kabul edildiği birkaç durum bulunmaktadır. İlk olarak bazı durumlarda metioninden kısıtlı diyet uygulamak ve metabolik kontrol oldukça zor olduğu ikincisi sıklıkla diyet uyumsuzluğu olduğu rapor edilmiştir (Atkinson ve ark., 2009; Obeid ve Herrmann, 2009; Lever ve Slow, 2010). Metioninden yoksun diyet belki de en çok doğuştan kısıtlı olan bireylerde sınırlayıcı olabilmektedir. Örneğin metabolik kontrol amacıyla fenilketonürlü hastalarda günlük 250 mg fenilalanin alınmasına izin verilirken, klasik homosisteinürlü bireylerde sadece 150 mg/ gün metionin alınımına izin verilebilir. Üçüncüsü çocuklukla hastalığın teşhisi veya daha sonra doğal protein alınımının sınırlı olması ya da sadece metionin ürünlerinin medical satın alımı zor ve başarısız oluşudur. Betain ile tedavi bu hastalarda Hcy seviyelerinin kısmi kontrolünü sağlayabilmektedir. Son olarak, piridoksin duyarlı olan hastalar nadiren piridoksin hakkında tam metabolik kontrol elde edebilirler. Betain bu hastaların diyetinde alternatif olabileceği ileri sürülmüştür (Lawson-Yuen ve Levy, 2006; Atkinson ve ark., 2009; Obeid ve Herrmann, 2009; Slow ve ark., 2009; Lever ve Slow, 2010; Obeid 2013; Zhang ve ark., 2013).

1.1.3.2. Orta Hiperhomosisteinemi

Büyük popülasyonları içeren birçok çalışmaya göre artmış Hcy seviyeleri ile koroner arter hastalığı (KAH) arasında ilişki olduğu çeşitli araştırmalarla rapor edilmiştir. Vasküler hastalık riski bulunan bireylerde Hcy seviyelerinin hafif yükselmesine karşın folat, pridoksin ve betain kombinasyonunun kullanılabilceği ifade edilmiştir (Lawson-Yuen ve Levy, 2006; Atkinson ve ark., 2009; Slow ve ark., 2009; Lever ve Slow, 2010; Obeid 2013; Zhang ve ark., 2013).

1.1.4. Karabiber

Çağımızda, fonksiyonel ve nutrasötik gıdaların sağlığı geliştirici potansiyeline yönelik bilimsel bir temel oluşturmak için çaba sarf edilmektedir. Nutrigenomik ve proteomiksteki yenilikler diyet müdahalelerinin çeşitli hastalıklardan korunma ve bunların tedavisindeki önemini daha iyi göstermiştir. Öncelikle kalp ve damar hastalıkları (KDH), kanser oluşumu, diabetes mellitus, alzheimer hastalığı ve diyet modüllerinden kaynaklanan çeşitli inflamatuvar hastalıklar göz önüne alınması gerektiği ifade edilmiştir (Srinivasan 2007; Wattanathorn ve ark., 2008; Singh ve Duggal 2009). Baharatlar ve biyoaktif bileşenleri diyete dayalı rejimlere dâhil edilmesi ile insan sağlığını geliştirmek için daha umut verici bir aday olarak karşımıza çıkmakta. Baharatların kurutulmuş tohum, kabuk, meyve, kök ve çiçek gibi farklı kısımları tat, aroma ve renk veren gıda tamamlayıcıları olarak kullanılmaktadır. Baharatların yemeklerde kullanılması ve tedavi edici kullanımı arasındaki sınır çizgisi antik çağlardan günümüze kadar her zaman belirsiz olmuştur. Bu gıdaların genel sağlık üzerine koruyucu etkinlikleri iyi olup sindirim sistemi üzerine etkileri, inflamasyon, antimikrobik, kemoprotektif ve nöroprotektif etkileri daha büyük önem taşımaktadır. Çeşitli baharatlar arasında, karabiber (*Piper Nigrum* L.) daha ön plandadır ve “Baharatların Kralı” olarak bilindiği ifade edilmiştir (Srinivasan 2007; Wattanathorn ve ark., 2008; Singh ve Duggal 2009).

Karabiber; (*Piper nigrum* Linn), Kapalı Tohumlular (Angiospermae) sınıfının Karabibergiller tropikal ve subtropikal dağılımlı 1000’den fazla baharatı kapsayan Piperaceae familyasına ait Karabiber (*Piper nigrum*)’in kurumuş meyvesidir. Çoğunlukla nane şekeri, karabiber, kaali-mirch ve siyah altın olarak bilinmektedir. İlk olarak Hindistan’ın kıyı kesimlerinde yetiştirilmiştir ancak günümüzde dünyanın diğer bölgelerinde de yetiştirilmekte olduğu rapor edilmiştir (Srinivasan 2007; Wattanathorn ve ark., 2008; Singh ve Duggal 2009; Moghadamnia ve ark., 2010).

Dünya Sağlık Örgütü’nün (WHO) tahminlerine göre bitkisel ilaç kullanımı, Çin’de toplam ilaç tüketiminin %30-50’si, Kanada’da % 70’ini ve Avrupa’da %50’sini oluşturmaktadır. Ayrıca, ABD’de reçeteli ilaç alan hastaların %16’sı

bitkisel ve tıbbi takviyeler alırken son zamanlarda Jamaika’da yürütülen anketler, nüfusun %80’inin reçeteli ilaçları bitkisel ilaçlarla birlikte kullandığını göstermiştir(Srinivasan 2007; Singh ve Duggal 2009). Karabiber kurumuş yemişi genellikle karabiber tanesi olarak adlandırılır (boyutu yaklaşık 5 mm). Karabiber taneleri; diyet lifi, kalsiyum, magnezyum potasyum, manganez, fosfor ve β karotenin yanı sıra A ve K vitaminleri açısından da zengin olduğu ileri sürülmektedir. Karabiberin diğer bazı ürünleri de öğütülmüş karabiber, oleoresin ve biber yağı şeklinde rapor edilmiştir (Srinivasan 2007; Wattanathorn ve ark., 2008; Singh ve Duggal 2009; Moghadamnia ve ark., 2010; Han 2011; Butt ve ark., 2013).

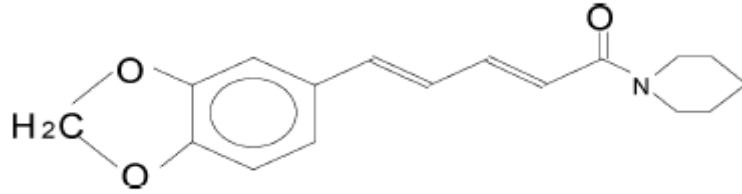
Karabiber, aktif bir bileşen olarak piperinle birlikte, uçucu yağ, oleoresinler ve alkaloidleri içermektedir. Karabiberde bulunan başlıca alkaloidler piperin, chavicine, piperidin ve piperetin olduğu gösterilmiştir. Piperin, karabiberin ana aktif bileşeni olarak bilinmektedir (Srinivasan 2007; Wattanathorn ve ark., 2008; Singh ve Duggal 2009; Moghadamnia ve ark., 2010; Han 2011; Butt ve ark., 2013).

1.1.4.1. Piperine

Piperin ilk olarak 1820 yılında Danimarkalı kimyacı Hans Christian Orstedt tarafından ayrıştırılmıştır. Piperinin bağlı molekül kütlesi ($C_{17}H_{19}O_3N$) ($[1-[5-[1, 3-benzodioxol-5-yl]-1-okso-2, 4, pentadienil piperidin)$, 285.33 g mol⁻¹’dir ve 71.55% karbon, 16.82% oksijen, 4.91% nitrojen, ve 6.71% hidrojen içerdiği gösterilmiştir (Srinivasan 2007). Erime noktası 128-130°C olan sarı kristal bir maddedir. Suda çözünmediği ve nitrik asitte veya sulu alkalide uçucu bazlı piperidine ($C_5H_{11}N$) karşı koyamayan zayıf baz gibi davranmaktadır. Buna karşın, hidrolizin asidik ürünü 4 izomerik şekli bulunan piperin asit ($C_{12}H_{19}O_4$) olarak bilinmektedir. Piperin stereoizomerleri haricindeki çok acı olmayan 3 izomerden dolayı tatsız olarak bilinmektedir (Srinivasan 2007; Ajazuddin ve ark., 2014). Piperin ışığa karşı oldukça hassastır, bu yüzden çözelti direkt ışığa maruz bırakılmamalıdır. Piperin ve piperidin ve chavicine gibi yardımcı bileşenleri karabiberin acılık özelliğinden sorumlu olduğu rapor edilmiştir. Karabiberden piperin çıkarmak için

çözücü olarak etanol kullanan çözücü ekstraksiyon sistemi kullanılabilir. Karabiber tanelerinde % 5-7 oranında piperin bulunmaktadır (Srinivasan 2007; Ajazuddin ve ark., 2014).

Piperin sağlığı geliştirici potansiyeli açısından önemlidir. Sindirimi kolaylaştırır ve sindirim enzimi uyarımını ve tükürük salgısını artırarak gıdanın bağırsaktan geçiş süresini kısaltabileceği rapor edilmiştir. Gastrik koruma işlevine ek olarak, piperinin yararları, karaciğerin korunması ve mikro besinlerin, vitaminlerin ve eser elementlerin biyo-emilimine kadar uzanmaktadır. Birçok ilaç türünün ve bitkisel ilaçların biyoyararlanımını artırmaya yardımcı olur ve bir besin geliştirici olarak hareket ettiği ifade edilmiştir. Piperine biyolojik etkisini geniş bir yelpazede sergilediği ileri sürülmüştür (Srinivasan 2007; Ajazuddin ve ark., 2014).



Şekil 1.11. Piperine Kimyasal Yapısı (Srinivasan 2007).

1.1.4.2. Antioksidan Potansiyeli

ROS yaygın olarak kanser, inflamasyon, damar tıkanıklığı ve yaşlanma gibi çeşitli hastalıklara neden olan ve/veya katkıda bulunan ajanlar olarak bilinmektedir. ROS'un aşırı üretimi oksidatif strese yol açarak vücudun savunma kabiliyetini azaltmaktadır. Birçok baharatın ve aromatik bitkinin biyoaktif moleküller içermesine bağlı olarak antioksidan potansiyele sahip olduğu rapor edilmiştir (Srinivasan 2007; Meghwal ve Goswami 2013; Ajazuddin ve ark., 2014).

Bu anlamda bitkilerde antioksidan aktivitesi (AOA) ile fenolik bileşenler arasında anlamlı bir ilişki söz edilmektedir. Bu anlamlı korelasyon baharatlarda

daha yüksek gözleendiği rapor edilmiştir. Sentetik antioksidanlarla karşılaştırıldığında karabiber esansiyel yağında ve oleoresinlerinde yüksek antioksidan etkinliği gözlemlenmiştir (Srinivasan 2007; Meghwal ve Goswami 2013; Ajazuddin ve ark., 2014).

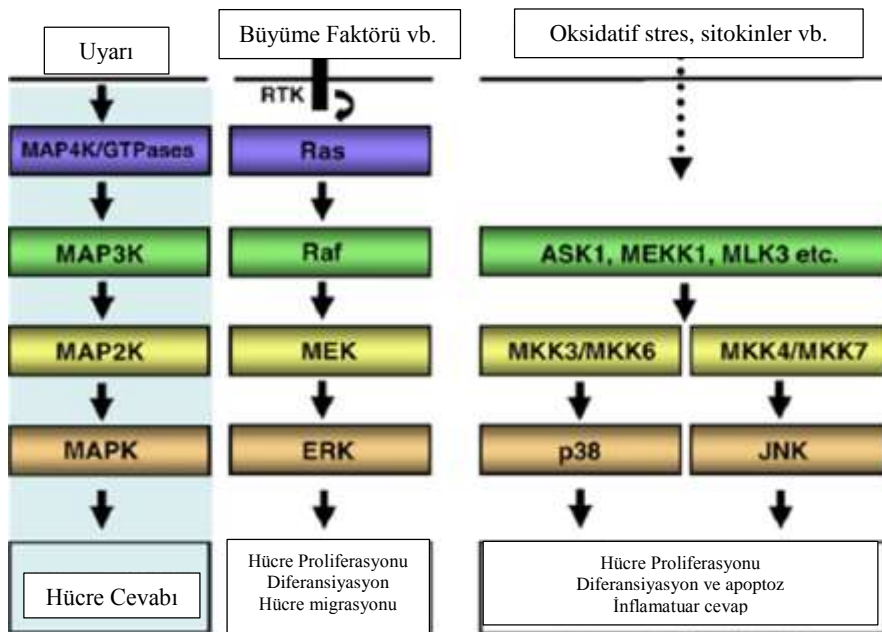
Tiyobarbiturik asit reaktif maddelerinin konjuge dienlerin üretimi oksidatif hasar belirtileri olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda, süperoksid dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon-S-transferaz (GST) ve glutatyon peroksidaz (GPx) vücutta antioksidan savunma sisteminde görev almaktadırlar. Piperin desteklemesinin oksidatif hasarı azalttığı ve vücutta işlev gören enzim sistemlerini modüle ettiği çalışmalarla gösterilmiştir (Srinivasan 2007; Meghwal ve Goswami 2013; Ajazuddin ve ark., 2014).

1.1.4.3. Karabiberin Nörolojik Koruyucu Potansiyeli

Tahminlere göre tüm dünyada 450 milyondan fazla insan birtakım sinirsel sorunlar yaşamaktadır. Bunların arasında depresyon ve stres rahatsızlıklarının birincil kaynağı oluşturmaktadır. Bu koşullara bir çözüm bulmak isteyen araştırmacılar birçok olası yöntem ortaya koymuşlardır. Karabiberin ve biyoaktif moleküllerin antioksidan potansiyeli beyin fonksiyonunu geliştirmede oldukça önemlidir. Piperinin kullanımı bilişsel fonksiyon kayıpları dahil olmak üzere nörolojik koruma sağladığı ileri sürülmektedir. Günümüzde, alzheimer hastalarının sayısındaki artış, insanoğlunun karşılaştığı en büyük sorunlardan biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Tüm dünyada bilim adamları bu tür hastalıklara karşı uygun bazı doğal ürünleri belirlemek için çalışmalar yürütmektedir. Karabiber ve aktif bileşenleri; depresyon, alzheimer, epilepsi vb. dâhil diğer sinir sistemiyle ilgili çeşitli hastalıkların tedavisinde destekleyici olarak kullanılabilceği rapor edilmiştir (Moghadamnia ve ark., 2010; Butt ve ark., 2013).

1.1.5. MAPK (Mitojen Aktive Protein Kinaz)

Ekstraselüler uyarıcılar tarafından tetiklenen gen ekspresyonu ve enzim aktivitesindeki değişimlere, çeşitli sinyal yollarının etkileşimleri aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bu yolların arasında, hücre zarından hücre çekirdeğine uyarılar gönderen temel arabulucular olan ve oldukça iyi korunan mitojen aktive protein kinaz (MAPK) yolu yer almaktadır. Mitojen aktive protein kinazlar (MAPK'lar), hücre çoğalması, farklılaşması, yaşama, ölümü ve transformasyonu dahil olmak üzere birçok hücrel etkinlik ile bağlantılı intraselüler sinyallere aracılık eden serin/treonin kinazları olarak bilinmektedir. Memeli MAPK ailesi, ekstraselüler sinyallerle düzenlenen kinaz (extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38'i ve c-Jun NH2-terminal kinazını (JNK; aynı zamanda stres ile etkileşen protein kinazı ya da SAPK olarak bilinir) içermektedir. Bu enzimlerin her biri ERK1'den ERK8'e; p38- α , - β , - γ ve - δ 'de; JNK1'den JNK3'e kadar birçok izoformu bulunmaktadır. Her MAPK sinyal aksisi; bir MAPK kinaz kinazı (MAP3K), bir MAPK kinazı (MAP2K) ve bir MAPK olmak üzere az üç ögeden oluşmaktadır. MAP3K'lar, MAP2K'ları fosforlar ve etkinleştirirken, buna karşılık olarak MAP2K'lar, MAPK'ları fosforlar ve etkinleştirir (Şekil 1.12) (Kim ve Choi 2010; Ghasemi ve ark., 2014).



Şekil 1.12. MAPK sinyal yolu (Kim ve Choi 2010).

Etkinleştirilen MAPK'lar; Elk-1, c-Jun, ATF2 ve p53 gibi transkripsiyon faktörleri dahil olmak üzere birçok substrat proteinini fosforlamaktadır. MAPK yolları, ya kinaz bileşimleri arasındaki bir dizi ikili etkileşimin sonucu olarak, ya da bir iskelet protein tarafından yönlendirilen birçok kinaz içeren, bir sinyal kompleks oluşumu ile aktiflenmektedir. Bu tür iskelet proteinleri, spesifik kinaz bileşimleri içeren MAPK sinyal yollarının etkinleşmesine aracılık ettiği ifade edilmiştir. Ras-1'in kinaz süpressörü (KSR) kinaz baskılayıcısı ve MEK partner 1 (MP1), ERK sinyal yolu için iskelet proteini olarak görev yapmaktadır. JNK ile etkileşen proteinler (JIP'ler) ise JNK yolu için iskelet proteini olarak işlev görmektedir. β -Arrestin 2, hem ERK hem de JNK sinyal yolları için iskelet proteini olarak davrandığı ileri sürülmüştür (Şekil 1.13) (Kim ve Choi 2010; Ghasemi ve ark., 2014).



Şekil 1.13. JNK Etkileşimi. Proteinler (JIP'ler) ise JNK yolu için iskelet proteini olarak işlev görür. β -Arrestin 2, hem ERK hem de JNK sinyal yolları için iskelet proteini olarak davranır (Kim ve Choi 2010).

JNK ve p38 sinyal yolları, tümör nekroz faktörü (TNF)- α ve interlökin (IL)-1 β gibi proinflamatuvar sitokinler tarafından ya da genotoksik, ozmotik, hipoksik veya oksidatif streslere bir yanıt olarak aktiflendiği ileri sürülmüştür (Kim ve Choi, 2010).

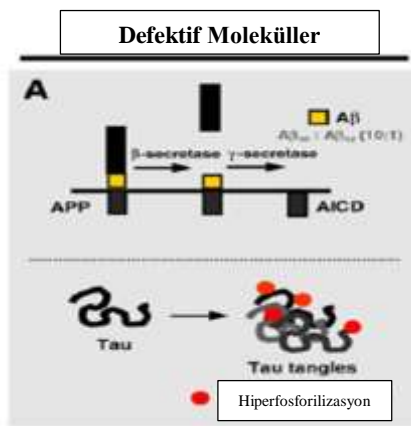
JNK yolu; JNK; SEK1 (MKK4 olarak da bilinir) gibi bir MAP2K ya da MKK7; ASK1, MEKK1, karışık dizili kinaz (MLK) gibi bir MAP3K, ya da transforming growth factor- β -aktivite kinaz 1 (TAK1)'dan oluşmaktadır. p38 sinyal yolunda, MKK3 ve MKK6 gibi farklı MAP2K'ler, p38'i aktifler ve kendileri de JNK yolunda işlev gösteren (ASK1 ve TAK1 gibi) aynı MAP3K'lar tarafından aktiflenmektedirler. ERK sinyal yolunda, ERK1 ya da ERK2 (ERK1/2), MEK1/2 tarafından aktiflenir ve buna karşılık olarak MEK1/2 A-Raf, B-Raf ya da Raf-1 (C-Raf) gibi bir Raf izoformu tarafından aktiflenmektedirler. Raf-1 kinazı, küçük GTPaz

Raf tarafından aktiflenir ve GTPaz Ras'ın aktiflenmesine reseptör tirozin kinazı (RTK)-Grb2-SOS sinyal aksisi aracılık ettiği ifade edilmiştir. K-Ras, H-Ras ve N-Ras dahil olmak üzere Ras familyasına üye proteinler, ekstraselüler sinyallerin hücre içine iletilmesinde anahtar bir role sahip olduğu rapor edilmiştir (Kim ve Choi 2010; Ghasemi ve ark., 2014).

Hem JNK hem de p38 sinyal yollarının içindeki bir MAP3K olan apoptozis sinyali düzenleyen kinaz 1 (ASK1); reaktif oksijen türleri (ROS), lipopolisakkarid (LPS), ER stresi ve Ca²⁺ akımı dahil olmak üzere birçok stres etkenine yanıt olarak etkinleşmektedir. Hücre çoğalması, farklılaşması, yaşamı ya da ölümü gibi hücrel etkinliklerde oynadıkları kritik rollerle tutarlı olarak, MAPK sinyal yolları insan hastalıklarının birçoğunun patogenezinine dahil edilmiştir (Kim ve Choi 2010; Ghasemi ve ark., 2014).

1.1.5.1. Alzheimer Hastalığı MAPK sinyalleri

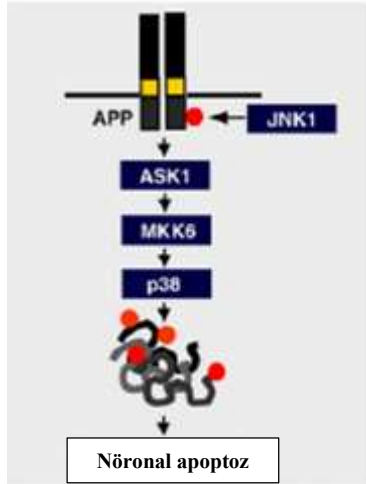
Tau'nun fosforilasyonuna JNK, p38 ve ERK dahil olmak üzere birçok kinazın aracılık ettiği belirtilmektedir (Şeki 1.14) (Zhu ve ark., 2002; Kim ve Choi 2010; Munoz ve Ammit 2010).



Şekil 1.14. Aβ ve Tau Yumağı (Kim ve Choi 2010)

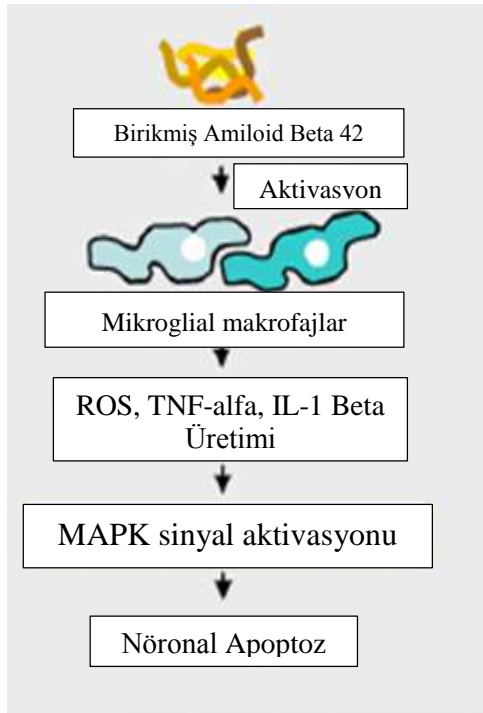
A β 42 ve A β 40 dahil olmak üzere birçok A β proteini, hücre dışında salgılanmasına rağmen, intraselüler A β 42'nin mitokondriyal oksidatif stresi başlattığı ve AH'nın patogenezi dahil olduğu gösterilmiştir. Oksidatif stresin, AH'nın ilerlemesinde anahtar bir risk faktörü olduğu düşünülmektedir. Bu tür bir stres, hidroksil radikal, süperoksit anyon ve hidrojen peroksit gibi ROS'lar ile tetiklenir ve AH'da JNK ile p38 sinyal yollarının tipik aktifleştiricileridir. Aktiflenen MAPK sinyal yollarının; nöronal apoptozu tetiklenmesi, β - ve γ -sekretazlarının transkripsiyonal ve enzimatik aktiflenmesi, JNK tarafından yapılarak AH'nın bir işareti olan APP'nin fosforlanması ve dengelenmesi gibi çeşitli mekanizmalar aracılığıyla AH patogenezi katkı sağladığı düşünülmektedir (Zhu ve ark., 2002; Kim ve Choi 2010; Munoz ve Ammit 2010).

ASK1, JNK ve p38 MAPK yollarında bulunan bir MAP3K'dir ve oksidatif strese yanıt olarak aktiflenmektedir. Proteinin A β 42 bölümü ile aracılık edilen APP dimerizasyonu, ASK1-MKK6-p38 sinyal yolunun aktiflenmesini ve dolayısıyla tau fosforilasyonunu başlattığı ileri sürülmüştür (Şekil 1.15) (Zhu ve ark., 2002; Kim ve Choi 2010; Munoz ve Ammit 2010).



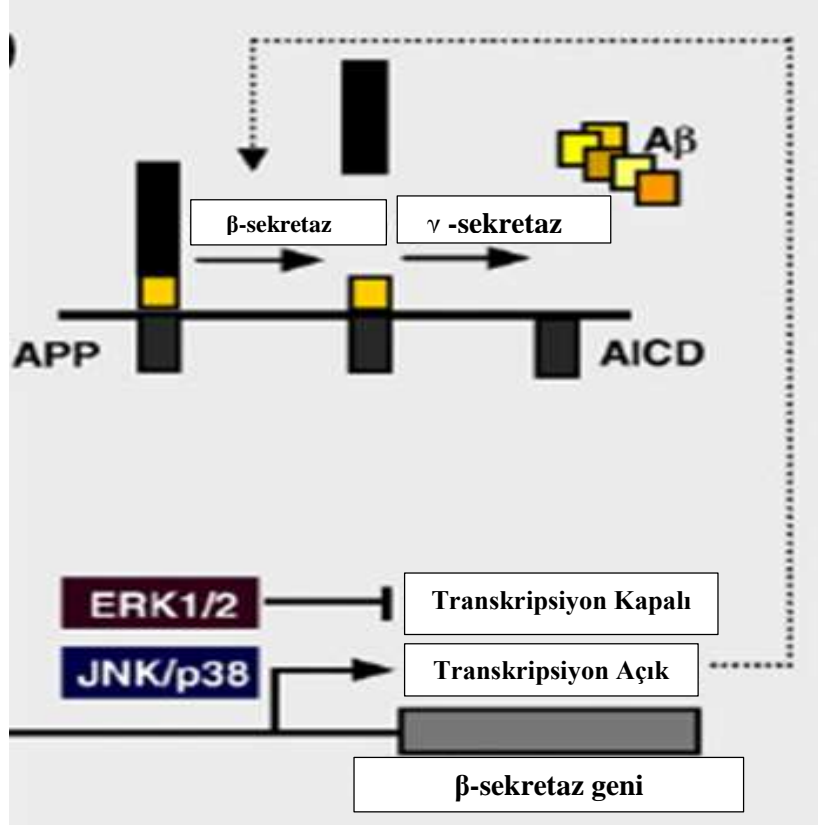
Şekil 1.15. APP dimerizasyonu, ASK1-MKK6-p38 sinyal yolunun aktiflenmesini ve dolayısıyla tau fosforilasyonunu başlatır (Kim ve Choi 2010).

ASK1 aynı zamanda, APP transgenik faresinin beyininde APP, MKK, JIP1 ve JNK1 ile sinyal kompleks oluşturmakta veya nöronal apoptozisi ya da nöronal hasarlanmadan sonra nöron dejenerasyonun gelişimini başlatmaktadır. A β 42'nin kümelenmesi, mikrogliyal makrofajların aktiflenmesine neden olur ve daha sonra hepsi MAPK sinyal yollarını harekete geçiren TNF- α ve IL-1 β gibi ROS ve proinflamatuvar sitokinleri üretir hale geldiği rapor edilmiştir (Şeki 1.16.) (Zhu ve ark., 2002; Kim ve Choi 2010; Munoz ve Ammit 2010).



Şekil 1.16. Proinflamatuvar sitokin üretimi (Kim ve Choi 2010).

Oksidatif stres koşulları altında, JNK ve p38 aktiflenirler ve β -sekretaz gen ekspresyonu başlatılır. Ancak, ERK1/2, β -sekretazın ekspresyonunu olumsuz yönde düzenlendiği ileri sürülmüştür (Şeki 1.16.) (Zhu ve ark., 2002; Bar ve ark., 2010; Kim ve Choi 2010; Munoz ve Ammit 2010).



Şekil 1.17. ERK1/2, β-sekretazı ekspresyonu olumsuz yönde düzenler (Kim ve Choi 2010).

γ-sekretazı özellikle interferon γ-, , IL-1β ya da TNF-α tarafından aktiflenir ve bu tür sitokinlerin neden olduğu γ-sekretaz etkinliğinin, JNK inhibitörü ile engellendiği ve γ-sekretaz etkinliğinin düzenlenmesinde JNK sinyal yolunu kapsayan MEKK1'in temel olarak etkin bir formunun ekspresyonu genişlettiği bulunmuştur. Büyüme faktörü β2'yi dönüştürmek APP'ye bağlıdır. MAPK sinyal yollarının nöronal apoptozis, β-ve γ-sekretaz etkinliği, APP fosforilasyonu ve taunun düzenlenmesi ile AH'nın patogeneze katkısında bulunabileceği öne sürülmektedir (Zhu ve ark., 2002; Bar ve ark., 2010; Kim ve Choi 2010; Munoz ve Ammit 2010).

1.1.5.1.1. Aβ Sitotoksitesinde MAPK'lar

Mitojenik uyarıya yanıt olarak hücre döngüsünün ilerlemesini kontrol eden sinyalleri ERK yolu ilettiği için, hücre yüzeyinden gelen mitojenik bir sinyal görevi yapabilen

NGF, TGF ve bFGF gibi büyüme faktörleri AH'da artış gösterir. ERK yolunun aktifleştirilmesinin muhtemel bir sonucu olarak, çok sayıda hücre döngüsü markerları, AH'da hassas nöronlarda yeniden eksprese edildiği rapor edilmiştir (Bar ve ark., 2010). Bu durum, hücrenin kesin olarak ölümüne katkı sağlayabilecek, hücre döngüsünün başlamasına sebep olabilir. Buna ek olarak, daha önce de bahsedildiği gibi ERK yolu, hipokampal sinaptik plastisite, öğrenme ve hafızada kritik bir rol oynamakta ve ERK'ların düzgün bir şekilde aktifleştirilmesi ile inaktif hipokampal LTP başlatımı için esansiyel pozisyona sahip olduğu ifade edilmiştir. Bu nedenle ERK yolunun düzgün bir şekilde çalışmaya devam etmesi, hipokampus ile ilgili işlevler açısından kritik önem taşımaktadır. AH'da hipokampusta anormal olarak aktifleştirilen ERK yolu, spesifik olarak hipokampal işlevlerini aksatabilir ya da bozabilir ve AH olan bireylerde hafıza kayıplarına katkı sağlayabildiği ileri sürülmüştür (Zhu ve ark., 2002; Bar ve ark., 2010; Kim ve Choi 2010; Munoz ve Ammit 2010).

Şuan, A β 'nin ERK yoluna etkisi hakkında birçok çelişkili sonuç bulunmamaktadır. A β 'nin mi ERK aktifleşmesine yol açtığı yoksa ERK aktifleşmesinin mi A β sitotoksitesine katkı sağladığı halen tartışılmaktadır. Her soruya verilen farklı cevaplara dayalı olarak, dört tane görüş ayrılığı bulunmaktadır: (1) A β sürekli olarak ERK aktifleşmesine yol açmakta ve ERK aktifleşmesi, A β 'nin neden olduğu \dot{U} fosforilasyonuna ve nöron dejenerasyonuna katkı sağlamaktadır. (2) A β , ERK aktifleşmesine yol açmakta; ancak ERK aktifleşmesi A β 'nin yol açtığı hücre ölümünde ne genel bir etki ne de koruyucu bir etkiye sahip bulunmaktadır. (3) A β , ERK aktifleşmesine yol açmaz; ancak ERK, A β 'nin yol açtığı nörotoksositeye birçok yönden aracılık eder. (4) A β , ERK'yı aktifleştirmez ve ERK, A β 'nin yol açtığı sitotoksositeye hiçbir şekilde aracılık etmediği ifade edilmiştir (Zhu ve ark., 2002; Bar ve ark., 2010; Kim ve Choi 2010; Munoz ve Ammit 2010).

AH ile ilgili proteinlerin birçok işlevi için ERK aktifleşmesinin gerekliliği ve öğrenme ile hafıza üzerinde oynadığı önemli rol düşünülürse, ERK yolunun tam olarak kontrol edilmesi çok önemli olduğu rapor edilmiştir. Aynı zamanda azalan ERK aktivitesi ile kanıtlanan, yaşlanma süresince ERK yolu üzerindeki

düzenlemenin azalması nöronal hücreleri özellikle stresle yüzleşme sırasında hassas hale getirebilir. Yaşlanırken ERK'nın düzenlenmesi üzerindeki bu azalma, 85 yaşın üstündeki yaşlıların yarısında AH görülmesinin nedeni olarak açıklanabileceği bildirilmiştir (Zhu ve ark., 2002; Bar ve ark., 2010; Kim ve Choi 2010; Munoz ve Ammit 2010).

1.1.6. Alkol

Alkolik terimi, etanole psişik olarak bağı (bağımlı) olanlar için kullanılmaktadır. Diğer bir deyişle, alkolikler için etanola duyulan şiddetli arzu günlük bir durum halini almıştır. Bu durumda, alkolün bırakılması fiziksel olarak geri çekilme semptom ve belirtileri gösterebilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde yetişkinlerin % 7'si, ergenlik çağındaki gençlerin % 19'unun ya alkolik ya da sorunlu içici oldukları tahmin edilmekte, ve toplam ölüm oranının % 5'i olarak etanol gösterilmektedir (Brust 2010).

1.1.6.1. Alkolik Demans

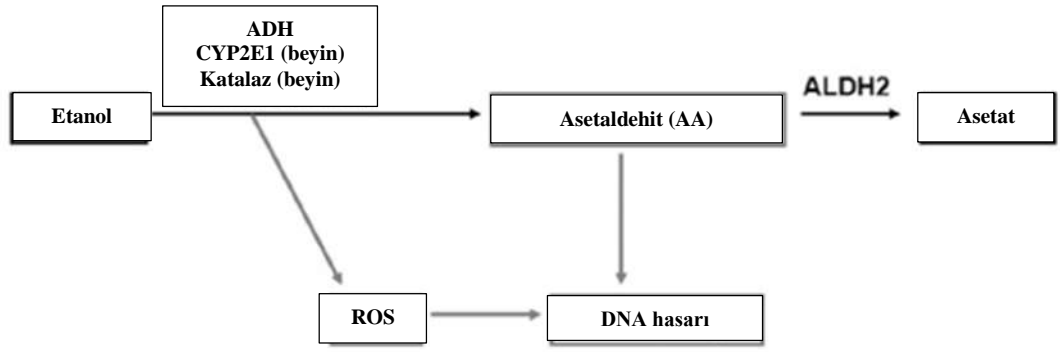
Son yıllarda, beslenme yetersizliği, beyin travması, karaciğer yetmezliği veya beyinde oluşabilecek diğer dolaylı hasarların varlığında etanolün uzun süreli bilişsel bozukluğa, “alkolik demans” ya da “etanol kaynaklı demans”a neden olabildiği günden güne kesinleşmektedir. Birçok alkolik, daha sınırlı bir alana etki eden amnestik bozukluktan çok, yavaşça ilerleyen ve birden çok alana etki eden bilişsel bozukluk göstermektedir rapor edilmiştir (Brust 2010; Kruman ve ark., 2012).

Etanole bağı demansın, tüm demans vakalarının yaklaşık % 10'unu oluşturduğu varsayılmakta olup “aşırı alkol kullanımı” büyük olasılıkla daha yüksek bir orana denk gelmektedir. Etanole bağı demans için kabul edilen kriterler, beş yılı aşkın bir süre zarfında erkekler için haftalık en az 35, kadınlar için 28 standart kadeh

ve bilişsel bozukluğun başlangıcı itibariyle üç yıl içerisinde önemli ölçüde tüketilen etanolü kapsamakta olduğu bildirilmiştir (Brust 2010; Kruman ve ark., 2012).

Hayvanlarda eşzamanlı kontrol uygulanarak yapılan çalışmalar, etanolün nörotoksik etkili olup; etanol verilen hayvanlarda hafıza ve öğrenme bozukluğuna neden olan nöropatolojik değişimlerin görüldüğünü doğruladığı gösterilmiştir. Şimdiye kadar bildirilmiş olan bozukluklar, hipokampal CA1 ve CA3 piramidal nöronların, yosunlu CA3 fiber sinapsların kaybını; bazal ön beyinde kolinerjik nöron kaybını; serebral korteks nöronlarında, hipotalamusta ve beyin sapındaki patolojik değişimleri ve hastalığın ilk aşamalarında kortikal sinaps fazlalığının ekarte edilmesiyle ortaya çıkan bozuklukları içermektedir. Hasar, doza bağımlı ve özellikle yüksek düzeyde kan etanol konsantrasyonuna (KEK) neden olan aşırı alkol tüketimi ile muhtemelen bağlantılı olarak ortaya çıkmaktadır (Brust 2010; Kruman ve ark., 2012).

Etanol nörotoksitesinin, glutamat eksitotoksitesi ve oksidatif stresi kapsamak üzere, tiyamin eksikliği kaynaklı bazı vakalarda, şiddetlenebilen çeşitli mekanizmaları bulunabilmektedir. Homosistein de etanol nörotoksitesi altında ele alınmaktadır. Hiperhomosisteinemi (HHcy), folat eksiliğinin sonucunda ortaya çıkarken homosistein, NMDA reseptör geçişini ve eksitotoksiteyi artıran glutamat NMDA reseptörlerinde bir agonist olarak çalışmaktadır. Etanol, aynı zamanda beyin-nörotropik faktör ve sinir gelişim faktörünün yararlılığını düşürmektedir. Bu durum da büyük olasılıkla intrasellüler sinyal yollarının bozulmasına sebep olmaktadır. Etanol nedeniyle DNA sarmallarının kopması, nöron ölümüyle sonuçlanabilmektedir. Kronik alkol tüketimi dokularda SAM miktarının azalmasına ve bunun sonucu olarak DNA'nın hipometilasyonuna yol açmakta olduğu rapor edilmiştir (Bleich ve ark., 2004; Brust 2010; Kruman ve ark., 2012; Schellenberg ve Montine 2012; Zakhari 2013).

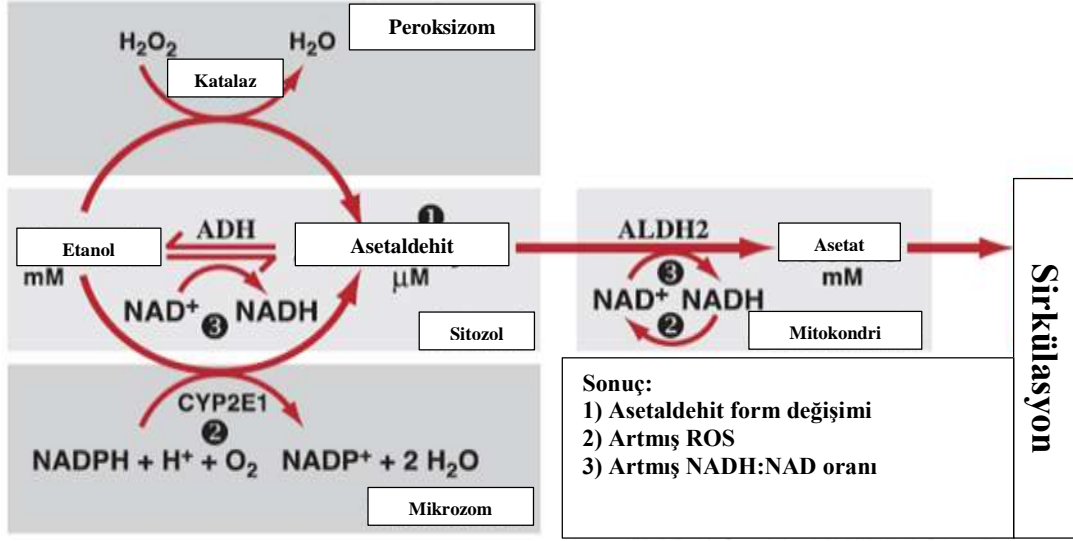


Şekil 1.18. Alkolün DNA hasarı üzerine etkisi (Kruman ve ark., 2012).

1.1.6.2. Alkol Metabolizması

Alkol metabolizması, metabolizma ürünlerinin belirlenmesi ve bunların fizyolojik etkilerinin ortaya konması önemlidir. Etanolün primer metabolizma yolu karaciğerde gerçekleşmektedir. Karaciğerden daha az olarak mide ve intestinal sistemde de oluşmaktadır. Etanol alkol dehidrogenaz (Şekil 1.1.6.2) enzimi aracılığıyla asetaldehite dönüşmektedir. Asetaldehit, etanolün etkilerinde aracılık eden majör bir rol oynamaktadır. Asetaldehit aldehit dehidrogenaz enzimi aracılığıyla asetata daha fazla okside olduğu bildirilmiştir (Zimatkin ve Deitrich 1997; Lieber 2004(a); Zakhari 2006; Kruman ve ark., 2012).

Karaciğerdeki etanol metabolizmasının aksine beyindeki etkilerinin aydınlatılması zor olduğu ifade edilmiştir. Rat beyin homojenat örneklerinde sitokrom P450 (CYP2E1) ve katalaz (CAT) yolu ile metabolizma oranları sırasıyla %60-70 ve %20 dolaylarında olduğu rapor edilmiştir (Zimatkin ve Deitrich 1997; Lieber 2004(a); Zakhari 2006; Kruman ve ark., 2012).



Şekil 1.19. Alkol metabolizması (Zakhari 2006).

1.1.6.3. Oksidatif Yol

Şekil 1.19 da gösterildiği gibi etanolün oksidatif metabolizmasına; ADH, Sitokrom P450 (CYP2E1) ve katalaz (CAT) katkıda bulunmaktadır (Lieber 2004(b); Kruman ve ark., 2012; Nassir ve Ibdah 2014).

1.1.6.3.1. ADH: Karaciğerde etanolün oksidatif metabolizmasında majör rol oynamaktadır. ADH yolu stoplazmada yer alır ve ADH'ın birçok varyantı bulunmaktadır. ADH ile metabolize olan etanol asetaldehit ürünü oluşturur ki asetaldehit doku hasarı gibi birçok zararlı etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda etanolün elemine edilmesinde bu ADH enzimi ve CYP2E1 görev almaktadır. Sonuç olarak alkol oksidasyonu karaciğer hücrelerinin sitozolünde gerçekleşmektedir. Diğer bir deyişle karaciğer hücrelerinde gerçekleşen bu reaksiyonlar sonucunda oluşan serbest radikaller (ROS) ve asetaldehid etkilerine karşı karaciğer hücreleri çok hassas olduğu ileri sürülmüştür (Lieber 2004(b); Kruman ve ark., 2012; Nassir ve Ibdah 2014).

1.1.6.3.2. Mikrozomal Etanol Okside Edici Sistem (CYP2E1): Vücuda alınan alkolün küçük (%10) bir bölümü farklı yollarla metabolize edilmektedir. Karaciğerde ADH yolu haricinde önemli bir bölümü mikrozomlarda metabolize edilmektedir. Karaciğer hücrelerinde endoplazmik retikulum (EPR) olarak bilinen hücre içi ağda mikrozomlar içinde bulunan CYP2E1, 1A2 ve 3A4 alkol oksidasyonu için başlıca yolu olduğu rapor edilmiştir. Kronik alkol tüketiminde mikrozomal etanol okside edici sistem (MEOS)'in aktivitesi özellikle de CYP2E1'in aktivitesi arttığı ileri sürülmüştür (Lieber 2004(b); Lu ve Cederbaum 2008; Kruman ve ark., 2012).

1.1.6.3.3. Katalaz (CAT): Hücrede peroxizomlarda lokalize olan katalaz (CAT) hidrojen peroksit (H₂O₂) varlığında etanolün oksidasyonunu gerçekleştirmektedir. Bununla birlikte kantitatif olarak aç karınla alkol alımı hariç CAT yolu alkol oksidasyonunda küçük bir yolu olduğu ifade edilmiştir. Kronik alkol tüketen rat karaciğerinde, perisentral bölgede H₂O₂ üretiminde ve CAT aktivitesinde artış gözlenmiştir (Lieber 2004(b); Kruman ve ark., 2012; Nassir ve Ibdah 2014).

1.1.6.4. Alkol Oksidatif Metabolizma Ürünleri

Alkolün oksidatif metabolizma ürünleri olan asetaldehit ve asetat çeşitli yollardan hücre ve doku hasarına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Lieber 2004(b); Lu ve Cederbaum 2008; Kruman ve ark., 2012).

1.1.6.4.1. Asetaldehit: Alkolün oksidatif metabolizması sırasında oluşan asetaldehit mitokondri de aldehit dehidrogenaz 2 tarafından hızlıca asetata dönüştürülür ve bu sırada NADH NADH'a dönüşmektedir. Mitokondride NADH bir dizi kimyasal reaksiyon (elektron transport zinciri) ile oksitlenmektedir. Asetaldehit enzim, mikrozomal protein ve mikrotübül gibi proteinlere bağlanma yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir. Asetaldehit, proteinlerdeki belirli bazı amino asitlerle (Lizin, sistein ve aromatik amino asit olarak adlandırılan bazı amino asitlerin gruplarıyla) etkileşime girmektedir. Ancak protein yapısındaki amino asitlerin hepsinin

asetaldehit ile olan etkileşimi aynı değildir. Bazı protein yapılar diğerlerine göre bu etkiye daha hassas olduğu rapor edilmiştir (Lieber 2004(b); Lu ve Cederbaum 2008; Kruman ve ark., 2012).

1.1.6.4.2. Asetat: Asetaldehitin oksidasyonu sonucu oluşan asetat karbondioksit (CO₂) oksitlenmektedir. Alkol metabolizması sonucunda oluşan asetatın çoğu karaciğerden kana geçmekte ve daha sonra kalp, iskelet kası ve beyinde CO₂'e metabolize edilmektedir. Asetat nötr bir ürün değildir ve karaciğer kan akışını arttırdığı gibi merkezi sinir sistemini deprese etmektedir. Asetat çeşitli yollarla metabolik yolları etkileyebilir (Lieber 2004(b); Lu ve Cederbaum 2008; Kruman ve ark., 2012).

1.1.6.5. Alkol ve Oksidatif Stres

Oksidatif stres fizyolojik ve patolojik süreçlerde üretilen ve normal antioksidan mekanizmalar tarafından engellenemeyen ROS birikimi olarak ifade edilmiştir. Kronik alkol tüketiminin yanı sıra akut alkol tüketimi de ROS üretimini artırmaktadır. ROS'un mevcut etkileri arasında DNA'nın üç boyutlu yapısının değişimi, hücre büyümesi ve ölümüyle ilgili genlerin inhibisyonu ve/veya aktivasyonu, hücre motilite artışı, vazodilatasyon ve angiogenesis olduğu rapor edilmiştir (Lieber 2004(b); Lu ve Cederbaum 2008; Kruman ve ark., 2012).

Alkolün indüklediği organ harabiyetinde alkol dehidrogenaz (ADH) ve asetaldehit dehidrogenaz (ALDH2) basamağında hidrojen akseptörü NAD kofaktör olarak görev almaktadır. NADH seviyesi artarken mitokondrial DNA harabiyeti ve lipit peroksidasyonuna yol açan süperoksit radikal seviyesi artmaktadır. Oksidatif denge bozulması sonucunda doku hasarı ortaya çıkmaktadır. Ayrıca mitokondri NAD⁺/NADH oranı da azalmaktadır. Etanol metabolizması sırasında ADH ve CYP2E1 tarafından üretilen asetaldehit ve ROS gibi reaktif moleküller, hücrede protein yapılar ve diğer moleküllerle etkileşerek bu yapıların stabilitesini ve üç

boyutlu yapılarını etkileyerek fonksiyonlarını bozabilmektedirler (Lieber 2004(b); Lu ve Cederbaum 2008; Kruman ve ark., 2012).

Tüm bu literatür bilgilerin ışığında bu çalışmada biz alkol ve AF64A ile indüklenen AH benzeri rat modelimizde antioksidan özellikteki piperinin hem moleküler düzeyde hem de davranışsal olarak tedavi etkinliğinin ortaya konması ile Hcy metabolizmasında görev alan betainin oksidan durumlardaki etkinliğinin ve davranışsal başarısını belirlemeyi amaçladık. Böylelikle AH patolojisinin aydınlatılmasına katkı sağlayarak erken teşhis edilebilmesine belirlenmesine yardımcı olmak hedeflenmektedir.

2. MATERYAL ve METOD

Afyon Kocatepe Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (AKUHADYЕК) AKUHADYЕК-195-13 nolu etik kurul raporu alınarak uygulamalar gerçekleştirilmiştir.

2.1. Hayvan Materyali

Bu çalışmada 42 adet, 3-3,5 aylık 280-320 g Sprague-Dawley erkek rat kullanılmış ve yine kayıpsız olarak 42 rat ile çalışma tamamlanmıştır. Ratlar standart bir diyetle beslenmiş ve içme suları ile ilgili herhangi bir sınırlandırılma yapılmamıştır. Tüm deney gruplarında çevresel şartlar kontrol altında tutulmuştur (12 saat/ 12 saat aydınlık/karanlık siklüsü, 25-28 °C ortam ısısı).

Çalışma prosedürüne göre ratlar aşağıda tarif edildiği gibi 3 ana grup ve daha sonra toplamda 7 grup olacak şekilde altgruplar oluşturularak sınıflandırılmıştır.

Piperine Sigma-Aldrich (Lot: MKBJ9209V) Hindistan, AF64A Sigma-Aldrich (Lot: 091M4609V) ABD, betaine Sigma-Aldrich (Lot: BCBH8777V) Almanya ve etil alkol Merck (İndeks No:603-002-00-5) Almanya'dan sağlanmıştır.

Grup 1 Kontrol grubu (n=6): Kontrol grubu ratlara herhangi bir işlem uygulanmamış olup normal günlük yaşamları korunmuştur.

Grup 2 Alkol Uygulaması (n=18):

Grup 3 AF64A Uygulaması (n=18):

Grup 2a Etanol Grubu (n=6): Solunum yoluyla her gün hayvan başına %96'lık 450 µl/ml (%47'lik etanol çözeltisi) etanol olacak şekilde karışım hazırlanıp 5 hafta süreyle hergün inhalasyon yoluyla verilmiştir.

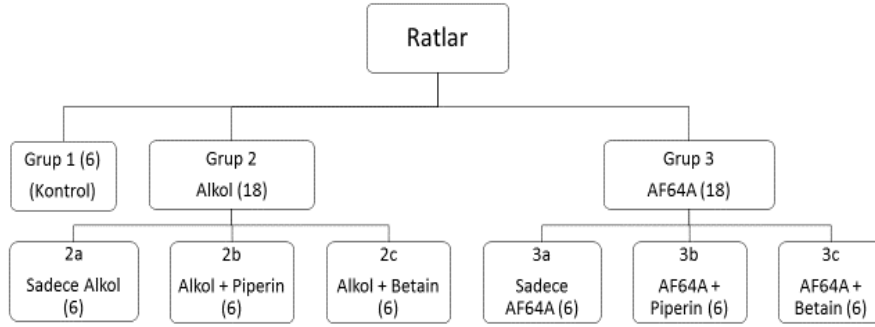
Grup 2b Tedavi Amaçlı Piperin Verilmesi (n=6): Hayvan başına 450 µl/ml %96'lık (%47'lik etanol çözeltisi) etanol verilmesine ek olarak ratlara hergün 12,5 mg/kg/gün tedavi amaçlı içme sularına katılan piperin 5 hafta süre ile hergün tedavi amaçlı verilmiştir.

Grup 2c Tedavi Amaçlı Betain Verilmesi (n=6): Hayvan başına her gün 450 µl/ml %96'lık (%47'lik etanol çözeltisi) etanol verilmesine ek olarak ratlara 12,5 mg/kg/gün 5 hafta süre ile tedavi amaçlı her gün içme sularına karıştırılan betain verilmiştir.

Grup 3a AF64A Grubu (n=6): AF64A uygulaması: 2 nmol/2µl/ gün (rat başına 1µmol/L'lik stok çözeltiden 2 µl) olarak 5 hafta süreli olarak her gün içme sularına verilmiştir.

Grup 3b Tedavi Amaçlı Piperin Verilmesi (n=6): Beş hafta süre ile 2 nmol/2µl/ gün (rat başına 1µmol/L'lik stok çözeltiden 2 µl) olarak AF64A'nın içme sularına uygulamasına ek olarak ratlara tedavi amaçlı piperine 10 mg/kg/gün 5 hafta süreli her gün içme sularına karıştırılarak verilmiştir.

Grup 3c Tedavi Amaçlı Betain Verilmesi (n=6): Beş hafta süre ile 2 nmol/2µl/ gün (rat başına 1µmol/L'lik stok çözeltiden 2 µl) olarak her gün içme sularına AF64A uygulamasına ek olarak ratlara tedavi amaçlı 12,5 mg/kg/gün 5 hafta her gün içme sularına betain karıştırılarak verilmiştir.



Şekil 2.1. Ratların gruplara göre sınıflandırılması

Tüm ratlara son uygulamadan 24 saat sonra Alfamin intraperitoneal (i.p) olarak uygulanmıştır. Operasyon öncesi ratlar yaklaşık 12 saat aç bırakılmışlardır. Batın açılıp heparinli enjektörle yaklaşık 5 ml kan intrakardiyak yöntemle alınarak heparinli tüplere konulduktan sonra ratlar dekapite edilmiştir.

2.2. Biyokimyasal Analizler

2.2.1. Örneklerin Hazırlanması

Heparinize kan 4 derecede 3000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Plazma kısmı başka bir tüpe alındı. Akyuvar tabakası aspire edildi. Daha sonra üç kez izotonik NaCl ile eritrositler yıkandı ve eritrosit paketi elde edildi. Elde edilen plazma örnekleri ve eritrosit paketleri çalışma gününe kadar -20 derece de saklanmıştır.

Plazma örneklerinden MDA seviyeleri çalışılmıştır. Eritrosit doku örneklerinden GSH seviyeleri çalışılmıştır. Eritrosit GSH sonuçları gram hemoglobin başına verilmiştir.

Kimyasalın Adı	Formülü	Miktarı	Birimi
Sodyum Bikarbonat	(NaHCO ₃)	1	g
Potasyum Ferrisiyanür	(K ₃ Fe(CN) ₆)	0,2	g
Potasyum Siyanür	(KCN)	0,05	g
Distile Su		1000	ml

Tablo 2.1. Drabkin reaktifinin bileşenleri

2.2.2. Karaciğer Doku Homojenatı Hazırlanması

Karaciğer doku örnekleri dokunun alınmasını müteakip doku örneklerinden 0,2 g tartılmış ve 0,1 M pH: 7,4 fosfat tamponundan 2 ml ilave edilerek Ultra Turrax (IKA Works, USA) marka homojenizatörle buz içerisinde 24,000 devir/dk da 1 dk homojenize edilmiştir. Homojenatlara daha sonra Dr Hielscher (Germany) marka sonikatörle 20,000 cycle/sec olacak şekilde 1 dk ultrasonikasyon gerçekleştirilmiştir. Ardından homojenatlar 10,000 g de 15 dk santrifüj edilerek supernatant ayrılmış ve çalışılincaya kadar -20 derecede saklanmıştır. Karaciğer doku örneklerinden GSH ve MDA seviyeleri çalışılmıştır. Sonuçlar gram protein başına olarak verilmiştir.

2. 2. 3. Doku Protein Ölçüm Yöntemi

Doku homojenatında Protein düzeyleri Brilliant Blue G boyası yöntemi ile Sigma marka ticari kitler kullanılarak (Saint Louis, Missouri, USA) prospektüste belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Sonuçlar µg/ml protein olarak verildi.

2.2.4. Eritrosit Hemoglobin Tayini:

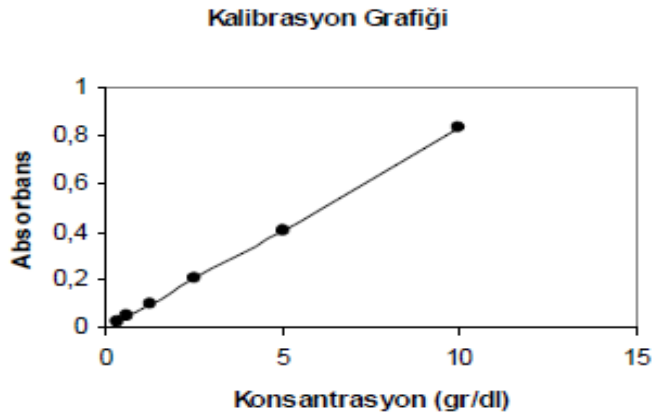
Drabkin çözeltilisinde (Tablo 2. 1.) bulunan ferrisiyanür Hb'deki +2 değerlikli demiri (ferro=Fe+2) +3 değerlikli demir (Ferrik=Fe+3)'e çevirerek methemoglobine

dönüştürmekte, sonra potasyum siyanür ile birleşerek stabil bir molekül olan siyanmethemoglobin meydana gelmektedir.

	<u>Kör</u>	<u>Numune</u>
Hemolizat	-	50 µl
Drabkin Çözeltisi	2,5 ml	2,5 ml

Tablo 2.2. Hemolizat hemoglobinin ölçümü

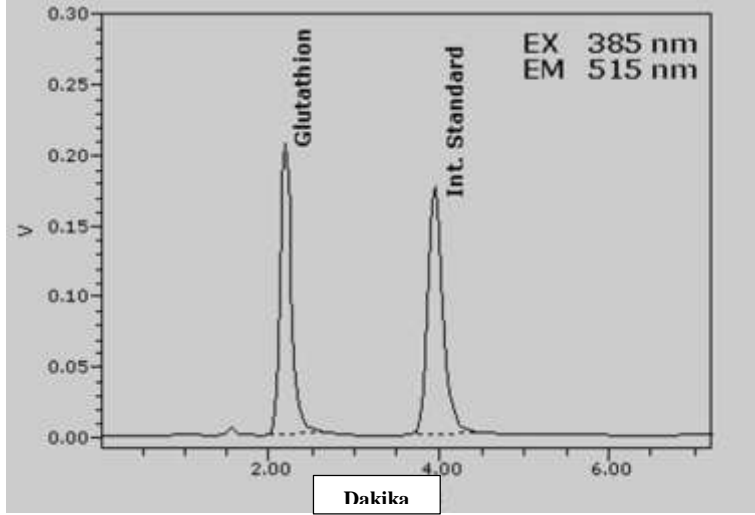
Tüpler altüst edildi ve daha sonra 10 dakika oda ısısında bekletildi. Numune köre karşı 546 nm’de okunur. Okunan absorbans kalibrasyon grafiğinden % Hb değeri olarak hesaplanmıştır.



Şekil 2.2. Drabkin hemoglobin kalibrasyon grafiği

2.2.5. Redükte Glutasyon (GSH) Ölçümü

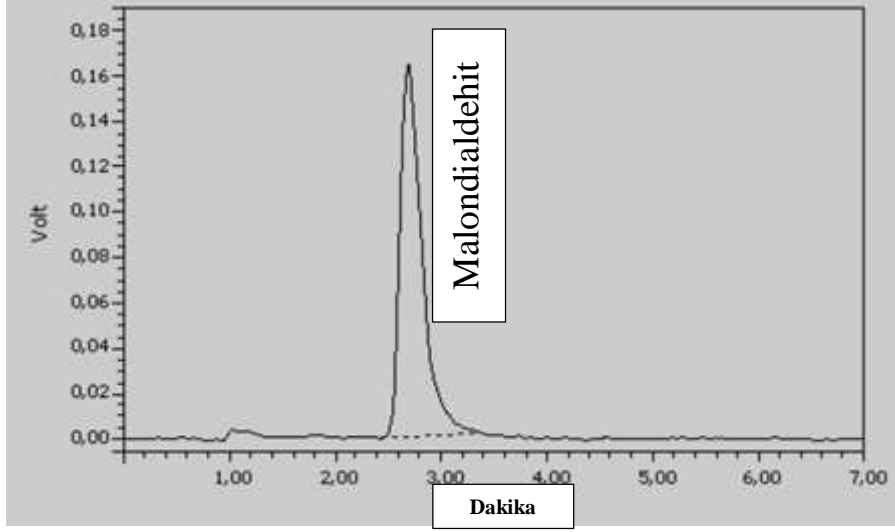
Redükte glutasyon (GSH) seviyeleri HPLC yöntemi ile Chromsystems Diagnostics (Munich/Germany)'den sağlanan kit HPLC floresan dedektör (Ex:385 Em:515 nm) ile belirlenmiş olup (Şekil 2.3.) sonuçlar $\mu\text{mol/L}$ olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 2.3. HPLC Redükte Glutasyon (GSH) kalibrasyon grafiği.

2.2.6. Malondialdehit (MDA) Ölçümü

Plazma ve karaciğer lipit peroksidasyon seviyeleri HPLC yöntemi ile Chromsystems Diagnostics (Munich/Germany)'den sağlanan kit HPLC floresan dedektör (Ex:515 Em:553 nm) ile belirlenmiş olup (Şekil 2.4.) sonuçlar $\mu\text{mol/L}$ olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 2.4. HPLC Malondialdehit (MDA) kalibrasyon grafiği.

2. 3. Patolojik İnceleme

Çıkarılan beyinler sağ ve sol hemisferler arasından longitudinal olarak kesilerek iki eşit parçaya bölünmüş, tüm sol beyin yarım küreleri tamponlu nötral % 15'lik formaldehit solüsyonunda 72 saat süreyle tespit edilmiştir. Dokular trimlenerek hipocampal bölgeleri doku takip kasetlerin aktarılmıştır. Dokular 8 saat süreyle akan suda yıkanmış ve genetik testlerin çalışılması için ayrılan diğer yarım küre parafine gömülerek saklanmıştır.

Doku takip cihazı ile (Leica TP 1020) dereceli alkol serilerinden ve ksilenden geçirilerek parafinde bloklanmış ve rotary mikrotomla (Leica RM 2155) 6-8 mikron kalınlığında kesitler alınarak Cresyl Violet ile boyanmıştır. Zeiss ICC 5 kamera, ZEN görüntüleme yazılımı ile ışık mikroskopunda (Zeiss Axiolab.A1) değerlendirilmiş ve gerekli görüldüğünde dijital kamera ile mikroskopik olarak görüntüler alınmıştır.

2.4. Genetik Analizler

2.4.1. Dokudan RNA İzolasyonu

Her gruptan parafine edilmiş beyin sol yarım küre örneklerinden RNA purification (Thermo scientific High Pure FFPE RNA Isolation Kit Roche Almanya) aracılığı ile elde edildi. Her bir rat beyin doku örneklerinin üzerine 400 µl lizis/binding buffer eklenerek vortekslendi. Daha sonra tüm karışım 8000 x g de 15 sn vortekslendi. 100 µL RNA Tissue Lysis Buffer, 16 µL %10'luk SDS, 40 µL proteinase K eklendi. 30 dak 85 derecede inkübasyon yapıldı. 80 µL proteinase K eklendi. 55 derecede 30 dak inkübasyon yapıldı. 325 µL RNA Binding Buffer ve 325 µL absolute ethanol eklendi. Örnekler filtreli tüplere alındı. 6,000 g de 30 saniye santrifüjden sonra yıkama solüsyonları ile sırası ile muamele edildi.

Ayrı 1,5 ml'lik eppendorf tüplere her örnek için 90 µl DNAaz inkübasyon buffer ve 10 µl DNaz eklenip karıştırıldı. Daha sonra her tüpe 100 µl dağıtıldı. Sonrasında 15 dk oda ısısında inkübe edildi. Her tüpe 500 µl wash buffer eklenerek 15 sn 8000 g de santrifüj edildi. Eppendorf ta pellet kalıcak şekilde döküldü. Her tüpe 200 µl wash buffer 2 eklenerek 2 dk 13000 g de santrifüj edildi. Sonrasında 50 µl elution buffer eklenerek 8000 g de 1 dk santrifüj edildi. Pellet de RNA elde edildi.

2.4.2. cDNA Sentezi

cDNA eldesi (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit) Almanya'dan sağlanan kit ile çalışılmıştır.

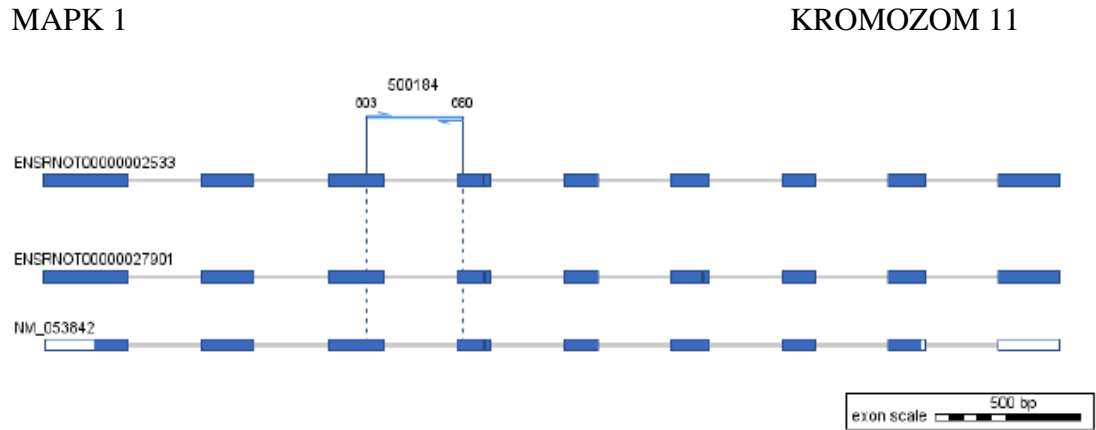
cDNA eldesi için ortalama 0,5-1 µg total RNA kullanıldı. 5 µl RNA eklendi. Primer 1 µl random primer + 1µl oligo primer = 2 µl PRİMER eklendi. Daha sonra 5,4 µl su eklendi. Toplam hacim 11,4 µ olarak elde edildi ve devamında 65 derece de 10 dk inkübe edildi. Daha sonra ikinci aşamaya geçildi. İkinci aşamada ise

Transcriptor High Fidelity Reverse Transkriptaz Buffer reaktifinden 4µl eklendi. Protector RNase inhibitörden 40 U/µl eklendi. Daha sonra deoksinükleotid 10 mM karışımından 5µl eklendi. Sonrasında 1 µl DTT eklendi. Transcriptor High Fidelity Reverse Transkriptaz Buffer reaktifinden 1,1 µl eklendi. Toplam hacim olarak 8,6 µl elde edildi. Sonuç hacim olarak 20 µl cDNA elde edildi.

2.4.3. Primer Tasarımı

ACTB (R. NORVEGICUS) geninin analizinde Roche marka 05532957001 Katolog numaralı ve Assay ID: 500153 olan primerler kullanılmıştır.

Rattus norvegicus mitogen activated protein kinase 1 (Mapk1), mRNA

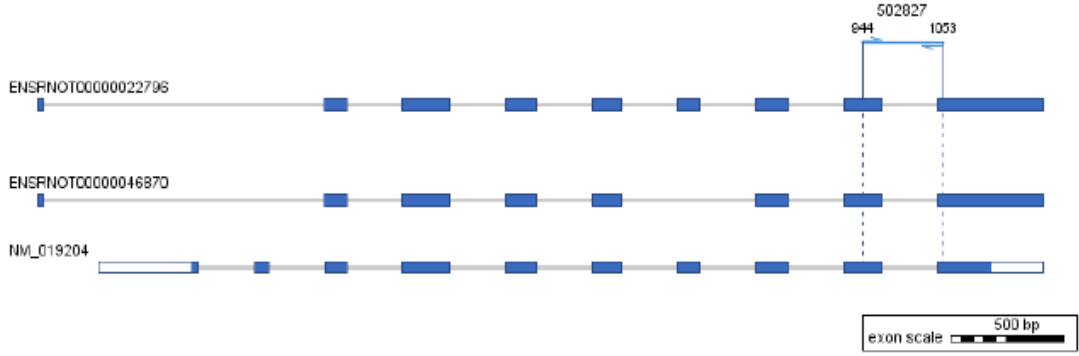


MAPK1 (R. NORVEGICUS) geninin analizinde Roche marka 05532957001 Katolog numaralı ve Assay ID: 500184 olan primerler kullanılmıştır.

Rattus norvegicus BACE, mRNA

BACE

KROMOZOM 8



BACE1 (R. NORVEGICUS) geninin analizinde Roche marka 05532957001 Katolog numaralı ve Assay ID: 502827 olan primerler kullanılmıştır.

2.4.4. β -sekretaz (BACE) mRNA Seviyelerinin Belirlenmesi

BACE mRNA seviyeleri için parafine gömülmüş beyin doku örnekleri kullanılmıştır.

- 1) cDNA'lar $\frac{1}{2}$ oranında olacak şekilde sulandırıldı. Sulandırılmış olan örneklere 5 μ l dH₂O eklendi.
- 2) 1 tanesine Beta Aktin referans gen probu olmak üzere sırayla x, y, z, target gen problemlerini içeren toplamda 40 adet ependorf hazırlandı.
- 3) Aşağıda belirtilen miktarlar, 40 (120 reaksiyon) numune olmak üzere hesaplandı.
- 4) Beta aktin referans ismi verilen ilk ependorfa sırasıyla;
 - a) 400 μ l Probe Master,
 - b) 160 μ l dH₂O
 - c) 40 μ Beta aktin referans gen probu konuldu.
- 5) BACE Target gen isimli 2. Ependorfa sırasıyla;
 - a) 400 μ l Probe Master,

- b)** 160 µl dH₂O
c) 40 µ IL1A Target gen probu konuldu.
- 6)** BACE Target gen isimli 3. Ependorfa sırasıyla;
a) 400 µl Probe Master,
b) 160 µl dH₂O
c) 40 µ IL1A Target gen probu konuldu.
- 7)** Sırasıyla diğ er Target gen proble ri için de aynı miktarlarda karışım lar hazırlandı.
- 8)** Hazırlana karışım lara dikkatlice pipetleme yapıldı.
- 9)** Hazırlanan karışım lardan 15 µ alınıp aşı ğıda belirtilen şekilde Light Cycl er 480 Multiwell Plate'e da ğıtıldı.
- 10)** Platedeki 1 numaralı kısma 5'er µl cDNA örnekle ri da ğıtıldı.
- 11)** Platedeki 12 numaralı kısma 5'er µl negatif kontrol olmak üzere su konuldu.
- 12)** Plate üzeri sealing Foil ile hava kabarcığı olmayacak şekilde dikkatlice kapatıldı.
- 13)** Plate 1500 x g de 3 dk santrifü j edildi.
- 14)** Plate, Light Cycl er 480 cihazına yerleştirildi.
- 15)** Cihaz programı PCR protokolüne göre hazırlandı.
- 16)** Ardından yaklaşık 1:20 dk süren okuma başlatıldı.

2.4.5. Mitojen-Aktiviteli Protein Kinaz (MAPK) mRNA Seviyelerinin Belirlenmesi

Mitojen-aktiviteli protein kinaz mRNA seviyeleri için parafine gömülmüş beyin doku örnekleri kullanılmıştır.

- 1) cDNA'lar ½ oranında olacak şekilde sulandırıldı. Sulandırılmış olan örneklere 5µl dH₂O eklendi.
- 2) 1 tanesine Beta Aktin referans gen probu olmak üzere sırayla x, y, z, target gen problemlerini içeren toplamda 40 adet ependorf hazırlandı.
- 3) Aşağıda belirtilen miktarlar, 40 (120 reaksiyon) numune olmak üzere hesaplandı.
- 4) Beta aktin referans ismi verilen ilk ependorfa sırasıyla;
 - a) 400 µl Probe Master,
 - b) 160 µl dH₂O.
 - c) 40 µ IL1A Target gen probu konuldu.
- 5) MAPK Target gen isimli 2. Ependorfa sırasıyla;
 - a) 400 µl Probe Master,
 - b) 160 µl dH₂O.
 - c) 40 µ IL1A Target gen probu konuldu.
- 6) MAPK Target gen isimli 3. Ependorfa sırasıyla;
 - a) 400 µl Probe Master,
 - b) 160 µl dH₂O
 - c) 40 µ IL1A Target gen probu konuldu.
- 7) Sırasıyla diğer Target gen problemleri için de aynı miktarlarda karışımlar hazırlandı.

- 8) Hazırlana karışımlara dikkatlice pipetleme yapıldı.
- 9) Hazırlanan karışımlardan 15 μ alınıp aşağıda belirtilen şekilde Light Cyler 480 Multiwell Plate'e dağıtıldı.
- 10) Platedeki 1 numaralı kısma 5'er μ l cDNA örnekleri dağıtıldı.
- 11) Platedeki 12 numaralı kısma 5'er μ l negatif kontrol olmak üzere su konuldu.
- 12) Plate üzeri sealing Foil ile hava kabarcığı olmayacak şekilde dikkatlice kapatıldı.
- 13) Plate 1500xg de 3 dk santrifüj edildi.
- 14) Plate, Light Cyler 480 cihazına yerleştirildi.
- 15) Cihaz programı aşağıdaki tabloda yer alan PCR protokolüne göre hazırlandı.
- 16) Ardından yaklaşık 1:20 dk süren okuma başlatıldı.

2.5. Morris Su Labirenti (Öğrenme Testi)

Öğrenmeyi test etmek amacıyla önceden hazırlatılan Richard Morris (Gallagher ve ark 1993) tarafından geliştirilen Morris su labirenti kullanıldı. Richard Morris tarafından geliştirilen Morris su labirenti uzamsal hafızayı test etmek için tasarlanmış bir davranış deneyidir. Morris su labirenti, içerisinde gizli bir platformu bulunduran, içi su dolu, geniş, sirküler bir tanktır. Tankın çapı 120 cm, yüksekliği 60 cm, su yüksekliği 40 cm. dir. Morris su tankı 24-26 derece su ile dolduruldu. Platform su yüzeyinden 5 cm derine yerleştirilmiş olup, çapı 10 cm, havuz kenarından uzaklığı ise 17 cm.dir. Platformun üstü ise ratların tutunmasını sağlayacak ve kendisini güvende hissedeceği şekilde lifli bir kumaşla kaplanmıştır (Arslan ve ark 2013).



Resim 2.1. Morris su testi görünümü

2.6. İstatistiksel Analiz

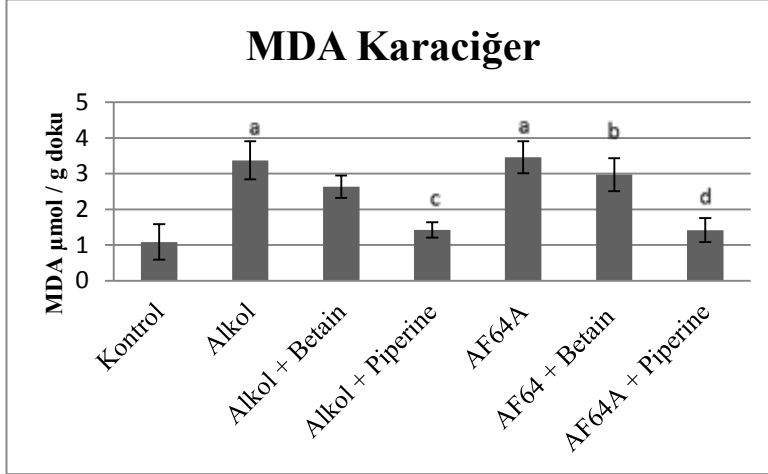
İstatistiksel analizler için Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 17.0 kullanılmıştır. Sonuçlar ortalama± standart sapma olarak ifade edilmiştir. Gruplar arası fark karşılaştırılmasında ANOVA analizi uygulanmıştır. Sürekli değişkenlerin normal dağılıp dağılmadığını test etmek için Kolmogorov Smirnov testi uygulanmış ve $p<0,05$ değeri anlamlılık düzeyi olarak belirlenmiştir.

Patolojik incelemede gruplar arası sürekli ve çok değişkenli karşılaştırmalar dağılımlara göre Kruskal-Wallis test kullanılarak yapılmıştır. Kruskal-Wallis teste göre istatistiksel fark gözlenen gruplar arası farklılığı göstermek için Mann-Whitney U-testi kullanılmış ve $p<0,05$ 'den küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Data analiz Light Cyclor 480 cihazının 465-510 kanalı kullanılarak yapılır. Rölafif kantitasyon analizi ile elde edilen değerler (Target gene / referans gen) kullanılarak, hedef genlerin mRNA ex presyon düzeylerinin değişim oranları $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile hesaplanarak grafik oluşturulmuştur (Pfaffl, 2001). Hesaplamada $\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ hedef gen} - Ct \text{ actb}) \text{ denek grubu} - (Ct \text{ hedef gen} - Ct \text{ actb}) \text{ kontrol grubu}$ formülünden yararlanılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Karaciğer ve Plazma MDA Seviyeleri

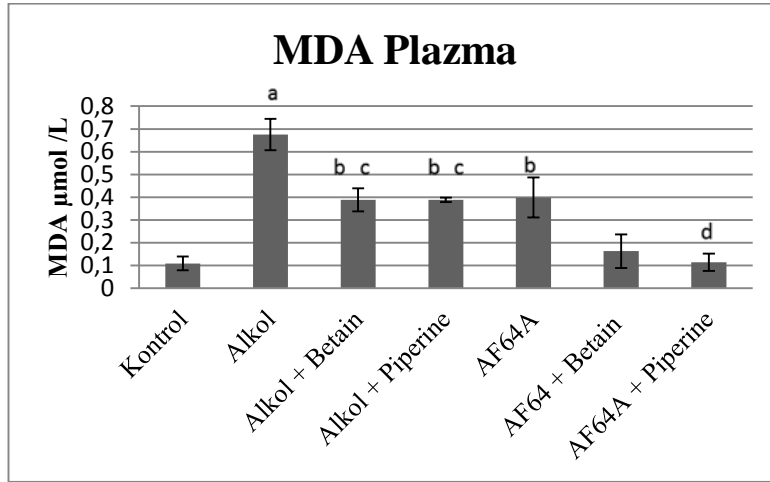


Şekil 3.1. Karaciğer MDA seviyeleri (a: $p < 0,01$ ve b: $p < 0,05$ kontrol grubu ile kıyaslandığında, c: $p < 0,05$ Alkol grubu ile kıyaslandığında ve d: $p < 0,05$ AF64A grubu ile kıyaslandığında. Diğer gruplarda herhangi bir istatistiksel anlamlılık gözlenmemiştir.).

Gruplar	Kontrol	Alkol	Alkol + Betain	Alkol + Piperine	AF64A	AF64A + Betain	AF64A + Piperine
Ortalama ± SD µmol/g doku	1,0837 ± 0,49816	3,3702 ± 0,53388	2,633 ± 0,31616	1,4205 ± 0,21446	3,4603 ± 0,45242	2,9722 ± 0,46466	1,4168 ± 0,33612

Tablo 3.1. Grupların karaciğer MDA ortalamaları.

3.2. Plazma MDA Seviyeleri



Şekil 3.2. Plazma MDA seviyeleri (a: $p < 0,001$ ve b: $p < 0,05$ kontrol grubu ile kıyaslandığında, c: $p < 0,05$ Alkol grubu ile kıyaslandığında ve d: $p < 0,05$ AF64A grubu ile kıyaslandığında. Diğer gruplarda herhangi bir istatistiksel anlamlılık gözlenmemiştir).

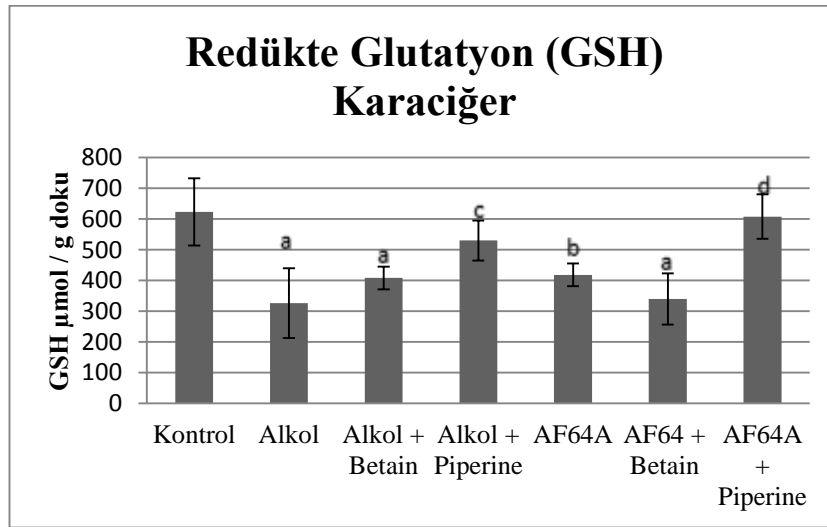
Gruplar	Kontrol	Alkol	Alkol + Betain	Alkol + Piperine	AF64A	AF64A + Betain	AF64A + Piperine
Ortalama ±	0,109 ±	0,6753 ±	0,388 ±	0,3883 ±	0,3985 ±	0,1627 ±	0,1137 ±
SD µmol/L	0,03032	0,06897	0,05097	0,00954	0,08781	0,07418	0,03805

Tablo 3.2. Grupların plazma MDA ortalamaları.

Çalışmamızdaki karaciğer doku MDA sonuçlarında kontrol grubu ile kıyaslandığında alkol, AF64A ve AF64A+betain gruplarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Şekil 3.1. a: $p < 0,01$, b: $p < 0,05$). Sonuçlar alkol, AF64A ve AF64A+betain gruplarının kontrol grubuna göre yüksek oksidan hasara maruz kalması sonucu ortaya çıktığı söylenebilir. Alkol grubu ile alkol+piperine grubu kıyaslandığında alkol+piperine grubu MDA seviyeleri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Şekil 3.1.). Bu bulgular ile MDA seviyelerinin piperine'nin oksidan harabiyeti azaltıcı yönde etki gösterdiği ile açıklanabilir. AF64A grubu ile AF64A + piperine grubu kıyaslandığında AF64A+ piperine grubundaki sonuçlar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Şekil 3.1. d $p < 0,05$). Bu sonuçlar piperine AF64A kaynaklı oksidan hasarı azaltıcı etkisinin olduğu şeklinde açıklama yapılabilir.

Plazma MDA seviyelerinde kontrol ile kıyaslandığında alkol ve AF64A gruplarında istatistiksel anlamlı yüksek sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 3.2.). Bu istatistiksel farklılığın nedeni alkol ve AF64A'nın oksidan hasara yol açtığını gösterir. Yine kontrol grubu ile kıyaslandığında alkol+betain, alkol+piperine ve AF64A seviyeleri anlamlı yüksek gözlenmiştir (Şekil 3.2. b $p < 0,05$). Alkol grubu ile kıyaslandığında alkol+betain ve alkol+piperine gruplarında MDA seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı düşük olduğu kaydedilmiştir (Şekil 3.2. c $p < 0,05$). Bu sonuçlar bize Alkolün oksidan etkisinin diğer iki gruba göre daha yüksek olduğu şeklinde bir fikir vermektedir. AF64A ile AF64A+piperine grubunda oluşturduğu oksidan hasarı betain ve piperinenin azalttığı gözlenmiştir (Şekil 3.2.). Bu sonuç ise AF64A'nın oksidan etkisinin olduğu ve piperinenin bu etkiyi azalttığı şeklinde netice çıkarmaktadır.

3.3. Karaciğer Redükte Glutasyon (GSH) Seviyeleri

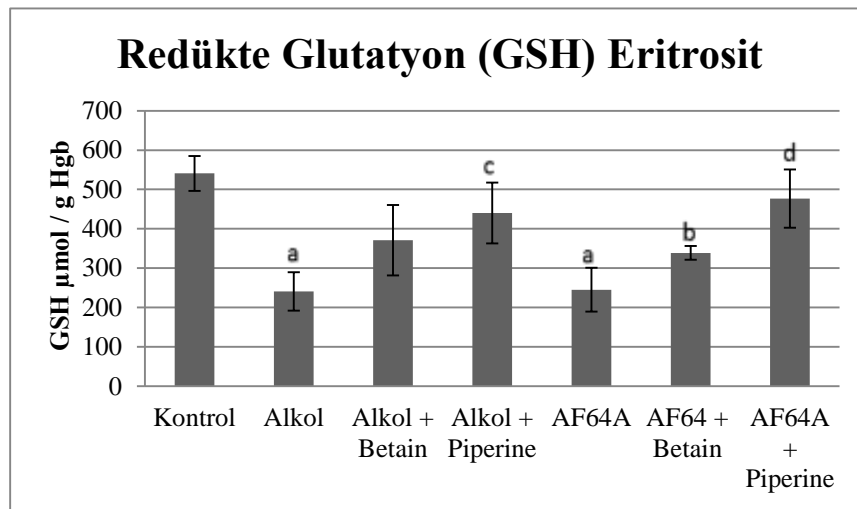


Şekil 3.3. Karaciğer redükte glutasyon (GSH) seviyeleri (a: $p < 0,001$, b: $p < 0,01$ Kontrol grubu ile kıyaslandığında, c: $p < 0,01$ Alkol grubu ile kıyaslandığında ve d: $p < 0,01$ AF64A grubu ile kıyaslandığında. Diğer gruplarda herhangi bir istatistiksel anlamlılık gözlenmemiştir).

Gruplar	Kontrol	Alkol	Alkol + Betain	Alkol + Piperine	AF64A	AF64A + Betain	AF64A + Piperine
Ortalama \pm SD $\mu\text{mol/g}$ doku	623,118 \pm 109,47441	326,2067 \pm 113,60553	408,428 \pm 37,17678	530,1053 \pm 65,4182	418,3442 \pm 36,80401	340,3857 \pm 83,28375	607,9727 \pm 72,08297

Tablo 3.3. Grupların karaciğer ortalama GSH değerleri.

3.4. Eritrosit Redükte Glutasyon (GSH) Seviyeleri



Şekil 3.4. Eritrosit redükte glutasyon (GSH) seviyeleri (a: $p < 0,001$, b: $p < 0,05$ Kontrol grubu ile kıyaslandığında, c: $p < 0,05$ Alkol grubu ile kıyaslandığında ve d: $p < 0,01$ AF64A ile kıyaslandığında. Diğer gruplarda herhangi bir istatistiksel anlamlılık gözlenmemiştir).

Gruplar	Kontrol	Alkol	Alkol + Betain	Alkol + Piperine	AF64A	AF64A + Betain	AF64A + Piperine
Ortalama \pm SD $\mu\text{mol/g}$ Hgb	540,6707 \pm 44,4729	240,7302 \pm 48,60654	371,0978 \pm 89,51097	440,138 \pm 76,9391	245,1283 \pm 55,97376	338,5875 \pm 17,5867	476,6237 \pm 73,87365

Tablo 3.4. Grupların ortalama eritrosit GSH değerleri.

Karaciğer redükte glutasyon (GSH) seviyelerinde kontrol grubu ile kıyaslandığında alkol, alkol+betain ve AF64A+betain grupları arasında istatistiksel anlamlı düşük sonuçlar gözlenmiştir (Şekil 3.3. a $p < 0,001$). Antioksidan özellikli GSH'daki bu anlamlı düzeydeki düşmelerin, söz konusu grupların oksidan strese

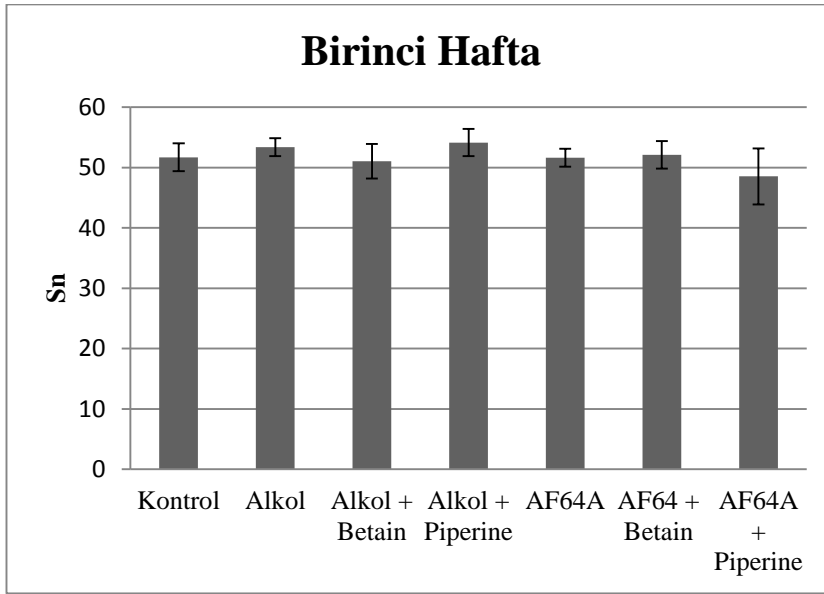
maruz kalmış olması ile açıklanabilir. Kontrol grubu ile AF64A grubu kıyaslandığında istatistiksel anlamlı düşük sonuç kaydedilmiştir (Şekil 3.3. b $p < 0,01$). AF64A'nın oksidan strese neden olması şeklinde açıklanabilir. Alkol grubu ile kıyaslandığında alkol+piperine grubunda istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,01$). Bu sonuçlar piperinenin alkolün oluşturduğu oksidan hasarı azaltmış olabileceği yönünde değerlendirilmiştir. AF64A grubu ile AF64A+piperine grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli bulunması ($p < 0,01$) piperine'nin AF64A'nın oksidan etkisini azaltıcı yönde etki ettiği yönde açıklanabilir.

Eritrosit redükte glutasyon seviyelerinde (GSH) kontrol grubu ile kıyaslandığında alkol ve AF64A gruplarında istatistiksel anlamlı düşük sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 3. 4. a $p < 0,001$). GSH'nin düşük olması, oksidan etkinin alkol ve AF64A gruplarında daha yüksek gözleendiği şeklinde açıklanabilir. Yine kontrol grubuna göre AF64A+betain grubunda anlamlı düşük sonuç gözlenmiştir (Şekil 3. 4. b $p < 0,05$). Alkol grubu ile kıyaslandığında alkol+piperine grubunda anlamlı yüksek sonuç kaydedilmiştir (Şekil 3.4. c $p < 0,05$). Bu sonuç piperinin antioksidan özelliğini ortaya koymuş olabileceği şeklinde yorumlanabilir. AF64A grubu ile kıyaslandığında AF64A+piperine grubunda anlamlı yüksek sonuç kaydedilmiştir (Şekil 3.4. d $p < 0,01$). Piperinenin burada da antioksidan özelliğini ortaya koyduğu anlaşılmaktadır.

3.5. Moris Water Maze Test

Ratlar deneysel model oluşturulmadan 1 hafta öncesinden itibaren Moris Water Maze havuzuna alıştırmaya süreci geçirmiştir. Ratların ilk günlerde çıkış platformunu kendiliğinden bulmaları beklenmiştir. Bir dakika sonunda çıkış platformunu bulamayan ratlara yardım edilerek platformu bulmaları sağlanmıştır. Platformu bulmalarını müteakip ratlar kurulanıp önce geçiş kafesine alınmış daha sonrada kendi kafeslerine geri koyulmuştur. Ratların moris su tankındaki alıştırmaya denemelerinin hergün aynı saatte ve aynı sırayla yapılmasına özen gösterilmiştir. Morris su tankı alıştırmaya denemelerinin 3. ve 4. günlerinde platformu kendilerinin kolaylıkla bulabildikleri izlenmiştir. Deneme haftasının sonlarında ise ratların çok daha kolay

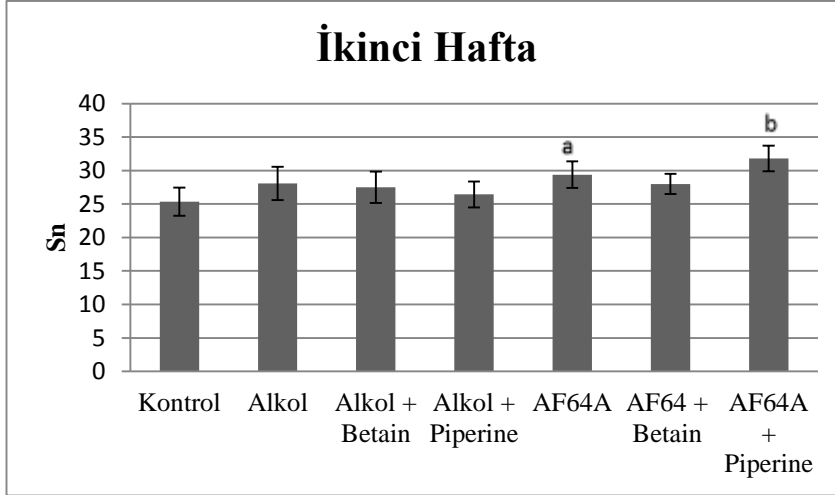
ve hızlı şekilde (yaklaşık 1 dk) çıkış platformunu bulabildikleri izlendi. Alıştırma haftasına ratların alınmasının sebebi, ratların havuzu öğrenmeleri, hepsinin aynı şartlarda aynı öğrenme derecesine sahip olarak deneye başlamasını sağlamaktır. Ayrıca sağlık yönünden, davranışsal açıdan ve beslenmeleri titizlikle izlenmiş, alışma süreci sonunda her kafeste bulunan ratlar tartılmış ve kaydedilmiştir. Süre sonrasında tüm kafeslerdeki ratların yaşamsal ve davranışsal özellikleri birbiriyle aynı olduğu görüldükten sonra sağlıklı olanlar deneye dahil edilmiştir.



Şekil 3.5. Moris water maze testi birinci hafta sonuçları.

Gruplar	Kontrol	Alkol	Alkol + Betain	Alkol + Piperine	AF64A	AF64A + Betain	AF64A + Piperine
Ortalama± SD sn	51,6905± 2,30955	53,381± 1,48645	51,0238 ±2,87625	54,119 ± 2,25772	51,619 ± 1,49739	52,0952 ± 2,27258	48,5238 ± 4,64395

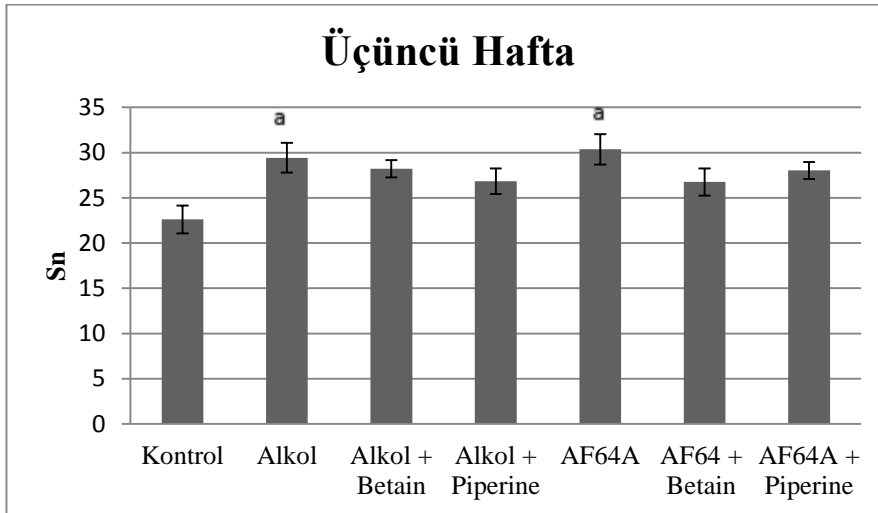
Tablo 3.5. Grupların birinci hafta ortalama süreleri.



Şekil 3.6. Morris water maze testi ikinci hafta sonuçları (a: $p < 0,05$, b: $p < 0,001$ Kontrol grubuyla kıyaslandığında. Diğer gruplarda herhangi bir istatistiksel anlamlılık gözlenmemiştir.)

Gruplar	Kontrol	Alkol	Alkol + Betain	Alkol + Piperine	AF64A	AF64A + Betain	AF64A + Piperine
Ortalama±	25,3571±	28,0714±	27,5±	26,4286±	29,381±	28±	31,8095±
SD sn	2,11843	2,48547	2,35736	1,92088	1,99523	1,4901	1,89665

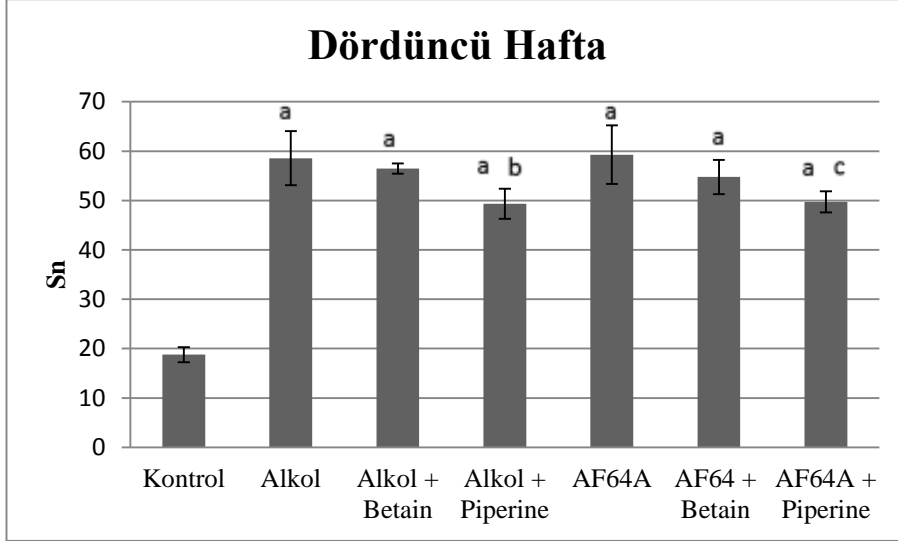
Tablo 3.6. Grupların ikinci hafta ortalama süreleri.



Şekil 3.7. Morris water maze testi üçüncü hafta sonuçları (a: $p < 0,01$ Kontrol grubu ile kıyaslandığında. Diğer gruplarda herhangi bir istatistiksel anlamlılık gözlenmemiştir).

Gruplar	Kontrol	Alkol	Alkol + Betain	Alkol + Piperine	AF64A	AF64A + Betain	AF64A + Piperine
Ortalama± SD sn	22,619± 1,53773	29,4286± 1,63881	28,2143± 0,95938	26,8333± 1,40674	30,3571± 1,6897	26,7619± 1,50238	28,0238± 0,92766

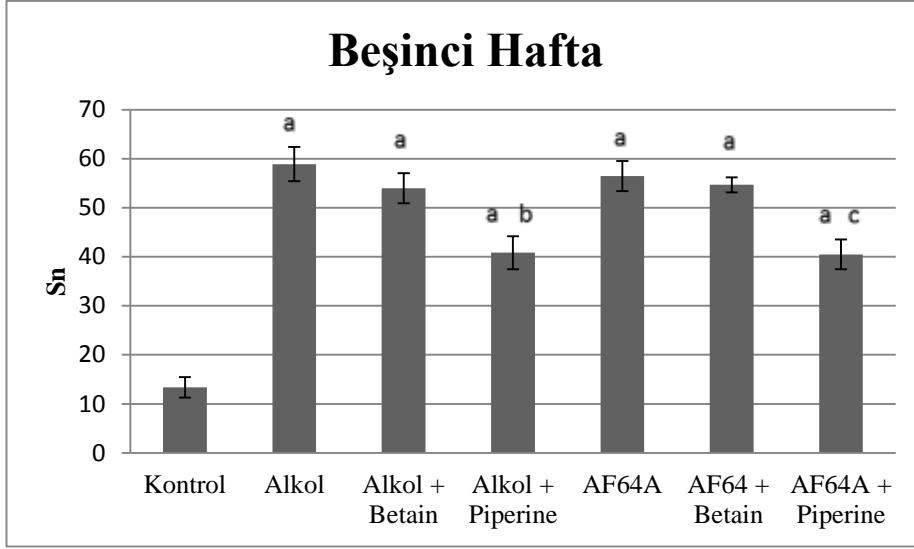
Tablo 3.7. Grupların üçüncü hafta ortalama süreleri.



Şekil 3.8. Morris water maze testi dördüncü hafta sonuçları (a: $p < 0,001$ Kontrol grubu ile kıyaslandığında, b: $p < 0,05$ Alkol grubu ile kıyaslandığında ve c: $p < 0,05$ AF64A grubu ile kıyaslandığında. Diğer gruplarda herhangi bir istatistiksel anlamlılık gözlenmemiştir.).

Gruplar	Kontrol	Alkol	Alkol + Betain	Alkol + Piperine	AF64A	AF64A + Betain	AF64A + Piperine
Ortalama± SD sn	18,7857± 1,51926	58,5714± 5,45931	56,4762± 1,02087	49,3333± 3,06883	59,2857± 5,94876	54,7619± 3,48251	49,7143 ± 2,14571

Tablo 3.8. Grupların dördüncü hafta ortalama süreleri.



Şekil 3.9. Morris water maze testi beşinci hafta sonuçları (a: $p < 0,001$ Kontrol grubu ile kıyaslandığında, b: $p < 0,01$ Alkol grubu ile kıyaslandığında ve c: $p < 0,05$ AF64A grubu ile kıyaslandığında. Diğer gruplarda herhangi bir istatistiksel anlamlılık gözlenmemiştir).

Gruplar	Kontrol	Alkol	Alkol + Betain	Alkol + Piperine	AF64A	AF64A + Betain	AF64A + Piperine
Ortalama± SD sn	13,3571± 2,0697	58,9048± 3,50474	53,9762± 3,0565	40,8333± 3,34227	56,4762± 3,04881	54,6905± 1,54237	40,5± 3,03012

Tablo 3.9. Grupların beşinci hafta ortalama süreleri.

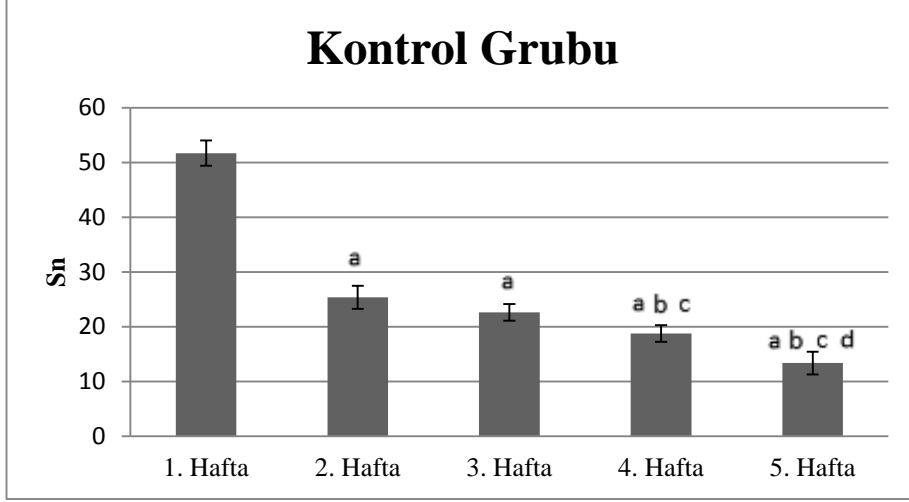
Tüm moris water davranış testi sonuçlarına göre; birinci hafta sonunda ratların çıkış platformunu bulma sürelerinde gruplar kıyaslandığında herhangi bir istatistiksel fark izlenmemiştir (Şekil 3.5.). Bu sonuç bize ilk hafta sonunda AF64A ve alkolün henüz oksidan özelliklerini davranışsal olarak ortaya koyamadığını göstermektedir.

İkinci hafta sonunda gruplar arasında ilk farklılıklar izlenmeye başlamıştır (Şekil 3.6.). Birinci hafta ile ikinci hafta arasında ratlarda genel olarak çıkış platformunu bulma süreleri uzamış ve ikinci hafta gruplar arasında farklılık dikkat çekmektedir. İkinci hafta morris su tankı testinin kontrol grubu ile kıyaslanmasında, AF64A ve AF64A + piperine gruplarında istatistiksel anlamlılık (Şekil 3.6.) gözlenmiştir.

Üçüncü hafta sonunda morris su tankı testinde kaydedilen gruplar arası istatistiksel farklılıklar ise şöyle bulunmuştur; Kontrol grubu ile Alkol grubu ve AF64A grupları kıyaslandığında anlamlı fark izlenmiştir (Şekil 3.7. a: $p < 0,01$). Alkolün ve AF64A'nın rat davranışları üzerindeki etkisinin çıkış platformunu bulma süreleri kıyaslandığında anlamlı olarak yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçların, Alkolün ve AF64A'nın hippocampus üzerindeki negatif, harabiyet edici etkileri sebebiyle ortaya çıktığı söylenebilir.

Dördüncü hafta sonunda morris su tankı testinde kaydedilen gruplar arası istatistiksel farklılıklar ise şöyle sıralanmaktadır; Kontrol grubu ile diğer tüm gruplar kıyaslandığında kontrol grubu ratlarda istatistiksel olarak anlamlı düşük sonuçlar kaydedilmiştir (Şekil 3.8. a: $p < 0,001$). Alkol grubu ile Alkol+Piperine grubu kıyaslamasında alkol+piperine grubu istatistiksel olarak anlamlı düşük sonuçlar vermiştir (Şekil 3.8. b: $p < 0,05$). Bu fark piperine'nin alkolün oluşturduğu oksidan hasarı önlemede ve/veya geriletmede başarılı olduğu sonucunu ortaya koymaktadır. Piperine'in diğer pozitif etkisi de AF64A ile AF64A+ piperine grupları arasındaki farka yansiyarak istatistiksel olarak anlamlı çıkmasıdır (Şekil 3.8. c: $p < 0,05$). Piperine'in AF64A'nın yaptığı harabiyeti de geriletmediği veya azalttığı söylenebilir.

Beşinci hafta sonunda morris su tankı testinde kaydedilen gruplar arası istatistiksel farklılıklar ise şöyledir; Kontrol grubu ile diğer tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık elde edilmiştir (Şekil 3.9. a: $p < 0,001$). Alkol grubu ile Alkol+Piperine grubu arasında ise istatistiksel olarak anlamlılık gözlenmiştir (Şekil 3.9. b: $p < 0,01$). Bu fark piperine'nin alkolün oluşturduğu oksidan hasarı ortadan kaldırmada ve/veya azalttığı sonucunu ortaya koymaktadır. Piperine'in diğer pozitif etkisi de AF64A ile AF64A+piperine grupları arasındaki farkı istatistiksel olarak anlamlı yaratmasıyla gözlenmiştir (Şekil 3.9. c: $p < 0,05$). Bu sonuçlar, piperinenin AF64A'nın yaptığı harabiyeti de geriletmediği, azalttığı ya da tedavi ettiği şeklinde yorumlanabilir.

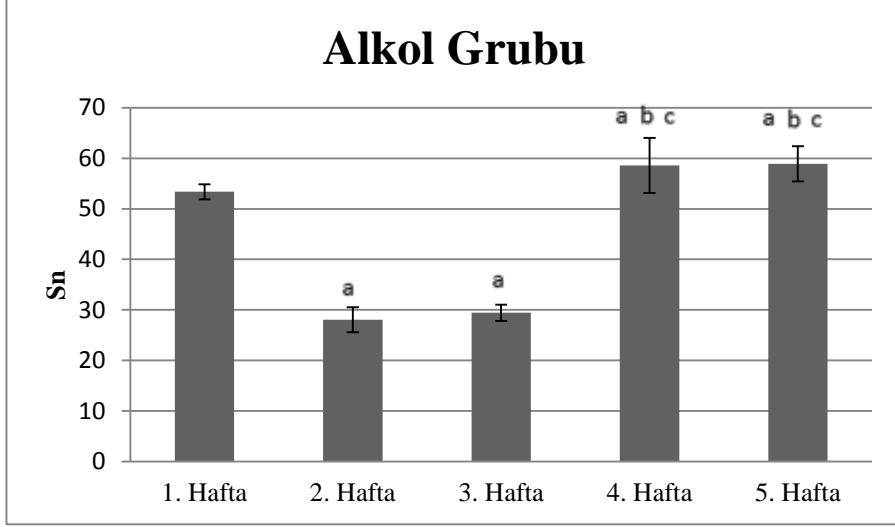


Şekil 3.10. Moris water maze testi kontrol grubu haftalar arası kıyaslaması (a: $p < 0,05$ 1. hafta ile kıyaslandığında, b: $p < 0,05$ 2. hafta ile kıyaslandığında, c: $p < 0,05$ 3. hafta ile kıyaslandığında ve d: $p < 0,05$ 4. hafta ile kıyaslandığında. Diğer gruplarda herhangi bir istatistiksel anlamlılık gözlenmemiştir).

Kontrol Grubu	1. Hafta	2. Hafta	3. Hafta	4. Hafta	5. Hafta
Ortalama	51,6905	25,3571	22,619	18,7857	13,3571
SD sn	± 2,30955	± 2,11843	± 1,53773	± 1,51926	± 2,0697

Tablo 3.10. Kontrol grubu haftalar arası ortalama.

Morris su tankı testi kontrol grubu haftalar arasında kıyaslandığında; birinci hafta, diğer tüm haftalarla kıyaslandığında istatistik olarak anlamlı yüksek sonuçlar gözlenmiştir (Şekil 3.10. a: $p < 0,05$). İkinci hafta ve Üçüncü hafta ile ayrı ayrı kıyaslandığında dördüncü ve beşinci haftalarda istatistiksel anlamlı düşük sonuçlar gözlenmiştir (Şekil 3.10. b: $p < 0,05$) ve (Şekil 3.10. c: $p < 0,05$). Son olarak, dördüncü hafta ile beşinci hafta kıyaslandığında ise yine istatistiksel anlamlı düşük sonuçlar gözlenmiştir (Şekil 3.10. d: $p < 0,05$). Kontrol grubu ratlarda her hafta öğrenmenin iyice pekiştiği ve çıkış platformunu bulmaları açısından, çıkış sürelerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde kısaldığı belirlenmiştir.

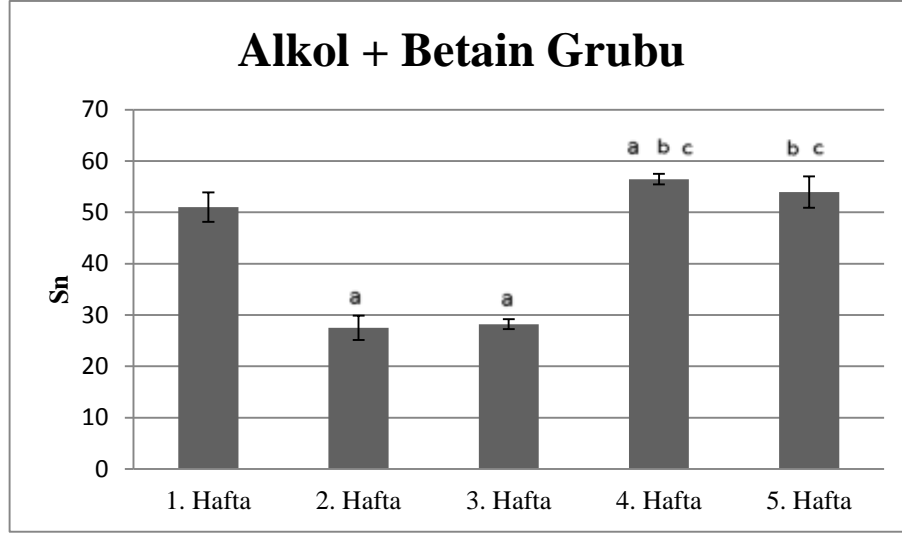


Şekil 3.11. Moris water maze testi Alkol grubu haftalar arası kıyaslaması (a: $p < 0,05$ 1. hafta ile kıyaslandığında, b: $p < 0,05$ 2. hafta ile kıyaslandığında ve c: $p < 0,05$ 3. hafta ile kıyaslandığında. Diğer gruplarda herhangi bir istatistiksel anlamlılık gözlenmemiştir).

Alkol Grubu	1. Hafta	2. Hafta	3. Hafta	4. Hafta	5. Hafta
Ortalama \pm	53,381 \pm	28,0714 \pm	29,4286 \pm	58,5716 \pm	58,9048 \pm
SD sn	1,48645	2,48547	1,63881	5,45931	3,50474

Tablo 3.11. Alkol grubu haftalar arası ortalaması.

Alkol grubu haftalar arası gözlenen kıyaslama sonuçları şöyle sıralanabilir; birinci hafta diğer tüm haftalarla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı farklar izlenmiştir (Şekil 3.11. a). İkinci ve üçüncü hafta birinci haftaya göre istatistiksel olarak düşük sonuçlar gözlenirken, dördüncü ve beşinci haftalarda istatistiksel anlamlı yüksek sonuçlar gözlenmiştir (Şekil 3.11. a: $p < 0,05$). İkinci hafta ile kıyaslandığında üçüncü haftada fark gözlenmezken, dördüncü ve beşinci haftada istatistiksel anlamlı yüksek sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 3.11. b: $p < 0,05$). Üçüncü hafta ile kıyaslandığında, dördüncü hafta ile beşinci haftalarda istatistiksel anlamlı yüksek sonuçlar kaydedilmiştir (Şekil 3.11. c: $p < 0,05$). Alkol grubu ratlarda ikinci ve üçüncü haftalarda öğrenmenin etkisi gözlenirken; dördüncü ve beşinci haftalarda ise alkolün hipokampus üzerindeki oksidan etkisi sebebiyle belleğin zayıfladığı ve bunun davranışlara yansıdığı anlaşılmıştır.



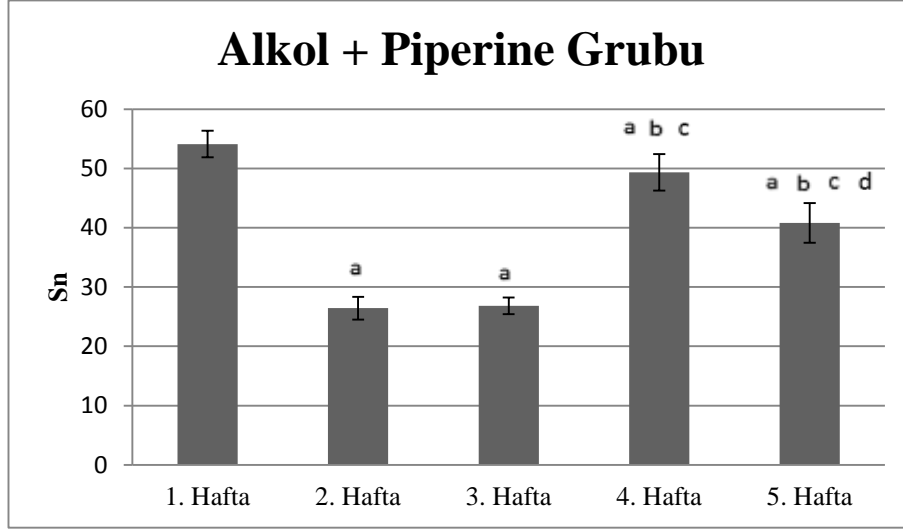
Şekil 3.12. Moris water maze testi Alkol + Betain grubu haftalar arası kıyaslaması (a: $p < 0,05$ 1. hafta ile kıyaslandığında, b: $p < 0,05$ 2. hafta ile kıyaslandığında ve c: $p < 0,05$ 3. hafta ile kıyaslandığında. Diğer gruplarda herhangi bir istatistiksel anlamlılık gözlenmemiştir).

Alkol + Betain Grubu	1. Hafta	2. Hafta	3. Hafta	4. Hafta	5. Hafta
Ortalama \pm	51,0238 \pm	27,5 \pm	28,2143 \pm	56,4762 \pm	53,9762 \pm
SD sn	2,87625	2,35736	0,95938	1,02087	3,0565

Tablo 3.12. Alkol + Betain grubu haftalar arası ortalaması.

Alkol + betain grubu haftalar arası gözlenen farklılıklar şöyledir; birinci hafta ile kıyaslandığında ikinci, üçüncü ve dördüncü haftalar ile istatistiksel olarak anlamlı farklar kaydedilmiştir (Şekil 3.12.). İkinci ve üçüncü hafta birinci haftaya göre istatistiksel olarak düşük sonuçlar gözlenirken; dördüncü haftada istatistiksel anlamlı yüksek sonuçlar gözlenmiştir (Şekil 3.12. a: $p < 0,05$). İkinci hafta ile kıyaslandığında, dördüncü ve beşinci haftalarda istatistiksel anlamlı yüksek sonuçlar gözlenmiştir (Şekil 3.12. b: $p < 0,05$). Üçüncü hafta ile kıyaslandığında, dördüncü ve beşinci hafta sonuçları istatistiksel anlamlı yüksek kaydedilmiştir (Şekil 3.12. c: $p < 0,05$). Alkol+betain grubu ratlarda ikinci ve üçüncü haftalarda öğrenmenin etkisi gözlenirken; dördüncü ve beşinci haftalarda ise betainin hippocampus üzerindeki antioksidan etkinliği ve dolayısıyla belleğin korunamadığı kaydedilmiştir. Diğer

yandan dördüncü ve beşinci haftalar arası davranışsal fark izlenmiş olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlılık gözlenmemiştir.



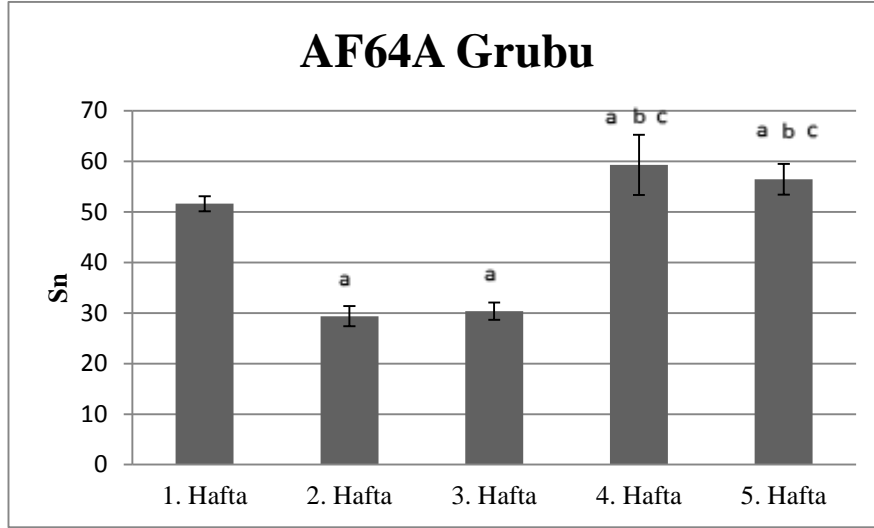
Şekil 3.13. Moris water maze testi Alkol + Piperine grubu haftalar arası kıyaslaması (a: $p < 0,05$ 1. hafta ile kıyaslandığında, b: $p < 0,05$ 2. hafta ile kıyaslandığında c: $p < 0,05$ 3. hafta ile kıyaslandığında ve d: $p < 0,05$ 4. hafta ile kıyaslandığında. Diğer gruplarda herhangi bir istatistiksel anlamlılık gözlenmemiştir).

Alkol + Piperine Grubu	1. Hafta	2. Hafta	3. Hafta	4. Hafta	5. Hafta
Ortalama \pm	54,119 \pm	26,4286 \pm	26,8333 \pm	49,3333 \pm	40,8333 \pm
SD sn	2,25772	1,92088	1,40674	3,06883	3,34227

Tablo 3.13. Alkol + Piperine grubu haftalar arası ortalaması.

Alkol + piperine grubu haftalar arası gözlenen farklılıklar şöyledir; birinci hafta ile kıyaslandığında ikinci, üçüncü dördüncü ve beşinci haftalar ile istatistiksel olarak anlamlı farklar kaydedilmiştir (Şekil 3.13). İkinci ve üçüncü hafta birinci haftaya göre istatistiksel olarak düşük sonuçlar gözlenirken dördüncü ve beşinci haftalarda istatistiksel anlamlı yüksek sonuçlar gözlenmiştir (Şekil 3.13. a: $p < 0,05$). İkinci hafta ile kıyaslandığında dördüncü ve beşinci haftalarda istatistiksel anlamlı yüksek sonuçlar gözlenmiştir (Şekil 3.13. b: $p < 0,05$). Üçüncü hafta ile kıyaslandığında dördüncü ve beşinci hafta sonuçları istatistiksel anlamlı yüksek sonuçlar gözlenmiştir

(Şekil 3.13. c: $p < 0,05$). Dördüncü hafta ile kıyaslandığında beşinci haftadaki düşük sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı görülmüştür. Alkol+piperin grubu ratlarda ikinci ve üçüncü haftalarda öğrenmenin etkisi gözlenirken dördüncü ve beşinci haftalarda ise piperin'in hippocampus üzerindeki antioksidan etkinliği ve dolayısıyla belleğin korunamadığı görülmüştür.



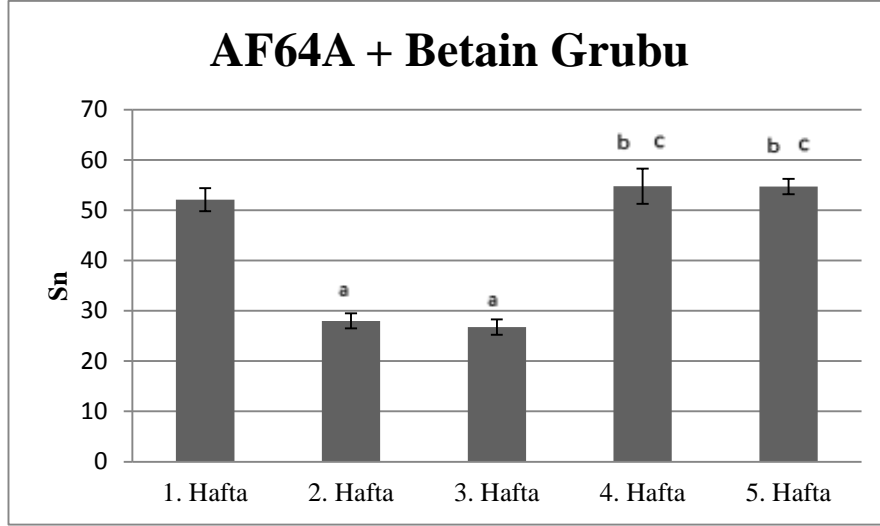
Şekil 3.14. Morris water maze testi AF64A grubu haftalar arası kıyaslaması (a: $p < 0,05$ 1. hafta ile kıyaslandığında, b: $p < 0,05$ 2. hafta ile kıyaslandığında ve c: $p < 0,05$ 3. hafta ile kıyaslandığında. Diğer gruplarda herhangi bir istatistiksel anlamlılık gözlenmemiştir).

AF64A Grubu	1. Hafta	2. Hafta	3. Hafta	4. Hafta	5. Hafta
Ortalama ±	51,619 ±	29,381 ±	30,3571 ±	59,2857 ±	56,4762 ±
SD sn	1,49739	1,99523	1,6897	5,94876	3,04881

Tablo 3.14. AF64A grubu haftalar arası ortalaması.

AF64A grubu haftalar arası gözlenen farklılıklar şöyledir; birinci haftaya göre diğer tüm haftalar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar kaydedilmiştir (Şekil 3.14.). İkinci ve üçüncü hafta birinci haftaya göre istatistiksel olarak düşük sonuçlar gözlenirken; dördüncü ve beşinci haftalarda istatistiksel anlamlı yüksek sonuçlar gözlenmiştir (Şekil 3.14. a: $p < 0,05$). İkinci hafta ve üçüncü hafta ile kıyaslandığında, dördüncü ve beşinci haftalarda istatistiksel anlamlı yüksek sonuçlar gözlenmiştir

(Şekil 3.14. b: $p < 0,05$) ve (Şekil 3.14. c: $p < 0,05$). AF64A grubu ratlarda ikinci ve üçüncü haftalarda öğrenmenin etkisi gözlenirken; dördüncü ve beşinci haftalarda ise AF64A'nın hippokampus üzerindeki oksidan etkinliği ve dolayısıyla belleğin zarar gördüğü sonuçları ortaya çıkmıştır.

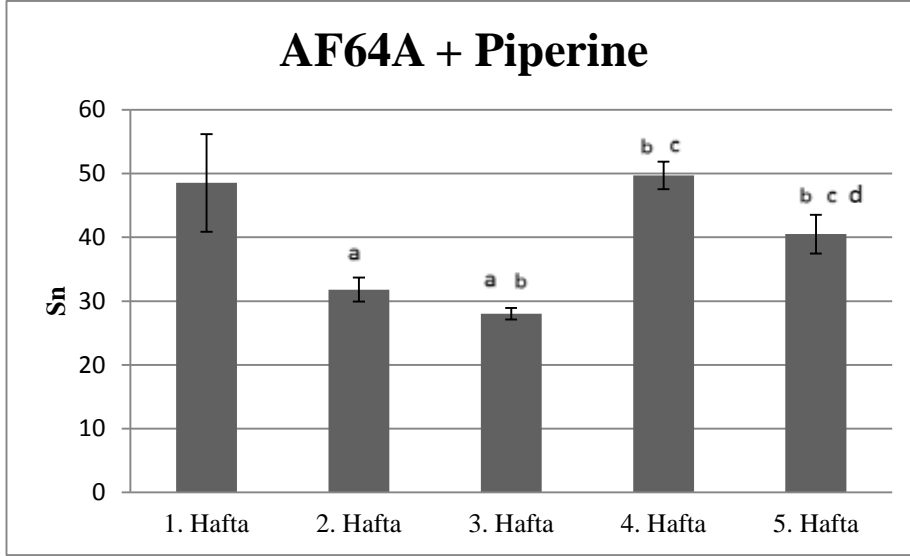


Şekil 3.15. Morris water maze testi AF64A + Betain grubu haftalar arası kıyaslaması (a: $p < 0,05$ 1. hafta ile kıyaslandığında, b: $p < 0,05$ 2. hafta ile kıyaslandığında ve c: $p < 0,05$ 3. hafta ile kıyaslandığında. Diğer gruplarda herhangi bir istatistiksel anlamlılık gözlenmemiştir).

AF64A + Betain Grubu	1. Hafta	2. Hafta	3. Hafta	4. Hafta	5. Hafta
Ortalama ± SD sn	52,0952 ± 2,27258	28 ± 1,4901	26,7619 ± 1,50283	54,7619 ± 3,48251	54,6905 ± 1,54237

Tablo 3.15. AF64A + Betain grubu haftalar arası ortalaması.

AF64A + betain grubu haftalar arası kıyaslama sonuçlarına göre; birinci hafta ile ikinci ve üçüncü hafta arasında birinci haftaya göre istatistiksel olarak düşük sonuçlar gözlenmiştir (Şekil 3.15. a: $p < 0,05$). İkinci hafta ile kıyaslandığında dördüncü ve beşinci haftalarda istatistiksel anlamlı yüksek sonuçlar kaydedilmiştir (Şekil 3.15. b: $p < 0,05$). Üçüncü hafta ile dört ve beşinci hafta kıyaslandığında istatistiksel anlamlı yüksek sonuçlar gözlenmiştir (Şekil 3.15. c: $p < 0,05$).

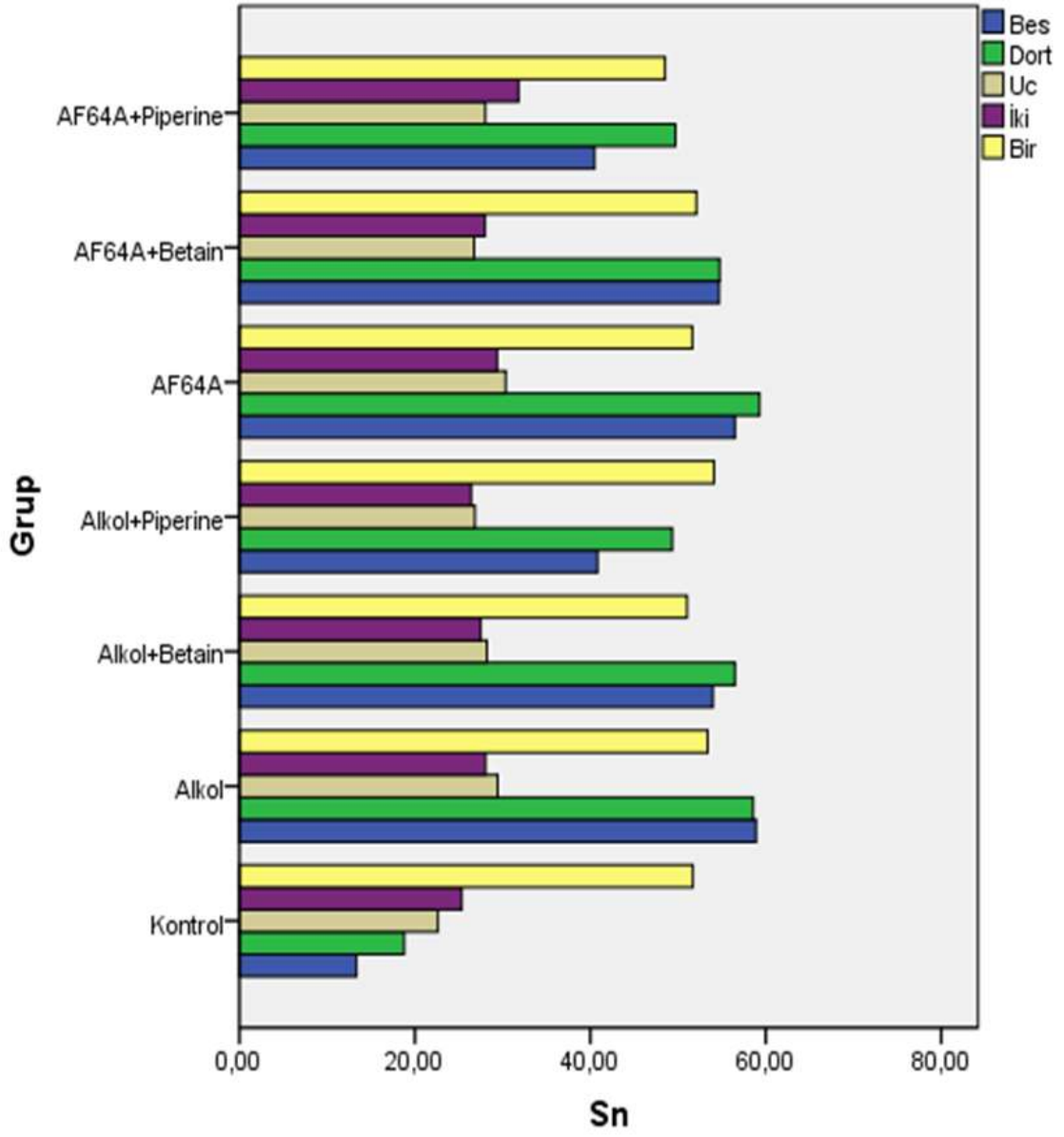


Şekil 3.16. Moris water maze testi AF64A + Piperine grubu haftalar arası kıyaslaması (a: $p < 0,05$ 1. hafta ile kıyaslandığında, b: $p < 0,05$ 2. hafta ile kıyaslandığında c: $p < 0,05$ 3. hafta ile kıyaslandığında ve d: $p < 0,05$ 4. Hafta ile kıyaslandığında. Diğer gruplarda herhangi bir istatistiksel anlamlılık gözlenmemiştir).

Haftalar	1	2	3	4	5
Ortalama \pm	48,5238 \pm	31,8095 \pm	28,0238 \pm	49,7143 \pm	40,5 \pm
SD sn	7,64395	1,89665	0,92766	2,1471	3,03012

Tablo 3.16. AF64A + Piperine grubu haftalar arası ortalaması.

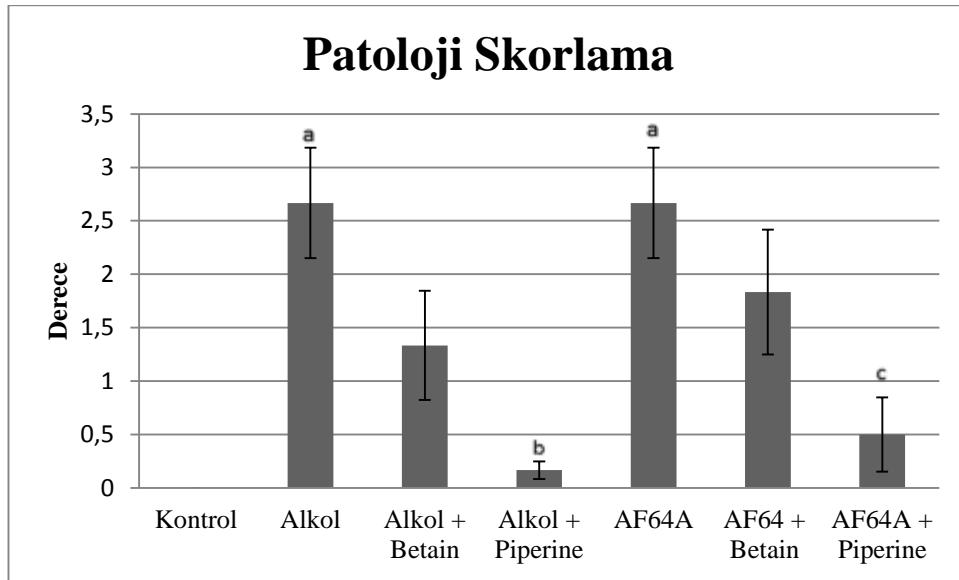
AF64A + piperine grubu haftalar arası istatistiksel farklar şöyledir; birinci hafta ile kıyaslandığında, ikinci ve üçüncü haftalar birinci haftaya göre istatistiksel olarak düşük sonuçlar gözlenmiştir (Şekil 3.16. a: $p < 0,05$). İkinci hafta ile kıyaslandığında üçüncü, dördüncü ve beşinci haftalarda istatistiksel anlamlı yüksek sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 3.16. b: $p < 0,05$). Üçüncü hafta ile dört ve beşinci hafta kıyaslandığında istatistiksel anlamlı yüksek sonuçlar gözlenmiştir (Şekil 3.16. c: $p < 0,05$). Dördüncü hafta ile kıyaslandığında beşinci haftadaki sonuçlar istatistiksel düşük sonuçlar izlenmiştir (Şekil 3.16. d $p < 0,05$).



Şekil 3.17. Tüm grupların beş haftalık morris su tankı sonuçları

3.6. Patolojik İnceleme Sonuçları

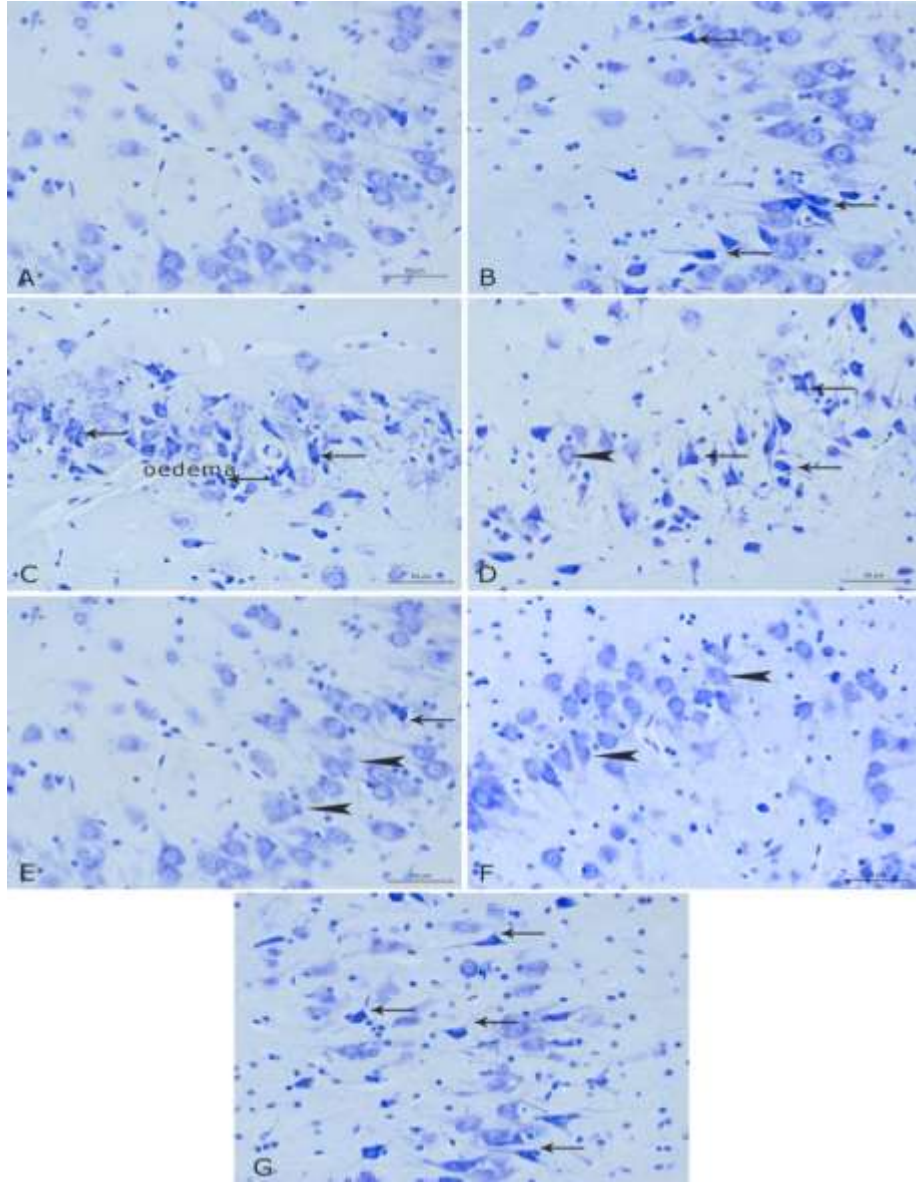
Histopatolojik incelemede sonunda hippocampusun CA1 bölgesinde belirgin nöronal patolojik değişiklikler görülmüştür. Bölgede gruplara göre değişen miktarlarda birçok nöronda nekrobiotik değişiklikler izlenmiştir. Bu hücrelerin sitoplazmaları koyu mavi renk almış, büzüşerek köşeli bir hal aldığı kaydedilmiştir. Çekirdekleri küçülmüş, hiperkromati bir görünümde ve çekirdekçikler seçilememiştir. Bölgede bulunan dejeneratif-nekrotik değişikliğe uğramış bu hücrelerin yüzdesine göre %50'den fazla ise (3), %25-50 arasında ise (2), %5-25 arasında ise (1) ve % 5'den az ise (0) şeklinde semikantitatif olarak skorlanarak sonuçlar (Şekil 3.18.)'de gösterilmiştir.



Şekil 3.18. Patolojik skorlama sonuçları (a: $p < 0,01$ Kontrol ile kıyaslandığında, b: $p < 0,05$ Alkol grubu ile kıyaslandığında ve $p < 0,05$ AF64A grubu ile kıyaslandığında).

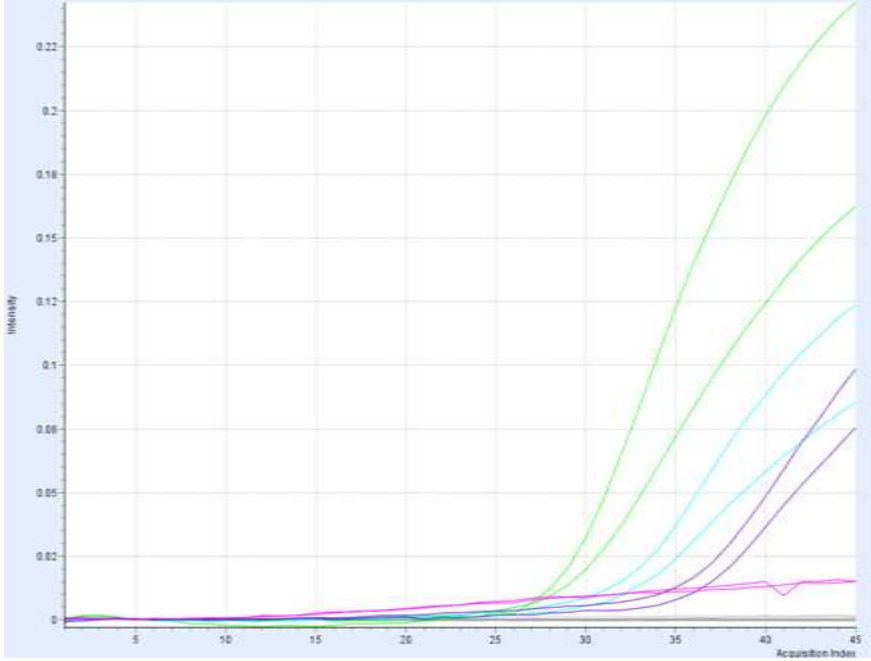
Patolojik skorlama bulgu sonuçları şöyledir; kontrol grubu ile kıyaslandığında alkol ve AF64A grubu arasındaki fark önemli bulunmuştur (Şekil 3.18. a). Alkol grubu ile kıyaslandığında alkol+piperine grubunda istatistiksel olarak anlamlı düşük sonuçlar kaydedilmiştir. Piperinin hippocampus üzerinde alkolün oluşturduğu oksidan harabiyetin piperin tarafından geriletildiği/azalttığı izlenmiştir (Şekil 3.18. b

$p < 0,05$). Yine aynı şekilde piperinin AF64A'nın oksidan etkisiyle oluşan harabiyeti geriletme/azaltmada etkin bir antioksidan olarak, kendi özelliklerini ortaya koyduğu gözlenmiştir (Şekil 3.18. $p < 0,05$).

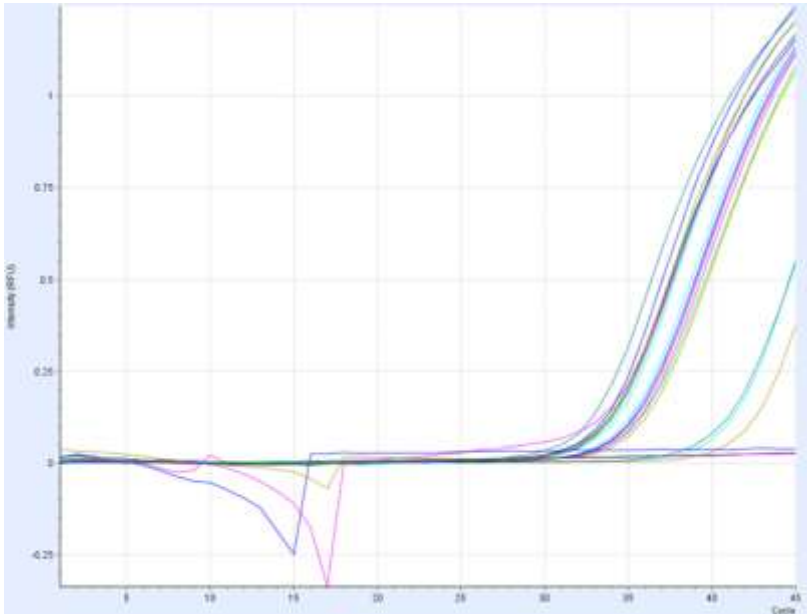


Şekil 3.19. A-G hipokampusün CA1 bölgesinde gruplara göre görülen değişiklikler; dejeneratif nekrotik primidal nöronlar (oklar), normal nöronlar (ok başları) A: Kontrol grubuna ait normal sağlıklı görünüm B: Alkol + Betain grubu ratlarda alkol grubuna göre daha az dejeneratif etkileri görülmekte C: AF64A grubu ratlarda nekrotik bölgeler D: AF64A + Betain grubu ratlarda AF64A grubuna göre daha az dejeneratif etkiler görülmekte. E: AF64A + Piperin grubu ratlarda çok daha az dejeneratif etkiler. F: Alkol + Piperin grubu ratlarda çok daha az dejeneratif görünüm. G: Alkol grubu ratlarda oluşan harabiyet ve nekrotik bölgeler.

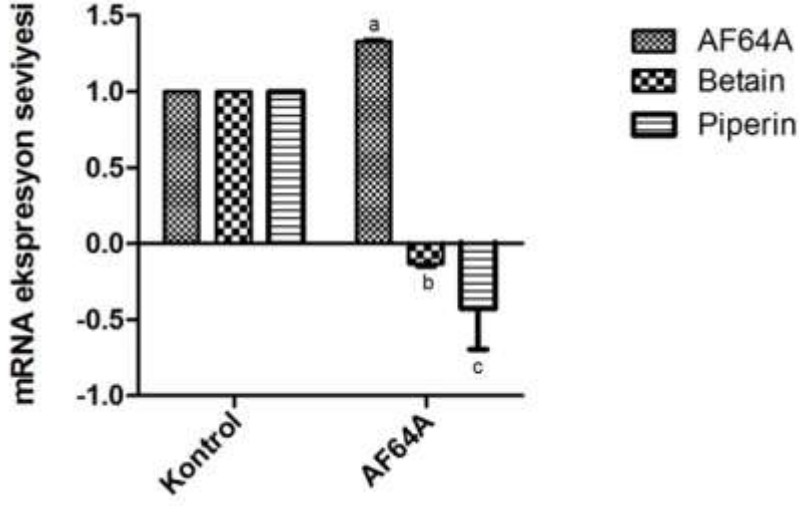
3.7. Hippokampus MAPK mRNA Seviyeleri



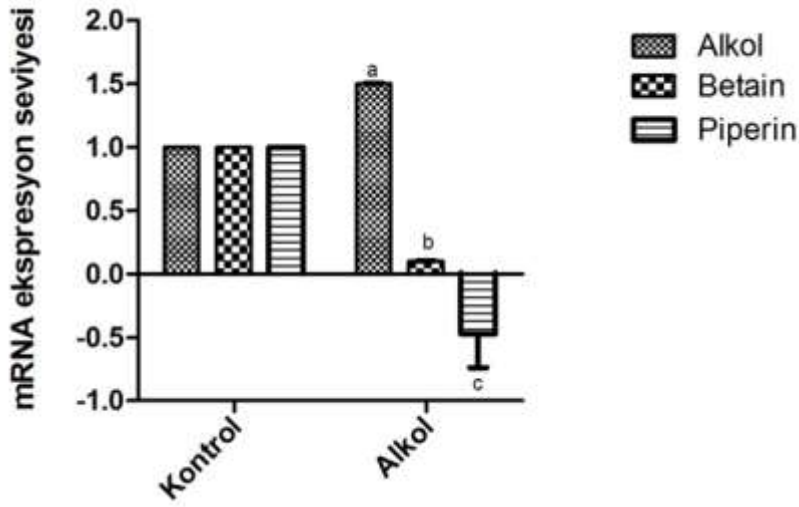
Şekil 3.20. Rat ACTB gen çalışma görünümü.



Şekil 3.21. Rat MAPK-1 gen çalışma görünümü.



Şekil 3.22. Hippokampus MAPK mRNA seviyelerinin AF64A ile kıyaslama sonuçları.



Şekil 3.23. Hippokampus MAPK mRNA seviyelerinin alkol ile kıyaslama sonuçları.

Gen ekspresyon düzeyleri belirlenen MAPK geninin gruplara göre istatistiksel olarak farklı olduğu görülmüştür. Kontrol grubuna göre kıyaslandığında AF64A grubu ratlarda MAPK mRNA ekspresyon seviyesinde belirgin bir artış gözlenmiştir (Şekil 3. 22.). AF64A + betain grubu ve AF64A + piperine grubu ratlarda ise MAPK mRNA ekspresyon seviyelerinde baskılanma izlenmiş olup en iyi sonuç AF64A +

piperine grubunda gözlenmiştir. Bu sonuçlar bize göstermektedir ki AF64A MAPK mRNA ekspresyon seviyelerini oksidan etkisi dolayısıyla artırdığı şeklinde yorumlanabilir. AF64A + betain grubu ratlarda MAPK mRNA ekspresyon seviyesinin baskılanması ve daha güçlü olarak AF64A + piperine grubunda baskılanması betain ve piperinenin antioksidan etkinliğinin rolü ile açıklanabileceği şeklinde düşünülmüştür.

Kontrol grubuna göre kıyaslandığında alkol verilerek AH benzeri etkiler oluşturulan grupta piperin ile tedavi sonucu MAPK ekspresyon düzeyi baskılanmıştır (Şekil 3. 23.). Alkol + betain grubunda MAPK mRNA seviyeleri düşük gözlenmiştir. Bu sonuçlar MAPK geninin AH benzeri davranışların oluşumundaki aktifleşmesine bağlı olarak artırıcı rolü ile tedavide piperin ve betainin başarılı olduğu sonucunun diğer bulgularımız ile uyum içerisinde olduğunu söyleyebiliriz.

3.8. Hippokampus BACE mRNA Seviyeleri

BACE geni için örneklerin büyük bir kısmında mRNA elde edilemediğinden, gen ekspresyon düzeyleri açısından istatistiki olarak analiz ele geçen değerlerle kısmi olarak yapılabilmiş ve buradan da gruplar arasında farklılık belirlenememiştir.

4. TARTIŞMA

Demans hastalarının büyük bir çoğunluğunu (yaklaşık %60-70) Alzheimer hastalığı oluşturur. Vasküler demans yaklaşık %20'lik kısmını, Lewy body ile olan demans %10'luk kısmını ve yaklaşık %2'lik kısmını ise Frontotemporal demanslı hastalar oluşturur (Holmes 2012; Fargo ve Bleiler 2014).

Tanımlandığı günden bugüne AH mekanizması açıklanmaya ve anlaşılmaya çalışılmıştır. Kendine has patolojisi olan Alzheimer hastalığı küresel olarak 26 milyondan fazla kişiyi etkilemektedir. Nüfus artışı ve yaşam ömrünün uzaması dolayısıyla AH ile karşılaşılma riski hızla artmaktadır. Etkilenen birey sayısının fazlalığı ve maliyeti göz önüne alındığında 2050'li yıllarda 1 yıl erken teşhisi bile milyarlarca doların geri kazanımı ve yaşam kalitesinin artışı anlamına gelmektedir (Sery ve ark. 2013; Agis-Torres ve ark.2014; Fargo ve Bleiler 2014; Ferreira ve ark.2014; Pimplikar 2014).

Çalışmamızı içeren deneysel rat modelinde AH oluşturmayı ve AH ile ilgili etkilerin gözlenmesi, tanımlanması ve/veya tedavi edilmesi amacıyla bu konuda etkin olabileceğini düşündüğümüz antioksidan özellikleri olan piperine ve betainin etkilerini görmeye çalıştık.

4.1. Moris Water Maze Test

Beş haftalık morris su tankı testi sonuçları bize göstermektedir ki ilk haftada herhangi belirgin bir değişiklik gözlenmezken ilerleyen haftalarda alkol ve AF64A gruplarında beşinci hafta sonuna vardığımızda kontrol grubu ile diğer tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık elde edilmiştir (Şekil 3. 9. a: $p < 0,001$). Hem alkol hemde AF64A uygulamasında görüldü ki; kullanılan antioksidan özellikli piperine hem alkolün oluşturduğu oksidan hasarı ortadan kaldırmada ve/veya tedavi etmede; hem de AF64A'nın yaptığı harabiyeti geriletme, azaltma ya da tedavi etmede başarılı olduğu ortaya konarak kaçış platformuna çıkış süreleri açısından

davranış değişiklikleri görülmüştür. Bu değişiklikler plazma oksidan MDA parametresinde tanımlanmıştır. Aynı sonuçlar, rat beyin dokusunun hippocampus bölgesi patolojik bulgularıyla da desteklenmiştir. Beş hafta sonundaki oksidan hasar seviyesini azaltmada ve/veya geriletmede betain'in etkinliği de gösterilmiştir, ancak betainin başarısına kıyasla piperine'nin etkinliği belirgin olarak daha ön plana çıkmaktadır.

Yu ve ark. (2015), A β 'nin ROS oluşumunu indüklediğini rapor etmişlerdir. Ratlarda A β 'nin indüklediği ROS'un sonucunda AH benzeri davranışların oluştuğu ve bununla ratların çıkış platformuna ulaşma süresini uzattığını göstermişlerdir. Bu çalışmadaki sonuçlar ile bizim deneysel modelimizdeki biyokimyasal, davranışsal ve patoloji sonuçları uyum içerisindedir.

Javed ve ark. (2015), çalışmalarında intrasebirebroventriküler-streptozotocin (ICV-STZ) uygulayarak, bilişsel harabiyet oluşturdukları ratlarda antioksidan özellikli bir flavonoid olan Hesperidinin etkilerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda hesperidinin rat hippocampusünde oluşan harabiyeti engellediği görülmüştür. Yine benzer şekilde antioksidan özelliği piperinenin bizim modelimizde ratların davranışsal, kimyasal parametrelerde ve patolojik analizlerde iyileştirici özellikleri olduğu görülmüştür. Antioksidan etkinin harabiyeti engelleyici rolü bizim çalışmamızca da teyid edilmiştir.

Leiros ve ark. (2015), Alzheimer modeli oluşturdukları ratlar üzerinde Gracilin'in etkilerini araştırmışlardır. İnvitro gracilin uygulamasının sonucunda, BACE-1 aktivitesini inhibe ettiği, Alzheimer hastalığı patolojilerinden olan, hiper tau fosforilasyon seviyelerini azalttığı ve ERK'yı inhibe ettiği rapor edilmiştir. İntraperitoneal uygulama sonucunda da aynı etkilerin gözlemlendiği ve rat davranışları üzerinde gracilin'in pozitif etkisinin olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca A β 42 seviyelerinin de bu çalışma sonucunda azaldığı gösterilmiştir. Çalışma sonucunda gracilin'in nörodejeneratif ve özellikle AH tedavisi için potansiyel olumlu etkisinin olduğu belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda ise alkol ve AF64A'nın etkilerini

azaltmada ve/veya tedavi etmede piperine'nin benzer etkilere sahip olduğu belirlenmiştir.

Sabogal-Guaqueta ve ark. (2015), antioksidan flavonoid ailesinin bir üyesi olan quercetin'in Alzheimer rat modelinde etkilerini araştırmışlardır. Sonuç olarak quercetin'in ekstrasellüler A β 1-42 seviyelerini anlamlı olarak azalttığı ve APP'nin BACE aracılı kesilimini azalttığı rapor edilmiştir. Aynı zamanda quercetin'in morris su tankı testinde öğrenme üzerine pozitif etkilerinin olduğu da rapor edilmiş olup, bu çalışma da bizim çalışmamızı antioksidan özelliğinin (ki farklı bir kimyasal olan piperine kullanılmasına rağmen) harabiyeti önleyici etkisinin ispatlanması açısından desteklemektedir.

Namki Cho ve ark (2014), *Betula platyphylla* bark (BPB-316)'ın A β 1-42'nin indüklediği hasar üzerine etkilerini araştırmışlar ve çalışma sonucunda oral BPB-316 uygulaması ile hipokampüste β -sekretaz aktivitesini inhibe ettiğini ve bunun sonucunda A β 1-42'nin hipokampüste birikimini anlamlı olarak azalttığını kaydetmişlerdir. Çalışmaya göre BPB-316 uygulaması hipokampüste asetilkolinesteraz aktivitesini anlamlı olarak azaltmakta, GSH konsantrasyonunu ise anlamlı olarak artırmaktadır. Bu sonuçları morris su tankı testiyle de davranışsal olarak desteklediklerini ifade etmişlerdir. Bu ekstraktın oksidatif stres bağlantılı ve özellikle yaşa bağlı neurodejenaratif hastalıklara karşı koruyucu bir etkisinin olabileceği ve özellikle de etkisini A β birikimini azaltıcı olarak göstermesi AH hastalığına karşı tedavide etkin olarak kullanılabileceği bildirilmiştir. Bu sonuçlar araştırmamızda kullandığımız piperinenin etkilerini desteklemektedir.

Alfa (α)-sekretaz tarafından Amiloid prekürsör proteinin (APP) işlenmesi ile β -amiloid AH'ı verilen küçük peptid yapının oluşumu engellenir. Alfa (α)- sekretaz aktivitesi sonucu oluşan sAPP α , nöronal plastisite/hayatta kalma da önemli rol oynamakta ve ekzotoksositeye karşı korumada görev almaktadır. sAPP α bir de stem cell proliferasyonunu düzenler ve erken CNS (Merkezi Sinir Sistemi) gelişiminde önemli rol oynar. Amiloid prekürsör protein β -sekretaz 1 (BACE1) APP metabolizmasıyla ilgili β -sekretazdır. BACE ekspresyonunun artış mekanizmaları

arasında enerji yoksunluğu, hipoksi, iskemi gibi oksidatif durumlar bulunmaktadır. β CFT, γ -sekretaz tarafından A β 40 ve A β 42 ye parçalanır ki bu durum plak oluşumunu hızlandırarak; AH benzeri etkilerin daha fazla görülmesi anlamına gelmektedir (Khachaturian 2007; Sery ve ark. 2013; Bayer ve Wirths 2014; Pimplikar 2014).

J. Greilberger ve ark. (2008), Alzheimer hastalarında oksidatif markeri çalışarak aralarında ilişki olup olmadığını gözlemlemeye çalışmışlardır. Çalışma sonucunda MDA değerlerinin yüksekliği ile Alzheimer arasında anlamlı korelasyon olduğu gözlenmiştir. Bu çalışma sonuçları da bizim sonuçlarımızla uyum içerisindedir.

4.2. AF64A Seviyeleri

Seçici bir kolinotoksin ve etilkolin mustard aziridinium iyonu (AF64A) Alzheimer hastalığının ilerleyişini anlayabilmek için oldukça önemlidir. AH ile öğrenme eksiliği, hafıza ve kolinerjik eksiklik arasında güçlü bir ilişki bulunmaktadır. AF64A'nın indüklediği DNA hasarı ve sitotoksik sonuçları gösterilmiş olup; çalışmamızın sonuçları da hafıza kaybı ile AH oluşturma mekanizmasına etkilerini net olarak ortaya koymuştur (Hanin 1996; Rose ve ark., 2004).

AF64A'nın çarpıcı olarak glutatyon (GSH) seviyesinde artışa neden olduğu rapor edilmiştir. GSH invivo oksidatif strese yanıt olarak endojen üretilen hücrel toksisiteyi sınırlamak için hizmet eder. AF64A serbest radikal oluşturabilir ve lipit peroxidasyona yolu ile hücrel hasara yol açarak oksidatif stresi tetikleyebilir (Hanin 1996; Hiramatsu ve ark., 2002; Rose ve ark., 2004).

Deneyisel modelimizde AF64A'nın etkilerini araştırmak için asetilkolinesteraz (AChE) aktivite seviyeleri yetersiz kaynak dolayısıyla çalışılmamıştır. Diğer yandan tüm doku örneklerinde daha önce de sözü edilen AF64A'nın oksidatif stresi

indükleyerek hasar oluşturabileceği ve çeşitli dokularda özellikle nöron ve serum oksidan metabolit seviyeleri araştırılmış, davranış testleri ve hippocampus üzerindeki zararlı etkileri patolojik görüntüleme ile ortaya koyulmaya çalışılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar hipotezimizi destekler yönde ortaya çıkmıştır. Lipit peroksidasyon göstergesi olan MDA seviyelerinde karaciğer dokusunda AF64A seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı yüksek olduğu kaydedilmiştir.

Morris su tankı testinde ilk hafta AF64A grubu ratlarda platforma çıkış sürelerinde istatistiksel olarak herhangi fark gözlenmemiştir (Şekil 3. 5.). İkinci ve üçüncü haftalarda ise kontrol grubuna göre anlamlı yüksek istatistiksel fark gözlenmiştir (Şekil 3. 6. a: $p < 0,05$) ve (Şekil 3. 7. a: $p < 0,01$). Dördüncü haftada ise kontrol gurubuyla istatistiksel olarak anlamlı yüksek ilişki kaydedilirken (Şekil 3.8. a $p < 0,001$); aynı haftada ve beşinci haftada AF64A grubu ile AF64A + piperine grubu arasında anlamlı düşük ilişki gözlenmiştir (Şekil 3. 8. c $p < 0,05$) ve (Şekil 3. 9. a ve c). Morris su tankı testine göre piperine'nin pozitif etkisi davranışlarda da belirlenmiştir. Patolojik inceleme sonuçlarında; AF64A grubu ile kontrol kıyaslandığında kontrole göre istatistiksel yüksek anlamlılık görülürken (Şekil 3.18), AF64A ile AF64A+ piperine grubu arasında istatistiksel anlamlı düşük sonuç elde edilmiştir (Şekil 3.18 c: $p < 0,05$). Patolojik görüntüleme sonuçları da bu sonuçlarımızı destekler yöndedir (Şekil 3. 19 C). Hippokampus patoloji görüntüleme sonuçlarında AF64A grubuna göre AF64A+ piperine grubunda daha düşük hasar izlenmiştir (Şekil 3.19. E).

N.V. Gulyaeva ve ark. (1996), beyine AF64A uygulamanın lipit peroksidasyon seviyesini yükselttiğini rapor etmişlerdir. Bu çalışma sonuçları bizim deneysel modelimizdeki karaciğer ve plazma MDA sonuçlarıyla (Şekil 3. 1., Şekil 3. 2.) uyum içerisindedir.

S. Bachurin ve ark. (1999, 2001), beyine AF64A uygulamasının morris su tankı test sonuçlarına göre, AF64A'nın öğrenmeye negatif yönde etki ettiği, öğrenmeyi zayıflattığı ve A β seviyelerini yükseltici yönde sonuç beyan etmişlerdir.

Bizim çalışmamızda da AF64A'nın öğrenmeyi negatif yönde etkilediği ve Alzheimer hastalığını taklit eden semptomlar oluşturduğu belirlenmiştir.

Nongnut Uabundit ve ark. (2010), AF64A'nın Alzheimer hastalığını indüklediği yönündeki bulguları, bizim çalışmamız ile paralellik göstermektedir.

4.3. Alkol Seviyeleri

Etanole bağlı demansın, tüm demans vakalarının yaklaşık % 10'unu oluşturduğu varsayılmakta olup "aşırı alkol kullanımı" büyük olasılıkla daha yüksek bir orana denk gelmektedir. Etanolün nörotoksik olup etanol verilen hayvanlarda hafıza ve öğrenme bozukluğuna neden olan nöropatolojik değişimlerin görüldüğünü doğrulanmaktadır. Etanol, aynı zamanda beyin-nörotropik faktör ve sinir gelişim faktörünün yararlılığını düşürmektedir (Collins ve ark., 2009; Brust 2010; Kruman ve ark., 2012).

Rachel L. Self ve ark. (2005), yüksek doz etanol tüketimi nörodejenerasyona ve A β birikimine yol açmakta, bunun sonucu olarak da AH'nın gelişimine katkıda bulunmaktadır. Bu çalışma sonuçları bizim modelimizdeki patolojik inceleme ve görüntüleme sonuçlarımız (Şekil 3. 18., Şekil 3. 19. G) ile uyum gösterdiği gözlenmiştir.

Do Yeon Lee ve ark. (2008), alkol tüketiminin mitokondrial disfonksiyonu tetiklediği, ayrıca ROS ürünlerinin oluşumunu artırarak, A β oluşumunu hızlandırdığı ve A β 'nin nörodejeneratif etkilerine katkıda bulunduğu ifade edilmiştir. Bu sonuçlar, bizim modelimizde elde ettiğimiz alkolün ROS ürünlerini artırdığını plazma ve karaciğer MDA (Şekil 3. 1. ve Şekil 3. 2.) ve A β oluşumunu tetiklediği yönündeki bulgularımızla aynı yönde olduğu gözlenmiştir.

Young-Jung Lee ve ark. (2012), alkolün etkileriyle ilgili çalışma raporları ve sonuçları bizim çalışma sonuçlarımızla paraleldir .

Gonzalo Muñoz ve ark. (2015), alkolün etkileriyle ilgili yaptıkları çalışmalarında, alkolün artan dozlarında nörodejeneratif ve toksik etkiye sahip olduğunu, küçük dozlarda ise koruyucu etkiye sahip olabileceğini rapor etmişlerdir. Alkolün nörotoksik etkisi ile ilgili bulguları deneysel modelimizde davranış testi, patolojik inceleme ve patolojik görüntüleme sonuçlarımızla uyumlu olduğu düşünülmektedir.

4.4. MAPK Seviyeleri

Oksidatif stresin, AH'nin ilerlemesinde anahtar bir risk faktörü olduğu düşünülmektedir. Bu tür bir stres, hidroksil radikal, süperoksit anyon ve hidrojen peroksit gibi ROS'lar ile tetiklenir ve AH'da JNK ile p38 sinyal yollarının tipik aktifleştiricileridirler. Aktiflenen MAPK sinyal yollarının; nöronal apoptosiz tetiklenmesi, β - ve γ -sekretazlarının transkripsiyonal ve enzimatik aktiflenmesi, JNK tarafından yapılarak AH'nin bir işareti olan APP'nin fosforlanması ve dengelenmesi gibi çeşitli mekanizmalar aracılığıyla AH patogenezinin katkı sağladığı düşünülmektedir (Zhu ve ark., 2002; Kim ve Choi 2010; Munoz ve Ammit 2010).

Deneysel modelimizde kontrol ile kıyaslandığında alkol, AF64A, AF64A+betain ve AF64A+piperine grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı yüksek sonuçlar bulunmuştur (Şekil 3. 22. ve Şekil 3. 23.) Alkol grubu ile alkol+piperine grubu arasında istatistiksel anlamlı düşük sonuçlar gözlemlenmiştir (Şekil 3. 23.). Yine AF64A grubu ile AF64A + Piperine grupları arasında istatistiksel anlamlı düşük sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 3.22.). Bu çalışma sonuçlarına göre alkol, ve AF64A uygulama gruplarında oluşan oksidan hasarı geriletmede ya da hücre ölüm yoluna tetikleyebilecek MAPK yolunun aktifleştirdiğini söyleyebiliriz. Piperine'nin bu zararlı etkileri geriletmede ya da azaltmada anlamlı katkı sağladığı gözlenmiştir. Patolojik inceleme ve görüntüleme sonuçlarımız da bu görüşü destekler yöndedir (Şekil 3.18. ve Şekil 3.19.).

Chiara Criscuolo ve ark. (2015), A β grubunda yüksek p38MAPK seviyeleri rapor edilmiştir. Bilindiği gibi p38 ve JNK yolağı oksidatif stresle aktive olmaktadır. Bizim çalışmamızda alkol ve AF64A uygulama gruplarında yüksek MAPK seviyeleri gözlenirken, piperine verilen grupta MAPK mRNA ekspresyon seviyelerinin baskılandığı gözlenmiştir.

Jeremy Yee Hoong Ong ve ark. (2015), oksidatif stresin MAPK, p38 ve JNK yolunu aktiflediğini rapor etmişlerdir. Bizim deneysel modelimizde AF64A ve alkol gruplarında oksidan hasarın yüksek olduğu MDA ve GSH sonuçlarıyla gözlenmiştir.

Ender Büyükgüzel ve ark. (2014), özellikle MAPK elemanları JNK ve p38'in ROS veya hücre içi tiyol/disülfid düzeyinin değişmesine bağlı ılımlı oksidatif stres ile güçlü bir şekilde aktive edildiği ifade edilmiştir. Deneysel modelimizde oksidan hasar göstergesi olan MDA plazma ve karaciğer seviyeleri alkol ve AF64A gruplarında yüksek gözlenmiştir (Şekil 3. 1. ve Şekil 3. 2.). Ayrıca alkol ve AF64A gruplarında MAPK mRNA ekspresyon seviyeleri yüksek izlenmiştir. Piperine ve betain gruplarında ise betain ve piperinenin antioksidan etkinliklerinden dolayı düşük oksidan hasar ve baskılanmış MAPK mRNA ekspresyon seviyeleri gözlenmiş olup bulgular bizim sonuçlarımızla uyum içerisinde olduğu düşünülmektedir.

János Varga ve ark. (2014), APP ve MAPK-1 seviyelerinin yaşla beraber arttığı ve yine yaşla beraber morris su tankı testinde çıkış platformuna çıkış sürelerinin uzadığı rapor edilmiştir. Bunun sebebi olarak da, pro-inflamatuar sitokinlerin salınımının regülasyonunda anahtar rol oynayan MAPK'nın yaşla beraber artan inflamasyon riskini azaltmaya yönelik etkisi gösterilmiştir. Deneysel modelimizde ise alkol ve AF64A gruplarında morris su tankı çıkış platformuna çıkış süreleri uzamış, aynı gruplarda MAPK seviyeleri yüksek gözlenmiştir. MAPK seviyelerinin yüksek olduğu gruplarda oksidan hasar yüksek gözlenmiştir.

Bo Ma ve ark. (2014), ERK yolunun hücrelerin farklılaşması ve büyümesinde önemli rol oynadığı, JNK ve p38'in çeşitli stres durumlarında yüksek aktivite ile aktiflendiği rapor edilmiştir. MAPK yolunun ise sıklıkla apoptotik aktivasyona yol

açtığı, diğer yandan Alzheimer hastalığında A β 'nin her üçünü de aktive ettiği belirtilmiştir. Bu çalışmada, A β 'nin MAPK yolunu aktive etmesi yönüyle bizim çalışmamızdaki Alzheimer benzeri etki oluşturulan deneysel modelimizde yüksek MAPK seviyeleri gözlenmiştir.

Rui Liu ve ark. (2014), sitotoksik A β 'nin indüklediği yüksek ROS seviyelerine sekonder ERK1/2, p38 MAPK/MK2, ve SAPK/JNK-c-Jun kaskatlarının aktive olduğu belirtilmiştir. Bu sonuçlar bizim deneysel modelimizdeki alkol ve AF64A'nın indüklediği yüksek ROS seviyesiyle aktive olan MAPK seviyesi bakımından ilişkili bulunmuştur.

Nirut Suwanna ve ark. (2014), A β 'nin oksidatif zararı ve inflamasyonu artırdığını rapor etmişlerdir. Çalışmalarında nöroprotektif etkisi olan diarylpropionitrile (DPN) kortikal hücre kültüründe kullanılmıştır. Çalışma sonucunda DPN ile muamelenin ROS seviyelerini anlamlı olarak düşürdüğü gösterilmiştir. Ayrıca DPN ile muamelenin A β 'nin indüklediği pro-inflamatuar sitokinler olan IL-1 β ve IL-6'nın ekspresyon seviyelerini azalttığı da belirtilmiştir. Çalışmada yer alan diğer bulgu, A β 'nin indüklediği ERK1/2 ve Akt fosforilasyonun deprese edilmesini DPN'nin geliştirdiği sonucudur. DPN'nin etkileri, ERK1/2 ve Akt aktivasyonunda dahil olmak üzere, JNK ve p38 inhibisyonunu kapsayabileceği ifade edilmiştir. Çalışma sonucunda DPN'nin, A β 'nin indüklediği nörotoksisite üzerine çeşitli mekanizmalarla antioksidan, antiapoptozis ve antiinflamasyon etkileriyle nöroprotektif etki gösterdiği; bu koruyucu etkinin çalışmamızda yer alan özellikle Piperin'in antioksidan olarak aynı şekilde ROS seviyelerini düşürücü etkide bulunması nedeniyle benzerlik gösterdiği anlaşılmaktadır.

Xiaolei Shi ve ark. (2015), Alzheimer modeli hücre kültüründe A β 'nin indüklediği nörotoksisite üzerine antiinflamatuvar özellikte olduğunu ileri sürdükleri Curcuminin koruyucu etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda curcuminin doza ve zamana bağlı şekilde, A β 42'nin etkilerine karşı mikrogial yaşamı koruduğu rapor edilmiştir. Bunun yanısıra curcumin'in mikroglada A β 42'nin indüklediği ERK1/2 ve p38'in fosforilasyonu üzerinde inhibitör etkisi olduğu da ifade edilmiştir. Mikroglada

curcumi'nin ERK1/2 ve p38 yolağın blokajı ile inflamatuvar stokinlerin üretimini azalttığı da belirtilmiştir. Ayrıca curcuminin mikroglia da A β 42'nin indüklediği IL-1 β , IL-6 ve TNF α 'nın mRNA seviyelerini doza bağlı olarak kaldırdığı da rapor edilmiş olup, çalışmamızda yer alan betain ve piperine'in MAPK geninin AH oluşumundaki etkisini azaltıcı olarak mRNA seviyelerini düşürme ve koruyucu etkileri ile benzer sonuçlar göstermesi açısından önemli olduğu düşünölmektedir.

5. SONUÇ

Deneysel alzheimer rat modelimizde oksidan alkol ve AF64A maddelerin seviyelerinin moleküler düzeyde olmak üzere beyin dokusunda özellikle hippokampus bölgesindeki nöron hücrelerinde oksidan ve hücreler üzerindeki harabiyet edici etkileri gözlenmiştir. Ayrıca sözkonusu oksidan maddelerin morris su tankı testi ile de davranışsal etkileri izlenmiştir. Oksidan etkileri azaltmada/geriletmede antioksidan özelliği düşünülen piperin ve betain kullanılmıştır. Betainin etkinliği tam olarak izlenememiş olmasına rağmen piperinin alkol ve AF64A oksidan etkileri azaltmada hem moleküler düzeyde hem de davranışsal anlamda daha etkin olduğu kaydedilmiştir. Deneysel modelimiz bu yönüyle istenilen amacı ve başarıyı sağladığı söylenebilir. Diğer yandan, Alzheimer hastalığının moleküler düzeyde patolojisinin aydınlatılması tedavi seçeneklerinin ve/veya ortaya çıkmadan önlenabilir yolların aydınlatılması için daha geniş katılımlı ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

ÖZET

Alzheimer Benzeri Demans Oluşturulan Ratlarda Piperine ve Betain Kullanımının Öğrenme Davranışı Biyokimyasal, Patolojik ve Genetik Etkileri

Demans hastalarının büyük bir çoğunluğunu (yaklaşık %60-70) Alzheimer hastalığı oluşturur. Alzheimer hastalığının kendine has özellikleri senil plaklar (SPs), nörofibriler yumaklar (NFTs), sinaptik kayıp ile seyreden ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır. Kanserden sonraki tedavi maliyeti en yüksek hastalık olan AH için etkili bir tedavi henüz bulunamamıştır. Bu konuyla ilgili deneysel rat modelimizde beyin ve özellikle hipokampus üzerinde etkili oksidan özellikli olan seçici kolinotoksin ve etilkolin mustard aziridinium iyonu (AF64A) araştırdık. Çalışmamızda serebral atrofi ve nörolojik anomallikleri indükleyen alkolün oluşturduğu hasarı ve bu oluşan hasarı ortadan kaldırma ve/veya geriletme için antioksidan özelliği olan piperini ve betainin etkinliklerini gözlemlemeye çalıştık. Mitojen aktive protein kinaz (MAPK-1)'in hipokampus doku örneğinde, serumda ve morris su tankı testi aracılı davranış testi ile gözlemlemeye çalışıldı.

Bu amaçla 60 adet, 3-3,5 aylık 280-320 g Sprague-Dawley erkek rat kullanılmıştır. Gruplarımız şu şekilde oluşturuldu; **Grup 1** Kontrol grubu (n=6), **Grup 2** Alkol Uygulaması ile Deneysel Demans Oluşturulan Grup (n=18), **Grup 3** AF64A Uygulaması ile Deneysel Demans Oluşturulan Grup (n=18), **Grup 2a** Kontrol Grubu (Sadece Alkol n=6), **Grup 2b** Tedavi Amaçlı Piperin Verilmesi (n=6), **Grup 2c** Tedavi Amaçlı Betain Verilmesi (n=6), **Grup 3a** Kontrol Grubu (Sadece AF64A n=6), **Grup 3b** Tedavi Amaçlı Piperin Verilmesi (AF64A+Piperine n=6), **Grup 3c** Tedavi Amaçlı Betain verilmesi (n=6).

Çalışma sonucunda serum, karaciğer ve eritrosit hemolizat örneklerinde, hipokampus doku örneklerinde patolojik inceleme ve davranış testi sonuçlarımızla elde edilen bulgulara göre alkol ve AF64A uygulamasının yapıldığı gruplarda davranışsal, biyokimyasal, patolojik ve genetik düzeyde oksidan etkileri gözlenmiştir. Diğer yandan piperine ve betainin bu zararlı etkileri

azaltmada/geriletmedeki başarıları izlenmiştir. Özellikle piperinin antioksidan etkisinin daha bariz olarak ortaya çıktığı istatistiksel, davranışsal, patolojik olarak, kan analizleri ve genetiksel incelemeler bazında belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: AF64A, AH, Alkol, Betain, Homosistein, Piperine

SUMMARY

Its Effect of using Piperine and Betaine Application to Learning Behaviour, Biochemical Parameters, Patalogical Examination and Genetic analysis of Alzheimer Like Dementia Formed in Rats

The vast mojority of dementia patients (about 60-70%) suffer from Alzheimer disease. The Alzheimer is a progressive neurodegenerative disease with specific features like senile plaques (SP), neurofibrillary tangles (NFTs) and synaptic loss. With the second highest treatment cost of AH after cancer, there is no effective treatment. In finding a cure for this disease, I performed an experimental rat model and used as a effective on brain and especially hippocampus, oxidant selector the kolinotoksin and etilkolin mustard aziridinium ion (AF64A). In this study; we aimed to find the damage level caused by the the alcohol, inducing the cerebral atrophy and neurological anomaly; and to determine the elimination and/or recession of this damage by the Piperine and Betaine as a antioxidant. The effect into mitogen active protein kinases (MAPK-1) in hippocampüs tissue, blood serum sample via mRNA level and the behaviour of the animals with using morris water maze test were searched.

In this study; 60 Sprague-Dawley male rat with each 3-3,5 months old and 280-320 g weight were used. The groups were performed like this; **Group 1** as the control group (n=6), **Group 2** performing experimental dementia with alcohol (n=18), **Group 3** performing experimental dementia with AF64A (n=18), **Group 2a** the control Group (only alcohol n=6), **Group 2b** for treatment the Piperin applying (n=6), **Group 2c** for treatment the Betain applying (n=6), **Grup 3a** the control groub (just AF64A n=6), **Group 3b** for treatment the Piperin applying (AF64A+Piperine n=6), **Group 3c** for treatment the Betain applying (n=6).

From this study; we obtained expected results from as a oxidant effective of the alcohol and AF64A application on the basis of the pathological and behavioural test in hippocampus tissue sample of blood serum, liver and hemolisat. Also, it was

observed the decrease and downgrade success of Betain and Piperine into detrimental effect of these substance. Especially, the significant antioxidan effect of Piperidine was determined from statistical, behavioural, pathological, blood and genetic analysis.

Key Words: AF64A, AH, Alcohol, Betain, Homocystein, Piperine

KAYNAKLAR

- AGIS-TORRES, A., SOLHUBER, M., FERNANDEZ, M., SANCHEZ-MONTERO, J. M., (2014). Multi-Target-Directed Ligands and other Therapeutic Strategies in the Search of a Real Solution for Alzheimer's Disease. *Current Neuropharmacology*, **12**: 2-36.
- AJAZUDDIN, ALEXANDER A., QURESHI A., KUMARI L., VAISHNAV P., SHARMA M., SARAF S., SARAF S., (2014). Role of herbal bioactives as a potential bioavailability enhancer for Active Pharmaceutical Ingredients. *Fitoterapia* **97**: 1-14.
- ARLT. S., (2013). Non-Alzheimer's disease-related memory impairment and dementia. *Dialogues in Clinical Neuroscience* - 15. (4): 465-473.
- ARSLAN, S., ATEŞ, E., ATIKCAN, D. T., UYANIK, E., & YAPAR, C., (2013). Stres Altında Olan Sıçanlarda Ve Normal Koşullardaki Sıçanlarda Antidepresan "Fluoksetin Hidroklorür Kullanımının Öğrenme Üzerine Etkileri. Erişim:<http://tip.baskent.edu.tr/egitim/mezuniyetoncesi/calismagrpo/ogrsmpzsnm13/13.S14.pdf> Erişim Tarihi: 17.06.2015.
- ATKINSON W., SLOW S., ELMSLIE J., LEVER M., CHAMBERS S.T., GEORGE P.M., (2009). Dietary and supplementary betaine: Effects on betaine and homocysteine concentrations in males. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* **19**: 767-773.
- BACHURIN S., BUKATINA E., LERMONTOVA N., TKACHENKO S., AFANASIEV A., GRIGORIEV V., GRIGORIEVA I., IVANOV Y., SABLIN S., ZEFIROV N., (2001). Antihistamine Agent Dimebon As a Novel Neuroprotector and a Cognition Enhancer. *Ann N Y Acad Sci.* Jun; **939**:425-35.
- BACHURIN S., OXENKRUG G., LERMONTOVA N., AFANASIEV A., BEZNOSKO B., VANKIN G., SHEVTZOVA E., MUKHINA T., SERKOVA T., (1999). N-Acetylserotonin, Melatonin and Their Derivatives Improve Cognition and Protect against -Amyloid-Induced Neurotoxicity. *Ann N Y Acad Sci.* **890**:155-66.
- BAR-AM O., AMIT T., WEINREB O., YODIM M.B., MANDEL S., (2010). Propargylamine Containing Compounds as Modulators of Proteolytic Cleavage of Amyloid Protein Precursor: Involvement of MAPK and PKC Activation. *Journal of Alzheimer's Disease* **21**: 361-371.
- BAYER T.A., WIRTHS O.,(2014). Focusing the amyloid cascade hypothesis on N-truncated Abeta peptides as drug targets against Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **127**:787-801.

- BERTRAM L., TANZI R.E., (2012). The Genetics of Alzheimer's Disease. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, **107**: 79-100.
- BIGNANTE E.A., HEREDIA F., MORFINI G., LORENZO A., (2013). Amyloid b precursor protein as a molecular target for amyloid beinduced neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* **34**: 2525–2537.
- BLEICH S., DEGNER D., SPERLING W., BÖNSCH D., THÜRAUF N., KORNHUBER J., (2004). Homocysteine as a neurotoxin in chronic alcoholism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. **28(3)**:453-464.
- BLENNOW K., LEON M.J.D., ZETTERBERG H., (2006). Alzheimer's disease. *Lancet* **368**: 387–403.
- BRUST JC., (2010). Ethanol and Cognition: Indirect Effects, Neurotoxicity and Neuroprotection: A Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **7**: 1540-1557.
- BUTT M.S., PASHA I., SULTAN M.T., RANDHAWA M.A., SAEED F., AHMED W., (2013). Black pepper and health claims: A comprehensive treatise. *Crit Rev Food Sci Nutr*. **53(9)**:875-886.
- BÜYÜKGÜZEL E., AKIN R., (2014). Redoksa Duyarlı Sinyal İletiminde Reaktif Oksijen Türlerinin (ROT) Rolü. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi* **4 (2)**: 70-81.
- CHAI G-S, JIANG X, FEI NI Z, WEI MA Z, XIE A.J, CHENG X-S, WANG Q, WANG J-Z ., LIU G-P.,(2013). Betaine attenuates Alzheimer-like pathological changes and memory deficits induced by homocysteine. *JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY* **124**: 388-396.
- CHEN J-H, LIN K-P, CHEN Y-C.,(2009). Risk Factors for Dementia. *J Formos Med Assoc* **108(10)**:754–764.
- CHO N., LEE HK., JEON BJ., KIM HW., KIM HP., LEE JH., KIM YC., SUNG SH., (2014). The effects of *Betula platyphylla* bark on amyloid beta-induced learning and memory impairment in mice. *Food Chem Toxicol*. Dec;**74**: 156-63.
- CHOI S.S., LEE S.-R., KIM S.U., LEE H.J.,(2014). Alzheimer's Disease and Stem Cell Therapy. *Exp Neurobiol*. **23(1)**:45-52.
- COLLINS M.A., NEAFSEY E.J., MUKAMAL K.J., GRAY M.O., PARKS D.A., DAS D.K., KORTHUIS R.J., (2009). Alcohol in Moderation, Cardioprotection and Neuroprotection: Epidemiological Considerations and Mechanistic Studies. *Alcohol Clin Exp Res*. **33(2)**: 206–219.
- CRISCUOLO C., FABIANI C., BONADONNA C., ORIGLIA N., DOMENICI L., (2015). BDNF prevents amyloid-dependent impairment of LTP in the entorhinal cortex by attenuating p38 MAPK phosphorylation. *Neurobiol Aging*. Mar; **36(3)**:1303-9.

- FARGO K., BLEILER L. (2014). Alzheimer's Association Report 2014 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia* **10** (2014): 47-92.
- FERREIRA D, PERESTELO-PÉREZ L, WESTMAN E, WAHLUND LO, SARRÍA A, SERRANO-AGUILAR P., (2014). Meta-Review of CSF Core Biomarkers in Alzheimer's Disease: The State-of-the-Art after the New Revised Diagnostic Criteria. *Front Aging Neurosci.* **24,6**:47.
- FERRER I., (2012). Defining Alzheimer as a common age-related neurodegenerative process not inevitably leading to dementia. *Progress in Neurobiology* **97**: 38–51.
- FJELL AM., MCEVOY L., HOLLAND D., DALE AM., WALHOVD KB., (2014). What is normal in normal aging? Effects of aging, amyloid and Alzheimer's disease on the cerebral cortex and the hippocampus. *Prog Neurobiol.* **117**: 20-40.
- GALLAGHER, M., BURWELL, R., & BURCHINAL, M. R. (1993). Severity of spatial learning impairment in aging: development of a learning index for performance in the Morris water maze. *Behavioral neuroscience*, **107(4)**: 618-626.
- GHASEMI R., ZARIFKAR A., RASTEGAR K., MAGHSOUDI N., MOOSAVI M., (2014a). Insulin protects against A β -induced spatial memory impairment, hippocampal apoptosis and MAPKs signaling disruption. *Neuropharmacology* **85**: 113–120.
- GHASEMI R., ZARIFKAR A., RASTEGAR K., MAGHSOUDI N., MOOSAVI M., (2014b). Repeated intra-hippocampal injection of beta-amyloid 25–35 induces a reproducible impairment of learning and memory: Considering caspase-3 and MAPKs activity. *European Journal of Pharmacology* **726**: 33–40.
- GREILBERGER J., KOIDL C., GREILBERGER M., LAMPRECHT M., SCHROECKSNADEL K., LEBLHUBER F., FUCHS D., OETTL K., (2008). Malondialdehyde, carbonyl proteins and albumin-disulphide as useful oxidative markers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Free Radic Res. Jul*; **42(7)**:633-8.
- GULYAEVA NV., LAZAREVA NA., LİBE ML., MITROKHINA OS., ONUFRIEV MV., STEPANICHEV MYu., CHERNYSEVSKAYA IA., WALSH TJ., (1996). Oxidative stress in the brain following intraventricular administration of ethylcholine aziridinium (AF64A). *Brain Res. Jul* **8;726(1-2)**:174-80.
- HAN H.K., (2011). The effects of black pepper on the intestinal absorption and hepatic metabolism of drugs. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **7(6)**:721-729.
- HANIN I., (1996). The AF64A Model of cholinergic hypofunction: An Update. *Life Sci.* **58(22)**:1955-1964.

- HIRAMATSU M., YAMATSU T., KAMEYAMA T., NABESHIMA T., (2002). Effects of repeated administration of (-)-nicotine on AF64A-induced learning and memory impairment in rats. *J Neural Transm* **109**: 361–375.
- HOCHGRÄFE K., SYDOW A., MANDELKOW EM.,(2013). Regulatable transgenic mouse models of Alzheimer Disease: Onset, Reversibility and Spreading of Tau pathology. *FEBS J.* **280(18)**: 4371-4381.
- HOLMES C. (2012). Dementia. *Medicine journal*11(2012): 628-631. *J Thromb Thrombolysis.* 2013 Oct; **36(3)**:258-62.
- JAVED H., VAIBHAV K., AHMED ME., KHAN A., TABASSUM R., ISLAM F., SAFHIMM., ISLAMF.,(2015).Effect of hesperidin on neurobehavioral, neuroinflammation, oxidative stress and lipid alteration in intracerebroventricular streptozotocin induced cognitive impairment in mice. *J Neurol Sci.* Jan **15;348(1-2)**:51-9.
- KHACHATURIAN Z.S.,(2007). A chapter in the development of Alzheimer's disease research: A case study of public policies on the development and funding of research programs. *Alzheimer's & Dementia* **3**: 243–258.
- KIDD P.M., (2008). Alzheimer's Disease, Amnesic Mild Cognitive Impairment, and Age-Associated Memory Impairment: Current Understanding and Progress Toward Integrative Prevention. *Alternative Medicine Review* **13(2)**: 85-115.
- KIM D.H., YEO S.H., PARK J.M., CHOI J.Y., LEE T.H., PARK S.Y., OCK M.S., EO J., KIM H.S., CHA H.J., (2014). Genetic markers for diagnosis and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Gene* **545**: 185–193.
- KIM E.K., CHOI E-J., (2010). Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta* **1802**: 396–405.
- KOVACS G.G., ADLE-BIASSETTE H., MILENKOVIC I., IS., SCHEPPINGENJ., ARONICAE., (2014). Linking pathways in the developing and aging brain with neurodegeneration. *Neuroscience Forefront Review* **269**:152–172
- KRUMAN I.I., HENDERSON G.I., BERGESON S.E., (2012). DNA damage and neurotoxicity of chronic alcohol abuse. *Exp Biol Med (Maywood).* **237(7)**: 740–747.
- LAWSON-YUEN A., LEVY H.L., (2006). The use of betaine in the treatment of elevated homocysteine. *Mol Genet Metab.***88**: 201–207.
- LEE DO Y., LEE KS., LEE HJ., JUNG HY., LEE JY., LEE SH., YOUN YC., SEO KM., LEE JH., LEE WB., KIM SS., (2008). Alcohol enhances A β 42-induced neuronal cell death through mitochondrial dysfunction. *FEBS Lett.* Dec **24;582(30)**:4185-90.

- LEE YJ., CHOI DY., HAN SB., KIM YH., KIM KH., HWANG BY., KANG JK., LEE BJ., OH KW., HONG JT., (2012). Inhibitory Effect of Ethanol Extract of *Magnolia officinalis* on Memory Impairment and Amyloidogenesis in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease via Regulating β -Secretase Activity. *Phytother Res.* Dec; **26(12)**:1884-92.
- LEIRÓS M., ALONSO E., RATEB ME., HOUSSEN WE., EBEL R., JASPARS M., ALFONSO A., BOTANA LM., (2015). Gracilins: Spongionella-derived promising compounds for Alzheimer disease. *Neuropharmacology* Jun; **93**: 285-93.
- LEVER M., SLOW S., (2010). The clinical significance of betaine, an osmolyte with a key role in methyl group metabolism. *Clinical Biochemistry* **43**: 732–744.
- LI M.H., TANG J.P., ZHANG P., LI X., WANG C.Y., WEI H.J., YANG X.F., ZOU W., TANG X.Q., (2014). Disturbance of endogenous hydrogen sulfide generation and endoplasmic reticulum stress in hippocampus are involved in homocysteine-induced defect in learning and memory of rats. *Behav Brain Res.* **262**: 35-41.
- LIEBER C.S., (2004a). Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol* **34**: 9–19.
- LIEBER C.S.,(2004b). The Discovery of the Microsomal Ethanol Oxidizing System and Its Physiologic and Pathologic Role. *Drug Metab Rev.* **36(3-4)**: 511-529.
- LIU R., LI JZ., SONG JK., SUN JL., LI YJ., ZHOU SB., ZHANG TT., DU GH., (2014). Pinocembrin Protects Human Brain Microvascular Endothelial Cells against Fibrillar Amyloid- β_{1-40} Injury by Suppressing the MAPK/NF- κ B Inflammatory Pathways. *Biomed Res Int.* ; **2014**: 470393.
- LOY C.T., SCHOFI ELD P.R., TURNER A.M., KWOK J.B.J.,(2014). Genetics of dementia. *Lancet* **383**: 828–840.
- LU Y., CEDERBAUM A.I., (2008). CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free Radical Biology & Medicine* **44(5)**: 723–738.
- MA B., MENG X., WANG J., SUN J., REN X., QIN M., SUN J., SUN G., SUN X., (2014). Notoginsenoside R1 attenuates amyloid- β -induced damage in neurons by inhibiting reactive oxygen species and modulating MAPK activation. *Int Immunopharmacol.* Sep; **22(1)**: 151-9.
- MEDINA M., AVILA J.,(2014). New perspectives on the role of tau in Alzheimer's disease Implications for therapy. *Biochemical Pharmacology* **88**: 540–547.
- MEGHWAL M., GOSWAMI T. K., (2013). Piper nigrum and Piperine: An Update. *Phytother. Res.* **27**: 1121–1130.

- MOGHADAMNIA A.A., ZANGOORI V., ZARGAR-NATTAJ S.S., TAYEBI P., MOGHADAMNIA Y., JORSARAE S.G.A., (2010). Effect of breastfeeding piperine on the learning of offspring mice: interaction with caffeine and diazepam. *Journal of Experimental Pharmacology* **2010:2** 111–120.
- MORLEY J.E., FARR S.A.,(2014). The role of amyloid-beta in the regulation of memory. *Biochemical Pharmacology* **88**: 479–485.
- MOSHER KI., WYSS-CORAY T., (2014). Microglial dysfunction in brain aging and Alzheimer's disease. *Biochemical Pharmacology* **88**: 594–604.
- MUÑOZ G., URRUTIA JC., BURGOS CF., SILVA V., AGUILAR F., SAMA M., YEH HH., OPAZO C., AGUAYO LG., (2015). Low concentrations of ethanol protect against synaptotoxicity induced by A β in hippocampal neurons. *Neurobiol Aging*. Feb; **36(2)**: 845-56.
- MUNOZ L., AMMIT A.J., (2010). Targeting p38 MAPK pathway for the treatment of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* **58(3)**: 561–568.
- NASSIR F., IBDAH J.A., (2014). Role of mitochondria in alcoholic liver disease. *Int J Mol Sci*. **15(5)**: 8713-8742.
- OBEID R., (2013). The Metabolic Burden of Methyl Donor Deficiency with Focus on the Betaine Homocysteine Methyltransferase Pathway. *Nutrients* **5**: 3481-3495.
- OBEID R., HERRMANN W., (2009). Homocysteine and lipids: S-Adenosyl methionine as a key intermediate. *FEBS Letters* **583**: 1215–1225.
- OBULESU M., SOMASHEKHAR R., VENU R.,(2011). Genetics of Alzheimer's Disease: An Insight Into Presenilins and Apolipoprotein E Instigated Neurodegeneration. *International Journal of Neuroscience* **121**: 229–236.
- ONG JY., YONG PV., LIM YM., HO AS., (2015). 2-Methoxy-1,4-naphthoquinone (MNQ) induces apoptosis of A549 lung 2 adenocarcinoma cells via oxidation-triggered JNK and p38 MAPK 3 signaling pathways. *Life Sci*. Apr **18**. pii: **S0024-3205(15)** 00212-00219.
- OVERK C.R., MASLIAH E., (2014). Pathogenesis of synaptic degeneration in Alzheimer's disease and Lewy body disease. *Biochemical Pharmacology* **88**: 508–516.
- PARVATHY S. BUXBAUM J.D., (2002) Molecular Pathology of Alzheimer Disease. *Molecular Genetics Of Alzheimer Disease*. Chapter **83**: 1199-1213.
- PFAFFL, M.W.(2001). A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, **vol 29**, No. 9.

- PIMPLIKAR S.W. (2014) . Neuroinflammation in Alzheimer's disease: from pathogenesis to a therapeutic target. *J Clin Immunol* DOI **10. 1007/ s10875-014-0032-5**.
- PLUTA R, KOCKI J, MACIEJEWSKI R, UŁAMEK-KOZIOŁ M, JABŁOŃSKI M, BOGUĆKA-KOCKA A, CZUCZWAR SJ., (2012). Ischemia signalling to Alzheimer-related genes. *Folia Neuropathol* **50 (4)**: 322-329.
- POIRIER J., MIRON J., PICARD C., GORMLEY P., THÉROUX L., BREITNER J., DEA D., (2014). Apolipoprotein E and lipid homeostasis in the etiology and treatment of sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* **35**: 3–10.
- ROCCA WA, MIELKE MM, VEMURI P, MILLER VM., (2014). Sex and gender differences in the causes of dementia: a narrative review. *Maturitas* **79(2)**: 196-201.
- ROSE M., DUDAS B., CORNELLI U., HANIN I., (2004). Glycosaminoglycan C3 protects against AF64A-induced cholinotoxicity in a dose-dependent and time-dependent manner. *Brain Research* **1015**: 96–102.
- SABOGAL-GUÁQUETA AM., MUÑOZ-MANCO JI., RAMÍREZ-PINEDA JR., LAMPREA-RODRIGUEZ M., OSORIO E., CARDONA-GÓMEZ GP., (2015). The flavonoid quercetin ameliorates Alzheimer's disease pathology and protects cognitive and emotional function in aged triple transgenic Alzheimer's disease model mice. *Neuropharmacology*. Jun; **93**:134-45.
- SCHELLENBERG G.D., MONTINE T. J., (2012). The genetics and neuropathology of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **124**:305–323.
- SCHONROCK N., GOTZ J.,(2012). Decoding the non-coding RNAs in Alzheimer's disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **69**: 3543–3559.
- SELF RL., SMITH KJ., MULHOLLAND PJ., PRENDERGAST MA., (2005). Ethanol Exposure and Withdrawal Sensitizes the Rat Hippocampal CA1 Pyramidal Cell Region to β -Amyloid (25-35)-Induced Cytotoxicity: NMDA Receptor Involvement. *Alcohol Clin Exp Res.* Nov; **29(11)**: 2063-9.
- SERÝ O., POVOVÁ J., MÍŠEK I., PEŠÁK L., JANOUT V.,(2013). Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: a review. *Folia Neuropathol.* **51(1)**:1-9.
- SHI X., ZHENG Z., LI J., XIAO Z., QI W., ZHANG A., WU Q., FANG Y., (2015). Curcumin inhibits A β -induced microglial inflammatory responses in vitro: Involvement of ERK1/2 and p38 signaling pathways. *Neurosci Lett.* May **6;594**:105-10.
- SINGH A., DUGGAL S., (2009). Piperine Review of Advances in Pharmacology. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology.* **2(3)**: 615 – 620.

- SLOW S., LEVER M., CHAMBERS S. T., GEORGE P. M., (2009). Plasma Dependent and Independent Accumulation of Betaine in Male and Female Rat Tissues. *Physiol. Res.* **58**: 403-410.
- SRINIVASAN K., (2007). Black Pepper and its Pungent Principle-Piperine: A Review of Diverse Physiological Effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **47**: **8** 735-748.
- SUWANNA N., THANGNIPON W., SOI-AMPORNKUL R., (2014). Neuroprotective effects of diarylpropionitrile against β -amyloid peptide-induced neurotoxicity in rat cultured cortical neurons. *Neurosci Lett.* Aug **22**; **578**: 44-9.
- TAKATA K., KITAMURA Y., (2012). Molecular Approaches to the Treatment, Prophylaxis, and Diagnosis of Alzheimer's Disease: Tangle Formation, Amyloid- β , and Microglia in Alzheimer's Disease. *J Pharmacol Sci* **118**: 331 – 337.
- THAMBISETTY M., LOVESTONE S.,(2010). Blood-based biomarkers of Alzheimer's disease: challenging but feasible. *Biomark Med.* **4**(1): 65–79.
- UABUNDIT N., WATTANATHORN J., MUCIMAPURA S., INGKANINAN K., (2010). Cognitive enhancement and neuroprotective effects of Bacopa monnieri in Alzheimer's disease model. *J Ethnopharmacol.* Jan **8**; **127**(1): 26-31.
- VARGA J., KLAUSZ B., DOMOKOS Á., KÁLMÁN S., PÁKÁSKI M., SZÚCS S., GARAB D., ZVARA Á., PUSKÁS L., KÁLMÁN J., TÍMÁR J., BAGDY G., ZELENÁ D., (2014). Increase in Alzheimer's related markers precedes memory disturbances: Studies in vasopressin-deficient Brattleboro rat. *Brain Res Bull.* Jan; **100**: 6-13.
- VILLAFLORES O.B., CHEN Y.J., CHEN C.P., YEH J.M., WU TY., (2012) Curcuminoids and resveratrol as anti-Alzheimer agents. *Taiwan J Obstet Gynecol.* **51**(4): 515-525.
- WAKUTANI Y., KOWA H., KUSUMI M., YAMAGATA K., WADA-ISOE K., ADACHI Y., TAKESHIMA T., URAKAMI K., NAKASHIMA K., (2002). Genetic analysis of vascular factors in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* **977**: 232-238.
- WATTANATHORN J., CHONPATHOMPIKUNLERT P., MUCHIMAPURA S., PRIPREM A., TANKAMNERDTHAI O., (2008). Piperine, the potential functional food for mood and cognitive disorders. *Food and Chemical Toxicology* **46**: 3106–3110.
- WISCHIK C.M., HARRINGTON C.R., STOREY J.M.D.,(2014). Tau-aggregation inhibitor therapy for Alzheimer's disease. *Biochemical Pharmacology* **88**: 529–539.

- YAN R., VASSAR R., (2014). Targeting the β secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy. *Lancet Neurol* **13**: 319–329.
- YU L., WANG S., CHEN X., YANG H., LI X., XU Y., ZHU X.,(2015). Orientin alleviates cognitive deficits and oxidative stress in A β 1-42-induced mouse model of Alzheimer's disease. *Life Sci. Jan* **15**;121:104-9.
- ZAKHARI S., (2006). Overview: How Is Alcohol Metabolized by the Body? *Alcohol Res Health.* **29(4)**: 245-254.
- ZAKHARI S., (2013). Alcohol Metabolism and Epigenetics Changes. *Alcohol Res.* **35(1)**: 6-16.
- ZHANG Y., ZHU T., WANG L., PAN Y-H., ZHANG S., (2013) Homocysteine Homeostasis and Betaine-Homocysteine S-Methyltransferase Expression in the Brain of Hibernating Bats. *PLoS ONE* 8(12): e85632. doi:10.1371/journal.pone.0085632.
- ZHU X., LEE H.G., RAINA A.K., PERRY G., SMITH M.A., (2002). The Role of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in Alzheimer's Disease. *Neurosignals.* **11(5)**: 270-281.
- ZIMATKIN S.M., DEITRICH R.A., (1997). Ethanol metabolism in the brain. *Addiction Biology* **2**: 387–399.
- ZOU Z., LIU C., CHE C., HUANG H.,(2014). Clinical Genetics of Alzheimer's Disease. *BioMed Research International* Article ID 291862, 10 pages.

ÖZGEÇMİŞ

BİREYSEL BİLGİLER:

AdSoyad: Ayhan VURMAZ
Doğum Tarihi ve Yeri: 11/09/1979 Çine/AYDIN
Uyruğu: TC
İletişim Adresleri: AKÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD.

EĞİTİM DURUMU:

Üniversite: Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans: Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri
Enstitüsü Tıbbi Biyokimya AD.
Yüksek Lisans Tez Adı: Etanol Verilen Ratlarda Quercetin'in Eritrosit
Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz (G6PD) Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi
Yabancı Dil: İngilizce

Yayınlar: **1** Kubilay Ocalan, Okan Solak, Hidir Esmе, Mehmet Sirmali, Husniye Dilek, Gurhan Oz, Ayhan Vurmaz, Ahmet Karaman (2013). Efficacy of budesonide and interleukin-10 in an experimental rat model with isolated bilateral pulmonary contusion created by blunt thoracic trauma. European Journal of Cardio-Thoracic Surgery(43), 163-167.

2 Yilmaz S, Uyar H, Aktepe F, Akaydin M, Cilekar M, Vurmaz A, Koca B, Kahraman A, Arikan Y. (2012). Laparoscopic preconditioning protects against oxidative injury in cerulein-induced pancreatitis rats (an experimental study). J Laparoendosc Adv Surg Tech A, 22(1), 34-39.

Bildiriler: Kubilay ÖCALAN, Okan SOLAK, Hıdır ESME, Mehmet SIRMALI, Hüsniye DİLEK, Ayhan VURMAZ, Ahmet KAHRAMAN (2011). Künt Toraks Travması ile İzole Bilateral Akciğer Kontüzyonu Oluşturulan Sıçanlarda Budesonit ve İnterlökin 10'un Etkinliğinin Araştırılması. VI. Ulusal Göğüs Cerrahisi Kongresi.