

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
SİNİR BİLİMLERİ ANABİLİM DALI**

**FARE İN VİTRO ALZHEİMER MODELİNDE HİPOKAMPUS
TRPA1, TRPM2 VE TRPV1 KATYON KANALLARI ÜZERİNDE
HOMOSİSTEİN İLE MEMANTİN'İN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

İshak Suat ÖVEY

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim
Birimi tarafından 4420-D2-15 proje numarası ile desteklenmiştir.**

Tez No:

ISPARTA-2017

KABUL ve ONAY SAYFASI

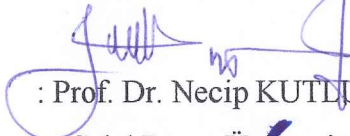
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Sinir Bilimleri Anabilim Dalı Doktora Programı** Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 22/05/2017


Tez Danışmanı : Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU

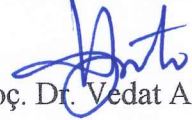
Süleyman Demirel Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Sinir Bilimleri Anabilim Dalı


Üye : Prof. Dr. Necip KUTLU

Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı


Üye : Prof. Dr. Semra ÖZDEMİR

İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı


Üye : Doç. Dr. Vedat Ali YÜREKLİ

Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı


Üye : Doç. Dr. PINAR ASLAN KOŞAR

Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

ONAY: Bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Mustafa KAYAN

Enstitü Müdürü

BEYAN

“Fare *in vitro* Alzheimer Modelinde Hipokampus TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 Katyon Kanalları Üzerinde Homosistein ile Memantin’in Etkilerinin Araştırılması” adlı Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

İshak Suat ÖVEY

İmza

Danışman

Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU

İmza

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasında ve doktora eğitimimde bende emeği büyük olan Anabilim Dalı Başkanımız ve aynı zamanda danışmanım olan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU'na,

Doktora eğitimim ve tez yazım aşaması sırasında desteğini hep hissettiğim Yrd. Doç. Dr. Ömer ÇELİK'e, değerli çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Ahmi ÖZ ve Arş. Gör. Bilal ÇİĞ'e, laboratuvar çalışmaları esnasında benden yardımlarını ve tecrübelerini esirgemeyen Anabilim Dalı personelimiz Muhammet ŞAHİN ve Fatih ŞAHİN'e

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Birimi'ne, Hayatıma girdiği andan itibaren iyi ve kötü günümde varlığını hep hissettiğim biricik eşim'e, hayatıma anlam katan canım oğlum Mehmet Emir'e

Hayata gözlerimi açtığım ilk andan bu tezin sunulduğu güne kadar desteklerini her anımda hissettiğim, haklarını asla ödeyemeyeceğimi düşündüğüm muhterem Annem ve Babam'a minnettarım...

İshak Suat ÖVEY

İÇİNDEKİLER

BEYAN	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
RESİMLER DİZİNİ	xii
GRAFİKLER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Alzheimer Hastalığı (AH)	4
2.2. Transient Receptor Potential (TRP) Kanalları	8
2.2.1. TRPA Kanal Alt Ailesi.....	9
2.2.1.1. TRPA1 Katyon Kanalları.....	10
2.2.2. TRPM Kanal Alt Ailesi	11
2.2.3. TRPM2 Katyon Kanalları.....	12
2.2.4. TRPV Kanal Alt Ailesi.....	13
2.2.3.1. TRPV1 Katyon Kanalları.....	14
2.2.4. TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 Kanallarının AH ile İlişkisi	16
2.2.4.1. TRPA1 Kanalının AH ile İlişkisi.....	16
2.2.4.2. TRPM2 Kanalının AH ile İlişkisi	17
2.2.4.3. TRPV1 Kanalının AH ile İlişkisi.....	18
2.3. Homosistein (Hcy)	20
2.3.1. Hcy Metabolizması.....	22
2.3.1.1. Remetilasyon Yolu	22
2.3.1.2. Transsülfürasyon Yolu.....	23
2.3.2. Hiperhomosisteinemi.....	24
2.3.3. Santral Sinir Sisteminde Homosistein'in Rolü.....	25
2.3.4. Hcy'nin Nörodejeneratif Hastalıklarla ve Yaşlanmayla İlişkisi.....	27
2.3.5. Homosistein ve Glutamat Reseptörleri.....	28
2.3.7. Homosistein ve Oksidatif Stres	29
2.3.8. Homosistein, Tau Proteini ve Amiloid Beta Arasındaki İlişki.....	31

2.4. Memantin (MEM)	33
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	36
3.1. Gereç	36
3.1.1. Kullanılan Alet ve Malzemeler	36
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	37
3.2. Yöntem	39
3.2.1. Kullanılan Deney Hayvanları	39
3.2.2. Gruplar.....	39
3.2.3. Hipokampus Hücrelerinin İzolasyonu	41
3.2.4. Laboratuvar Analizleri.....	43
3.2.4.1. Hücre İçi Ca^{+2} Ölçülmesi.....	43
3.2.4.2. Apoptozis Testi	44
3.2.4.3. Hücre Canlılığı (MTT) Analizi.....	44
3.2.4.4. Kaspaz 3 ve 9 Aktivitesi Analizleri	45
3.2.4.5. Hücre İçi ROT Üretimi Tayini.....	45
3.2.4.6. Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu Analizi	46
3.2.4.7. Western Blot Analizleri	47
3.2.5. Etik Kurul İzni	49
3.2.6. İstatistiksel Analiz	49
4. BULGULAR	50
4.1. Hücre İçi Serbest Ca^{+2} Sonuçları.....	50
4.1.1. TRPA1 Kanalı ve Sitolitik Ca^{+2} İlişkisi	50
4.1.2. TRPM2 Kanalı ve Sitolitik Ca^{+2} İlişkisi	53
4.1.3. TRPV1 Kanalı ve Sitolitik Ca^{+2} İlişkisi.....	56
4.2. Programlı Hücre Ölümü (Apoptozis) Analizi Sonuçları.....	59
4.2.1. TRPA1 Kanalı ve Apoptozis İlişkisi	59
4.2.2. TRPM2 Kanalı ve Apoptozis İlişkisi.....	60
4.2.3. TRPV1 Kanalı ve Apoptozis İlişkisi	61
4.3. Hücre Canlılığı (MTT) Analizi Sonuçları	62
4.3.1. TRPA1 Kanalı ve Hücre Canlılığı İlişkisi	62
4.3.2. TRPM2 Kanalı ve Hücre Canlılığı İlişkisi	63
4.3.3. TRPV1 Kanalı ve Hücre Canlılığı İlişkisi.....	64
4.4. Mitokondriyal Depolarizasyon Analizi Sonuçları.....	65
4.4.1. TRPA1 Kanalı ve Mitokondriyal Depolarizasyon İlişkisi	65

4.4.2. TRPM2 Kanalı ve Mitokondriyal Depolarizasyon İlişkisi.....	66
4.4.3. TRPV1 Kanalı ve Mitokondriyal Depolarizasyon İlişkisi	67
4.5. Hücre İçi ROT Analizi Sonuçları.....	68
4.5.1. TRPA1 Kanalı ve Hücre İçi ROT Üretimi İlişkisi	68
4.5.2. TRPM2 Kanalı ve Hücre İçi ROT Üretimi İlişkisi.....	69
4.5.3. TRPV1 Kanalı ve Hücre İçi ROT Üretimi İlişkisi	70
4.6. Kaspaz 3 Aktivasyon Analizi Sonuçları.....	71
4.6.1. TRPA1 Kanalı ve Kaspaz 3 Aktivasyonu İlişkisi	71
4.6.2. TRPM2 Kanalı ve Kaspaz 3 Aktivasyonu İlişkisi.....	73
4.6.3. TRPV1 Kanalı ve Kaspaz 3 Aktivasyonu İlişkisi	74
4.7. Kaspaz 9 Aktivasyon Analizi Sonuçları.....	75
4.7.1. TRPA1 Kanalı ve Kaspaz 9 Aktivasyonu İlişkisi	75
4.7.2. TRPM2 Kanalı ve Kaspaz 9 Aktivasyonu İlişkisi.....	76
4.7.3. TRPV1 Kanalı ve Kaspaz 9 Aktivasyonu İlişkisi	77
4.8. Western Blot Kanal Ekspresyon Analizi Sonuçları	78
4.8.1. TRPA1 Kanalı Ekspresyon Analizi Sonuçları.....	78
4.8.2. TRPM2 Kanalı Ekspresyon Analizi Sonuçları.....	80
4.8.3. TRPV1 Kanalı Ekspresyon Analizi Sonuçları.....	81
4.9. Grupların Poli-(ADP-Riboz) Polimeraz 1 (PARP1) İfade Düzeyleri	83
4.10. Grupların Aktif Kaspaz 3 ve 9 Aktivasyonu İfade Düzeyleri.....	84
5. TARTIŞMA	86
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	94
ÖZET.....	96
KAYNAKLAR	98
EKLER.....	123
Ek-1. Etik Kurul Kararı	123
BEYAN.....	124
ÖZGEÇMİŞ ve ESERLER LİSTESİ.....	125

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ACA	: Anthranilic acid
ADP-Riboz	: Adenozin difosfat riboz
AKG	: Arka kök gangliyonu
AMP	: Adenozin monofosfat
Apo E	: Apolipoprotein E
Apo E4	: Apolipoprotein E4
APP	: Amiloid prekürsor protein
Aβ	: Amiloid beta
AβP	: Amiloid beta plakları
2-APB	: 2- aminoethoxydiphenyl borate
ATP	: Adenozin trifosfat
BACE 1	: Beta-secretase 1
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
Ca⁺²	: Kalsiyum iyonu
[Ca⁺²]_i	: Hücre içi kalsiyum konsantrasyonu
CAP	: Kapsaisin
CBS	: Sistasyonin β sentaz
CPZ	: Kapsazepin
CPx	: Kümen hidroperoksid
DMSO	: Dimethyl sulphoxide
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
Kaspaz	: Cysteine-dependent aspartate-directed protease
NMDA	: N-Methyl D-Aspartat
NFY	: Nörofibriler yumaklar

PARP	: Poli-adenozin difosfat riboz-polimeraz
PARP1	: Poli-adenozin difosfat riboz-polimeraz 1
PP2A	: Protein fosfataz-2A
PS 1	: Presenilin 1
ROT	: Reaktif oksijen türleri
SAH	: S-adenozil homosistein
SAM	: S-adenozil metiyonin
SIN	: Sinamaldehyd
TRP	: <i>Transient Receptor Potential</i>
TRPA	: <i>Transient Receptor Potential Ankyrin (Ankrin)</i>
TRPA1	: <i>Transient Receptor Potential Ankyrin (Ankrin) 1</i>
TRPC	: <i>Transient Receptor Potential Canonical</i>
TRPM	: <i>Transient Receptor Potential Melastatin</i>
TRPM2	: <i>Transient Receptor Potential Melastatin 2</i>
TRPML	: <i>Transient Receptor Potential Mucolipin</i>
TRPP	: <i>Transient Receptor Potential Polycystin</i>
TRPV	: <i>Transient Receptor Potential Vanilloid</i>
TRPV1	: <i>Transient Receptor Potential Vanilloid</i>

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Total plazma Hcy bileşenleri ve yüzdeleri.....	21
Tablo 2. Total plazma Hcy dağılımı.....	21
Tablo 3. Hiperhomosisteinemi değerleri	21



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Memelilerde bulunan TRP kanal alt aileleri.....	8
Şekil 2. TRPA1 kanal uyarıcıları.....	10
Şekil 3. TRPM familyasının filogenisi.....	12
Şekil 4. TRPV familyası üyelerinin fonksiyonel polipeptid birimleri.....	14
Şekil 5. TRPV1 kanalı aktivasyonu.....	15
Şekil 6. Hcy'nin oksitlenerek homosistine dönüşmesi.....	20
Şekil 7. Hcy metabolizması.....	22
Şekil 8. Hcy ve MEM'in TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 kanalları üzerinde muhtemel etki yolları.....	35



RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Çalışmada kullanılan Swis Mouse ırkı fare.....	39
Resim 2. Hipokampus hücre izolasyon aşaması - 1	41
Resim 3. Hipokampus hücre izolasyon aşaması - 2	42
Resim 4. Hipokampus hücre izolasyon aşaması – 3.....	42
Resim 5. Kalsiyum sinyali analizlerinin yapıldığı spektrofloreometre cihazı	44
Resim 6. Floresans ve spektrofotometrik analizlerin yapıldığı kuyucuk okuyucu (plate reader) cihazı.....	47
Resim 7. Western Blot analizi için kullanılan ekipmanlar	48
Resim 8. Jel görüntüleme cihazı.....	48



GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. Hipokampal hücrelerdeki SIN (0.1 mM) ile uyarılan TRPA1 kanallarının aktivasyonunun sitozolik Ca^{+2} miktarındaki değişim üzerine etkisi.....	50
Grafik 2. TRPA1 kanalı aracılığıyla sitozolik Ca^{+2} artışının kontrole kıyasla gösterimi.....	78
Grafik 3. Hipokampal hücrelerdeki CPx (0.1 mM) ile uyarılan TRPM2 kanallarının aktivasyonunun sitozolik Ca^{+2} miktarındaki değişim üzerine etkisi.....	53
Grafik 4. TRPM2 kanalı aracılığıyla sitozolik Ca^{+2} artışının kontrole kıyasla gösterimi.....	54
Grafik 5. Hipokampal hücrelerdeki CAP (0.1 mM) ile uyarılan TRPV1 kanallarının aktivasyonunun sitozolik Ca^{+2} miktarındaki değişim üzerine etkisi.....	56
Grafik 6. TRPV1 kanalı aracılığıyla sitozolik Ca^{+2} artışının kontrole kıyasla gösterimi.....	57
Grafik 7. TRPA1 kanalı ve apoptozis ilişkisi.	59
Grafik 8. TRPM2 kanalı ve apoptozis ilişkisi.	60
Grafik 9. TRPV1 kanalı ve apoptozis ilişkisi.	61
Grafik 10. TRPA1 kanalı ve hücre canlılığı (MTT) ilişkisi.....	62
Grafik 11. TRPM2 kanalı ve hücre canlılığı (MTT) ilişkisi.	63
Grafik 12. TRPV1 kanalı ve hücre canlılığı (MTT) ilişkisi.....	64
Grafik 13. TRPA1 kanalı ve mitokondriyal depolarizasyon ilişkisi.	65
Grafik 14. TRPM2 kanalı ve mitokondriyal depolarizasyon ilişkisi.	66
Grafik 15. TRPV1 kanalı ve mitokondriyal depolarizasyon ilişkisi.	67
Grafik 16. TRPA1 kanalı ve hücre içi ROT üretimi ilişkisi.	68
Grafik 17. TRPM2 kanalı ve hücre içi ROT üretimi ilişkisi.....	69
Grafik 18. TRPV1 kanalı ve hücre içi ROT üretimi ilişkisi.	70
Grafik 19. TRPA1 kanalı ve kaspaz 3 aktivitesi ilişkisi.	71
Grafik 20. TRPM2 kanalı ve kaspaz 3 aktivitesi ilişkisi.....	73
Grafik 21. TRPV1 kanalı ve kaspaz 3 aktivitesi ilişkisi.	74
Grafik 22. TRPA1 kanalı ve kaspaz 9 aktivitesi ilişkisi.	75
Grafik 23. TRPM2 kanalı ve kaspaz 9 aktivitesi ilişkisi.....	76
Grafik 24. TRPV1 kanalı ve kaspaz 9 aktivitesi ilişkisi.	77
Grafik 25. Gruplararası TRPA1 kanalı ekspresyon düzeyleri.	78
Grafik 26. Gruplararası TRPM2 kanalı ekspresyon düzeyleri.....	80
Grafik 27. Gruplararası TRPV1 kanalı ekspresyon düzeyleri.	81
Grafik 28. PARP1 aktivitesinin gruplara göre gösterimi.....	83
Grafik 29. Aktif kaspaz 3 ve 9 aktivitesinin gruplara göre gösterimi.....	84

1. GİRİŞ

Alzheimer Hastalığı (AH) özellikle 65 yaş ve üzerindeki toplum bireylerinde %80'lik bir görülme sıklığıyla seyreden, büyük oranda hafıza kaybı ile sonuçlanan bir demans tipidir. Bilişsel bozuklukların yanı sıra, davranış bozukluğu belirtileriyle de kendisini gösteren AH, Alman Nörolog Alois Alzheimer tarafından ilk kez 1907 yılında tanımlanmıştır. Türkiye Alzheimer Derneği'nin 2015 yılı verilerine göre; ülkemizde 400 binin üzerinde AH'ye yakalanan birey olduğu tahmin edilirken bu sayının dünya geneline bakıldığında ise 46,8 milyon civarında olduğu bildirilmiştir (1, 2).

AH patogenezinde temel olarak ekstraselüler matrikste biriken amiloid beta (A β) plakları ve nörofibriler yumaklar (NFY) görülmektedir. AH'de oluşan nörodejenerasyonun temel nedenlerinden birinin A β peptitlerinin olduğu düşünülmektedir. Yapılan çeşitli çalışmalar ve bilimsel veriler A β 'nin hücre membranının yapısını bozduğu ve membran üzerinde yerleşimli iyon kanallarının düzenli çalışmalarını da etkilediği görülmektedir (3).

AH'de ekstrasellüler aralıkta biriken A β plakların, öncelikle hücre zarında yapısal hasar oluşturarak hücre membranı permeabilitesinin bozulmasına sebep olduğu ileri sürülmektedir. Permeabilitenin bozulması ekstrasellüler aralıktan hücre içine yüksek miktarda kalsiyum iyonu (Ca⁺²) girişine ve dolayısıyla hücre içindeki oksidatif stres ürünlerinin artışına öncülük etmektedir (4).

Transient Receptor Potential (TRP) kanal alt ailelerinin üyelerinden olan TRP Ankiyren 1 (TRPA1), TRP Melastatin 2 (TRPM2) ve TRP Vanilloid 1 (TRPV1), hücresel oksidatif hasar düzeyinin artışıyla aktive olabilen ve ekstrasellüler aralıktan hücre içine Ca⁺² girişine aracılık eden hücre zarına gömülü halde bulunan protein yapılı katyon kanallarıdır. A β plakların sebep olduğu oksidatif stres, bu kanalların aktive olmasına neden olarak hücre içine daha fazla miktarda Ca⁺² girişini tetiklemekte ve hücresel oksidatif stres ürünlerinin daha da fazla artmasına sebep olduğu bildirilmiştir (4). TRP iyon kanallarının hastalık durumlarında ekspresyonlarında artma veya azalma olduğu bildirilmiştir (5, 6). TRP kanallarının ekspresyonlarındaki bu artış veya azalış, nörolojik hastalıklar veya kanser gibi hastalıkların teşhisinde bilim dünyasına ışık tutabilecek niteliktedir ancak bu konuda yeterince detaylı çalışma

yapılmamıştır. AH gibi tedavisi tam olarak mümkün olmayan nörodejeneratif hastalıkların teşhisinde veya tedavisinde de iyon kanalı ekspresyonları önemli bir potansiyele sahip olabilecek niteliktedir.

Homosistein (Hcy), nöronların oksidatif strese karşı hassasiyetlerini kayda değer bir şekilde artırıcı özelliğe sahip uyarıcı bir aminoasittir (7). Hcy'nin konsantrasyonundaki artışın oksidatif stresi tetiklediği bildirilmiştir (7). Oksidatif stres düzeyindeki artış da protein fosfataz-2A (PP2A)'nın inhibisyonuna ve matriks metalloproteinazın ise aktivasyonuna öncülük ederek AH patogenezine yol açan A β plak formasyonunu tetikleyen reaksiyonlar zincirini başlatmaktadır (8). Hcy'nin indüklediği oksidatif strese bağlı olarak hipokampal hücrelerde TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 kanallarının aktive olabileceği ve bu kanallar aracılığı ile de hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun ve apoptozis düzeyinin artabileceği bildirilmiştir (9).

Günümüzde AH'nin tedavisinde kullanılan yeni nesil moleküllerden biri de NMDA reseptör anatagonistlerinden olan memantindir. Memantin, N-Methyl D-Aspartat (NMDA) kanal inhibitörü olarak görev yaptığından, asetilkolin esteraz inhibisyonu için kullanılan diğer ilaçlar gibi AH tedavisi için yaygın kullanımı söz konusudur (10). Memantin AH tedavisinde tek başına etkili bir ajan olarak yaygın bir şekilde kullanılsa da, memantin yalnız veya Hcy ile birlikte kullanımının TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 kanallarının fonksiyonu ve ekspresyonu üzerine etkilerini ortaya koyan bir çalışma henüz literatürde mevcut değildir.

TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 katyon kanallarının ortak özelliği oksidatif stres ile aktive olabilmeleridir (9). Memantin sahip olduğu antioksidan etkisi ile TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 aracılı sitozole Ca⁺² girişini de düzenleyebilir. Sitozole Ca⁺² akışının artışı, nörolojik hastalıkları tetiklediği, mitokondriyal depolarizasyon yolu ile oksidatif stres ürünlerini artırdığı, cysteine-dependent aspartate-directed protease (kaspaz) aktivasyonları ile de apoptozis oluşumuna neden olduğu çok iyi bilinmektedir (9). Fakat ortaya çıkan bu durumun TRPA1, TRPV1 ve TRPM2 kanal aracılı meydana gelip gelmediği veya bu kanalların da bir katkısının olup olmadığının bilinmesi AH patogenezinde Ca⁺² ile ilişkili mekanizmaların aydınlatılması açısından oldukça önemlidir ve tedavi seçeneklerine yeni katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

Memantin, glutamat nörotransmitterinin iyonotropik NMDA reseptörü için inhibitör etkiye sahip olması dolayısı ile sitozolde biriken Ca^{+2} konsantrasyonunu engelleyerek oksidatif stresi ve eksitotoksisiteyi azalttığı, AH tedavisi için terapötik bir ajan olarak tercih edilmektedir (10). Memantin TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 kanal aktivasyonunun düzenlenmesinde bir rolü olabileceği düşünülmektedir. Ancak memantin oksidatif stresle aktive olabilen bu kanallar üzerindeki etkisi bilinmediği için mevcut tez çalışmasında memantin anılan katyon kanalları üzerine potansiyel inhibitör/aktivatör yöndeki etkileri araştırılmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı (AH)

Dünya Alzheimer raporu 2015 (World Alzheimer report 2015) verilerine göre dünya çapında tahmini 46,8 milyon demans hastası bulunmaktadır (11). Tüm demansların %60 ile %80'ini AH oluşturmaktadır (12). Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2015 raporuna göre, 60 yaş üzerinde tahmini AH prevalansı %11,2'dir, Türkiye'de ise bu oran %11 ile batılı ülkeler düzeyinde saptanmıştır (12). Yüksek prevalans oranı AH'yi ciddi bir halk sağlığı problemi yapmakta ve araştırmalarda öncelikli bir konuma taşımaktadır (13). AH genel olarak 60'lı yaşlar sonrasında görülen bir hastalık olarak değerlendirilse de günümüzde var olan çevresel faktörler ve beslenme koşulları gibi etmenler neticesinde 45 yaş civarı gibi daha erken yaşlarda da görülebilmektedir.

AH, ilk kez Alman nöropatolog ve psikiyatrist Alois Alzheimer tarafından 1906 yılında tanımlanmıştır (14). Nörodejeneratif bir hastalık türü olan AH, demansın görülen en sık nedeni olarak bilinmektedir (15). AH'nin temel olarak beynin algılama fonksiyonları üzerine olumsuz etkileri neticesinde unutkanlık ve konuşma bozukluklarının meydana geldiği bilinmektedir. AH'nin bir sinir sistemi hastalığı olması itibarı ile yapılan histopatolojik analizlerde hücre ölümü, sinaps kaybı (kolinerjik aktivitede zayıflama), nörofibriler yumakların (NFY) ve amiloid plakların mevcudiyetindeki artış ile karakterize bir hastalık tablosu görülmektedir (16). Bu hastalıkta, NFY ve AP'nin sinir hücrelerinin ölümleri tam olarak başlamadan önce ve bellek kaybı ile bunama belirtileri belirgin hale gelmeden önce oluşmaya başladığı düşünülmektedir (17).

Ayrıca AH'de; beyin hücrelerinde meydana gelen haraplanmanın etiyolojisi henüz tam olarak aydınlatılmamış olsa da hastalığın ortaya çıkmasındaki temel etkenlerin genetik faktörler, anormal proteinler, otoimmün reaksiyonlar, toksik reaksiyonlar, kafa travmaları ve virüsler olduğu düşünülmektedir (18). Bu arada hastalığın oluşumuna yol açan diğer etkenler arasında esansiyel elementlerin ve serebral kan damarlarının rolü olabileceği de varsayılmaktadır (19).

Ailesinde AH olan bir kişi, bu riski taşımayanlara kıyasla 2 kat daha fazla AH'ye yakalanma riski ile karşı karşıyadır. Bu genetik geçiş %1 düzeyinde kalmaktadır ve temel olarak bu geçişin apolipoprotein E4 (Apo E4) alleli taşıyıcılığı, presenilin-1, presenilin-2, ve amiloid prekürsor protein (APP) genlerindeki mutasyonlara bağlı olduğu düşünülmektedir (20, 21). Orta ve ileri yaşlarda kalp damar rahatsızlıklarına neden olan kolesterolün, taşınmasında görevli bir protein olan Apo E alleli normalde %16 pozitif iken, AH bireylerde bu oranın %35-50 dolaylarında pozitif olduğu saptanmıştır (22). Dolayısıyla bu proteini taşıyanların bir kısmının hastalığa yatkın olduğu söylenebilir (22).

Her ne kadar hastalığın oluşum nedenleri arasında genetik faktörler sayılmış olsa da hastalığın oluşmasında 'genetik faktör' etkeninin diğer etkenlerden daha sınırlı ve düşük bir potansiyele sahip olduğu görülmektedir (20, 22).

AH'nin oluşum sürecinde genetik veya özellikle yaş ve  vresel faktörlerin değişkenliğine bağlı olarak hastalık patolojisinde NFY ve senil plaklar rol oynamaktadır (20). Bu hastalığın meydana gelmesindeki en önemli faktör Aβ denilen plakların oluşması ve hücrelerarası boşlukta birikmesidir (20). Aβ plakları, bir transmembran protein olan APP'in metabolize edilmesi sonucu meydana gelir. AH'de oluşan Aβ'nin kümeler halinde  okmesi sonucu SP adı verilen oluşumlar meydana gelir. Bu plaklar toksik etkileri olmayan ve nöronlarda inflamasyona neden olmayan bir yapıya sahiptirler (23). Ancak ortamda oluşan oksidatif stres, mikroglyal aktivasyon gibi nedenler ile birlikte sert yapılı bir plak yapısına dönüştüklerinden nörotoksik etkiye sahip zararlı bir oluşum halini almaktadırlar (23). Dejenere olmuş akson ve dentrit parçaları ile  z n r olmayan fibriler Aβ yapılar ile NFY birlikte nöritik plakları oluşurmaktadır (24). Bireylerin yaşlarının ilerlemesiyle birlikte özellikle yaşlılık evresinde diffüz (senil) plaklar normal olarak da görülürken, AH bulunan bireylerin beyinlerinde ise nöritik plaklar daha çok yerleşim yeri olarak neokortekste görülmektedir (24).

AH tanısı konulan kişilerden alınan histopatolojik kesitlerde görülen NFY'ler, aşırı şekilde hiperfosforile olmuş tau proteinlerinin çift sarmallı filamanlar halinde hücre içerisine  okmeleri sonucunda oluşmaktadır (25). Bu NFY'ler ilk etapta limbik alanda belirirken hastalığın ilerleyişine bağlı olarak assosiasyon korteksinde

görülmektedir (26). AH nöropatolojisinde tespit edilen diğer nedenler sinir hücresi ölümleri ve buna bağlı gelişen sinaps kayıpları, doğal akson ve dentrit yapılarındaki morfolojik değişiklikler ile mevcut nörotransmitter sistemlerin ve kortikal kolinerjik uyarımların işlevselliğindeki kayıplardır (25, 26). Hasta bireyde demans tablosu ortaya çıkmadan önceki evre olarak tabir edilen prelinik evrede görülen patofizyolojik belirtilerin, hastalığın teşhisi ve önlenmesinde ciddi bir öneme sahip olduğu bilinmektedir. Teşhis sürecinde ise en son 2011 yılında Dünya Alzheimer Derneği AH'yi; Prelinik evre, AH kaynaklı hafif kognitif bozukluk evresi ve AH kaynaklı demans evresi olarak 3 evrede tanımlamıştır (27, 28).

Beynin manyetik rezonans (MR) tekniği ile görüntülenmesinde genel yapısında bir küçülme daha çok hastalığın ilerleyen aşamalarında görülürken, oluşan NFY'ler aracılığıyla ilk olarak temperomedial bölgedeki harabiyete bağlı olarak yakın bellek bozukluğu hastalığın başlangıcı sonrası evrelerde görülmeye başlanmaktadır (26, 29).

Klinik tanı olarak AH'yi bulguların şiddetine bağlı olarak 3 evrede incelemek doğru olacaktır. Bu evreler erken, orta ve ileri evrelerdir.

1- EVRE I (ERKEN): Amnestik dönem (bellek ve konuşma bozukluğu):

Erken evrede semptomatik olarak görülen olgu; öğrenilecek yeni bir bilginin öğrenilmesinde zorluk ve bellek bozukluğu ile karakterizedir. Ağızdan çıkan kelime veya cümlelerin tekrarı, herhangi bir yere bırakılan anahtar veya kumanda gibi objelerin yerlerinin karıştırılması, hastalık öncesi ismini iyi bildiği kişilerin isimlerinin unutulması gibi belirtiler görülmektedir.

2- EVRE II (ORTA): Demans dönemi (entelektüel bozulma):

Orta evrede ise yeni bilgi öğrenimi tamamen durmuş, hastalığın başlangıç evresindeki belirtiler ilerlemiş ve kısmen günlük yaşamsal faaliyetlerde kayıp söz konusudur. Kişi yardıma ihtiyaç duymaktadır.

3- EVRE III (İLERİ): Vejetatif dönem (bakım gereksinimi):

İleri evrede ise; günlük yaşamsal faaliyetler yani beslenme, giyinme vs. dışa bağımlı olarak ikinci bir kişinin yardımıyla gerçekleştirilebilmektedir. Hasta yatar pozisyonda yaşamak durumundadır ve bu yüzden yatak yarası enfeksiyonları, üriner sistem enfeksiyonu, solunum sistemi hastalıkları veya emboli ve beslenme bozukluklarına bağlı gelişen

komplasyonlar genel olarak ölüm nedenlerini oluşturmaktadır. Bu evrede zihinsel işlevler en alt seviyede seyretmektedir (30).

Tercih edilen medikal tedavi prensipleri; semptomlara göre değişiklik göstermektedir. Alzheimer hastalığındaki tedavi yaklaşımları şunlardır;

- 1) APP ekspresyonunu inhibe etmek
- 2) A β proteinlerin üretimini inhibe etmek
 - a. α -sekretaz aktivasyonu
 - b. β -sekretaz inhibisyonu
 - c. γ -sekretaz modülasyonu
- 3) Amiloid fibril formlarının inhibisyonu
- 4) A β fibrillerin toksisitesinin inhibisyonu.
- 5) Asetil kolin esteraz inhibitörleri
- 6) NMDA reseptör antagonistleri (örn: memantin)
- 7) Non-steroidal antienflamatuvar ilaçlar (NSAİİ)
- 8) Kolesterol azaltıcı ilaçlar
- 9) Östrojenler
- 10) Antioksidanlar
- 11) Antifibrilizasyon ajanları (proteoglikanlar)

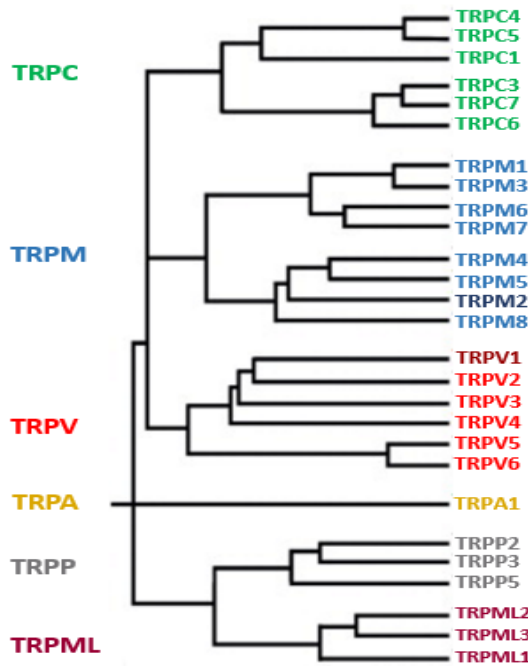
12) Tau proteinlerinin hiperfosforilasyonunun önlenmesi: Lityum tedavisi tau proteinlerinin fosforilasyonu ile NFY oluşumu için kritik öneme sahiptir ve glikojen sentaz kinaz 3 beta (GSK 3 β) gibi hücre içi kinazlara bağlıdır. Bu mekanizmayı lityum ve valproik asit inhibe etmektedir. Lityumun hücre kültüründe ve transgenik farelerde GSK 3 β 'yı inhibe ederek tau proteinlerinin hiperfosforilasyonunu azaltabileceği gösterilmiştir.

- 13) Metal şelatörleri

14) Sinir büyüme faktörü gen terapisi (CERE-110): Eksojen NGF uygulaması sıçanlarda eksitoksik neokorteks lezyon sonrası bazal çekirdekte nöron kaybını azalttığı ve atrofiyi düzelttiği gösterilmiştir (30).

2.2. Transient Receptor Potential (TRP) Kanalları

TRP kanalları, ilk olarak *Drosophila* cinsi meyve sineklerinin fotoreseptör hücrelerinde varlığı tespit edilen, genel olarak Ca^{+2} geçirgen transmembran iyon kanallarıdır (31). Hücre dışı sıvı, hücre içine oranla yaklaşık 20.000 kat daha fazla oranda Ca^{+2} ihtiva ettiği göz önüne alınca, sitozoldeki Ca^{+2} konsantrasyonunun değişimine bağlı olarak açılıp kapanan bu kanallardan iyon geçişinin hücrenin yaşamsal fonksiyonlarını yerine getirmesinde büyük önem arz ettiği düşünülmektedir. TRP iyon kanal üst ailesi memelilerde, kendi içerisinde spesifik bağlanma bölgelerine göre toplamda 29 alt tip ihtiva eden, altı alt aileye ayrılır (32). Bunlar; Ankyrin (TRPA), Vanilloid (TRPV), Canonical (TRPC), Melastatin (TRPM), Polycystin (TRPP), Mucolipin (TRPML)'dir.



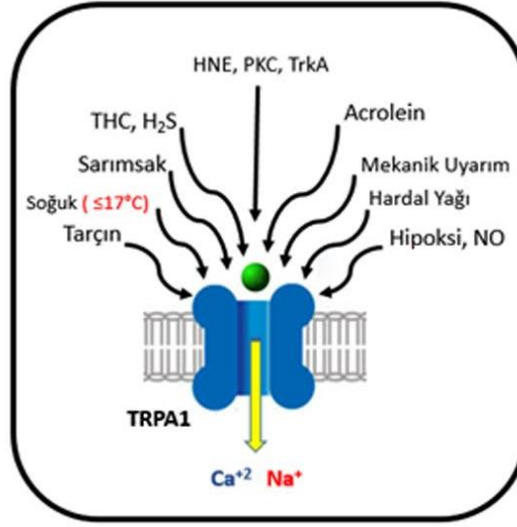
Şekil 1. Memelilerde bulunan TRP kanal alt aileleri

Her bir alt aile spesifik tanımlayıcı bölgelerine göre belirlenmiş alt birimlere ayrılır ve her alt birim kendi içinde değişik sayıda kanal alt tiplerine sahiptir ve bunlar aynı zamanda anılan alt ailelerinin üyeleridirler. TRPA alt ailesinin bir, TRPV alt

ailesinin altı, TRPC alt ailesinin yedi, TRPM alt ailesinin sekiz, TRPP alt ailesinin dört ve TRPML alt ailesinin şimdiye kadar keşfedilen üç alt birimi veya üyesi mevcuttur (31). Son yıllarda yapılan çalışmalarla TRP iyon kanallarının; apoptozis (33), kanser (34), diyabet (35) gibi hastalıkların yanı sıra; AH (36) ve migren (37) gibi nörolojik rahatsızlıklarla bağlantısı olabileceği bildirilmiştir.

2.2.1. TRPA Kanal Alt Ailesi

Memelilerde TRPA Kanalları TRP kanal üst ailesinin tek fertli olan bir kanal alt tipidir. TRPA kanal alt ailesi de yalnızca TRPA1 olmak üzere bir üyeden oluşmaktadır (38). 14 adet N-terminal ankrin tekrarı içeren TRPA1'in mekanik ve kimyasal stres sensörü gibi işlev gördüğü bilinmektedir (38). Beyin korteksi (39) ve hipokampus (39) başta olmak üzere, trigeminal gangliyon (40) ve arka kök gangliyon (AKG) hücrelerinde (41), akciğer dokusunda (42), saç tellerinde (43) ve diğer farklı birçok hücre grubunda var olduğu bilinmekte, bulunduğu doku organa göre de ekspresyonunda değişiklik görülmektedir (44). TRPA1 kanalları, 25°C sıcaklıkta aktive olabilen TRPM8 kanallarından da daha düşük derecelerde (17°C ve altındaki ısılarda) aktif hale gelebilirler (45). Ayrıca TRPA1 kanalları, oksijen azlığında (<15%), ortamda NO birikimi, H₂S, sarımsak, hardal yağı, tarçın özütü olan sinamaldehyd (SIN), mekanik uyarım, hint keneviri, hidroksinonenal (HNE), protein kinaz C (PKC), tropomiyozin reseptör kinaz A (TrkA), akrolein gibi ajanlarla aktive edilirler. Ayrıca, isothiocyanate gibi sistein içeren yapılar veya metil salisilat gibi sentetik bileşikler de TRPA1 kanalı aktivasyonuna neden olabilmektedir (46-48). Oksidatif strese bağlı olarak gelişen mitokondriyal ROT ve sigara, egzost gazı gibi (hipoksi, CO) çevresel iritanlarla da aktif hale gelebilmektedir (49).



Şekil 2. TRPA1 kanal uyarıcıları

2.2.1.1. TRPA1 Katyon Kanalları

Transient Receptor Potential Kanalları (TRP)'nin nörolojik hastalıkların zeminini hazırlama konusundaki önemi, gün geçtikçe daha iyi anlaşılmaktadır. TRP kanalları kendi familyası içerisinde veya farklı gruptaki bazı TRP kanalları ile birlikte aynı etki (ROT, pH, mekanik uyarım vs.) neticesinde stimüle edilmektedir (50, 51). Genel olarak insan vücudundaki hücelere o organın çalışma fonksiyonuna uygun TRP kanalları lokalize olmuştur (52, 53). Özellik ve lokalizasyon bakımından geniş bir alana sahip olan TRP Ankrin-1 (TRPA1) kanalının stimülasyonunda da soğuk (<math>< 17^{\circ}\text{C}</math>), inflamatuvar etkiler, pH, oksidatif stres, hardal yağı, O_2 , CO_2 ve bazı iyonlar (Ca^{+2} , Zn^{+}) gibi birçok etken yer almaktadır (46-48). Ankrin familyasının tek üyesi olan TRPA1 kanalı özellikle sinir hücreleri başta olmak üzere akciğerlerde, beyinde, deride ve daha birçok organda bulunmakta, bulunduğu organda da ilgili etkene göre aktif hale gelerek (açılarak) kalsiyum iyonlarının yanı sıra sodyum ve potasyum iyonlarının hücre dışı ortamdaki hücre içi ortama geçişlerine de olanak sağlamaktadır (54, 55). Bir örnekle açıklamak gerekirse deri üzerinde lokalize olmuş TRPA1 kanalları yaralanma sonrası inflamatuvar etkilerle aktif hale gelip ağrı mekanizmasında rol alırken, akciğerlerde lokalize olmuş TRPA1 kanalları da O_2 , CO_2 azlığı veya çokluğuna göre ya da nefes alıp verme esnasında mekanik olarak uyarılmaktadır (55, 56).

TRPA1 kanalları gibi diğer TRP kanalları üzerine yapılan çalışmalar her geçen gün artmakta ve bünyelerinde barındırdıkları gizemli sıklarda gelişen teknoloji ile birlikte ortaya çıkarılmaya çalışılmaktadır.

2.2.2. TRPM Kanal Alt Ailesi

Bu ailenin ilk keşfedilen üyesi TRPM1 kanallarıdır ve ilk kez melanoma hücrelerinde belirlenmiştir. Bu nedenle bu aileye mensup üyeler melanoma kelimesinin baş harfi olan 'M' harfi ile ifade edilmektedir (57, 58).

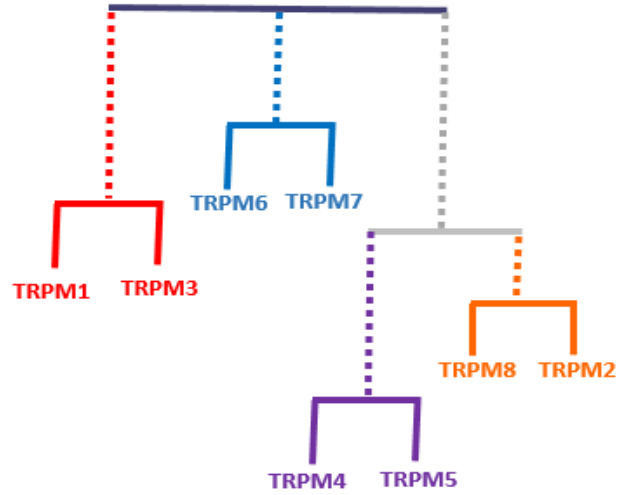
TRPM alt ailesi sekiz alt tip içerir ve dört gruba ayrılır. Bu gruplar, kanalları oluşturan aminoasit dizi benzerlikleri esasına dayanarak oluşturulmuştur

1. Grup; TRPM1 ve TRPM3'ten oluşur. TRPM1'i aktive eden bilinmemekle beraber, TRPM3'ün ise steroidlerden pregnenolon sülfat ve Ca^{+2} ile aktive olduğu bildirilmiştir (57).

2. Grup; TRPM6 ve TRPM7'den oluşur. TRPM6 ve TRPM7'nin karboksit terminalinde yerleşik kinaz aktivite bölgesindeki serin/treonin kalıntılarından ATP harcanarak aktive edildiği vurgulanmıştır (58).

3. Grup; TRPM4 ve TRPM5'ten oluşur. TRPM4 ve TRPM5'in Ca^{+2} geçirgen olmadığı fakat aktivasyonlarının $[Ca^{+2}]_i$ ile düzenlendiğinden söz edilmiştir (59).

4. Grup; TRPM2 ve TRPM8'den oluşur. TRPM2'nin karboksit terminaline yerleşik NUDT9-H bölgesinin ADP-Riboz pirofosfataz aktivitesiyle ADP-Riboz ve deneysel ROT (H_2O_2) ile aktive olduğu; TRPM8'in ise mentol ve düşük sıcaklıklarda aktive olduğu kanıtlanmıştır (60, 61).



Şekil 3. TRPM familyasının filogenisi

2.2.3. TRPM2 Katyon Kanalları

TRPM2, TRPM ailesinin ikinci üyesi olarak tanımlanmıştır (62, 63). TRPM2 katyon kanallarında tıpkı voltaja duyarlı sodyum kanallarında olduğu gibi 6 transmembran segment bulunmaktadır ve iyon akışı 5. ve 6. segmentler arasındaki pordan gerçekleşmektedir (64). Kanalin amino ve karboksi uçları sitozole bakar. TRPM2'nin karboksi ucuna 'nudix domain' (NUDT9-H bölgesi) denilmektedir. Bu uç ADP-Riboz pirofosfataz enzimi aktivitesine sahiptir. Bu sayede kanalın karboksi ucuyla ADP-Riboz'un etkileşimi esnasında, ADP-Riboz'dan adenozin monofosfat ve Riboz 5-fosfat oluşumu katalizlenir ve kanal aktivasyonu gerçekleşir (65). Bu reaksiyon sonucu biriken adenozin mono fosfat (AMP)'ın negatif geribildirim mekanizmasıyla çalışarak kanalın inaktivasyonundan sorumlu olduğu düşünülmektedir (66).

TRPM2, kalsiyuma geçirgen non-selektif katyon kanallarıdır. TRPM2 kanallarının varlığı başta beyin ve kemik iliği olmak üzere böbrek, bağırsak, karaciğer, akciğer, testis, prostat, pankreas, iskelet kası, lökositler ve AKG gibi birçok doku ve hücrede tespit edilmiştir. Bu kanallar sodyum ve potasyuma geçirgen olmakla beraber esasında hücreye kalsiyumun girişinde çok önemli rol oynarlar (33). TRPM2 kanallarının şekil 3'de gösterildiği gibi 4 alt tipi bulunmaktadır. Hücre içi serbest Ca^{+2} düzeyi (80-100 nM) hücre dışına kıyasla 20.000 misli daha azdır. Metabolizma sonucu üretilen H_2O_2 hücre içerisine girerek TRPM kanalını aktive etmesiyle hücre içerisine

Ca⁺² iyonu girişini artırdığı bilinmektedir. Bir kısım araştırmacıların sonuçlarına göre ise H₂O₂ hücre içi organellerde (nükleus, mitokondride vs.) ADP-riboz sentezini artırmakta ve bu ADP-riboz kanalı açmaktadır (67). Ayrıca, hücre kültürü çalışmalarında TRPM2 kanallarının H₂O₂ ile aktive olduğu gösterilmiştir (68).

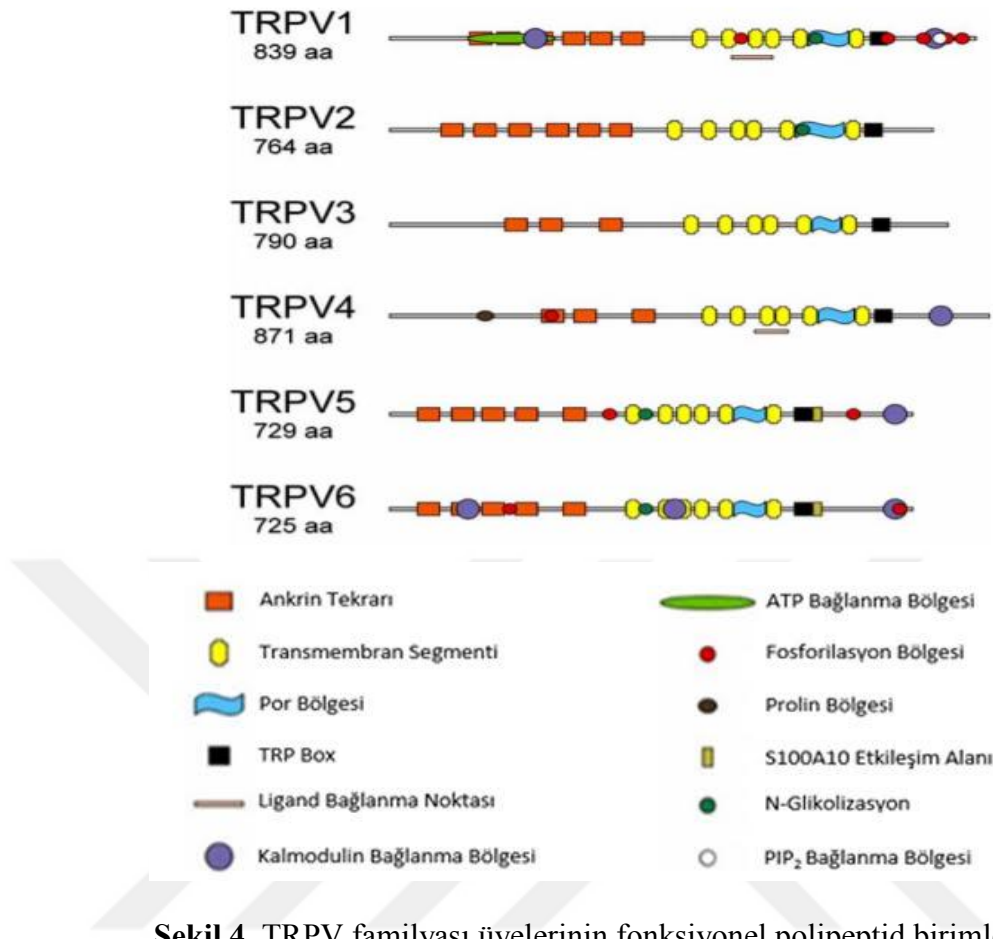
Hücre içi Ca⁺² iyonu artışı hücre ölümlerine kadar varan patofizyolojik olayların başlatıcısıdır. Günümüzdeki TRPM2 kanalları, Ca⁺² kanal inhibisyonunda kullanılan ilaçlar ile tamamen bloke olmamaktadır (35).

Bu nedenle hücre içine Ca⁺² girişini ayarlayan TRPM2 katyon kanallarını aktive ve inhibe eden mekanizmaların araştırılması hücre içi Ca⁺² artışı ile ilgili başta Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklar olmak üzere, diyabet, kanser ve kalp hastalıklarının patogenezinin anlaşılması açısından çok önemlidir.

Yapılan çalışmalarda, TRPM2 kanal aktivasyonunun düzenlenmesinde 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) ve antranilik asidin (ACA) önemli rolleri olabileceği gösterilmiştir (69). ACA'nın etkisinin ise fosfolipaz A2'yi baskılayarak gerçekleştirdiği düşünülmektedir (70).

2.2.4. TRPV Kanal Alt Ailesi

TRPV kanalları, bazı bitkilerin yapısında bulunan vanilin, vanilik asit ve kapsaisin gibi doğal vaniloidler tarafından aktive edildiği bilinen ve ismini de burdan alan kanallardır. TRPV kanallarının sadece hücre membranının üzerinde değil aynı zamanda organelleri çevreleyen zarlar üzerinde de var oldukları gösterilmiştir (71). TRPV kanallarının aktivasyonuna sebep olan fiziksel faktörler arasında basınç, pH, sıcaklık bazı kimyasal ve biyolojik moleküller olduğunu söylemek mümkündür (72). Her ne kadar nosiseptör olarak görev yaptıkları bildirilse de temelde kimyasal bileşiklerle etkileşimli bir kemo-sensör olarak görev yapmaktadırlar. TRPV alt ailesi; TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPV5 ve TRPV6 olmak üzere 6 alt bireyden oluşmaktadır. Bunlardan TRPV1'den TRPV4'e kadar olanların nosisepsiyon ile ilgili olduğu varsayılmakta iken, TRPV5 ve TRPV6'nın ise epitelyal Ca⁺² kanalı olarak görev yaptıkları düşünülmektedir (73, 74). TRPV kanalları genel olarak katyon geçişlerine olanak sağlasa da Ca⁺² iyon seçiciliğinin yüksek olması nedeniyle hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun dengede tutulmasında çok önemli bir role sahiptirler.

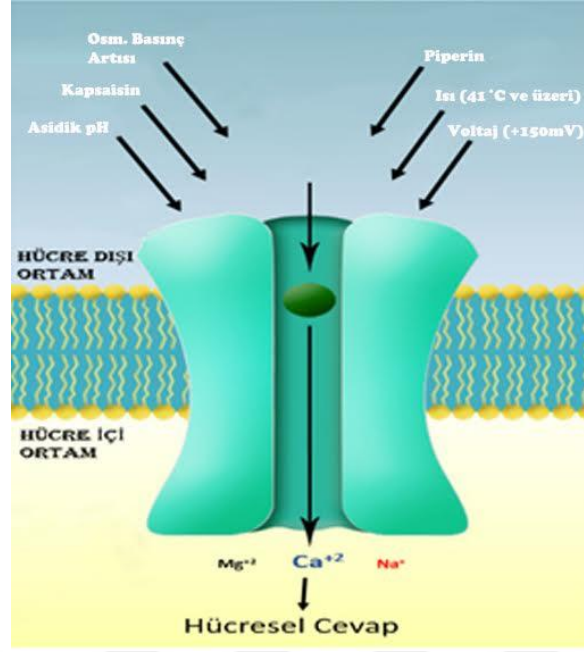


Şekil 4. TRPV familyası üyelerinin fonksiyonel polipeptid birimleri

2.2.3.1. TRPV1 Katyon Kanalları

Vanilloid grubu içerisinde yer alan TRPV1 kanalları, memelilerin birçok fizyolojik ve patolojik durumlarında rol oynamaktadır. Bununla beraber, en önemli rolünün periferel ağrının oluşumunda olduğu gözlenmiştir (80).

Kapsaisin, düşük pH ve ısı içeren uyarımların birçoğu seçici olmayan bu kanallardan hücre içine Ca^{+2} girişine sebep olur. TRPV1 zararlı birçok uyarımdan sorumlulukta işaret verici olarak rol alabilir. TRPV1'in tekrar eden aktivasyonunda ölümcül hücre yaralanmaları, oksidatif stres ve sitozoldeki serbest kalsiyumun artışıdaki sonuçlar daha önce belirtilmiştir (9).



Şekil 5. TRPV1 kanalı aktivasyonu

Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, AKG sinir hücrelerinde ve hatta erken diyabetik nöropatik ağrı oluşumunda TRPV1 kanallarının rolünün varlığı rapor edilmiştir (75). Ayrıca hem TRPA1 hem de TRPV1 kanallarının yapısında ve aktivasyonunda tiyol ve sülfidril gruplarının önemine değinilmiştir (76, 77). TRPV1 kanallarının kimyasallarca aktive edilebildiğinden yukarıda bahsedilmiştir. Sarımsakta daha ziyade bulunan gallisin maddesi ve nitrik oksit TRPA1 ve TRPV1 de kovalent değişikliklere neden olarak ve oksidatif stres oluşturarak ağrı ve ağrıya karşı aşırı hassasiyet (hyperalgesia) oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir (78). Daha ziyade kırmızı biberde bol miktarda bulunan kapsaisin maddesi TRPV1 kanallarının başlıca agonistidir (uyarıcısıdır). Bu madde ile yapılan inkübasyonlarda kanal aktive olmaktadır. Bunun yanı sıra, hücre içerisinden ve dışından gelen uyarılarla da aktive olmaktadır. Bu uyarılar arasında yüksek ısı (>42°C), asidik ortam, inflamasyonu uyarıcı faktörler (örneğin interlökinler) ve kimyasal uyarıcılar yer almaktadır (79). H₂O₂'nin TRPV1 kanallarına hem bağımlı hem de bağımsız ağrıya karşı aşırı hassasiyet oluşumunda rol oynadığı bildirilmiştir (80). H₂O₂ gibi hücre zarını geçebilen oksidanların TRPV1 kanallarını aktive edebildikleri, hücre zarını geçemeyenlerin ise aktive edemedikleri gözlenmiştir (81). Bununla birlikte, H₂O₂'in TRPV1 kanallarını aktive ettiği biyokimyasal yollar hakkında yeterince bilgi yoktur. Kapsaisin ile oksidatif ürünler arasındaki etkileşim neticesinde kapsaisinin etkisinin

artmasından dolayı, oksidatif stres ürünlerinin fazla üretildiği hücrel ortamlarda, kapsaisinle uyarılan TRPV1 kanal akımları, oksidatif ürünlerin az bulunduğu ortamlara kıyasla daha fazla gözlenilmiştir (81, 82). Oksidatif stres ürünleri kinaz enzimleri ve hücre zarı proton yapılarında değişikliklere neden olmaktadır. Bu nedenle, uzun süre oksidatif strese maruz kalındığında tiyol-sülfidril gruplarındaki bağlardaki değişimlerden dolayı, TRPV1 kanallarının duyarlılığının azaldığı, fakat sistein içeren maddeleri inkübe edilen HEK-293 hücre serilerinin TRPV1 kanallarının açılma-kapanma hassasiyetinin düzeldiği rapor edilmiştir (78).

2.2.4. TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 Kanallarının AH ile İlişkisi

2.2.4.1. TRPA1 Kanalının AH ile İlişkisi

TRPA1 kanallarının ağrı ve inflamasyonda önemli rol aldığı bilinmektedir (83). Fakat vücudumuzda serebral korteks ve hipokampus gibi bilişsel faaliyet gösteren alanlarda bulunmaları ve başta oksidatif stres olmak üzere çeşitli agonistlerle aktive olmaları bu tip kanalların AH ile yakın ilişkili olabileceği gerçeğini gün yüzüne çıkarmaktadır. Yapılan sınırlı sayıda TRPA1 ve AH bağımlı çalışma olsa da henüz TRPA1 kanallarının gelişen AH patolojisi üzerindeki rolünü tam olarak aydınlatmaya yetememiştir. Primer sensör nöronlar ve diğer nöronal olmayan hücre gruplarında var olan TRPA1 kanalları, ROT, soğuk ve kannabinoidlere karşı hassasiyet göstermekte ve aktive olabilmektedir (84). AH'de oluşan A β plakları; Beta-secretase 1 (BACE1) ve presenilin 1 (PS1) enzimleri vasıtasıyla APP'lerden oluşturulmaktadır (85). Oluşan bu toksik A β plakları mikroglia ve astrositleri aktive ederek kronik inflamasyon oluşumunu tetikler böylece bu hücrelerden salınan sitokinler, pro-inflamatuar mediatörler (prostoglandinler, ROT, NO vs.) AH'nin ilerlemesine neden olmaktadır. (86-90). Ortamda biriken A β plaklarının doğrudan TRPA1 kanallarını stimüle edebildiği bazı kaynaklarda bildirilmişken (91), yine pro-inflamatuar mediatörlerden olan NO de TRPA1 kanallarını stimüle etme potansiyeline sahiptir (92). Bu stimülasyon ve kanal aktivasyonu sonrasında ise ekstraselüler ortamdan hücre içi sitozole Ca⁺² iyonu akışı gerçekleşmekte ve bunun neticesinde hücredeki kaspaz reaksiyonları hızlanarak hücre apoptozise doğru sürüklenmektedir. Ayrıca hücre içinde Ca⁺² iyonu artışı mitokondriyi daha da uyarıp buna bağlı olarak ROT ürünleri

artışına sebep olmaktadır. Bu artışa bağlı olarak da hücre daha da hızlı bir şekilde ölüme sürüklenecektir. Bu da AH'nin progresyonunda hızlanmaya ve hastalıkla ilgili semptomların oluşumu ve hastalık progresyonu üzerine hızlandırıcı etki yapacaktır.

Beyinde TRPA1 kanalları, beyin gelişimi ve astrositlerin fizyolojik fonksiyonlarını icra etmesinde önemli bir role sahiptir (93, 94). Bunun yanı sıra bakteriyel endotoksinler, çevresel iritanlar veya inflamatör mediatörler gibi uyarılara karşı inflamasyonel cevabın oluşumu ve düzenlenmesinde görevi olduğu düşünülmektedir (46, 48, 95). Son zamanlarda AH ile ilgili yapılan çalışmalarda araştırmacılar daha çok AH patogenezinde Ca^{+2} bağıntılı sinyal yollarının yükselen rolüne odaklanmışlardır (96, 97). Ancak, TRPA1 kanallarının AH patogenezindeki TRPA1- Ca^{+2} bağıntılı sinyal yolları ve mekanizmaları içerisinde ne kadarlık bir etkiye sahip olduğu henüz tam netlik kazanamamıştır.

2.2.4.2. TRPM2 Kanalının AH ile İlişkisi

AH'de oluşan patolojik belirtilerin gelişiminde, inflamasyon ve oksidatif stres aracılığıyla aktive olan TRPM2 kanallarında bu tabloda rol oynadığı birçok çalışma tarafından doğrulanmıştır (98, 99). TRPM2 kanallarının travmaya bağlı oluşan oksidatif strese, nöronal apoptozise, mitokondriyal disfonksiyona ve sitozolik Ca^{+2} iyonu artışına neden olduğu ve bütün bu gelişen olguların da AH patolojisindeki değişikliklerle ilgili olduğu bildirilmiştir (98). AH'de A β peptid birikiminin yüksek düzeyde toksisitesine bağlı olarak sinaptik aktivite ve nöronal hücre ölümüne sebep olduğu bilinmektedir.

Artan oksidatif stres düzeyinin ve kalsiyum kanal aktivitelerinden kaynaklanan hücre içi kalsiyum iyon dengesizliğinin bu etkilerin ortaya çıkışına öncülük ettiği birçok çalışmada rapor edilmiştir (35, 77). Yüksek düzeyde kalsiyum permeabilitesine sahip olan TRPM2 kanalları non-selektif bir katyon kanalıdır. Oksidatif stresle aktive olabildiği iyi bilinen TRPM2 kanalları birçok nörodejeneratif hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar TRPM2 kanal aktivasyonun aynı zamanda A β nin sebep olduğu nörotoksisite ile ilişkili olabileceğini göstermiştir (99). Bunlara ek olarak kültüre edilmiş nöronlarda A β plakların, TRPM2 kanal fonksiyonlarını artırdığını gösteren bulgular da literatürde mevcuttur (99). APP/PS1

ile oluşturulan deney hayvanı AH modelinde endoplazmik retikulum stres markörü, protein disülfid izomeraz ve fosforile ökaryotik transkripsiyon faktör 2 α düzeylerinin artarken, presinaptik sinaptofizin markörü seviyelerinin ise azaldığı bildirilmiştir (100). AH modeli oluşturulan farelerde TRPM2 kanallarının yokluğunda mikroglial aktivasyonda azalma ve yaşa bağlı hafıza bozukluklarında iyileşme gözlemlenirken, TRPM2 kanal varlığında ise yüksek düzeyde mikroglial aktivasyonun ve hafıza ile ilgili bozuklukların devam ettiği görülmüştür. Tüm bunlar nöranal toksisite oluşumunda TRPM2 kanalları ile A β plak arasındaki ilişkinin önemine işaret etmekle beraber TRPM2 kanal aktivasyonunun AH tedavisinde potansiyel bir hedef olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir (99).

2.2.4.3. TRPV1 Kanalının AH ile İlişkisi

Sinir hücrelerinde Ca⁺² iyonu, mevcut çeşitli metabolik yollarla sinaptik iletim ve plastisite ile nöronal gelişme üzerinde etkili olan temel iyonlardan bir tanesidir. Hücre içi ortamda Ca⁺² iyonu homeostazisinin sağlanamaması AH'nin nöropatolojisinde önemli bir rol oynamaktadır (101). A β toksisitesinin varsayılan mekanizmalarından biri, eksitotoksik uyarılara karşı savunmasızlığın eşlik ettiği Ca⁺² homeostaz bozukluğunu içerdiği görülmektedir (102, 103). Bu nörotoksisite PLC'yi aktive ederek IP3 üretilir ve bu da hücre içi Ca⁺² depolarını uyarır. Ayrıca NMDA reseptörlerini ve voltaj bağımlı kalsiyum kanallarını aktive eder (104, 105). Aslında, A β 'nin doğrudan nörotoksitesisi ve eksitotoksisiteye karşı geliştirilmiş savunmasızlık olgusunun, hücreler Ca⁺² içermeyen ortamda inkübe edildiğinde zayıflaması ve Ca⁺² içeren ortamda ise sitozole Ca⁺² akışının arttığı saptanması, TRPV1 kanallarının AH ile alakasını ve AH'deki önemini ortaya koymaktadır (106). A β 1-42 tarafından tetiklenen nöroinflamatuvar bir süreç nörodejeneratif sürecin merkezinde yer almaktadır (107). Bu nörodejenerasyon süreci, aktive edilmiş mikroglia, astrositler, proinflamatuvar moleküllerin indüksiyonu ve ilgili sinyal yolları tarafından yönlendirilerek sinaptik ve nöronal hasarın oluşumuna yol açar. Epidemiyolojik kanıtlar ve klinik araştırma verileri, steroid olmayan anti-inflamatuvar ilaç kullanımının AH insidansını azaltabileceğini ve AH patogenezinde inflamasyon rolünü daha da desteklediğini ortaya koymaktadır (107-109). Her ne kadar AH ile nöroinflamasyonun oluşumu arasında moleküler ve hücreler olarak bir

bağlantı henüz bir netlik kazanmasa da, sinyal yollarının aktivasyonu ve nöronal hasarın daha da kötüleşmesi ile mevcut inflamasyonun artışına sitokinlerin aracılık ettiği düşünülmektedir (110).

Kapsaisine duyarlı sensör nöronlar da nosiseptif nöron grubundandır ve bu nöronların ödem oluşumu ve inflamasyonun daha da kötüleşmesinde payının olduğu düşünülmektedir (111). TRPV1 kanalları vanilloid ile kapsaisin yanı sıra 43°C ve üzeri sıcaklık ile ortam pH'sı 6'dan (pH<6) aşağıya düştüğü durumlarda aktif hale gelmektedir (112-114).

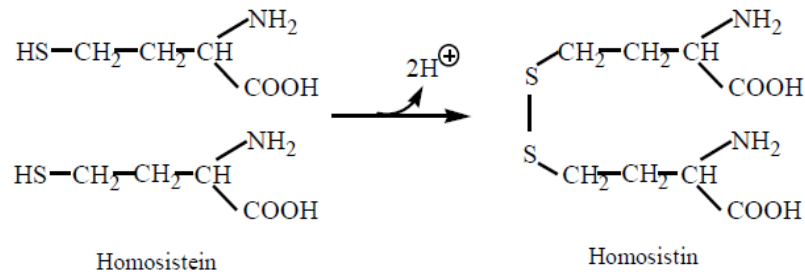
Son zamanlardaki yapılan çalışmalar neticesinde; beyindeki nöronlar, perisitler, astrositler ve mikroglialarda TRPV1 kanallarının ekspresyonlarındaki geniş dağılım rapor edilmiştir (115-117). Bu yüzden TRPV1 kanallarının AH ile ilişkili nöroinflamatuvar süreçlere katkıda bulunması olasıdır. Kim ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışma sonrasında rapor edilen sonuçlara göre, mezensefalik dopaminerjik nöronlar'ın TRPV1 kanal ajanisti kapsaisine maruz bırakılmaları neticesinde hücre ölümünün tetiklendiği bildirilmiştir ancak bu etki kullanılan TRPV1 antagonisti (blokör) olan kapsazepin (CPZ) ve iodo-resiniferatoksin tarafından inhibe edilmesiyle baskılanmış, neticede bu kanalın hücre ölümü üzerine doğrudan etkin olabileceği düşünülmüştür (118). TRPV1 kanalları tarafından indüklenmiş nörotoksisiteye mitokondriyal hasar ve sitozoldeki Ca⁺² miktarındaki artış eşlik etmektedir. Ancak bu durum intraselüler Ca⁺² şelatörü BAPTA-AM ve TRPV1 antagonisti CPZ tarafından inhibe edilmiş baskılanmıştır (119). Hücrelerin kapsaisin veya endojenöz bir TRPV1 ligandı olan anandamid ile uyarılması, mitokondriyal sitokrom c salınımını ve aktif kaspaz 3'e karşı oluşan immun cevabın güçlenmesine neden olmaktadır. Ayrıca sıçan beyinde intranigral alana yapılan kapsaisin enjeksiyonunda da TRPV1 aracılı hücre ölümüne neden olduğu bildirilmiştir. Dolayısı ile kapsaisin ve anandamidin birlikte kullanılması sonucu TRPV1 kanalı aktivasyonu ile yukarıda bahsedilen olaylar mikroglia hücrelerinde cerayan ederek Ca⁺² sinyali aracılı sinir hücresi hasarı ve mitokondriyal yıkımlanma şekillenmiştir (119). Bu durum göz önünde bulundurulduğunda AH'nın oluşumunda TRPV1 kanallarının da bir rolü olduğu düşünülebilir.

2.3. Homosistein (Hcy)

Hcy yapısında sülfür ihtiva eden esansiyel aminoasitlerden olan metiyoninin metabolizması sonucu meydana gelen bir ara üründür. Ayrıca yine metiyoninin sistine dönüşümü esnasında meydana gelen tiyol içeren bir aminoasittir. Hcy, vücutta kofaktör olarak vitamin B12'nin kullanılmasıyla remetilasyon döngüsü ile tekrar metiyonine dönüşürken; vitamin B6'nin kullanılması ile transsülfürasyonla sistine metabolize olmaktadır (120).

Kandaki total plazma Hcy'inin yaklaşık %80'i disülfid köprüleri aracılığıyla albümine bağlıdır. Bağlı olmayan serbest haldeki Hcy türleri ise başlıca 'Hcy-Sistin' ve 'Hcy-Hcy' disülfidleri şeklinde bulunmaktadır. Dolaşımdaki tüm Hcy'in yalnızca %1'i serbest Hcy şeklinde bulunur. İnsan plazmasında Hcy, hem indirgenmiş (redükte) formda hem de yükseltgenmiş (okside) formda serbest veya proteine bağlı olarak bulunur (Tablo 1).

Hcy sıvı fazda çok dayanıksızdır ve miktarı artınca oksidasyonla homosistine dönüşür (Şekil 6). Normal kişilerin idrarındaki Hcy tespit edilemeyecek kadar az miktardadır ancak, sistasyon β-sentaz eksikliğinde Hcy'in sistatiyona dönüşümü azaldığı için artmaktadır. Metil tetrahidrofolat transferaz eksikliğinde homosistinüri meydana geliş sebebi, metiyonine geri dönüşümün azalmasıdır.



Şekil 6. Hcy'nin oksitlenerek homosistine dönüşmesi

Yapılan çalışmalar sonucu Hcy ile ilgili kimyasal tanımlamalar yapılmıştır. Bu kimyasal tanımlamalar, sülfidriлли veya redükte formdaki Hcy ve disülfidli veya okside formdaki Hcy olarak adlandırılmıştır. Disülfidli formlar, reaktif sistein kalıntıları içeren proteinlerle ve sisteinle meydana gelir (120).

Hcy'in okside formları aynı zamanda mikst disülfidler olarak adlandırılır. Plazmadaki Hcy'in multiple formlarının isimlendirilmesinde "total Hcy, indirgenmiş

Hcy, proteine bağılı Hcy, serbest Hcy ve Hcy-sistein kompleksi” gibi kavramlar genel olarak kullanılmaktadır. Total Hcy bütün bu serbest ve bağılı biyokimyasal Hcy türlerinin toplamını tanımlar.

Tablo 1. Total plazma Hcy bileşenleri ve yüzdeleri

Metabolik durum	Yüzdesi (%)
Yükseltgenmiş (oksidize) Hcy	5-10
İndirgenmiş (redükte) Hcy	1
Proteine bağılı Hcy	80-90
Sistinli Hcy	5-10

Tablo 2. Total plazma Hcy dağılımı

Normal oran	5-15 $\mu\text{mol/L}$
Beklenen	< 10 $\mu\text{mol/L}$

Tablo 3. Hiperhomosisteinemi değerleri

Ağır	50-500 $\mu\text{mol/L}$
Orta	25-50 $\mu\text{mol/L}$
Hafif	15-25 $\mu\text{mol/L}$

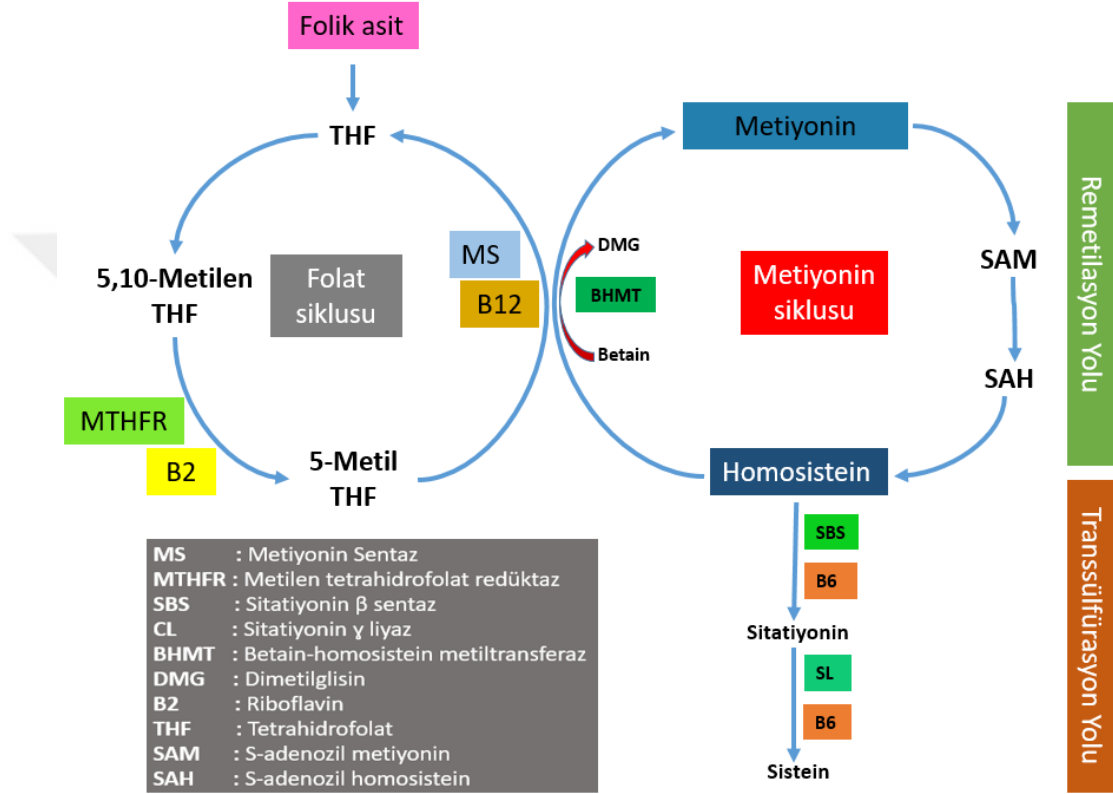
Normal olgularda ortalama plazma Hcy değeri 10 $\mu\text{mol/L}$ olup 95 persentil ile 16 $\mu\text{mol/L}$ civarındadır (Tablo 2). Değerler kadınlarla karşılaştırıldığında erkeklerde %10 kadar daha yüksektir ve konsantrasyonlar her iki cinste yaşla birlikte giderek artar. Hcy ölçümleri hasta aç durumdayken yapılmalıdır.

Günümüzde Hcy seviyeleri için terapötik hedefler saptanmıştır. Son verilere göre kardiyovasküler hastalıklar için yüksek risk altındaki hastalarda hedef düzey 10 $\mu\text{mol/L}$ 'den az olmasıdır (121).

Normal sağlıklı kişilerde günlük Hcy üretimi 20.000 μmol kadardır. Total Hcy'in 1200 $\mu\text{mol/gün}$ kadarlık kısmı plazmada sürekli bir döngü durumundadır. Hcy'in yaklaşık 3-10 $\mu\text{mol/gün}$ kadarlık miktarı idrarla atılır. Bu miktar total Hcy'in yaklaşık %0,1 kadarını oluşturur (122).

2.3.1. Hcy Metabolizması

Hcy iki major yolla metabolize olmaktadır. Bunlar Transsülfürasyon ve Metilasyon yollarıdır. Hcy'in %50'lik kısmı transsülfürasyon yoluyla sisteine dönüşür. Diğer % 50'lik kısmı ise yeniden metillenerek metiyonini oluşturur (123). Hcy metabolizması komplike bir feed-back sistemle düzenlenir (Şekil 7).



Şekil 7. Hcy metabolizması

2.3.1.1. Remetilasyon Yolu

Hcy esansiyel bir aminoasit olan metiyoninin demetilasyonu ile metilasyon döngüsünde meydana gelir. Besinlerle alınan metiyoninin ATP yapısındaki adenzil kalıntısı ile oluşturduğu S-adenozil metiyonin (SAM), metillendirme tepkimelerinde en önemli metil vericisi olarak kullanılmaktadır. SAM yapısındaki metil grubunun özel metiltransferazlar ile uygun alıcılara taşınmasından sonra oluşan S-adenozil homosistein (SAH), adenzin ve Hcy'e hidroliz olmaktadır (124).

Eğer metiyonin dengesi negatif ve SAM konsantrasyonu düşükse Hcy doğrudan metiyonin sentazın (MS) katalizlediği reaksiyonla metiyonin oluşturmak

için remetilasyon yoluna girer. Bu reaksiyonda vitamin B12 kofaktör, metiltetrahidrofolat (MTHF) substrattır (124).

MTHF, metilentetrahidrofolat redüktazın (MTHFR) katalizlediği bir reaksiyonla meydana gelir. Bu reaksiyon folat metabolizmasında MTHF'in formasyonu için hız kısıtlayıcı basamaktır ve Hcy'den metiyonin jenerasyonu için önemlidir. MTHF'in Hcy remetilasyonunda indirekt etkisi vardır. Çoğu dokuda Hcy vitamin B12 bağımlı enzim metiyonin sentaz ile metiyonine remetile olur. Bazı dokularda ise çoğunlukla karaciğer ve böbreklerde betain homosistein metiltransferaz enzimi Hcy'in metiyonine remetilasyonu için alternatif bir yoldur (123). Bu yolda Hcy, kolinin oksidasyonu ile oluşan betainden metil grubu alarak yeniden metiyonine dönüşür (124). Hcy'in SAM ve metiyonine dönüşümü MS veya MTHFR enzimidaki genetik bir kusurla bloke olabilir. Bu şekildeki yeni doğanlarda total Hcy seviyesi yüksek, metiyonin seviyesi düşüktür. Sonuçta nörolojik semptomlar ve zihinsel problemler şekillenebilir (125).

Hem Hcy hem de metiyonin birbirlerinin prekürsörleridir, birinin yıkılması diğerinin sentez aşamasını oluşturmaktadır. Bu ilişkinin temelini metiyonin metabolizması oluşturmaktadır (126).

2.3.1.2. Transsülfürasyon Yolu

SAM konsantrasyonu yüksek olduğunda, transsülfürasyon yolu kullanılır ve Hcy geri dönüşümsüz olarak sistatyon ve sistein oluşturmak için ilk basamağını sistatyon β -sentazın (CBS) katalizlediği iki vitamin B6 bağımlı reaksiyona girer. Sistein major hücrel redoks tampon ve glutatyon için bir prekürsördür. Tahminen karaciğerdeki hücre içi glutatyon havuzunun yarısı homosisteinden türemektedir (123).

CBS enzimi bu yol için en önemli enzimdir. Bu enzime ait homozigot kusurlar nedeniyle Hcy düzeyleri ($>100\mu\text{mol/L}$) artarak homosistinüriye neden olur. Heterozigot kusurlarda ise parsiyel CBS eksikliği meydana gelir ve orta düzeyde hiperhomosisteinemi saptanabilir. Metiyonin yükleme testinden sonra hiperhomosisteineminin belirgin bir şekilde ortaya çıkması ile tanısı konulabilir.

Kofaktör olan vitamin B6'nın eksikliklerinde ise parsiyel CBS eksikliğinde meydana gelenlere benzer Hcy yükseklikleri görülebilir (122, 127).

Transsülfürasyon yolu öncelikle karaciğer, böbrek ve pankreasta meydana gelir. Bu dokular ayrıca glutasyon döngüsünün en hızlı olduğu dokulardır.

Hayvanlarda yapılan çalışmalar göstermiştir ki vitamin B6 eksikliğinden kaynaklanan transmetilasyon yolunun inhibisyonu SAH seviyelerinde artış ve SAM seviyelerinde azalmayla sonuçlanır (123).

2.3.2. Hiperhomosisteinemi

Enzim kusurları, Hcy metabolizmasındaki vitaminlerin eksikliği veya dağılımındaki bozukluk, yaşam şekli, hastalıklar ve ilaçlar metilasyon ve folat döngüsünü bozarak total Hcy seviyesini artırabilir (128).

Genel olarak yükselmiş plazma toplam Hcy konsantrasyonunun en sık edinsel sebepleri folat, B vitaminlerinin tam veya relatif eksikliği ve böbrek yetmezliğidir. Bu durum özellikle yaşlı kimseler için daha doğrudur (129). Renal fonksiyon toplam Hcy seviyesi için güçlü bir göstergedir. Bu, renal metabolizmayla ilgilidir (127). Genetik bozukluklara bağlı olarak görülen eksiklikler genel popülasyonda veya vasküler hastalıklı kişilerde görülen yüksek seviyelerin muhtemelen sadece bir kısmının sebebi olarak düşünülmektedir. Homosisteinüriye en sık sebep olan genetik durum, yüksek toplam Hcy seviyeleri ve prematüre kardiyovasküler hastalıklarla karakterize CBS eksikliğidir. Yeni doğanlarda, toplam Hcy metabolizması kusurları homosisteinüri ile seyreden ağır hiperhomosisteinemi sebebidir. Artmış toplam Hcy'in diğer genetik sebepleri; metiyonin sentaz ve MTHFR yokluğu ve bozukluğudur (130).

Yüksek toplam Hcy seviyesi; ilerlemiş yaş, hipotiroidi, nikotinik asit, teofilin ve L-dopa gibi ilaçların kullanımı sırasında da görülebilir (128). Diyetle alınan vitamin B6, vitamin B12 ve folat düzeyleri ve total Hcy seviyeleri ters orantılıdır. Aşırı sigara, alkol ve kafein alan kişilerde toplam Hcy seviyesi yükselir. Kadınlarda bu şekilde hayat tarzı erkeklere göre toplam Hcy seviyesini daha fazla etkiler. Kronik alkol tüketiminde etanolün vitamin durumunu etkilemesi sonucu toplam Hcy seviyesi artar (127).

2.3.3. Santral Sinir Sisteminde Homosistein'in Rolü

İlerleyen tıp bilimi ve teknoloji sayesinde nöronal gelişim ve dejenerasyonu üzerine mikro besin maddelerinin rolü daha iyi anlaşılmaktadır (131, 134). Daha önce de ifade edildiği üzere Hcy, metiyonin metabolizması sonucu oluşan, esansiyel olmayan kükürt içeren bir aminoasittir. Hcy katabolizması; folat, B6 ve B12 vitaminine bağlı olarak çalışmaktadır. Bu nedenle, Hcy'nin plazma konsantrasyonu, B vitamininden faydalanma durumunu kısmen gösterebilir (135). Erken embriyonik hayatta embriyonun sinir sistemi oluşum aşamasında iken folatın rolü iyi belgelenmiştir. Hcy, transmetilasyon yolunu inhibe ederek civciv embriyosundaki nöral tüpün kapanmasını geciktirir. Bu veriler, folat takviyesinin sinir tüpü defektlerinin önlenmesindeki etkisi ile açıklanabilmektedir. Hcy metabolizmasında kofaktörlerden birinin eksikliği, miyelinizasyon bozukluğuna ve ciddi nörolojik hasara neden olabilir. Hcy ve sinir sistemindeki bozukluklar arasındaki bağlantı ilk olarak şiddetli CBS eksikliği bulunan hastalarda belgelenmiştir (137, 138). Ayrıca bazı hastalarda zihinsel gerilik, serebral atrofi ve nöbetler görüldüğü de bildirilmiştir (137, 140).

Hcy'nin metionine remetilasyonu, metionin sentaz ve onun kofaktörü olan vitamin B12 aracılıdır ve reaksiyon esnasında 5-metiltetrahidrofolat metil grubu vericisidir. Hcy remetilasyonu beyin önemli metil grupları kaynağıdır (141). Beyinde, nörotransmitterlerin, membran fosfolipidlerinin ve kontrollü DNA metilasyonunun sentezi ve degradasyonu da dahil olmak üzere birçok metilasyon reaksiyonu meydana gelir. Betain-homosistein metil transferaz yoluyla gerçekleşen Hcy'nin alternatifi bir remetilasyon yolu beyinde yoktur (142, 143).

Hcy katabolizması için Hcy'nin transsülfürasyon yolu önemlidir ve Hcy'nin karaciğerde önemli bir glutatyon kaynağı olduğu düşünülmektedir (144). Ancak bu durum beyinde daha karmaşıktır. CBS ve sistatyonaz, transsülfürasyon döngüsü ile Hcy'nin glutatyonun öncüsü olan sisteine dönüşmesini kataliz eder. CBS enzimi insan beyinde de tespit edilmiştir (144) ancak beyindeki sistatyonaz aktivitesi ile ilgili bilgiler yer yer farklılık göstermektedir (145, 147). Beyindeki sistatyonaz aktivitesinde geniş bölgesel farklılıklar olduğunu gösteren yalnızca birkaç çalışma yapılmıştır (146, 147). Dahası, sistein ve daha az oranda sistatyonin, astroglial kültür

kullanılarak glutasyon üretmek için kullanılmıştır (148). Ancak bunun aksine, astroglial kültürde Hcy ve metionin transsülfürasyon yolağını geçememiş ve de glutatyona dönüşmemiştir (148).

Genel olarak mevcut veriler beyindeki glutasyon sentezi için gerekli sistein üretiminde Hcy transsülfürasyonunun önemli bir rolünü desteklemez (141, 148, 149). Sistein, astrositlerde bir Na⁺ bağımlı glutamat taşıyıcı vasıtasıyla nakledildiği gösterilen glutasyonun sentezi için oran belirleyici bir substrattır (149, 150). Sistein öncülleri (sistatyonin, homosistein ve metiyonin), kan sisteinini muhafaza ederek beyin glutasyonu seviyesini normal değerlerde tutmak için önemli bir role sahip olabilirler. Ancak bu görüşü netleştirmek için daha ciddi kanıtlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Beyindeki Hcy transportu tam olarak keşfedilememiştir. Daha önce deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalar, Hcy'nin basit difüzyona ilaveten belirli bir doyurulabilir reseptör yoluyla taşınabileceğini bildirmiştir (151, 153). İnsan nöronal hücreleri normal koşullar altında Hcy üretebilir (154). Ayrıca, folat eksikliği bulunan bir mediumla inkübe edilen nöronal hücrelerde Hcy seviyesinin arttığı bildirilmiştir (154). Bu sonuçlar, Hcy'nin beyinde kendi kendisine de üretilebileceğini göstermiştir. Ancak beyinde bölgesel olarak Hcy metabolizmasının farklılık gösterip göstermeyeceği tam olarak araştırılmış değildir. Fareler üzerinde oluşturulan bir hiperhomosisteinemi modelinde Hcy'nin kan-beyin bariyerinin bütünlüğünü bozduğu rapor edilmiştir (155). Bununla birlikte, böbrek hastalarında beyin Hcy etkisi üzerine hiperhomosisteineminin etkisi aracılığıyla Hcy'nin beyne girme yeteneği üzerine yapılan çalışmalarda tam anlamıyla yeterli düzeyde değildir. Ancak, günümüzde elde edilen mevcut kanıtlar ışığında Hcy'nin iki yönlü olarak spesifik taşıyıcılar aracılığıyla plazmadan beynin içerisine alınabileceği ve kan beyin bariyerini geçebileceği bildirilmiştir (151).

Bazı nörolojik hastalıklarda Hcy'nin beyindeki ve beyin omurilik sıvısındaki (BOS) konsantrasyonu yükselmiştir (156, 160). BOS'da Hcy yükselmesi serumda da paralellik gösterir. Ancak serum konsantrasyonları BOS konsantrasyonlarından 20-100 kat daha fazladır. Antifolat tedavisi için kullanılan metotreksatın, BOS'daki folat ve SAM konsantrasyonlarını düşürdüğü, Hcy seviyesini artırdığı görülmüştür (161).

Bu durum, metotreksatin nörotoksik etkisini, beyindeki azalan folat miktarı ve/veya artmış Hcy düzeyi ile açıklanabileceğini göstermiştir. Ayrıca, CBS eksikliği olan çocuklarda yüksek hiperhomosisteinemi seviyesi ($>100 \mu\text{M}$), Hcy'nin BOS'daki konsantrasyonunda 10 kat artış ile ilişkilendirilmiştir (162). Aynı çalışmada betainle tedavi edilen homosistinüri hastalarının plazma ve BOS Hcy seviyeleri düşüktür (162). Bu veriler neticesinde, Hcy'nin her iki yönde de kan-beyin bariyerini geçebileceğini göstermektedir (162). Hcy'nin kan-beyin bariyerinin bütünlüğünü bozduğu bulgusu da bu tespitle de uyum göstermektedir (155).

2.3.4. Hcy'nin Nörodejeneratif Hastalıklarla ve Yaşlanmayla İlişkisi

Nörodejeneratif hastalıklar, çeşitli etiyolojik ve klinik özelliklerde içeren geniş bir grup bozukluğu kapsar. Bu hastalıkların ortak noktası; nöronların protein yapılarında bozulmaya sebep olmalarıdır.

Demans, AH, Parkinson hastalığı ve felç, yaşlı insanlarda sık görülen nörodejeneratif hastalıklara örnektir. Hafif bilişsel bozukluk, yaşlılarda görülen ve neredeyse %50'si demansla sonuçlanan majör bir sağlık sorunudur (163). AH hem genetik hem de edinsel faktörlerle ilişkili multifaktöriyel bir hastalıktır. AH'nın patolojik olarak belirtileri, nörofibriler yumaklar, nöritik plaklar ve çözünmeyen A β birikimidir (164, 165). Bu belirtiler genel olarak kognitif gerilemeden 10-20 yıl kadar önce ortaya çıkar (166). Nörodejeneratif hastalıklarda oluşan patolojik mekanizmalar, apoptozis, nöronal ölüm, oksidatif stres, glutamat reseptörlerinin aşırı aktivasyonu, mitokondriyal işlev bozuklukları ve kaspazların aktivasyonu gibi bir dizi reaksiyonları da tetiklemektedir (167, 169). AH'li hastaların beyinlerinde anormal redoks dengesi ile oksidatif hasarın, proteinlere ve nükleik asitlere vermiş olduğu zarar görülebilir (170, 171).

Hcy nöronal dejenerasyonu tetiklemektedir. Bu nedenle psikiyatrik ve yaşa bağlı nörodejeneratif hastalıkların ilerlemesine neden olmaktadır. Genel popülasyonda, ileriki yaşlarda nörodejeneratif hastalıkların görülme sıklıklarının artması, yaşla birlikte plazma Hcy düzeyinin artması ile de ilişkilendirilmiştir (135, 172). Hcy'nin beyin atrofisi için bir risk teşkil ettiği bildirilmiştir (173). Hcy'nin 11.9 $\mu\text{mol/L}$ 'nin üzerindeki konsantrasyonları, beyaz cevher hasarına karşı yaklaşık 8.6

$\mu\text{mol/L}$ 'nin altındaki konsantrasyonlara kıyasla yaklaşık 3 kat daha fazla risk ile ilişkilendirilmiştir (174). Epidemiyolojik ve uzun süreli çalışmalar, Hcy ve bilişsel bozukluk arasında nedensel bir bağlantı olduğunu ileri sürmüştür (175). Bu durum serebrovasküler kaynaklı olabileceği gibi doğrudan nörotoksik mekanizmalara bağlı da olabilir (176). Çeşitli çalışmalar, demans tablosu oluşan yaşlı insanlarda düşük folat, vitamin B6 ve/veya B12 konsantrasyonlarının olduğunu teyit etmektedir (134). Serum B-vitamini konsantrasyonlarının düşüklüğü ile nörobilişsel testlerdeki zayıflık birbiri ile negatif olarak ilişkilidir (134). Buna ilaveten, Hcy konsantrasyonları düşük vitamin konsantrasyonlarına göre bilişsel düşüşün güçlü bir öncüsüdür (181). Her ne kadar Hcy'nin nörolojik hastalıklarda önemli bir role sahip olabileceği *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla gösterilse de bu durum klinik çalışmalarla henüz kanıtlanmış değildir.

2.3.5. Homosistein ve Glutamat Reseptörleri

Hcy, NMDA reseptör alt türüne etki yapmaya eğilimli (184, 197) endojen glutamat reseptör agonistidir (184, 194, 196). Hcy'nin oksidatif bir ürünü olan homosisteik asit, beyin hücreleri tarafından üretilir ve eksitator uyarıya karşılık olarak salgılanır (198). Homosisteik asit, NMDA reseptörünü aktif hale getirerek bir eksitator nörotransmitter olarak işlevini yerine getirir (199). Beyindeki homosisteik asidin nörotoksitesisi seçici bir NMDA antagonisti kullanılarak engellenebilir (196, 200).

Hcy, NMDA reseptörüne bağlanarak (153) kalsiyum girişini dolaylı olarak artırır (184, 186, 200, 201). İlginç bir biçimde, düşük (başka bir deyişle, normal, 10 $\mu\text{mol/L}$) glisin konsantrasyonunun varlığında Hcy, NMDA reseptörünün glisin alanının kısmi bir antagonisti olarak davranmaktadır ve reseptör aracılı aktiviteyi (Hcy antagonist veya nöroprotektif görevinde) engeller. (184). Normal glisinin varlığında Hcy'nin toksitesisi, Hcy yüksek konsantrasyonlarda (başka bir deyişle, Hcy=100 $\mu\text{mol/L}$) iken gözlemlenebilir. Bunun aksine, glisin düzeyleri sinir sisteminde (inme, kafa travması veya migrenden sonra) arttığında (202), nispeten düşük Hcy konsantrasyonu (başka bir deyişle, Hcy=10 $\mu\text{mol/L}$) NMDA'yı bağlayarak ve aktive ederek eksitotoksik (agonist) olabilir (184, 203, 204). Bu sonuçlar, Hcy'nin migren hastalarında, inmeden sonra veya iskemi sonrasında serebral hasara sebep olabileceğini ortaya koyar (184).

Bu nedenle, glisin konsantrasyonlarına bağı olarak, Hcy ya NMDA reseptörünün glisin alanını tıkayabilir veya bu reseptörün glutamat alanında bir antagonist gibi davranabilir (184).

Başka bir kanıt da, Hcy'nin NMDA olmayan bir reseptör mekanizması yoluyla veya metabolik grup I metabotropik glutamat reseptörünü aktive ederek hareket edebileceğini ileri sürmektedir (203). Hcy'nin hipokampüste hücre dışı bir sinyal yönlendirmeli kinaz oluşturduğu görülmüştür. Bu etki üç tip glutamat reseptör antagonisti (NMDA, non-NMDA ve metabotropik glutamat reseptörü) tarafından engellenmiştir (201). İyonotropik ve metabotropik reseptörleri aktive ederek, Hcy dolaylı olarak hücre içi kalsiyum düzeylerini artırabilir ve birçok kinazı aktive edebilir (201).

2.3.7. Homosistein ve Oksidatif Stres

Hcy metabolizması, hücredeki redoks potansiyeli tarafından düzenlenir (205, 206). Hcy temizlenmesine vasıta olan birçok enzimin aktiviteleri, bu oksidatif durum (başka bir deyişle, metiyonin sentaz, CBS) tarafından düzenlenir (205, 207, 208). Örneğin, CBS aktivitesi, oksidatif stres koşulları altında artar ve böylece daha fazla Hcy'yi sistein ve glutatyona dönüştürür. Transsülfürasyon yolunun bozulması (CBS +/-), redoks homeostazını bozar ve sistein seviyelerini düşürür (187), böylece nöronal hasara sebep olur. Buna karşın, artmış reaktif oksijen türleri (ROT) durumunda metionin sentaz aktivitesi daha düşüktür. Metionin açısından zengin bir beslenme düzenine sahip sıçanlarda, kandaki Hcy konsantrasyonlarının arttığı (20 µM'ye karşı kontrol grubu sıçanlarında 7 µM) ve düşük glutasyon peroksidaz aktivitesi görülmüştür (209). Hcy ile başlatılmış oksidatif stres düşük glutasyon üretimi durumunda kötüleşebilir.

Hcy kendi kendine otooksidasyona girebilir ve böylece redoks homeostazının bozulmasına sebep olabilir ve vasküler ve nöronal hücrelerdeki redoks sinyal yollarını etkileyebilir (205, 210, 211). Hcy'nin oksidatif stres yoluyla nörolojik disfonksiyonu başlattığı bulunmuştur (212, 213). Bu etki, ROT üretiminin artırılması ve nitrik oksidin oksidatif deaktivasyonu ile açıklanabilir. Üstelik, Hcy, NMDA reseptörüne

bağlanarak beyin lipid peroksidasyonuna neden olur (214). Antioksidan tedavi, Hcy'nin birçok toksik etkilerini onarır (214).

Oksidatif stresin sinirsel dejenerasyondaki rolü yoğun bir biçimde incelenmiştir. Oksidatif stres, nöronal hücrelerde Hcy toksisitesi için önemli bir mekanizmadır (215). Hcy, oksidatif stresi başlatarak doğrudan A β nörotoksitesini arttırmıştır (213). Hcy'nin hücre toksisitesininin, N-asetilsistein, C veya E vitamini gibi antioksidanlarla yatıştırıldığı bildirilmiştir (213, 216, 217). Antioksidanlar (C veya E vitamini) aynı zamanda hafıza bozukluğunu (216) ve sıçanlarda Hcy'nin neden olduğu ATPaz aktivitesini önlediği bildirilmiştir (217). Diğer çalışmalar, Merkezi sinir sisteminde folat eksikliğinin bir etkisini de ortaya koymuştur (215, 218). Folat takviyesi A β ile ROT oluşumunu engellerken, folat yoksunluğu, Hcy ve ROT'da bariz bir artışa neden olmuş ve A β ile başlatılan apoptozu (programlı hücre ölümünü) arttırmıştır (215).

S-adenozil homosistein hidrolaz inhibitörü olan 3-deaza adenzin (3-DZA) ile yapılan tedavi, normal ve APO E eksikliği olan farelerde ve folat ve E vitamini yoksunu ve oksidatif mücadeleye maruz kalan laboratuvar ortamında yetiştirilmiş sinir hücrelerinde nörolojik koruma sağlar (219). Bununla birlikte, folat eksikliğinin beyindeki etkisinin Hcy yükselmesinden bağımsız mı yoksa onun vasıtasıyla mı olduğu bilinmemektedir.

Transsülfürasyon yolu, antioksidan ve metilasyon metabolizması arasındaki metabolik bağlantıyı gösterir (220). SAM'ın antioksidan olarak bir rolü olduğunu düşündüren kanıtlar mevcuttur. SAM, artmış glutatyon üretimine, neredeyse %65 oranında düşmüş lipid peroksidasyonuna neden olmuş ve deneysel bir bölgesel anemi (iskemi) modelinde (oksidatif stres) nöronal ölümü önlemiştir (222). Canlı organizmalardaki çalışmalar, SAM'ın varlığında geçici beyin iskemisi sonrasında kan-beyin bariyerinde bir iyileşme olduğunu göstermiştir (223). Buna ek olarak, kronik SAM tedavisi (22 ay), sıçan beyinde, glutatyon konsantrasyonlarını artırmış ve lipid peroksidasyonunu düşürmüştür (224). Akut iskemik inmeden hemen sonra B-vitaminlerinin uygulandığında oksidatif hasarı yatıştırdığı klinik çalışmalarca daha fazla kanıt sağlanmıştır (225). SAM'ın nöroprotektif etkilerinin en azından bazıları,

onun transsülfürasyon yolunun güçlendirilmesi ve glutatyon üretiminin arttırılmasındaki önemli rolü arasında bağlantı kurulabilir.

Hcy ile ilişkili oksidatif stresin nöronal hasara neden olabileceği diğer bir mekanizma da artmış hiperfosforile tau (P-tau) proteindir. Genetik faktörlerin, sinirsel dejenerasyon üzerindeki etkisini B vitaminlerinin modüle ettiği bildirilmiştir (226). Bu doğrultuda, Apo E *knock-out* fareleri, folat eksikliği çektiklerinde artmış beyin oksidatif hasar ve bilişsel noksanlıklar sergilemiştir (226, 227). Bu, belirli risk faktörlerine (bir başka deyişle Apo E4 veya APP) sahip olan hastaların folat eksikliğinden kaynaklanan oksidatif strese daha yatkın olabileceğine işaret edebilir.

2.3.8. Homosistein, Tau Proteini ve Amiloid Beta Arasındaki İlişki

Normal yaşlanma sürecinin bir parçası olarak beyindeki yaygın A β birikmesi artar. AH bulunan bireylerin beyinde göze çarpan bir özelliği, yaşlılıkla birlikte artan A β plaklarının serebral ve meningeal kan damarında yaygın şekilde birikimidir (228, 229). Alzheimer hastalarından ve vasküler demansa ait BOS örneklerinde A β konsantrasyonları düşüktür ve bu düşüş bilişsel gerileme ile ilişkilidir. Yaşlanma ve nörodejeneratif hastalıkta Hcy'nin plazma konsantrasyonları ile A β 1-40'ın plazma konsantrasyonları arasında pozitif bir ilişki bildirilmiştir (230). Bir homosisteine tepki veren endoplazmik retikulum protein (Herp) yakın zamanda tespit edilmiş ve c-sekretaz aktivitesini ve dolayısıyla beyindeki A β 1-40 birikimini arttırdığı bulunmuştur (231). Öte yandan, Hcy nöronlar için toksik olabilir ve A β tarafından hasara uğratılma açısından savunmasızlıklarını artırabilir (213, 232). Homosisteik asit, nöronal hücrelerde hücre içi ve hücre dışı A β 1-42 birikimine yol açar (233). Vasküler düz kas hücrelerinde Hcy, doz bağımlı bir şekilde A β toksisitesini ve kaspaz 3 aktivasyonunu artırmıştır (234). Özetlemek gerekirse, güncel veriler, Hcy'nin beyinde A β birikimini artırarak bunamayı hızlandırdığını göstermektedir. Tau proteini, insan beyinde belleğin zayıflaması ve bunama olaylarına ilişkin önemli başka bir proteindir. Tau, NFY oluşumuna dahil olan, hücre içi bir mikrotübüle bağlı proteindir. NFY'ler bilişsel bozukluklar, nörodejeneratif bozukluklar ve bunama ile ilişkilidirler. Tau'nun fizyolojik işlevi tübülün parçalarının bir araya gelmesini kolaylaştırmak ve mikrotübülleri stabilize etmektir. Tau fosforilasyonu tübülünlerin dağılımını ve hücre

zarı ile ilişkisini bozabilir (236). Artmış hiperfosforile tau (P-tau), daha düşük bir fosfataz aktivitesi veya artmış bir kinaz aktivitesi ile ilişkili olabilir. Artmış A β , fosforile tau kinazları (GSK 3 β , fosfotidilinositol 3-kinaz (PI3K), MAP kinaz) aktive ederek tau birikimini hızlandırabilir (235). PP2A, tau proteinlerini ayırarak ve proteoliz için erişilebilir hale getirerek çift sarmal filamentlerde P-tau'yu fosforilden ayırabilir (236). Kinazların (azalma) veya fosfatazların (artışı) aktivitesini etkileyen faktörler bu nedenle AH için tedavisel bir potansiyele sahip olabilir. Birçok çalışma, kontrollerle karşılaştırıldıklarında, AH hastalarının beyin dokularındaki PP2A'nın ekspresyonunun veya aktivitesinin azaldığını göstermiştir (237, 238). Her ne kadar mRNA PP2A'nın artsa da, PP2A proteininin ekspresyonu AH hastalarındaki fibroblastlarda da düşüktür (239). Bu sonuçlar, translasyon sonrası modifikasyonlarda veya enzimin dayanıklılığında bir başarısızlık olduğuna işaret etmektedir. AH ile homosisteinde azaltılmış PP2A protein metilasyonu arasında muhtemel bir bağlantı olduğu varsayılmıştır (240). Katalitik altbirim B'nin, enzimin metillenmiş altbirim C'ye bağlanması, enzimin aktivitesi için zorunludur (241). SAM'in düşük konsantrasyonları veya düşük bir SAM/SAH oranı, daha düşük bir PP2A aktivitesi ve artan bir P-tau ile sonuçlanır (240, 242). Buna göre, fosfataz metiltransferaz 1'in protein düzeyi ve PP2A'nın metilasyona uğramış C altbiriminin protein düzeyi, kontrollerinkilerle kıyaslandığında AH'ye yakalanan bireylerden alınan frontal ve temporal ekstraktlarda yaklaşık %40 daha düşüktür (238). Buna ek olarak, PP2A protein aktivitesi ve gen ekspresyonu AH bireylerin beyinlerinde belirgin bir şekilde azalmıştır (237). Genel olarak, bu veriler, SAM metabolizmasındaki veya SAM/SAH oranındaki değişikliklerin, tau proteinlerinin fosforilden ayrılmasını önleyerek AH etiolojisine katkıda bulunabileceğini kesin olarak ortaya koymaktadır.

Nöronal hücrelerdeki deneysel folat eksikliği ek bir kanıt sağlamıştır. Nöroblastom hücrelerindeki folat yoksunluğu, P-tau'nun immünreaktivitesinde %66'luk bir artışa ek olarak Hcy seviyesinde ve ROT'da belirgin bir yükselmeye sebep olmuştur (215). Kültürlere folat ilave edildikten sonra P-tau artışı tersine çevrilebildi (215). Bu sonuçlar, P-tau'nun folat eksikliğinde biriktiğini ortaya koydu, fakat bu fenotip, en azından kısa dönem eksiklikte muhtemelen tersine çevrilebilir. P-tau'nun azaltılmasının hafıza işlevinin düzelmesine yol açabileceğinden, Hcy düşürücü tedavi P-tau'nun azaltılması yoluyla hafıza işlevini iyileştirebilir (243).

2.4. Memantin (MEM)

Memantin, AH tedavisinde NMDA reseptör antagonisti olarak kullanılan bir amantadin türevidir (244). Orta ve ileri evredeki AH olan kişilerde tercih edilen memantin, hücre içi kalsiyum yoğunluğunu azaltmak amacıyla, sinir hücrelerinde fonksiyon bozukluğuna neden olan aşırı glutamat aktivasyonuna engel olmak amacıyla tercih edilmektedir (245). Bilindiği gibi hücre dışı kalsiyum iyonu miktarı (1.2 mM) hücre içine (80-100 nM) kıyasla 10.000-20.000 kat daha fazla oranda bulunmaktadır. Sorunlu bölgede meydana gelen asidite, oksidatif stres veya farklı nedenler ve çeşitli ligandlar vasıtasıyla aktif hale gelen kalsiyum kanalları bu dengeyi bozarak hücre içi kalsiyum yoğunluğunu artırmakta ve artan kalsiyum iyonu yoğunluğu, başta mitokondride ve sitozolde olmak üzere bir dizi hücreyi ölüme götüren reaksiyon zincirlerinin başlamasına neden olmaktadır (246). Merkezi sinir sisteminde (MSS) hızlı eksitator (uyarıcı) transmitterler olarak glutamat, aspartat ve homosisteat bulunmaktadır. Ancak glutamat, beyindeki uyarıcı iletimin %75'inden sorumlu olup kendine özgü dört eksitator reseptör tipi olan NMDA, AMPA, kainik asit reseptörleri ve metabotropik reseptörler ile bu etkisini göstermektedir (249). NMDA reseptörleri beyin korteksi, hipokampus, striatum, septum ve amigdala gibi daha çok kognitif işlev ile alakalı kısımlardaki nöronların post-sinaptik kısımlarında bulunmaktadır. Yukarıda bahsedilen reaksiyonların ve hücrenin apoptozise uğramasının engellenmesi, Ca^{+2} girişine aracılık eden NMDA reseptörlerinin memantin tarafından bloke edilmesi ile gerçekleşmesi ayrı bir öneme sahiptir (248, 249).

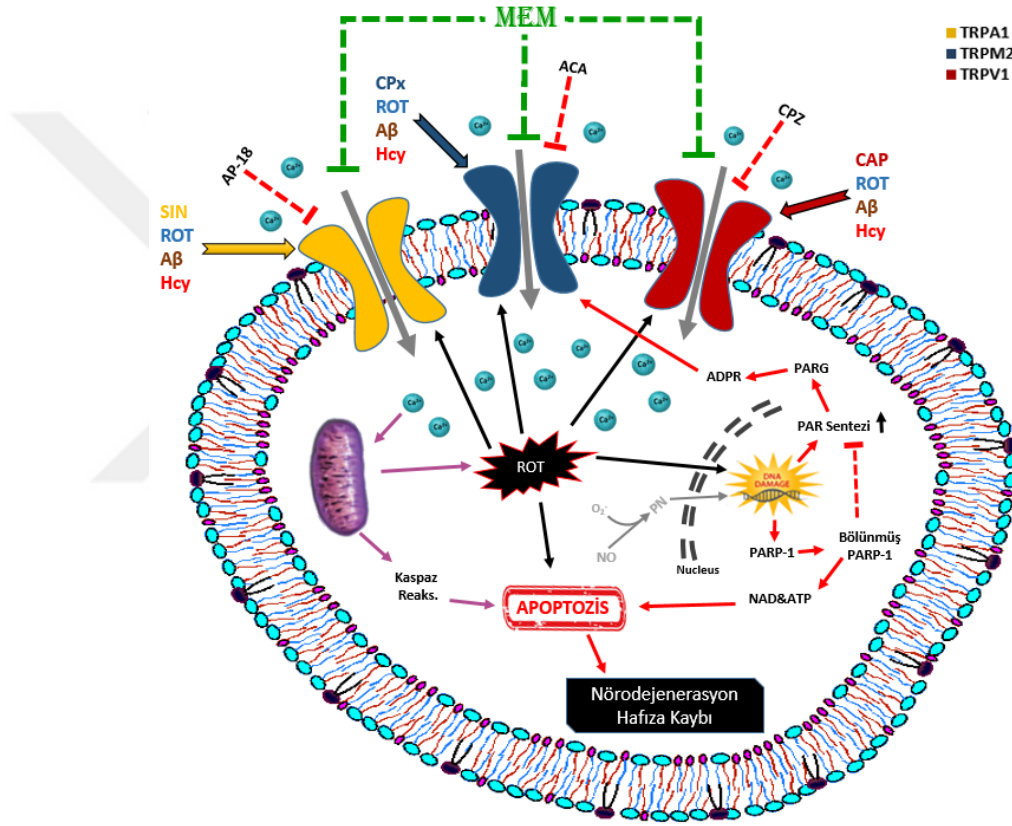
Öğrenme ve belleğin gelişmesinde hücre içi Ca^{+2} düzeyindeki anlık değişimlerin ve nöronal sinaptik bağlantıların çok etkin bir rolü olduğu kabul edilmektedir (250, 251). Glutamat hücreler arası iletişimi sağlayan çok önemli bir fizyolojik mediatör olmasının yanında bazı nörodejeneratif hastalıklarda glutamat reseptörlerinin aşırı ve zamansız uyarılması "eksitotoksosite" olarak bilinen durumun ortaya çıkması sonucu nöronların ölümüne sebep olabilmektedir (252). Eksitotoksitenin birçok akut ve kronik MSS nörodejeneratif bozukluğunda rol aldığı ve aşırı Ca^{+2} yükü ile bağlantılı olduğu ileri sürülmüştür (253). Eksitotoksosite, birçok nörodejeneratif hastalıkta hücrelerin apoptozise uğramasını açıklayan en yaygın hipotez olarak kabul görmektedir.

Memantin, AH tedavisinde tercih edilen NMDA reseptör antagonisti bir ilaç olmakla birlikte, orta ve ileri derecedeki Alzheimer tipi demansın semptomatik tedavisi için endikedir ve her hangi büyük bir yan etkisi saptamamıştır (254, 255). Son zamanlarda yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar memantin kinolinik asite bağlı toksisiteye, beyin travması, iskemi ve A β 1–40/A β 1–42–aracılı nörotoksisiteye karşı etkili bir koruma sağlayabildiğini bildirmektedir (256-259). Yine son zamanlarda rapor edilen sonuçlara göre sıçan kortikal kültür nöronlarında memantin tau proteinlerinin fosforilasyonu ve A β 1–42 aracılı tau kinazların (GSK-3 β and ERK-1/2) aktivasyonunun zayıflamasıyla şekillenen toksisiteye karşı da koruyucu etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (260). Tüm bunlara ek olarak memantin, A β ile indüklenen kaspaz 3 bölünmesini ve siklik AMP yanıt elementi bağlayıcı proteinin defosforilasyonunu da azaltır. Böylece her ikisinin de hücrenin hayatta kalması için kritik bir öneme sahip olduğu bildirilmiştir (260). Bununla birlikte, memantine, A β peptidinin oluşumunu veya içselleşmesini değiştirmedeği ve A β 'nın neden olduğu hücre dışı glutamat potansiyelini hafifletemediği bildirilmiştir (260). Toksikite üzerine olan etkilerinin yanısıra memantin, *in vivo* olarak A β 'nın fare hipokampal kesitlerinden elde edilen kültürlerde ve yetişkin sıçan hipokampusunun CA1 bölgesinde indüklediği uzun süreli potansiyel artış bozukluklarını geri döndürebilir (261, 262).

Bu sonuçlar ile tutarlı olarak, A β peptidlerini aşırı ifade eden transgenik farelerde memantin kognitif bozukluklar ve Alzheimer hastalığına bağlı patoloji üzerine faydalı etkileri gösteren birkaç çalışma mevcuttur (263, 264). Memantin, TG2576 transgenik fare hipokampuslarında A β plak yığınlarını azalttığı ve sinaptik yoğunluğu artırdığına dair bildirimler bulunmaktadır (263).

Üç farklı yaş grubundaki transgenik farelerde yapılan bir çalışmada, 3 ay süre ile günlük 30 mg/kg memantin uygulamasının hiperfosforile tau protein seviyelerini azaltarak ve inaktif GSK3 β seviyelerini artırarak bilişsel performansı artırdığı gözlemlenmiştir (265). Bu çalışmanın sonucunda memantin gibi antagonistlerin APP miktarını veya oluşum sürecini etkilemezken A β agregasyonu ve bertaraf edilmesi süreçlerinde önemli bir role sahip olduğu ifade edilmiştir (265). Fakat önceki çalışmaların aksine, *in vivo* ve *in vitro* koşullarda gerçekleştirilen çalışmalarda, memantin uygulaması sonrasında A β 1–40/A β 1–42 oluşumunda meydana gelen

azalmanın düşük APP seviyesi ve değişen APP süreci ile de alakalı olduğu rapor edilmiştir (263-265). Ancak bu tutarsızlığın sebebinin yapılan çalışmalarda kullanılan memantin dozu ve uygulama süresindeki değişikliğe bağlı olarak bazı çalışmaların uzun vadeli (30 mg/kg/gün, 3 ay süre ile) bazılarının ise kısa vadeli (20 mg/kg/gün, 8 gün süre ile) gerçekleştirilmiş olması veya diğer bazı hücrel faktörlere bağlı olabilir. Fakat AH için her iki sonuç da birlikte ele alındığında, memantin hem tau hem de A β aracılı olarak meydana gelen beyindeki AH'ye özgü patolojik tabloyu ve hayvanın bilişsel performansını tedavi edici bir etki ile birlikte hafifletebilir (263, 265).



Şekil 8. Hcy ve MEM'in TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 kanalları üzerinde muhtemel etki yolları. NMDA kanal inhibitörü olarak kullanılan MEM'in; A β , Hcy ve hücre dışı ROT yanı sıra TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 kanallarına spesifik stimülatörler olan Sinamaldehit (SIN), Kümen hidroperoksit (CPx) ve kapsaisin (CAP) ile aktive olan kanalların muhtemel aktivasyonunu inhibe ederek bu kanallar aracılığıyla kalsiyumun sitozole girişi engellediğini gösterir şekildir. AH'de, ekstraselüler ortamda oluşan ROT ve kullanılan spesifik kanal açıcı ajanlar TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 kanallarını aktif hale getirerek stozole aşırı miktarda Ca²⁺ girişine neden olmaktadır. Hcy ise ROT oluşumu ve doğrudan kanal aktivasyonuna neden olarak bu etkiyi daha da artırmaktadır. Hcy aynı zamanda NMDA kanallarını stimüle etme kabiliyetine sahip bir yapıya sahiptir. Tüm bu zararlı etkileri MEM ise kanal inhibisyonuna neden olarak azaltmakta, hücrenin apoptotik sürece girmesini engellemekte veya öteleyebilmektedir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Alet ve Malzemeler

Şarjlı pipet: Witeg (Almanya)

Şarjlı pipet uçları: LP Italiana 5 ml, 10 ml hacimlerde (İtalya)

Floresan spektrofotometre: Cary Eclipse, Varian, (Avustralya)

Şeffaf küvet: Sarstedt (45mm) Cuvvette (Almanya)

Plate reader: Infinite 200 Pro, Tecan (Avusturya)

Hücre sayım cihazı: Casy TT, Roche, (Almanya)

Jel görüntüleme cihazı: Syngene G:Box, XRQ (İngiltere)

Soğutmalı santrifüj: Kubota 2800 (Japonya)

Derin dondurucu (-80°C): Wisd Persnal Digital (Kore)

Hassas terazi: Scaltec SPB 32 (İsviçre)

Vorteks: Nüve NM 100 (Türkiye)

pH metre: Hanna Instruments (Portekiz)

Manyetik karıştırıcı: Nüve (Türkiye)

CO₂ inkübatör: Heal Force HF90, Smart Cell (Japonya)

Çalkalamalı su banyosu: Termal Laboratuvar Aletleri (Türkiye)

Çalkalama cihazı: Biosan Orbital shaker PSU 10i (Türkiye)

Falkon tüpleri: ISOLAB, 15 ml ve 50 ml hacimlerde (Almanya)

Steril 96'lık plakalar: Greiner Bio-One (Almanya)

Buz yapma makinesi: ITV IQ P5C (ABD)

Manyetik ısıtıcılı karıştırıcı: Variomag Monoterm (Almanya)

Distile ve ultradistile su cihazı: ELGA Purelab option DU25 (ABD)

Western Blot sistemleri: Bio-Rad Mini Protean Tetra System (ABD),

Hoeffer MiniVE PS300-B (ABD)

Ultrasonik doku parçalayıcı: Bandelin Sonoplus HD2070

Stereo Mikroskop: Olympus Corporation T5, SN (Japonya)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI 1640), Sigma Aldrich (ABD)

Fetal Bovine Serum (FBS), Life Technologies (ABD)

Penicillin/Streptomycin, Biochrom (Almanya)

Phosphate Buffered Saline (10X, PBS), Biochrom (Almanya)

Trypsin-EDTA (%0,25), Sigma Aldrich (ABD)

Dimethyl sulphoxide (DMSO), Sigma Aldrich (ABD)

Anthranilic acid (ACA), Sigma Aldrich (ABD)

Cumene hydroperoxide, Sigma Aldrich (ABD)

Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), Merck (Almanya)

Ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), Sigma Aldrich (ABD)

HEPES, Sigma Aldrich (ABD)

Sodium chloride (NaCl), Merck (Almanya)

Potassium chloride (KCl), Merck (Almanya)

Calcium chloride (CaCl₂), Merck (Almanya)

L-glutamic acid, Merck (Almanya)

Cesium hydroxide monohydrate (CsOH.H₂O), Sigma Aldrich (ABD)

Hydrochloric acid (HCl), Merck (Almanya)

Potassium hydroxide (KOH), Merck (Almanya)

Fura-2 AM, Invitrogen (ABD)

APOPercentage Apoptosis Kit, Biocolor (Kuzey İrlanda)

Dihydrorhodamine 123 (DHR 123), Molecular Probes (ABD)

JC-1 Dye, Santa Cruz Biotechnology (ABD)

Kaspaz 3 substrat (AC-DEVD-AMC), Bachem, (İsviçre)

Kaspaz 9 (AC-LEHD-AMC) substrat, Bachem, (İsviçre)

DL-Homocysteine, Santa Cruz Biotechnology (ABD)

Memantine hydrochloride, Santa Cruz Biotechnology (ABD)

Capsaisin, Santa Cruz Biotechnology (ABD)

AP-18, Santa Cruz Biotechnology (ABD)

Anthranilic Acid (ACA), Sigma Aldrich (ABD)

Capsazepine, Sigma Aldrich (ABD)

Cinnamaldehyde, Sigma Aldrich (ABD)

Amiyloid Beta Peptide (1-42), Abcam Biochemicals (İngiltere)

Anti-TRPA1 Antibody, Novus Biologicals (ABD)

Anti TRPM2 Antibody, Abcam Biochemicals (İngiltere)

Anti TRPV1 Antibody, Abcam Biochemicals (İngiltere)

β -actin Antibody, Abcam Biochemicals (İngiltere)

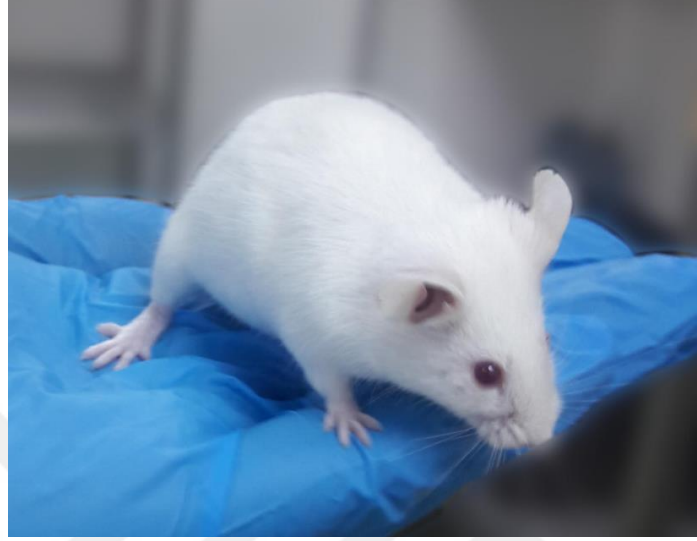
Cleaved caspase 3 Antibody, Proteintech (ABD)

Cleaved caspase 9 Antibody, Proteintech (ABD)

PARP1 antibody, Proteintech (ABD)

3.2. Yöntem

3.2.1. Kullanılan Deney Hayvanları



Resim 1. Çalışmada kullanılan Swis Mouse ırkı fare

Deney için ağırlıkları ortalama 36-40 gr olan 10-12 aylık 80 adet swiss mouse ırkı albino (beyaz) fare kullanılmıştır. Çalışmaya başlamadan 2 hafta öncesinden hayvanlar çevre şartlarına alıştırdı ve içerisinde altlık bulunan kendilerine ait kafeslerde barındırıldılar. *Ad libitum* yemleme tarzı ile standart sıçan-fare yemi ve su ile beslendiler. Işık aydınlık-karanlık siklusu 12-12 saat olarak ayarlandı.

Hayvanların kullanımı Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanları Üretimi ve Deneysel Araştırma Laboratuvarı (HÜDAL) tarafından takip ve kontrol edilen hayvan refahı ve deney hayvanları bakımı, kullanımı esasına göre gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Gruplar

Çalışmada 40 adet dişi ve 40 adet erkek olmak üzere toplam 80 adet yaşlı fare (10-12 aylık swiss Mouse ırkı) kullanıldı. Deney aşamasında, hayvanlar her grup için dişi ve erkek sayıları homojen olacak şekilde ayarlandı. Hayvanlar 8 gruba ayrıldı ve inhalasyon anestezisi (eter) altında dekapute edilerek hipokampus hücreleri izolasyonu yapıldı.

- I- Kontrol grubu (n=10):** Bu gruptaki hipokampal sinir hücrelerine herhangi bir kimyasal uygulanmadı.
- II- A β grubu (n=10):** Bu gruptaki hücreler 20 μ M A β 1-42 ile 24 saat süreyle inkübe edildi (274).
- III- Hcy grubu (n=10):** Bu gruptaki hipokampal sinir hücreleri 250 μ M Hcy ile 30 dakika süreyle inkübe edildi (275).
- IV- MEM grubu (n=10):** Bu gruptaki hipokampal sinir hücreleri 10 μ M Memantin ile 24 saat süreyle inkübe edildi (276).
- V- A β +Hcy grubu (n=10):** Bu gruptaki hipokampal sinir hücreleri A β grubunda belirtildiği şekilde 20 μ M A β 1-42 ile 24 saat süreyle inkübe edildikten sonra Hcy grubunda belirtildiği gibi 250 μ M Hcy ile 30 dakika süreyle inkübe edildi.
- VI- A β +MEM grubu (n=10):** Bu gruptaki hipokampal sinir hücreleri A β grubunda belirtildiği şekilde 20 μ M A β 1-42 ile 24 saat süreyle inkübe edildikten sonra MEM grubunda belirtildiği gibi 10 μ M MEM ile 24 saat süreyle inkübe edildi.
- VII- A β +Hcy+MEM grubu (n=10):** Bu gruptaki hipokampal sinir hücreleri A β grubunda belirtildiği şekilde 20 μ M A β 1-42 ile 24 saat süreyle inkübe edildikten sonra Hcy grubunda belirtildiği gibi 250 μ M Hcy ile 30 dakika süreyle inkübe edildi. Son olarak da MEM grubunda belirtildiği gibi 10 μ M Memantin ile 24 saat süreyle inkübe edildi.
- VIII- Hcy+MEM grubu (n=10):** Bu gruptaki hipokampal sinir hücreleri 250 μ M Hcy ile 30 dakika süreyle inkübe edildikten sonra 10 μ M Memantin ile 24 saat süreyle inkübe edildi.

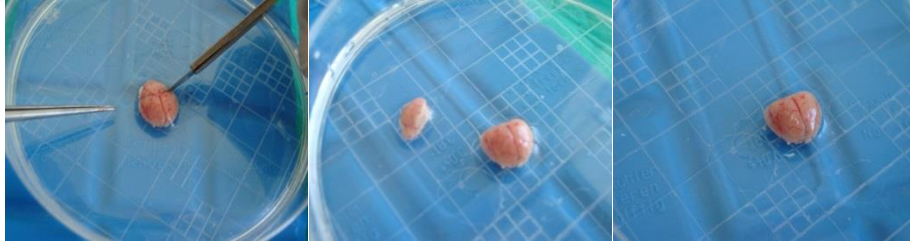
Çalışmada kullanılacak kimyasallar hazırlanırken tamamen çözümlerine dikkat edilerek agreve olmayacakları en uygun solventlerde çözdürüldü. Homosistein, memantin ve sinamaldehit distile suda, kapsaisin etanolde, amiloid beta dimetil sülfoksit (DMSO)'de çözdürülerek, çalışma protokolüne uygun olarak zamanı geldiğinde RPMI-1640 hücre mediumu ile karıştırılıp hücre inkübasyonları yapıldı.

Sıvı kimyasallardan ise stok solüsyonlar hazırlanarak sonrasında direkt medium içerisine konuldu.

Hipokampal nöronların A β , Hcy ve MEM ile inkübasyonları hücrelerin yaşayabilmesi için uygun şartlara sahip inkübatörde (37°C, %5 CO₂) yapıldı. Ayrıca TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 kanallarının aktivasyonlarını değerlendirmek için çeşitli ajanlar ve antagonistler kullanıldı. TRPA1 kanallarının inhibisyonu ve stimülasyonu için sırası ile AP-18 (0.020 mM), sinamaldehit (0.1 mM); TRPM2 kanallarının inhibisyonu için ACA (0.025 mM) ve stimülasyonu için kumenhidroperoksit (CPx) (0.1 mM), TRPV1 kanallarının inhibisyonu ve stimülasyonu için sırası ile CPZ (0.1 mM) ve kapsaisin (CAP) (0.1 mM) kullanıldı (84, 277).

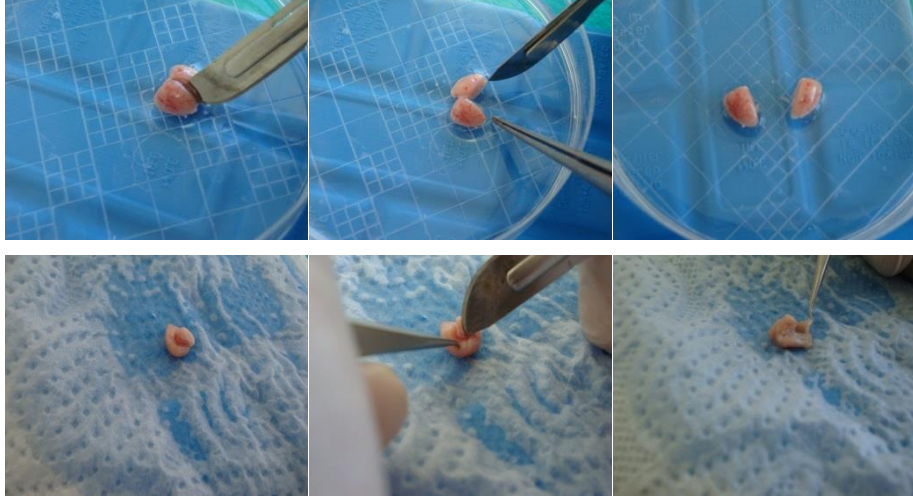
3.2.3. Hipokampus Hücrelerinin İzolasyonu

Hipokampus hücreleri 10-12 aylık farelere inhalasyon (eter) anestezisi işleminden sonra dekapitasyon işlemi takiben hiç vakit kaybedilmeden kafatası ince uçlu makas aracılığıyla kesildi ve beyin bir bütün halinde 3-5 ml HBSS (Hank's Blanced Salts Solution) solüsyonu içerisine çıkarıldı.



Resim 2. Hipokampus hücre izolasyon aşaması - 1

Pens yardımıyla nazikçe tutularak bistüri ile beyincik, beyin dokusundan ayrıldı ve beynin frontal lobu uç kısmından 2 yarım küredende küçük parçalar halinde uzaklaştırıldı. Bu işlem hipokampusu daha kolay ve zarar vermeden çıkarabilmek için yapıldı. Sonra her iki beyin yarım küresinde birbirinden ayırmak için ortadan sagittal kesit atıldı. Daha sonra buz aküsü üzerine konulan kâğıt havlu üzerine HBSS solüsyonu dökülerek (3-4 ml) üzerine her bir yarım küre işlem sırası geldiğinde konuldu ve üzerine tekrar 2-3 ml civarında HBSS solüsyonu döküldü.



Resim 3. Hipokampus hücre izolasyon aşaması - 2

Sonrasında hipokampal bölge 2 adet pens yardımıyla nazik hareketlerle çıkarıldı ve çıkarılan hipokampuslar içerisinde 1ml HBSS bulunan ependorfa yavaşça konularak iki ucu sivri küçük makas yardımıyla olabildiğince küçük parçalara bölününceye kadar parçalama işlemi uygulandı.



Resim 4. Hipokampus hücre izolasyon aşaması - 3

Daha sonra parçalanmış hipokampal dokular 15 ml'lik Falcon tüpüne aktarılarak son hacim 7 ml oluncaya kadar üzerine 37°C HBSS ilave edildi ve son hacim 10 ml oluncaya kadar da tripsin enzimi (3 ml) doku homejenizasyonu sağlamak amacıyla ilave edildi. Yarım saat çalkalamalı su banyosuna her 10 dakikada bir pipetaj yapmak üzere konuldu. Yarım saat geçtikten sonra 3 kez 5'er dakika süreyle santrifüje tabii tutularak süpernatantlar döküldü. Dipte kalan hücreler üzerine 5 ml HBSS eklendi. Homojen bir şekilde pipetaj hareketleriyle karıştırılarak yarısı (2,5 ml) ikinci

bir 15 ml hacimli falcon tüpüne konuldu. Bölünen bu 2,5 ml lik tüplerin birisine son konsantrasyon 250 µM olacak şekilde Hcy konularak yarım saat süreyle inkübatörde (37°C ve %5 CO₂) HBSS solüsyonu içerisinde bekletildi. Sonra hücreleri yıkamak amacıyla santrifüj işlemine tabi tutuldu ve süpernatant dökülüp 1XPBS tamponu ile homojen hale getirilerek floresan boyar maddesi Fura-2-AM maddesi ilave edilerek 45 dakika süre ile 37°C de çalkalamalı su banyosuna konuldu.

3.2.4. Laboratuvar Analizleri

3.2.4.1. Hücre İçi Ca⁺² Ölçülmesi

Hücre izolasyon işlemini takiben, her gruba ait ependorflardaki hücreler 37°C’de 45 dk çalkalamalı su banyosunda 4 µM Fura-2 pentakis (acetoxymethyl) ester (Fura-2 AM, LifeTechnologies, ABD) floresan boyası ile taze medyum içerisinde boyandı. Boyama işleminden sonra 400 g’de 5 dk boyunca santrifüj edildi. Süpernatantlar atılarak Ca⁺² tamponuna [Na⁺-HEPES [(mM cinsinden); NaCl, 140; KCl, 4,7; CaCl₂, 1,2; MgCl₂, 1,1; Glukoz, 10 ve HEPES, 10 (pH 7,4)] alınan hücreler manyetik olarak karıştırılan, şeffaf küvetlere hücre yoğunluğu yaklaşık 2x10⁶/ml olacak şekilde floresan spektrofloremetredeki (Varian Cary Eclipse, Sydney, Avustralya) küvet haznesine yerleştirildi. Fura-2 AM için eksitasyon dalga boyları 340 nm ve 380 nm, emisyon dalga boyu 505 nm’de floresan ışık ile uyarılarak yaklaşık yedi dakika boyunca kayıt alındı. TRPA1 kanallarının inhibisyonu ve stimülasyonu için sırası ile AP-18 (0.020 mM), sinamaldehit (0.1 mM); TRPM2 kanallarının inhibisyonu için ACA (0.025 mM) ve stimülasyonu için kumenhidroperoksit (CPx) (0.1 mM), TRPV1 kanallarının inhibisyonu ve stimülasyonu için sırası ile CPZ (0.1 mM) ve kapsaisin (CAP) (0.1 mM) kullanıldı. Hücre içi serbest Ca⁺² iyon düzeyi değişimleri bilgisayar ekranında 340nm / 380nm dalga boylarındaki uyarımları kaydedildi. Elde edilen bulgular Grynkiewicz ve arkadaşlarının tanımladığı metoda göre hesaplandı (278).



Resim 5. Kalsiyum sinyali analizlerinin yapıldığı spektrofloreometre cihazı

3.2.4.2. Apoptosis Testi

Her bir grup için ayrı ependorflar içerisinde 1 ml 1X PBS ile dilüe edilmiş izole hücrelerden 150 μ l lik hacim, apoptozis testi için alındı. Daha sonra alınan 150 μ l hücre süspansiyonu her bir eppendorfta 50'şer μ l olacak şekilde 3'e bölündü ve üzerlerine 950 μ l 1XPBS koyularak pipetaj yaptıktan sonra üzerine 5 μ l apoptozis boyasından (APOpercentage, Biocolor, İngiltere) ilave edildi ve 30 dk süreyle çalkalama cihazına bırakıldı. Çalkalama sonrası 4x100 g'de 5 dk süre ile santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Üzerine 1X PBS eklenerek tekrar santrifüj işlemine tabii tutularak ortamdaki kullanılmayan fazla boyanın uzaklaştırılması sağlandı. Bu işlemi takiben 200 μ l APOpercentage Dye Release'den ilave edilerek pipetaj ve tekrar santrifüj işleminin ardından süpernatant alındı ve kuyucuklara aktarılıp 550 nm dalga boyunda Infinite 200 Pro (Avusturya) marka kuyucuk okuyucu cihazında okundu. Elde edilen değerler kontrole kıyasla hesaplandı (279).

3.2.4.3. Hücre Canlılığı (MTT) Analizi

Eppendorf içerisinde 1xPBS ile sulandırılmış izole hücrelerden 150 μ l'lik hacim alınarak her bir eppendorfta 50'şer μ l olacak şekilde 3'e bölündü ve üzerlerine 950 μ l

1XPBS koyuldu. Her bir ependorfa 15 µl MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) kimyasalı ilave edildi. MTT kimyasalı ilavesinden sonra bütün ependorflar 8-10 defa yavaşça çalkalanıp, 37°C de çalkalamalı su banyosunda 90 dakika süre ile yavaşça çalkalamaya tabi tutuldu. Çalkalama sonrasında bütün ependorflar 4x100 g de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Her bir ependorfa 450'şer µl DMSO ilave edildi. Pelet DMSO içerisinde resuspense edildi. Sonra her bir küvete 150 µl bu örnekten konuldu. Plate Readerda 490 nm ve 650 nm dalga boylarında okunup bu iki dalga boyunda okunan değerler birbirinden çıkarılarak sonuçlar elde edildi. (Abs 490 nm – Abs 650 nm: x) (279).

3.2.4.4. Kaspaz 3 ve 9 Aktivitesi Analizleri

Kaspaz 3 ve kaspaz 9 substrat tamponlarının hazırlanması için 2,5 ml kaspaz 3 ve kaspaz 9 tamponu ham solüsyonlarından ayrı ayrı 15 ml'lik falkon tüplerine koyuldu. Her 2 tüpe de 2,5 µl NP-40 kimyasalından ilave edilerek vortekslendi ve floresan kaspaz DTT boyasından 12,5 µl koyulup tekrar vorteks ile karıştırıldı. 1 ml 1XPBS ile seyreltilmiş hücrelerden 150 µl'si kaspaz 9, 150 µl'si kaspaz 3 analizi için ayrıldı. Her iki analiz için de 150 µl hücre süspansiyonu her bir eppendorfta 15 µl olacak şekilde 10 kuyucuğa eşit bir şekilde koyuldu. Üzerlerine öncesinde hazırlanmış olduğumuz kaspaz 3 ve kaspaz 9 tamponlarından 50'şer µl eklendi ve açığa çıkan enzim aktivitesi infinite 200 Pro marka (Avusturya) kuyucuk okuyucu cihazında 360 nm eksitasyon ve 460 nm emisyon dalga boylarında okunarak kaspaz 3 ve 9 enzim aktiviteleri ölçüldü. Elde edilen veriler kontrole kıyasla misli artış olarak değerlendirildi (279).

3.2.4.5. Hücre İçi ROT Üretimi Tayini

Eppendorf içerisinde 1xPBS ile sulandırılmış izole hücrelerden 150 µl'lik hacim alınarak ROT üretim tayini analizi için yapılması için her bir eppendorfta 50'şer µl olacak şekilde 3'e bölündü ve üzerlerine 950 µl 1XPBS koyuldu. Sonrasında 8-10 kez pipetaj yapılarak homojen hale getirildi. Üzerine 1 µl Dihydrorhodamine 123 (DHR 123, Sigma Aldrich, ABD) ROT boyasından konulduktan sonra tekrar 8-10 kez pipetaj

yapıldı. Bu işlemi takiben ependorflar 30 dk süreyle çalkalamalı su banyosunda 37 °C’de inkübe edildi. Süre bitimini takiben 4x100 g de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Sonrasında süpernatant atılarak üzerlerine 300 µl 1XPBS koyuldu ve pipetaj yapıldı. Her bir plate kuyucuğuna 100 µl olacak şekilde bölündü. Plate Reader cihazında (Infinite 200 Pro, Avusturya) 488 nm eksitasyon (uyarım) ve 530 ve 590 nm emisyon dalga boylarında okunup aradaki fark değer olarak belirlendi (280).

3.2.4.6. Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu Analizi

Eppendorf içerisinde 1xPBS ile sulandırılmış izole hücrelerden 150 µl’lik hacim alınarak her bir eppendorfta 50’şer µl olacak şekilde 3’e bölündü ve üzerlerine 950 µl 1XPBS konulduktan sonra 8-10 kez pipetaj yapıldı. Üzerine 1 µl 5’,6,6’-tetrachloro-1,1’,3,3’-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1, Life Technologies, ABD) mitokondriyal membran depolarizasyon boyasından konularak ve tekrar 8-10 kez pipetaj yapıldı. Eppendorflar 30 dk süreyle çalkalamalı su banyosunda 37°C’de inkübe edildi. Süre bitimini takiben 4x100 g de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Sonrasında süpernatant atılarak üzerlerine 300 µl 1XPBS koyuldu ve pipetaj yapıldı. Her bir plate kuyucuğuna 100 µl olacak şekilde bölündü. Plate Reader’da 488 nm eksitasyon, 590 nm (JC-1 kümeleşmeleri) ve 525 nm (JC-1 monomerleri) emisyon dalga boylarında okunup 590/525 nm emisyon oranıyla sonuçlar hesaplandı. Veriler kontrol grubuna kıyasla nispi artış şeklinde grafiklendirildi (282).



Resim 6. Floresans ve spektrofotometrik analizlerin yapıldığı kuyucuk okuyucu (plate reader) cihazı

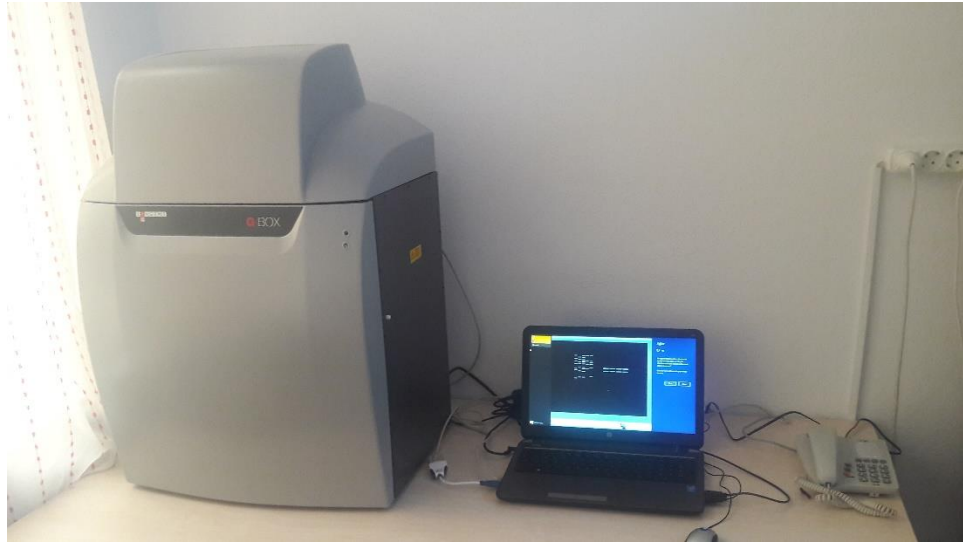
3.2.4.7. Western Blot Analizleri

Tüm Western Blot analizleri standart protokol izlenerek gerçekleştirildi. Her gruba ait flasklar rutin olarak kaldırılıp santrifüjden sonra süpernatant atıldı. Hücreler lizis tamponu içerisinde çözdürüldü. 12000 rpm’de 15 dk boyunca santrifüj edilen hipokampal hücrelerinin üzerinden süpernatant uzaklaştırıldı. Total protein miktarı Bradford yöntemine göre belirlendi. İmmünoiblotlama için %6 ile %13 arasında değişen konsantrasyonlarda Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel (SDS-Page) hazırlandı ve jellere eşdeğer protein (her örnekten $\pm 30 \mu\text{g}$) yüklemesi yapıldı. Elektroforez işlemi ardından jeller nitroselüloz membranlara transfer edildi. Oda sıcaklığında 1 saat boyunca %5 yağsız süt tozu (Pınar, Türkiye) ve %1 Tween 20 içeren Tris Buffered Saline (TBS) ile bekletildi ve 3 defa 5 dk süreyle TBST buffer ile yıkandı. Daha sonra membran primer (Anti-TRPA1 Antibody (Novus Biologicals ABD); Anti TRPM2 Antibody (Abcam Biochemicals, İngiltere); Anti TRPV1 Antibody (Abcam Biochemicals, İngiltere); Caspase 9/p35/p10 Polyclonal Antibody (Proteintech, ABD); Caspase 3, p17-specific Polyclonal Antibody (Proteintech, ABD); Beta Actin Polyclonal Antibody (Abcam Biochemicals, İngiltere); PARP1 Polyclonal Antibody Proteintech, ABD)) ve sekonder antikor (Amersham ECL Rabbit IgG, HRP-

linked whole Ab, İngiltere) ile inkübe edildi. İşlem sonunda β -actin, PARP1, aktif (bölünmüş) kaspaz 3, aktif (bölünmüş) kaspaz 9 ve TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 kanal proteinlerine ait ekspresyon çalışmalarında elde edilen bantlar, hassas jel görüntüleme cihazı (Syngene G:Box, İngiltere) kullanılarak görüntülendi (281).



Resim 7. Western Blot analizi için kullanılan ekipmanlar



Resim 8. Jel görüntüleme cihazı

3.2.5. Etik Kurul İzni

Çalışma protokolü Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK) tarafından (Karar no: 09.07.2015-03 ve Karar no: 18.02.2016-02) uygun bulunmuştur.

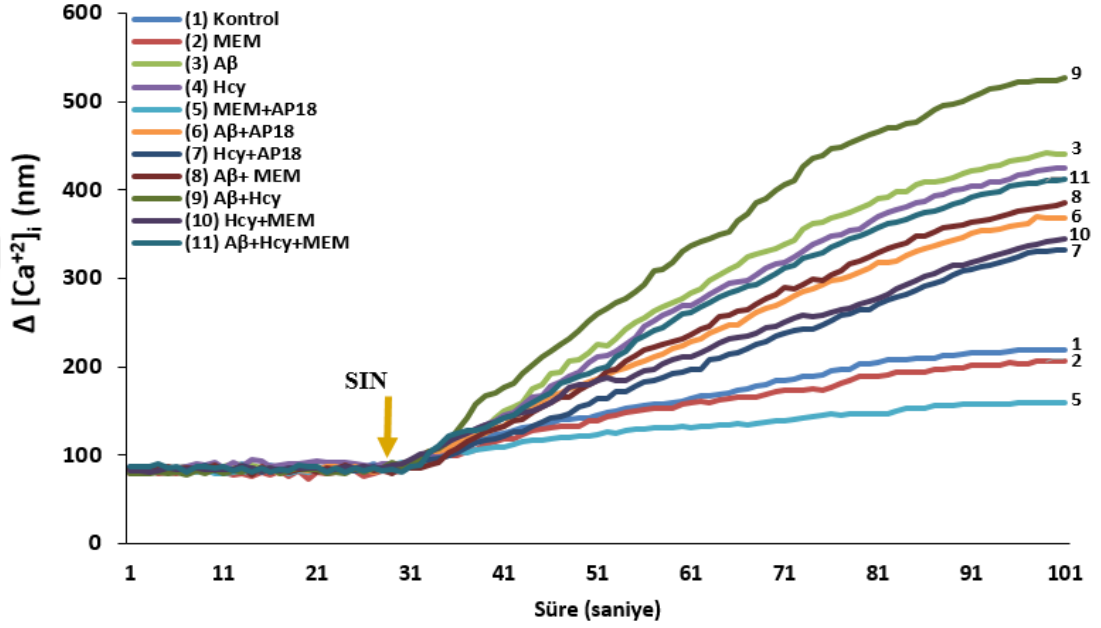
3.2.6. İstatistiksel Analiz

Bütün veriler ortalama \pm standart sapma [mean \pm standard deviation (SD)] olarak verildi. Hipokampus sinir hücrelerinde çalışılan bilimsel değerlerin aritmetik ortalama değerleri arasındaki farklılıklar, SPSS, Windows 17.0 lisanslı paket bilgisayar programı kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Gruplarda istatistiksel önem varlığı ANOVA ve Mann-Whitney *U* testi ile değerlendirildi. Tüm istatistiki karşılaştırmalarda anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

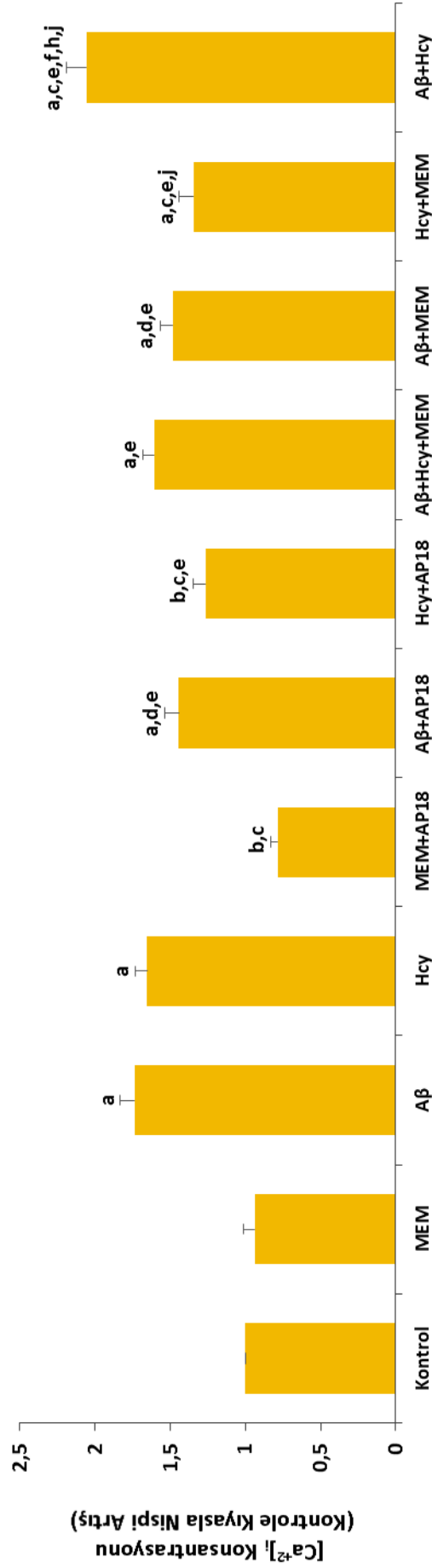
4. BULGULAR

4.1. Hücre İçi Serbest Ca^{+2} Sonuçları

4.1.1. TRPA1 Kanalı ve Sitozolik Ca^{+2} İlişkisi



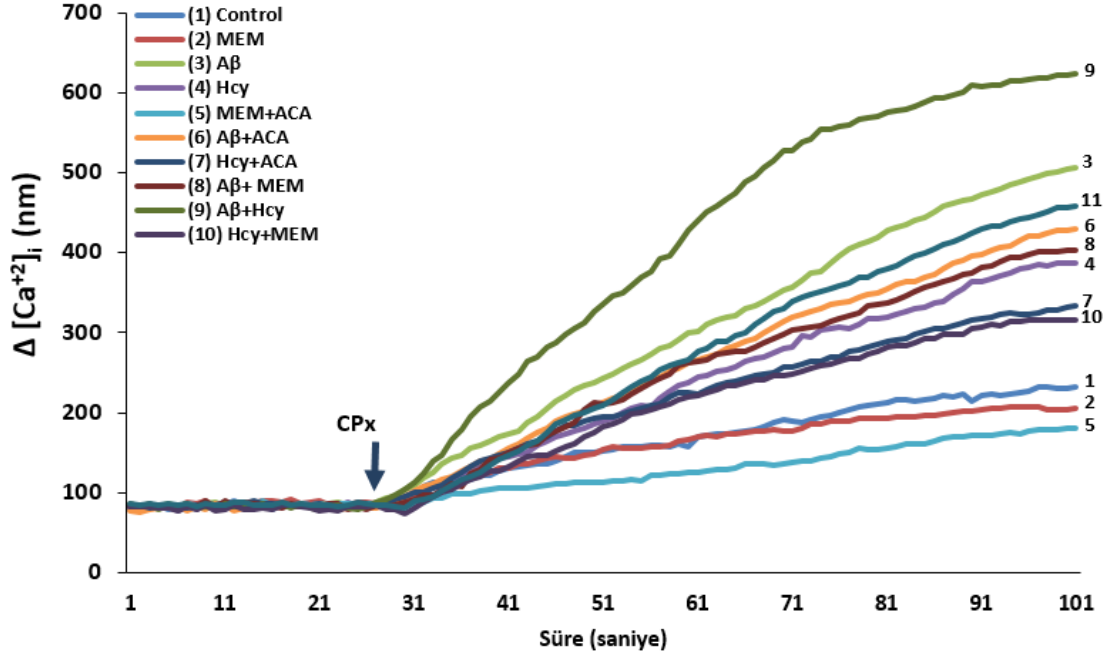
Grafik 1. Hipokampal hücrelerdeki SIN (0.1 mM) ile uyarılan TRPA1 kanallarının aktivasyonunun sitozolik Ca^{+2} miktarındaki değişim üzerine etkisi. Fura-2 AM ile işaretlenmiş Ca^{+2} bulunan ortamda TRPA1 kanalları analiz öncesinde kanal aktivasyonunu net bir şekilde görebilmek amacıyla AP-18 (0.1 mM, 30 dk.) ile inhibe edilmiş ve kayıt esnasında SIN ile uyarım yapılarak toplamda 100 saniyelik sürede kanalın aktive olduğu ve sonrasında aktivasyonun sonlanarak stabil hale geldiği zaman aralığı kayıt altına alınmıştır. Stozole Ca^{+2} akışı yanı sıra alt kısımda bulunan sütun grafik ile de TRPA1 kanal aktivasyonu sonrası sitozolde biriken toplam Ca^{+2} miktarı kontrole kıyasla sunulmuştur.



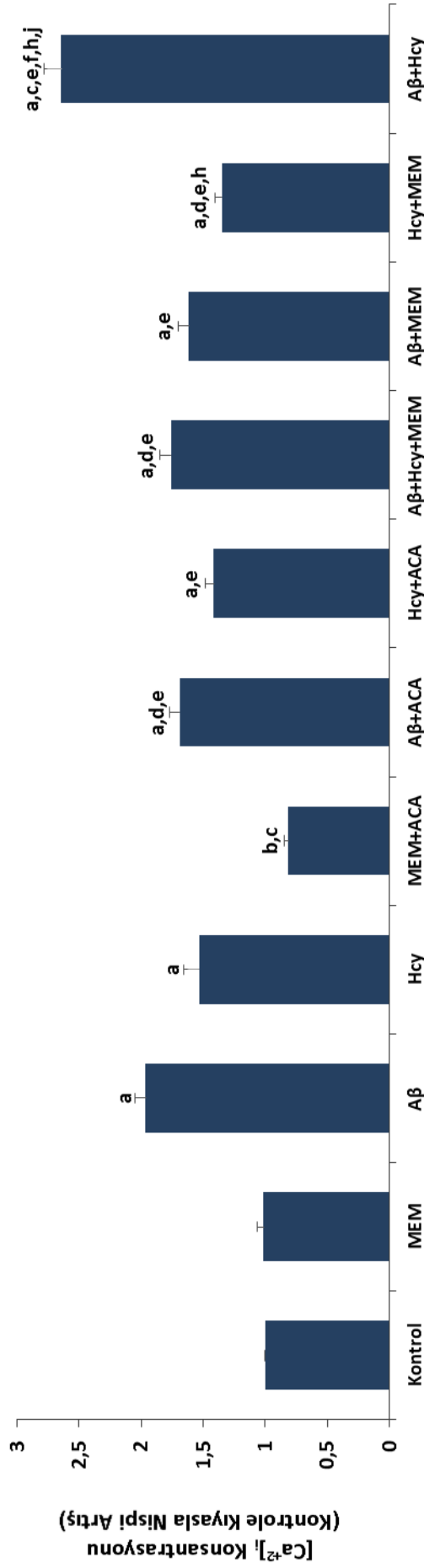
Grafik 2. TRPA1 kanalı aracılığıyla sitozolik Ca⁺² artışının kontrole kıyasla gösterimi. Hipokampal hücrelerin Aβ ile indüklenmesi sonucu oluşturulan in vitro AH modelinde Hcy (0.25 mM) ve MEM (10μM)'in TRPA1 katyon kanalları aracılığıyla stozole Ca⁺² girişi üzerine etkileri. (Ort ± SD ve n=3). Kanal inhibisyonu 0.1 mM AP-18 ile yapılırken uyarımlar ise 0.1 mM SIN ile yapılmıştır. ^ap<0.001 ve ^bp<0.05 kontrol and MEM gruplarına kıyasla. ^cp<0.001 ve ^dp<0.05 Aβ ve Hcy gruplarına kıyasla. ^ep<0.001 MEM+AP-18 grubuna kıyasla. ^fp<0.001 ve ^gp<0.05 Aβ+AP-18 ve Hcy+AP-18 gruplarına kıyasla. ^hp<0.001 ve ⁱp<0.05 Aβ+Hcy+MEM grubuna kıyasla. ^jp<0.001 Aβ+MEM ve Hcy+MEM gruplarına kıyasla.

Tüm gruplara ait hücreler, deney protokolünde belirtildiği şekilde A β , Hcy, MEM ve TRPA1 inhibitörü olan AP-18 ile tek veya kombine olarak inkübe edilmiş, her gruba ait transparan küvette (4 ml hacimli) bulunan hücrelerin sayıları 2,5 milyon hücre olacak şekilde dilüe edilip, çalkalamalı su banyosunda 37°C’de Fura-2 AM ile 45 dk boyanarak kalsiyum salınımları spektrofotometre cihazı ile ölçülmüştür. Stimülör olarak TRPA1 agonisti (sinamaldehit) kullanılmıştır. Tüm gruplara ait serbest Ca⁺² salınıminin zamana göre değişimi grafik 1’de, uyarım sonrası sitozolde biriken toplam Ca⁺² miktarı da grafik 2’de gösterilmiştir. Grafik 2 incelendiğinde hücre içi toplam Ca⁺² miktarlarının, kontrol grubuna kıyasla A β ve Hcy grubunda önemli düzeyde arttığı gözlemlenmiştir (p<0.001). Ancak MEM grubunda kontrole kıyasla anlamlı istatistiksel bir fark bulunamamıştır (p>0.5). AP-18 spesifik TRPA1 kanal antagonisti kullanılan gruplarda (MEM+AP-18, A β +AP-18 ve Hcy+AP-18), kanal inhibisyonu sonrasında sitozolik Ca⁺² miktarının sırasıyla inhibitör uygulanmayan MEM, Hcy ve A β gruplarına kıyasla azalmış olduğu görüldü. A β ve Hcy’nin birlikte kullanıldığı A β +Hcy grubunda sitozolik Ca⁺² düzeyinin, A β ve Hcy grubu yanı sıra diğer tüm gruplara kıyasla önemli düzeyde artmış olduğu görüldü (p<0.001). MEM+AP-18 grubu ile A β +AP-18 ve Hcy+AP-18 grupları kıyaslandığında A β +AP-18 ve Hcy+AP-18 gruplarında daha fazla sitozolik kalsiyum birikimi olduğu görüldü (p<0.001). A β +AP-18 ile Hcy+AP-18 grupları kıyaslandığında ise anlamlı bir fark görülmedi (p>0.5). A β +Hcy+MEM grubu, A β +MEM ve Hcy+MEM ile kıyaslandığında anlamlı istatistiksel bir fark bulunamadı (p>0.5). Bu sonuçlarla; A β ve Hcy ile artan sitozolik Ca⁺² miktarının AP-18 ve MEM kullanılarak azalması sonucu, oksidatif stres ve ROT ile aktive olabilen TRPA1 kanallarının AH’deki önemini göstermektedir.

4.1.2. TRPM2 Kanalı ve Sitozolik Ca^{+2} İlişkisi



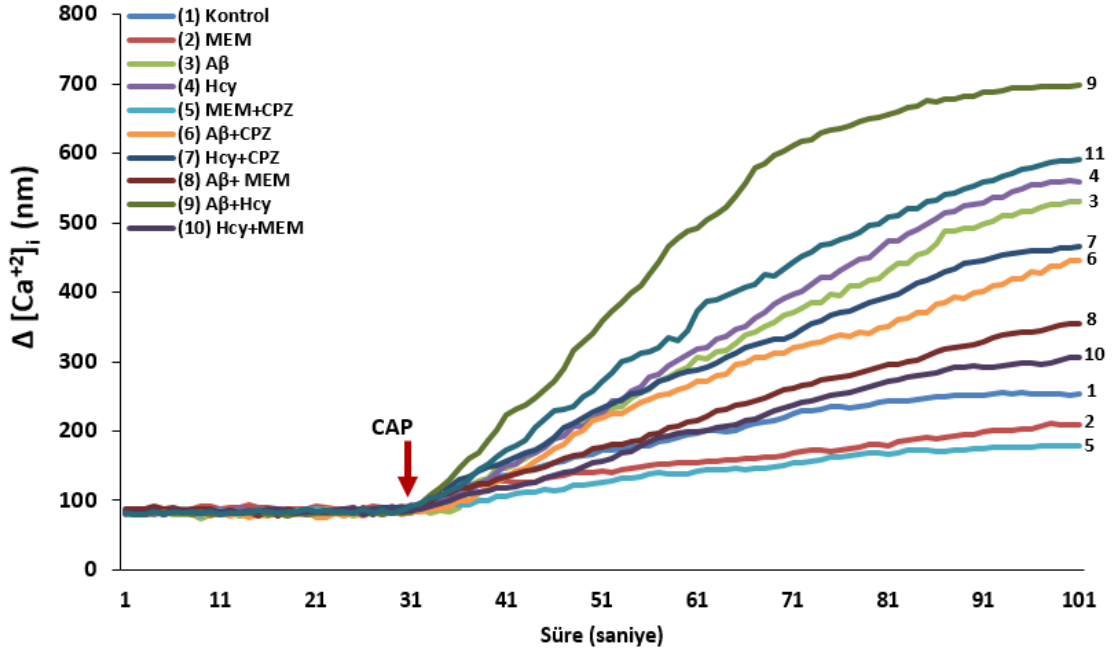
Grafik 3. Hipokampal hücrelerdeki CPx (0.1 mM) ile uyarılan TRPM2 kanallarının aktivasyonunun sitozolik Ca^{+2} miktarındaki değişim üzerine etkisi. Fura-2 AM ile işaretlenmiş Ca^{+2} bulunan ortamda TRPM2 kanalları analiz öncesinde kanal aktivasyonunu net bir şekilde görebilmek amacıyla ACA (0.1 mM, 30 dk.) ile inhibe edilmiş ve kayıt esnasında CPx (kumenhidroperoksit) ile uyarım yapılarak toplamda 100 saniyelik sürede kanalın aktive olduğu ve sonrasında aktivasyonun sonlanarak stabil hale geldiği zaman aralığı kayıt altına alınmıştır. Stozole Ca^{+2} akışı yanı sıra alt kısımda bulunan sütun grafik ile de TRPM2 kanal aktivasyonu sonrası sitozolde biriken toplam Ca^{+2} miktarı kontrole kıyasla sunulmuştur.



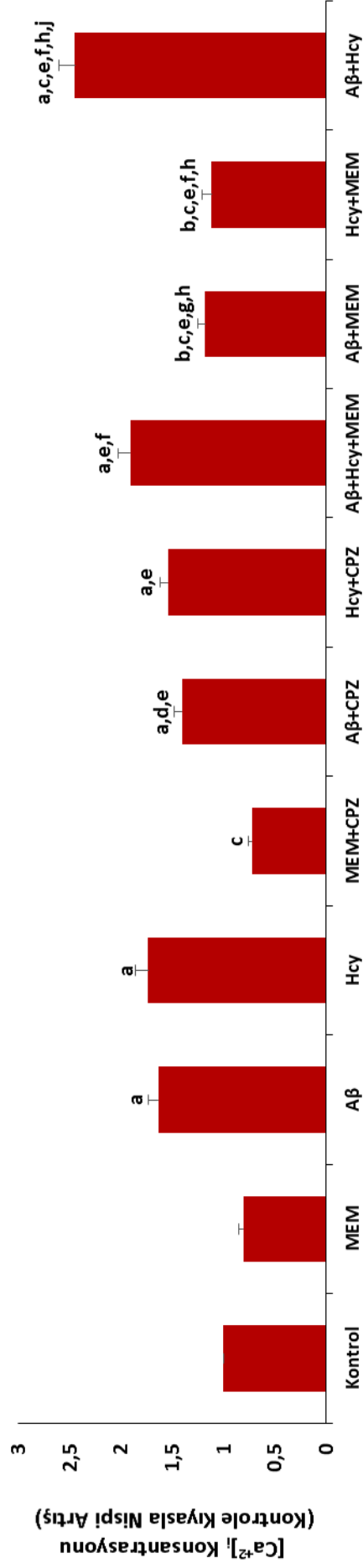
Grafik 4. TRPM2 kanalı aracılığıyla sitozolik Ca⁺² artışının kontrole kıyasla gösterimi. Hipokampal hücrelerin Aβ ile indüklenmesi sonucu oluşturulan in vitro AH modelinde Hcy (0.25 mM) ve MEM (10μM)'in TRPM2 katyon kanalları aracılığıyla stozole Ca⁺² girişi üzerine etkileri. (Ort ± SD ve n=3). TRPM2 kanal inhibisyonu 0.1 mM ACA ile yapılırken uyarımlar ise 0.1 mM CPx ile yapılmıştır. ^ap<0.001 ve ^bp<0.05 kontrol and MEM gruplarına kıyasla. ^cp<0.001 ve ^dp<0.05 Aβ ve Hcy gruplarına kıyasla. ^ep<0.001 MEM+ACA grubuna kıyasla. ^fp<0.001 ve ^gp<0.05 Aβ+ACA ve Hcy+ACA gruplarına kıyasla. ^hp<0.001 ve ⁱp<0.05 Aβ+Hcy+MEM grubuna kıyasla. ^jp<0.001 Aβ+MEM ve Hcy+MEM gruplarına kıyasla.

Tüm gruplara ait hücreler, deney protokolünde belirtildiği şekilde A β , Hcy; MEM ve TRPM2 inhibitörü olan Anthranilic acid (ACA) ile tek veya kombine olarak inkübe edilmiş, her gruba ait transparan küvette (4 ml hacimli) bulunan hücrelerin sayıları 2,5 milyon hücre olacak şekilde dilüe edilip, çalkalamalı su banyosunda 37°C’de Fura-2 AM ile 45 dk boyanarak kalsiyum salınımları spektrofluorometre cihazı ile ölçüldü. Stimülatör olarak TRPM2 agonisti (CPx) kullanıldı. Tüm gruplara ait serbest Ca⁺² salınıminin zamana göre değişimi grafik 3’de, uyarım sonrası sitozolde biriken toplam Ca⁺² miktarı da grafik 4’de gösterilmiştir. Grafik 4 incelendiğinde hücre içi toplam Ca⁺² miktarlarının, kontrol grubuna kıyasla A β ve Hcy grubunda önemli düzeyde arttığı gözlemlendi (p<0.001). Ancak MEM grubunda kontrole kıyasla anlamlı istatistiki bir fark bulunamadı (p>0.5). ACA spesifik TRPM2 kanal antagonisti kullanılan gruplarda (MEM+ACA, A β +ACA ve Hcy+ACA) kanal inhibisyonu sonrasında sitozolik Ca⁺² miktarının sırasıyla inhibitör uygulanmayan MEM, Hcy ve A β gruplarına kıyasla azalmış olduğu görüldü. A β ve Hcy’nin birlikte kombine olarak kullanıldığı A β +Hcy grubunda sitozolik Ca⁺² düzeyinin, A β ve Hcy grubu yanı sıra diğer tüm gruplara kıyasla önemli düzeyde artmış olduğu görüldü (p<0.001). MEM+ACA grubu ile A β +ACA ve Hcy+ACA grupları kıyaslandığında A β +ACA ve Hcy+ACA gruplarında daha fazla sitozolik kalsiyum birikimi olduğu görüldü (p<0.001). A β +ACA ile Hcy+ACA grupları kıyaslandığında ise anlamlı bir fark görülmedi (p>0.5). A β +Hcy+MEM grubu A β +MEM grubu ile kıyaslandığında anlamlı istatistiki bir fark bulunamazken (p>0.5), Hcy+MEM grubu ile kıyaslandığında ise A β +Hcy+MEM’den daha düşük seviyede sitozolik Ca⁺² düzeyinin olduğu görüldü (p<0.001). Bu sonuçlarla; A β ve Hcy ile artan sitozolik Ca⁺² miktarının ACA ve MEM kullanılarak azalması sonucu, oksidatif stres ve ROT ile aktive olabilen TRPM2 kanallarının AH’deki önemini göstermektedir.

4.1.3. TRPV1 Kanalı ve Sitololik Ca^{+2} İlişkisi



Grafik 5. Hipokampal hücrelerdeki CAP (0.1 mM) ile uyarılan TRPV1 kanallarının aktivasyonunun sitozolik Ca^{+2} miktarındaki değişim üzerine etkisi. Fura-2 AM ile işaretlenmiş Ca^{+2} bulunan ortamda TRPV1 kanalları analiz öncesinde kanal aktivasyonunu net bir şekilde görebilmek amacıyla CPZ (0.1 mM, 30 dk.) ile inhibe edilmiş ve kayıt esnasında CAP (kapsaisin) ile uyarım yapılarak toplamda 100 saniyelik sürede kanalın aktive olduğu ve sonrasında aktivasyonun sonlanarak stabil hale geldiği zaman aralığı kayıt altına alınmıştır. Stozole Ca^{+2} akışı yanı sıra alt kısımda bulunan sütun grafik ile de TRPV1 kanal aktivasyonu sonrası sitozolde biriken toplam Ca^{+2} miktarı kontrole kıyasla sunulmuştur.

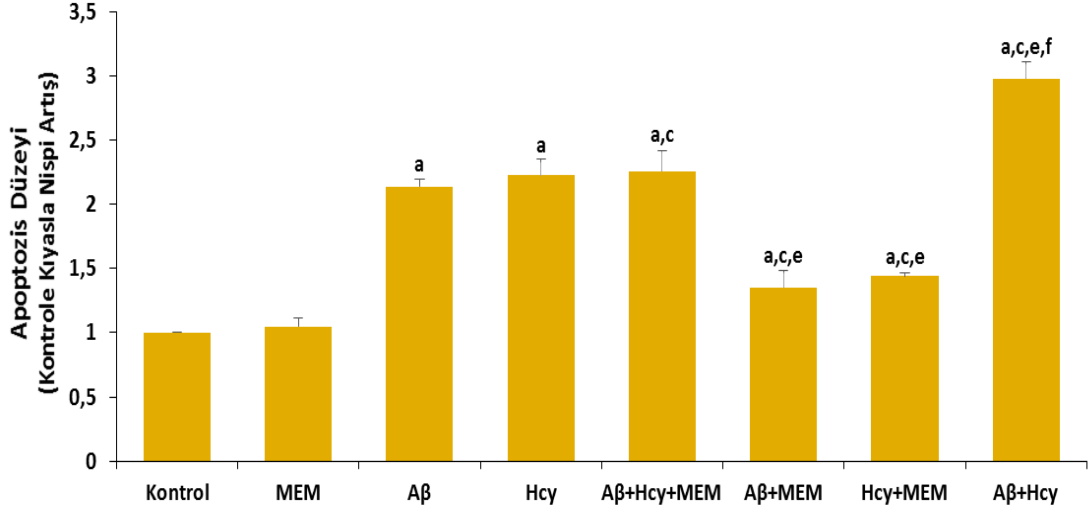


Grafik 6. TRPV1 kanalı aracılığıyla sitozolik Ca⁺² artışının kontrole kıyasla gösterimi. Hipokampal hücrelerin Aβ ile indüklenmesi sonucu oluşturulan in vitro AH modelinde Hcy (0.25 mM) ve MEM (10μM) in TRPV1 katyon kanalları aracılığıyla stozole Ca⁺² girişi üzerine etkileri. (Ort ± SD ve n=3). Kanal inhibisyonu 0.1 mM CPZ ile yapılmıştır. ^ap<0.001 ve ^bp<0.05 kontrol and MEM gruplarına kıyasla. ^cp<0.001 ve ^dp<0.05 Aβ ve Hcy gruplarına kıyasla. ^ep<0.001 MEM+CPZ grubuna kıyasla. ^fp<0.001 ve ^gp<0.05 Aβ+CPZ ve Hcy+CPZ gruplarına kıyasla. ^hp<0.001 ve ⁱp<0.05 Aβ+Hcy+MEM grubuna kıyasla. ^jp<0.001 Aβ+MEM ve Hcy+MEM gruplarına kıyasla.

Tüm gruplara ait hücreler, deney protokolünde belirtildiği şekilde A β , Hcy; MEM ve TRPV1 inhibitörü olan kapsazepin (CPZ) ile tek veya kombine olarak inkübe edilmiş, her gruba ait transparan küvette (4 ml hacimli) bulunan hücrelerin sayıları 2,5 milyon hücre olacak şekilde dilüe edilip, çalkalamalı su banyosunda 37°C'de Fura-2 AM ile 45 dk boyanarak kalsiyum salınımları spektrofloreometre cihazı ile ölçüldü. Stimülör olarak TRPV1 agonisti (CAP) kullanıldı. Tüm gruplara ait serbest Ca⁺² salınımının zamana göre değişimi grafik 5'de, uyarım sonrası sitozolde biriken toplam Ca⁺² miktarı da grafik 6'de gösterilmiştir. Grafik 6 incelendiğinde hücre içi toplam Ca⁺² miktarlarının, kontrol grubuna kıyasla A β ve Hcy grubunda önemli düzeyde arttığı gözlemlendi (p<0.001). Ancak MEM grubunda kontrole kıyasla anlamlı istatistiksel bir fark bulunamadı (p>0.5). CPZ spesifik TRPV1 kanal antagonisti kullanılan gruplarda (MEM+CPZ, A β +CPZ ve Hcy+CPZ) kanal inhibisyonu sonrasında sitozolik Ca⁺² miktarının sırasıyla inhibitör uygulanmayan MEM, Hcy ve A β gruplarına kıyasla azalmış olduğu görüldü. A β ve Hcy'nin birlikte kombine olarak kullanıldığı A β +Hcy grubunda sitozolik Ca⁺² düzeyinin, A β ve Hcy grubu yanı sıra diğer tüm gruplara kıyasla önemli düzeyde artmış olduğu görüldü (p<0.001). MEM+CPZ grubu ile A β +CPZ ve Hcy+CPZ grupları kıyaslandığında A β +CPZ ve Hcy+CPZ gruplarında daha fazla sitozolik kalsiyum birikimi olduğu görüldü (p<0.001). A β +CPZ ile Hcy+CPZ grupları kıyaslandığında ise anlamlı bir fark görülmedi (p>0.5). A β +Hcy+MEM grubu A β +MEM ve Hcy+MEM grupları ile kıyaslandığında ise A β +Hcy+MEM'den daha düşük seviyede sitozolik Ca⁺² düzeyinin olduğu görüldü (p<0.001). Bu sonuçlarla; A β ve Hcy ile artan sitozolik Ca⁺² miktarının CPZ ve MEM kullanılarak azalması sonucu, oksidatif stres ve ROT ile aktive olabilen TRPV1 kanallarının AH'deki önemini göstermektedir.

4.2. Programlı Hücre Ölümü (Apoptozis) Analizi Sonuçları

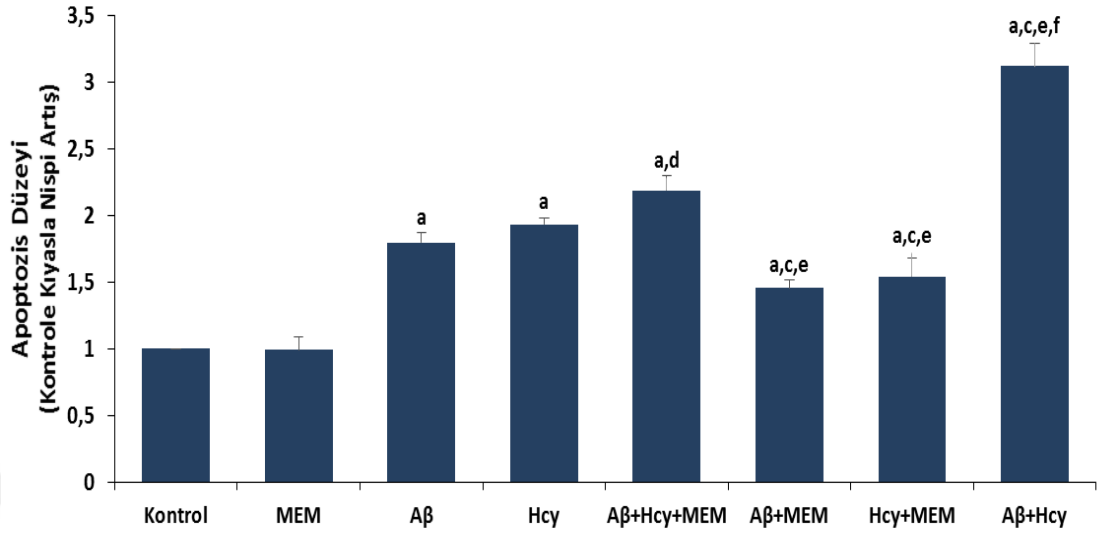
4.2.1. TRPA1 Kanalı ve Apoptozis İlişkisi



Grafik 7. TRPA1 kanalı ve apoptozis ilişkisi. Hipokampal hücrelerin A β ile indüklenmesi sonucu oluşturulan in vitro AH modelinde Hcy (0.25 mM) ve MEM (10 μ M)'in TRPA1 katyon kanalları aracılığıyla programlı hücre ölümü (Apoptozis) üzerine etkileri. (Ort \pm SD ve n=3). Kanal stimülasyonları 0.1 mM SIN ile yapılmıştır. ^ap<0.001 ve ^bp<0.05 kontrol ve MEM gruplarına kıyasla. ^cp<0.001 ve ^dp<0.05 A β ve Hcy gruplarına kıyasla. ^ep<0.001 ve ^fp<0.05 A β +Hcy+MEM grubuna kıyasla. ^gp<0.001 A β +MEM ve Hcy+MEM gruplarına kıyasla.

Apoptozis sonuçlarını gösteren grafik incelendiğinde SIN (0.1 mM) ile uyarılan A β , Hcy ve A β +Hcy gruplarının hücre ölümünü kontrol ve MEM grubuna kıyasla artırdığı görüldü (p<0.001). MEM grubu, kontrol grubu ile kıyaslandığında ise herhangi bir istatistiki fark görülmediğinden (p>0.5), diğer grupların anlamlılık düzeyi bu iki gruba kıyasla istatistiki olarak belirlenmiştir. A β +MEM, Hcy+MEM, A β +Hcy+MEM grupları; MEM uygulanmayan A β , Hcy ve A β +Hcy grupları ile kıyaslandığında bu gruplarda uygulanan MEM'in hücre ölümünü azalttığı görüldü (p<0.001). A β +Hcy+MEM grubu ile A β +MEM ve Hcy+MEM grupları kıyaslandığında, A β +MEM ve Hcy+MEM gruplarının apoptozis düzeyinin daha düşük seviyede olduğu görüldü (p<0.001). A β grubu ile Hcy grubu birbiri ile kıyaslandığında da aralarında istatistiki bir fark olmadığı görüldü (p>0.5). Ancak A β +Hcy grubu hem A β hem de Hcy grupları ile kıyaslandığında ise A β +Hcy grubunun hücre ölümü düzeyinin artmış olduğu görüldü (p<0.001).

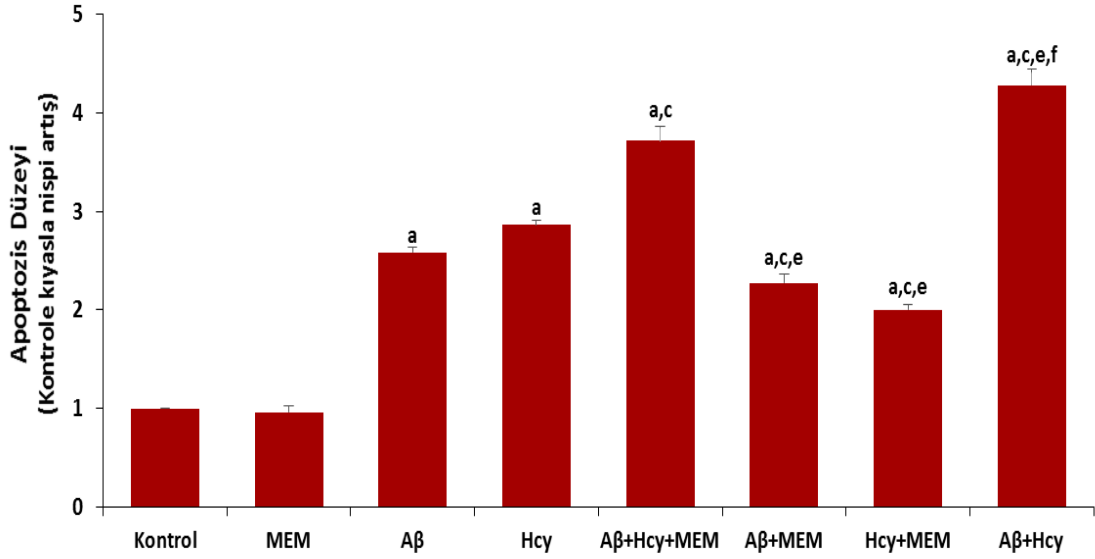
4.2.2. TRPM2 Kanalı ve Apoptozis İlişkisi



Grafik 8. TRPM2 kanalı ve apoptozis ilişkisi. Hipokampal hücrelerin A β ile indüklenmesi sonucu oluşturulan in vitro AH modelinde Hcy (0.25 mM) ve MEM (10 μ M)'in TRPA1 katyon kanalları aracılığıyla programlı hücre ölümü (Apoptozis) üzerine etkileri. (Ort \pm SD ve n=3). Kanal stimülasyonları 0.1 mM CPx ile yapılmıştır. ^ap<0.001 ve ^bp<0.05 kontrol ve MEM gruplarına kıyasla. ^cp<0.001 ve ^dp<0.05 A β ve Hcy gruplarına kıyasla. ^ep<0.001 ve ^fp<0.05 A β +Hcy+MEM grubuna kıyasla. ^gp<0.001 A β +MEM ve Hcy+MEM gruplarına kıyasla.

Apoptozis sonuçlarını gösteren grafik incelendiğinde CPx (0.1 mM) ile uyarılan A β , Hcy ve A β +Hcy gruplarının hücre ölümünü kontrol ve MEM grubuna kıyasla artırdığı görüldü (p<0.001). MEM grubu, kontrol grubu ile kıyaslandığında ise herhangi bir istatistiksel fark görülmediğinden (p>0.5), diğer grupların anlamlılık düzeyi bu iki gruba kıyasla istatistiksel olarak belirlenmiştir. A β +MEM, Hcy+MEM, A β +Hcy+MEM grupları; MEM uygulanmayan A β , Hcy ve A β +Hcy grupları ile kıyaslandığında bu gruplarda uygulanan MEM'in hücre ölümünü azalttığı görüldü (p<0.001). A β +Hcy+MEM grubu ile A β +MEM ve Hcy+MEM grupları kıyaslandığında, A β +MEM ve Hcy+MEM gruplarının apoptozis düzeyinin daha düşük seviyede olduğu görüldü (p<0.001). A β grubu ile Hcy grubu birbiri ile kıyaslandığında da aralarında istatistiksel bir fark olmadığı görüldü (p>0.5). Ancak A β +Hcy grubu hem A β hem de Hcy grupları ile kıyaslandığında ise A β +Hcy grubunun hücre ölümü düzeyinin artmış olduğu görüldü (p<0.001).

4.2.3. TRPV1 Kanalı ve Apoptozis İlişkisi

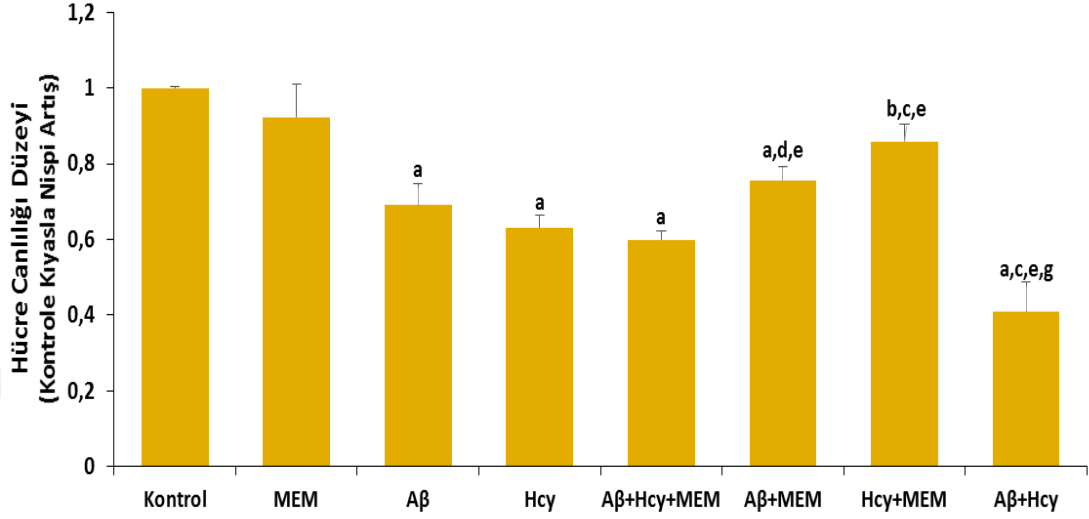


Grafik 9. TRPV1 kanalı ve apoptozis ilişkisi. Hipokampal hücrelerin A β ile indüklenmesi sonucu oluşturulan in vitro AH modelinde Hcy (0.25 mM) ve MEM (10 μ M)'in TRPA1 katyon kanalları aracılığıyla programlı hücre ölümü (Apoptozis) üzerine etkileri. (Ort \pm SD ve n=3). Kanal stimülasyonları 0.01 mM CAP ile yapılmıştır. ^ap<0.001 ve ^bp<0.05 kontrol ve MEM gruplarına kıyasla. ^cp<0.001 ve ^dp<0.05 A β ve Hcy gruplarına kıyasla. ^ep<0.001 ve ^fp<0.05 A β +Hcy+MEM grubuna kıyasla. ^gp<0.001 A β +MEM ve Hcy+MEM gruplarına kıyasla.

Apoptozis sonuçlarını gösteren grafik incelendiğinde CAP (0.1 mM) ile uyarılan A β , Hcy ve A β +Hcy gruplarının hücre ölümünü kontrol ve MEM grubuna kıyasla artırdığı görüldü (p<0.001). MEM grubu, kontrol grubu ile kıyaslandığında ise herhangi bir istatistiki fark görülmediğinden (p>0.5), diğer grupların anlamlılık düzeyi bu iki gruba kıyasla istatistiki olarak belirlenmiştir. A β +MEM, Hcy+MEM, A β +Hcy+MEM grupları; MEM uygulanmayan A β , Hcy ve A β +Hcy grupları ile kıyaslandığında bu gruplarda uygulanan MEM'in hücre ölümünü azalttığı görüldü (p<0.001). A β +Hcy+MEM grubu ile A β +MEM ve Hcy+MEM grupları kıyaslandığında, A β +MEM ve Hcy+MEM gruplarının apoptozis düzeyinin daha düşük seviyede olduğu görüldü (p<0.001). A β grubu ile Hcy grubu birbiri ile kıyaslandığında da aralarında istatistiki bir fark olmadığı görüldü (p>0.5). Ancak A β +Hcy grubu hem A β hem de Hcy grupları ile kıyaslandığında ise A β +Hcy grubunun hücre ölümü düzeyinin artmış olduğu görüldü (p<0.001).

4.3. Hücre Canlılığı (MTT) Analizi Sonuçları

4.3.1. TRPA1 Kanalı ve Hücre Canlılığı İlişkisi

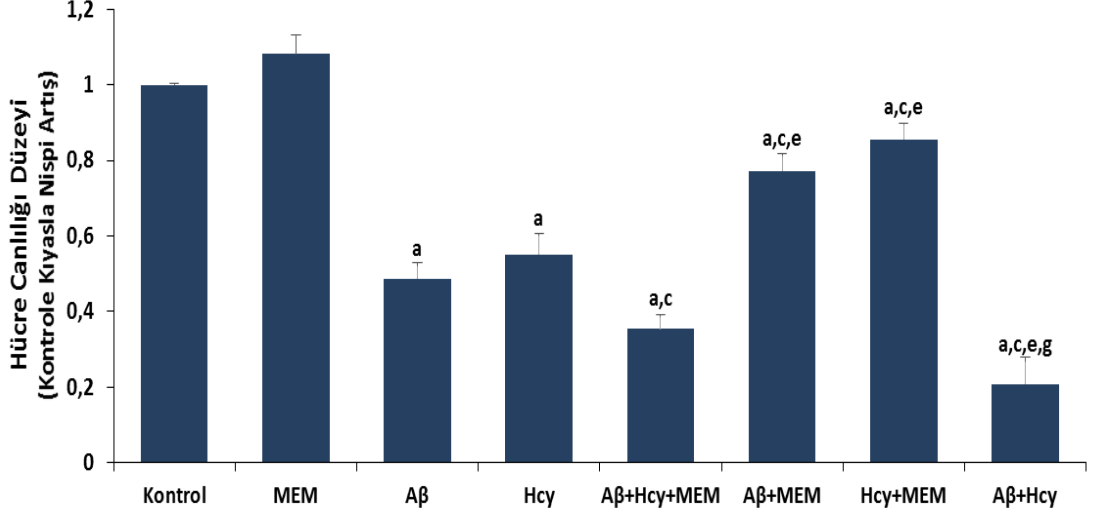


Grafik 10. TRPA1 kanalı ve hücre canlılığı (MTT) ilişkisi. Hipokampal hücrelerin Aβ ile indüklenmesi sonucu oluşturulan in vitro AH modelinde Hcy (0.25 mM) ve MEM (10 μM)'in TRPA1 katyon kanalları aracılığıyla hücre canlılığı üzerine etkileri. (Ort ± SD ve n=3). Kanal stimülasyonları 0.1 mM SIN ile yapılmıştır. ^ap<0.001 ve ^bp<0.05 kontrol ve MEM gruplarına kıyasla. ^cp<0.001 ve ^dp<0.05 Aβ ve Hcy gruplarına kıyasla. ^ep<0.001 ve ^fp<0.05 Aβ+Hcy+MEM grubuna kıyasla. ^gp<0.001 Aβ+MEM ve Hcy+MEM gruplarına kıyasla.

MTT sonuçlarını gösteren grafik incelendiğinde, SIN (0.1 mM) ile uyarılan Aβ, Hcy ve Aβ+Hcy, Aβ+MEM, Hcy+MEM ve Aβ+Hcy+MEM grupları, kontrol ve MEM grupları ile kıyaslandığında kontrol ve MEM grubu harici diğer gruplarda hücre canlılığının daha da azalmış olduğu görüldü (p<0.001 ve p<0.05). MEM grubu, Kontrolle kıyaslandığında ise herhangi bir fark görülmediğinden (p>0.5) diğer grupların anlamlılık düzeyi bu iki gruba kıyasla istatistiksel olarak belirlendi. Aβ grubu ile Hcy grubu birbiri ile kıyaslandığında da aralarında istatistiksel bir fark olmadığı görüldü (p>0.5). Aβ+MEM, Hcy+MEM, Aβ+Hcy+MEM grupları; MEM uygulanmayan Aβ, Hcy ve Aβ+Hcy grupları ile kıyaslandığında MEM'in hücre ölümünü azalttığı görüldü (p<0.001 ve p<0.05). Aβ+Hcy+MEM grubu ile Aβ+MEM ve Hcy+MEM grupları kıyaslandığında ise Aβ+Hcy+MEM grubunda hücre canlılık düzeyinin daha düşük olduğu görüldü (p<0.001). Ancak Aβ+Hcy grubu, Aβ ve Hcy

grupları ile kıyaslanmasının yanı sıra diğer tüm gruplarla kıyaslandığında da en az hücre canlılık düzeyine sahip olduğu görüldü ($p<0.001$).

4.3.2. TRPM2 Kanalı ve Hücre Canlılığı İlişkisi

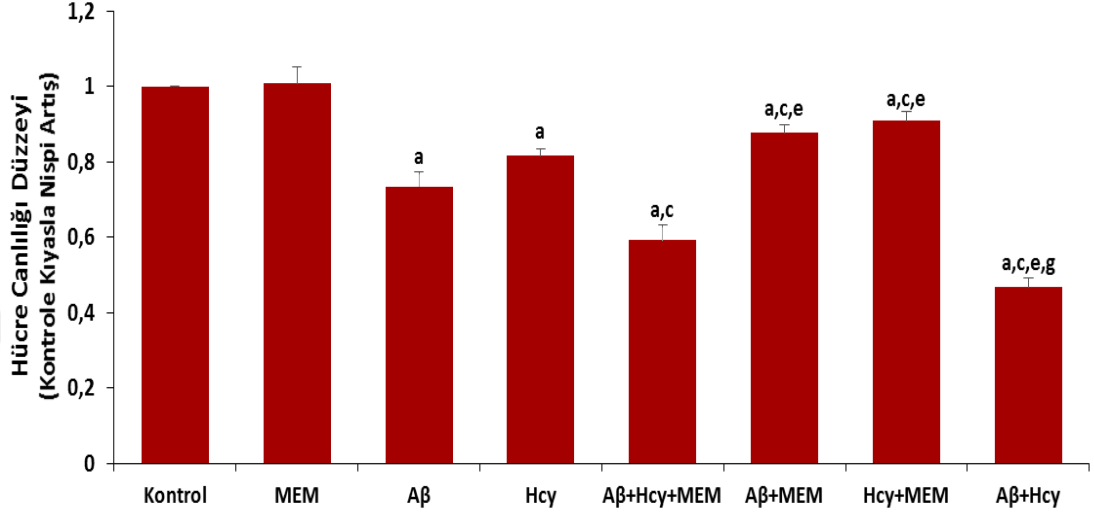


Grafik 11. TRPM2 kanalı ve hücre canlılığı (MTT) ilişkisi. Hipokampal hücrelerin A β ile indüklenmesi sonucu oluşturulan in vitro AH modelinde Hcy (0.25 mM) ve MEM (10 μ M)'in TRPA1 katyon kanalları aracılığıyla hücre canlılığı üzerine etkileri. (Ort \pm SD ve n=3). Kanal stimülasyonları 0.1 mM CPx ile yapılmıştır. ^a $p<0.001$ ve ^b $p<0.05$ kontrol ve MEM gruplarına kıyasla. ^c $p<0.001$ ve ^d $p<0.05$ A β ve Hcy gruplarına kıyasla. ^e $p<0.001$ ve ^f $p<0.05$ A β +Hcy+MEM grubuna kıyasla. ^g $p<0.001$ A β +MEM ve Hcy+MEM gruplarına kıyasla.

MTT sonuçlarını gösteren grafik incelendiğinde, CPx (0.1 mM) ile uyarılan A β , Hcy ve A β +Hcy, A β +MEM, Hcy+MEM ve A β +Hcy+MEM grupları, kontrol ve MEM grupları ile kıyaslandığında Kontrol ve MEM grubu harici diğer gruplarda hücre canlılığının daha da azalmış olduğu görüldü ($p<0.001$ ve $p<0.05$). MEM grubu, Kontrolle kıyaslandığında ise herhangi bir fark görülmediğinden ($p>0.5$) diğer grupların anlamlılık düzeyi bu iki gruba kıyasla istatistiki olarak belirlendi. A β grubu ile Hcy grubu birbiri ile kıyaslandığında da aralarında istatistiki bir fark olmadığı görüldü ($p>0.5$). A β +MEM, Hcy+MEM, A β +Hcy+MEM grupları; MEM uygulanmayan A β , Hcy ve A β +Hcy grupları ile kıyaslandığında MEM'in hücre ölümünü azalttığı görüldü ($p<0.001$ ve $p<0.05$). A β +Hcy+MEM grubu ile A β +MEM ve Hcy+MEM grupları kıyaslandığında ise A β +Hcy+MEM grubunda hücre canlılık düzeyinin daha düşük olduğu görüldü ($p<0.001$). Ancak A β +Hcy grubu, A β ve Hcy

grupları ile kıyaslanmasının yanı sıra diğer tüm gruplarla kıyaslandığında da en az hücre canlılık düzeyine sahip olduğu görüldü ($p<0.001$).

4.3.3. TRPV1 Kanalı ve Hücre Canlılığı İlişkisi



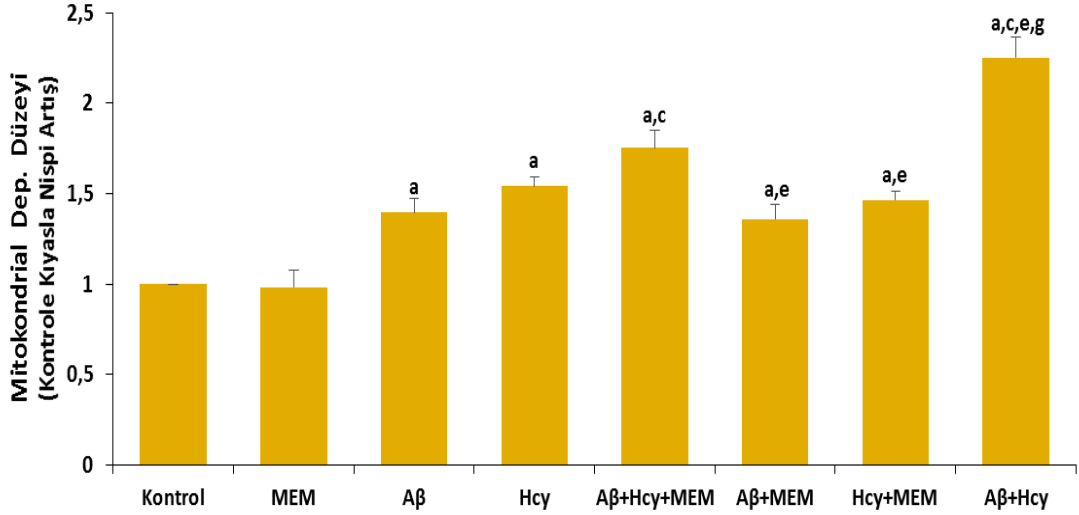
Grafik 12. TRPV1 kanalı ve hücre canlılığı (MTT) ilişkisi. Hipokampal hücrelerin Aβ ile indüklenmesi sonucu oluşturulan in vitro AH modelinde Hcy (0.25 mM) ve MEM (10 μM)'in TRPA1 katyon kanalları aracılığıyla hücre canlılığı üzerine etkileri. (Ort ± SD ve n=3). Kanal stimülasyonları 0.1 mM CAP ile yapılmıştır. ^a $p<0.001$ ve ^b $p<0.05$ kontrol ve MEM gruplarına kıyasla. ^c $p<0.001$ ve ^d $p<0.05$ Aβ ve Hcy gruplarına kıyasla. ^e $p<0.001$ ve ^f $p<0.05$ Aβ+Hcy+MEM grubuna kıyasla. ^g $p<0.001$ Aβ+MEM ve Hcy+MEM gruplarına kıyasla.

MTT sonuçlarını gösteren grafik incelendiğinde, CAP (0.1 mM) ile uyarılan Aβ, Hcy ve Aβ+Hcy, Aβ+MEM, Hcy+MEM ve Aβ+Hcy+MEM grupları, kontrol ve MEM grupları ile kıyaslandığında Kontrol ve MEM grubu harici diğer gruplarda hücre canlılığının daha da azalmış olduğu görüldü ($p<0.001$ ve $p<0.05$). MEM grubu, Kontrolle kıyaslandığında ise istatistiki olarak herhangi bir fark görülmediğinden ($p>0.5$) diğer grupların anlamlılık düzeyi bu iki gruba kıyasla istatistiki olarak belirlendi. Aβ+MEM, Hcy+MEM, Aβ+Hcy+MEM grupları; MEM uygulanmayan Aβ, Hcy ve Aβ+Hcy grupları ile kıyaslandığında MEM'in hücre ölümünü azalttığı görüldü ($p<0.001$ ve $p<0.05$). Aβ+Hcy+MEM grubu ile Aβ+MEM ve Hcy+MEM grupları kıyaslandığında ise Aβ+Hcy+MEM grubunda hücre canlılık düzeyinin daha düşük olduğu görüldü ($p<0.001$). Aβ+MEM ve Hcy+MEM grupları birbiri ile kıyaslandığında ise istatistiki olarak herhangi bir fark görülmedi ($p>0.5$). Ancak

A β +Hcy grubu, A β ve Hcy grupları ile kıyaslanmasının yanı sıra diğer tüm gruplarla kıyaslandığında da en az hücre canlılık düzeyine sahip olduğu görüldü ($p<0.001$).

4.4. Mitokondriyal Depolarizasyon Analizi Sonuçları

4.4.1. TRPA1 Kanalı ve Mitokondriyal Depolarizasyon İlişkisi

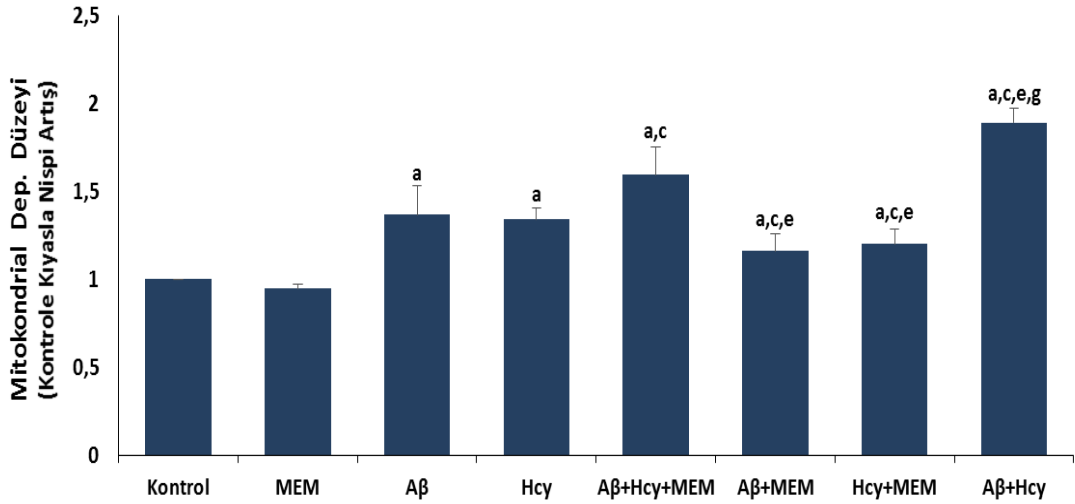


Grafik 13. TRPA1 kanalı ve mitokondriyal depolarizasyon ilişkisi. Hipokampal hücrelerin A β ile indüklenmesi sonucu oluşturulan in vitro AH modelinde Hcy (0.25 mM) ve MEM (10 μ M)'in TRPA1 katyon kanalları aracılığıyla mitokondriyal depolarizasyon üzerine etkileri. (Ort \pm SD ve n=3). Kanal stimülasyonu 0.1 mM SIN ile yapılmıştır. ^a $p<0.001$ ve ^b $p<0.05$ Kontrol and MEM gruplarına kıyasla. ^c $p<0.001$ ve ^d $p<0.05$ A β ve Hcy gruplarına kıyasla. ^e $p<0.001$ ve ^f $p<0.05$ A β +Hcy+MEM grubuna kıyasla. ^g $p<0.001$ A β +MEM ve Hcy+MEM gruplarına kıyasla.

Mitokondriyal depolarizasyon sonuçlarını gösteren grafik incelendiğinde, SIN ile uyarılan A β , Hcy ve A β +Hcy, A β +MEM, Hcy+MEM, A β +Hcy+MEM grupları kontrol ve MEM grupları ile kıyaslandığında genel olarak mitokondriyal depolarizasyon düzeylerinin artmış olduğu sonucu elde edildi ($p<0.001$). MEM grubu, Kontrole kıyaslandığında ise herhangi bir fark görülmedi ve bu yüzden diğer gruplar Kontrol ve MEM grubuna göre birlikte kıyaslama yapıldı ($p>0.5$). A β grubu Hcy grubu ile kıyaslandığında herhangi bir istatistiki fark görülmediğinden ($p>0.5$) diğer grupların anlamlılık düzeyi bu iki gruba kıyasla istatistiki olarak belirlendi. A β ve Hcy grupları, A β +MEM ve Hcy+MEM grupları ile kıyaslandığında herhangi bir istatistiki fark görülmedi ($p>0.5$). A β +Hcy+MEM grubu ile A β +MEM ve Hcy+MEM grupları

kıyaslandığında mitokondriyal depolarizasyonun A β +MEM ve Hcy+MEM gruplarında daha da azalmış olduğu görüldü ($p<0.001$). A β +Hcy grubu A β ve Hcy grupları yanı sıra diğer tüm gruplarla kıyaslandığında da mitokondriyal depolarizasyon düzeyinin en fazla A β +Hcy grubunda artmış olduğu görüldü ($p<0.001$).

4.4.2. TRPM2 Kanalı ve Mitokondriyal Depolarizasyon İlişkisi

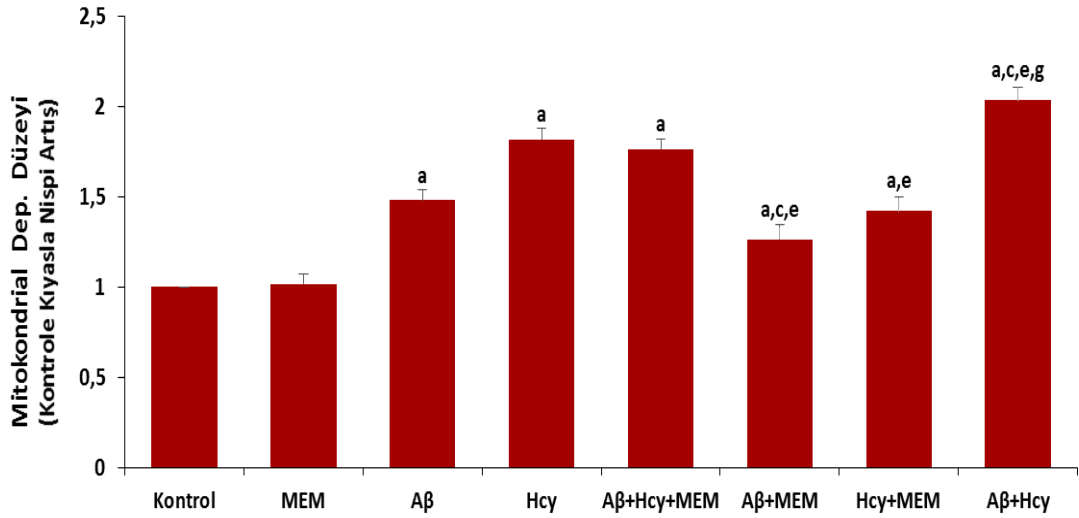


Grafik 14. TRPM2 kanalı ve mitokondriyal depolarizasyon ilişkisi. Hipokampal hücrelerin A β ile indüklenmesi sonucu oluşturulan in vitro AH modelinde Hcy (0.25 mM) ve MEM (10 μ M)'in TRPM2 katyon kanalları aracılığıyla mitokondriyal depolarizasyon üzerine etkileri. (Ort \pm SD ve n=3). Kanal stimülasyonları 0.1 mM CPx ile yapılmıştır. (^a $p<0.001$ ve ^b $p<0.05$ Kontrol and MEM gruplarına kıyasla. ^c $p<0.001$ ve ^d $p<0.05$ A β ve Hcy gruplarına kıyasla. ^e $p<0.001$ ve ^f $p<0.05$ A β +Hcy+MEM grubuna kıyasla. ^g $p<0.001$ A β +MEM ve Hcy+MEM gruplarına kıyasla).

Mitokondriyal depolarizasyon sonuçlarını gösteren grafik incelendiğinde, CPx ile uyarılan A β , Hcy ve A β +Hcy, A β +MEM, Hcy+MEM, A β +Hcy+MEM grupları kontrol ve MEM grupları ile kıyaslandığında genel olarak artmış olduğu sonucu elde edildi ($p<0.001$). A β +MEM, Hcy+MEM, A β +Hcy+MEM grupları; MEM uygulanmayan A β , Hcy ve A β +Hcy grupları ile kıyaslandığında MEM'in mitokondri depolarizasyonunu azalttığı görüldü ($p<0.001$ ve $p<0,05$). MEM grubu, Kontrol grubu ile kıyaslandığında herhangi bir istatistikî fark görülmediğinden ($p>0.5$) diğer grupların anlamlılık düzeyi bu iki gruba kıyasla istatistikî olarak belirlendi. Ancak A β +Hcy grubu A β ve Hcy grupları yanı sıra diğer tüm gruplarla kıyaslandığında da mitokondriyal depolarizasyon düzeyinin en fazla A β +Hcy grubunda artmış olduğu

görüldü ($p < 0.001$). $A\beta + Hcy + MEM$ grubu ile $A\beta + MEM$ ve $Hcy + MEM$ grupları kıyaslandığında mitokondriyal depolarizasyonun $A\beta + MEM$ ve $Hcy + MEM$ gruplarında daha da azalmış olduğu görüldü ($p < 0.001$). $A\beta + MEM$ ile $Hcy + MEM$ grupları birbirleri ile kıyaslandığında herhangi bir istatistiki fark görülmedi ($p > 0.5$).

4.4.3. TRPV1 Kanalı ve Mitokondriyal Depolarizasyon İlişkisi



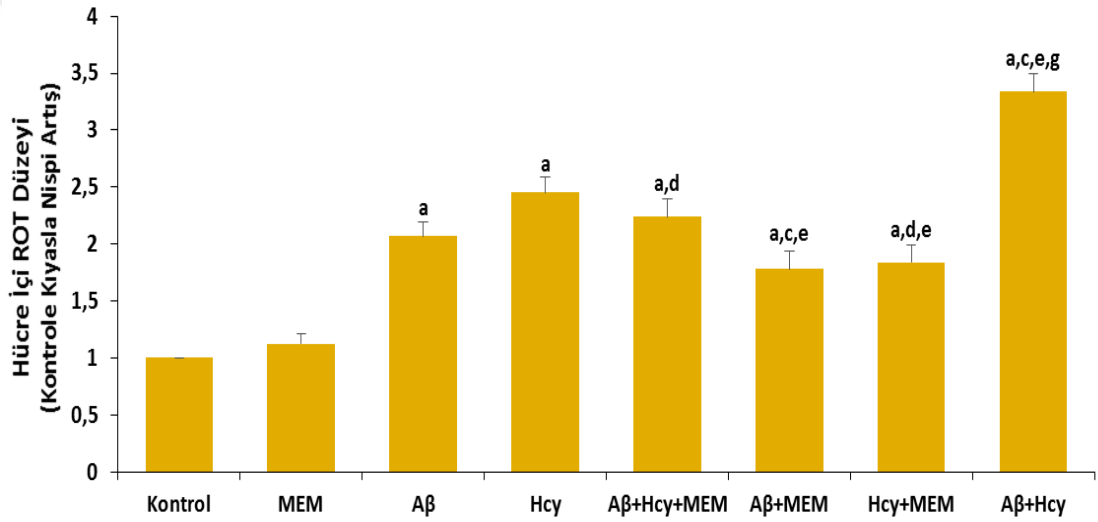
Grafik 15. TRPV1 kanalı ve mitokondriyal depolarizasyon ilişkisi. Hipokampal hücrelerin $A\beta$ ile indüklenmesi sonucu oluşturulan in vitro AH modelinde Hcy (0.25 mM) ve MEM (10 μ M)'in TRPV1 katyon kanalları aracılığıyla mitokondriyal depolarizasyon üzerine etkileri. (Ort \pm SD ve $n=3$). Kanal stimülasyonları 0.1 mM CAP ile yapılmıştır. ^a $p < 0.001$ ve ^b $p < 0.05$ Kontrol and MEM gruplarına kıyasla. ^c $p < 0.001$ ve ^d $p < 0.05$ $A\beta$ ve Hcy gruplarına kıyasla. ^e $p < 0.001$ ve ^f $p < 0.05$ $A\beta + Hcy + MEM$ grubuna kıyasla. ^g $p < 0.001$ $A\beta + MEM$ ve $Hcy + MEM$ gruplarına kıyasla.

Mitokondriyal depolarizasyon sonuçlarını gösteren grafik incelendiğinde, CAP ile uyarılan $A\beta$, Hcy ve $A\beta + Hcy$, $A\beta + MEM$, $Hcy + MEM$, $A\beta + Hcy + MEM$ grupları kontrol ve MEM grupları ile kıyaslandığında mitokondriyal depolarizasyon düzeyinin genel olarak artmış olduğu görüldü ($p < 0.001$). $A\beta + MEM$ ve $A\beta + Hcy + MEM$ grupları; sırasıyla MEM uygulanmayan $A\beta$ ve $A\beta + Hcy$ grupları ile kıyaslandığında MEM'in mitokondriyal depolarizasyonu azalttığı görüldü ($p < 0.001$). Ancak Hcy ile $Hcy + MEM$ grubu kıyaslandığında ise aralarında istatistiki bir fark olmadığı görüldü ($p > 0.5$). MEM grubu, Kontrole kıyaslandığında ise herhangi bir fark görülmedi ve bu yüzden diğer gruplar Kontrol ve MEM grubuna göre birlikte kıyaslama yapıldı ($p > 0.5$).

A β +Hcy grubu A β ve Hcy grupları yanı sıra diğer tüm gruplarla kıyaslandığında da mitokondriyal depolarizasyon düzeyinin en fazla A β +Hcy grubunda artmış olduğu görüldü ($p<0.001$). A β +Hcy+MEM grubu ile A β +MEM ve Hcy+MEM grupları kıyaslandığında mitokondriyal depolarizasyonun A β +MEM ve Hcy+MEM gruplarında daha da azalmış olduğu görüldü ($p<0.001$). A β +MEM ile Hcy+MEM grupları birbirleri ile kıyaslandığında herhangi bir istatistiki fark görülmedi ($p>0.5$).

4.5. Hücre İçi ROT Analizi Sonuçları

4.5.1. TRPA1 Kanalı ve Hücre İçi ROT Üretimi İlişkisi

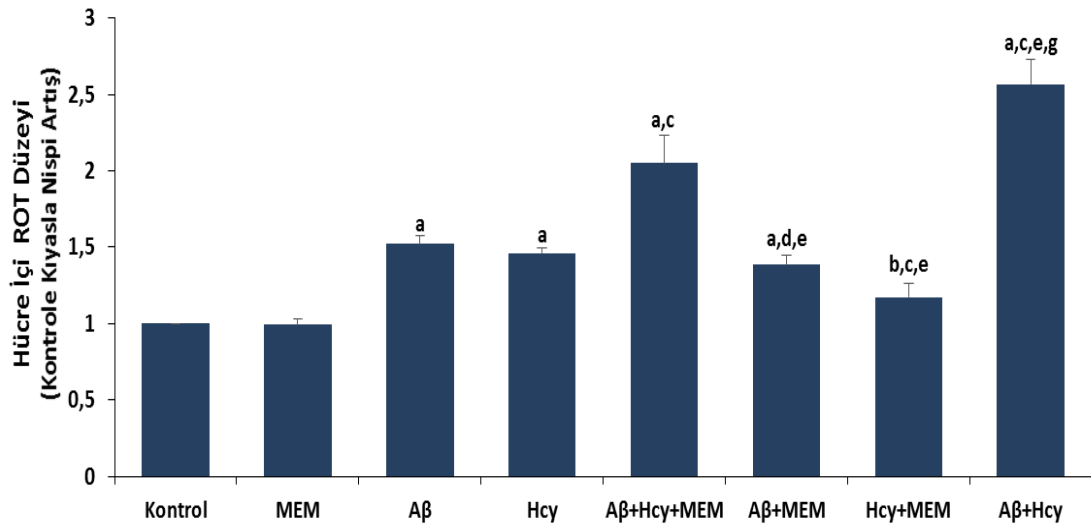


Grafik 16. TRPA1 kanalı ve hücre içi ROT üretimi ilişkisi. Hipokampal hücrelerin A β ile indüklenmesi sonucu oluşturulan in vitro AH modelinde Hcy (0.25 mM) ve MEM (10 μ M)'in TRPA1 katyon kanalları aracılığıyla hücre içi reaktif oksijen türleri üzerine etkileri. (Ort \pm SD ve n=3). Kanal stimülasyonları 0.1 mM SIN ile yapılmıştır. ^a $p<0.001$ ve ^b $p<0.05$ Kontrol and MEM gruplarına kıyasla. ^c $p<0.001$ ve ^d $p<0.05$ A β ve Hcy gruplarına kıyasla. ^e $p<0.001$ ve ^f $p<0.05$ A β +Hcy+MEM grubuna kıyasla. ^g $p<0.001$ A β +MEM ve Hcy+MEM gruplarına kıyasla.

Hücre içi ROT analizi sonuçlarını gösteren grafik incelendiğinde, SIN ile uyarılan A β , Hcy ve A β +Hcy, A β +MEM, Hcy+MEM, A β +Hcy+MEM grupları kontrol ve MEM grupları ile kıyaslandığında ROT düzeylerinin artmış olduğu sonucu elde edildi ($p<0.001$). MEM grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında ise herhangi bir istatistiki fark görülmedi ve bu yüzden diğer gruplar kontrol ve MEM grubuna göre birlikte kıyaslama yapıldı ($p>0.5$). A β , Hcy ve A β +Hcy grupları; MEM uygulanan

A β +MEM, Hcy+MEM, A β +Hcy+MEM grupları ile kıyaslandığında MEM'in ROT üretimini azaltarak A β +MEM, Hcy+MEM, A β +Hcy+MEM gruplarında daha düşük ROT düzeyi olduğu görüldü ($p<0.001$ ve $p<0,05$). A β +Hcy+MEM grubu ile A β +MEM ve Hcy+MEM grupları kıyaslandığında ROT düzeylerinin A β +MEM ve Hcy+MEM gruplarında daha düşük olduğu sonucu elde edildi ($p<0.001$). A β +MEM grubu ile Hcy+MEM grubu kıyaslandığında aralarında herhangi bir istatistiki fark olmadığı sonucu elde edildi ($p>0.5$). A β +Hcy grubu, A β , Hcy ve diğer tüm gruplarla kıyaslandığında A β +Hcy grubunda ROT düzeyinin hepsinden fazla ve artmış olduğu görüldü ($p<0.001$).

4.5.2. TRPM2 Kanalı ve Hücre İçi ROT Üretimi İlişkisi

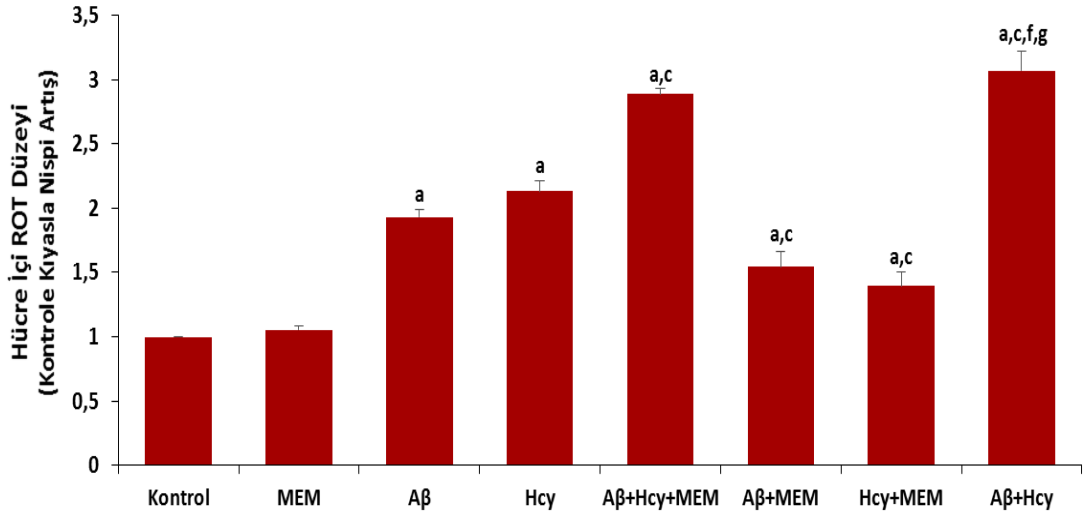


Grafik 17. TRPM2 kanalı ve hücre içi ROT üretimi ilişkisi. Hipokampal hücrelerin A β ile indüklenmesi sonucu oluşturulan in vitro AH modelinde Hcy (0.25 mM) ve MEM (10 μ M)'in TRPM2 katyon kanalları aracılığıyla hücre içi reaktif oksijen türleri üzerine etkileri. (Ort \pm SD ve n=3). Kanal stimülasyonları 0.1 mM CPx ile yapılmıştır. ap<0.001 ve bp<0.05 Kontrol and MEM gruplarına kıyasla. cp<0.001 ve dp<0.05 A β ve Hcy gruplarına kıyasla. ep<0.001 ve fp<0.05 A β +Hcy+MEM grubuna kıyasla. gp<0.001 A β +MEM ve Hcy+MEM gruplarına kıyasla.

Hücre içi ROT analizi sonuçlarını gösteren grafik incelendiğinde, CPx ile uyarılan A β , Hcy ve A β +Hcy, A β +MEM, Hcy+MEM, A β +Hcy+MEM grupları kontrol ve MEM grupları ile kıyaslandığında ROT düzeylerinin artmış olduğu sonucu elde edildi ($p<0.001$ ve $p<0,05$). MEM grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında ise herhangi bir istatistiki fark görülmedi ve bu yüzden diğer gruplar kontrol ve MEM

grubuna göre birlikte kıyaslama yapıldı ($p>0.5$). $A\beta$, Hcy ve $A\beta$ +Hcy grupları; MEM uygulanan $A\beta$ +MEM, Hcy+MEM, $A\beta$ +Hcy+MEM grupları ile kıyaslandığında MEM'in ROT üretimini azaltarak $A\beta$ +MEM, Hcy+MEM, $A\beta$ +Hcy+MEM gruplarında daha düşük ROT düzeyi olduğu görüldü ($p<0.001$ ve $p<0,05$). $A\beta$ +Hcy+MEM grubu ile $A\beta$ +MEM ve Hcy+MEM grupları kıyaslandığında ROT düzeylerinin $A\beta$ +MEM ve Hcy+MEM gruplarında daha düşük olduğu sonucu elde edildi ($p<0.001$). $A\beta$ +MEM grubu ile Hcy+MEM grubu kıyaslandığında aralarında herhangi bir istatistikî fark olmadığı sonucu elde edildi ($p>0.5$). $A\beta$ +Hcy grubu, $A\beta$, Hcy ve diğer tüm gruplarla kıyaslandığında $A\beta$ +Hcy grubunda ROT düzeyinin hepsinden fazla ve artmış olduğu görüldü ($p<0.001$).

4.5.3. TRPV1 Kanalı ve Hücre İçi ROT Üretimi İlişkisi



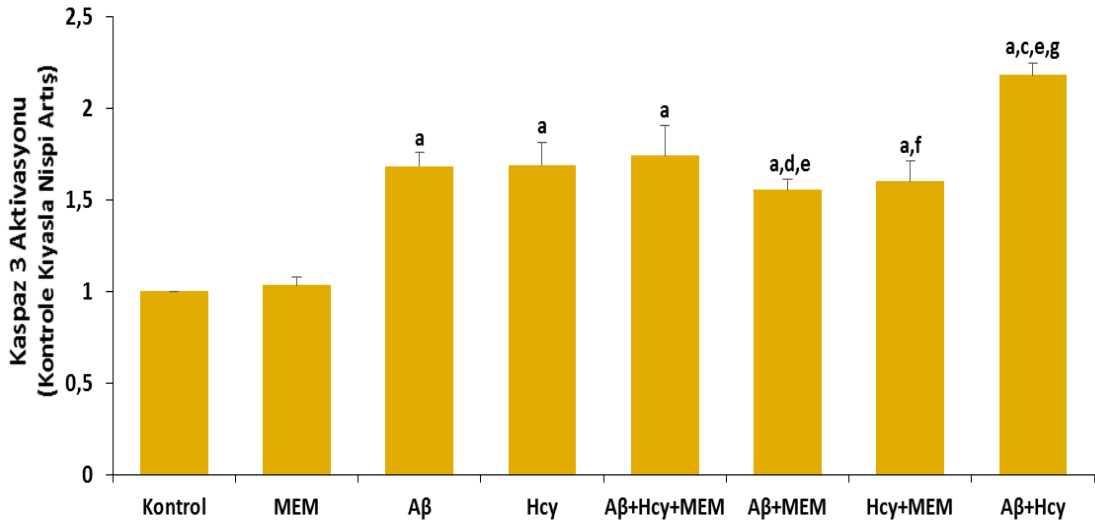
Grafik 18. TRPV1 kanalı ve hücre içi ROT üretimi ilişkisi. Hipokampal hücrelerin $A\beta$ ile indüklenmesi sonucu oluşturulan in vitro AH modelinde Hcy (0.25 mM) ve MEM (10 μ M)'in TRPV1 katyon kanalları aracılığıyla hücre içi reaktif oksijen türleri üzerine etkileri. (Ort \pm SD ve n=3). Kanal stimülasyonları 0.1 mM CAP ile yapılmıştır. ^a $p<0.001$ ve ^b $p<0.05$ Kontrol and MEM gruplarına kıyasla. ^c $p<0.001$ ve ^d $p<0.05$ $A\beta$ ve Hcy gruplarına kıyasla. ^e $p<0.001$ ve ^f $p<0.05$ $A\beta$ +Hcy+MEM grubuna kıyasla. ^g $p<0.001$ $A\beta$ +MEM ve Hcy+MEM gruplarına kıyasla.

Hücre içi ROT analizi sonuçlarını gösteren grafik incelendiğinde, CPx ile uyarılan $A\beta$, Hcy ve $A\beta$ +Hcy, $A\beta$ +MEM, Hcy+MEM, $A\beta$ +Hcy+MEM grupları kontrol ve MEM grupları ile kıyaslandığında ROT düzeylerinin artmış olduğu sonucu elde edildi ($p<0.001$ ve $p<0,05$). MEM grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında ise

herhangi bir istatistiki fark görülmedi ve bu yüzden diğer gruplar kontrol ve MEM grubuna göre birlikte kıyaslama yapıldı ($p>0.5$). $A\beta$, Hcy ve $A\beta$ +Hcy grupları; MEM uygulanan $A\beta$ +MEM, Hcy+MEM, $A\beta$ +Hcy+MEM grupları ile kıyaslandığında MEM'in ROT üretimini azaltarak $A\beta$ +MEM, Hcy+MEM, $A\beta$ +Hcy+MEM gruplarında daha düşük ROT düzeyi olduğu görüldü ($p<0.001$ ve $p<0,05$). $A\beta$ +Hcy+MEM grubu ile $A\beta$ +MEM ve Hcy+MEM grupları kıyaslandığında ROT düzeylerinin $A\beta$ +MEM ve Hcy+MEM gruplarında daha düşük olduğu sonucu elde edildi ($p<0.001$). $A\beta$ +MEM grubu ile Hcy+MEM grubu kıyaslandığında aralarında herhangi bir istatistiki fark olmadığı sonucu elde edildi ($p>0.5$). $A\beta$ +Hcy grubu, $A\beta$, Hcy ve diğer tüm gruplarla kıyaslandığında $A\beta$ +Hcy grubunda ROT düzeyinin hepsinden fazla olduğu görüldü ($p<0.001$).

4.6. Kaspaz 3 Aktivasyon Analizi Sonuçları

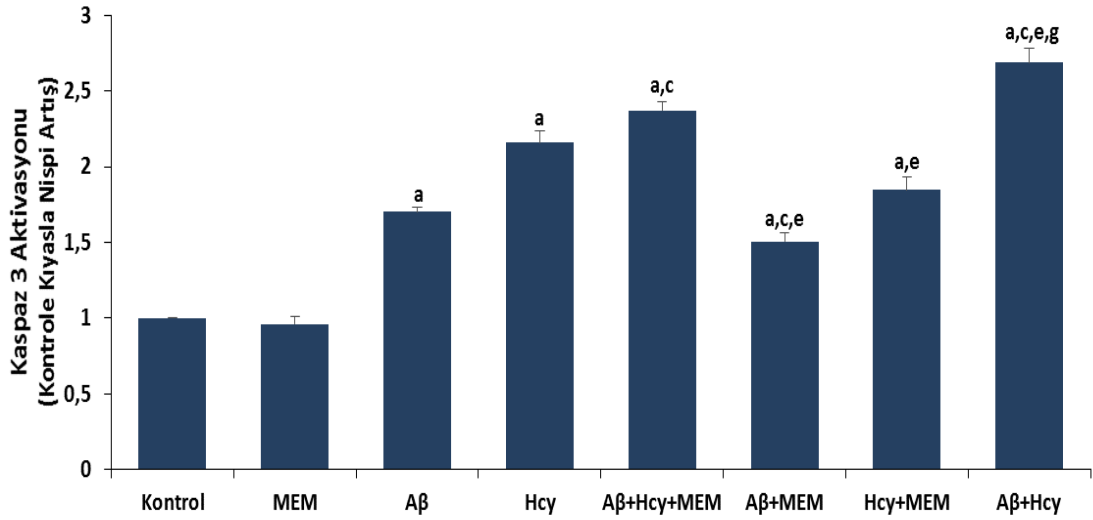
4.6.1. TRPA1 Kanalı ve Kaspaz 3 Aktivasyonu İlişkisi



Grafik 19. TRPA1 kanalı ve kaspaz 3 aktivitesi ilişkisi. Hipokampal hücrelerin $A\beta$ ile indüklenmesi sonucu oluşturulan in vitro AH modelinde Hcy (0.25 mM) ve MEM (10 μ M)'in TRPA1 katyon kanalları aracılığıyla kaspaz 3 aktivitesi üzerine etkileri. (Ort \pm SD ve n=3). Kanal stimülasyonları 0.1 mM SIN ile yapılmıştır. ap<0.001 ve bp<0.05 kontrol and MEM gruplarına kıyasla. cp<0.001 ve dp<0.05 $A\beta$ ve Hcy gruplarına kıyasla ep<0.001 ve fp<0.05 $A\beta$ +Hcy+MEM grubuna kıyasla. gp<0.001 $A\beta$ +MEM ve Hcy+MEM gruplarına kıyasla.

Kaspaz 3 aktivasyon analizi sonuçlarını gösteren grafik incelendiğinde, SIN ile uyarılan A β , Hcy ve A β +Hcy, A β +MEM, Hcy+MEM, A β +Hcy+MEM grupları kontrol ve MEM grupları ile kıyaslandığında kaspaz 3 aktivasyon düzeylerinin artmış olduğu görüldü ($p<0.001$). MEM grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında ise herhangi bir fark görülmedi ve bu yüzden diğer gruplar kontrol ve MEM grubuna göre birlikte kıyaslama yapıldı ($p>0.5$) A β grubu ile Hcy grubu birbiri ile kıyaslandığında da aralarında istatistiki bir fark olmadığı görüldü ve bu yüzden diğer gruplarla birlikte kıyaslamaya tabii tutuldu ($p>0.5$). A β ve Hcy grupları A β +Hcy+MEM grupları ile kıyaslandığında herhangi bir istatistiki fark olmadığı sonucu elde edildi ($p>0.5$). A β ve Hcy grupları birlikte A β +MEM grubu ile kıyaslandığında A β +MEM grubunun kaspaz 3 aktivasyon düzeyinin diğer iki gruba kıyasla daha düşük olduğu görüldü ($p<0.05$). A β ve Hcy grupları Hcy+MEM grubu ile kıyaslandığında herhangi bir istatistiki fark olmadığı görüldü ($p>0.5$). A β +Hcy+MEM grubu ile A β +MEM ve Hcy+MEM grupları kıyaslandığında, kaspaz 3 aktivitesinin A β +MEM ve Hcy+MEM gruplarında daha düşük olduğu görüldü ($p<0.001$ ve $p<0.05$). A β +MEM grubu ile Hcy+MEM grubu kıyaslandığında herhangi bir istatistiki fark olmadığı görüldü ($p>0.5$). A β +Hcy grubuna ait kaspaz 3 aktivasyon düzeyinin diğer tüm gruplara kıyasla artmış olduğu görüldü ($p<0.001$).

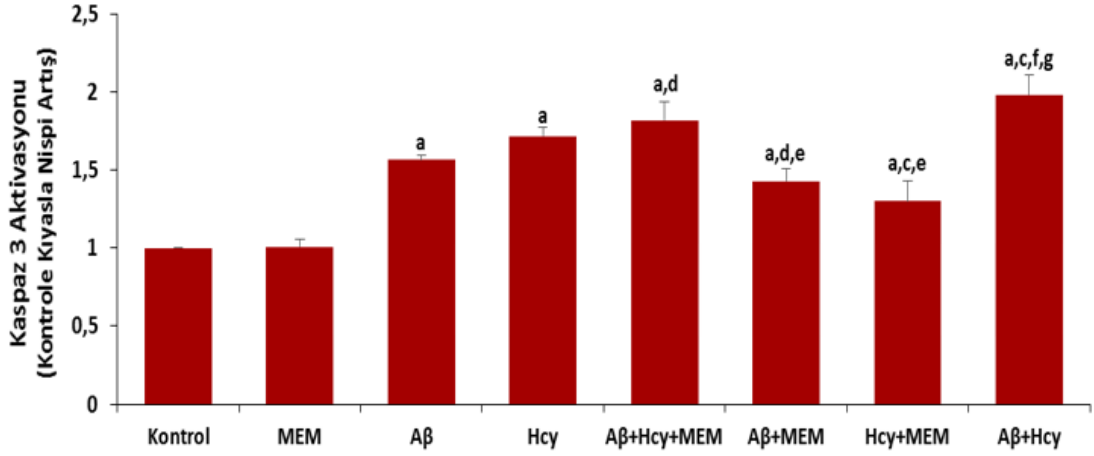
4.6.2. TRPM2 Kanalı ve Kaspaz 3 Aktivasyonu İlişkisi



Grafik 20. TRPM2 kanalı ve kaspaz 3 aktivitesi ilişkisi. Hipokampal hücrelerin A β ile indüklenmesi sonucu oluşturulan in vitro AH modelinde Hcy (0.25 mM) ve MEM (10 μ M)'in TRPM2 katyon kanalları aracılığıyla kaspaz 3 aktivitesi üzerine etkileri. (Ort \pm SD ve n=3). Kanal stimülasyonları 0.1 mM CPx ile yapılmıştır. ap<0.001 ve bp<0.05 kontrol and MEM gruplarına kıyasla. cp<0.001 ve dp<0.05 A β ve Hcy gruplarına kıyasla ep<0.001 ve fp<0.05 A β +Hcy+MEM grubuna kıyasla. gp<0.001 A β +MEM ve Hcy+MEM gruplarına kıyasla.

Kaspaz 3 aktivasyon analizi sonuçlarını gösteren grafik incelendiğinde, CPx ile uyarılan A β , Hcy ve A β +Hcy, A β +MEM, Hcy+MEM, A β +Hcy+MEM grupları kontrol ve MEM grupları ile kıyaslandığında kaspaz 3 aktivasyon düzeylerinin artmış olduğu görüldü (p<0.001). MEM grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında ise herhangi bir fark görülmedi ve bu yüzden diğer gruplar kontrol ve MEM grubuna göre birlikte kıyaslama yapıldı (p>0.5) A β ve Hcy grupları A β +Hcy+MEM grupları ile kıyaslandığında A β ve Hcy gruplarındaki kaspaz 3 aktivasyon düzeyinin daha az olduğu görüldü (p<0.001). A β ve Hcy gruplarındaki kaspaz 3 aktivasyon düzeylerinin A β +MEM grubunun kaspaz 3 aktivasyon düzeyinden daha fazla olduğu görüldü (p<0,05). A β +Hcy+MEM grubu ile A β +MEM ve Hcy+MEM grupları kıyaslandığında, kaspaz 3 aktivitesinin A β +MEM ve Hcy+MEM gruplarında daha düşük olduğu görüldü (p<0.001). A β +Hcy grubuna ait kaspaz 3 aktivasyon düzeyinin diğer tüm gruplara kıyasla artmış olduğu görüldü (p<0.001).

4.6.3. TRPV1 Kanalı ve Kaspaz 3 Aktivasyonu İlişkisi



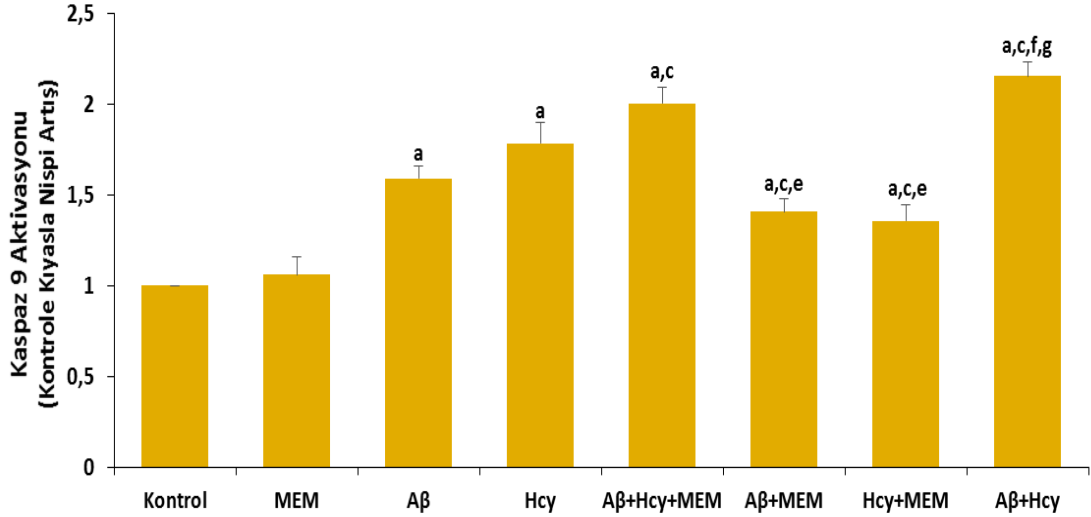
Grafik 21. TRPV1 kanalı ve kaspaz 3 aktivitesi ilişkisi. Hipokampal hücrelerin Aβ ile indüklenmesi sonucu oluşturulan in vitro AH modelinde Hcy (0.25 mM) ve MEM (10 μM)'in TRPV1 kanyon kanalları aracılığıyla kaspaz 3 aktivitesi üzerine etkileri. (Ort ± SD ve n=3). Kanal stimülasyonları 0.1 mM CAP ile yapılmıştır. ap<0.001 ve bp<0.05 kontrol and MEM gruplarına kıyasla. cp<0.001 ve dp<0.05 Aβ ve Hcy gruplarına kıyasla ep<0.001 ve fp<0.05 Aβ+Hcy+MEM grubuna kıyasla. gp<0.001 Aβ+MEM ve Hcy+MEM gruplarına kıyasla.

Kaspaz 3 analizi sonuçlarını gösteren grafik incelendiğinde, CAP ile uyarılan Aβ, Hcy ve Aβ+Hcy, Aβ+MEM, Hcy+MEM, Aβ+Hcy+MEM grupları kontrol ve MEM grupları ile kıyaslandığında Kaspaz 3 düzeylerinin artmış olduğu sonucu elde edildi (p<0.001). MEM grubu, kontrol grubu ile kıyaslandığında ise herhangi bir istatistiki fark görülmedi ve bu yüzden diğer gruplar Kontrol ve MEM grubuna göre birlikte kıyaslama yapıldı (p>0.5). Aβ grubu ile Hcy grubu birbiri ile kıyaslandığında da aralarında istatistiki bir fark bulunamamasından dolayı diğer gruplar birlikte kıyaslamaya tabii tutuldu (p>0.5). Aβ ve Hcy grupları Aβ+Hcy+MEM grupları ile kıyaslandığında herhangi bir istatistiki fark olmadığı sonucu elde edildi (p>0.5). Aβ ve Hcy grupları ile Aβ+MEM ve Hcy+MEM grupları birlikte kıyaslandığında Aβ+MEM ve Hcy+MEM gruplarının kaspaz 3 aktivasyon düzeyinin diğer iki gruba kıyasla daha düşük olduğu görüldü (p<0.001 ve p<0.05). Aβ+Hcy+MEM grubu ile Aβ+MEM ve Hcy+MEM grupları kıyaslandığında, kaspaz 3 aktivasyon düzeyinin Aβ+MEM ve Hcy+MEM gruplarında daha düşük olduğu görüldü (p<0.001 ve

p<0,05). A β +Hcy grubuna ait kaspaz 3 aktivasyon düzeyi sonucunun ise diğer tüm gruplara kıyasla daha fazla olduğu görüldü (p<0.001).

4.7. Kaspaz 9 Aktivasyon Analizi Sonuçları

4.7.1. TRPA1 Kanalı ve Kaspaz 9 Aktivasyonu İlişkisi

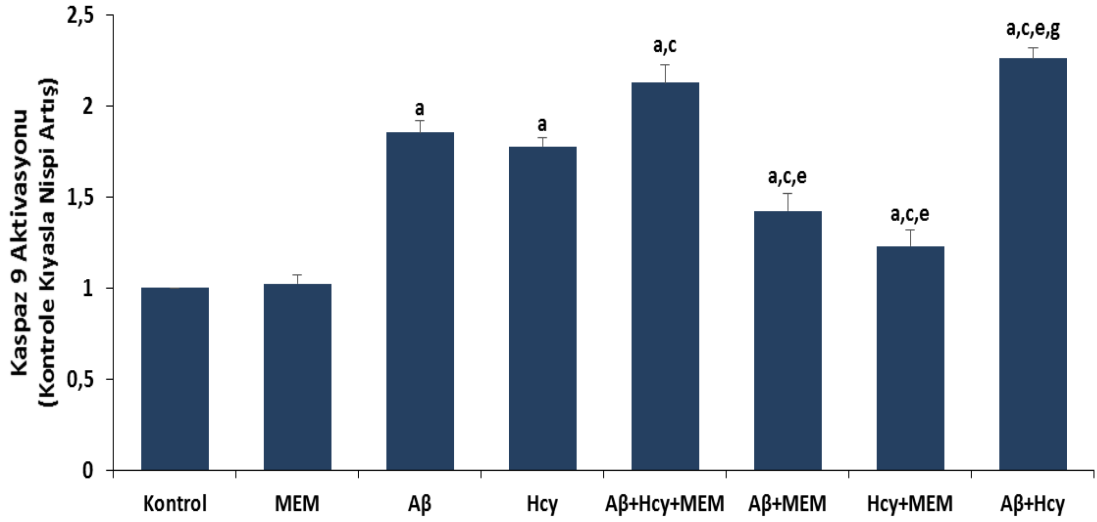


Grafik 22. TRPA1 kanalı ve kaspaz 9 aktivitesi ilişkisi. Hipokampal hücrelerin A β ile indüklenmesi sonucu oluşturulan in vitro AH modelinde Hcy (0.25 mM) ve MEM (10 μ M)'in TRPA1 katyon kanalları aracılığıyla kaspaz 9 aktivitesi üzerine etkileri. (Ort \pm SD ve n=3). Kanal stimülasyonları 0.1 mM SIN ile yapılmıştır. ap<0.001 ve bp<0.05 kontrol and MEM gruplarına kıyasla. cp<0.001 ve dp<0.05 A β ve Hcy gruplarına kıyasla ep<0.001 ve fp<0.05 A β +Hcy+MEM grubuna kıyasla. gp<0.001 A β +MEM ve Hcy+MEM gruplarına kıyasla.

Kaspaz 9 analizi sonuçlarını gösteren grafik incelendiğinde, SIN (TRPA1 kanalı stimülatörü) ile uyarılan A β , Hcy ve A β +Hcy, A β +MEM, Hcy+MEM, A β +Hcy+MEM grupları kontrol ve MEM grupları ile kıyaslandığında Kaspaz 9 düzeylerinin artmış olduğu sonucu elde edildi (p<0.001 ve p<0,05). MEM grubu Kontrol grubu ile kıyaslandığında ise herhangi bir istatistiki fark görülmedi ve bu nedenle diğer gruplar Kontrol ve MEM grubuna göre birlikte kıyaslama yapıldı (p>0.5). A β grubu ile Hcy grubu birbiri ile kıyaslandığında da aralarında istatistiki bir fark olmadığı görüldü ve bu nedenle diğer gruplar Kontrol ve MEM grubuna göre birlikte kıyaslamaya tabii tutuldu (p>0.5). A β ve Hcy grupları A β +Hcy+MEM grubu ile kıyaslandığında kaspaz 9 düzeyinin A β +Hcy+MEM grubunda daha yüksek olduğu

sonucu elde edildi ($p<0,001$). $A\beta$ ve Hcy grupları birlikte $A\beta$ +MEM grubu ile kıyaslandığında $A\beta$ +MEM ve Hcy+MEM grubunun Kaspaz 9 düzeyinin diğer iki gruba kıyasla daha düşük olduğu görüldü ($p<0,001$). $A\beta$ +Hcy+MEM grubu ile $A\beta$ +MEM ve Hcy+MEM grupları kıyaslandığında, Kaspaz 9 aktivitesinin $A\beta$ +MEM ve Hcy+MEM gruplarında daha düşük olduğu görüldü ($p<0,001$ ve $p<0,05$). $A\beta$ +Hcy grubuna ait kaspaz 9 sonucunun diğer tüm gruplara kıyasla artmış olduğu görüldü ($p<0,001$).

4.7.2. TRPM2 Kanalı ve Kaspaz 9 Aktivasyonu İlişkisi

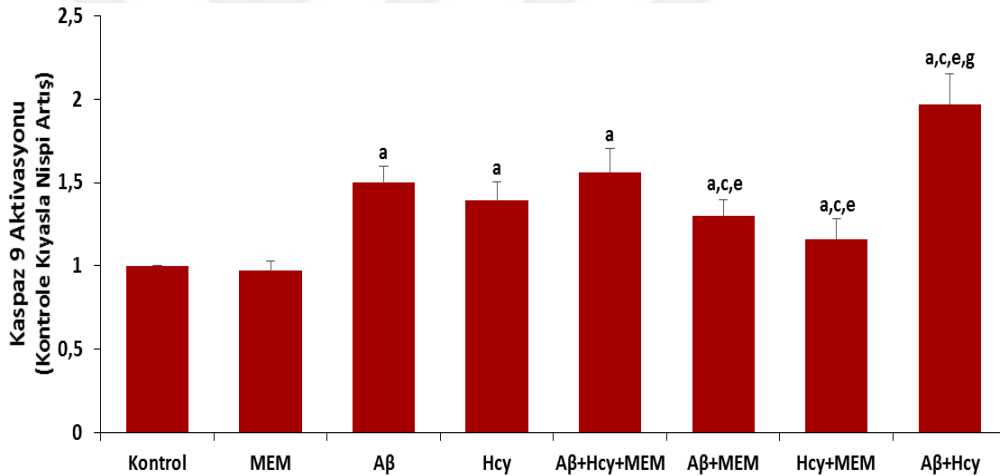


Grafik 23. TRPM2 kanalı ve kaspaz 9 aktivitesi ilişkisi. Hipokampal hücrelerin $A\beta$ ile indüklenmesi sonucu oluşturulan in vitro AH modelinde Hcy (0.25 mM) ve MEM (10 μ M)'in TRPM2 katyon kanalları aracılığıyla kaspaz 9 aktivitesi üzerine etkileri. (Ort \pm SD ve n=3). Kanal stimülasyonları 0.1 mM CPx ile yapılmıştır. ^a $p<0,001$ ve ^b $p<0,05$ kontrol and MEM gruplarına kıyasla. ^c $p<0,001$ ve ^d $p<0,05$ $A\beta$ ve Hcy gruplarına kıyasla ^e $p<0,001$ ve ^f $p<0,05$ $A\beta$ +Hcy+MEM grubuna kıyasla. ^g $p<0,001$ $A\beta$ +MEM ve Hcy+MEM gruplarına kıyasla.

Kaspaz 9 analizi sonuçlarını gösteren grafik incelendiğinde, CPx (TRPM2 kanalı stimülatörü) ile uyarılan $A\beta$, Hcy ve $A\beta$ +Hcy, $A\beta$ +MEM, Hcy+MEM, $A\beta$ +Hcy+MEM grupları kontrol ve MEM grupları ile kıyaslandığında Kaspaz 9 düzeylerinin artmış olduğu sonucu elde edildi ($p<0,001$ ve $p<0,05$). MEM grubu Kontrol grubu ile kıyaslandığında ise herhangi bir istatistiki fark görülmediğinden diğer gruplar Kontrol ve MEM grubuna göre birlikte kıyaslama yapıldı ($p>0,5$). $A\beta$ grubu ile Hcy grubu birbiri ile kıyaslandığında da aralarında istatistiki bir fark

olmadığı görüldü ve bu yüzden diğer gruplar Kontrol ve MEM grubuna göre birlikte kıyaslamaya tabii tutuldu ($p>0.5$). A β ve Hcy grupları A β +Hcy+MEM grubu ile kıyaslandığında kaspaz 9 düzeyinin A β +Hcy+MEM grubunda daha yüksek olduğu sonucu elde edildi ($p<0,001$). A β ve Hcy grupları birlikte A β +MEM grubu ile kıyaslandığında A β +MEM ve Hcy+MEM grubunun Kaspaz 9 düzeyinin diğer iki gruba kıyasla daha düşük olduğu görüldü ($p<0,001$). A β +Hcy+MEM grubu ile A β +MEM ve Hcy+MEM grupları kıyaslandığında, Kaspaz 9 aktivitesinin A β +MEM ve Hcy+MEM gruplarında daha düşük olduğu görüldü ($p<0.001$ ve $p<0,05$). A β +Hcy grubuna ait kaspaz 9 sonucunun diğer tüm gruplara kıyasla artmış olduğu görüldü ($p<0.001$).

4.7.3. TRPV1 Kanalı ve Kaspaz 9 Aktivasyonu İlişkisi



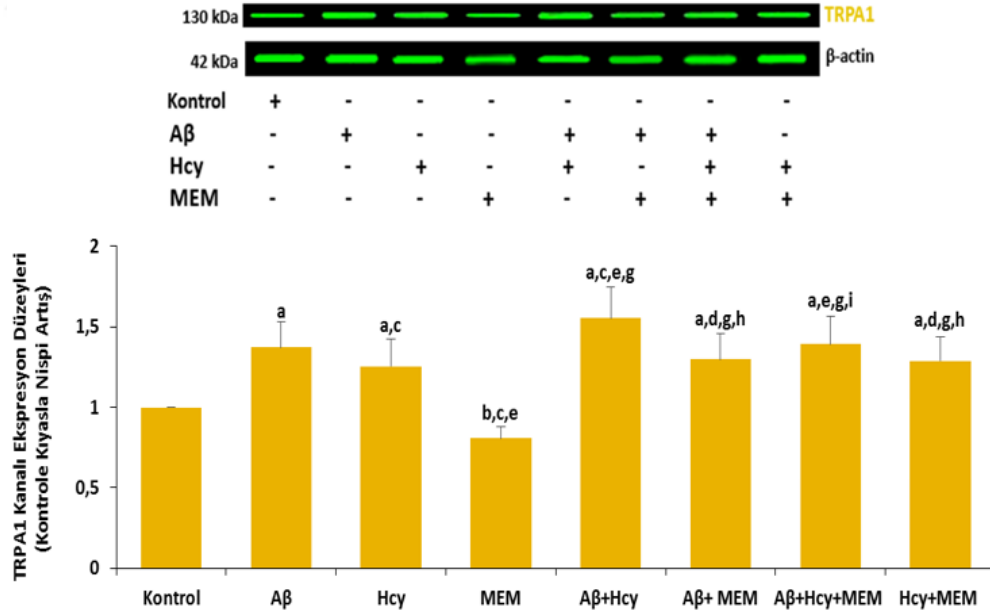
Grafik 24. TRPV1 kanalı ve kaspaz 9 aktivitesi ilişkisi. Hipokampal hücrelerin A β ile indüklenmesi sonucu oluşturulan in vitro AH modelinde Hcy (0.25 mM) ve MEM (10 μ M)'in TRPV1 katyon kanalları aracılığıyla kaspaz 9 aktivitesi üzerine etkileri. (Ort \pm SD ve n=3). Kanal stimülasyonları 0.1 mM CAP ile yapılmıştır. ^a $p<0.001$ ve ^b $p<0.05$ kontrol and MEM gruplarına kıyasla. ^c $p<0.001$ ve ^d $p<0.05$ A β ve Hcy gruplarına kıyasla ^e $p<0.001$ ve ^f $p<0.05$ A β +Hcy+MEM grubuna kıyasla. ^g $p<0.001$ A β +MEM ve Hcy+MEM gruplarına kıyasla.

Kaspaz 9 analizi sonuçlarını gösteren grafik incelendiğinde, CAP (TRPV1 kanalı stimülatörü) ile uyarılan A β , Hcy ve A β +Hcy, A β +MEM, Hcy+MEM, A β +Hcy+MEM grupları kontrol ve MEM grupları ile kıyaslandığında Kaspaz 9 düzeylerinin artmış olduğu sonucu elde edildi ($p<0.001$ ve $p<0,05$). MEM grubu Kontrol grubu ile kıyaslandığında ise herhangi bir istatistiki fark görülmediği için

diğer gruplar Kontrol ve MEM grubuna göre birlikte kıyaslama yapıldı ($p>0.5$). A β grubu ile Hcy grubu birbiri ile kıyaslandığında da aralarında istatistiki bir fark olmadığı görüldü ve bu yüzden diğer gruplar Kontrol ve MEM grubuna göre birlikte kıyaslamaya tabii tutuldu ($p>0.5$). A β ve Hcy grupları A β +Hcy+MEM grubu ile kıyaslandığında kaspaz 9 düzeyinin A β +Hcy+MEM grubunda daha yüksek olduğu sonucu elde edildi ($p<0,001$). A β ve Hcy grupları birlikte A β +MEM grubu ile kıyaslandığında A β +MEM ve Hcy+MEM grubunun Kaspaz 9 düzeyinin diğer iki gruba kıyasla daha düşük olduğu görüldü ($p<0,001$). A β +Hcy+MEM grubu ile A β +MEM ve Hcy+MEM grupları kıyaslandığında, Kaspaz 9 aktivitesinin A β +MEM ve Hcy+MEM gruplarında daha düşük olduğu görüldü ($p<0.001$ ve $p<0,05$). A β +Hcy grubuna ait kaspaz 9 sonucunun diğer tüm gruplara kıyasla artmış olduğu görüldü ($p<0.001$).

4.8. Western Blot Kanal Ekspresyon Analizi Sonuçları

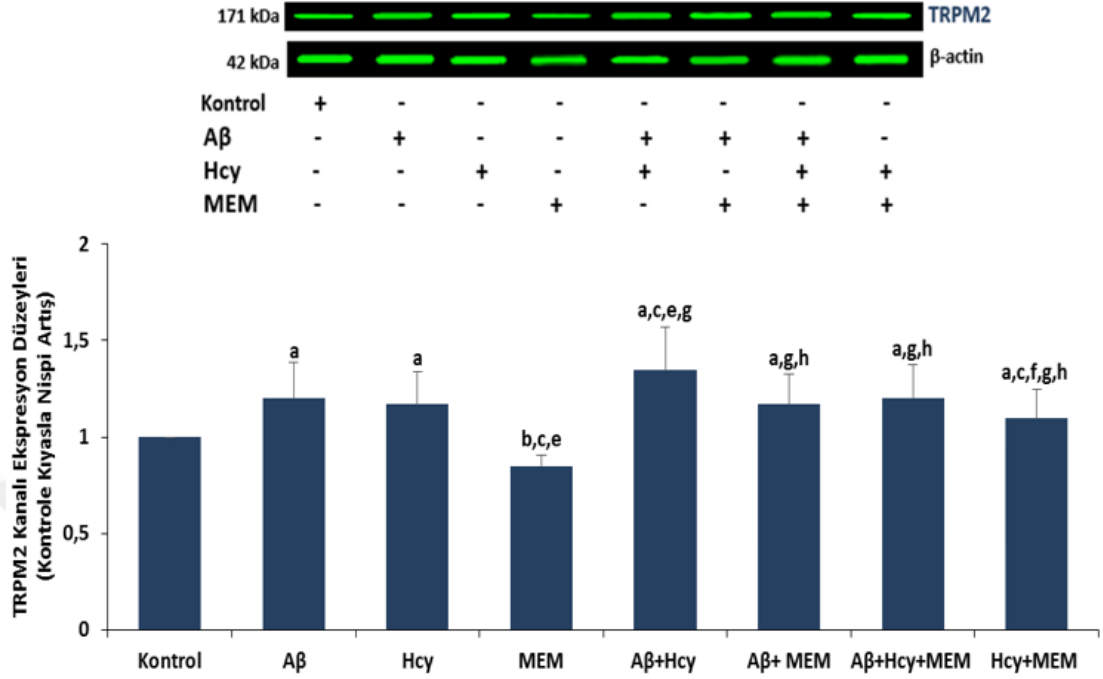
4.8.1. TRPA1 Kanalı Ekspresyon Analizi Sonuçları



Grafik 25. Gruplararası TRPA1 kanalı ekspresyon düzeyleri. Hipokampal hücrelerin A β ile indüklenmesi sonucu oluşturulan in vitro AH modelinde Hcy (0.25 mM) ve MEM (10 μ M)'in TRPA1 kanalı ekspresyonu üzerine etkileri. (Ort \pm SD ve n=3). ^a $p<0.001$ ve ^b $p<0.05$ kontrol grubuna kıyasla. ^c $p<0.001$ ve ^d $p<0.05$ A β grubuna kıyasla. ^e $p<0.001$ ve ^f $p<0.05$ Hcy grubuna kıyasla. ^g $p<0.001$ MEM grubuna kıyasla. ^h $p<0.001$ ve ⁱ $p<0.05$ A β +Hcy grubuna kıyasla.

TRPA1 kanalı ekspresyon düzeylerini gösteren grafik incelendiğinde, SIN (TRPA1 kanalı stimülatörü) ile uyarılan A β , Hcy, A β +Hcy, A β +MEM, A β +Hcy+MEM, Hcy+MEM grupları kontrol grubu ile kıyaslandığında kanal ekspresyon düzeylerinin artmış olduğu görüldü ($p<0.001$). Kontrol grubu ile MEM grubu kıyaslandığında ise MEM grubunda TRPA1 kanal ekspresyon düzeyinin azalmış olduğu ($p<0.05$), diğer tüm grupların ise Kontrol grubuna kıyasla artmış olduğu görüldü ($p<0.001$ ve $p<0.05$). A β grubu ile Hcy grubu kıyaslandığında ekspresyon düzeyinin Hcy grubunda daha düşük olduğu görüldü ($p<0.001$). A β grubu ile A β +Hcy grubu kıyaslandığında kanal ekspresyon düzeylerinin A β +Hcy grubunda daha da arttığı görüldü ($p<0.001$). A β grubu, A β +MEM ve Hcy+MEM grupları ile kıyaslandığında ekspresyon düzeylerinin A β +MEM ve Hcy+MEM gruplarında daha düşük olduğu ($p<0.05$), A β grubu ile A β +Hcy+MEM grubu kıyaslandığında ise herhangi bir istatistiki fark olmadığı görüldü ($p>0.5$). Hcy grubu ile A β +Hcy grubu kıyaslandığında kanal ekspresyon düzeylerinin A β +Hcy grubunda daha da arttığı görüldü ($p<0.001$). Hcy grubu ile A β +Hcy+MEM grubu kıyaslandığında, kanal ekspresyon düzeylerinin A β +Hcy+MEM grubunda artmış olduğu görüldü ($p<0.001$) ancak yine Hcy grubu ile A β +MEM ve Hcy+MEM grupları kıyaslandığında ise herhangi bir istatistiksel fark olmadığı görüldü ($p>0.5$). MEM grubu ile A β +Hcy, A β +MEM, A β +Hcy+MEM, Hcy+MEM gruplar kıyaslandığında TRPA1 kanal ekspresyonunun tüm gruplarda anlamlı bir şekilde arttığı görüldü ($p<0.001$). A β +Hcy grubu A β +MEM, A β +Hcy+MEM, Hcy+MEM ile kıyaslandığında ekspresyon düzeyinin artmış olduğu görüldü ($p<0.001$ ve $p<0.05$).

4.8.2. TRPM2 Kanalı Ekspresyon Analizi Sonuçları

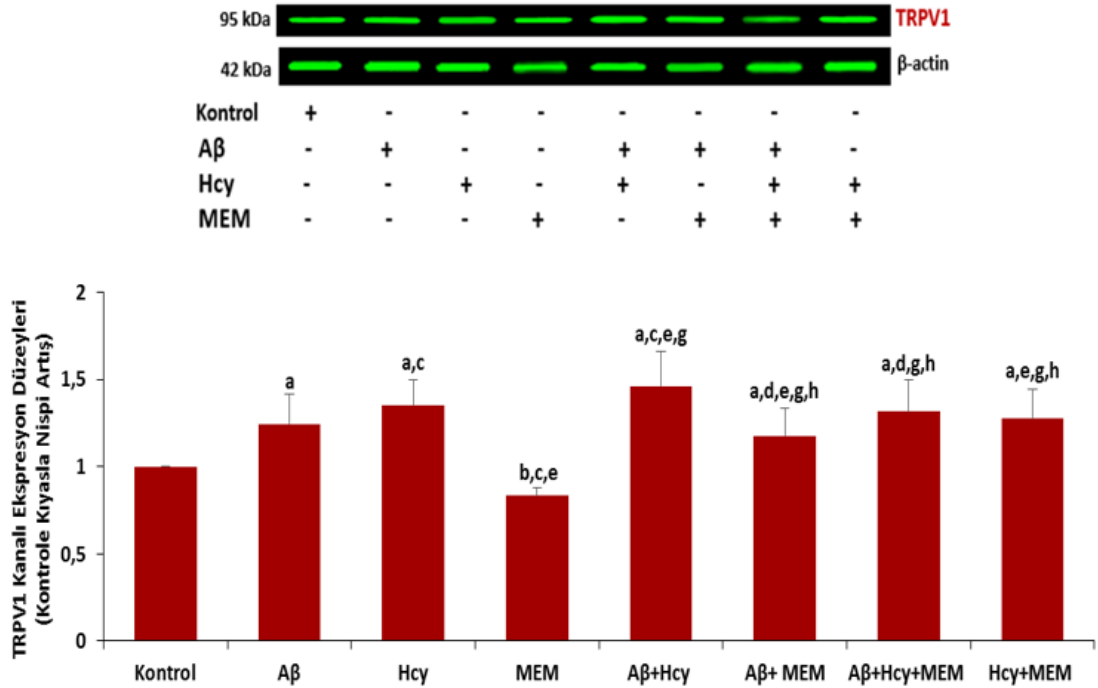


Grafik 26. Gruplararası TRPM2 kanalı ekspresyon düzeyleri. Hipokampal hücrelerin A β ile indüklenmesi sonucu oluşturulan in vitro AH modelinde Hcy (0.25 mM) ve MEM (10 μ M)'in TRPM2 kanalı ekspresyonu üzerine etkileri. (Ort \pm SD ve n=3). ^ap<0.001 ve ^bp<0.05 kontrol grubuna kıyasla. ^cp<0.001 ve ^dp<0.05 A β grubuna kıyasla. ^ep<0.001 ve ^fp<0.05 Hcy grubuna kıyasla. ^gp<0.001 MEM grubuna kıyasla. ^hp<0.001 ve ⁱp<0.05 A β +Hcy grubuna kıyasla.

TRPM2 kanalı ekspresyon düzeylerini gösteren grafik incelendiğinde, CPx (TRPM2 kanalı stimülatörü) ile uyarılan A β , Hcy, A β +Hcy, A β +MEM, A β +Hcy+MEM, Hcy+MEM grupları kontrol grubu ile kıyaslandığında kanal ekspresyon düzeylerinin artmış olduğu görüldü (p<0.001). Kontrol grubu ile MEM grubu kıyaslandığında ise MEM grubunda TRPA1 kanal ekspresyon düzeyinin azalmış olduğu (p<0.05), diğer tüm grupların ise Kontrol grubuna kıyasla artmış olduğu görüldü (p<0.001 ve p<0.05). A β grubu ile Hcy grubu kıyaslandığında ekspresyon düzeyinin Hcy grubunda daha düşük olduğu görüldü (p<0.001). A β grubu ile A β +Hcy grubu kıyaslandığında kanal ekspresyon düzeylerinin A β +Hcy grubunda daha da arttığı görüldü (p<0.001). A β grubu, A β +MEM ve Hcy+MEM grupları ile kıyaslandığında ekspresyon düzeylerinin A β +MEM ve Hcy+MEM gruplarında daha düşük olduğu (p<0.05), A β grubu ile A β +Hcy+MEM grubu kıyaslandığında ise herhangi bir istatistikî fark olmadığı görüldü (p>0.5). Hcy grubu ile A β +Hcy grubu

kıyaslandığında kanal ekspresyon düzeylerinin A β +Hcy grubunda daha da arttığı görüldü ($p<0.001$). Hcy grubu ile A β +Hcy+MEM grubu kıyaslandığında, kanal ekspresyon düzeylerinin A β +Hcy+MEM grubunda artmış olduğu görüldü ($p<0.001$) ancak yine Hcy grubu ile A β +MEM ve Hcy+MEM grupları kıyaslandığında ise herhangi bir istatistiksel fark olmadığı görüldü ($p>0.5$). MEM grubu ile A β +Hcy, A β +MEM, A β +Hcy+MEM, Hcy+MEM gruplar kıyaslandığında TRPA1 kanal ekspresyonunun tüm gruplarda anlamlı bir şekilde arttığı görüldü ($p<0.001$). A β +Hcy grubu A β +MEM, A β +Hcy+MEM, Hcy+MEM ile kıyaslandığında ekspresyon düzeyinin artmış olduğu görüldü ($p<0.001$ ve $p<0.05$).

4.8.3. TRPV1 Kanalı Ekspresyon Analizi Sonuçları

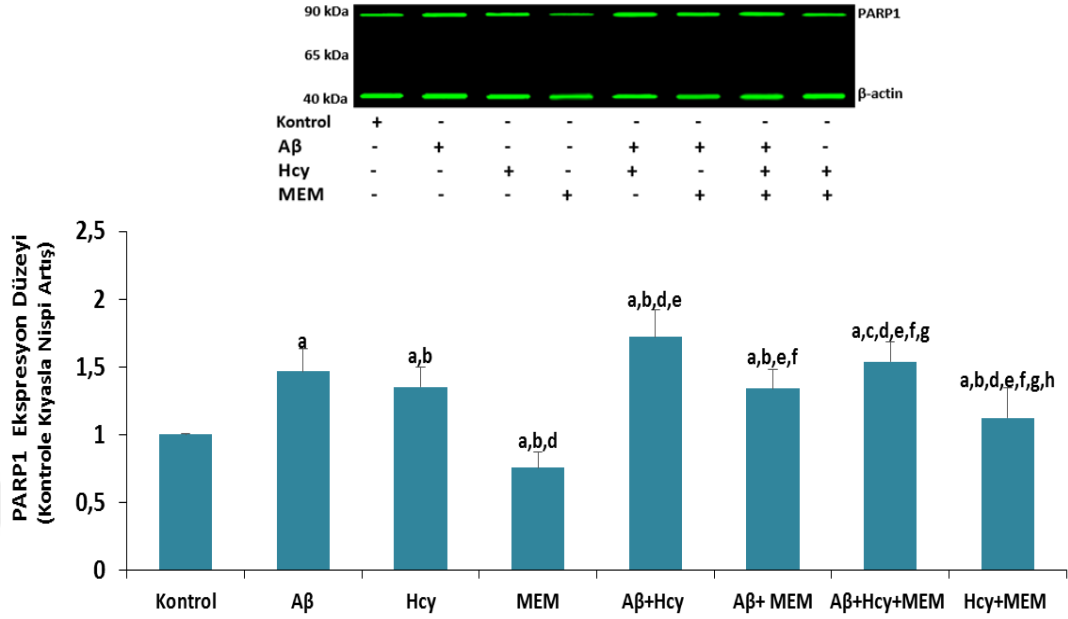


Grafik 27. Gruplararası TRPV1 kanalı ekspresyon düzeyleri. Hipokampal hücrelerin A β ile indüklenmesi sonucu oluşturulan in vitro AH modelinde Hcy (0.25 mM) ve MEM (10 μ M)'in TRPV1 kanalı ekspresyonu üzerine etkileri. (Ort \pm SD ve n=3). ^a $p<0.001$ ve ^b $p<0.05$ kontrol grubuna kıyasla. ^c $p<0.001$ ve ^d $p<0.05$ A β grubuna kıyasla. ^e $p<0.001$ ve ^f $p<0.05$ Hcy grubuna kıyasla. ^g $p<0.001$ MEM grubuna kıyasla. ^h $p<0.001$ ve ⁱ $p<0.05$ A β +Hcy grubuna kıyasla.

TRPV1 kanalı ekspresyon düzeylerini gösteren grafik incelendiğinde, CAP (TRPV1 kanalı stimülatörü) ile uyarılan A β , Hcy, A β +Hcy, A β +MEM, A β +Hcy+MEM, Hcy+MEM grupları kontrol grubu ile kıyaslandığında kanal

ekspresyon düzeylerinin artmış olduğu görüldü ($p<0.001$). Kontrol grubu ile MEM grubu kıyaslandığında ise MEM grubunda TRPV1 kanal ekspresyon düzeyinin azalmış olduğu ($p<0.05$), diğer tüm grupların ise MEM grubuna kıyasla artmış olduğu görüldü ($p<0.001$ ve $p<0.05$). A β grubu ile Hcy grubu kıyaslandığında ekspresyon düzeyinin Hcy grubunda daha düşük olduğu görüldü ($p<0.001$). A β grubu ile A β +Hcy grubu kıyaslandığında kanal ekspresyon düzeylerinin A β +Hcy grubunda daha da arttığı görüldü ($p<0.001$). A β grubu, A β +MEM ve Hcy+MEM grupları ile kıyaslandığında ekspresyon düzeylerinin A β +MEM ve Hcy+MEM gruplarında daha düşük olduğu ($p<0.05$), A β grubu ile A β +Hcy+MEM grubu kıyaslandığında ise herhangi bir istatistiksel fark olmadığı görüldü ($p>0.5$). Hcy grubu ile A β +Hcy grubu kıyaslandığında kanal ekspresyon düzeylerinin A β +Hcy grubunda daha da arttığı görüldü ($p<0.001$). Hcy grubu ile A β +Hcy+MEM grubu kıyaslandığında, kanal ekspresyon düzeylerinin A β +Hcy+MEM grubunda artmış olduğu görüldü ($p<0.001$) ancak yine Hcy grubu ile A β +MEM ve Hcy+MEM grupları kıyaslandığında ise herhangi bir istatistiksel fark olmadığı görüldü ($p>0.5$). MEM grubu ile A β +Hcy, A β +MEM, A β +Hcy+MEM, Hcy+MEM grupları kıyaslandığında TRPV1 kanal ekspresyonunun tüm gruplarda anlamlı bir şekilde arttığı görüldü ($p<0.001$). A β +Hcy grubu A β +MEM, A β +Hcy+MEM, Hcy+MEM ile kıyaslandığında ekspresyon düzeyinin artmış olduğu görüldü ($p<0.001$ ve $p<0.05$).

4.9. Grupların Poli-(ADP-Riboz) Polimeraz 1 (PARP1) İfade Düzeyleri

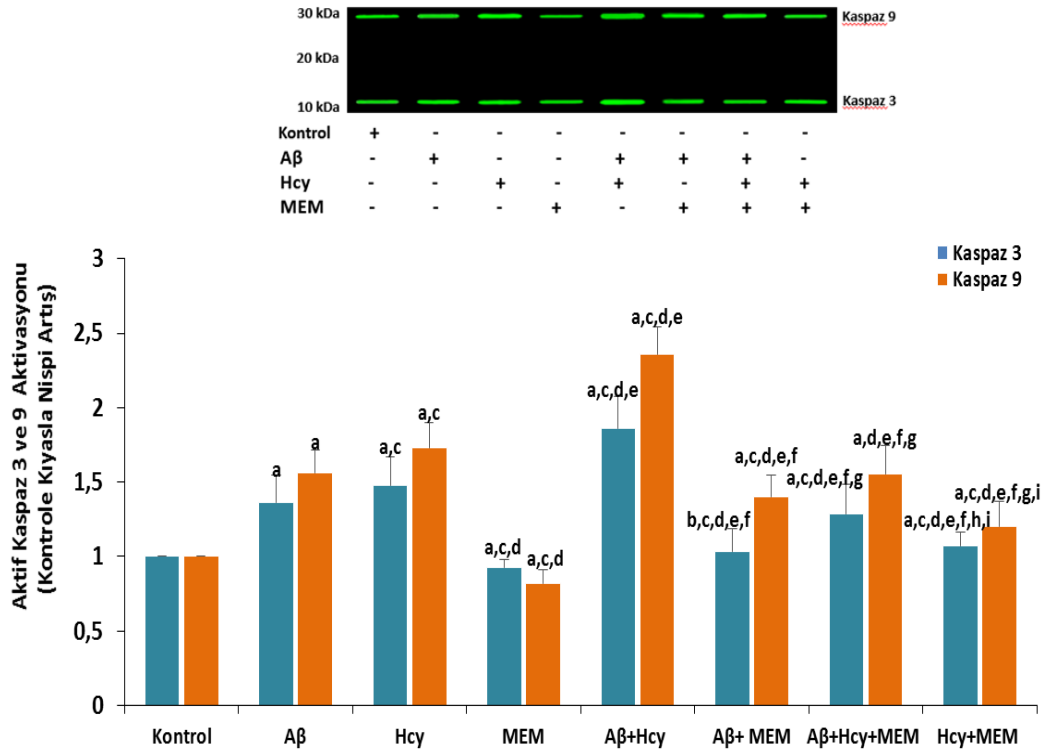


Grafik 28. PARP1 aktivitesinin gruplara göre gösterimi. Hipokampal hücrelerin Aβ ile indüklenmesi sonucu oluşturulan in vitro AH modelinde Hcy (0.25 mM) ve MEM (10 μM)'in PARP1 aktivitesi üzerine etkileri. (Ort ± SD ve n=3). ^ap<0.001 kontrol grubuna kıyasla. ^bp<0.001 ve ^cp<0.05 Aβ grubuna kıyasla. ^dp<0.001 Hcy grubuna kıyasla. ^ep<0.001 MEM grubuna kıyasla. ^fp<0.001 Aβ+Hcy grubuna kıyasla. ^gp<0.001 Aβ+MEM grubuna kıyasla. ^hp<0.001 Aβ+Hcy+MEM grubuna kıyasla.

Hücre içi aktivatörlerinden ADP-Riboz'un polimerizasyonu ile nükleus DNA'sının tek zincir kırıklarının tamirde önemli görev yapan PARP1 enzimi ifade düzeyleri de araştırılmıştır. PARP1 enzimi DNA'nın kırık bölgesine ulaşarak ADP-Riboz polimerleştirmeyle kırığın tamirinden sorumlu DNA ligaz ve benzeri enzimlere öncülük ederek tamir edilecek DNA'nın işaretlenmesinden sorumludur. Hücrede PARP1 enzimi ifadesinin artışı tamir edilecek DNA miktarının da artmış olduğu anlamına gelmektedir. Şekil (?)'e bakıldığında Aβ, Hcy, Aβ+Hcy, Aβ+MEM, Aβ+Hcy+MEM, Hcy+MEM grupları kontrol grubu ile kıyaslandığında kanal ekspresyon düzeylerinin artmış olduğu (p<0.001 ve p<0.05), MEM grubu kıyaslandığında ise MEM grubunda PARP1 ekspresyon düzeyinin azalmış olduğu görüldü (p<0.001). MEM grubu ile diğer tüm gruplar kıyaslandığında ise PARP1 düzeyinin artmış olduğu görüldü (p<0.001 ve p<0.05). Aβ grubu ile Hcy grubu kıyaslandığında PARP1 düzeyinin Hcy grubunda daha düşük olduğu görüldü (p<0.001). Aβ ve Hcy grubu Aβ+Hcy grubu ile kıyaslandığında PARP1 düzeyinin Aβ+Hcy grubunda daha da arttığı görüldü (p<0.001). Aβ grubu, Aβ+MEM ve

Hcy+MEM grupları ile kıyaslandığında PARP1 düzeylerinin A β +MEM ve Hcy+MEM gruplarında daha düşük olduğu ($p<0.001$), A β grubu ile A β +Hcy+MEM grubu kıyaslandığında ise herhangi bir istatistiki fark olmadığı görüldü ($p>0.5$). Hcy grubu ile A β +Hcy+MEM grubu kıyaslandığında, PARP1 düzeylerinin A β +Hcy+MEM grubunda artmış olduğu ($p<0.001$), ve Hcy+MEM grubunda ise Hcy grubuna kıyasla azalmış olduğu görüldü ($p<0.001$). Ancak Hcy grubu ile A β +MEM grubu kıyaslandığında ise herhangi bir istatistiksel fark olmadığı görüldü ($p>0.5$). MEM grubu ile diğer tüm gruplar kıyaslandığında PARP1 ekspresyonunun tüm gruplarda anlamlı bir şekilde arttığı görüldü ($p<0.001$). A β +Hcy grubu A β +MEM, A β +Hcy+MEM, Hcy+MEM ile kıyaslandığında PARP1 düzeylerinin artmış olduğu görüldü ($p<0.001$ ve $p<0.05$).

4.10. Grupların Aktif Kaspaz 3 ve 9 Aktivasyonu İfade Düzeyleri



Grafik 29. Aktif kaspaz 3 ve 9 aktivitesinin gruplara göre gösterimi. Hipokampal hücrelerin A β ile indüklenmesi sonucu oluşturulan in vitro AH modelinde Hcy (0.25 mM) ve MEM (10 μ M)'in kaspaz 3 ve 9 aktivitesi üzerine etkileri. (Ort \pm SD ve n=3). ^a $p<0.001$ ve ^b $p<0.05$ kontrol grubuna kıyasla. ^c $p<0.001$ A β grubuna kıyasla. ^d $p<0.001$ Hcy grubuna kıyasla. ^e $p<0.001$ MEM grubuna kıyasla. ^f $p<0.001$ A β +Hcy grubuna kıyasla. ^g $p<0.001$ ve ^h $p<0.05$ A β +MEM grubuna kıyasla. ⁱ $p<0.001$ A β +Hcy+MEM grubuna kıyasla.

Kaspaz reaksiyonları hücrenin apoptozise hazırlandığının en açık göstergesidir. Hücre içi ve hücre dışı araçlar (agonist, iyon kanalları, ROT v.s.) bu zincir reaksiyonları başlatan unsurlardan bazılarıdır. Aktif kaspaz 3 ve kaspaz 9 düzeyini belirten grafik incelendiğinde; A β , Hcy, A β +Hcy, A β +MEM, A β +Hcy+MEM, Hcy+MEM grupları kontrol grubu ile kıyaslandığında kanal ekspresyon düzeylerinin artmış olduğu ($p<0.001$ ve $p<0.05$), MEM grubu kıyaslandığında ise MEM grubunda aktif kaspaz 3 ve 9 düzeyinin her ikisinde azalmış olduğu görüldü ($p<0.001$). MEM grubu ile diğer tüm gruplar kıyaslandığında ise aktif kaspaz 3 ve 9 düzeyinin artmış olduğu görüldü ($p<0.001$ ve $p<0.05$). A β grubu ile Hcy grubu kıyaslandığında kaspaz 3 ve 9 düzeylerinin her ikisinde de Hcy grubunda daha yüksek olduğu görüldü ($p<0.001$). A β ve Hcy grubu A β +Hcy grubu ile kıyaslandığında Kaspaz 3 ve 9 düzeylerinin A β +Hcy grubunda daha da arttığı görüldü ($p<0.001$). A β grubu, A β +MEM ve Hcy+MEM grupları ile kıyaslandığında kaspaz 3 ve 9 aktivasyon düzeylerinin A β +MEM ve Hcy+MEM gruplarında daha da düşük olduğu ($p<0.001$), A β grubu ile A β +Hcy+MEM grubu kıyaslandığında ise kaspaz 3 için A β +Hcy+MEM düzeyi düşük iken ($p<0.001$), kaspaz 9'a ait A β +Hcy+MEM grubunda herhangi bir istatistiki fark olmadığı görüldü ($p>0.5$). Hcy grubu ile A β +MEM, A β +Hcy+MEM ve Hcy+MEM grupları kıyaslandığında, aktif kaspaz 3 ve 9 aktivasyon düzeylerinin her ikisinde azalmış olduğu görüldü ($p<0.001$). A β +Hcy grubu A β +MEM, A β +Hcy+MEM, Hcy+MEM ile kıyaslandığında aktif kaspaz 3 ve 9 aktivasyon düzeylerinin A β +Hcy grubunda diğer tüm gruplara kıyasla artmış olduğu görüldü ($p<0.001$ ve $p<0.05$).

5. TARTIŞMA

Alzheimer Hastalığı (AH), genel olarak 65 yaş ve üzeri bireylere ait bir hastalık olarak düşünülse de hastalığın hazırlayıcı sebepleri arasında yer alan anormal proteinler, otoimmün reaksiyonlar, toksik reaksiyonlar, kafa travmaları ve virüslerin varlığına bağlı olarak nadiren daha da erken yaşlarda görülebilmektedir. AH, beyinde biriken A β P ve NFY'lerin yoğunluğu ile orantılı olarak şiddeti değişen nörodejeneratif bir hastalıktır. AH'de oluşan A β plakları; APP'lerden BACE1 ve PS1 enzimleri vasıtasıyla oluşturulmaktadır (85). Oluşan bu toksik A β plakları mikrogliya ve astrositleri aktive ederek kronik inflamasyon oluşumunu tetikler ve böylece bu hücrelerden salınan sitokinler, pro-inflamatuar mediatörler (prostoglandinler, ROT, NO vs.) AH'nin ilerlemesine neden olmaktadır (86-90).

Vücudumuzda bulunan en önemli iyonlardan birisi Ca⁺²'dir. Ca⁺² kemik gelişimine katılmasından ziyade daha mikro düzeyde incelendiğinde hücrelerdeki yaşamsal faaliyetlerin sürdürülebilmesi için de belli bir denge denkleminde hücre içi ve hücre dışı olarak hücre zarı üzerindeki bir takım iyon kanalları vasıtasıyla iki yönlü hareket halindedir. Hücre içine kıyasla hücreler arası sıvıda yaklaşık 20.000 kat daha fazla Ca⁺² bulunmaktadır. Çevresel etmenler, sıcaklık, beslenme, ilaç kullanımı ve nörolojik hastalık (Alzheimer vs.) durumunda hücre hasar meydana gelmekte ve bunun sonucunda hasarlı hücre içerisine normalden fazla miktarda Ca⁺² girmektedir. Bu da hücre içi aşırı mitokondriyal ROT üretimi ve hücre içi çekirdek PARP1 aktivasyonu artışına bağlı nükleer DNA hasarı ile aşırı ADP-Riboz üretimine neden olmaktadır. TRPM2, TRPM ailesinin ikinci üyesi olarak tanımlanmıştır (62, 63). TRPM2'nin karboksi ucuna '*nudix domain*' (NUDT9-H bölgesi) denilmektedir. Bu uç ADP-Riboz pirofosfataz enzimi aktivitesine sahiptir. Bu sayede kanalın karboksi ucuyla ADP-Riboz'un etkileşimi esnasında, ADP-Riboz'dan AMP ve Riboz 5-fosfat oluşumu katalizlenir ve kanal aktivasyonu gerçekleşir (65). Bu reaksiyon sonucu biriken AMP'nin negatif geribildirim mekanizmasıyla çalışarak kanalın inaktivasyonundan sorumlu olduğu düşünülmektedir (66). Hücrede sürekli artan ROT, TRPM2 kanal aracılı veya aracısız sitozole Ca⁺² girişini artırarak daha fazla oksidatif hasara neden olarak sitozolik kaspaz reaksiyonlarını ve çekirdekteki PARP1 yolağını

tetikleyerek nöronal hücre hasarı ve de nöronların ölümüne neden olan potansiyel bir faktör olarak görülmektedir (58, 60, 72, 98, 253).

Tez çalışmamızda, TRPM2 kanal ekspresyon düzeyi ve TRPM2 kanal aracılı sitozolik Ca^{+2} ve apoptozis artışı gözlemlendi. Hücrel oksidatif stres artışının çekirdekte PARP1 aracılı ADP-riboz üretimi artırdığı ve bu ADP-riboz ile TRPM2 kanal aktivasyonunun arttığını göstermektedir. Bunun sonucunda da hücre içi mitokondriyal ROT aşırı üretimi sonucu kanalın daha fazla aktivasyonu ve aşırı apoptozis ve kaspaz aktivasyonları belirlendi. Bununla birlikte, literatürde ilk kez, memantin TRPM2 kanallarını kapatarak, hücre içi mitokondriyal ROT üretimi ve apoptozis düzeyi ile kaspaz aktivasyonları ve ekspresyon düzeyleri azalışı belirlendi. Diğer bir ifade ile Hcy uygulanan sinir hücrelerinde PARP1 ekspresyon ve hücre içi aşırı ROT üretimine bağlı olarak aşırı TRPM2 kanal aktivasyonu artışı ve Ca^{+2} girişi gözlenmiştir. Bu sonuçlar Hcy aracılı TRPM2 kanal aktivasyonunun mitokondriyal zar depolarizasyon artışı ve ROT üretiminde önemli bir rolü olduğunu göstermiştir.

AH'nde A β plaklarının varlığı ile doğru orantılı olarak hücre dışı ROT'un aşırı üretimi nedeniyle oksidatif stres artışı TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 katyon kanalları vasıtasıyla hücreye yüksek miktarda Ca^{+2} girişine sebep olmaktadır. [Ca^{+2}]_i'nin fizyolojik sınırların üzerine çıkması ise mitokondrileri depolarize ederek daha fazla hücre içi ROT üretimine neden olmaktadır (283). Mevcut tez çalışmasında da, A β gruplarında TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 kanal aracılı sitozolik Ca^{+2} girişinin artışına bağlı olarak mitokondriyal membran depolarizasyonu, hücrel ROT üretimi, aktif kaspaz 3 ve 9 aktivasyonlarının arttığı gözlemlendi. Ancak kullanılan TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 kanal inhibitörleri ile sitozolik Ca^{+2} düzeyinin inhibitör kullanılmayan gruplara kıyasla daha fazla azalmış olduğu sonucu elde edildi. A β grubuna kıyasla A β +MEM, Hcy grubuna kıyasla Hcy+MEM, A β +Hcy grubuna kıyasla A β +Hcy+MEM gruplarında da [Ca^{+2}]_i'nin düşük olduğu sonucunu gözlemledik. NMDA kanal inhibitörü olarak görev yapan MEM için, MEM+inhibitör gruplarına kıyasla MEM gruplarında daha az düzeyde [Ca^{+2}]_i yoğunluğu olması MEM'in de TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 kanallarına doğrudan ya da dolaylı olarak bir inhibitör etkisinin olabileceği düşüncesine neden olmuştur. A β +Hcy grubu için TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 kanalları kendi arasında değerlendirildiğinde ise TRPM2 kanalının TRPA1 ve TRPV1 kanalına kıyasla daha fazla düzeyde [Ca^{+2}]_i olduğu sonucu elde

edilmiştir. Bu durum A β ve Hcy'nin birlikte kullanılmasının TRPM2 kanalları üzerine daha fazla etkiyebileceği düşüncesine neden olmuştur. Diğer taraftan A β ve Hcy ayrı ayrı değerlendirildiğinde toksik etkilerinin hücredeki [Ca⁺²]_i yoğunluğu başta olmak üzere apoptozis, mitokondriyal depolarizasyon, ROT düzeyi ile aktif kaspaz 3 ve 9 aktivasyonu üzerine hemen hemen benzer düzeyde bir etkiye sahip olduğu sonucu elde edilmiştir. Yine tez çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre de MEM, A β ve Hcy grupları üzerine benzer bir etki oluşturmaktadır. Bu durum oksidatif stres ile aktive olan TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 kanallarının AH oluşumu ve tedavisindeki önemini daha da iyi ifade etmektedir. Hcy'nin de aynı şekilde oksidatif stresi artırarak ortamda ROT oluşumunu tetiklediği ve sonuçta nörolojik disfonksiyonu başlattığı bildirilmiştir (212, 213). Hcy'nin NMDA reseptör alt türüne etki yapmaya eğilimli endojen glutamat reseptör agonisti olduğu bildirilmiştir (184, 194). Hcy'nin oksidatif bir ürünü olan homosisteik asit, beyin hücreleri tarafından üretilir ve eksitatör uyarıya karşılık olarak salgılanır (198). Homosisteik asit, NMDA reseptörünü aktif hale getirerek bir eksitatör nörotransmitter olarak işlevini yerine getirdiği bildirilmiştir (199). Bu tezde hipokampal hücrelerde Hcy'nin TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 kanal aktivasyonuna bağlı Ca⁺² girişinin daha da fazla artırdığı gösterilmiştir. Benzer şekilde, Övey ve Nazıroğlu (2015) çalışmalarında hipokampal sinir hücrelerinde TRPM2 ve TRPV1 kanallarının Hcy ile aktive olması sonucu [Ca⁺²]_i yoğunluğunun, hücre içi ROT ve mitokondriyal membran depolarizasyon değerlerinin arttığını bildirmişlerdir. Bizim elde ettiğimiz sonuçlarda da Hcy grubunda apoptozis ve ROT düzeyleri ile mitokondriyal depolarizasyon düzeylerinin daha fazla olduğu saptanmıştır. A β +Hcy grubu için ise apoptozis, ROT ve mitokondriyal depolarizasyon düzeyleri diğer tüm gruplara kıyasla en fazla bulunmuştur. Bu sonuçlar A β +Hcy+MEM grubunda A β +Hcy gruplarına kıyasla daha düşük düzeyde gözlenmiştir. Bu sonuçlarla beraber MEM'in A β +Hcy'nin zararlı etkilerinden hücreyi korumaya yardımcı olduğu sonucunu ortaya koymuştur. Benzer bir çalışmada ise Hcy'nin sıçan mikroglia hücrelerinde kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivasyonunu artırdığı ve apoptozisi tetiklediği bildirilmiştir (285). Bizim elde ettiğimiz sonuçlarda da Hcy'nin aktif kaspaz 3 ve 9 aktivasyonunu artırdığı ve hücre ölümünü tetiklediği tespit edilmiştir. MEM'in kullanıldığı Hcy+MEM grubu, Hcy grubu ile A β +Hcy+MEM grubu da A β +Hcy ile aktif kaspaz 3 ve 9 aktivasyonu

bakımından kıyaslandığında yine Hcy üzerine MEM'in kaspaz aktivasyonlarında baskılayarak hücrenin ölüme gitmesine engel olduğu sonucu elde edilmiştir.

Memantin'in kinolinik asite bağlı toksisiteye, beyin travması, iskemi ve A β 1–40/A β 1–42–aracılı nörotoksisiteye karşı etkili bir koruma sağlayabildiği bildirilmiştir (256-259). Eksitotoksitenin birçok akut ve kronik MSS nörodejeneratif bozukluğunda rol aldığı ve aşırı kalsiyum iyonu +2 yükü ile bağlantılı olduğu ileri sürülmüştür (253). Eksitotoksiste, birçok nörodejeneratif hastalıkta hücrelerin apoptozise uğramasını açıklayan en yaygın hipotez olarak kabul görmektedir. Bizim western blot deneyi ile elde ettiğimiz sonuçlarda da A β 'nin aktif kaspaz 3 ve 9 aktivasyon seviyelerinin de artmış olduğu sonucunu elde ettik. Yine tez çalışmamda A β 'nin TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 kanal uyarıcıları kullanılan gruplarda daha fazla aktif kaspaz 3 ve 9 aktivasyonuna neden olduğu, mitokondriyal depolarizasyonu tetiklediği ve sonuç olarak da hücrelerde apoptozisi artırdığı kanaatine varılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlarla uyumlu olarak diğer bazı çalışmalarda da A β 'nin TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 kanallarını aktive ederek hücre içi Ca⁺² konsantrasyonunu artırarak hücreyi apoptozise ve dolayısı ile de nörodejenerasyona götürdüğü bildirilmiştir (286-288). Benzer şekilde, Charkhkar ve ark. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada A β 'nin hücre içi Ca⁺² düzeyini artırdığı, MEM'in ise bunu düzenlemede etkin rol aldığı bildirilmiştir (252). Bizim elde ettiğimiz sonuçlarda da MEM'in TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 kanalı aracılı [Ca⁺²]_i azalttığı hücrenin apoptozise gitmesini kısmen engellediği sonucu elde edilmiştir.

TRP kanalları kendi familyası içerisinde veya da farklı gruptaki bazı TRP kanalları ile birlikte aynı etki (ROS, pH, mekanik uyarım) neticesinde stimüle edilmektedir (50, 51). Genel olarak insan vücudundaki organların hücrelerine o organın işlevine uygun TRP kanalları lokalize olmuştur (52, 53). Memelilerde TRPA Kanalları TRP kanal üst ailesinin tek fertli olan bir kanal alt tipidir. Yine TRPA kanal alt ailesi de yalnızca TRPA1 olmak üzere bir üyeden oluşmaktadır (38). 14 adet N-terminal ankrin tekrarı içeren TRPA1'in mekanik ve kimyasal stres sensörü gibi işlev gördüğü bilinmektedir (38). Beyin korteksi (39) ve hipokampus (39) başta olmak üzere, trigeminal gangliyon (40) ve arka kök gangliyon hücrelerinde (41), akciğer dokusunda (42), saç tellerinde (43) ve diğer farklı birçok hücre grubunda var olduğu bilinmekte ve bulunduğu doku organa göre de ekspresyonunda değişiklik

görülmektedir (44). Özellik ve lokalizasyon bakımından geniş bir alana sahip olan TRP Ankrin-1 (TRPA1) kanalının stimülasyonunda da soğuk (<17°C), inflamatuvar etkiler, pH, oksidatif stres, hardal yağı, O₂, CO₂ ve bazı iyonlar (Ca⁺², Zn⁺²) vs. gibi birçok etken yer almaktadır (46-48). Ankrin familyasının tek üyesi olan TRPA1 kanalı özellikle sinir hücreleri başta olmak üzere akciğerlerde, beyinde, deride ve daha birçok organda bulunmakta, bulunduğu organda da ilgili etkene göre aktif hale gelerek kalsiyum iyonlarının yanı sıra Na⁺ ve K⁺ iyonlarının hücre dışı alandan hücre içi alana geçişlerine de olanak sağlamaktadır (54, 55). TRPA1 kanallarının ağrı ve inflamasyonda önemli rol aldığı bilinmektedir (83). Fakat vücudumuzda serebral korteks ve hipokampus gibi kognitif faaliyet gösteren alanlarda bulunmaları ve başta oksidatif stres olmak üzere çeşitli agonistlerle aktive olmaları bu tip kanalların AH ile yakın ilişkili olabileceği gerçeğini gün yüzüne çıkarmaktadır.

Oluşan toksik A β plakları mikroglia ve astrositleri aktive ederek kronik inflamasyon oluşumunu tetikler böylece bu hücrelerden salınan sitokinler ve pro-inflamatuar mediatörler (prostaglandinler, ROT, NO vs.) AH'nin ilerlemesine neden olmaktadır. (86-90). Ortamda biriken A β plaklarının direkt olarak TRPA1 kanallarını stimüle edebildiği bazı kaynaklarda bildirilmişken (91), yine pro-inflamatuar mediatörlerden olan NO de TRPA1 kanallarını stimüle etme potansiyeline sahiptir (92). Tez çalışmamızda TRPA1 kanalı stimülasyonuna bağlı olarak A β 'nin olduğu gruplarda başta sitozolik Ca⁺² miktarı olmak üzere apoptozis, ROT, mitokondriyal depolarizasyon düzeyleri ile aktif kaspaz 3 ve 9 aktivasyonları tümünde fazla bulunmuştur.

Ortamda biriken A β plaklarının direkt olarak TRPA1 kanallarını stimüle edebildiği bazı kaynaklarda bildirilmişken (91), yine pro-inflamatuar mediatörlerden olan NO de, TRPA1 kanallarını stimüle etme potansiyeline sahiptir (92). Bu stimülasyon ve kanal aktivasyonu sonrasında ise ekstraselüler ortamdan hücre içi sitozole Ca⁺² iyonu akışı gerçekleşmekte ve bunun neticesinde hücredeki kaspaz reaksiyonları hızlanarak hücre apoptozise doğru sürüklenmektedir. Ayrıca hücre içinde Ca⁺² iyonu artışı mitokondriyi daha da uyararak buna bağlı olarak ROT ürünleri artışına sebep olmakta, ROT ürünlerindeki artışa bağlı olarak da hücre daha da hızlı bir şekilde ölüme sürüklenecektir. Bu da AH'nin progresyonunda hızlanmaya ve

hastalıkla ilgili semptomların oluşumu ve hastalık ilerlemesi üzerine hızlandırıcı etki yaptığına işaretir.

TRPV kanal ailesi, bazı bitkilerin yapısında bulunan vanilin, vanilik asit ve kapsaisin gibi doğal vaniloidler tarafından aktive edildiği bilinen ve ismini de burdan alan kanallardır. TRPV kanallarının sadece hücre membranının üzerinde değil aynı zamanda organelleri çevreleyen zarlar üzerinde de var oldukları gösterilmiştir (71). TRPV1 kanalları katyonlara karşı seçici olmamakla birlikte kalsiyum Ca^{+2} 'ye karşı duyarlılığı oldukça yüksektir. TRPV1 kanalları ya direkt olarak plazma membranındaki Ca^{+2} giriş kanalları gibi davranmakta ya da Ca^{+2} giriş kanallarının modülasyonunu sağlayacak olan zar potansiyelini değiştiren sitozolik serbest Ca^{+2} kanalları üzerinde etkili olmaktadır. TRP üst ailesinin, her biri kendi içinde alt gruplara ayrılan altı üyesi bulunmaktadır. TRPV1 kanallarının aktivasyonuna sebep olan faktörler arasında basınç, sıcaklık, bazı kimyasal (resiniferatoksin) ve biyolojik moleküller yer almaktadır (72). Bunların yanısıra kapsaisin ve düşük pH içeren uyarımların birçoğu seçici olmayan katyon kanallarından (TRPV1) Ca^{+2} hücre içine girişine sebep olur ve böylece normal düzeyden fazla miktarda sitozole Ca^{+2} girişi hücrede apoptotik yolları tetikleyerek hücre içi ROT'un, mitokondriyal depolarizasyonun, kaspaz 3 ve 9 aktivasyonunun artmasına neden olmaktadır. Son zamanlardaki yapılan çalışmalar neticesinde; beyindeki nöronlar, perisitler, astrositler ve mikroglialarda TRPV1 kanallarının ekspresyonlarında geniş dağılım gösterdiği rapor edilmiştir (115-117). A β toksisitesinin varsayılan mekanizmalarından biri, eksitotoksik uyarılara karşı savunmasızlığın eşlik ettiği Ca^{+2} homeostaz bozukluğunu içerdiği görülmektedir (102, 103). Bu nörotoksisite PLC'yi aktive ederek IP3 üretilir ve bu da hücre içi Ca^{+2} depolarını uyarır. $[Ca^{+2}]_i$ ve ROT düzeyindeki artışla alakalı olarak da TRPV1 kanallarının AH ile ilişkili nöroinflamatuvar süreçlere katkıda bulunması da olasıdır. Kim ve arkadaşları tarafından 2005 yılında gerçekleştirilen çalışma sonrasında rapor edilen sonuçlara göre, mezensefalik dopaminerjik nöronların TRPV1 kanal agonisti kapsaisine maruz bırakılmaları neticesinde hücre ölümünün tetiklendiği bildirilmiştir (118). Ayrıca sıçan beyinde intranigral alana yapılan kapsaisin enjeksiyonunda da TRPV1 aracılı hücre ölümüne neden olduğu bildirilmiştir. Dolayısı ile kapsaisin ve anandamidin birlikte kullanılması sonucu TRPV1 kanalı aktivasyonu ile yukarıda bahsedilen olaylar mikroglia

hücrelerinde de cerayan ederek Ca^{+2} sinyali aracılı sinir hücresi hasarı ve mitokondriyal yıkımlanma şekillenmiştir (119).

Apoptozisin en önemli iki oluşum mekanizmasından birincisi dış etmenler aracılığıyla uyarılan hücre membranındaki reseptörler aracılı, ikincisi ise hücre içi apoptotik yollara bağlı olarak depolarize olan mitokondriler aracılıdır (289). Bizim elde etmiş olduğumuz sonuçlar da hücre membranı üzerinde konuşlu olan TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 kanallarının kullanılan kendilerine özgü agonistlerce açılmalarına binaen $[Ca^{+2}]_i$ konsantrasyonunun artışı MEM'in azalttığı görülmüştür. Yine aynı şekilde mitokondriyal depolarizasyonun da MEM kullanılan gruplarda diğer kullanılmayan gruplara kıyasla daha da azaldığı sonucu elde edilmiştir. Yine farklı bir çalışmada da MEM'in mitokondriyal depolarizasyon düzeyini azalttığı ve de mitokondriyal homeostazisi sağlamada rol üstlendiği bildirilmiştir (290). Buna bağlı olarak farklı bir çalışmada da sitozolik kalsiyum düzeyini MEM'in azalttığı ve hücrenin apoptozise gitmesine kısmen engel olduğu bildirilmiştir (291). Bizim elde ettiğimiz sonuçlarda MEM'in hücre dışından hücre içine giren Ca^{+2} konsantrasyonunu ciddi düzeyde azalttığı ve hücrenin apoptozise gitmesine engel olduğu sonucunu doğrulamıştır.

Oksidatif stres ile aktive olan TRP kanallarının hastalık durumunda ekspresyon düzeylerinde artış olduğu farklı çalışmalarda bildirilmiştir (292, 293). Tez çalışmamızda A β +Hcy, A β , Hcy gruplarında oksidatif stresle aktive olabilen TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 kanallarının ekspresyon düzeylerinde en fazla A β +Hcy grubunda olduğu tespit edilmiştir. A β ve Hcy gruplarındaki TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 kanalları ekspresyon düzeyleri bakımından kıyaslandığında, A β grubunda TRPA1 kanalının Hcy grubundaki TRPA1 kanalına kıyasla daha fazla eksprese olduğu gözlemlendi. TRPM2 kanalının ekspresyonunda göze çarpan herhangi bir fark olmadığı belirlendi. Fakat A β grubundaki TRPV1 kanal ekspresyonunun, Hcy grubuna kıyasla daha düşük düzeyde olmasından dolayı Hcy'nin TRPV1 kanal ekspresyonunu artırdığı sonucuna varılmıştır. Kontrol grubu ile diğer tüm gruplar kıyaslandığında, MEM grubunda TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 kanal ekspresyonlarının tümünde azalma görülürken MEM haricindeki diğer gruplarda ise kontrole kıyasla artış görülmüştür. Yine MEM'in kombine olarak kullanıldığı A β +MEM grubunda A β grubuna kıyasla, Hcy+MEM grubunda Hcy grubuna kıyasla ve A β +Hcy+MEM grubunda ise A β +Hcy

grubuna kıyasla TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 kanal ekspresyon düzeylerinde önemli bir düşüş olduğu sonucu elde edilmiştir. Bu durum MEM'in oksidatif stres ve hücre içi mekanizmalar yanı sıra TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 kanalları üzerine doğrudan veya dolaylı olarak bir etkisinin olduğu sonucu ile açıklanabilir.

Tez çalışmamızda oksidatif stresin fazla olduğu A β +Hcy, A β , Hcy gruplarında MEM uygulanan gruplara kıyasla daha fazla düzeyde TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 kanal ekspresyonu saptanmış, bu gruplarda hücre ölümü, ROT üretimi, mitokondriyal depolarizasyon, PARP1 düzeyi ile aktif kaspaz 3 ve 9 aktivitesinin genel olarak fazla, hücre canlılığının ise düşük olması, AH'de TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 kanallarının önemini bir kez daha göstermektedir.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

NMDA reseptörleri ve TRP kanal aktivasyonuna bağlı aşırı hücre içi Ca^{+2} artışı sinir hücresi ölümü ve Alzheimer hastalığına neden olduğu iyi bilinirken, Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılan memantin TRP kanalları üzerindeki etkisi henüz bilinmemektedir. TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 katyon kanallarının nöronlarda ölüme götüren süreçlerde ne gibi rolünün olduğunu anlamak ve Alzheimer hastalığı tedavisinde oldukça önem arz etmektedir. Tez çalışmamızda, *in vitro* Alzheimer hastalığı model oluşumu için A β ile inkübe edilen hipokampal nöronlarda Hcy ve memantin TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 kanalı üzerine etkileri araştırılmıştır. Yapılan analizler neticesinde A β ve Hcy'nin TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 kanallarının daha fazla aktivasyonuna neden olduğu, memantin ise A β ve Hcy'nin neden olduğu TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 aracılı aşırı Ca^{+2} girişini önlediği sonucu elde edilmiştir. Hipokampal hücrelerde oksidatif stresle TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 kanallarının aktive olması hücreye Ca^{+2} girişini artırmaktadır. Sitozolik Ca^{+2} seviyelerinin artışı, mitokondriyal membran potansiyelini artırarak mitokondriyal depolarizasyon neticesinde hücrel apoptozis süreçlerinin aktiflenmesine sebep olduğu bilinmektedir. Bu çalışmayla Hcy bölünmüş kaspaz 3 ve 9 enzimlerinin aktivasyonuna ve apoptozise neden olurken, memantin ise kaspaz 3 ve 9 aktivasyonunu azalttığı ve hücrenin ölüme gitmesine engel olduğu sonucu ortaya çıkmıştır. Nörodejeneratif bir hastalık olan Alzheimer Hastalığı'nda apoptozis, beraberinde beyin dokusunun küçülmesi ile sonuçlanan bir süreçtir. Alzheimer Hastalığının tedavisi ile ilgili kısımda bahsettiğimiz tedavi prensipleri kalıcı bir çözümden ziyade, hastalara daha çok semptomatik bir tedavi sunan ve hastalığın ilerlemesini geciktiren bir uygulamadan öteye gidememektedir. Elde etmiş olduğumuz sonuçlara göre TRPA1 (AP-18), TRPM2 (ACA) ve TRPV1 (CPZ) kanal blokeleri bu kanalların aktivasyonunu baskımlarken, kanal blokelerinin memantin ile birlikte kullanılmaları bir dizi hücrel moleküler apoptotik reaksiyonu sonucunda nöron ölümünü dikkat çekici bir şekilde azaltmıştır. Elde edilen sonuçlar, günümüzde Alzheimer Hastalığı için tercih edilen pahalı tedavi yaklaşımları yerine, tez çalışmamızda kalsiyum kanal blokerlerinin TRP kanalları aktivasyonları üzerine etkileri bilindiğinden, *in vivo* deney hayvanı modellerinde de mevcut kanal blokeri uygulamasının daha etkili olabileceği fikrini doğrulamaktadır. Elde edilen veriler, başta ülke ekonomisi üzerine bir yük olan pahalı

Alzheimer Hastalığı'nın tedavi yaklaşımlarına ucuz bir alternatif olabilmesinin yanı sıra, Alzheimer Hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların patogenezi ve tedavisine yönelik *in vivo* ve *in vitro* çalışma planlayan araştırmacılara, Alzheimer Hastalığı'nda TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 kanallarının fonksiyonunu anlatan bir potansiyel kaynak olarak geleceğe ışık tutacak niteliktedir.

Sonuç olarak, Alzheimer hastalığının oluşumunda Hcy zararlı etkisini TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 kanallarını aşırı aktive ederek gerçekleştirirken, incelenen değerler üzerinde memantin olumlu etkisini bu kanalları düzenleyerek katkı sağlamıştır. Memantin Alzheimer tedavisinde yaygın olarak kullanılıyor olmasına rağmen, Hcy yüksekliği ve Alzheimer hastalığı durumunda memantin kullanılabilişliği konusunda literatürde yapılmış bir deneysel çalışma yoktur. Çalışmamızın sonuçlarının bu boşluğu dolduracağı kanaatindeyiz. Çalışma sonuçlarımız memantin, TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 kanal aktivasyonuna bağlı gelişen hipokampal nörolojik hastalıkların tedavisinde potansiyel ilaç olarak kullanılabileceği gerçeğini de ortaya çıkarmıştır. Bu sonuçların insan klinik çalışmaları ile doğrulanması, mevcut ilacın (memantin) başka hastalıkların tedavisinde de kullanılması için önemli kaynak oluşturulacaktır.

ÖZET

Fare *in vitro* Alzheimer Modelinde Hipokampus TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 Katyon Kanalları Üzerinde Homosistein İle Memantin 'in Etkilerinin Araştırılması

NMDA reseptörleri ve TRP kanal aktivasyonuna bağlı aşırı hücre içi Ca^{+2} artışının sinir hücresi ölümü ve Alzheimer hastalığı (AH)'na neden olduğu iyi bilinirken, AH tedavisinde kullanılan memantin TRP kanalları üzerindeki etkisi henüz bilinmemektedir. Hcy'nin Alzheimer hastalığı oluşumunda oksidatif stresi artırarak rol oynadığı iyi bilinmektedir. Memantin, $A\beta$ ve Hcy'nin neden olduğu oksidatif stres TRPA1, TRPM2 ve TRPV kanallarını aktivasyonunu önleyerek aşırı apoptozis ve mitokondriyal oksidatif stres oluşumuna engel olabilir. $A\beta$ ile oluşturulan *in vitro* AH modelinde TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 katyon kanalları aktivasyonu yolu ile Hcy'nin tetiklediği mitokondriyal oksidatif stresle indüklenen hücresel hasar üzerinde memantin koruyucu etkisi araştırıldı.

İzole edilen fare hipokampus hücreleri kontrol, $A\beta$, Hcy, MEM, $A\beta$ +Hcy, $A\beta$ +Hcy+MEM, $A\beta$ +MEM, Hcy+MEM olacak şekilde toplamda sekiz gruba ayrıldı. İzole edilen hipokampus hücreleri kendi gruplarına özgü $A\beta$ (20 μ M ve 24 saat), Hcy (250 μ M ve 30 dakika) ve memantin (10 μ M ve 24 saat) ile inkübe edildiler.

Kalsiyum sinyali analizlerinde TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 kanal inhibisyonu sırası ile AP-18 (0.020 mM), N-(p-Amylcinnamoyl) antranilik asit (0.025 mM) ve kapsazepin (0.1 mM) yapılırken, kanal aktivasyonları sırası ile sinamaldehyd (0.1 mM), cumene hidroperoksit (0.1 mM) ve kapsaisin (0.01 mM) ile yapıldı. TRPA1, TRPM2 and TRPV1 kanal uyarımları ile yapılan analizlerde, hücre içi serbest Ca^{+2} , mitokondriyal depolarizasyon, hücre içi oksidatif stres düzeyleri, apoptozis, aktif kaspaz 3 ve 9 düzeyleri kontrole kıyasla $A\beta$ ve Hcy gruplarında yüksek iken, MEM grubunda $A\beta$ ve Hcy kıyasla daha düşük gözlemlendi. $A\beta$ ve Hcy gruplarında azalan hücre canlılığı değerleri, memantin tedavisi ile arttığı gözlemlendi. Benzer şekilde, aktif kaspaz 3, kaspaz 9 ve PARP1, TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 kanal ekspresyon düzeyleri kontrole kıyasla, $A\beta$ ve Hcy gruplarında yüksek iken, MEM grubunda $A\beta$ ve Hcy gruplarına kıyasla daha düşük gözlemlendi. Araştırılan bu değerlerin MEM ile birlikte TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 kanal blokelerinin kullanılması durumunda sadece MEM grubuna kıyasla daha da azaldığı gözlemlendi.

Sonuç olarak, TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 kanalları aracılı $A\beta$ ve Hcy ile indüklenen hipokampal nöron ölümlerinde MEM'in bu kanalların aşırı aktivasyonunu önlediği gözlemlendi. $A\beta$ ve Hcy'nin neden olduğu hipokampus aşırı mitokondriyal oksidatif stres üretimi, stozole aşırı Ca^{+2} girişi ve apoptozise karşı memantin TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 kanal aktivasyonunu düzenleyerek koruyucu etkisinin olduğu gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer hastalığı, Apoptozis, Homosistein, Memantin, Oksidatif stres, TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 katyon kanalları,

ABSTRACT

Effects of Homocysteine and Memantine on TRPA1, TRPM2 and TRPV1 Cation Channels in Mouse Hippocampus of in Vitro Alzheimer's Disease Model

It is well known that overload calcium ion entry (Ca^{2+}) and excessive reactive oxygen species (ROS) production have important role in etiology of Alzheimer's disease (AD). Memantine (MEM) has been used to treat patients with AD though inhibition of Ca^{2+} entry and glutamate receptor. The Ca^{2+} permeable TRPA1, TRPM2 and TRPV1 channels are activated in the hippocampus by oxidative stress, and antioxidant MEM as a potent TRPA1, TRPM2 and TRPV1 channel antagonist may reduce $\text{A}\beta$ -induced oxidative stress and apoptosis in the neurons. In the current study, we investigated the neuroprotective properties of MEM in $\text{A}\beta$ -induced primary mice hippocampal neuron cultures.

Freshly isolated hippocampal neurons divided into eight groups as control, $\text{A}\beta$, Hcy, MEM, $\text{A}\beta$ +Hcy, $\text{A}\beta$ +Hcy+MEM, $\text{A}\beta$ +MEM, Hcy+MEM. The neurons were incubated with $\text{A}\beta$ (20 μM for 24 h), Hcy (250 μM for 30 min) and MEM (10 μM for 24 h). The eight groups, TRPA1, TRPM2 and TRPV1 were further activated by cinnamaldehyde (0.1 mM), cumene hydroperoxide (0.1 mM) and capsaicin (0.01 mM), respectively although they were further inhibited by AP-18 (0.020 mM), N-(p-Amylcinnamoyl) anthranilic acid (ACA and 0.025 mM) and capsazepine (CPZ and 0.1 mM). The [Ca^{2+}] concentration, apoptosis, caspase 3, caspase 9 activations, mitochondrial membrane depolarization and intracellular ROS production values in the neurons were higher in $\text{A}\beta$ and Hcy groups than in control although they were lower in the MEM group than in $\text{A}\beta$ and Hcy groups. The values were further decreased by MEM+AP-18, MEM+CPZ and MEM+ACA treatments as compared to MEM only. $\text{A}\beta$ and Hcy-induced decrease of cell viability level was increased by MEM treatment although $\text{A}\beta$ and Hcy-induced increase of caspase 3, caspase 9, PARP1, TRPA1, TRPM2 and TRPV1 channels expression levels were decreased by MEM treatments.

In conclusion, TRPA1, TRPM2 and TRPV1 channels are involved in $\text{A}\beta$ and Hcy-induced neuronal death, and modulation of the activity of these channels by MEM treatment may account for their neuroprotective activity against apoptosis, excessive ROS production, and Ca^{2+} entry.

Keywords: Alzheimer's Disease, Apoptosis, Homocysteine, Memantine, Oxidative stress, TRPA1, TRPM2 and TRPV1 cation channels, Ca^{2+} signaling,

KAYNAKLAR

1. Türkiye Alzheimer Derneği'nin 2015 yılına ait sunmuş olduğu Alzheimer'lı hasta raporu. <http://www.alzheimerderneği.org.tr/adan-zye-alzheimer/> (TAD-2016)
2. Hao W, Friedman A. Mathematical model on Alzheimer's disease. *BMC Syst Biol.* 2016 Nov 18;10(1):108. PubMed PMID: 27863488; PubMed Central PMCID: PMC5116206.
3. Nida Demirçak, YL Tezi. PC12 nöronal hücre hattında amiloid beta ile oluşturulan alzheimer modelinde saponinlerin oksidatif makromolekül hasarı üzerine etkisinin incelenmesi, Dokuz Eylül Üniv. Moleküler Tıp A.D, 2012. YÖK Tez Kodu: 331296
4. Tönnies E, Trushina E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2017 Dec 3. doi: 10.3233/JAD-161088. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 28059794.
5. Zeng C, Zhou P, Jiang T, Yuan C, Ma Y, Feng L, Liu R, Tang W, Long X, Xiao B, Tian F. Upregulation and Diverse Roles of TRPC3 and TRPC6 in Synaptic Reorganization of the Mossy Fiber Pathway in Temporal Lobe Epilepsy. *Mol Neurobiol.* 2015 Aug;52(1):562-72. doi: 10.1007/s12035-014-8871-x. PubMed PMID: 25213992.
6. Mizuno K, Kono T, Suzuki Y, Miyagi C, Omiya Y, Miyano K, Kase Y, Uezono Y. Goshajinkigan, a traditional Japanese medicine, prevents oxaliplatin-induced acute peripheral neuropathy by suppressing functional alteration of TRP channels in rat. *J Pharmacol Sci.* 2014;125(1):91-8. PubMed PMID: 24784702.
7. Kamat PK, Kalani A, Givvimani S, Sathnur PB, Tyagi SC, Tyagi N. Hydrogen sulfide attenuates neurodegeneration and neurovascular dysfunction induced by intracerebral-administered homocysteine in mice. *Neuroscience* 2013; 252: 302-19.
8. Kamat PK, Vacek JC, Kalani A, Tyagi N. Homocysteine Induced Cerebrovascular Dysfunction: A Link to Alzheimer's Disease Etiology. *Open Neurol J.* 2015 Jun 24;9:9-14. doi: 10.2174/1874205X01509010009.
9. Övey IS, Nazıroğlu M. Homocysteine and cytosolic GSH depletion induce apoptosis and oxidative toxicity through cytosolic calcium overload in the hippocampus of aged mice: involvement of TRPM2 and TRPV1 channels. *Neuroscience.* 2015 Jan 22;284:225-33. Doi 10.1016/j.neuroscience.2014.09.078.
10. Shao ZQ. Comparison of the efficacy of four cholinesterase inhibitors in combination with memantine for the treatment of Alzheimer's disease. *Int J Clin Exp Med.* 2015 Feb 15;8(2):2944-8. PubMed PMID: 25932260; PubMed Central PMCID:PMC4402907.
11. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Kamu Hastaneleri Kurumu İstatistik, Analiz ve Raporlama Daire Bşk. 18.09.2015 tarih 11 sayılı numaralı Rapor Bülteni

12. Cankurtaran M, Yavuz BB, Cankurtaran ES, Halil M, Ulger Z, Ariogul S. Risk factors and type of dementia: vascular or Alzheimer? Arch Gerontol Geriatr. 2008 Jul-Aug;47(1):25-34. PubMed PMID: 17692938.
13. Tuba Gül YAZICI, Hüseyin A. ŞAHİN, On Dokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı, Samsun, Alzheimer Hastalığı, Derleme, 2008
14. Berchtold NC, Cotman CW. Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer's disease: Greco-roman period to the 1960s. Neurobiol Aging, 1998; 19(3): 173-189
15. Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. Alzheimer's disease. Lancet. 2011 Mar 19;377(9770):1019-31. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61349-9. Review. PubMed PMID: 21371747.
16. Pievani M, de Haan W, Wu T, Seeley WW, Frisoni GB. Functional network disruption in the degenerative dementias. Lancet Neurology, 2011, 10: 829-843.
17. Petersen RC, Wiste HJ, Weigand SD, Rocca WA, Roberts RO, Mielke MM, Lowe VJ, Knopman DS, Pankratz VS, Machulda MM, Geda YE, Jack CR Jr. Association of Elevated Amyloid Levels With Cognition and Biomarkers in Cognitively Normal People From the Community. JAMA Neurol. 2016 Jan;73(1):85-92. doi:10.1001/jamaneurol.2015.3098. Erratum in: JAMA Neurol. 2016 Apr;73(4):481. PubMed PMID: 26595683; PubMed Central PMCID: PMC4710552.
18. Mendez MF. What is the Relationship of Traumatic Brain Injury to Dementia? J Alzheimers Dis. 2017 Mar 2. doi: 10.3233/JAD-161002. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 28269777.
19. Texel SJ, Zhang J, Camandola S, Unger EL, Taub DD, Koehler RC, Harris ZL, Mattson MP. Ceruloplasmin deficiency reduces levels of iron and BDNF in the cortex and striatum of young mice and increases their vulnerability to stroke. PLoS One. 2011;6(9):e25077. doi: 10.1371/journal.pone.0025077. PubMed PMID: 21949858; PubMed Central PMCID: PMC3174999.
20. Solomon A, Mangialasche F, Richard E, Andrieu S, Bennett DA, Breteler M, Fratiglioni L, Hooshmand B, Khachaturian AS, Schneider LS, Skoog I, Kivipelto M. Advances in the prevention of Alzheimer's disease and dementia. J Intern Med. 2014 Mar;275(3):229-50. doi: 10.1111/joim.12178. PubMed PMID: 24605807; PubMed Central PMCID: PMC4390027.
21. Guerreiro R, Hardy J. Genetics of Alzheimer's disease. Neurotherapeutics. 2014 Oct;11(4):732-7. doi: 10.1007/s13311-014-0295-9. Review. PubMed PMID: 25113539; PubMed Central PMCID: PMC4362699.
22. Yalug I, Selekler M, Erdogan A, Kutlu A, Dundar G, Ankarali H, Aker T. Correlations between alexithymia and pain severity, depression, and anxiety among patients with chronic and episodic migraine. Psychiatry Clin Neurosci. 2010 Jun;64(3):231-8. doi: 10.1111/j.1440-1819.2010.02093.x. PubMed PMID: 20602723.

23. Klementieva O, Willén K, Martinsson I, Israelsson B, Engdahl A, Cladera J, Uvdal P, Gouras GK. Pre-plaque conformational changes in Alzheimer's disease-linked A β and APP. *Nat Commun.* 2017 Mar 13;8:14726. doi: 10.1038/ncomms14726. PubMed PMID: 28287086.
24. Edip Tosun, YL Tezi. Büt-2-endoik asit bis-(benzil-fenil-amit) türevi bileşiklerin sentezi asetilkolinesteraz ve butilkolinesteraz enzimlerine karşı aktivitelerinin araştırılması, Erzurum Atatürk Üniv. Farmasötik Kimya A. D.2014. YÖK Tez No: 379330.
25. Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2011 Sep;1(1):a006189. doi:10.1101/cshperspect. a006189. Review. PubMed PMID: 22229116; PubMed Central PMCID:PMC3234452.
26. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 1991;82(4):239-59. Review. PubMed PMID: 1759558.
27. Sperling R. Potential of functional MRI as a biomarker in early Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2011 Dec;32 Suppl 1:S37-43. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2011.09.009. Review. PubMed PMID: 22078171; PubMed Central PMCID: PMC3233699.
28. Jack, C.R., Jr., et al., Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol*, 2010. 9(1): p. 119-28.
29. Weintraub, S., A.H. Wicklund, and D.P. Salmon, The neuropsychological profile of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012. 2(4): p. a006171.
30. Charles V, Mufson EJ, Friden PM., Bartus RT, Kordower JH. (1996). Atrophy of cholinergic basal forebrain neurons following excitotoxic cortical lesions is reversed by intravenous administration of an NGF conjugate. *Brain Res*, 728: 193–203.
31. Clapham DE, Runnels LW, Strübing C. The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci.* 2001;2(6):387-96.
32. Liedtke WB. TRP ion channel function in sensory transduction and cellular signaling cascades: CRC Press; 2006.
33. Sun L, Yau H-Y, Wong W-Y, Li RA, Huang Y, Yao X. Role of TRPM2 in H₂O₂-induced cell apoptosis in endothelial cells. *PLoS One.* 2012;7(8):e43186.
34. Prevarskaya N, Zhang L, Barritt G. TRP channels in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1772(8):937-46.
35. Nazıroğlu M, Dikici DM, Dursun Ş. Role of oxidative stress and Ca²⁺ signaling on molecular pathways of neuropathic pain in diabetes: focus on TRP channels. *Neurochem Res.* 2012;37(10):2065-75.
36. Yamamoto S, Wajima T, Hara Y, Nishida M, Mori Y. Transient receptor potential channels in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1772(8):958-67.
37. Öz A, Cihangir A. Migren patogeneğinde oksidatif strese duyarlı TRP kanallarının rolleri. *Med J SDU/SDÜ Tıp Fak Derg.* 2015;22(4):144-50.

38. Marsakova L, Barvik I, Zima V, Zimova L, Vlachova V. The First Extracellular Linker Is Important for Several Aspects of the Gating Mechanism of Human TRPA1 Channel. *Front Mol Neurosci.* 2017 Jan 31;10:16. doi: 10.3389/fnmol.2017.00016. PubMed PMID: 28197074; PubMed Central PMCID: PMC5281607.
39. Lee KI, Lee HT, Lin HC, Tsay HJ, Tsai FC, Shyue SK, Lee TS. Role of transient receptor potential ankyrin 1 channels in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation.* 2016 Apr 27;13(1):92. doi: 10.1186/s12974-016-0557-z. PubMed PMID: 27121378; PubMed Central PMCID: PMC4847235.
40. Asgar J, Zhang Y, Saloman JL, Wang S, Chung MK, Ro JY. The role of TRPA1 in muscle pain and mechanical hypersensitivity under inflammatory conditions in rats. *Neuroscience.* 2015 Dec 3;310:206-15. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.09.042. PubMed PMID: 26393428; PubMed Central PMCID: PMC4633371.
41. Yamamoto K, Chiba N, Chiba T, Kambe T, Abe K, Kawakami K, Utsunomiya I, Taguchi K. Transient receptor potential ankyrin 1 that is induced in dorsal root ganglion neurons contributes to acute cold hypersensitivity after oxaliplatin administration. *Mol Pain.* 2015 Nov 13;11:69. doi: 10.1186/s12990-015-0072-8. PubMed PMID: 26567040; PubMed Central PMCID: PMC4644342.
42. Nie Y, Huang C, Zhong S, Wortley MA, Luo Y, Luo W, Xie Y, Lai K, Zhong N. Cigarette smoke extract (CSE) induces transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) expression via activation of HIF1 α in A549 cells. *Free Radic Biol Med.* 2016 Oct;99:498-507. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.07.028. PubMed PMID: 27480844.
43. Corey DP, García-Añoveros J, Holt JR, Kwan KY, Lin SY, Vollrath MA, Amalfitano A, Cheung EL, Derfler BH, Duggan A, Géléoc GS, Gray PA, Hoffman MP, Rehm HL, Tamasauskas D, Zhang DS. TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature.* 2004 Dec 9;432(7018):723-30. PubMed PMID: 15483558.
44. Tominaga M, Momonaka Y, Yokose C, Tadaishi M, Shimizu M, Yamane T, Oishi Y, Kobayashi-Hattori K. Anorexic action of deoxynivalenol in hypothalamus and intestine. *Toxicol.* 2016 Aug;118:54-60. doi: 10.1016/j.toxicol.2016.04.036. PubMed PMID: 27090011.
45. Zappia KJ, Garrison SR, Hillery CA, Stucky CL. Cold hypersensitivity increases with age in mice with sickle cell disease. *Pain.* 2014 Dec;155(12):2476-85. doi: 10.1016/j.pain.2014.05.030. PubMed PMID: 24953902; PubMed Central PMCID: PMC4250326.
46. Mukhopadhyay I, Gomes P, Aranake S, Shetty M, Karnik P, Damle M, Kuruganti S, Thorat S, Khairatkar-Joshi N. Expression of functional TRPA1 receptor on human lung fibroblast and epithelial cells. *J Recept Signal Transduct Res.* 2011 Oct;31(5):350-8. doi: 10.3109/10799893.2011.602413. PubMed PMID: 21848366.

47. Meents JE, Fischer MJ, McNaughton PA. Sensitization of TRPA1 by Protein Kinase A. *PLoS One*. 2017 Jan 11;12(1):e0170097. doi: 10.1371/journal.pone.0170097. PubMed PMID: 28076424; PubMed Central PMCID: PMC5226813.
48. Summers T, Wang Y, Hanten B, Burrell BD. Physiological, pharmacological and behavioral evidence for a TRPA1 channel that can elicit defensive responses in the medicinal leech. *J Exp Biol*. 2015 Oct;218(Pt 19):3023-31. doi: 10.1242/jeb.120600. PubMed PMID: 26254323.
49. Brooks SM, Bernstein IL. Irritant-induced airway disorders. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2011 Nov;31(4):747-68, vi. doi: 10.1016/j.iac.2011.07.002. Review. PubMed PMID: 21978855.
50. Taylor-Clark TE. Role of reactive oxygen species and TRP channels in the cough reflex. *Cell Calcium*. 2016 Sep;60(3):155-62. doi: 10.1016/j.ceca.2016.03.007. Review. PubMed PMID: 27016063; PubMed Central PMCID: PMC5012938.
51. Kozai D, Ogawa N, Mori Y. Redox regulation of transient receptor potential channels. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Aug 20;21(6):971-86. doi: 10.1089/ars.2013.5616. Review. PubMed PMID: 24161127.
52. Santoni G, Cardinali C, Morelli MB, Santoni M, Nabissi M, Amantini C. Danger- and pathogen-associated molecular patterns recognition by pattern-recognition receptors and ion channels of the transient receptor potential family triggers the inflammasome activation in immune cells and sensory neurons. *J Neuroinflammation*. 2015 Feb 3;12:21. doi: 10.1186/s12974-015-0239-2. Review. PubMed PMID: 25644504; PubMed Central PMCID: PMC4322456.
53. De Logu F, Patacchini R, Fontana G, Geppetti P. TRP functions in the broncho-pulmonary system. *Semin Immunopathol*. 2016 May;38(3):321-9. doi: 10.1007/s00281-016-0557-1. Review. PubMed PMID: 27083925.
54. Kim S, Hwang SW. Emerging roles of TRPA1 in sensation of oxidative stress and its implications in defense and danger. *Arch Pharm Res*. 2013 Jul;36(7):783-91. doi: 10.1007/s12272-013-0098-2. Review. PubMed PMID: 23558672.
55. Zygmunt PM, Högestätt ED. TRPA1. *Handb Exp Pharmacol*. 2014;222:583-630. doi:10.1007/978-3-642-54215-2_23. Review. PubMed PMID: 24756722.
56. Belvisi MG, Dubuis E, Birrell MA. Transient receptor potential A1 channels: insights into cough and airway inflammatory disease. *Chest*. 2011 Oct;140(4):1040-7. doi: 10.1378/chest.10-3327. PubMed PMID: 21972382; PubMed Central PMCID: PMC3186687.
57. Wagner TF, Loch S, Lambert S, Straub I, Mannebach S, Mathar I, et al. Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic β cells. *Nat Cell Biol*. 2008;10(12):1421-30.
58. W Runnels L. TRPM6 and TRPM7: A Mul-TRP-PLIK-cation of channel functions. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011;12(1):42-53.
59. Guinamard R, Sallé L, Simard C. The non-selective monovalent cationic channels TRPM4 and TRPM5. *Transient Receptor Potential Channels: Springer*; 2011. p. 147-71.

60. Clapham DE. Mammalian TRP channels. *Cell*. 2007;129(1):220.
61. Nazıroğlu M, Özgöl C. Effects of antagonists and heat on TRPM8 channel currents in dorsal root ganglion neuron activated by nociceptive cold stress and menthol. *Neurochem Res*. 2012;37(2):314-20.
62. Perraud A-L, Fleig A, Dunn CA, Bagley LA, Launay P, Schmitz C, et al. ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature*. 2001;411(6837):595-9.
63. Sano Y, Inamura K, Miyake A, Mochizuki S, Yokoi H, Matsushime H, et al. Immuncyte Ca²⁺ influx system mediated by LTRPC2. *Science*. 2001;293(5533):1327-30.
64. Nilius B. Transient receptor potential (TRP) cation channels: rewarding unique proteins. *Bull Mem Acad R Med Belg*. 2006;162(3-4):244-53.
65. Fliegert R, Gasser A, Guse A. Regulation of calcium signalling by adenine-based second messengers. *Biochem Soc Trans*. 2007;35(1):109-14.
66. Kolisek M, Beck A, Fleig A, Penner R. Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels. *Molecular cell*. 2005;18(1):61-9.
67. Kühn FJ, Heiner I, Lückhoff A. TRPM2: a calcium influx pathway regulated by oxidative stress and the novel second messenger ADP-ribose. *Pflugers Arch*. 2005 Oct;451(1):212-9. Review. PubMed PMID: 15952035.
68. Kheradpezhoh E, Barritt GJ, Rychkov GY. Curcumin inhibits activation of TRPM2 channels in rat hepatocytes. *Redox Biol*. 2016 Apr;7:1-7. doi: 10.1016/j.redox.2015.11.001. PubMed PMID: 26609559; PubMed Central PMCID: PMC4683391.
69. Yamamoto S, Shimizu S, Kiyonaka S, Takahashi N, Wajima T, Hara Y, Negoro T, Hiroi T, Kiuchi Y, Okada T, Kaneko S, Lange I, Fleig A, Penner R, Nishi M, Takeshima H, Mori Y. TRPM2-mediated Ca²⁺-influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. *Nat Med*. 2008 Jul;14(7):738-47. doi: 10.1038/nm1758. PubMed PMID: 18542050; PubMed Central PMCID: PMC2789807.
70. Kraft R, Grimm C, Frenzel H, Harteneck C. Inhibition of TRPM2 cation channels by N-(p-amylicinnamoyl)anthranilic acid. *Br J Pharmacol*. 2006 Jun;148(3):264-73. PubMed PMID: 16604090; PubMed Central PMCID: PMC1751561.
71. Satheesh NJ, Uehara Y, Fedotova J, Pohanka M, Büsselberg D, Kruzliak P. TRPV currents and their role in the nociception and neuroplasticity. *Neuropeptides*. 2016 Jun;57:1-8. doi: 10.1016/j.npep.2016.01.003. Review. PubMed PMID: 26825374.
72. Hilton et al., 2015, J.K. Hilton, P. Rath, C.V. Heisell, O. Beckstein, W.D. Van Horn Understanding thermosensitive TRP channels as versatile polymodal cellular sensors *Biochemistry*, 54 (2015), pp. 2401–2413.

73. Huynh KW, Cohen MR, Chakrapani S, Holdaway HA, Stewart PL, Moiseenkova-Bell VY. Structural insight into the assembly of TRPV channels. *Structure*. 2014 Feb 4;22(2):260-8. doi: 10.1016/j.str.2013.11.008. PubMed PMID: 24373766.
74. Huynh KW, Cohen MR, Moiseenkova-Bell VY. Application of amphipols for structure-functional analysis of TRP channels. *J Membr Biol*. 2014 Oct;247(9-10):843-51. doi: 10.1007/s00232-014-9684-6. Review. PubMed PMID: 24894720; PubMed Central PMCID: PMC4198461.
75. Hong S, Agresta L, Guo C, Wiley JW. The TRPV1 receptor is associated with preferential stress in large dorsal root ganglion neurons in early diabetic sensory neuropathy. *J Neurochem*. 2008 May;105(4):1212-22. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05220.x. PubMed PMID: 18182051.
76. Taylor-Clark TE, Udem BJ. Sensing pulmonary oxidative stress by lung vagal afferents. *Respir Physiol Neurobiol*. 2011 Sep 30;178(3):406-13. doi: 10.1016/j.resp.2011.05.003. Review. PubMed PMID: 21600314; PubMed Central PMCID: PMC3170436.
77. Akpınar H, Nazıroğlu M, Övey İS, Çiğ B, Akpınar O. The neuroprotective action of dexmedetomidine on apoptosis, calcium entry and oxidative stress in cerebral ischemia-induced rats: Contribution of TRPM2 and TRPV1 channels. *Sci Rep*. 2016 Nov 22;6:37196. doi: 10.1038/srep37196. PubMed PMID: 27872485; PubMed Central PMCID: PMC5131653.
78. Zhang Y, Sreekrishna K, Lin Y, Huang L, Eickhoff D, Degenhardt C, Xu T. Modulation of transient receptor potential (TRP) channels by Chinese herbal extracts. *Phytother Res*. 2011 Nov;25(11):1666-70. doi: 10.1002/ptr.3427. PubMed PMID: 21432926.
79. Soompon S, Phoolcharoen W, Pavasant P. Thermal stimulation of TRPV1 up-regulates TNF α expression in human periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol*. 2013 Jul;58(7):887-95. doi: 10.1016/j.archoralbio.2013.01.010. PubMed PMID: 23411401.
80. Keeble JE, Bodkin JV, Liang L, Wodarski R, Davies M, Fernandes ES, Coelho Cde F, Russell F, Graepel R, Muscara MN, Malcangio M, Brain SD. Hydrogen peroxide is a novel mediator of inflammatory hyperalgesia, acting via transient receptor potential vanilloid 1-dependent and independent mechanisms. *Pain*. 2009 Jan;141(1-2):135-42. doi: 10.1016/j.pain.2008.10.025. PubMed PMID: 19059721.
81. Susankova K, Tousova K, Vyklicky L, Teisinger J, Vlachova V. Reducing and oxidizing agents sensitize heat-activated vanilloid receptor (TRPV1) current. *Mol Pharmacol*. 2006 Jul;70(1):383-94. PubMed PMID: 16614139.
82. Jin Y, Kim DK, Khil LY, Oh U, Kim J, Kwak J. Thimerosal decreases TRPV1 activity by oxidation of extracellular sulfhydryl residues. *Neurosci Lett*. 2004 Oct 21;369(3):250-5. PubMed PMID: 15464274.

83. Liu B, Tai Y, Caceres AI, Achanta S, Balakrishna S, Shao X, Fang J, Jordt SE. Oxidized Phospholipid OxPAPC Activates TRPA1 and Contributes to Chronic Inflammatory Pain in Mice. *PLoS One*. 2016 Nov 3;11(11):e0165200. doi: 10.1371/journal.pone.0165200. PubMed PMID: 27812120.
84. Yazğan Y, Nazıroğlu M. Ovariectomy-Induced Mitochondrial Oxidative Stress, Apoptosis, and Calcium Ion Influx Through TRPA1, TRPM2, and TRPV1 Are Prevented by 17 β -Estradiol, Tamoxifen, and Raloxifene in the Hippocampus and Dorsal Root Ganglion of Rats. *Mol Neurobiol*. 2016 Nov 10. [Epub ahead of print] PubMed PMID:27832523.
85. Deng QS, Dong XY, Wu H, Wang W, Wang ZT, Zhu JW, Liu CF, Jia WQ, Zhang Y, Schachner M, Ma QH, Xu RX. Disrupted-in-Schizophrenia-1 Attenuates Amyloid- β Generation and Cognitive Deficits in APP/PS1 Transgenic Mice by Reduction of β -Site APP-Cleaving Enzyme 1 Levels. *Neuropsychopharmacology*. 2016 Jan;41(2):440-53. doi: 10.1038/npp.2015.164. PubMed PMID: 26062786; PubMed Central PMCID: PMC5130120.
86. Heneka MT, Golenbock DT, Latz E. Innate immunity in Alzheimer's disease. *Nat Immunol*. 2015;16:229–36.
87. Morales I, Guzmán-Martínez L, Cerda-Troncoso C, Farías GA, Maccioni RB. Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:112.
88. Rodríguez JJ, Olabarria M, Chvatal A, Verkhratsky A. Astroglia in dementia and Alzheimer's disease. *Cell Death Differ*. 2009;16:378–85.
89. Verkhratsky A, Olabarria M, Noristani HN, Yeh CY, Rodriguez JJ. Astrocytes in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*. 2010;7:399–412.
90. Zhang F, Jiang L. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2015;11:243–56.
91. Lee KI, Lee HT, Lin HC, Tsay HJ, Tsai FC, Shyue SK, Lee TS. Role of transient receptor potential ankyrin 1 channels in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*. 2016 Apr 27;13(1):92. doi: 10.1186/s12974-016-0557-z. PubMed PMID: 27121378; PubMed Central PMCID: PMC4847235.
92. Takahashi N, Kozai D, Mori Y. TRP channels: sensors and transducers of gasotransmitter signals. *Front Physiol*. 2012 Aug 9;3:324. doi: 10.3389/fphys.2012.00324. PubMed PMID: 22934072; PubMed Central PMCID: PMC3429092.
93. Corrigan F, Mander KA, Leonard AV, Vink R. Neurogenic inflammation after traumatic brain injury and its potentiation of classical inflammation. *J Neuroinflammation*. 2016 Oct 11;13(1):264. Review. PubMed PMID: 27724914; PubMed Central PMCID: PMC5057243.
94. Kimura H. Physiological role of hydrogen sulfide and polysulfide in the central nervous system. *Neurochem Int*. 2013 Nov;63(5):492-7. doi: 10.1016/j.neuint.2013.09.003. Review. PubMed PMID: 24036365.

95. Pereira I, Mendes SJ, Pereira DM, Muniz TF, Colares VL, Monteiro CR, Martins MM, Grisotto MA, Monteiro-Neto V, Monteiro SG, Calixto JB, Brain SD, Fernandes ES. Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Channel Expression on Peripheral Blood Leukocytes from Rheumatoid Arthritic Patients and Correlation with Pain and Disability. *Front Pharmacol.* 2017 Feb 10;8:53. doi: 10.3389/fphar.2017.00053. PubMed PMID: 28239353; PubMed Central PMCID: PMC5301024.
96. Yamamoto N, Fujii Y, Kasahara R, Tanida M, Ohora K, Ono Y, Suzuki K, Sobue K. Simvastatin and atorvastatin facilitates amyloid β -protein degradation in extracellular spaces by increasing neprilysin secretion from astrocytes through activation of MAPK/Erk1/2 pathways. *Glia.* 2016 Jun;64(6):952-62. doi: 10.1002/glia.22974. PubMed PMID: 26875818.
97. Moreno-Ortega AJ, Buendia I, Mouhid L, Egea J, Lucea S, Ruiz-Nuño A, López MG, Cano-Abad MF. CALHM1 and its polymorphism P86L differentially control Ca^{2+} homeostasis, mitogen-activated protein kinase signaling, and cell vulnerability upon exposure to amyloid β . *Aging Cell.* 2015 Dec;14(6):1094-102. doi: 10.1111/accel.12403. PubMed PMID: 26416646; PubMed Central PMCID: PMC4693463.
98. Yürüker V, Nazıroğlu M, Şenol N. Reduction in traumatic brain injury-induced oxidative stress, apoptosis, and calcium entry in rat hippocampus by melatonin: Possible involvement of TRPM2 channels. *Metab Brain Dis.* 2015 Feb;30(1):223-31. doi: 10.1007/s11011-014-9623-3. PubMed PMID: 25339252.
99. Ostapchenko VG, Chen M, Guzman MS, Xie YF, Lavine N, Fan J, Beraldo FH, Martyn AC, Belrose JC, Mori Y, MacDonald JF, Prado VF, Prado MA, Jackson MF. The Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) Channel Contributes to β -Amyloid Oligomer-Related Neurotoxicity and Memory Impairment. *J Neurosci.* 2015 Nov 11;35(45):15157-69. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4081-14.2015. PubMed PMID:26558786.
100. Shi S, Liang D, Chen Y, Xie Y, Wang Y, Wang L, Wang Z, Qiao Z. Gx-50 reduces β -amyloid-induced TNF- α , IL-1 β , NO, and PGE2 expression and inhibits NF- κ B signaling in a mouse model of Alzheimer's disease. *Eur J Immunol.* 2016 Mar;46(3):665-76. doi: 10.1002/eji.201545855. PubMed PMID: 26643273.
101. Missiaen L, Robberecht W, van den Bosch L, Callewaert G, Parys JB, Wuytack F, Raeymaekers L, Nilius B, Eggermont J, De Smedt H. Abnormal intracellular Ca^{2+} homeostasis and disease. *Cell Calcium.* 2000 Jul;28(1):1-21. Review. PubMed PMID: 10942700.
102. Pascale A, Etcheberrigaray R. Calcium alterations in Alzheimer's disease: pathophysiology, models and therapeutic opportunities. *Pharmacol Res.* 1999 Feb;39(2):81-8. Review. PubMed PMID: 10072697.
103. Hölscher C. Possible causes of Alzheimer's disease: amyloid fragments, free radicals, and calcium homeostasis. *Neurobiol Dis.* 1998 Sep;5(3):129-41. Review. PubMed PMID: 9848086.

104. Kelly B. L, Ferreira A. Beta-Amyloid-induced dynamin 1 degradation is mediated by N-methyl-D-aspartate receptors in hippocampal neurons, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 28079–28089.
105. Ho R, Ortiz D. Shea T. B, Amyloid-beta promotes calcium influx and neurodegeneration via stimulation of L voltage-sensitive calcium channels rather than NMDA channels in cultured neurons, *J. Alzheimers Dis.* 3 (2001) 479–483.
106. Demuro A, Mina E, Kaye R, Milton SC, Parker I, Glabe CG. Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J Biol Chem.* 2005 Apr 29;280(17):17294-300. PubMed PMID: 15722360.
107. Fedotova J, Soultanov V, Nikitina T, Roschin V, Ordyan N, Hritcu L. Cognitive-enhancing activities of the polyprenol preparation Ropren® in gonadectomized β -amyloid (25-35) rat model of Alzheimer's disease. *Physiol Behav.* 2016 Apr 1;157:55-62. doi: 10.1016/j.physbeh.2016.01.035. PubMed PMID: 26821186.
108. Saathoff JM, Liu K, Chojnacki JE, He L, Chen Q, Lesnefsky EJ, Zhang S. Mechanistic Insight of Bivalent Compound 21MO as Potential Neuroprotectant for Alzheimer's Disease. *Molecules.* 2016 Mar 25;21(4):412. doi: 10.3390/molecules21040412. PubMed PMID: 27023508; PubMed Central PMCID: PMC4831581.
109. Lanté F, Chafai M, Raymond EF, Pereira AR, Mouska X, Kootar S, Barik J, Bethus I, Marie H. Subchronic glucocorticoid receptor inhibition rescues early episodic memory and synaptic plasticity deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology.* 2015 Jun;40(7):1772-81. doi: 10.1038/npp.2015.25. PubMed PMID: 25622751; PubMed Central PMCID: PMC4915261.
110. Venegas C, Heneka MT. Danger-associated molecular patterns in Alzheimer's disease. *J Leukoc Biol.* 2017 Jan;101(1):87-98. doi: 10.1189/jlb.3MR0416-204R. Review. PubMed PMID: 28049142.
111. Okajima K, Harada N. Regulation of inflammatory responses by sensory neurons: molecular mechanism(s) and possible therapeutic applications *Curr. Med. Chem.*, 13 (2006), pp. 2241–2251
112. Ross RA. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors *Br. J. Pharmacol.*, 140 (2003), pp. 790–801
113. Szallasi A, Cruz F, Geppetti P. TRPV1: a therapeutic target for novel analgesic drugs? *Trends Mol. Med.*, 12 (2006), pp. 545–554
114. Tominaga M, Tominaga T. Structure and function of TRPV1 *Pflugers Arch.*, 451 (2005), pp. 143–150
115. Toth A, Boczan J, Kedei N, Lizanecz E, Bagi Z, Papp Z, Edes I, Csiba L, Blumberg PM. Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 135 (2005), pp. 162–168
116. Doly S, Fischer J, Salio C, Conrath M. The vanilloid receptor-1 is expressed in rat spinal dorsal horn astrocytes *Neurosci. Lett.*, 357 (2004), pp. 123–126

117. Kim SR, Kim SU, Oh U, Jin BK. Transient receptor potential vanilloid subtype 1 mediates microglial cell death in vivo and in vitro via Ca²⁺-mediated mitochondrial damage and cytochrome c release *J. Immunol.*, 177 (2006), pp. 4322–4329
118. Kim SR, Lee DY, Chung ES, Oh UT, Kim SU, Jin BK. Transient receptor potential vanilloid subtype 1 mediates cell death of mesencephalic dopaminergic neurons in vivo and in vitro *J. Neurosci.*, 25 (2005), pp. 662–671
119. S.R. Kim, S.U. Kim, U. Oh, B.K. Jin Transient receptor potential vanilloid subtype 1 mediates microglial cell death in vivo and in vitro via Ca²⁺-mediated mitochondrial damage and cytochrome c release *J. Immunol.*, 177 (2006), pp. 4322–4329
120. Jacobs RL, Jiang H, Kennelly JP, Orlicky DJ, Allen RH, Stabler SP, Maclean KN. Cystathionine beta-synthase deficiency alters hepatic phospholipid and choline metabolism: Post-translational repression of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase is a consequence rather than a cause of liver injury in homocystinuria. *Mol Genet Metab.* 2017 Mar 2. pii: S1096-7192(17)30144-0. doi: 10.1016/j.ymgme.2017.02.010. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 28291718.
121. Andersson A., Brattström L., Israelsson B., et al. , Plazma homocysteine before and after methionine loading with regard to age, gender and menopausalstatus. *Eur J Clin Invest*,1992; 22: 79-87.
122. Boztepe Derici Ü. Altok Reis K. Hpr-Hcy ve kronik böbrek yetmezliği. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 2002; I(3): 129-134.
123. Bolander C. Focus On Homocysteine And The Vitamins Involved In Its Metabolism (ed). Second enlarged et revised edition, Springer Verlag France, Sweden. 2002.
124. James D.F., John J.M. Homocysteine. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32: 385-389.
125. McCully KS. Hyperhomocysteinemia and arteriosclerosis: historical perspectives. *Clin Chem Lab Med.* 2005;43(10):980-6. Review. PubMed PMID: 16197285.
126. Brattström L., Lindgren A., Israelsson B., et al. Homocystein and cystein: Determinants of plasma levels in middle- aged and elderly subjects. *J Intern Med* 1994; 263: 633-641.
127. Temel İ., Özerol E. Homosistein metabolizma bozuklukları ve vasküler hastalıklarla ilişkisi. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2002; 9(2): 149-157.
128. Selhub J, Homocysteine metabolism. *Annu Rev.* 1999; 19: 217-246.
129. Todesco L, Angst C, Litynski P, Loehrer F, Fowler B, Haefeli WE. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma homocysteine and age. *Eur J Clin Invest.* 1999 Dec;29(12):1003-9. PubMed PMID: 10583447.

130. Brönstrup A, Pietrzik K. Low dose B vitamin intervention in elderly individuals: Extent of homocysteine plasma reduction and association with vitamin and genotype status for thermolabile methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Neth J Med* 1998; 2: 19.
131. Clarke, R., Smith, A.D., Jobst, K.A., Refsum, H., Sutton, L. and Ueland, P.M. (1998) Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 55, 1449–1455.
132. Morris, M.S., Fava, M., Jacques, P.F., Selhub, J. and Rosenberg, I.H. (2003) Depression and folate status in the US population. *Psychother. Psychosom.* 72, 80–87.
133. Selhub, J., Bagley, L.C., Miller, J. and Rosenberg, I.H. (2000) B vitamins, homocysteine, and neurocognitive function in the elderly. *Am. J. Clin Nutr.* 71, 614S–620S.
134. Goodwin, J.S., Goodwin, J.M. and Garry, P.J. (1983) Association between nutritional status and cognitive functioning in a healthy elderly population. *JAMA* 249, 2917–2921.
135. Obeid, R., Schorr, H., Eckert, R. and Herrmann, W. (2004) Vitamin B12 status in the elderly as judged by available biochemical markers. *Clin. Chem.* 50, 238–241.
136. Afman, L.A., Blom, H.J., Drittij, M.J., Brouns, M.R. and van Straaten, H.W. (2005) Inhibition of transmethylation disturbs neurulation in chick embryos. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 158, 59–65.
137. Mudd, S.H., Skovby, F., Levy, H.L., Pettigrew, K.D., Wilcken, B., Pyeritz, R.E., Andria, G., Boers, G.H., Bromberg, I.L. and Cerone, R. (1985) The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 37, 1–31.
138. Grieco, A.J. (1977) Homocystinuria: pathogenetic mechanisms. *Am. J. Med. Sci.* 273, 120–132.
139. Sachdev, P.S., Valenzuela, M., Wang, X.L., Looi, J.C. and Brodaty, H. (2002) Relationship between plasma homocysteine levels and brain atrophy in healthy elderly individuals. *Neurology* 58, 1539–1541.
140. Van den, B.M., van der Knaap, M.S., Boers, G.H., Stehouwer, C.D., Rauwerda, J.A. and Valk, J. (1995) Hyperhomocysteinaemia; with reference to its neuroradiological aspects. *Neuroradiology* 37, 403–411.
141. Scott, J.M., Molloy, A.M., Kennedy, D.G., Kennedy, S. And Weir, D.G. (1994) Effects of the disruption of transmethylation in the central nervous system: an animal model. *Acta Neurol. Scand.* 154 (Suppl.), 27–31.
142. Chadwick, L.H., McCandless, S.E., Silverman, G.L., Schwartz, S., Westaway, D. and Nadeau, J.H. (2000) Betaine-homocysteine methyltransferase-2: cDNA cloning, gene sequence, physical mapping, and expression of the human and mouse genes. *Genomics* 70, 66–73.

143. McKeever, M.P., Weir, D.G., Molloy, A. and Scott, J.M. (1991) Betaine-homocysteine methyltransferase: organ distribution in man, pig and rat and subcellular distribution in the rat. *Clin. Sci. (Lond)* 81, 551–556.
144. Ichinohe, A., Kanaumi, T., Takashima, S., Enokido, Y., Nagai, Y. and Kimura, H. (2005) Cystathionine beta-synthase is enriched in the brains of Down's patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 1547–1550.
145. Heinonen, K. (1973) Studies on cystathionase activity in rat liver and brain during development. Effects of hormones and amino acids in vivo. *Biochem. J.* 136, 1011–1015.
146. Griffiths, R. and Tudball, N. (1976) Observations on the fate of cystathionine in rat brain. *Life Sci.* 19, 1217–1224.
147. Awata, S., Nakayama, K., Suzuki, I., Sugahara, K. And Kodama, H. (1995) Changes in cystathionine gamma-lyase in various regions of rat brain during development. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 35, 1331–1338.
148. Kranich, O., Dringen, R., Sandberg, M. and Hamprecht, B. (1998) Utilization of cysteine and cysteine precursors for the synthesis of glutathione in astroglial cultures: preference for cystine. *Glia* 22, 11–18.
149. Shanker, G., Allen, J.W., Mutkus, L.A. and Aschner, M. (2001) The uptake of cysteine in cultured primary astrocytes and neurons. *Brain Res.* 902, 156–163.
150. Wu, G., Fang, Y.Z., Yang, S., Lupton, J.R. and Turner, N.D. (2004) Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr.* 134, 489–492.
151. Grieve, A., Butcher, S.P. and Griffiths, R. (1992) Synaptosomal plasma membrane transport of excitatory sulphur amino acid transmitter candidates: kinetic characterisation and analysis of carrier specificity. *J. Neurosci. Res.* 32, 60–68.
152. Griffiths, R., Grieve, A., Allen, S. and Olverman, H.J. (1992) Neuronal and glial plasma membrane carrier-mediated uptake of L-homocysteate is not selectively blocked by beta-p-chlorophenylglutamate. *Neurosci. Lett.* 147, 175–178.
153. Zeise, M.L., Knopfel, T. and Zieglgansberger, W. (1988) (+/-)- beta-Parachlorophenylglutamate selectively enhances the depolarizing response to L-homocysteic acid in neocortical neurons of the rat: evidence for a specific uptake system. *Brain Res.* 443, 373–376.
154. Ho, P.I., Ashline, D., Dhitavat, S., Ortiz, D., Collins, S.C., Shea, T.B. and Rogers, E. (2003) Folate deprivation induces neurodegeneration: roles of oxidative stress and increased homocysteine. *Neurobiol. Dis.* 14, 32–42.
155. Kamath, A.F., Chauhan, A.K., Kisucka, J., Dole, V.S., Loscalzo, J., Handy, D.E. and Wagner, D.D. (2006) Elevated levels of homocysteine compromise blood–brain barrier integrity in mice. *Blood* 107, 591–593.
156. Eto, K., Asada, T., Arima, K., Makifuchi, T. and Kimura, H. (2002) Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 1485–1488.

157. Regland, B., Andersson, M., Abrahamsson, L., Bagby, J., Dyrehag, L.E. and Gottfries, C.G. (1997) Increased concentrations of homocysteine in the cerebrospinal fluid in patients with fibromyalgia and chronic fatigue syndrome. *Scand. J. Rheumatol.* 26, 301–307.
158. Regland, B., Abrahamsson, L., Blennow, K., Grenfeldt, B. And Gottfries, C.G. (2004) CSF-methionine is elevated in psychotic patients. *J. Neural. Transm.* 111, 631–640.
159. Yanai, Y., Shibasaki, T., Kohno, N., Mitsui, T. and Nakajima, H. (1983) Concentrations of sulfur-containing free amino acids in lumbar cerebrospinal fluid from patients with consciousness disturbances. *Acta Neurol. Scand.* 68, 386–393.
160. [Isobe, C., Murata, T., Sato, C. and Terayama, Y. (2005) Increase of total homocysteine concentration in cerebrospinal fluid in patients with Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Life Sci.* 77, 1836–1843.
161. Quinn, C.T., Griener, J.C., Bottiglieri, T., Arning, E. And Winick, N.J. (2004) Effects of intraventricular methotrexate on folate, adenosine, and homocysteine metabolism in cerebrospinal fluid. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 26, 386–388.
162. Surtees, R., Bowron, A. and Leonard, J. (1997) Cerebrospinal fluid and plasma total homocysteine and related metabolites in children with cystathionine beta-synthase deficiency: the effect of treatment. *Pediatr. Res.* 42, 577–582.
163. Wimo, A., Winblad, B., guero-Torres, H. and von, S.E. (2003) The magnitude of dementia occurrence in the world. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 17, 63–67.
164. Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, F., Lee, M., Dovey, H., Davis, D., Sinha, S., Schlossmacher, M., Whaley, J. And Swindlehurst, C. (1992) Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature* 359, 325–327.
165. Hardy, J. and Selkoe, D.J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353–356.
166. Tanemura, K., Akagi, T., Murayama, M., Kikuchi, N., Murayama, O., Hashikawa, T., Yoshiike, Y., Park, J.M., Matsuda, K., Nakao, S., Sun, X., Sato, S., Yamaguchi, H. and Takashima, A. (2001) Formation of filamentous tau aggregations in transgenic mice expressing V337M human tau. *Neurobiol. Dis.* 8, 1036–1045.
167. [Mattson, M.P. and Duan, W. (1999) “Apoptotic” biochemical cascades in synaptic compartments: roles in adaptive plasticity and neurodegenerative disorders. *J. Neurosci. Res.* 58, 152–166.
168. Mattson, M.P., Pedersen, W.A., Duan, W., Culmsee, C. And Camandola, S. (1999) Cellular and molecular mechanisms underlying perturbed energy metabolism and neuronal degeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Ann. N.Y. Acad. Sci* 893, 154–175.

169. Su, J.H., Anderson, A.J., Cummings, B.J. and Cotman, C.W. (1994) Immunohistochemical evidence for apoptosis in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 5, 2529–2533.
170. Pappolla, M.A., Omar, R.A., Kim, K.S. and Robakis, N.K. (1992) Immunohistochemical evidence of oxidative [corrected] stress in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 140, 621–628.
171. Lyras, L., Cairns, N.J., Jenner, A., Jenner, P. and Halliwell, B. (1997) An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 68, 2061–2069.
172. Herrmann, W., Quast, S., Ullrich, M., Schultze, H., Bodis, M. and Geisel, J. (1999) Hyperhomocysteinemia in high-aged subjects: relation of B-vitamins, folic acid, renal function and the methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *Atherosclerosis* 144, 91–101.
173. Den Heijer, T., Vermeer, S.E., Clarke, R., Oudkerk, M., Koudstaal, P.J., Hofman, A. and Breteler, M.M. (2003) Homocysteine and brain atrophy on MRI of non-demented elderly. *Brain* 126, 170–175.
174. Wright, C.B., Paik, M.C., Brown, T.R., Stabler, S.P., Allen, R.H., Sacco, R.L. and DeCarli, C. (2005) Total homocysteine is associated with white matter hyperintensity volume: the Northern Manhattan Study. *Stroke* 36, 1207–1211.
175. Nurk, E., Refsum, H., Tell, G.S., Engedal, K., Vollset, S.E., Ueland, P.M., Nygaard, H.A. and Smith, A.D. (2005) Plasma total homocysteine and memory in the elderly: The Hordaland homocysteine study. *Ann. Neurol.* 58, 847–857.
176. Sachdev, P.S. (2005) Homocysteine and brain atrophy. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 29, 1152–1161.
177. Ravaglia, G., Forti, P., Maioli, F., Martelli, M., Servadei, L., Brunetti, N., Porcellini, E. and Licastro, F. (2005) Homocysteine and folate as risk factors for dementia and Alzheimer disease. *Am. J. Clin Nutr.* 82, 636–643.
178. Seshadri, S., Beiser, A., Selhub, J., Jacques, P.F., Rosenberg, I.H., D'Agostino, R.B., Wilson, P.W. and Wolf, P.A. (2002) Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 346, 476–483.
179. McCaddon, A., Hudson, P., Davies, G., Hughes, A., Williams, J.H. and Wilkinson, C. (2001) Homocysteine and cognitive decline in healthy elderly. *Dement. Geriatr. Cogn Disord.* 12, 309–313.
180. Lindenbaum, J., Healton, E.B., Savage, D.G., Brust, J.C., Garrett, T.J., Podell, E.R., Marcell, P.D., Stabler, S.P. and Allen, R.H. (1988) Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anemia or macrocytosis. *N. Engl. J. Med.* 318, 1720–1728.
181. Riggs, K.M., Spiro III, A., Tucker, K. and Rush, D. (1996) Relations of vitamin B-12, vitamin B-6, folate, and homocysteine to cognitive performance in the Normative Aging Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 63, 306–314.

182. Stott, D.J., MacIntosh, G., Lowe, G.D., Rumley, A., McMahon, A.D., Langhorne, P., Tait, R.C., O'Reilly, D.S., Spilg, E.G., MacDonald, J.B., MacFarlane, P.W. and Westendorp, R.G. (2005) Randomized controlled trial of homocysteine-lowering vitamin treatment in elderly patients with vascular disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 82, 1320–1326.
183. Yang, Q., Botto, L.D., Erickson, J.D., Berry, R.J., Sambell, C., Johansen, H. and Friedman, J.M. (2006) Improvement in stroke mortality in Canada and the United States, 1990 to 2002. *Circulation* 113, 1335–1343.
184. Lipton, S.A., Kim, W.K., Choi, Y.B., Kumar, S., D'Emilia, D.M., Rayudu, P.V., Arnelle, D.R. and Stamler, J.S. (1997) Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 94, 5923–5928.
185. Parsons, R.B., Waring, R.H., Ramsden, D.B. and Williams, A.C. (1998) In vitro effect of the cysteine metabolites homocysteic acid, homocysteine and cysteic acid upon human neuronal cell lines. *Neurotoxicology* 19, 599–603.
186. Kruman, I.I., Culmsee, C., Chan, S.L., Kruman, Y., Guo, Z., Penix, L. and Mattson, M.P. (2000) Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *J. Neurosci.* 20, 6920–6926.
187. Vitvitsky, V., Dayal, S., Stabler, S., Zhou, Y., Wang, H., Lentz, S.R. and Banerjee, R. (2004) Perturbations in homocysteine-linked redox homeostasis in a murine model for hyperhomocysteinemia. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287, R39–R46.
188. Troen, A.M. (2005) The central nervous system in animal models of hyperhomocysteinemia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psych.* 29, 1140–1151.
189. Watanabe, M., Osada, J., Aratani, Y., Kluckman, K., Reddick, R., Malinow, M.R. and Maeda, N. (1995) Mice deficient in cystathionine beta-synthase: animal models for mild and severe homocyst(e)inemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 1585–1589.
190. Algaidi, S.A., Christie, L.A., Jenkinson, A.M., Whalley, L., Riedel, G. and Platt, B. (2005) Long-term homocysteine exposure induces alterations in spatial learning, hippocampal signalling and synaptic plasticity. *Exp. Neurol.* 197, 8–12.
191. Streck, E.L., Bavaresco, C.S., Netto, C.A. and Wyse, A.T. (2004) Chronic hyperhomocysteinemia provokes a memory deficit in rats in the Morris water maze task. *Behav. Brain Res.* 153, 377–381.
192. Streck, E.L., Delwing, D., Tagliari, B., Matte, C., Wannmacher, C.M., Wajner, M. and Wyse, A.T. (2003) Brain energy metabolism is compromised by the metabolites accumulating in homocystinuria. *Neurochem. Int.* 43, 597–602.
193. Mattson, M.P. and Shea, T.B. (2003) Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* 26, 137–146.

194. Do, K.Q., Herrling, P.L., Streit, P., Turski, W.A. and Cuenod, M. (1986) In vitro release and electrophysiological effects in situ of homocysteic acid, an endogenous N-methyl- (D)-aspartic acid agonist, in the mammalian striatum. *J. Neurosci.* 6, 2226–2234.
195. Ito, S., Provini, L. and Cherubini, E. (1991) L-homocysteic acid mediates synaptic excitation at NMDA receptors in the hippocampus. *Neurosci. Lett.* 124, 157–161.
196. Olney, J.W., Price, M.T., Salles, K.S., Labruyere, J., Ryerson, R., Mahan, K., Frierdich, G. and Samson, L. (1987) L-homocysteic acid: an endogenous excitotoxic ligand of the NMDA receptor. *Brain Res. Bull.* 19, 597–602.
197. Zhang, D. and Lipton, S.A. (1992) L-homocysteic acid selectively activates N-methyl-D-aspartate receptors of rat retinal ganglion cells. *Neurosci. Lett.* 139, 173–177.
198. Klancnik, J.M., Cuenod, M., Gahwiler, B.H., Jiang, Z.P. and Do, K.Q. (1992) Release of endogenous amino acids, including homocysteic acid and cysteine sulphinic acid, from rat hippocampal slices evoked by electrical stimulation of Schaffer collateral-commissural fibres. *Neuroscience* 49, 557–570.
199. Cuenod, M., Do, K.Q. and Streit, P. (1990) Homocysteic acid as an endogenous excitatory amino acid. *Trends Pharmacol. Sci* 11, 477–478.
200. Kim, J.P., Koh, J.Y. and Choi, D.W. (1987) L-homocysteate is a potent neurotoxin on cultured cortical neurons. *Brain Res.* 437, 103–110.
201. Robert, K., Pages, C., Ledru, A., Delabar, J., Caboche, J. And Janel, N. (2005) Regulation of extracellular signal-regulated kinase by homocysteine in hippocampus. *Neuroscience* 133, 925–935.
202. Alam, Z., Coombes, N., Waring, R.H., Williams, A.C. and Steventon, G.B. (1998) Plasma levels of neuroexcitatory amino acids in patients with migraine or tension headache. *J. Neurol. Sci* 156, 102–106.
203. Zieminska, E., Stafiej, A. and Lazarewicz, J.W. (2003) Role of group I metabotropic glutamate receptors and NMDA receptors in homocysteine-evoked acute neurodegeneration of cultured cerebellar granule neurones. *Neurochem. Int.* 43, 481–492.
204. Shi, Q., Savage, J.E., Hufeisen, S.J., Rauser, L., Grajkowska, E., Ernsberger, P., Wroblewski, J.T., Nadeau, J.H. and Roth, B.L. (2003) L-homocysteine sulfinic acid and other acidic homocysteine derivatives are potent and selective metabotropic glutamate receptor agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305, 131–142.
205. Zou, C.G. and Banerjee, R. (2005) Homocysteine and redox signaling. *Antioxid. Redox. Signal.* 7, 547–559.
206. Banerjee, R. and Zou, C.G. (2005) Redox regulation and reaction mechanism of human cystathionine-beta-synthase: a PLP-dependent hemesensor protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 433, 144–156.

207. Maclean, K.N., Janosik, M., Kraus, E., Kozich, V., Allen, R.H., Raab, B.K. and Kraus, J.P. (2002) Cystathionine beta-synthase is coordinately regulated with proliferation through a redox-sensitive mechanism in cultured human cells and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Physiol.* 192, 81–92.
208. Mosharov, E., Cranford, M.R. and Banerjee, R. (2000) The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transsulfuration pathway and its regulation by redox changes. *Biochemistry* 39, 13005–13011.
209. Baydas, G., Ozer, M., Yasar, A., Tuzcu, M. and Koz, S.T. (2005) Melatonin improves learning and memory performances impaired by hyperhomocysteinemia in rats. *Brain Res.* 1046, 187–194.
210. Perna, A.F., Ingrosso, D. and De Santo, N.G. (2003) Homocysteine and oxidative stress. *Amino Acids* 25, 409–417.
211. Weiss, N., Heydrick, S.J., Postea, O., Keller, C., Keaney Jr., J.F. and Loscalzo, J. (2003) Influence of hyperhomocysteinemia on the cellular redox state—impact on homocysteine-induced endothelial dysfunction. *Clin. Chem. Lab. Med.* 41, 1455–1461.
212. James, S.J., Cutler, P., Melnyk, S., Jernigan, S., Janak, L., Gaylor, D.W. and Neubrandner, J.A. (2004) Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children with autism. *Am. J. Clin. Nutr.* 80, 1611–1617.
213. Ho, P.I., Collins, S.C., Dhitavat, S., Ortiz, D., Ashline, D., Rogers, E. and Shea, T.B. (2001) Homocysteine potentiates betaamyloid neurotoxicity: role of oxidative stress. *J. Neurochem.* 78, 249–253.
214. Jara-Prado, A., Ortega-Vazquez, A., Martinez-Ruano, L., Rios, C. and Santamaria, A. (2003) Homocysteine-induced brain lipid peroxidation: effects of NMDA receptor blockade, antioxidant treatment, and nitric oxide synthase inhibition. *Neurotox. Res.* 5, 237–243.
215. Ho, P.I., Ashline, D., Dhitavat, S., Ortiz, D., Collins, S.C., Shea, T.B. and Rogers, E. (2003) Folate deprivation induces neurodegeneration: roles of oxidative stress and increased homocysteine. *Neurobiol Dis.* 14, 32–42.
216. Reis, E.A., Zugno, A.I., Franzon, R., Tagliari, B., Matte, C., Lammers, M.L., Netto, C.A. and Wyse, A.T. (2002) Pretreatment with vitamins E and C prevent the impairment of memory caused by homocysteine administration in rats. *Metab. Brain Dis.* 17, 211–217.
217. Wyse, A.T., Zugno, A.I., Streck, E.L., Matte, C., Calcagnotto, T., Wannmacher, C.M. and Wajner, M. (2002) Inhibition of Na(+), K(+)-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to acute administration of homocysteine is prevented by vitamins E and C treatment. *Neurochem. Res.* 27, 1685–1689.
218. Kruman, I.I., Mouton, P.R., Emokpae Jr., R., Cutler, R.G. and Mattson, M.P. (2005) Folate deficiency inhibits proliferation of adult hippocampal progenitors. *Neuroreport* 16, 1055–1059.

219. Tchanchou, F., Graves, M., Ortiz, D., Rogers, E. and Shea, T.B. (2004) Dietary supplementation with 3-deaza adenosine, N-acetyl cysteine, and S-adenosyl methionine provide neuroprotection against multiple consequences of vitamin deficiency and oxidative challenge: relevance to age-related neurodegeneration. *Neuromolecular. Med.* 6, 93–103.
220. Prudova, A., Bauman, Z., Braun, A., Vitvitsky, V., Lu, S.C. and Banerjee, R. (2006) S-adenosylmethionine stabilizes cystathionine β -synthase and modulates redox capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 6489–6494.
221. Villalobos, M.A., De La Cruz, J.P., Cuerda, M.A., Ortiz, P., Smith-Agreda, J.M. and Sanchez, D.L.C. (2000) Effect of Sadenosyl-L-methionine on rat brain oxidative stress damage in a combined model of permanent focal ischemia and global ischemia–reperfusion. *Brain Res.* 883, 31–40.
222. Matsui, Y., Kubo, Y. and Iwata, N. (1987) S-adenosyl-L-methionine prevents ischemic neuronal death. *Eur. J. Pharmacol.* 144, 211–216.
223. Rao, A.M., Baskaya, M.K., Maley, M.E., Kindy, M.S. and Dempsey, R.J. (1997) Beneficial effects of S-adenosyl-L-methionine on blood–brain barrier breakdown and neuronal survival after transient cerebral ischemia in gerbils. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 44, 134–138.
224. De La Cruz, J.P., Pavia, J., Gonzalez-Correa, J.A., Ortiz, P. And Sanchez De La, C.F. (2000) Effects of chronic administration of S-adenosyl-L-methionine on brain oxidative stress in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 361, 47–52.
225. Ullegaddi, R., Powers, H.J. and Gariballa, S.E. (2004) B-group vitamin supplementation mitigates oxidative damage after acute ischaemic stroke. *Clin. Sci. (Lond)* 107, 477–484.
226. Shea, T.B. and Rogers, E. (2002) Folate quenches oxidative damage in brains of apolipoprotein E-deficient mice: augmentation by vitamin E. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 108, 1–6.
227. Tchanchou, F., Graves, M., Rogers, E., Ortiz, D. and Shea, T.B. (2005) N-acetyl cysteine alleviates oxidative damage to central nervous system of ApoE-deficient mice following folate and vitamin E-deficiency. *J. Alzheimers. Dis.* 7, 135–138.
228. Gharib, A., Chabannes, B., Sarda, N. and Pacheco, H. (1983) In vivo elevation of mouse brain S-adenosyl-L-homocysteine after treatment with L-homocysteine. *J. Neurochem.* 40, 1110–1112.
229. Ho, P.I., Ortiz, D., Rogers, E. and Shea, T.B. (2002) Multiple aspects of homocysteine neurotoxicity: glutamate excitotoxicity, kinase hyperactivation and DNA damage. *J. Neurosci. Res.* 70, 694–702.
230. Trovarelli, G., De Medio, G.E., Porcellati, S., Stramentinoli, G. and Porcellati, G. (1983) The effect of S-adenosyl-L-methionine on ischemia-induced disturbances of brain phospholipid in the gerbil. *Neurochem. Res.* 8, 1597–1609.

231. Fuso, A., Seminara, L., Cavallaro, R.A., D'Anselmi, F. And Scarpa, S. (2005) S-adenosylmethionine/homocysteine cycle alterations modify DNA methylation status with consequent deregulation of PS1 and BACE and beta-amyloid production. *Mol. Cell Neurosci.* 28, 195–204.
232. Selkoe, D.J. (2001) Presenilin, Notch, and the genesis and treatment of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 11039–11041.
233. Scarpa, S., Fuso, A., D'Anselmi, F. and Cavallaro, R.A. (2003) Presenilin 1 gene silencing by S-adenosylmethionine: a treatment for Alzheimer disease? *FEBS Lett.* 541, 145–148.
234. Leulliot, N., Quevillon-Cheruel, S., Sorel, I., de La Sierra-Gallay, I.L., Collinet, B., Graille, M., Blondeau, K., Bettache, N., Poupon, A., Janin, J. and Van, T.H. (2004) Structure of protein phosphatase methyltransferase 1 (PPM1), a leucine carboxyl methyltransferase involved in the regulation of protein phosphatase 2A activity. *J. Biol. Chem.* 279, 8351–8358.
235. Masters, C.L., Multhaup, G., Simms, G., Pottgiesser, J., Martins, R.N. and Beyreuther, K. (1985) Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *EMBO J.* 4, 2757–2763.
236. Glenner, G.G., Wong, C.W., Quaranta, V. and Eanes, E.D. (1984) The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Appl. Pathol.* 2, 357–369.
237. Irizarry, M.C., Gurol, M.E., Raju, S., az-Arrastia, R., Locascio, J.J., Tennis, M., Hyman, B.T., Growdon, J.H., Greenberg, S.M. and Bottiglieri, T. (2005) Association of homocysteine with plasma amyloid beta protein in aging and neurodegenerative disease. *Neurology* 65, 1402–1408.
238. Sai, X., Kawamura, Y., Kokame, K., Yamaguchi, H., Shiraishi, H., Suzuki, R., Suzuki, T., Kawaichi, M., Miyata, T., Kitamura, T., De, S.B., Yanagisawa, K. and Komano, H. (2002) Endoplasmic reticulum stress-inducible protein, Herp, enhances presenilin-mediated generation of amyloid beta-protein. *J. Biol. Chem.* 277, 12915–12920.
239. Kruman, I.I., Kumaravel, T.S., Lohani, A., Pedersen, W.A., Cutler, R.G., Kruman, Y., Haughey, N., Lee, J., Evans, M. And Mattson, M.P. (2002) Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 22, 1752–1762.
240. Hasegawa, T., Ukai, W., Jo, D.G., Xu, X., Mattson, M.P., Nakagawa, M., Araki, W., Saito, T. and Yamada, T. (2005) Homocysteic acid induces intraneuronal accumulation of neurotoxic A β 42: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* 80, 869–876.
241. Mok, S.S., Turner, B.J., Beyreuther, K., Masters, C.L., Barrow, C.J. and Small, D.H. (2002) Toxicity of substrate-bound amyloid peptides on vascular smooth muscle cells is enhanced by homocysteine. *Eur. J. Biochem.* 269, 3014–3022.

242. Ferreira, A., Lu, Q., Orecchio, L. and Kosik, K.S. (1997) Selective phosphorylation of adult tau isoforms in mature hippocampal neurons exposed to fibrillar A beta. *Mol. Cell Neurosci.* 9, 220–234.
243. Wang, J.Z., Gong, C.X., Zaidi, T., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K. (1995) Dephosphorylation of Alzheimer paired helical filaments by protein phosphatase-2A and -2B. *J. Biol. Chem.* 270, 4854–4860.
244. Vogelsberg-Ragaglia, V., Schuck, T., Trojanowski, J.Q. and Lee, V.M. (2001) PP2A mRNA expression is quantitatively decreased in Alzheimer's disease hippocampus. *Exp. Neurol.* 168, 402–412.
245. Sontag, E., Hladik, C., Montgomery, L., Luangpirom, A., Mudrak, I., Ogris, E. and White III, C.L. (2004) Downregulation of protein phosphatase 2A carboxyl methylation and methyltransferase may contribute to Alzheimer disease pathogenesis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63, 1080–1091.
246. Zhao, W.Q., Feng, C. and Alkon, D.L. (2003) Impairment of phosphatase 2A contributes to the prolonged MAP kinase phosphorylation in Alzheimer's disease fibroblasts. *Neurobiol. Dis.* 14, 458–469.
247. Vafai, S.B. and Stock, J.B. (2002) Protein phosphatase 2A methylation: a link between elevated plasma homocysteine and Alzheimer's Disease. *FEBS Lett.* 518, 1–4.
248. Tolstykh, T., Lee, J., Vafai, S. and Stock, J.B. (2000) Carboxyl methylation regulates phosphoprotein phosphatase 2A by controlling the association of regulatory B subunits. *EMBO J.* 19, 5682–5691.
249. Lee, J. and Stock, J. (1993) Protein phosphatase 2A catalytic subunit is methyl-esterified at its carboxyl terminus by a novel methyltransferase. *J. Biol. Chem.* 268, 19192–19195.
250. Santacruz, K., Lewis, J., Spires, T., Paulson, J., Kotilinek, L., Ingelsson, M., Guimaraes, A., DeTure, M., Ramsden, M., McGowan, E., Forster, C., Yue, M., Orne, J., Janus, C., Mariash, A., Kuskowski, M., Hyman, B., Hutton, M. and Ashe, K.H. (2005) Tau suppression in a neurodegenerative Mouse model improves memory function. *Science* 309, 476–481.
251. Deardorff WJ, Grossberg GT. A fixed-dose combination of memantine extended-release and donepezil in the treatment of moderate-to-severe Alzheimer's disease. *Drug Des Devel Ther.* 2016 Oct 3;10:3267-3279. Review. PubMed PMID: 27757016; PubMed Central PMCID: PMC5055113.
252. Birnbaum JH, Bali J, Rajendran L, Nitsch RM, Tackenberg C. Calcium flux-independent NMDA receptor activity is required for Aβ oligomer-induced synaptic loss. *Cell Death Dis.* 2015 Jun 18;6:e1791. doi: 10.1038/cddis.2015.160. PubMed PMID: 26086964; PubMed Central PMCID: PMC4669839.
253. Demirdaş A, Nazıroğlu M, Övey İS. Duloxetine Reduces Oxidative Stress, Apoptosis, and Ca(2+) Entry Through Modulation of TRPM2 and TRPV1 Channels in the Hippocampus and Dorsal Root Ganglion of Rats. *Mol Neurobiol.* 2016 Jul 21. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27443158.

254. Charkhkar H, Meyyappan S, Matveeva E, Moll JR, McHail DG, Peixoto N, Cliff RO, Pancrazio JJ. Amyloid beta modulation of neuronal network activity in vitro. *Brain Res.* 2015 Dec 10;1629:1-9. doi: 10.1016/j.brainres.2015.09.036. PubMed PMID: 26453830.
255. Prentice H, Modi JP, Wu JY. Mechanisms of Neuronal Protection against Excitotoxicity, Endoplasmic Reticulum Stress, and Mitochondrial Dysfunction in Stroke and Neurodegenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:964518. doi: 10.1155/2015/964518. Review. PubMed PMID: 26576229; PubMed Central PMCID:PMC4630664.
256. Tremblay R, Chakravarthy B, Hewitt K, Tauskela J, Morley P, Atkinson T, Durkin JP. Transient NMDA receptor inactivation provides long-term protection to cultured cortical neurons from a variety of death signals. *J Neurosci.* 2000 Oct 1;20(19):7183-92. PubMed PMID: 11007874.
257. Kocahan S, Doğan Z. Mechanisms of Alzheimer's Disease Pathogenesis and Prevention: The Brain, Neural Pathology, N-methyl-D-aspartate Receptors, Tau Protein and Other Risk Factors. *Clin Psychopharmacol Neurosci.* 2017 Feb 28;15(1):1-8. doi: 10.9758/cpn.2017.15.1.1. Review. PubMed PMID: 28138104; PubMed Central PMCID: PMC5290713.
258. Guo L, Tian J, Du H. Mitochondrial Dysfunction and Synaptic Transmission Failure in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2016 Sep 20. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27662318.
259. Gold M, Koczulla AR, Mengel D, Koepke J, Dodel R, Dontcheva G, Habib P, Bach JP. Reduction of glutamate-induced excitotoxicity in murine primary neurons involving calpain inhibition. *J Neurol Sci.* 2015 Dec 15;359(1-2):356-62. doi: 10.1016/j.jns.2015.11.016. PubMed PMID: 26671142.
260. Mehta A, Prabhakar M, Kumar P, Deshmukh R, Sharma PL. Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *Eur J Pharmacol.* 2013 Jan 5;698(1-3):6-18. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.10.032. Review. PubMed PMID: 23123057.
261. Reisberg B, Doody R, Stoffler A, et al. Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2003;348:1333-41.
262. Winblad B, Jones RW, Wirth Y, et al. Memantine in moderate to severe Alzheimer's disease: a meta-analysis of randomised clinical trials. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2007;24:20-7.
263. Floden AMS, Li S, Combs CK. β -amyloid-stimulated microglia induce neuron death via synergistic stimulation of tumor necrosis factor α and NMDA receptors. *J Neurosci.* 2005;25:2566-75.
264. Tremblay R, Chakravarthy B, Hewitt K, et al. Transient NMDA receptor inactivation provides long-term protection to cultured cortical neurons from a variety of death signals. *J Neurosci.* 2000;20:7183-92.
265. Miguel-Hidalgo JJ, Alvarez XA, Cacabelos R, et al. Neuroprotection by memantine against neurodegeneration induced by β -amyloid (1-40) *Brain Res.* 2002;958:210-21.

266. Rao VL, Dogan A, Todd KG, et al. Neuroprotection by memantine, a non-competitive NMDA receptor antagonist after traumatic brain injury in rats. *Brain Res.* 2001;911:96–100. [PubMed]
267. Song MS, Rauw G, Baker GB, et al. Memantine protects rat cortical cultured neurons against β -amyloid-induced toxicity by attenuating tau phosphorylation. *Eur J Neurosci.* 2008;28:1989–2002.
268. Klyubin I, Wang Q, Reed MN, et al. Protection against A β -mediated rapid disruption of synaptic plasticity and memory by memantine. *Neurobiol Aging.* 2011;32:614–23.
269. Rammes G, Hasenjager A, Sroka-Saidi K, et al. Therapeutic significance of NR2B-containing NMDA receptors and mGluR5 meta-botropic glutamate receptors in mediating the synaptotoxic effects of β -amyloid oligomers on long-term potentiation (LTP) in murine hippocampal slices. *Neuropharmacology.* 2011;60:982–90.
270. Dong H, Yuede CM, Coughlan C, Lewis B, Csernansky JG. Effects of memantine on neuronal structure and conditioned fear in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology.* 2008 Dec;33(13):3226-36. doi: 10.1038/npp.2008.53. PubMed PMID: 18418360; PubMed Central PMCID: PMC2664647.
271. Ito K, Tatebe T, Suzuki K, Hirayama T, Hayakawa M, Kubo H, Tomita T, Makino M. Memantine reduces the production of amyloid- β peptides through modulation of amyloid precursor protein trafficking. *Eur J Pharmacol.* 2017 Mar 5;798:16-25. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.02.001. PubMed PMID: 28167259.
272. Fitzjohn SM, Doherty AJ, Collingridge GL. The use of the hippocampal slice preparation in the study of Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol.* 2008 May 6;585(1):50-9. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.02.077. Review. PubMed PMID: 18423442.
273. Spilman P, Descamps O, Gorostiza O, Peters-Libeu C, Poksay KS, Matalis A, Campagna J, Patent A, Rao R, John V, Bredesen DE. The multi-functional drug tropisetron binds APP and normalizes cognition in a murine Alzheimer's model. *Brain Res.* 2014 Mar 10;1551:25-44. doi: 10.1016/j.brainres.2013.12.029. PubMed PMID: 24389031; PubMed Central PMCID: PMC4001856.
274. Abe K, Misawa M. Amyloid beta protein enhances the clearance of extracellular L-glutamate by cultured rat cortical astrocytes. *Neurosci Res.* 2003 Jan;45(1):25-31. PubMed PMID: 12507721.
275. Tjiattas L, Ortiz DO, Dhivant S, Mitton K, Rogers E, Shea TB. Folate deficiency and homocysteine induce toxicity in cultured dorsal root ganglion neurons via cytosolic calcium accumulation. *Aging Cell.* 2004 Apr;3(2):71-6. PubMed PMID: 15038821.
276. Kimura M, Komatsu H, Ogura H, Sawada K. Comparison of donepezil and memantine for protective effect against amyloid-beta(1-42) toxicity in rat septal neurons. *Neurosci Lett.* 2005 Dec 31;391(1-2):17-21. PubMed PMID: 16154269.

277. Balaban H, Nazıroğlu M, Demirci K, Övey İS. The Protective Role of Selenium on Scopolamine-Induced Memory Impairment, Oxidative Stress, and Apoptosis in Aged Rats: The Involvement of TRPM2 and TRPV1 Channels. *Mol Neurobiol.* 2016 Mar 28. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27021021.
278. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 1985;260(6):3440-50.
279. Uğuz AC, Nazıroğlu M, Espino J, Bejarano I, González D, Rodríguez AB, et al. Selenium modulates oxidative stress-induced cell apoptosis in human myeloid HL-60 cells through regulation of calcium release and caspase-3 and-9 activities. *J Memb Biol.* 2009;232(1-3):15-23.
280. Uğuz AC, Nazıroğlu M. Effects of selenium on calcium signaling and apoptosis in rat dorsal root ganglion neurons induced by oxidative stress. *Neurochem Res.* 2012;37(8):1631-8.
281. Yazgan B, Yazgan Y, Ovey IS, Naziroglu M. Raloxifene and Tamoxifen Reduce PARP Activity, Cytokine and Oxidative Stress Levels in the Brain and Blood of Ovariectomized Rats. *J Mol Neurosci.* 2016.
282. Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med.* 1999;27(5):612-6.
283. Rodrigues FP, Pestana CR, Dos Santos GA, Pardo-Andreu GL, Santos AC, Uyemura SA, Alberici LC, Curti C. Characterization of the stimulus for reactive oxygen species generation in calcium-overloaded mitochondria. *Redox Rep.* 2011;16(3):108-13. doi: 10.1179/1351000211Y.0000000001. PubMed PMID: 21801492.
284. Rodrigues FP, Pestana CR, Dos Santos GA, Pardo-Andreu GL, Santos AC, Uyemura SA, Alberici LC, Curti C. Characterization of the stimulus for reactive oxygen species generation in calcium-overloaded mitochondria. *Redox Rep.* 2011;16(3):108-13. doi: 10.1179/1351000211Y.0000000001. PubMed PMID: 21801492.
285. Lin HC, Yang CM, Liu CL, Hu ML. Synergistic effects of homocysteine, S-adenosylhomocysteine and adenosine on apoptosis in BV-2 murine microglial cells. *Biofactors.* 2008;34(2):81-95. PubMed PMID: 19706975.
286. Kwan KY, Glazer JM, Corey DP, Rice FL, Stucky CL. TRPA1 modulates mechanotransduction in cutaneous sensory neurons. *J Neurosci.* 2009 Apr 15;29(15):4808-19. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5380-08.2009. PubMed PMID: 19369549; PubMed Central PMCID: PMC2744291.
287. Ostapchenko VG, Chen M, Guzman MS, Xie YF, Lavine N, Fan J, Beraldo FH, Martyn AC, Belrose JC, Mori Y, MacDonald JF, Prado VF, Prado MA, Jackson MF. The Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) Channel Contributes to β -Amyloid Oligomer-Related Neurotoxicity and Memory Impairment. *J Neurosci.* 2015 Nov 11;35(45):15157-69. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4081-14.2015. PubMed PMID: 26558786.

288. Benito C, Tolón RM, Castillo AI, Ruiz-Valdepeñas L, Martínez-Orgado JA, Fernández-Sánchez FJ, Vázquez C, Cravatt BF, Romero J. β -Amyloid exacerbates inflammation in astrocytes lacking fatty acid amide hydrolase through a mechanism involving PPAR- α , PPAR- γ and TRPV1, but not CB₁ or CB₂ receptors. *Br J Pharmacol*. 2012 Jun;166(4):1474-89. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01889.x. PubMed PMID: 22321194; PubMed Central PMCID: PMC3417461.
289. Sendrowski K, Sobaniec P, Poskrobko E, Rusak M, Sobaniec W. Unfavorable effect of levetiracetam on cultured hippocampal neurons after hyperthermic injury. *Pharmacol Rep*. 2017 Jan 24;69(3):462-468. doi: 10.1016/j.pharep.2017.01.020. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 28319750.
290. Khodorov BI, Storozhevykh TP, Surin AM, Yuryavichyus AI, Sorokina EG, Borodin AV, Vinskaya NP, Khaspekov LG, Pinelis VG. The leading role of mitochondrial depolarization in the mechanism of glutamate-induced disruptions in Ca²⁺ homeostasis. *Neurosci Behav Physiol*. 2002 Sep-Oct;32(5):541-7. PubMed PMID: 12403008.
291. Nakamura T, Lipton SA. Preventing Ca²⁺ mediated nitrosative stress in neurodegenerative diseases: possible pharmacological strategies. *Cell Calcium*. 2010 Feb;47(2):190-7. doi: 10.1016/j.ceca.2009.12.009. Epub 2010 Jan 8. Review. PubMed PMID: 20060165; PubMed Central PMCID: PMC2875138.
292. Yu X, Yu M, Liu Y, Yu S. TRP channel functions in the gastrointestinal tract. *Semin Immunopathol*. 2016 May;38(3):385-96. doi: 10.1007/s00281-015-0528-y. Epub 2015 Oct 12. Review. PubMed PMID: 26459157.
293. Alptekin M, Eroglu S, Tutar E, Sencan S, Geyik MA, Ulasli M, Demiryurek AT, Camci C. Gene expressions of TRP channels in glioblastoma multiforme and relation with survival. *Tumour Biol*. 2015 Dec;36(12):9209-13. doi: 10.1007/s13277-015-3577-x. Epub 2015 Jun 19. PubMed PMID: 26088448.

EKLER

Ek-1. Etik Kurul Kararı



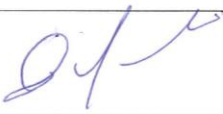
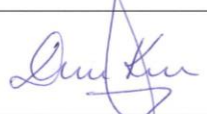




T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı

TOPLANTI TARİHİ	TOPLANTI SAYISI	KARAR SAYISI
18.02.2016	03	02

İlgi: 09.02.2016 tarih ve 34 sayılı dilekçeye istinaden, 09.07.2015 tarih ve 03 sayılı karara ek olarak;
Süleyman Demirel Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 18 ŞUBAT 2016 tarihinde Saat 09:30'da toplanarak aşağıdaki kararları almıştır,

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik A.D. Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU'nun yürütücüsü olduğu Doktora Öğrencisi İshak Suat ÖVEY'in yardımcı araştırmacı olarak yer aldığı, "İn Vitro Alzheimer Modelinde Hipokampus TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 Katyon Kanalları Üzerinde Homosistein ile Memantin'in Etkilerinin Araştırılması" başlıklı çalışma için vermiş olduğunuz dilekçede belirtilen;

- 1- Projede kullanılacak olan (C57BL/6J) cinsi fare yerine (Swiss mouse) cinsi farenin kullanılması,
- 2- Swiss Mouse farelerin yaşının (40-50 haftalık veya 10-12 aylık) olarak değiştirilmesi; Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından oy birliği ile UYGUN görülmüştür.

Prof. Dr. İbrahim BARUT BAŞKAN	Prof. Dr. Mustafa Çağrı SAVAŞ BAŞKAN YARDIMCISI	Prof. Dr. Ersin USKUN ÜYE
	KATILMADI	
Prof. Dr. Emel SESLİ ÇETİN ÜYE	Doç. Dr. Duygu KUMBUL DOĞUÇ ÜYE	Yrd. Doç. Dr. Müge ÇINA AKSOY ÜYE
		
Arş. Gör. Sümeyra KAYAN ÜYE	Vet. Hekim Yaşar GÜNAYDIN ÜYE	Öğretmen Hasan Ali ÇETİN ÜYE
		

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tezi Hazırlayan

İshak Suat ÖVEY

İmza

Danışman

Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU

İmza

ÖZGEÇMİŞ ve ESERLER LİSTESİ

1. Genel

Düzenleme Tarihi:	15.05.2017		
Adı Soyadı:	İshak Suat ÖVEY		
Yazışma Adresi:	Süleyman Demirel Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sinir Bilimleri A.D. 32260, Doğu Kampüsü, Çünür/Isparta		
Tel:	(0246) 211 37 22	GSM:	(0543) 688 33 33
E-Posta:	ishaksuatovey@gmail.com	Faks:	0246 211 11 65

2. Eğitim: (Son aldığınız dereceden / diplomadan başlayarak yazınız)

Öğrenim Dönemi	Derece (*)	Üniversite	Öğrenim Alanı
2013- 2017	Doktora	Süleyman Demirel Üniversitesi	Sağlık Bil. Enst. Sinir Bil. A.D.
2011-2013	Y. Lisans (Tezli)	Süleyman Demirel Üniversitesi	Sağlık Bil. Enst. Biyofizik A.D.
2003-2008	Y. Lisans (Tezsiz)	Kafkas Üniversitesi	Veteriner Fakültesi

(*) Diploma Türü (Lisans, Y.Lisans, vs.)

3. İdari Görev ve Sorumluluk:

Görev Dönemi	Unvan	Üniversite	Bölüm
2009-2011	Hayvan Deneylei Etik Kurul Üyeliği	Süleyman Demirel Üniversitesi	Deney Hayvanları Üretimi ve Deneysel Araştırma Laboratuvarı

4. Yayın Bilgileri/Eserler

ISI indeksine kayıtlı dergilerde yayınlanan Makale (A)	17
Diğer indekslere kayıtlı / Hakemli dergilerde yayınlanan Makale (B)	2
Diğer indekslere kayıtlı / Hakemli dergilerde yayınlanan Özet (C)	24
Alanında Kitap / Kitap Bölümü / Ünite Yazarlığı (D)	1
Diğer yayınlar (E)	2
TOPLAM	46

A-SCI, SSCI ve AHCI tarafından taranan dergilerde yayımlanan teknik not, editöre mektup, tartışma, vaka takdimi ve özet türünden yayınlar dışındaki makaleler

- 1- Akpınar H, Nazıroğlu M, **Övey İS**, Çiğ B, Akpınar O. The neuroprotective action of dexmedetomidine on apoptosis, calcium entry and oxidative stress in cerebral ischemia-induced rats: Contribution of TRPM2 and TRPV1 channels. *Sci Rep*. 2016 Nov 22;6:37196. doi: 10.1038/srep37196. PubMed PMID: 27872485.
- 2- Demirci K, Nazıroğlu M, **Övey İS**, Balaban H. Selenium attenuates apoptosis, inflammation and oxidative stress in the blood and brain of aged rats with scopolamine-induced dementia. *Metab Brain Dis*. 2016 Sep 15. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27631101.
- 3- Demirdaş A, Nazıroğlu M, **Övey İS**. Duloxetine Reduces Oxidative Stress, Apoptosis, and Ca(2+) Entry Through Modulation of TRPM2 and TRPV1 Channels in the Hippocampus and Dorsal Root Ganglion of Rats. *Mol Neurobiol*. 2016 Jul 21. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27443158.
- 4- Yazğan B, Yazğan Y, **Övey İS**, Nazıroğlu M. Raloxifene and Tamoxifen Reduce PARP Activity, Cytokine and Oxidative Stress Levels in the Brain and Blood of Ovariectomized Rats. *J Mol Neurosci*. 2016 Oct;60(2):214-22. doi: 10.1007/s12031-016-0785-9. PubMed PMID: 27372663.
- 5- Sakallı Çetin E, Nazıroğlu M, Çiğ B, **Övey İS**, Aslan Koşar P. Selenium potentiates the anticancer effect of cisplatin against oxidative stress and calcium ion signaling-induced intracellular toxicity in MCF-7 breast cancer cells: involvement of the TRPV1 channel. *J Recept Signal Transduct Res*. 2016 Apr 8:1-10. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27055401.
- 6- Balaban H, Nazıroğlu M, Demirci K, **Övey İS**. The Protective Role of Selenium on Scopolamine-Induced Memory Impairment, Oxidative Stress, and Apoptosis in Aged Rats: The Involvement of TRPM2 and TRPV1 Channels. *Mol Neurobiol*. 2016 Mar 28. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27021021.
- 7- Kahya MC, Nazıroğlu M, **Övey İS**. Modulation of Diabetes-Induced Oxidative Stress, Apoptosis, and Ca(2+) Entry Through TRPM2 and TRPV1 Channels in Dorsal Root Ganglion and Hippocampus of Diabetic Rats by Melatonin and Selenium. *Mol Neurobiol*. 2016 Mar 9. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 26957303.
- 8- Demirdaş A, Nazıroğlu M, **Övey İS**. Short-Term Ketamine Treatment Decreases Oxidative Stress Without Influencing TRPM2 and TRPV1 Channel Gating in the Hippocampus and Dorsal Root Ganglion of Rats. *Cell Mol Neurobiol*. 2016 Mar 2. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 26935063.
- 9- Koşar PA, Nazıroğlu M, **Övey İS**, Çiğ B. Synergic Effects of Doxorubicin and Melatonin on Apoptosis and Mitochondrial Oxidative Stress in MCF-7 Breast Cancer Cells: Involvement of TRPV1 Channels. *J Membr Biol*. 2016 Apr;249(1-2):129-40. doi: 10.1007/s00232-015-9855-0. PubMed PMID: 26525975.

- 10- Naziroğlu M, **Övey İS**. Involvement of apoptosis and calcium accumulation through TRPV1 channels in neurobiology of epilepsy. *Neuroscience*. 2015 May 7;293:55-66. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.02.041. PubMed PMID: 25743251.
- 11- **Övey İS**, Naziroğlu M. Homocysteine and cytosolic GSH depletion induce apoptosis and oxidative toxicity through cytosolic calcium overload in the hippocampus of aged mice: involvement of TRPM2 and TRPV1 channels. *Neuroscience*. 2015 Jan 22;284:225-33. doi: 0.1016/j.neuroscience.2014.09.078. PubMed PMID:25305668.
- 12- Naziroğlu M, Kutluhan S, **Övey İS**, Aykur M, Yurekli VA. Modulation of oxidative stress, apoptosis, and calcium entry in leukocytes of patients with multiple sclerosis by *Hypericum perforatum*. *Nutr Neurosci*. 2014 Sep;17(5):214-21. doi: 10.1179/1476830513Y.0000000083. PubMed PMID: 24075078.
- 13- Kayan M, Naziroğlu M, **Övey İS**, Aykur M, Uğuz AC, Yürekli VA. Non-ionic contrast media induces oxidative stress and apoptosis through Ca²⁺ influx in human neutrophils. *J Membr Biol*. 2012 Dec;245(12):833-40. doi: 10.1007/s00232-012-9491-x. PubMed PMID: 22903554.
- 14- Esenlik E, Naziroğlu M, Açıkalın C, **Övey İS**. Vitamin E supplementation modulates gingival crevicular fluid lipid peroxidation and antioxidant levels in patients with orthodontic tooth movement. *Cell Biochem Funct*. 2012 Jul;30(5):376-81. doi: 10.1002/cbf.1833. PubMed PMID: 22113708.
- 15- Korkmaz S, Erturan I, Naziroğlu M, Uğuz AC, Ciğ B, **Övey İS**. Colchicine modulates oxidative stress in serum and neutrophil of patients with Behçet disease through regulation of Ca²⁺ release and antioxidant system. *J Membr Biol*. 2011 Dec;244(3):113-20. doi: 10.1007/s00232-011-9404-4. PubMed PMID: 22052237.
- 16- Calışkan AM, Naziroğlu M, Uğuz AC, **Övey İS**, Sütçü R, Bal R, Calışkan S, Ozcankaya R. Acamprosate modulates alcohol-induced hippocampal NMDA receptors and brain microsomal Ca²⁺-ATPase but induces oxidative stress in rat. *J Membr Biol*. 2010 Sep;237(1):51-8. doi: 10.1007/s00232-010-9305-y. PubMed PMID: 20871985.
- 17- Dilek M, Naziroğlu M, Baha Oral H, **Övey İS**, Küçükayaz M, Mungan MT, Kara HY, Sütçü R. Melatonin modulates hippocampus NMDA receptors, blood and brain oxidative stress levels in ovariectomized rats. *J Membr Biol*. 2010 Feb;233(1-3):135-42. doi: 10.1007/s00232-010-9233-x. PubMed PMID: 20140668.

B- SCI, SSCI ve AHCI dışındaki indeks ve özler tarafından taranan dergilerde yayımlanan teknik not, editöre mektup, tartışma, vaka takdimi ve özet türünden yayınlar dışındaki makale,

- 1- Nazıroğlu M, Güler M, Küçükayaz M, **Övey İS**, Özgül C. Apple cider vinegar supplementation modulates lipid peroxidation and glutathione peroxidase values in lens of ovariectomized mice Journal of CMFRR., 2012.
- 2- **Övey İS**, Nazıroğlu M. Effects of Homocysteine on Ca²⁺ Signaling, Apoptosis, TRPV1 and TRPM2 Cation Channels in Hippocampus of Aged Mice. 5. Sinir Bilim Günleri, CMFRR

C- SCI, SSCI ve AHCI dışındaki indeks ve özler tarafından taranan dergilerde yayımlanan teknik not, editöre mektup, tartışma, vaka takdimi ve özet türünden yayınlar

- 1- Handan B, Uğuz AC, Bardak Y, Nazıroğlu Mustafa, **Övey İS**. Curcumin inhibits apoptosis by regulating intracellular calcium release, reactive oxygen species and mitochondrial depolarization levels in ARPE-19 cells CMFRR 2016,8,1.
- 2- Yazğan B, Yazğan Y, **Övey İS**, Nazıroğlu M. Raloxifene and tamoxifen attenuates PARP activity, cytokine and oxidative stress levels in the brain and blood of ovariectomized rats. CMFRR, 2016,8,1.
- 3- Uslusoy F, Nazıroğlu M, Çiğ B, **Övey İS**. Effects of Hypericum perforatum on TRPM2 and TRPV1 channels in sciatic nerves and dorsal root ganglia of sciatic nerve injuryinduced rats. CMFRR 2016,8,1.
- 4- Demirdaş A, Nazıroğlu M, **Övey İS**. In vitro effects of duloxetine on TRPM2 and TRPV1 channels in the hippocampus and dorsal root ganglion of rats. CMFRR 2016,8,1.
- 5- Akpınar H, Nazıroğlu M, **Övey İS**, Çiğ B, Akpınar O. The neuroprotective role of dexmedetomidine on calcium signaling, oxidative stress and apoptosis in cerebral ischemia-induced rats: The involvement of TRPM2 and TRPV1 channels. CMFRR 2016,8,1.
- 6- Sakallı Çetin E, Nazıroğlu M, Çiğ B, **Övey İS**, Aslan Koşar P. Selenium potentiates the anticancer effect of cisplatin against oxidative stress and calcium ion Signaling-induced intracellular toxicity in MCF-7 breast cancer cell: Involvement of TRPV1 channel. CMFRR 2016,8,1.
- 7- **Övey İS**, Pariente R, Bejarano I, Rodríguez AB, Naziroglu M, Pariente JA. Effect of Heat Shock Proteins (HSP) on cell viability and caspases activation in human epitheloid cervix carcinoma HeLa cells CMFRR 2016,8,1.
- 8- Demirci K, Nazıroğlu M, **Övey İS**, Balaban H. Selenium attenuates apoptosis, inflammation, and oxidative stress in the blood, and brains of aged rats with scopolamine-induced dementia CMFRR 2016,8,1.

- 9- Akpınar O, Nazıroğlu M, **Övey İS**, Akpınar H. Dexmedetomidine reduces plasma cytokine levels in cerebral ischemia-induced rats. CMFRR 2016,8,1.
- 10- Aslan Koşar P, Nazıroğlu M, **Övey İS**, Çiğ B. Synergic effects of doxorubicin and melatonin on apoptosis and mitochondrial oxidative stress in MCF-7 breast cancer cells: Involvement of TRPV1 channels. CMFRR 2016,8,1.
- 11- Yazğan Y, Yazğan B, **Övey İS**, Nazıroğlu M. Raloxifene and tamoxifen reduces oxidative stress in brain of ovariectomized rats. 1st International Brain Research School, CMFRR 2015,7,1,426,
- 12- Yazğan B, Yazğan Y, **Övey İS**, Nazıroğlu M. Protective Effect of Tamoxifen and Raloxifene on oxidative stress in liver, heart and kidney of ovariectomized rats. 1st International Brain Research School, CMFRR 2015 7,1,428,
- 13- Kahya MC, Nazıroğlu M, **Övey İS**. Selenium reduces oxidative stress, apoptosis and Ca²⁺ entry in dorsal root ganglion neurons of diabetic rats: Involvement of TRPV1 channels. CMFRR 2014,6,1 ,334.
- 14- Özdamar G, Nazıroğlu M, Demirdaş A, **Övey İS**. Effects of Agomelatine on apoptosis through TRPV1 Channels in hippocampus of depression induced rats. CMFRR 2014 6,1,370.
- 15- Nazıroğlu M, **Övey İS**. Involvement of apoptosis and calcium accumulation through TRPV1 channels in neurobiology of Epilepsy. CMFRR 2014 6,1,372.
- 16- Ulusoy Karatopuk D, Nazıroğlu M, Öncü M, **Övey İS**. Evaluating apoptosis, Ca²⁺ entry and oxidative stress markers as indicator of oocyte quality in granulosa cells of women undergoing in vitro fertilization (IVF): Involvement of TRPV1 channels. 2014, 6,1,379.
- 17- Tök L, Nazıroğlu M, **Övey İS**, Kahya MC. Modulator role of melatonin and selenium on oxidative stress in lens of diabetic rats. CMFRR. 2014, 6,1,408.
- 18- Nazıroğlu M, Uğuz AC, Çelik Ö, **Övey İS**, Yüksel M, Özkaya MO. Wifi (2.45GHz) elektromanyetik Radyasyonun Gebe ve Yavru Farelerin Beyin Dokularında Antioksidan Sistem, Kalsiyum Sinyali, Kaspaz 3 ve 9 Aktiviteleri Üzerine Etkileri, 25. Ulusal Biyofizik Kongresi, 2013
- 19- Nazıroğlu M, **Övey İS**. Effects of Homocysteine on Ca²⁺ Signaling, apoptosis, TRPV1 and TRPM2 cation channels in DRG of aged mice. 3rd Tehran IBRO School of Neuroscience, 2013
- 20- Kayan M, Nazıroğlu M, **Övey İS**, Aykur M, Uğuz AC, Yürekli VA. Non ionic contrast medium induces oxidative stress andapoptosis through Ca²⁺ influx in Human neutrophiles. CMFRR. 4,1,48. 2012.
- 21- Nazıroğlu M, Özgül C, Akay MB, **Övey İS**. Capparis ovata modulates oxidative stress and ADP ribose-induced TRPM2 channel currents in dorsal root ganglion of pentylentetrazol-induced epileptic rats. CMFRR. 4,1,49. 2012.
- 22- Demirkan H, Şahin M, Uğuz AC, **Övey İS**, Nazıroğlu M, Tunç E. Colchicine modulates oxidative stress and Ca²⁺ release in polymorph nuclear leucocytes of remission(but not unremission) of patients with familial mediterranean fever. 2010, 2;1;70.

- 23- Kanatsız O, Yozgat Z, Ören Ö, **Övey İS**, Sözbir E, Özgül C, Küçükayaz M, Çiğ B, Kale Köroğlu B, Nazıroğlu M. Effects of apple cider vinegar on lipid profiles, liver lipid peroxidation and vitamin E and β -carotene levels in ovariectomized and streptozotocin induced diabetic mice fed cholesterol. 2010, 2;1;76.
- 24- Güler M, Saydam G, **Övey İS**, Özgül C, Küçükayaz M, Sözbir E, Çiğ B, Özzkaya MO, Nazıroğlu M. Effects of apple cider vinegar reduces blood lipid profiles, liver lipid peroxidation and antioxidant levels in streptozotocin induced diabetic and cholesterol fed mice. . 2010, 2;1;75.

D- Alanında, diğer tür kitaplarda bölüm ve ünite yazarlığı

- 1- Methods Book – Western Blot Chapter, 1st International Brain Research School (24 August-4 September 2015), Isparta, Turkey (<http://www.cmos.org.tr/brs2015/en/>)

E- Ulusal toplantıda poster, sözlü sunum ve gösterim

- 1- **Övey İS**, Nazıroğlu M. Sinir Hücrelerinde Kuyucuk Okuyucu (Plate Reader) ile Apoptoz Analizi. Celal Bayar Üniversitesi 2. Ulusal Kök Hücre Öğrenci Sempozyumu, 2014,47.
- 2- **Övey İS**, Nazıroğlu M. Homosisteinin Hipokampus Kalsiyum Sinyali, Apoptozis, TRPV1 ve TRPM2 katyon Kanalları Üzerine Etkileri, 5. Hücrel Sinir Bilim Günleri, 2013

F- Katıldığı Kongre / Kurs / Sempozyum / Seminer / Eğitim / Workshop:

- 1- 6. Uluslararası Oksidatif Stres Kalsiyum Sinyali ve TRP Kanalları Dünya Kongresi Poster Sunumu, 24-27 Mayıs 2016, Isparta
- 2- 1. Uluslararası Beyin Araştırmaları Okulu Kurs Programı-Öğretici, 24 Ağustos - 4 Eylül 2015, Isparta
- 3- 5. Uluslararası Hücre Zarları ve Oksidatif Stres Kongresi Kurs Programı-Öğretici, 25 Ağustos-26 Ağustos 2014, Isparta
- 4- 5. Uluslararası Hücre Zarları ve Oksidatif Stres Kongresi Düzenleme Kurulu Üyeliği, 24 Ağustos-4 Eylül 2014, Isparta
- 5- Üsküdar Üniversitesi Nöropsikofarmakoloji Sempozyumu Workshop katılımı, 10 Ekim 2014, İstanbul
- 6- İstanbul Üsküdar Üniversitesi Nöropsikofarmakoloji Sempozyum katılımı, 9-10 Ekim 2014, İstanbul
- 7- Celal Bayar Üniversitesi 2. Ulusal Kök Hücre Öğrenci Sempozyumu DEFAM Kursu, 17-20 Nisan 2014, Manisa

- 8- Celal Bayar Üniversitesi 2. Ulusal Kök Hücre Öğrenci Sempozyumu, 17-20 Nisan 2014, Manisa
- 9- 3. Uluslararası Beyin Araştırmaları Organizasyonu (IBRO-APRC) Kurs Programı Kursiyer, 26 Ekim-6 Kasım 2013, Tahran, İRAN
- 10- 21. Uluslararası Fizyoloji ve Farmakoloji Kongresi, 23-27 Ağustos 2013, Tebriz, İRAN
- 11- 4. Uluslararası Hücre Zarları ve Oksidatif Stres Kongresi Düzenleme Kurulu Üyeliği, 26-29 Haziran 2012, Isparta
- 12- 4. Uluslararası Hücre Zarları ve Oksidatif Stres Kongresi Kurs Programı-Öğretici, 30 Haziran-1 Temmuz 2012, Isparta
- 13- 3. Uluslararası Hücre Zarları ve Oksidatif Stres Kongresi Düzenleme Kurulu Üyeliği, 22-27 Haziran 2010, Isparta
- 14- 3. Uluslararası Hücre Zarları ve Oksidatif Stres Kongresi Kurs Programı-Öğretici, 28-29 Haziran 2010, Isparta
- 15- Süleyman Demirel Üniversitesi 5. Sinir Bilim Günleri, 1-2 Haziran 2013, Isparta
- 16- 19 Mayıs Üniversitesi 3. Sinir Bilim Günleri, 26 Mayıs 2012, Samsun
- 17- Süleyman Demirel Üniversitesi 1. Bilimsel Araştırmalar Kursu, 25 Eylül – 27 Kasım 2011, Isparta
- 18- Selçuk Üniversitesi 2. Hücresel Sinir Bilim Günleri, 14 Ekim 2011, Konya
- 19- Türkiye Hayvan Deneğinde Etik Sempozyumu, 16 Haziran 2011, Ankara
- 20- Gülhane Askeri Tıp Akademisi (GATA) 3. Doğu Akdeniz ICLAS Sempozyumu 13-15 Haziran 2011, Ankara
- 21- VI. Deney Hayvanları Kullanımı Eğitim Kursu, 1-9 Kasım 2010, Öğretici, SDÜ, Isparta
- 22- V. Deney Hayvanları Kullanımı Eğitim Kursu, 25-29 Ocak 2010, Öğretici, SDÜ, Isparta
- 23- AD Instruments Powerlab Araştırma ve Workshop Eğitimi Programı, Ekim 2009, İstanbul
- 24- IV. Deney Hayvanları Kullanımı Eğitim Kursu, 13-17 Temmuz 2009, Öğretici, SDÜ, Isparta
- 25- Deney Hayvanları Kullanımı Eğitim Kursu, Kursiyer, 6-10 Nisan 2009, SDÜ, Isparta