

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**RATLARDA SKOPOLAMİN İLE İNDÜKLENEN DEMANS
MODELİNDE SELENYUMUN APOPİTOZ, OKSİDATİF STRES
ve KALSİYUM İYON DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. Hasan BALABAN

**RUH SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

I. DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Kadir DEMİRCİ

II. DANIŞMAN

Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU

**Bu Tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim
Birimi tarafından 4257-TU2-15 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ISPARTA-2016

TEŞEKKÜR

Akademik eğitimimde bilgi ve tecrübelerinden yararlanma olanağı sunan, hayata ve insanlara daha geniş bakış açısıyla bakmamı sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Ramazan Özçankaya'ya;

Eğitim sürecime büyük katkılar sağlayan, tez sürecimin tüm aşamalarında destek olan, motive eden, yardımını asla esirgemeyen ve kendisi tez danışmanım olduğu için kendimi şanslı hissettiğim değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Kadir Demirci'ye;

Psikiyatri eğitimimin verimli şekilde geçmesinde hiçbir zaman desteğini esirgemeyen, klinik yaklaşım ve tedavi konularında kendisinden çok şey öğrendiğim değerli hocam Doç. Dr. Duru Kuzugüdenlioğlu'na;

Uzmanlık eğitimim sürecinde büyük emeği olan, sosyal ve bilimsel desteğini hiç esirgemeyen, mesleki bilgi ve tecrübesinden yararlanma fırsatı bulduğum değerli hocam Doç. Dr. Abdullah Akpınar'a;

Eğitim sürecimde hasta sunmaktan büyük keyif aldığım, fikirlerimize değer veren, bizlere çok rahat bir çalışma ortamı sağlayan, birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım, Doç. Dr. İnci Meltem Atay'a;

Eğitim sürecimde her zaman yanımda olduğunu hissettiğim, güncel bilgileri öğrenmemde katkı sağlayan, adli konularla ilgili dikkatimi artıran Yrd. Doç. Dr. Arif Demirdaş'a

Tezim vesilesiyle kendisini tanıma ve birlikte çalışma fırsatı bulduğum, ilham verici çalışkanlığı ile iyi bir örnek olan ve ilerde başka çalışmalar yapabilmeyi arzuladığım değerli hocam Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU'na;

Tezime yönelik özel katkıları bulunan başta İshak Suat Övey olmak üzere Biyofizik ve Deney Hayvanları Laboratuvarı çalışanlarına;

Berberce ve uyum içinde çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli dostlarım Dr. Gözde Bacık Yaman, Dr. Gülin Özdamar Ünal, Dr. Bilal Tanrıtanır, Dr. Cafer Çağrı Korucu, Dr. Ayşe Rümeyza Yaman, Dr. Fatma Kaplan Başal, Dr. Havva Sert,

Dr. Mehmet Akgönül, Dr. Ekrem Didin, Dr. Süleyman Keleş, Dr. İbrahim Halil Aslan, Dr Ayşe Özçelik, Dr Merve Orhan, Dr. Kevser Kuzdere'ye

Her zaman desteklerini hissettiğim, birlikte huzurlu bir ekip çalışması yapma fırsatı bulduğum Psikiyatri hemşireleri Gizem Ekinci, Sema Akbaş, Mürşide Demircan, Dilek Günal ve Dilek Zeybek'e

Rotasyonlarım boyunca bilgilerinden faydalandığım hocalarım Prof. Dr. Süleyman Kutluhan, Prof. Dr. Serpil Demirci, Doç. Dr. Hasan Rıfat Koyuncuoğlu, Doç. Dr. Evrim Aktepe, Doç. Dr. Vedat Ali Yürekli, Yrd. Doç. Dr. Seden Demirci'ye arkadaşlarım Dr. Adem Işık, Dr. Orhan Kocaman, Dr. Funda Özyay Eroğlu, Dr. Büşra Bağcı, Dr. Emel Özen, Dr. Abdülbaki Akyıldız, Dr. Yakup Erdoğan, Dr. Hatice Değirmenci, Dr. Sibel Kahraman, Dr. Burcu Kurt ve Dr. Pınar Karabacak'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca çalışma konusunda beni motive eden, adını taşımaktan büyük mutluluk duyduğum, asistanlık dönemimde kaybettiğim dedeme,

Oğulları olmaktan büyük gurur duyduğum, bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan babam ile anneme ve kardeşlerime sonsuz minnetle teşekkür ederim.

Hayatıma girdiği ilk andan beri huzur ve mutluluk kaynağım olan, tez sürecimde bana sabır gösteren çok değerli eşime ve evliliğimizin en büyük mucizesi olan oğlum Mehmet'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Demans.....	2
2.1.1. Tanım ve Tarihçesi.....	2
2.1.2. Epidemiyoloji.....	2
2.1.3. Demansın Sınıflandırılması.....	3
2.2. Alzheimer Hastalığı	5
2.2.1. Tanım ve tarihçe.....	5
2.2.2. Epidemiyoloji.....	6
2.2.3. Risk Faktörleri.....	6
2.2.3.1. Yaş	7
2.2.3.2. Cinsiyet	7
2.2.3.3. Düşük Eğitim	7
2.2.3.4. Aile Öyküsü	8
2.2.3.5. Kafa Travması Öyküsü	8
2.2.3.6. Yaşam Tarzı ve Aktivite	8
2.2.3.7. Kardiyometabolik Risk Faktörleri	8
2.2.3.8. Diğer Risk Faktörleri	9
2.2.4. Koruyucu Faktörler	9
2.2.4.1. Diyet.....	9
2.2.4.2. Fiziksel Aktivite	9
2.2.4.3. Entellektüel Aktivite	10
2.2.5. Genetik	10
2.2.5.1. Otozomal Dominant AH	10
2.2.5.2. Sporadik AH	11
2.2.6. Evreleme	11

2.2.7. Tanı Ölçütleri	12
2.2.8. Klinik Seyir	13
2.2.8.1. AH Klinik Evreleri	14
2.2.8.1.1. Preseptomatik Dönem	14
2.2.8.1.2. Preklinik Dönem	14
2.2.8.1.3. Hafif Kognitif Bozukluk	14
2.2.8.1.4. Erken Dönem Alzheimer Hastalığı	15
2.2.8.1.5. Orta Dönem Alzheimer Hastalığı	15
2.2.8.1.6. Ağır Dönem Alzheimer Hastalığı	16
2.2.9. Etiyoloji, Patoloji ve Patofizyoloji	16
2.2.9.1. Amiloid Birikimi ve AP Oluşumu	17
2.2.9.2. Tau Hiperfosforilasyonu ve NFY Oluşumu	18
2.2.9.3. Gliyozis ve inflamasyon	19
2.2.9.4. Nöron ve Sinaps Kaybı	19
2.2.9.5. Kolinergic Hipotez	20
2.2.9.6. Glutamaterjik Hipotez	20
2.2.9.7. Mitokondriyal Fonksiyon Bozukluğu	21
2.2.9.8. Oksidatif Stres	21
2.3. Oksidatif Stres ve AH	22
2.4. Alzheimer Hastalığına Yönelik Tedaviler	24
2.4.1. Antioksidanlar ve Alzheimer Hastalığı	25
2.4.1.1. Selenyum	26
2.5. Apoptozis	29
2.5.1. Kaspazlar	30
2.5.1.1. Sitokin Aktivasyonu Yapanlar	31
2.5.1.2. Apoptozisi Başlatanlar	31
2.5.1.3. Apoptozisi Yürütenler (Efektör Grup) (İnfazcılar)	31
2.5.2. Apoptoz Mekanizmaları	31
2.5.2.1. Mitokondri/Sitokrom-C Aracılı Apoptoz	32
2.5.2.2. Dış Sinyallerle Apoptoz Tetiklenmesi	32
2.5.2.3. ER Aracılı Apoptoz	32
2.6. Kalsiyum Kanalları	33
2.6.1. TRP Kanalları	34
2.6.1.1. Transient Reseptör Potansiyel Melastatin (TRPM) Kanalları	35

2.6.1.1.1. Transient Reseptör Potansiyel Melastatin 2 (TRPM2) Katyon Kanalları	35
2.6.1.2. TRPV1 Katyon Kanalları	37
2.7. AH için Kullanılan Deneysel Hayvan Modelleri	39
2.7.1. Kolinerjik Fonksiyon Bozulmasına Bağlı Modeller	39
2.7.2. Skopolamin ile Deneysel AH Modeli Oluşturulması	40
2.8. Deneysel AH Modellerinde Kullanılan Düzenekler	42
2.8.1. Sekiz Kollu Işınsal Labirent Testi (Radial Arm Maze Testi)	42
3. MATERYAL-METOD	44
3.1. Gereç	44
3.1.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler	44
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	45
3.2. Yöntem	46
3.2.1. Deney Hayvanları	46
3.2.2. Sekiz kollu Işınsal labirent Testi (Radial Arm Maze Testi)	47
3.2.2.1. Labirent Testi için Ratların Eğitilmesi	48
3.2.2.2. Işınsal Kollu Labirent Ölçümleri ve Hesaplamaları	49
3.2.2.3. İlaç Uygulama ile Eş Zamanlı Hatırlatma Eğitimleri Aşaması	50
3.2.3. Laboratuvar Analiz Aşaması	53
3.2.3.1. Hipokampal Nöron İzolasyonları ve Plazma ile Alyuvar Eldesi	53
3.2.3.2. Antioksidan ve Oksidan Analizleri	55
3.2.3.3. GSH ve GSH-Px Analizleri	55
3.2.3.4. LPO Analizi	56
3.2.3.5. İntraselüler Ca^{+2} Ölçülmesi	56
3.2.3.6. Hücre Canlılığı (MTT Analizi)	57
3.2.3.7. Hücre içi ROS Üretimi Tayini	57
3.2.3.8. Mitokondriyal Membran Depolarizasyon Tayini	57
3.2.3.9. Apoptozis Testleri	58
3.2.3.9.1. Kaspaz 3 ve 9 Enzim Aktiviteleri Tayini	58
3.2.3.10. Western Blot Analizleri	59
3.3. İstatistiksel Analiz	59

4. BULGULAR	60
4.1. Çalışma Belleği Hataları (WME) ve Referans Belleği Hataları (RME)	60
4.2. Lipit Peroksidasyonu, İndirgenmiş Glutasyon (GSH) Seviyeleri ve Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesi	60
4.3. Selenyumun TRPV1 Kanal Aracılı Hücre İçi Serbest Kalsiyum İyon Düzeyleri ($[Ca^{+2}]_i$) Üzerine Etkileri	61
4.4. Selenyumun TRPM2 Kanal Aracılı Hücre İçi Serbest Kalsiyum İyon Düzeyleri ($[Ca^{+2}]_i$) Üzerine Etkileri	63
4.5. TRPV1 Aracılı Apoptozis ve MTT Düzeyleri	65
4.6. TRPM2 Aracılı Apoptozis ve MTT Düzeyleri	66
4.7. TRPV1 Aracılı Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 Aktiviteleri	67
4.8. TRPM2 Aracılı Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 Aktiviteleri	68
4.9. TRPV1 Aracılı Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu (JC-1) ve Hücre İçi ROS Üretimi.....	69
4.10. TRPM2 Aracılı Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu (JC-1) ve Hücre İçi ROS Üretimi.....	70
4.11. Prokaspaz 3, Prokaspaz 9 Aktivitesi	71
4.12. PARP Aktivitesi	72
5. TARTIŞMA	74
ÖZET.....	95
SUMMARY	97
KAYNAKÇA	99
EKLER.....	126
Ek 1. Etik Kurul Onayı.....	126

KISALTMALAR DİZİNİ

Aβ	: Amiloid beta
ACA	: Anthranilic acid
ACh	: Asetilkolin
AChE	: Asetilkolin esterase
ADP	: Adenin difosfat
ADPR	: ADP-Riboz
AH	: Alzheimer hastalığı
AP	: Amiloid plak
APA	: Amerikan Psikiyatri Derneği
ApoE	: Apolipoprotein E
ApoER2	: Apolipoprotein E reseptörü
APP	: Amiloid prekürsör protein
ATP	: Adenozin tri fosfat
BACE-1	: Beta sekretaz-1(β -site APP-cleaving enzyme-1)
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
Ca⁺²	: Kalsiyum iyonu
CDR	: Clinical Dementia Rating Scale
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DSM-IV-TR	: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-IV-TR
DSM-5	: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-5
ER	: Endoplazmik retikulum
GDS	: Global Deterioration Scale
GSH	: İndirgenmiş glutatyon
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz enzimi
GSH-R	: Glutatyon redüktaz
HBSS	: Hank's Blanced Salts Solution
HKB	: Hafif Kognitif Bozukluk
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
IP₃	: Inositol 1,4,5-trifosfat
I-RTX	: İodo-resiniferatoxin

JC-1	: Mitokondriyal membran depolarizasyonu
KAP	: Kapsaisin
Kaspaz	: Cysteine Aspartate Spesific Protease
KAT	: Katalaz
KPZ	: Kapsazepin
LPO	: Lipit peroksidasyonu
MDA	: Malondialdehit
MR	: Manyetik rezonans
mRNA	: Messenger ribonükleik asid
Na⁺	: Sodyum iyonu
NIA-AA	: National Institute on Aging and Alzheimer's Association
NINCDS-ARDRA	: National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association
NFY	: Nörofibriler yumaklar
NGF	: Sinir büyüme faktörü (Nerve Growth Factor)
NMDA	: N-Metil-D-Aspartat
NO	: Nitrik oksit
NSAİİ	: Non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar
MSS	: Santral sinir sistemi
NOS	: Nitrik oksit sentaz
OD	: Otozomal dominant
OH⁻	: Hidroksil radikali
O₂	: Oksijen
PARP	: Poli ADP-riboz polimeraz
PET	: Pozitron emisyon tomografisi
PP2A	: Protein fosfataz 2A
PSEN1	: Presenilin 1
PSEN2	: Presenilin 2
RAM	: Radial arm maze
RME	: Referance memory error
ROS	: Reaktif oksijen türleri (Reactive Oxygen Species)

RTX	: İyodo-resiniferatoksin
Se	: Selenyum
SelP	: Selenoprotein P
SF	: Serum fizyolojik
Skop	: Skopolamin
SMMT	: Standart mini mental test
SOD	: Süperoksit dismutaz
SP	: Senil plak
SF	: Serum fizyolojik
TNF	: Tümör nekrosis faktör
TRP	: Transient Reseptör Potansiyel kanalları
TRPM	: Transient Reseptör Potansiyel Melastatin Kanalları
TRPV	: Transient Reseptör Potansiyel Valinoid Kanalları
WME	: Working memory error

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Demans Türlerinin Sınıflandırılması.....	4
--	---



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Apoptozis mekanizmasının şematik görünümü.....	33
Şekil 2. Şekilde AH'nda artan A β 'nin oksidatif stresi uyardığı, böylece artan oksidatif stresin TRPM2 ve TRPV1 kanallarını uyararak Ca ⁺² iyonunun hücre içine girişini artırdığı, artan hücre içi Ca ⁺² 'un mitokondriyi uyararak hem sitozolik Ca ⁺² miktarını artırdığı hem de kaspaz 3-9 salınımını artırarak apoptozise yol açtığı, ROS ve RNS gibi oksidatif ürünlerin salınımı sonucu nöronal eksitotoksisite, sinaptik kayıp ve nöronal hasar oluştuğu ve bunların amiloid plak ve NFY oluşumunu daha da artırdıkları böylece AH'na neden olabildikleri gösterilmektedir	38
Şekil 3. Ratların zamanlarını geçirdiklerin kafeslerin görünümü	47
Şekil 4. Labirentin deney için hazır hale getirilmiş hali görülmektedir	48
Şekil 5. İlk günden son güne kadar çalışma sürecinde gün gün neler yapıldığı şekilde gösterilmektedir.	52
Şekil 6. Ratlardan beyin dokusunun izole edilmesi	54
Şekil 7. Beyin dokusundan hipokampal dokunun izole edilmesi	55
Şekil 8. 2 haftalık RAM eğitimi sonrası tüm gruplara uygulanan Test-1, ilaç uygulamaları sonrası tüm gruplara uygulanan Test-2 ve skop+se grubuna uygulanan Test-3 sonrası elde edilen WME ve RME değerleri.....	60
Şekil 9. Skopolamin ile demans oluşturulan yaşlı sıçanların hipokampus nöronlarındaki GSH, GSH-Px ve lipid peroksidasyon değerleri	61
Şekil 10. İntraperitoneal skopolamin, SF ve selenyum alan sıçanların hipokampal nöronları deney hayvanlarından kesilerek çıkarıldı	62
Şekil 11. Skopolamin ile indüklenen demans modeli oluşturulan sıçan hipokampus hücrelerinde ve kontrol sinir hücrelerinde selenyumun TRPV1 kanal aracılı hücre içi serbest kalsiyum iyon düzeyleri ([Ca ⁺²] _i) üzerine etkileri grafiksel döküm halinde şekil 9'da gösterilmiştir.	63
Şekil 12. İntraperitoneal skopolamin, SF ve selenyum alan sıçanların hipokampal nöronları kesilerek çıkarıldı.	64
Şekil 13. Skopolamin ile indüklenen demans modeli oluşturulan sıçan hipokampus sinir hücrelerinde ve kontrol sinir hücrelerinde selenyumun TRPM2 kanal aracılı hücre içi serbest kalsiyum iyon düzeyleri ([Ca ⁺²] _i) üzerine etkileri grafiksel döküm halinde şekil 11'de gösterilmiştir.	64
Şekil 14. Kontrol, skopolamin, selenyum ve skopolamin+selenyum gruplarının hipokampal nöronları, TRPV1 deneylerinde in vitro KAP (0.01 mM) ile uyarıldı ve onlar KPZ (0.1 mM) tarafından inhibe edildi	66
Şekil 15. Kontrol, skopolamin, selenyum ve skopolamin+selenyum gruplarının hipokampal nöronları, TRPM2 deneylerinde in vitro CHPx (1 mM) ile uyarıldı ve onlar ACA (0.025 mM) tarafından inhibe edildi.....	67

Şekil 16. Kontrol, skopolamin, selenyum ve skopolamin+selenyum gruplarının hipokampal nöronları, TRPV1 deneylerinde in vitro KAP (0.01 mM) ile uyarıldı ve onlar KPZ (0.1 mM) tarafından inhibe edildi.	68
Şekil 17. Kaspaz aktiviteleri materyal metod bölümünde açıklandığı şekliyle hesaplandı. Kontrol, skopolamin, selenyum ve skopolamin+selenyum gruplarının hipokampal nöronları, TRPM2 deneylerinde in vitro CHPx (1 mM) ile uyarıldı ve ACA (0.025 mM) tarafından inhibe edildi.....	69
Şekil 18. TRPV1 Aracılı Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu (JC-1) ve Hücre İçi ROS düzeyleri.	70
Şekil 19. Kontrol, skopolamin, selenyum ve skopolamin+selenyum gruplarının hipokampal nöronları, TRPM2 deneylerinde in vitro CHPx (1 mM) ile uyarıldı ve ACA (0.04 mM) tarafından inhibe edildi.....	71
Şekil 20. Değerler 3 ayrı deneyde ortalama \pm SS olarak sunuldu ve sonuçlar kontrole kıyasla misli artış şeklinde ifade edilmiştir.....	72
Şekil 21. Değerler 3 ayrı deneyde ortalama \pm SS olarak sunuldu ve sonuçlar kontrole kıyasla misli artış şeklinde ifade edilmiştir.....	73

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Günümüzde Alzheimer tipi demans, yaşlanan nüfus ile birlikte dünya çapında yaygınlığının hızla artması nedeniyle ciddi bir sağlık sorunu haline gelmiştir [1]. AH'nda dejeneratif süreçleri açıklamada kabul gören patofizyolojik mekanizmalardan biri de oksidatif streştir [2]. AH'nda artan oksidatif stres ile ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri, nöronlarda dejenerasyona sebep olmaktadır [3]. TRPM2 ve TRPV1 non selektif Ca^{+2} geçirgen katyon kanallarıdır. Bu kanallar, oksidatif stres ürünleriyle aktif hale gelerek hücre içine Ca^{+2} almaktadır. Hücresel hasarı başlatan olayın, hücre içine aşırı miktarda Ca^{+2} girişi olduğu düşünüldüğünde, hücrede doğrudan hasar yapabilen, oksidatif stresle aktive olan TRPM2 ve TRPV1 kanallarının potansiyel önemi ortaya çıkmaktadır [4,5]. Selenyum birçok enzimin kofaktörüdür ve temel olarak antioksidan fonksiyonuyla bilinen oksidatif düzenlemede görevli esansiyel bir eser elementtir [6]. Selenyum seviyeleri ve bilişsel zayıflama arasındaki ilişkiyi değerlendiren çalışmalarda, selenyum eksikliğinin demans riskini artırabileceği ileri sürülmektedir [7,8]. Selenyumun hangi mekanizma ile bilişsel fonksiyonlar üzerinde olumlu etkileri olduğuna yönelik çeşitli hipotezler vardır. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda selenyumun potent bir TRPM2 ve TRPV1 kanal antagonisti olduğu gösterilmiştir [9,10].

Bu çalışma ile skopolamin ile demans modeli oluşturulması, demans modeli oluşturulan yaşlı ratlarda selenyum tedavisinin bellek hataları üzerine etkilerinin araştırılması, selenyumun apoptozis, oksidatif stres, kalsiyum iyon düzeyleri, TRPM2 ve TRPV1 katyon kanalları üzerine etkilerinin araştırılması planlanmıştır. Çalışmanın sonuçları, TRPM2 ve TRPV1'in demansa bağlı hücre ölümüyle ilişkilerini ortaya koyacak ve demans etiolojisinde yer alan hücre hasarlarını sınırlamaya yönelik yeni stratejilerin geliştirilmesine yardımcı olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Demans

2.1.1. Tanım ve Tarihçesi

Demans; bir ya da daha çok bilişsel alanda (öğrenme ve bellek, dil, yürütücü işlevler, karmaşık dikkat, algısal, motor ya da sosyal biliş), daha önceki yeterlik düzeyine göre belirgin bilişsel gerilemenin olduğu nörodejeneratif bir bozukluktur [11]. Halk arasında “bunama” adı verilen “demans” sözcüğü, etimolojik olarak Latince zihin anlamına gelen “mens” sözcüğünün “de” olumsuz ön eki alması ile türetilmiş olup, zihnin yitirilmesi anlamındaki “demens” sözcüğüyle ifade edilir. Latince’de “yerleşmiş, varolan, edinilmiş olan zihnin, sonradan yitirilmesi” anlamını taşır [12]. Yaşlanma ile birlikte tüm vücutta olduğu gibi beyinde de çeşitli fizyolojik değişikliklerin meydana gelmektedir. Bilgi işleme hızındaki yavaşlamaya bağlı olarak problem çözme, öğrenme ve bellek gibi bilişsel yetilerde bozulmalar oluşur. Normal yaşlanma süreci, bilişsel bozulmanın çok yavaş olması ve kişinin günlük aktivitesini engellememesi ile demanstan ayrılır [13].

Amerikan Psikiyatri Derneği (APA) 2000 yılında yayınladığı “Mental Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kılavuzu IV-TR’de (DSM-IV-TR) Kognitif Bozukluklar başlığı altında sınıfladığı Demans hastalığını, 2013 yılında yayınladığı “Mental Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kılavuzu 5’te (DSM-5) Nörokognitif Bozukluklar başlığı altında sunmuş ve ismini Majör Nörokognitif Bozukluk olarak revize etmiştir [11].

2.1.2. Epidemiyoloji

Dünyada ve ülkemizde yaşlı nüfus oranları artış göstermektedir. 2014 yılı verilerine göre Türkiye’de 65 yaş ve üzeri nüfusun oranı %8’dir. Yaşlı nüfustaki artışa paralel olarak bu oranın 2023 yılında %10,2’ye, 2050 yılında %20,8 ve 2075 yılına kadar %27,7’ye yükseleceği tahmin edilmektedir. 2023 yılı için öngörülen %10,2’lik yaşlı nüfus oranı ile ülkemizin ‘çok yaşlı’ nüfuslu ülkeler arasında yer

alacağı tahmin edilmektedir [14]. Yaşlı nüfusta artış ile birlikte demanslı birey sayısının da artacağı düşünüldüğünde giderek daha büyük bir halk sağlığı sorunu olacaktır. Dünya sağlık örgütünün 2015 yılı verilerine göre dünya üzerinde 47,5 milyon demans hastası olduğu, bunların %60-70'inin AH'sı olduğu bilinmektedir. Bu sayıya her yıl 7,7 milyon yeni olgu eklenmektedir. Demanslı hasta sayısının yaklaşık 20 yılda ikiye katlanacağı, 2030 yılında 75,6 milyon, 2050 yılında 135,5 milyon olacağı öngörülmektedir [15].

2.1.3. Demansın Sınıflandırılması

Demansa yol açan nedenlerin türüne göre primer ve sekonder olarak iki ana kategoride incelenmektedir. Demansın en büyük bölümünü AH'nın da içinde yer aldığı Primer demanslar oluşturmaktadır. Bunlar Merkezi sinir sisteminin nörodejeneratif hastalıklarını kapsar. Beyinde nörodejenerasyonun hangi alanlarda olduğuna, hangi alanların sağlam kaldığına, ilerleme gösterip göstermediğine bağlı olarak farklı klinik tablolar oluşur. Sistemik, nörolojik ya da psikiyatrik bir primer hastalığın seyrinde hastalığın belirtilerine eklenen demans tablosu sekonder demans türlerini oluşturur. Sekonder demansın en sık görülen nedeni vasküler demanstır [16].

Tüm demans türleri arasında en sık rastlanan sebep AH'dır. Bu hastalığın başlangıç döneminde öncelikle yakın bellek bozulurken uzak bellek daha az etkilenmektedir. Zamanla soyut düşünme, lisan, yönetici işlevlerde bozukluk, hezeyan, depresyon, ajitasyon ve halüsinasyon görülebilmektedir. Bu hastalığın 65 yaşından önce görülme sıklığı %1 iken, 65 yaşında %5-%10, 85 yaşından sonra ise %30-%40'tır. Ayrıca hastanın kardeşlerinde yaşam boyu riskin iki kat fazla olduğu bulunmuştur [17].

Tablo 1. Demans Türlerinin Sınıflandırılması [16]

Primer (Dejeneratif)	Sekonder
Alzheimer hastalığı	Vasküler demans
Lewy cisimcikli demans	Multi-infarkt demans
Fronto-temporal demans	Binswanger hastalığı
FTD-davranışsal varyant	Stratejik infarkt demansı
İlerleyici tutuk afazi	CADASIL
Semantik demans	Normal basınçlı hidrosefali
FTD-ALS	Toksik-metabolik demanslar
Hareket bozukluğuyla birlikte	Wernicke-Korsakoff hastalığı
Parkinson hastalığı demansı	B12 vitamin eksikliği
Kortiko-bazal dejenerasyon	Hipotiroidi
Progresif supranükleer paralizi	İlaçlar
Huntington hastalığı	Kronik karaciğer hastalığı
Multi-sistem atrofiler	Organik çözücülere maruz kalma
Wilson hastalığı	İnfeksiyonlar
Nöroakantositoz	Herpes simpleks ensefaliti
Prion hastalıkları	Nörosifilis
Creutzfeldt-Jacob hastalığı	HIV-demans kompleksi
Gerstmann-Sträussler-Scheinker hastalığı	Kronik menenjitler
Fatal familyal insomni	Whipple hastalığı
Çeşitli pedyatrik demanslar	Kafa içi yer kaplayıcı hastalıklar
Kufs hastalığı	Neoplastik durumlar
Metakromatik lökodistrofi	Subdural hematoma
Gaucher hastalığı	Otoimmün-inflamatuar hastalıklar
Niemann-Pick hastalığı	Multipl skleroz
Diğer ender demanslar	Behçet hastalığı
Limbik demans	Paraneoplastik limbik ensefalit
Poliglukoza cisimcik hastalığı	Primer sinir sistemi vaskülit
Arjirofilik tahıl hastalığı	VGKC ve NMDAR kanalopatileri
	Granülomatöz anjitis
	NAIM sendromu

Kısaltmalar: VGKC: Voltaj kapılı potasyum kanalı; NMDAR: N-metil D-aspartat reseptörü; NAIM: Non-vaskülitik otoimmün meningoensefalit.

2.2. Alzheimer Hastalığı

2.2.1. Tanım ve tarihçe

AH özellikle yaşlı popülasyonda görülen, etyolojisi ve patogenezini henüz tam anlamıyla ortaya konamamış, nörodejeneratif bir hastalık olup, demansın en sık nedenidir [18]. AH'nda görülen temel nöropatolojik değişiklikler; diffüz ekstrasellüler amiloid birikimi ile oluşan senil plaklar ve intrasellüler nörofibriler yumaklardır (NFY). Bunlara genellikle reaktif mikrogliozis, nöron ve sinaps kaybı da eşlik etmektedir [19]. AH'ndaki nörodejenerasyonun ilerleyici doğası nedeniyle beynin kortikal bölgelerinde sinaptik yetmezlik ve nöronal hasar olduğu gösterilmiştir [20].

Demans (bunama), antik Yunan ve Roma çağlarından beri bilinen bir kavramdır [21]. Hipokrat günümüzde demans tanısı alabilecek özelliklere sahip hastalar ile ilgili hipotezinde bu hastaların beyin suyunun arttığını ileri sürmüştür [22]. Ancak AH'nın ilk kez tanımlanması bir asırdan biraz daha eskiye dayanır. 1901 yılında Frankfurt akıl hastanesine yatırılan Auguste Deter adlı hasta 5 yıl boyunca progresif hafıza kaybı, halüsinasyon, delüzyon, konuşma ve davranış bozuklukları ile izlenmiştir. Bu hastanın 1906 yılında ölümü sonrası yapılan postmortem beyin incelemesinde Alois Alzheimer, hastalığının patolojik karakteristik bulguları olarak kabul edilen Amiloid beta (A β) plakları ve NFY'ları tanımlamıştır. Bu hastalık önceleri presenil demans olarak adlandırılrsa da Alois Alzheimer'in ölümü sonrası klinik şefi olan Emil Kraepelin tarafından AH olarak adlandırılmıştır [23, 24]. AH ilk tanımlandığı zamandan itibaren presenil demanslar kategorisinde incelenmiştir. Ancak 1977 yılında yapılan bir kongrede, presenil ve senil demansın farklı etyopatogenezleri olsa da, klinik ve patolojik belirtileri benzer olduğundan AH tanımının hastalığın başlangıç yaşından bağımsız olarak kullanılabilmesi konusunda görüş birliğine varılmıştır [25]. 2013 yılında yayınlanan DSM-5'te AH'na bağlı majör nörokognitif bozukluk adıyla anılmaktadır [11].

2.2.2. Epidemiyoloji

AH artan yaşla birlikte giderek yaygınlaşmaktadır ve AH'nin toplam yükü, dünya çapında önemli boyutlara ulaşmıştır [1]. 2011 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde 65 yaş üstü yaklaşık 4,5 milyon Alzheimer hastası olduğu tahmin edilmektedir. Bu sayının 0,7 milyonu 65-74 yaş aralığında, 2,3 milyonu 75-84 yaş aralığında ve 1,8 milyonu 85 yaş ve üzeridir. Bu rakamın 2050 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde 13,8 milyona yükseleceği, dünya çapında ise 100 milyonu aşacağı öngörülmektedir [26]. 2013 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde 450.000 insan AH'nin bir sonucu olarak ölmüştür [27].

İstanbul'da yapılan Türkiye AH Prevalansı Çalışması'nda 70 yaş üzeri kişiler arasında muhtemel AH, toplam AH ve toplam demans oranları sırasıyla %11, %16 ve %20 olarak saptanmıştır. Bu prevalans oranları değerlendirildiğinde Türkiye'de 250-300 bin Alzheimer hastası olduğu varsayılmaktadır [28]. AH'de fiziksel aktivitenin azalması ile yaşam kalitesi olumsuz etkilenmekte ve yaşam beklentisi de azalmaktadır. Gelişmiş ülkelerde evde bakım hizmeti gerektiren hastalıklar arasında AH ilk sırada yer almaktadır. AH 65 yaş ve üstü grupta özürlülük, inme, kas iskelet sistemi ve kardiyovasküler hastalıklardan daha yüksek oranda görülmektedir [29]. AH için devletlerin harcadığı bütçeler artış göstermektedir. AH'nin 2008 yılında sadece Avrupa'da toplam maliyeti 177 milyar doların üzerindedir. Demanslı bir hastanın yıllık bakım maliyeti, ortalama 20 000 dolar olarak tahmin edilmektedir. Bu rakam, kanser veya kardiyovasküler hastalık tanımlı hasta grubunun bakımı için gerekli miktardan daha yüksektir [30]. İlerleyen yıllarda AH ile ilişkili bakım hizmetlerinin sağlık sistemine benzeri görülmemiş zorluklar sunması beklenmektedir [26].

2.2.3. Risk Faktörleri

Diğer kronik hastalıklarda olduğu gibi AH da tek bir sebepten değil birçok faktörden etkilenmektedir.

2.2.3.1. Yaş

Değiştirilmesi mümkün olmayan en önemli risk faktörüdür. Tüm dünyada ortalama yaşam beklentisi giderek artmaktadır. Gelişmiş ülkeler başta olmak üzere, tüm dünyada yaşlı nüfusun genel nüfusa oranı giderek artmakta ve bu durum AH'nin önemini daha da arttırmaktadır. Altmış beş yaşın üzerinde her beş yılda bir prevalans iki katına çıkmaktadır. Doksanlı yaşlardan sonra AH prevalansının plato çizdiği ileri sürülmekte ise de hastalığın görülme sıklığının artmaya devam ettiğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. AH yaşlanmanın doğal bir süreci olmadığı gibi, yaşlanma tek başına hastalık sebebi de değildir [28, 31].

2.2.3.2. Cinsiyet

Yapılan çalışmaların birçoğu AH prevalansının kadınlarda erkeklerden daha fazla olduğuna işaret etmektedir. Bu prevalans farklılığının kesin nedeni belli olmasa da çoğunlukla kadınlarda beklenen yaşam süresinin daha uzun olmasıyla açıklanmaktadır. Bunun yanı sıra beyinde nörotrofik bir faktör olan östrojen hormonu menapoz sonrası dönemde çok azalarak bu işlevi yeterince yapamamaktadır. Erkeklerde ise testosteron hormonu beyinde östrojene çevrilerek nörotrofik etkinlik sergilemektedir. Kadınlardaki yüksek prevalans nedenini açıklayan durumlardan biri de post menapozal dönemde bu nörotrofik faktörden yoksun kalmaları olabilir. Bununla ilintili olarak epidemiyolojik çalışmalarda menapoz sonrası dönemde östrojen takviyesi alan kadınlarda almayanlara göre demans prevalansının daha düşük olduğunun gösterilmesi bu varsayımı desteklemektedir [16]. Framingham çalışmasında AH için tahmin edilen yaşam boyu risk oranı 65'li yaşlardaki kadınlarda %17,2 erkeklerde %9,1 olarak saptanmış, risk oranının ilerleyen yaşlarda da kadınlarda yüksek seyretmeye devam ettiği gösterilmiştir [32].

2.2.3.3. Düşük Eğitim

Düşük eğitim düzeyinin hangi mekanizma ile demans riskini artırdığı net olarak bilinmemektedir. Yüksek eğitim düzeyine sahip bireylerin kognitif rezervinin

daha geniş olduğu, bu nedenle hastalığın ortaya çıkış eşiğininin daha yüksek olduğu ileri sürülmüştür [16].

2.2.3.4. Aile Öyküsü

AH aile öyküsü, bir bireyde bu hastalığın gelişmesi için şart değildir. Bununla birlikte anne, baba ya da kardeşlerinde Alzheimer hastası olan kişilerde bu hastalığa yakalanma riskinin birinci derece akrabalarında AH olmayanlardan daha fazla olduğu bildirilmiştir [33].

2.2.3.5. Kafa Travması Öyküsü

Biyolojik mekanizması henüz aydınlatılamamış olsa da bilinç kaybına yol açacak kadar şiddetli kafa travmalarının bir risk faktörü olduğu bilinmektedir [34]. Travmanın nöronal hasara sebep olduğu, nöronal hasarın ve o bölgede oluşan ikincil inflamasyonun A β birikimine ve amiloid plak (AP) oluşumuna neden olduğu düşünülmektedir [35].

2.2.3.6. Yaşam Tarzı ve Aktivite

Sosyal, zihinsel ve fiziksel aktivite olmak üzere 3 yaşam tarzı komponenti tanımlanmıştır. Sosyal, zihinsel ve fiziksel olarak pasif yaşamının AH ve diğer demanslarda artış ile yakından ilişkili olduğu çalışmalarda gösterilmiştir [36].

2.2.3.7. Kardiyometabolik Risk Faktörleri

AH'nda histopatolojik olarak aterosklerotik değişiklikler, mikroenfarktlar, mikrovasküler değişiklikler, amiyloid anjiopati, diffuz beyaz cevher hasarı gibi vasküler değişiklikler sıklıkla görülmektedir [37]. Hipertansiyon [38], miyokard iskemisi, ateroskleroz, diyabet [39] hiperkolesterolemi [40], Apolipoprotein E (ApoE) ϵ 4 etkileşimi [33], sigara içimi [41], alkol kullanımı [42], serebrovasküler olay öyküsü [43], atrial fibrilasyon [44] ile metabolik sendrom [45] varlığında AH riskinin anlamlı olarak arttığına dair yayınlar bulunmaktadır

2.2.3.8. Diğer Risk Faktörleri

Homosistein yüksekliği [46], yağdan zengin diyet, post menopozal östrojen kullanımı [47], periferik işitme kaybı [48], D vitamini eksikliği [49], inflamasyon [50], tıbbi hastalıklar ve hospitalizasyon [51], Obstrüktif uyku apnesi [52], Çeşitli toksinler [53], antikolinerjik ilaçlar [54], depresyon öyküsü [55], Yüksek ve düşük hemoglobin düzeyleri [56] yer almaktadır.

2.2.4. Koruyucu Faktörler

2.2.4.1. Diyet

Balık, sebze ve meyvelerde yüksek miktarda bulunan ve antioksidan özelliğe sahip çok zincirli doymamış yağ asitleri (PUFA) tüketiminin AH riskini, hafif kognitif yıkımı ve yaşla ilişkili kognitif etkilenmeyi azalttığı bildirilmiştir [57].

Tek zincirli doymamış yağ asiti içeren zeytinyağı, balık, bitkisel gıdalar, hafif düzeyde kırmızı et içeren Akdeniz tipi beslenmenin AH ve hafif kognitif etkilenme riskini azalttığı öne sürülmektedir [58].

Antioksidan özellik gösteren selenyum, vitamin E ve C kullanımının AH riskini azalttığı, yaşlılarda diyete vitamin (folat, Vitamin C, E, beta karoten) takviyesinin kognitif kapasiteyi artırdığı öne sürülmüştür. Karoten ve vitamin C'nin lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etki yaparak hücre ölümünü engellediği bildirilmiştir [59].

2.2.4.2. Fiziksel Aktivite

Çalışmalar, yapılan egzersizin türüne bağlı farklı mekanizmalar vasıtasıyla kognitif fonksiyonları düzelttiğini ileri sürmüşlerdir. Örnek olarak Aerobik fitness, serebral kan akımını, oksijen tüketimini, glikoz kullanımını arttırabilir, kapiller dansite artışı gibi yapısal beyin değişikliklerini uyaran büyüme faktörlerini indükleyebilir, AP oluşum hızını azaltabilir [59].

2.2.4.3. Entellektüel Aktivite

Yüksek eğitim düzeyine sahip bireylerin demans sürecinin erken evrelerinde, kognitif bozukluğun günlük yaşamı olumsuz etkilemesini birtakım telafi yöntemleri kullanarak önleyebildikleri buna bağlı olarak demans belirtilerinin daha geç ortaya çıktığı da ileri sürülmüştür [31].

Gençlerde ya da yaşlılarda öğrenme, okuma, oyun oynama gibi kognitif fonksiyonları indükleyen aktivitelere yönelmenin demans riskini azalttığı bildirilmiştir [60].

2.2.5. Genetik

Alzheimer hastalığı mendelyan yasaların etkisinde basit genetik geçişli olmayıp, genetik ve çevresel faktörlerin bir araya geldiği kompleks bir etkileşim sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır. AH'nın genetik özellikleri iki ayrı grup halinde incelenebilir. Birinci grup nadir görülen mutasyonlara bağlı oluşan otozomal dominant (OD) geçişli ailevi AH'dır. Bu hastalar çoğunlukla erken başlangıçlı AH ile birliktelik gösterir. İkinci grup ise sporadik AH'na neden olabilecek genetik risk faktörleri ile ilişkilidir.

2.2.5.1. Otozomal Dominant AH

OD geçişli AH 65 yaşından erken ortaya çıkmakta ve bu nedenle erken başlangıçlı AH alttüründe sınıflandırılmaktadır. Altmış beş yaşından sonra ortaya çıkan AH olguları ise geç başlangıçlı AH olarak adlandırılır [61]. Erken başlangıçlı Alzheimer hastalarında aile öyküsü %60 oranında vardır. OD geçişe sahip 3 gen tanımlanmıştır. Bunlar; Amiloid Prekursor Protein (APP), Presenilin 1 (PSEN 1) ve Presenilin 2 (PSEN 2) genleridir. Bu genler, APP'den metabolize edilen A β proteininin atılmayarak AP'lar içinde biriken daha uzun şekli olan A β 42 peptid artışına neden olarak etkili olurlar. Bu 3 spesifik genden herhangi birinde oluşan mutasyonlara bağlı olarak oluşan olgular tüm olguların % 1 veya daha azını oluşturur [62].

2.2.5.2. Sporadik AH

Olguların büyük bir çoğunluğunu oluşturur. Genellikle 65 yaş üstünde ortaya çıkmaktadır. ApoE'nin geç başlangıçlı AH için önemli bir risk faktörü olduğu düşünülmektedir. ApoE lipoprotein metabolizmasında düzenleyici olarak işlev görür. ApoE geninin E2, E3 ve E4 olmak üzere 3 alleli bulunur. ApoE, merkezi sinir sisteminde kolesterol taşınması, nöroplastisite ve inflamasyonda görev almaktadır. ApoE4'ün, A β 'ya bağlanmak suretiyle çözülebilir A β 'nın klirensini ve plak oluşumunu etkilediği düşünülmektedir. ApoE genotipi ile A β 42 ve tau düzeyleri arasında ilişki olduğu bildirilmiştir [18, 63]. Apo E4'ün bir kopyasını kalıtanlarda (heterozigot) 3 kat risk artışı varken, E4 formunun her iki kopyasını kalıtanlarda (homozigot) 8-12 kat risk artışı vardır [33]. Apolipoprotein E2 allelinin ise koruyucu etkisi olduğu düşünülmektedir [64].

2.2.6. Evreleme

Günümüzde de hala geçerliliğini koruyan iki klinik evreleme sistemi mevcuttur.

Bunlar Reisberg ve arkadaşları tarafından 1982'de yayınlanan "Global Bozulma Ölçeği" (Global Deterioration Scale-GDS) ve Hughes ve arkadaşları tarafından 1982'de yayınlanan "Demansın Klinik Evrelendirilmesi" (Clinical Dementia Rating Scale-CDR)'dir. GDS, AH için özgül olduğundan diğer demans türlerinde kullanılması uygun değildir. GDS evreleri 1-7 arasında değişir. GDS1, hiç yakınması ve bulgusu olmayan normal yaşlıya, GDS2; Yaşla ilişkili bellek bozukluğuna, GDS3; Hafif Kognitif Bozukluğa (HKB) karşılık gelir. GDS 4-5-6-7-ise sırasıyla hafif, orta, ağır ve çok ağır olarak AH'nı evrelendirir [65].

CDR ise yaygın olarak kullanılan başka bir ölçektir. CDR'de bellek yine merkezi önemde olmakla birlikte, çok eksenli tasarımıyla diğer demansların evrelenmesinde de kullanılabilmesi ile GDS'den farklılık gösterir. CDR 0, yaşla ilişkili bellek bozukluğunu da kapsayacak şekilde normal yaşlılığa karşılık gelir. CDR 1, 2 ve 3 sırasıyla hafif, orta ve ağır demans evreleridir [66].

2.2.7. Tanı Ölçütleri

Günümüzde AH için yaygın olarak kullanılan 2 farklı tanı sistemi mevcuttur. Bunlardan biri 2011 yılında yayınlanan National Institute on Aging and Alzheimer's Association (NIA-AA) tanı ölçütleri iken diğeri 2013 yılında yayınlanan DSM-5 sınıflandırma sistemidir.

1984 yılında yayınlanan National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ARDRA) tanı kriterleri AH tanısı için o tarihten beri yaygın olarak kullanılsa da son yıllarda bilimsel ve teknolojik gelişmeler sonucunda AH'nin nörobiyolojisi ve genetik mekanizmaları daha iyi anlaşılmış bu nedenle görüntüleme teknikleri ve biyobelirteçlerin tanıda belirleyici rol oynadığı NIA-AA tanı kriterleri 2011 yılında yayınlanmıştır [67].

NINCDS-ARDRA tanı kriterlerine göre AH üç gruba ayrılmaktaydı. Bunlar; Muhtemel AH, mümkün AH ve otopsi sonucuna bağlı tanı konabilen kesin AH tanılarıyla. NIA-AA kriterlerine göre AH için prelinik/preseptomatik (AH-P), AH'na bağlı HKB (AH-HKB) ve AH'na bağlı demans (AH-D) olmak üzere 3 dönem kabul edilmiş, bu üç evreye özgü 3 farklı kriterler dizisi tanımlanmıştır [68].

NINCDS-ARDRA evrelendirme sisteminden farklı olarak AH'nin hafif evreden daha önce başladığı vurgulanmaktadır. Teknolojik gelişmeler ile hafif evre öncesi meydana gelen erken değişiklikler saptanabilmektedir. Burada biyoişaretleyicilerin önemli olduğu ve tanıda spesifiteyi arttıracakları belirtilmiştir [69]. Biyoişaretleyiciler iki grupta incelenmektedir

A β birikimi yani amiloidoz işaretleyicileri: BOS A β 42 düzeylerinde düşme ve PET ile amiloid görüntülemeye serebral amiloid yükünün artması [69].

Nörodejenerasyon işaretleyicileri: BOS'ta yüksek tau ve fosfo-tau düzeyleri, florodeoksiglukoz-PET ile posterior singulat, precuneus ve temporoparietal hipometabolizma, MR'da temporoparietal atrofi [69]. Bu erken değişiklikler tespit edildiğinde yeni oluşturulan kriterler ile hastanın AH-P veya AH-HKB sürecinde olup olmadığı belirlenebilecektir. AH-D evresi ise kendi içerisinde hafif, orta ve ileri AH olarak sınıflandırılmaya devam etmektedir [67].

Alzheimer Hastalığına bağlı Major Nörokognitif Bozukluk DSM-5 tanı kriterleri
A. Bir veya daha fazla bilişsel alanda önceki performans düzeyinden anlamlı bilişsel gerileme kanıtı olması.
Öğrenme ve bellek.
Dil.
Yürütücü işlev.
Karmaşık dikkat.
Algısal-motor.
Sosyal biliş
B. Bilişsel bozukluklar günlük faaliyetlerdeki bağımsızlığı engelleyebilir. En azından, fatura ödeme ya da ilaç yönetimi gibi günlük yaşamın kompleksi enstrümental faaliyetlerinde yardıma gereksinim duyulmalıdır.
C. Bilişsel bozukluklar, bir deliryum bağlamında özel olarak ortaya çıkmaz.
D. Bilişsel bozukluklar diğer ruhsal bozukluk tarafından daha iyi açıklanmamıştır. (örneğin, major depresif bozukluk, şizofreni)
E. En az iki bilişsel alandaki bozulma sinsi başlangıçlıdır ve kademeli ilerleme sergiler.
F. Aşağıdakilerden herhangi biri
Aile öyküsü veya genetik test sonucu Alzheimer hastalığı'na sebep olan bir genetik mutasyonun kanıtı.
Aşağıdakilerden her üçü mevcuttur:
1) Bellek ve öğrenme ve en az bir diğer bilişsel alanda gerileme olduğunun açık bir kanıtı.
2) Bilişte, uzun süreli duraksama olmaksızın, sürekli ilerleyen aşamalı gerileme
3) Karışık etyoloji olduğuna dair kanıt yoktur (yani, diğer nörodejeneratif bozuklukların veya serebrovasküler hastalıkların, ya da muhtemelen bilişsel gerilemeye katkıda bulunan başka bir nörolojik, zihinsel ya da sistemik hastalık veya durumun olmaması).

2.2.8. Klinik Seyir

AH'da dejeneratif süreç ilk önce hipokampuslar ve entorhinal kortekste başlar. Bu bölgeler bellek işlevinin yürütülmesinde görevli oldukları için ilk bozulan kognitif fonksiyon bellektir. Hastalığın ilerlemesi ile dejenerasyon ön ve arka multinodal assosiasyon kortekslerine doğru yayılım gösterir. Temporoparietal kortekste yer alan arka asosiyasyon korteksi karmaşık görsel-mekansal becerilere, prefrontal kortekste yer alan ön asosiyasyon korteksi ise karmaşık dikkate ve yönetici işlevlere aracılık eder. Dejenerasyonun bu bölgelere yayılımı ile bu becerilerde ve

işlevlerde giderek artan bozulmalar gözlenir. Araştırmalar sonucunda AH'na bağlı patolojik değişikliklerin klinik bulgular ortaya çıkmadan 15-20 yıl önce başladığına dair kanıtlar bulunmuştur [70-72].

2.2.8.1. AH Klinik Evreleri

Preseptomatik dönem, prelinik dönem (AH-P), hafif kognitif bozukluk (AH-HKB), hafif AH, orta dönem AH ve ağır dönem AH olarak 6 gruba ayrılabilir.

2.2.8.1.1. Preseptomatik Dönem

AH sinsi bir seyir göstermektedir ve beyinde yıllar içinde çok yavaş ilerleyen patolojik bir süreç vardır. Bu dönemde kişide herhangi bir mental veya davranışsal semptom, günlük aktivitelerde bozulma, performansta azalma söz konusu değildir. Böyle bir evrenin varlığı, antemortem değerlendirmede gözlenebilen ya da ölçülebilen herhangi bir klinik kayıp olmayan kişilere yapılan postmortem beyin otopsilerinde karakteristik AH lezyonlarının gösterildiği bir dizi patoloji serisi ile desteklenmektedir [73].

2.2.8.1.2. Prelinik Dönem

Bu evrede kognitif performanstaki testler ile saptanabilen ve özellikle bellek ile ilişkili kolaylıkla fark edilemeyen kayıplar vardır. Bu kişilerde karar verme gücü de görülebilir. Ancak bu kayıplar günlük yaşam aktivitelerinde herhangi bir aksamaya neden olmaz [74].

2.2.8.1.3. Hafif Kognitif Bozukluk

Hafif düzeyde unutkanlık, yeni bilgiler öğrenme ve hafızaya almada zorluk, konsantrasyon azlığı, karar verme yeteneğinde zayıflama günlük, sosyal ve mesleki işlevsellikte azalma, ikili ilişkilerde bozulma, anksiyete belirtileri olmasına rağmen mini mental test skorlarında (SMMT) bir düşüş yoktur. Kişilikte hafif değişiklikler görülebilir. Hastalar hafif bellek sorunlarından şikayetçi olsalar da bilişsel

fonksiyonları normal sınırlardadır. Nöropatolojik hasar belli bir eşik değeri aşmadığı sürece klinikte belirgin demansa neden olmaz [16].

Klinik tablonun şiddetine göre hastalık erken, orta ve ileri olmak üzere üç evreye ayrılabilir.

2.2.8.1.4. Erken Dönem Alzheimer Hastalığı

Yakın bellek bozukluğu ve yeni bilgiler öğrenmekte zorlanma bu dönemin önemli özellikleridir. Eşyaların yerlerinin karıştırılması, isim unutkanlıkları, konuşmaların tekrarlanması, soruların tekrar tekrar sorulması, alışveriş listesinin unutulması, yemek yaparken tencerenin ocakta unutulması, anahtarın evde unutulup dışarı çıkılması, konuşurken kelime bulma güçlükleri, bulaşık makinesi, cep telefonu, bilgisayar gibi kullanımı kısmen karmaşık olan cihazların kullanımının öğrenilememesi, varsa hobilerin gerçekleştirilmesinde güçlükler hastalığın bu evresinin genel özellikleridir. Bu evrede hastanın bağımsızlığı halen korunmuştur. Sosyal aktiviteler katılımında sorun yaşanmaz. Kişisel bakımını yerine gerirebilmektedir. Mental durum muayenesinde belleğin kayıt fazının genellikle korunduğu, geri çağırma ve tanıma fazının ise bozulduğu görülür. Dikkat, planlama, akıl yürütme gibi yürütücü işlevlerde hafif bozulmanın yanı sıra kelime bulma güçlüğü ile saptanan dil bozukluğu görülebilir. Yakınmaların farkında olan bazı hastalarda reaktif depresyon gelişebilir. Hafif evre AH'de SMMT skoru 20-24 arasında olabilir [16].

2.2.8.1.5. Orta Dönem Alzheimer Hastalığı

Başlangıç belirtilerinin giderek ağırlaştığı, günlük yaşam aktivitelerindeki bağımsızlığın birçok alanda kaybedildiği saptanır. Yeni bilgi öğrenme işlevi tamamen durmuştur. Daha önce kayıt altına alınmış bilgiler de, geriye dönük bir kronolojik seyirle, kaybolmaya devam etmektedir. Ev dışında yalnız başlarına dolaşamazlar. Yalnız dışarı çıktıklarında kaybolabilirler. Alışveriş yapma, parasal işlerin idare edilmesinde ciddi sorunlar yaşanır. Kıyafetleri değiştirme, banyo yapma ya da banyo zamanına karar vermede, tuvalet ihtiyacının giderilmesinde ciddi yardım gerekir. Yemek yerken etrafa dökülebilir. Dilsel işlevlerdeki bozulmalar ilerlemiş,

tutarlı bir sohbeti sürdürmeyi engelleyecek düzeye ulaşmıştır. Zaman yöneliminde bozulmalar, gece-gündüz ayrımının bozulması, uyku-uyanıklık döngüsünde bozulma görülür. Bu evrede ajitasyon, yerinde duramama, bakım verenlere fiziksel müdahale, suçlayıcı davranışlar, şüphecilik gibi psikiyatrik belirtiler de ortaya çıkar. SMMT skoru 10-19 arasında değişir [16].

2.2.8.1.6. Ağır Dönem Alzheimer Hastalığı

Hasta en temel günlük yaşam aktivitelerini dahi sürdüremez ve sürekli bir başkasının yardımına gereksinim duyar. Beslenme, yıkanma, giyinme gibi temel işlevlerinde tamamen başkalarına bağımlı hale gelmiştir. Zihinsel işlevler en alt düzeye inmiş; bellekte sadece parçacıklar kalmıştır. Yakın akrabalarını, hatta aynada kendisini bile tanıyamaz duruma gelebilir. Konuşmaları anlam bütünlüğünü kaybetmiş kelimeler ya da seslerden ibarettir. Amaçlarını ve isteklerini ifade etmeleri neredeyse olanaksızlaşır. Belirgin sfinkter kusuru nedeniyle genellikle bez bağlanması gerekir. Tekrarlayıcı, amaçsız motor davranışlar görülebilir. Evrenin sonuna doğru hastalar yatağa bağımlı hale gelirler. SMMT skoru 0-9 arasındadır [16].

2.2.9. Etyoloji, Patoloji ve Patofizyoloji

AH'nın etyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte birçok nörodejeneratif hastalık gibi genetik yatkınlık ve çevresel etkenlerin etkisi altında olduğu düşünülmektedir.

AH'nın makroskopik patoloji incelemeleri, özellikle korteks ve hipokampuste hücre ve sinaps kaybına bağlı yaygın neokortikal atrofi olduğunu gösterir. Hastalığın histopatolojik bulguları olarak, Meynert'in nükleus bazalisi, hipokampus ve asosiyasyon korteksi alanlarında kolinerjik nöron kaybı olduğu, hücre içinde NFY birikimi olduğu, hücre dışı yerleşimli AP'lar, granülovakuolar dejenerasyon ve sinaptik kayıplar olduğu saptanmıştır [75, 76].

Seçilmiş hasta örneklerinde yapılan çalışmalarda, kortikal amiloid birikimi [77], gri madde atrofisi [78], hipometabolizma [79] ve yapısal [80] ve işlevsel [81]

kortikal ayrılma gibi AH'na özgü görüntüleme anormallikleri gösterilmiştir. Bu bulgular güvenilir bir şekilde, hafif ve orta derecede demans aşamalarını hem normal yaşlanma bunaması hem de diğer nörodejeneratif demanslardan ayırt etmek için kullanılabilir [82].

AH'na neden olan patofizyolojik süreçler halen kesin olarak belirlenmiş değildir. Bununla birlikte hastalığın gelişimine eşlik eden bazı nöropatolojik değişiklikler tanımlanmıştır. Bunlar:

- Amiloid Birikimi ve AP oluşumu.
- Tau Hiperfosforilasyonu ve Nörofibriler Yumak (NFY) Oluşumu
- Gliyozis ve inflamasyon
- Nöron ve sinaps kaybı
- Mitokondrial fonksiyon bozukluğu
- Kolinerjik inervasyon ve diğer nörotransmitterlerin kaybı
- Oksidatif stres

olarak başlıklar halinde sunulabilir

2.2.9.1. Amiloid Birikimi ve AP Oluşumu

Amiloid kaskad hipotezine göre çevresel faktörler, hücre yaşlanması ya da genetik mutasyonlar sonucunda bir membran proteini olan APP'in yıkım süreci değişmektedir [74].

A β peptid (40-42 aminoasit içerir) AP'ların esas bileşeni olan büyük bir membran proteindir. On dokuzuncu kromozomda kodlanan APP'in α , β ve γ sekretazlar gibi proteolitik enzimlerce kesilmesi sonucu oluşur. α -sekretazlar APP'i orta noktalarından keserek hücre dışında, çözünebilir olan ve herhangi bir beyin patolojisine sebep olmayan APP parçası ortaya çıkarırlar. β ve γ sekretazlar ise çözünlüğü olmayan, AP'ların oluşumuna yol açan farklı aminoasit uzunluklarına sahip A β 'lar oluşturmaktadır. Amiloid β 40 ve A β 42 en yaygın görülen formlardır. Her iki formda toksik olmasına rağmen A β 42'nin çözünmediği ve AP'larda biriktiği

ve böylece nöronal sitotoksisite nedeniyle beyinde nörodejenerasyona yol açtığı kabul edilmektedir [83]. Amiloid β 42 başlangıçta monomer halde olup monomerlerin oligomerizasyonu esnasında oligomer, protofibril ve fibril gibi daha büyük ve daha sağlam formlara oligomerize olur. Oligomerizasyon esnasında bu elementleri β tabaka yapısında fibriller forma dönüştüren konformasyonel değişiklikler de meydana gelir. Amiloid β nın tüm ara ürünleri ve olgun fibriller nörotoksiktir. Tüm bu ürünler ekstraselüler ortamda birikmektedir. Takiben diffüz plaklar halinde agregate olup nöritik plaklara dönüşmektedir. Amiloid birikimi arttıkça BOS amiloid düzeyleri düşer. Amiloid birikimini takiben hücre içi tau proteini hiperfosforile olup agregasyona başlar [84, 85].

2.2.9.2. Tau Hiperfosforilasyonu ve NFY Oluşumu

AH'nın patogeneğinde yer alan ikinci protein "Tau" diye adlandırılır. Tau, mikrotübüllerin stabilizasyonunda, hücre iskeletinin bütünlüğünün korunmasında, aksonal transportta rol oynayan mikrotübüllere bağlı bir proteindir. AH gelişiminde tau, hiperfosforile olur ve mikrotübüllere bağlanma kapasitesi azalır. Bağlanmayan tau proteini, çift sarmallı lifler (PHF) halinde nöron sitoplazması içinde çökerek NFY'ların major bileşenini oluşturur. Bu değişmiş protein birikiminin, deneysel modellerde nöronlar için toksik olduğu gösterilmiştir. Oksidatif stres artışının proteozom aktivitelerini bozarak hatalı proteinlerin otofaji ile temizlenmesini engellediği böylece nöronlarda hasara yol açtığı bildirilmiştir [86-89].

AH'nda görülen nöropatolojik değişiklikler hastalığın evresine göre değişiklikler gösterir. Bu konuda ileri sürülen bir modelde NFY'ların başlangıçta özellikle entorhinal bölgede yerleşim gösterdiği, sonra paralimbik bölgeye ve hipokampusu ve son olarak da isokortikal bölgeye (neokorteks) uzandığı bildirilmektedir. Entorhinal dönem epizodik bellekte kayıp ile karakterizedir. Limbik dönemde sözel beceriler, görsel uzamsal fonksiyonlar bozulmakta, isokortikal dönemde ise primer bellek bozukluğu ortaya çıkmaktadır [90].

2.2.9.3. Gliyozis ve inflamasyon

İnflamasyon; organizmanın stres, yaralanma, travma ve enfeksiyon gibi çeşitli endojen veya eksojen uyaranlara cevap olarak başlattığı yaşamın devamı için gerekli ancak spesifik olmayan bir yanıttır [91]. Genetik etkilerin ve çevresel faktörlerin kombinasyonu beyinde enflamasyona yol açarak nöronal hücre ölümü ve ilerleyici demansa yol açmaktadır [92].

AH patogeneğinde inflamasyonun önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir. NFY ve AP'lar, astroglial ve mikroglial hücreleri uyarak klasik proinflamatuvar yanıtı uyarır. Böylece plakların çevresinde akut faz proteinleri, kompleman elemanları, sitokinler, proteazlar, nörotransmitterler, reaktif oksijen türleri (ROS) ve NO gibi inflamasyonda rol alan birçok madde birikir. Bu inflamatuvar maddelerin katılımı ile gevşek AP'lar katı nöritik plağa dönüşür. Hem plağın kendisi hem de oluşan inflamatuvar yanıt nöronun iyonik ve metabolik dengesini bozarak ve oksidatif stres oluşturarak nöron hasarına yol açar. İnflamasyon özellikle beyin savunmasız alanlarında oluşmaktadır. NSAİ ilaçların koruyucu etkisinin altında yatan sebebin de bu ilaçların inflamasyonu engelleme işlevi görmeleri olduğu düşünülür. Bu durum inflamatuvar süreçlerin ve glial aktivasyonun AH patogeneğinde önemli rol oynadığı ya da oluşmuş hastalığın ilerlemesine katkı sağladığını düşündürmektedir [93-95].

2.2.9.4. Nöron ve Sinaps Kaybı

Sağlıklı bir yetişkin beyinde yaklaşık 100 milyar nöron ve 100 trilyon sinaps bulunmaktadır. Sinapslar, sinyallerin beyin nöronal devreleri üzerinde hızla iletilmesini sağlamaktadır. AH'nda, sinapslarda bilgi aktarımı bozulmaya başlar, sinaps sayısı azalır ve nöron kaybı olur. β amiloid birikiminin sinapslarda nöronlar arası iletişimi bozduğuna ve hücre ölümüne katkıda bulunduğuna inanılmaktadır. Tau yumaklarının, nöronlar içinde besin ve diğer temel moleküllerin taşınmasını engellediği ve aynı zamanda hücre ölümüne katkıda bulunduğu düşünülmektedir. İlerlemiş AH'na sahip insanların beyinleri, ölmüş ve hasar görmüş nöronlar nedeniyle atrofiye uğramaktadır[96].

2.2.9.5. Kolinerjik Hipotez

AH'nın patofizyolojisi ile ilgili hipotezlerden biri de günümüzdeki ilaç tedavilerinin de hedefinde olan kolinerjik hipotezdir. Buna göre, hastalıkta gözlenen belirtilerin bir kısmı azalmış asetilkolin (ACh) sentezine bağlıdır. Korteks ve hipokampusa kolinerjik projeksiyon temel limbik yapılardan biri olan bazal ön beyindeki Meynert çekirdeğinden sağlanır. AH'da görülen kortikal kolinerjik eksikliğin nedeni, bazal ön beyin kolinerjik nöronların nörodejenerasyonudur. Kolinerjik eksikliğin kognitif yetileri azalttığı düşünülmektedir. Kortikal kolinerjik eksikliğin dikkat bozukluğuna yol açtığı, hipokampal kolinerjik girdi azalmasının ise bellek bozukluğu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir[97].

Serebral korteks ve hipokampusta ACh sentezi için görevli olan asetilkolin transferaz enzim aktivitesi %50-90 azalmıştır [17]. AH'nda öğrenme ve bellek üzerine etkileri olduğu bilinen nikotidik reseptörlerde ve presinaptik M2 muskarinik reseptörlerde kayıpların olduğu, postsinaptik M1 muskarinik reseptörlerin yoğunluğunda ise değişim olmadığı bildirilmiştir [98].

AH'da meydana gelen kolinerjik kayıp AP oluşumuna katkı sağlarken, oluşan β amiloid de kolinerjik kaybı arttırmakta ve kısır bir döngü ortaya çıkmasına neden olmaktadır [99].

Asetilkolinesteraz (AChE) enzim inhibitörleri, kolinerjik eksikliğin klinik tablo ile ilişkisi nedeniyle asetilkolinin intrasinaptik yıkılımını geciktirmekte ve sinaptik boşluktaki ACh seviyesini artırarak etkisini uzatmaktadır. Bu nedenle hastalığın semptomatik tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır [100].

2.2.9.6. Glutamaterjik Hipotez

Beynin ana eksitatör nörotransmitteri olan glutamat, presinaptik ve postsinaptik reseptörlerle fizyopatogenezde etkili olur. Postsinaptik NMDA reseptörlerinin aktivasyonu ile artan glutamat, voltaj kapılı kalsiyum kanallarını aktive ederek endoplazmik retikulumdan hücre içine toksik oranda kalsiyum salınmasına neden olur. Ayrıca glutamat APP üretimini artırarak plak ve yumak oluşumunu da indükler [101].

2.2.9.7. Mitokondriyal Fonksiyon Bozukluğu

A β mitokondri üzerine potent etkili bir toksin olup, beyinde ve mitokondri içindeki öncelikle sitokrom c oksidaz olmak üzere bazı enzimleri inhibe eder [102]. Böylece mitokondri membran potansiyelleri, elektron transportu, ATP üretimi, oksijen tüketiminde bozulmalar meydana gelir [103]. Mitokondri içinde süperoksit radikalleri oluşur, hidrojen peroksit dönüşür ve oksidatif denge bozulur oksidatif stres egemen hale gelir, sitokrom c salınır ve aktive proteaz kompleksi oluşur, kaspaz aktivasyonu takiben fagositoz başlar nükleer kromatin yoğunlaşması ve fragmentasyonu ile sonuçlanacak olan apoptotik hücre ölümü gerçekleşir [104].

2.2.9.8. Oksidatif Stres

Oksidatif stres; ROS ile antioksidan savunma sistemleri arasındaki dengenin reaktif oksijen türleri lehine bozulması sonucu oksidan ajanların zararlı etkilerinin ortaya çıkması anlamına gelmektedir. Reaktif oksijen ürünlerinden olan superoksit radikali, hidrojen peroksit (H₂O₂) ve hidroksil radikali gibi hemoglobin ve poliansatüre yağ asitleri ile otooksidasyon ile sürekli üretilir [105]. Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme dengenin bozulmasına neden olur. Oksidatif stres olarak adlandırılan bu durum özetle, serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermektedir [106]. Nörodejeneratif hastalıklar (demans gibi), kanser, diabetes mellitus ve ateroskleroz gibi birçok patolojik durumla ilişkili olan serbest radikallerin en zararlı biyolojik etkisi, hücre membranı yağ asitlerine ve lipoproteinlere saldırması, lipoprotein oksidasyonu (LPO) olarak bilinen bir reaksiyon zincirini başlatarak, membran proteinlerine hasar verip yapısal ve işlevsel bozukluklara neden olmasıdır [107]. Ayrıca protein, karbonhidrat ve Deoksiribo nükleik asit (DNA) gibi biyomoleküller ile etkileşerek hücrede yapısal ve metabolik değişikliklere neden olmaktadır [108].

Özetle AH farklı patofizyolojik süreçlere sahip, genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi ile ortaya çıkan, A β ve plak oluşumu ile başlayıp, NFY oluşumu ile devam eden ve oksidatif hasar, sinaptik kayıp, inflamatuvar yanıt sonrası gerçekleşen önlenemez apoptotik nöron ölümü ile sonlanan; makroskopik göstergesi serebral atrofi olan kompleks bir oluşum sürecine sahiptir [101]. Hastalığın tedavisinin gerçekleştirilebilmesine yönelik farklı patofizyolojik mekanizmaları hedefleyen çeşitli ajanlar denenmiş ve halen yenileri denenmeye devam etmektedir.

2.3. Oksidatif Stres ve AH

Oksidatif stresin AH'nın patogeneğinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. AH'ndaki patolojinin ortaya çıkmasında en çok kabul gören hipotezlerden biri mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stresin ortaya çıkışıdır [2].

Beyin, vücut ağırlığının %2'sini oluşturmasına rağmen toplam O $_2$ 'in %20'sini kullanmaktadır. Buna ek olarak otooksidasyona yatkın doymamış yağ asitleri ve katekoleminler açısından zengin olması oksidatif strese karşı hassas bir zemin oluşturur. Serbest radikaller yaşlılıkta ve nörodejeneratif süreçlerde DNA, lipidler, proteinler ve karbonhidratlarda oksidatif hasara yol açmaktadır. Serbest radikaller, sitoplazmada ve hücre içi organel membranlarında lipid peroksidasyonunu neden olur. Özellikle sistein sülfidril gruplarını okside ederek, proteinlerdeki amino asit kalıntılarının yıkılmasına sebep olurlar. Karbonhidratlarda otooksidasyona yol açarak, süperoksit, H $_2$ O $_2$ ve reaktif oksaldehydlerin oluşumunu başlatırlar. Nükleer ve mitokondriyal DNA'da da oksidatif hasar meydana getirirler [109-112].

AH'nın karakteristik nöropatolojik ve nörokimyasal nedenleri iyi tanımlanmış olsa da etyolojisi tam olarak aydınlatılmamıştır ve bu durum tedavisini zorlaştırmaktadır. Nöronlar gibi yüksek metabolik aktiviteye sahip özelleşmiş hücrelerde, günlük yaklaşık 10^{11} reaktif oksidatif ürünün serbest radikal olarak üretildiği tahmin edilmektedir [113, 114].

Beyin, artmış oksijen ihtiyacı, poliansature yağ asitlerinin yüksek seviyeleri ve antioksidanların göreceli olarak düşük seviyeleri nedeniyle oksidatif strese özellikle duyarlıdır [115].

Yaşlanma süreci, beyinde antioksidan kapasitede azalma ve ROS üretiminde artışla sonuçlanan morfolojik ve fizyolojik değişiklikleri içermektedir [116, 117].

Bu alanda yapılan çalışmalar, serbest radikallerin hücrel hasara sebep olan önemli bir neden olduğunu göstermektedir. Oksidatif stres [3], inflamasyon [118], anormal proteinler [119] ya da bilinmeyen faktörlere bağlı olabilen aşırı serbest radikal üretiminin nöronal hasara yol açtığı bildirilmiştir. Literatür verileri AH'na sahip insanların beyin dokularının hastalığın gelişimi esnasında oksidatif strese maruz kaldığını göstermektedir. Serbest radikal ürünleri birikiminin, neden olduğu oksidatif hasarın demans patogenezinin erken evrelerinde meydana geldiğine inanılmaktadır [120, 121]. Belki de bir AH'na sahip bir beynin en erken karakteristik özelliği olduğu [116, 122] ve belirgin nöropatolojik değişikliklerden önce oluştuğu ileri sürülmüştür [122-124]. Hem ROS hem de ya da reaktif nitrojen ürünlerinin (RNS) aşırı oluşumu hem de endojen antioksidan kapasitenin azalmasıyla oluşturulan oksidatif stres; protein oksidasyonu, lipid peroksidasyonu, DNA oksidasyonu ve glikoksidasyon gibi hücrel hasar ile ilişkilidir. Birçok çalışma, AH'na sahip kişilerin hem beyin dokusunda hem de kan dolaşımında ROS aracılı lipid peroksidasyonu işaret eden malondialdehit (MDA), 4-hidroksinonenal, F2-isoprostanlar, ROS aracılı protein oksidasyonunu gösteren peroksinitrit, protein karbonilleri (CRBNLs) ve nitrotirozin, ROS aracılı DNA oksidasyonu belirten 8-hidroksi-2-deoksiganosin, gelişmiş glukasyon son ürünleri (AGEs) gibi biyomoleküler peroksidasyon son ürünlerini tanımlamıştır [124-127].

Oksidatif stresin indüksiyonunda yer alan diğer bir mekanizma NMDA tipi glutamat reseptörleri aracılı mekanizmadır. Normal koşullar altında sinaptik NMDA reseptörlerinin ılımlı aktivasyonu fizyolojik ROS ve RNS ürünlerini indükler böylece nöronal hayatta kalım ve nöronal fonksiyonda normal sinyallere aracılık eder. AH'nda beyin dokusundaki NMDA reseptörlerinin aşırı aktivasyonu kalsiyum (Ca^{+2}) iyonlarının aşırı içeriye akımına, ROS ve RNS'nin nörotoksik seviyelerde üretimine sebep olur. Dahası Ca^{+2} iyonları nöronal ve glial nitrik oksit sentazı (NOS) aktive eder ve aşırı NO ayrıca NMDA reseptörlerinin aşırı aktivasyonuna katkı sağlar. NMDA reseptörlerinin aşırı aktivasyonu, protein yanlış katlanması ve mitokondrial disfonksiyon kümülatif olarak aşırı nitrosatif ve oksidatif stres aracılığıyla sinaptik kaybı ve nöronal hasarı indüklemektedir [128-130].

İlerleyen yaş ve çeşitli sebeplerle artan ROS üretiminin proteinlerde ve lipidlerde peroksidasyona yol açtığı; β -sekretaz aktivitesini artırarak APP'den fibriller A β yapımını artırdığı, amiloid β ve hiperfosforile taunun çözünebilir durumdan çözünemez hale geçmesine neden olduğu, böylece bu maddelerin agregate olarak senil plakları ve NFY oluşturdıkları ve senil plak oluşumunu indükledikleri öne sürülmüştür [131, 132].

Klasik teori β amiloid peptitlerin ekstrasellüler olarak depolandığını gösterse de son zamanlarda farklı Alzheimer tipi demans modellerinde ve yaşlılarda yapılan hücrel ve biyokimyasal çalışmalarda, bu peptitlerin mitokondriyi hedefledikleri nöron içinde de birikebileceğini ve hastalığın gelişimine katkıda bulunabileceğine dair kanıtlar vardır[133]. Amiloid β , mitokondrideki elektron zincirini inhibe eder, solunum hızını azaltır, ROS salınımını indükler ve lipit membranları ve geçiş metalleri ile etkileşerek direk ROS üretimi yoluyla nörotoksositeye de sebep olabilir [134]. AH'na sahip beyinlerde β amiloid depolanmasının, oksidatif strese bağlı hasara karşı bu hücrelerin bir korunma çabası olarak sayılabileceği öne sürülmüştür [113, 135, 136].

2.4. Alzheimer Hastalığına Yönelik Tedaviler

Günümüzde AH tedavisinde kullanılan ilaçlar, hastalığın oluşmasını ve ilerlemesini durdurmakta yetersiz kalmakta, sadece semptomları ortadan kaldırmakta ve/veya şiddetini azaltmaktadır. İdeal tedavi hedefi, hastalığın semptomlarını tedavi etmekle sınırlı kalmamalı, bunun yanı sıra AP'ların, tau proteininin oluşumunu ve nöron dejenerasyonunu önlemeyi de hedeflemektedir. Günümüzde pek çok ilaç ya da ajan AH patofizyolojisinde rol oynayan farklı mekanizmaları hedef alarak hastalığı önleme ya da tedavi etme amacıyla denenmektedir.

Günümüzde kullanılan ya da halen Faz çalışma döneminde olup gelecekte tedavi alternatifi olmaya aday seçenekler şunlardır:

A. Kolinerjik sistem üzerine etkili ilaçlar: AchE inhibitörleri (Donepezil, Rivastigmin, Tacrine, Galantamin)

B. Glutamaterjik sistem üzerine etkili ilaçlar: Memantin

C. Metabolik ve vasküler sistem üzerine etkili ilaçlar

i. Antioksidanlar: Vitamin E ve C, selenyum, ginkobiloba ekstreleri, pentoksifilin, ginseng ekstreleri, idebenon.

ii. Nootropikler: Pirasetam, oxaracetam, etiracetam, aniracetam, pramiracetam

D. Gen tedavisi: Sinir hücresi büyüme faktörü (NGF) Glial derived neurotrophic factor (GDNF), brain derived neurotrophic factor (BDNF).

E. Amyloid oluşumunu engelleyen ilaçlar: Amyloid beta peptid aşısı,

β -Sekretaz İnhibitörleri, α -Sekretaz Aktivatörleri, γ -Sekretaz İnhibitörleri.

F. Amiloid yıkımını artıran ilaçlar: Lenti-Nep, bapineuzumap, solenozumap, MABT 5102A, gantenerumab.

G. Nörofibriler yumakları inhibe eden ilaçlar: pacritaksel, testosteron, östrojen, Metiltioninium (metilen blue), davunetidin

H. Davranış bozukluklarına yönelik ilaçlar: Antipsikotikler (risperidon, ketyapin, olanzapin, klozapin), benzodiazepinler (diazepam, klonozapam, lorazepam, oksazepam), antiepileptikler (karbamazepin, valproik asit), antidepresanlar (serotonin geri alım inhibitörleri, trisiklik antidepresanlar)

I. Olası ilaçlar: Nonsteroid anti inflamatuvar ilaçlar (NSAİİ), statinler...

2.4.1. Antioksidanlar ve Alzheimer Hastalığı

Antioksidan süreçte rol oynayan maddelere 'antioksidanlar' denir. Enzimatik antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimleridir. SOD'ın yapısında bakır, çinko ve manganez, GSH-Px'da ise selenyum maddesi bulunduğundan bu enzimler metalloenzim olarak da adlandırılırlar [137]. Hücre içi ortamın aksine hücre dışı ortamda gerçekleşen enzimatik olmayan antioksidan savunmadan ise E ve C vitaminleri, transferrin, seruloplazmin, albumin, bilirubin, β -karoten sorumludurlar. SOD, GSH-Px ve KAT enzimlerinden ayrı olarak E ve C vitaminleri de hücre içi antioksidan özelliğe sahiptirler. Her ikisi de hücre membranlarındaki LPO zincir reaksiyonlarını kıran

antioksidanlardır. Hücre içi ortamın aksine hücre dışı sıvılarda enzimatik antioksidan sistemin aktivitesi sınırlıdır [138, 139].

ROS'un sitotoksik aktivitesi ile savaşmak için, hücreler KAT ve GSH-Px gibi antioksidan enzimleri, vitamin E ve Askorbat gibi serbest radikal süpürücü kimyasalları da içeren çeşitli antioksidan savunma sistemleri ile donatılmışlardır. Antioksidanlar, ROS ve metal iyonları gibi oksidanları uzaklaştırarak ya da minimize ederek veya oksidatif zincir reaksiyonlarına engel olarak ve hücrenin kendi antioksidan savunmalarını optimize ederek hareket edebilirler [140].

Güncel araştırmalar AH modellerinde antioksidanların (tokoferol, ubikinonlar ve curcumin gibi) nöron koruyucu etkilerine odaklanmaktadır [141, 142]. Çalışmalarda antioksidanların AH'nın ilerlemesini geciktirdiği bildirilmektedir [143]. Antioksidanlardan zengin sebze meyvelerin tüketimi ile birlikte sağlanan yüksek antioksidan aktivite ve nöroprotektif ajanların AH'ndaki bellek kayıpları riskini azaltabileceği bulunmuştur [116, 144]. Eser elementlerin AH tedavisi için önemli olabileceğine dair yayınlar da mevcuttur [145-147].

2.4.1.1. Selenyum

Selenyum, ilk kez 1817 yılında sülfürik asit üretiminin bir yan ürünü olarak bir kimyager olan İsveçli Jons Jacob Berzelius tarafından tanımlanmıştır [148].

Selenyumun, inorganik formları (selenit, selenat, selenid) ve doğal olan organik formları (selenometiyonin, selenosistein) bulunur [149]. Selenyum dokularda iyonik formda oluşmaz [150]. Selenit ve selenat gibi inorganik formları dokularda selenosistein ve selenomethionin gibi organik formlara çevrilir [151, 152].

Selenometiyonin, barsaktan absorpsiyonunda metiyonin ile yarışır, metiyonin içeren vücut proteinlerine katılır ve depolanır. Fare ve insan çalışmalarında selenometiyoninin biyoyararlanımının selenit ve selenattan daha fazla olduğu gösterilmiştir ve muhtemelen canlılar için selenyumun esas kaynağıdır [153, 154].

Selenyum, insan organizmasında bir dizi biyolojik fonksiyonda rol oynamaktadır. Biyolojik etkilerini, yapısında selenosistein aminoasidi bulunan selenoproteinler yoluyla göstermektedir. Selenosistein biyolojik pH da anyonik halde

bulunur ve bu özelliği, elektron alışverişi yoluyla biyolojik redoks reaksiyonlarının gerçekleşmesini sağlar. Selenoproteinlerin enzimatik redoks aktivitelerinin yanı sıra yapısal ve transport fonksiyonları da vardır. Selenyum, selenosistein halinde GSH-Px, iyodotironin deiyodinaz ve tiyoredoksin redüktaz enzimlerinin yapısında bulunur [155].

Selenyum, beyin de dahil olmak üzere farklı dokularda ifade edilen antioksidan enzimlerin temel bileşeni olarak antioksidan rol oynamaktadır. Bu nedenle, bu mineral antioksidan sistemde önemli bir role sahiptir. Bu eser elementin ROS ile indüklenen hücre hasarına karşı koruma sağladığı ve işlevini çoğunlukla GSH-Px ailesi ve selenoprotein P (SelP)'nin fonksiyonlarını başlatmak sureti ile yaptığı ileri sürülmektedir [6]. Selenyum sinaptik fonksiyon için gerekli olan, antioksidan fonksiyonu olan ve redoks durumuna dahil olan birçok selenoproteinin bir bileşenidir [156-158]. SelP ve GSH-Px beyindeki önemli selenoproteinlerdir. GSH-Px, E vitamini ile sinerjik çalışan antioksidan bir enzim olup glutasyonu azaltarak H₂O₂, organik hidroperoksit ve lipid peroksitlerinin azalmasını katalize eder böylece hücreleri oksidatif hasara karşı koruyarak önemli bir antioksidan role sahiptir [159]. GSH-Px enzimleri nöronlar ve glial hücreler tarafından ifade edilir [152, 160]. SelP ise on kadar selenosistein kalıntısı sunar ve selenyumun esas taşıyıcısıdır. Selenoproteinlerin AH'nda hücre ölümünde rol alan ROS'un engellenmesine yardımcı olduğu bildirilmiştir [161].

Selenyumun güçlü bir antioksidan rolü vardır ve AH gibi birçok nörodejeneratif hastalık selenyum yetersizliği ve oksidatif stres artışı ile ilişkili bulunmuştur [156, 162]. Selenyum, AH'na sahip beyinlerde görülen senil plaklar ve NFY'larda tanımlanmıştır bu durum oksidatif hasardan nöronları koruyan önemli bir role sahip olduğunu düşündürmektedir [151, 163]. Selenyum önemli bir antioksidan rol oynarken, özellikle beyin fonksiyonların sürdürülmesinde önemli olabilir. Böylece bu mineralin eksikliği, mitokondriyal fonksiyon bozuklukları, sinaptik iletim, aksonal transport ve nöroinflamasyon ile ilişkili olan serbest radikaller nedeniyle nöron kaybına katkıda bulunan oksidatif stresi artırabilir [164, 165].

Selenyum seviyeleri ve bilişsel zayıflama arasındaki ilişkiyi değerlendiren çalışmalarda, selenyum eksikliğinin demans riskini artırabileceği ileri sürülmektedir

[7, 8]. Ratlarda beyin dokusu diğer dokulara kıyasla selenyum için daha yüksek metabolik önceliğe sahiptir [166]. Sağlıklı kontrollerle karşılaştırdıklarında malnutrisyonda olmayan erken dönem AH'na sahip kişilerde plazma selenyum düzeyinin daha düşük olduğu bulundu. Bu durum malnutrisyon yokluğunda bile AH'na sahip kişilerde beslenme durumunda farklılıklar olduğunu düşündürmektedir [167-170].

Beyindeki selenyum metabolizması sistemin geri kalanından bağımsızdır ve hatta ağır selenyum eksikliği koşullarında bile beyin fonksiyonu için gerekli olan selenyumun optimal konsantrasyonunu sürdürür [162]. Selenyumdan fakir diyetle beslenen genç domuzlarda oniki selenoproteininin messenger ribonükleik asid (mRNA) düzeylerinin, hipofiz bezinde yüksek düzeyde ifade edildiği ama karaciğer gibi diğer organlarda önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir [171]. Beyinde, selenyumun en yüksek konsantrasyonda serebellumda biriktiği, takiben korteks, medulla oblonga, serebral hemisfer ve omurilikte birikmiş olduğu tespit edilmiştir. Beyinde selenyum tutulumu Selp ekspresyonuna dayanır [172]. Selenyum beyne ana tedarikçisi olan Selp, beyinde de novo sentezlenir ve ayrıca apolipoprotein E reseptörü (ApoER2) vasıtasıyla içeri akar. Selp ya da ApoER2'nin kaybı (delesyonu) GPx aktivitesindeki azalma ile farelerde ciddi nörolojik fonksiyon bozukluğuna yol açar [173, 174]. Selp'nin AH'na sahip kişilerin beynindeki AP'larla birlikte lokalize olduğu bildirilmiştir [175].

AH'na sahip kişilerin sağlıklı yaşlılardan daha düşük selenyum seviyelerine sahip oldukları gösterilmiştir [168, 169]. Smorgon ve ark. farklı gruplarda eser elementler ile bilişsel fonksiyon arasında direk bir ilişki olduğunu bulmuş ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında AH'na sahip kişilerin plazma selenyum düzeylerinin azalmış olduğunu göstermişlerdir [167]. Selenyum düzeylerinin yaşla birlikte azaldığı, bu durumun yaşlı popülasyondaki nöropsikolojik fonksiyonlarda azalmaya katkı sağlayabileceği bildirilmiştir. Azalmış selenyum seviyesinin kognitif fonksiyonlarda bozukluk ile ilişkili olması bu durumu destekler niteliktedir [8, 176]. Yapılan çalışmalarda selenyum düzeyi ile bilişsel performans arasında korelasyon olduğu, selenyum eksikliğinin bilişsel fonksiyonlarda bozulma ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [7, 8, 167, 176-178]. Çalışmalar AH olan bireylerde selenyumun azaldığını bulmuştur [168, 169]. Kemirgenlerde oluşturulan bir AH modelinde

selenyum eksikliğinin AH patolojisini artırdığı bulunmuştur [179]. Transgenik farelerin beyinlerindeki A β plak üretimine selenyumdan fakir diyetin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, selenyumdan eksik diyetle beslenen fare beynindeki A β depozitlerinin kontrol deneklere göre arttığı saptanmıştır [179]. AH olan bireylerde selenyumun nutrisyonel durumunun araştırıldığı bir çalışmada Alzheimer hasta grubunda anlamlı düzeyde selenyum eksikliği olduğu, selenyumu da içeren çeşitli antioksidanların yaşla ilişkili hastalıklarda azaldığı bildirilmiştir [168]. Bir başka çalışmada Organoselenyumun APP ve presenilin mutasyonu ile oluşturulmuş AH kemirgen modelinde patolojiyi azaltmada etkili olduğu gösterildi [180]. Ishrat ve arkadaşları Selenitin streptozotosin ile indüklenen AH kemirgen modelinde kognitif bozukluğu ve patolojiyi azalttığını göstermişlerdir [181].

Selenyumun hangi mekanizma ile AH için etkili olduğu net değildir. Bu konu ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Sodyum selenatın, protein fosfataz 2A (PP2A) için bir agonist olarak etki ederek, NFY oluşumunu azalttığı bildirilmiştir [182, 183]. Başka çalışmalarda selenyumun β ve γ sekretaz aktivitesini azaltarak A β 42 üretimini ve A β kaynaklı nöron ölümünü azalttığı sunulmuştur [184-186]. Sodyum selenitin, nöronal hücre hatlarında A β üretimini azalttığı [184] ve selenatın AH modellerindeki tau patolojisini ve nörodejenerasyonu azalttığı [183] raporlanmasına rağmen, selenyum düzeyinin plazma A β 42, tau ve tau/A β 42 oranı ile korelasyon göstermemesi, selenyumun AH'ndaki A β /tau aracılı mekanizmanın düzenlenmesinde direk rolü olmadığını da düşündürmektedir [174]. Farklı çalışmalarda selenyumun koruyucu mekanizmasının redoks regülasyonu ve antioksidan fonksiyonlardaki anahtar rolleri ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir [187-190]. Seleno-L-metionin ile kombine edilmiş E vitamininin, hücre kültüründe β -amiloid toksisitesi ve oksidatif strese karşı koruma sağladığı gösterilmiştir [191].

2.5. Apoptozis

Hücrenin intiharı olarak da tanımlanabilen Apoptoz, vücudun anormal gördüğü veya ihtiyaç duymadığı hücrelerden çevredeki diğer hücre ve yapılara zarar vermeden kurtulmak için kullandığı fizyolojik bir yoldur. Genetik faktörler ya da hücre dışı lezyonlar sonucu aktive edilen ve hücrenin kendisi tarafından

programlanmış bir mekanizmayla hücre ölümünü kontrol eden aktif bir işlemdir. İyonize radyasyon, kemoterapiyi de içeren travmatik ajanlar, hormonal olarak aktif çeşitli maddelerin neden olduğu hücre hasarları ve genetik faktörlerle aktive edilen hücrel intihar programının apoptoza yol açtığı bildirilmiştir [192].

Hücrelerde akut hasar sonucu olan hücre ölümü tipi olan nekrozdandır. Apoptoz ardı sıra moleküler işlemler sonunda hücrenin ölümünü sağlar. Organizmanın yaşam döngüsü için gerekli ve yararlıdır. Örneğin embriyoda insan parmaklarının farklılaşması sırasında parmaklar arasındaki hücreler apoptoza uğrar ve parmaklar birbirinden ayrılır. Apoptoza uğrayan bir hücre nekrozdandır farklı olarak, küçülür ve ölür [193]. Embriyogenez, büyüme ve gelişme, rejenerasyon, hemostaz ve tamirde organların patofizyolojisinde ve hacimlerinin korunmasında apoptozis önemli rol oynamaktadır [194].

Vücutta bir saniyede yaklaşık bir milyon hücre apoptozisle programlı hücre ölümüne uğramakta yerlerine yeni hücreler yapılmaktadır. Yapım (mitozis) ile yıkım (apoptozis) arasında hassas bir denge vardır. Bu dengenin bozulması birçok önemli hastalığın ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Apoptozisin gereğinden fazla olduğu veya çok hızlandığı durumlarda nörodejeneratif hastalıklar, AIDS, insüline bağımlı diabet, MI, hepatit C enfeksiyonu, ateroskleroz gibi hastalıklar oluşabilmektedir. Apoptozis mekanizmasının gerektiğinde devreye girmediği yada yavaşladığı durumlarda ise otoimmün hastalıklar ve kanser ortaya çıkabilmektedir [195].

2.5.1. Kaspazlar

Apoptozisin düzenlenmesinde görev alan ‘‘Cysteine Aspartate Spesifik Protease’lar’’ (Caspase/Kaspaz) olarak adlandırılan proteazlar, Apoptozun başlatılması, yürütülmesi ve inflamatuvar sitokinlerin salınımının kontrolünde görevli enzimlerdir [196].

Kaspazlar hücrede inaktif (zimojen) olarak prokaspaz formunda bulunur. Apoptoz sinyalinin alınmasıyla inaktif prokaspaz enzimler aktifleşerek diğer inaktif kaspazları aspartik birimlerinden keserek aktifleştirirler [197].

Kaspazlar biyolojik işlevlerine göre 3 ana grupta incelenmektedir [198].

2.5.1.1. Sitokin Aktivasyonu Yapanlar

Kaspaz -1, -4, -5, -11, -12, -13 ve -14'ü içermektedir. proinflamatuvar sitokinleri aktifleştirerek inflamasyonda görev alırlar. Ayrıca kaspaz-1, -4 ve -5 tetrapeptid yapıda olup kendi kendilerini aktive edebilmektedirler.

2.5.1.2. Apoptozisi Başlatanlar

Kaspaz-2, -8, -9 ve -10'u içermektedir.

2.5.1.3. Apoptozisi Yürütenler (Efektör Grup) (İnfazcılar)

Kaspaz-3, -6 ve -7'yi içermektedir.

Kaspazlar apoptotik yolda “başlatıcılar” ve “infazcılar” olmak üzere iki grupta yer alırlar. Apoptotik hücre ölümünde kaspazlardan ilk görev alanlar başlatıcıdır. Apoptotik yolun daha sonraki aşamalarında görev alan kaspazların diğer üyeleri ise infazcı kaspazlar olarak isimlendirilir. Kaspaz 2, 8, 9 ve 10 başlatıcı kaspazlardandır, kaspaz 3, 6 ve 7 ise infazcı kaspazlardır. Başlatıcı kaspazlar farklı yollarla gelen uyarıları, genel bitirici faza taşırlar, yeterli miktarda infazcı kaspazın aktifleşmesini sağlayarak apoptotik sinyalin çoğalmasında rol oynarlar, ölümün en son basamağında bir kontrol noktası olarak yer alırlar [199]. Kaspaz-3 aktif ölüm proteazı olup birçok hücrenin parçalanması ve apoptotik cisimlerin oluşumu ile ilişkili apoptozis sürecinde kritik rol oynar [200].

2.5.2. Apoptoz Mekanizmaları

Üç farklı mekanizma ile apoptoz meydana gelmektedir. Bunlar;

- a. Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apoptoz oluşturulması (İntrensek yol),
- b. Dış sinyallerle apoptoz tetiklenmesi (Ekstrensek yol),
- c. Endoplazmik retikulum (ER) aracılı apoptoz.

2.5.2.1. Mitokondri/Sitokrom-C Aracılı Apoptoz

İntrensik yolun temelinde mitokondrial geçirgenliği düzenleyen pro-apoptotik ve anti-apoptotik moleküllerin dengesi bulunmaktadır. Çeşitli apoptotik uyarıcılar mitokondrinin dış membranının geçirgenliğini arttırarak intermembranal boşlukta bulunan sitokrom c, SMAC/DIABLO, EndoG, AIF ve OMI/HTRA2 gibi bazı proteinlerin sitoplazmaya geçişine neden olur [201]. Mitokondri membranının geçirgenliği proapoptotik (Bax, Bim, Bid, Bak, Noxa) ve antiapoptotik (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w) proteinlerin karşılıklı etkileşimleri ile yönetilmektedir. Membranın geçirgenliğinde artış apoptozisteki en kritik aşamadır [202, 203]. Mitokondri membranında Bcl-2/Bax oranının azalmasıyla membran geçirgenliği artar ve sitokrom-c mitokondri membranından sitoplazmaya geçer. Böylece sağlıklı hücrelerde Bcl-2'ye bağlı bir protein olan Apaf-1 (apoptoz aktive edici faktör-1) de Bcl-2'den ayrılıp sitoplazmaya salınır. Her iki protein sitoplazmadaki kaspaz ile birleşerek Apoptozom denilen yapıyı oluşturur [203, 204]. Apoptozom prokaspaz-9'un aktivasyonunu gerçekleştirir ve kaspaz-9 oluşur. Kaspaz-9 da diğer kaspazları aktive eden bir zincir reaksiyonunu başlatır [202]. Bu enzimler hücredeki birçok yapıya enzimatik olarak zarar verirler ve apoptozisin sonlanmasında kritik rol oynarlar [205, 206].

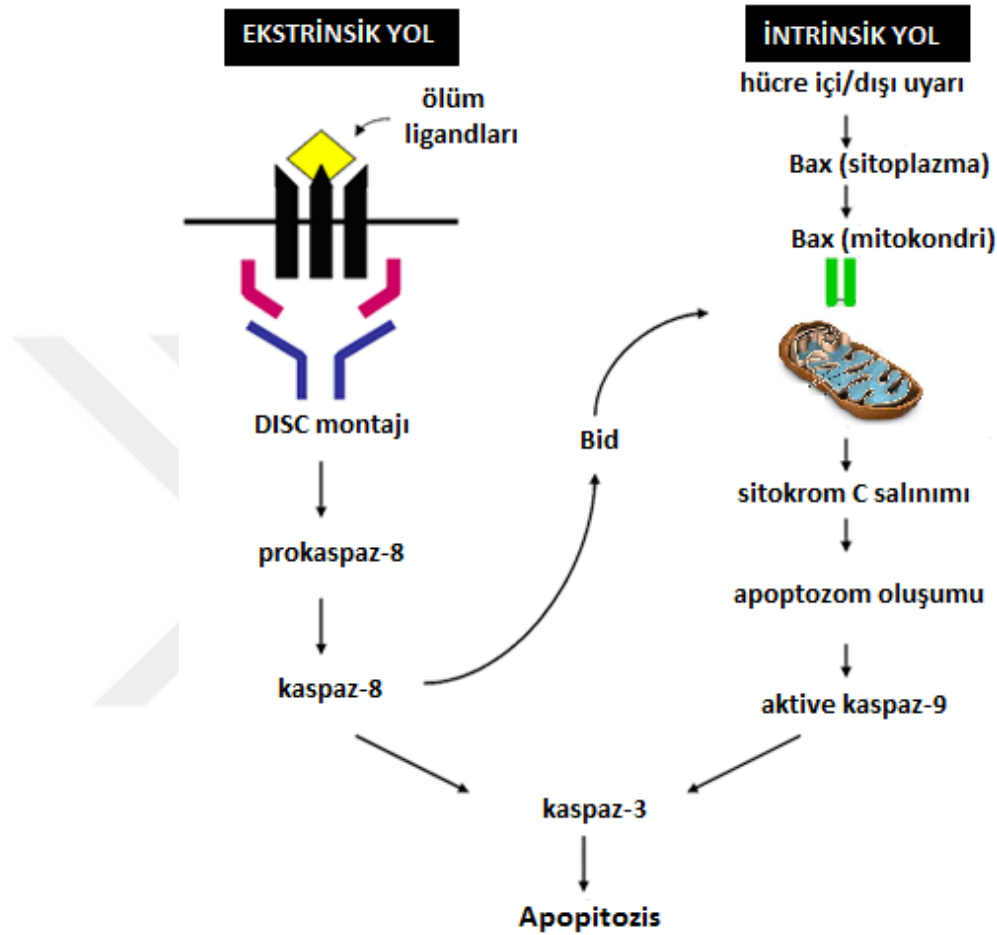
2.5.2.2. Dış Sinyallerle Apoptoz Tetiklenmesi

Transmembran reseptör aracılı etkileşimlerle Apoptozu başlatan yol ekstrinsek ya da ölüm reseptör yolu olarak adlandırılmaktadır. Kaspaz-8 diğer kaspazları aktive eder ve sonuçta hücrenin ölümü ve fagositozu gerçekleşir [207].

2.5.2.3. ER Aracılı Apoptoz

Enfekte hücrelerde viral proteinlerin yoğun sentezi, ER'da bu proteinlerin kontrolsüz birikmesine ve kıvrımlarının açılmasına yol açarak, ER aracılı apoptozis sürecini başlatabilmektedir [208]. ER, hücre içi Ca^{+2} deposu gibi işlev görmektedir. ER'den Ca^{+2} salınması stoplazmadaki Ca^{+2} düzeyini artırır ve Ca^{+2} endonükleaz, transglutaminaz gibi enzimleri aktive eder. Bu enzimler, DNA'nın nükleozomlar

arası bölgelerden düzgün bir şekilde kırılması sağlar [205, 209]. Kaspaz-12 ER membranında yer alır ve bu yolla oluşan apoptozda görevli bir enzimdir. Kaspaz-12 stoplazmada artan Ca^{+2} düzeyi aktive olur ve kaspaz-9 ile etkileşerek kaspaz kaskadını aktive eder [210].



Şekil 1. Apoptozis mekanizmasının şematik görünümü

2.6. Kalsiyum Kanalları

Kalsiyum kanalı Ca^{+2} iyonları için seçici geçirgenlik sergileyen bir iyon kanalıdır. Voltaj bağımlı Ca^{+2} kanalları ve ligand-kapılı Ca^{+2} kanalları olmak üzere iki türü vardır. Voltaja duyarlı Ca^{+2} kanalları 5 adettir. Bunlar L-tipi Ca^{+2} kanalları ("Long-Lasting" AKA "DHP Receptor"), P- tipi Ca^{+2} kanalları ("Purkinje") /Q- tipi Ca^{+2} kanalları, N- tipi Ca^{+2} kanalları ("Neural"/"Non-L"), R- tipi Ca^{+2} kanalları ("Residual") ve T- tipi Ca^{+2} kanalları ("Transient")'dır [211]. Ligand Bağımlı Kalsiyum Kanalları ise iyon kanalları ligand adı verilen bir kimyasal habercinin

yapışmasına cevap olarak açılan ya da kapanan bir grup transmembran iyon kanalıdır. Sinapslarda yer alan bu tip reseptörler, pre-sinaptik kimyasal sinyali doğrudan ve hızlıca post-sinaptik elektriksel sinyallere çevirmektedirler [211]. Inositol 1,4,5-trifosfat (IP₃) reseptörü, Ryanodin reseptörleri (RyRs), STIM-Orai Kanalları, Two-pore channel's (TCP), Spermin katyon kanalları (Catsper kanalları) ligand bağımlı Ca⁺² kanallarıdır [211, 212].

Kimyasal kapılar içersinde glutat kanalları önemli yer tutmaktadır. Bunların 3 reseptörü (NMDA, AMPA ve kainat) vardır. Bunların dışında son 10-20 yıl içerisinde keşfedilmiş olan ve aktivasyon ve inhibisyon mekanizmaları kimyasal ve voltaja duyarlı kalsiyum kanallarından farklı olan Transient Reseptör Potansiyel (TRP) kanalları vardır.

2.6.1. TRP Kanalları

TRP proteini ilk kez *Drosophila Melanogaster* türü sirke sineği fotoreseptörleri üzerine yapılan çalışmalar sırasında bulunmuştur [213, 214]. TRP kanal üst ailesi, memelilerde bulunan, voltaj bağımlı olmayan katyon kanalları olup kalsiyum, sodyum ve potasyuma geçirgendir [215]. 1992 yılında TRP geni ilk kez klonlanmış ve böylece TRP mutant genindeki eksik proteinin, Ca⁺² geçirgen olduğu ve hücre içine kalsiyumun girişine aracılık ettiği sonucuna varılmıştır [216]. TRP kanallarının görme, dokunma, tat alma, duyma, termal hassasiyet gibi duyuların algılanmasında önemli görevleri vardır [217, 218]. Yapısı incelendiğinde N-terminal, C-terminal ve transmembran bölgesi olarak 3 temel bölgeden oluşmaktadır. İyon akışı, transmembran bölgesindeki beş ve altıncı segmentler arasından olmaktadır [219]. TRP kanalları sekans sınıflandırmasına göre canonical veya klasik tip olarak adlandırılan (C), vanilloid reseptör (V), melastatin (M), ankrin (A), mukolipin (ML) ve polisistin (P) TRPN olmak üzere yedi alt aileden oluşmaktadır. İlk 6 tanesi memelilerde bulunurken TRPN sadece omurgasızlarda bulunur ve TRP bölgesi içermez [220].

2.6.1.1. Transient Reseptör Potansiyel Melastatin (TRPM) Kanalları

Bu ailenin ilk üyesi, melanoma hücrelerinde saptanmış olan TRPM1 kanallarıdır. Melanoma hücrelerinde saptandığından ‘‘M’’ harfi ile adlandırılırlar [220, 221]. Bu ailenin TRPM1, TRPM2, TRPM3, TRPM4, TRPM5, TRPM6, TRPM7 ve TRPM8 olmak üzere toplam 8 üyesi bulunmaktadır [222]. Bu ailenin bir üyesi olan ve özellikle oksidatif stresle aktive olan, TRPM2 kanallarının hücre farklılaşması ve canlılığın devam ettirilmesi gibi önemli fonksiyonlarda görev aldıkları bildirilmiştir [223, 224].

2.6.1.1.1. Transient Reseptör Potansiyel Melastatin 2 (TRPM2) Katyon Kanalları

TRPM2, non-selektif kalsiyuma geçirgen katyon kanalıdır [225]. TRPM2 geni ilk defa 1998 yılında klonlanmıştır [226]. TRPM2 kanalları öncelikle beyin ve kemik iliğinde saptanmış, sonraki çalışmalarda böbrek, bağırsak, karaciğer, testis, akciğer, pankreas, prostat, lökositler, iskelet kası ve arka kök gangliyonları (AKG) gibi birçok doku ve hücrede saptanmıştır [227]. Bu kanallar sodyum ve potasyuma da geçirgen olan non-selektif katyon kanalları olsa da esas olarak hücreye kalsiyumun girişinde önemli görev alırlar [228]. TRPM2'nin C terminal bölgesinde bulunan enzimatik bölümün (NUDT9-H) hücredeki oksidatif hasarı temsil eden ADPR için spesifik bağlanma bölümü olduğu bildirilmiştir [229]. Hücre dışı serbest Ca^{+2} düzeyi hücre içi serbest Ca^{+2} düzeyine (80-100 nM) kıyasla 20,000 kat daha fazladır [230]. Metabolik reaksiyonlar sonucu oluşan H_2O_2 'nin hücre içerisine girerek TRPM2 kanalını aktive ettiği, böylece hücre içerisine Ca^{+2} iyon girişini artırdığı bildirilmiştir [223, 231]. Bazı çalışmalarda ise H_2O_2 'nin kanalı direk aktive etmediği bunun yerine hücre içi organellerde (çekirdek, mitokondri vb.) ADP riboz sentezini artırdığı ve bu ADP-ribozun TRPM2 kanalını açtığı bildirilmiştir [232-234]. TRPM2 kanallarının oksidatif stresle aktive olabileceği gösterilmiştir [223]. TRPM2 kanallarının ADPR tarafından aktive olabildikleri gösterilmiştir [232]. ADPR üretimi G proteine bağlı reseptörlere ligandın bağlanarak TRPM2 kanalını aktive etmesiyle başlar. Reseptör aktivasyonu ile TRPM2 kanalından kalsiyum girmesi, intrasellüler Ca^{+2} yoğunluğunun yükselmesi IP_3 tarafından hücre içi

organellerden Ca^{+2} serbest bırakılmasını sağlar. Alternatif kaynaklar ADPR içeren mitokondri ve çekirdektir. ADPR polimerleri stimülasyon sonrası poli ADP-riboz polimeraza (PARP-1) ve sonrasında poly (ADPR) glikohidrolaz (PARG) tarafından ADPR'ye hidroliz edilir. Bu olay hücreyi apoptozise gidinceye kadar uyarabilir. Sitozolda Ca^{+2} artışı mitokondride depolarizasyon ve porların açılması veya hücre dışından sitozole H_2O_2 lerin gelişi daha fazla NOS ve ROS üretilir. ADPR ve ROS, geri bildirim mekanizması ile TRPM2 kanallarının açılması yolu ile sitozole Ca^{+2} akışını artırır [225]. Hücre içinde artış gösteren Ca^{+2} iyonu hücre ölümüne kadar gidebilecek patofizyolojik sürecin başlatıcısıdır [4,5]. Günümüzde TRPM2 kanallarını doğrudan kapatan bir ajan olmadığı gibi bu kanallar Ca^{+2} kanal blokeri ilaçlar ile de kapanmamaktadır [235, 236]. TRPM2, farklı beyin bölgelerinde ifade edilen, hücre içi adozin difosfat (ADP), ısı, H_2O_2 ve ROS tarafından aktive edilen kalsiyum geçirgen bir kanaldır [220, 237]. TRPM2 kanallarının açılmasıyla hücre içinde artan kalsiyum ile ilişkili hücrel disfonksiyon ve bir dizi olay yoluyla oluşan amiloid β , beyin endotel hücrelerini direk bozabilir. Vasküler endoteldeki bu bozulma yeterli kan akışını engelleyebilmekte ve nöronal canlılık üzerinde olumsuz sonuçlar doğurarak AH patogenezinde rol oynayabilmektedir. Serebral endotel hücrelerine amiloid β 'nin bağlanması, ROS üretmek için NADPH oksidaz aktivitesini uyarmakta, ROS ve NO birleşerek peroksinitrit oluşturmakta ve DNA hasarına sebep olmaktadır [238,239]. Çalışmamızda kullanılacak selenyumun oksidatif stres üzerine etkisini araştıran yayınlar oldukça fazladır. Yakın zamanda hücre serilerinde (örneğin CHO ve HEK293) yapılan çalışmalarda TRPM2 kanalları üzerinde selenyumun düzenleyici rolünün olduğu rapor edilmiştir [240, 241]. Fakat AH'nın TRPM2 kanalları üzerinde nasıl bir etkisi olduğuna ilişkin literatürde yeterince yayın bulunmamaktadır. Nöronların elektriksel olarak aşırı uyarılması "aşırı uyarılma toksisitesi" adı verilen, hücreyi ölüme götüren bir süreci başlatabilir. Bu durum pek çok nörodejeneratif hastalıkta ve travmalardan sonra gözlenen nöron kaybının patofizyolojisinde sorumlu tutulmaktadır. Aşırı uyarılma toksisitesinde hücre ölüm sürecini başlatan hücre içinde yükselen Ca^{+2} seviyesidir [4, 5]. Yeni tanımlanmış olan TRPM2 Ca^{+2} kanallarının bu bağlamda AH'nda nasıl rol oynadığı, nöronu ölüme götüren süreçlerde ne gibi rolünün olduğunu anlamak oldukça önem arz etmektedir.

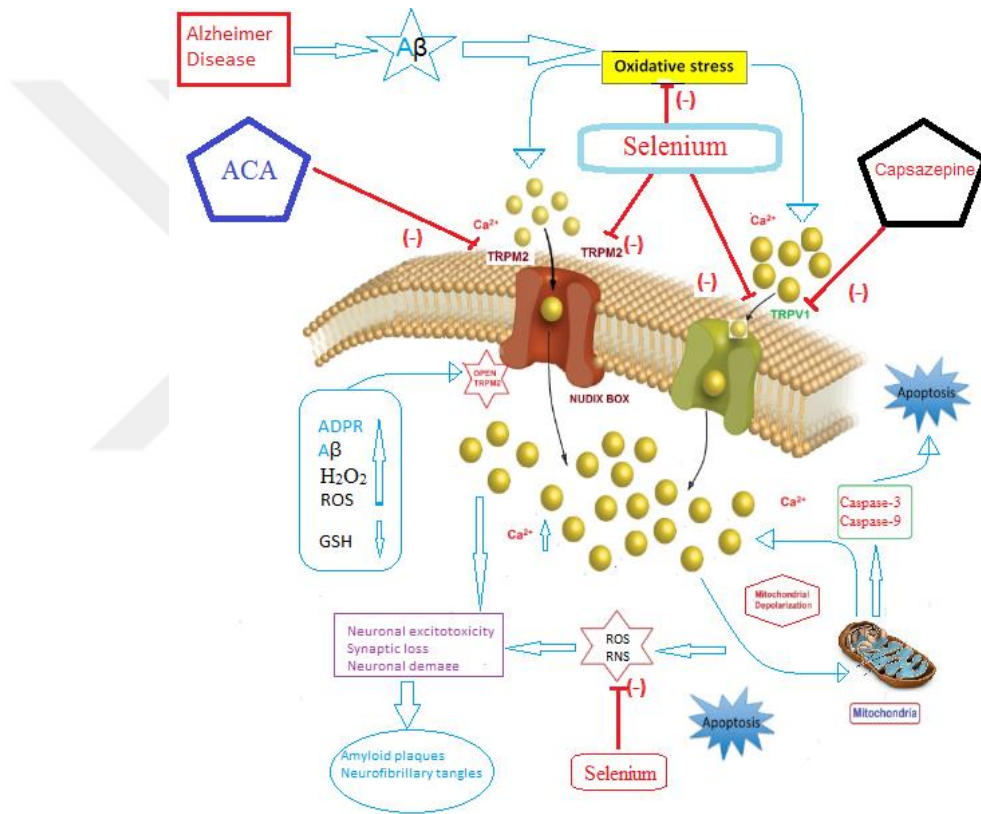
2.6.1.2. TRPV1 Katyon Kanalları

TRPV1, nonselektif bir katyon kanalı olup sınırlı kalsiyum selektivitesi olan bir proteindir. Esas olarak tetramerik homomer yapısına sahip olup altı adet transmembran segmenti içermektedir [242].

TRPV1, ilk defa görüntüleme temeline dayanan kalsiyum ekspresyon yöntemi ile saptanmıştır [243]. Temel olarak dorsal kök ganglionlarının afferent nosiseptörlerinde, trigeminal ganglion ve vagal sinirin kaudal gangliyonu olan nodosa gangliyonunda yer almakta ve termal uyarılar ile zararlı kimyasalların tespit edilmesinde önemli rol oynamaktadır [244]. Hipokampus ve striatum da dahil olmak üzere bir çok beyin bölgesinde önemli fonksiyonlara sahip olan TRPV1, periakvaduktal gri madde gibi ağrının ve düzenlenmesinde etkili olan bölgelerde daha fazla eksprese edilmektedir [245,246]. TRPV1 aktivasyonu sonucunda santralde bazal gangliyonlar, hipotalamus, periakvaduktal gri madde ve hipokampustan [247,248], periferde serbest sinir uçlarından [243] glutamat salınımında artış olduğuna dair yayınlar mevcuttur. TRPV1, glutamat salınımını kontrol ederek sinaptik transmisyonu yardımcı olurken [243] GABAerjik sistem TRPV1 aktivasyonundan etkilenmez [249]. Hipokampusta öğrenme ve bellekte rol oynadığı gösterilmiştir [250]. Reseptör aktivitesi protein kinaz A, C ve fosfolipaz C gibi hücre içi sinyal proteinleri tarafından düzenlenir [251]. ATP bağımlı fosforilasyon TRPV1 proteinini aktive ederken, defosforilasyon inaktive eder [252]. Proinflamatuvar sitokinelere (bradikinin, histamin, serotonin, vb.) ve inflamatuvar mediyatörlere duyarlıdır [253]. TRPV1, kapsaisin (KAP) (acı biber ekstresi), vaniloid bileşikler, sıcaklık ($43 > 0^{\circ}\text{C}$) ve asidoz ile aktive olabildiği gibi, çalışmalarda hücre membran depolarizasyonu ile de aktive olabildiği gösterilmiştir [254]. TRPV1, nöronal hücre tiplerinin farklılaşmasında, nöral prekürsörlerin proliferasyonunun düzenlenmesinde, hücre ölümü ya da yaşam süresinin belirlenmesinde de rol oynar [255]. TRPV1 kanallarının yapısında sistein grupları bulunmaktadır [256]. Sistein, indirgenmiş glutatyon (GSH), GSH-Px ve lipoik asit gibi birçok antioksidanın yapısında bulunan bir aminoasittir. Güncel çalışmalarda TRPV1 kanal aktivasyonu üzerine GSH ve N asetil sistein (NAC) antioksidanlarının düzenleyici rolü olduğu gösterilmiştir [257,258]. TRPV1 yapısındaki sistein grupları oksidatif stres ve NO ile aktive olunca TRPV1 kanalları açılmakta ve Na^+ ile Ca^{+2} iyonları hücre içine girmektedir [259]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, selenyumun TRPV1 kanal

aracılı Ca^{+2} girişini, apoptozisi ve oksidatif stresi azaltarak hücrelerde olumlu etkilerinin olduğu da bildirilmiştir [9,10].

TRPV1 kanalları oksidatif stres ile aşırı aktive edildiğinde letal kalsiyum aşırı yüklenmesine neden olmaktadır. Bu nedenle selenyum gibi bir TRPV1 antagonisti ile ortaya çıkarılan korumanın, oksidatif stres sırasında ortaya çıkan aşırı kalsiyum girişinin inhibisyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [9]. Selenyum tedavisi ile hipokampal hücrelerde TRPV1'in modülasyonunun, mitokondrial ROS üretiminde azalmaya, apoptoziste azalmaya ve hücre membranına azalmış kalsiyum girişine neden olduğu bulunmuştur [10].



Şekil 2. Şekilde AH'nda artan Aβ'nın oksidatif stresi uyardığı, böylece artan oksidatif stresin TRPM2 ve TRPV1 kanallarını uyararak Ca^{+2} iyonunun hücre içine girişini artırdığı, artan hücre içi Ca^{+2} 'un mitokondriyi uyararak hem sitozolik Ca^{+2} miktarını artırdığı hem de kaspaz 3-9 salınımını artırarak apoptozise yol açtığı, ROS ve RNS gibi oksidatif ürünlerin salınımı sonucu nöronal eksitotoksisite, sinaptik kayıp ve nöronal hasar oluştuğu ve bunların amiloid plak ve NFY oluşumunu daha da artırdıkları böylece AH'na neden olabildikleri gösterilmektedir. Bu süreçte kapzazepinin (KPZ) TRPV1, ACA'nın TRPM2, selenyumun ise her 2 kanal üzerinde antagonist etki yaparak Ca^{+2} girişini önlemek suretiyle bu patolojiyi önlemeye çalıştıkları gösterilmiştir.

2.7. AH için Kullanılan Deneysel Hayvan Modelleri

Alzheimer hastalığında gözlenen kognitif, davranışsal, biyokimyasal ve histopatolojik anormallikleri tam olarak taklit edebilen deneysel bir hayvan modeli henüz geliştirilebilmiş değildir. Ancak, AH'nın nöropatolojisi ve hastalıkta gözlemlenen kognitif bozukluklar çeşitli farmakolojik ve genetik yöntemlerle modellenenmektedir. Her model hastalığın farklı bir yönünün araştırılmasına imkan sağladığından değerlidir [260, 261].

Deneysel AH modelleri;[260]

- Kolinerjik fonksiyon kaybına bağlı modeller,
- Amiloid β peptid ile ilişkili transgenik olmayan modeller,
- Nörofibriller yumak ile ilişkili modeller,
- Alüminyum toksisitesi modeli,
- Lokal glukoz metabolizması, serebral kan akımı ve sitokrom oksidaz aktivitesinin azaltılması ilkesine bağlı modeller,
- Transgenik hayvan modelleri.

2.7.1. Kolinerjik Fonksiyon Bozulmasına Bağlı Modeller

AH'nın patofizyolojisinde birçok nörotransmitter sistemlerini ilgilendiren bozukluklarla ilişkili bilişsel ve davranışsal problemler oluşur. Hayvan modellerinin çoğu AH ile en çok ilişkili olduğu bilinen kolinerjik hipoteze odaklanmaktadır. Bazal ön beyinde yerleşim gösteren ve öncelikle neokortekse projekte olan Meynert'in bazal çekirdeğindeki kolinerjik nöronların dejenerasyonu hastalığın erken evrelerinde oluşmaktadır [260, 262, 263]. Meynert'in bazal çekirdeği başta olmak üzere bazal ön beyin, kortikal ve hipokampal kolinerjik innervasyonun temel kaynağı olduğundan bu bölgenin dejenerasyonu bilişsel fonksiyon kayıpları ile ilişkilidir [264]. AH'nın özellikle bilişsel fonksiyon kayıplarına yönelik belirtilerini taklit etmek ve incelemek amacıyla deney hayvanlarının beyinlerinde farklı yöntemlerle akut veya kronik kolinerjik hasar oluşturan modeller kullanılmaktadır [262, 263]. Kolinerjik reseptörler nikotinik ve muskarinik olmak üzere 2 alt birimden oluşmaktadır.

Muskarinik reseptör sayısının AH ile daha fazla ilişkili olduğu düşünülmektedir [265]. Muskarinik reseptörlerin öğrenme ve bellek, bilişsel işlevler, uykunun ve duygudurumun düzenlenmesi gibi bir dizi işlevde rol oynadığı bildirilmiştir [266].

Literatürde deney hayvanlarıyla gerçekleştirilen AH modellerinin test edilmesi amacıyla farklı öğrenme deneylerinin kullanıldığı, bunların birbirine göre farklı açılardan üstünlükleri olduğu bilinmektedir.

AH'ndaki kortikal kolinerjik involüsyonun pathogenezi incelemek için çeşitli lezyon modelleri de geliştirilmiştir. Bu amaçla elektrokoagülasyon [267], mekanik (fimbria/forniks çapraz kesisi) ve kimyasal (AF64 gibi kolinerjik sisteme spesifik olan ya da eksitotoksin veya kolinotoksin gibi spesifik olmayan toksinlerin uygulanması) yöntemler geliştirilmiştir [268]. Elektrokoagülasyon yönteminde bipolar bir prob aracılığı ile beyin seçilen bir bölgesine belli bir frekansta akım uygulayarak doku hasarı oluşturulması prensibine dayanır [267].

2.7.2. Skopolamin ile Deneysel AH Modeli Oluşturulması

Skopolamin non-selektif muskarinik reseptör antagonisti parasempatolitik, santralde sedatif, antiemetik, amnezik etkili, hayvan deneylerinde universal amnezik olarak kabul gören tropan alkaloidi bir ilaçtır [269, 270]. Muskarinik reseptörleri yüksek seçicilik ile bloke ettiği ancak yüksek dozlarda nikotinik reseptörleri de bloke edebildiği gösterilmiştir. Parasempatolitik etkisinden dolayı sıklıkla kullanılmaktadır [271]. MSS'de muskarinik reseptörler korteks, hipokampus, striatum ve beyin sapındaki nöronlarda yer alırlar [269, 272]. Muskarinik reseptörlerin 5 alt tipine (M1-M5, G-protein kenetli) karşı non-selektif antikolinerjik etkilidir. Beyinde baskın olarak M1 ve M5 reseptörleri bulunur. M2 reseptörleri ise presinaptik yerleşimde bulunur ve otoreseptör olarak görev alır. M2 reseptör blokajı sinaptik aralıkta Ach miktarını artırır [273, 274]. Skopolamin lipofilik yapıda olduğundan kan-beyin bariyerini aşarak MSS'ne geçer ve muskarinik reseptörleri bloke ederek santral etkiler oluşturur [275]. Skopolaminin beyinde Ach seviyelerini azalttığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Skopolaminin beyinde AchE enzim aktivitesini artırdığı, bu durumun Ach seviyelerindeki azalmanın muhtemel sebebi olabileceği bildirilmiştir [276]. Santral Ach reseptörlerinin bloke edilmesinin, sıçanlarda ve

insan olmayan primatlarda öğrenme ve bellek fonksiyonlarını bozduğu bildirilmiştir [277, 278].

Bir muskarinik reseptör blokerleri olan skopolamin, sağlıklı gönüllülerde AH ile benzer özellikler taşıyan bellek bozukluğuna yol açtığından bilişsel ilaç araştırma testlerinde sıklıkla kullanılmaktadır [279].

Skopolamin doza ve zamana bağlı bir şekilde dikkat gücünü, dikkat devamlılığını, çalışan bellek kalitesini, episodik ikincil bellek kalitesini ve bellek hızını bozar ve skopolamin kaynaklı kognitif bozukluk reversibl olduğundan, kognitif fonksiyonları düzeltebilen bileşiklerin belirlenmesi için uygun bir modeldir [280]. Transgenik modellerle karşılaştırıldığında oluşturulmaları daha kolay, zahmetsiz ve ucuzdur. Skopolaminin neden olduğu kolinerjik fonksiyon bozukluğunun amneziye neden olduğu, bu amnezik durumun Alzheimer hastalığında ve senil demansta görülen kognitif bozukluğa benzer olduğu ve bu nedenle, deneysel Alzheimer hastalığı modeli oluşturabilmek amacıyla kullanılabileceği bildirilmektedir [281-283]. Skopolamin kaynaklı hafıza bozukluğu, hafıza süreçlerinin davranışsal ve biyokimyasal bileşenlerinin her ikisinin de değerlendirilmesi için iyi bilinen bir hayvan modelidir [284, 285].

Bu bulgulardan hareketle non-invaziv bir yöntem olması, sıklıkla çalışmalarda tercih edilmesi, cerrahi yöntemlere göre daha kolay uygulanabilmesi, geri döndürülebilir bir bilişsel bozulmaya neden olması gibi avantajları nedeniyle bu çalışmada sistemik olarak skopolamin uygulanarak kognitif fonksiyonlar araştırılmıştır[267].

Skopolaminin sistemik uygulanmasının insanlarda kognitif defisitlere neden olduğu bilinmektedir. Ayrıca, skopolaminin, ratların serebral kortekslerindeki APP ve mRNA seviyelerinde artışa yol açtığı da gösterilmiştir [286]. Skopolamin, yaşlı demanslı örneklere benzer şekilde genç gönüllülerde de geri döndürülebilir bilişsel kayıpları indüklemektedir [287].

Skopolamin motor öğrenmeyi bozar ve lokomotor aktivitede artışa yol açar. Skopolamin; merkezi infüzyon şeklinde uygulandığında infralimbik korteks [288], kaudat nükleus [289], medial septal bölge [290] ve septal hipokampus [291] gibi beyin bölgelerinin uzamsal alternasyonunda rol oynadığı çalışmalarda gösterilmiştir.

Çalışmalarda skopolaminin peririnal (perirhinal) korteks içine uygulanmasının objeleri saptama yeteneğini bozduğu gösterilmiştir [292-295]. Skopolaminin, hipokampusa lokal enjeksiyonu bilginin kodlanması sürecinde uzamsal bellekte bozulmaya neden olur. Skopolaminin medyal septuma infüzyonunda ise uzamsal öğrenme bozulmuş ve hipokampustan Ach salınımı azalmıştır [279].

Bazı çalışmalarda radial labirent testinde skopolaminin sistemik uygulaması sonucu belirgin performans kayıpları görüldüğü bildirilmiştir [295], bazı çalışmalarda ise 0.5mg/kg ve daha yüksek dozlarda skopolaminin sistemik uygulamasından sonra belirgin performans bozuklukları olduğu bildirilmiştir [271, 296].

Skopolamine bağlı hafıza kaybı öğrenme ve bellek ile ilişkili özel yapıların yanı sıra tüm beyinde artan oksidatif stres ile ilişkilidir [297]. Skopolaminin GSH gibi antioksidan molekülleri azalttığı ve böylece artmış LPO yoluyla beyin hücrelerine daha fazla zarar verdiği bildirilmiştir [284]. Skopolamin verilen sıçanlarda, yaşlılıkta ve AH olan bireylerde olduğu gibi EEG'de yavaş delta ve teta dalgalarının arttığı bildirilmiştir [298].

2.8. Deneysel AH Modellerinde Kullanılan Düzenekler

Deney hayvanlarında oluşturulan demans modelinin türüne, araştırılmak istenen bellek çeşidine, kullanım kolaylığına, maliyetine, erişilebilirliğine ve diğer birçok duruma göre tercih edilebilecek çok çeşitli düzenekler mevcuttur. Çalışmamızda 8 kollu ışınsal labirent test düzeneğini kullandık.

2.8.1. Sekiz Kollu Işınsal Labirent Testi (Radial Arm Maze Testi)

İlk kez Olton ve Samuelson tarafından 1976 yılında uzamsal(mekânsal) öğrenme ve belleği hesaplamak için dizayn edilmiştir [299]. Mekansal hafıza hem bireylerin hem de türlerin hayatta kalması ile ilgili olduğundan biyolojide son derece önem taşımaktadır. Davranışsal testler arasında, uzamsal öğrenme ve belleği ölçmek için en uygun cihazlardan biridir [299].

Işınsal kollu labirent testleri kemirgenlerde öğrenme ve belleği değerlendirmek için kullanılan modellerden birisidir. Birçok çalışmada kısa süreli ve

uzun süreli hafızayı ölçmek için yaygın olarak kullanılmıştır. Ratların minimal bir çaba ile yiyecek bulmaları ve çevrelerini keşfetmeleri için optimal bir strateji geliştirmeleri öncülüne dayanmaktadır. Uzamsal hafıza testi olarak da bilinen ışınsal kollu labirent testi, dairesel bir alandan çevreye yayılan birçok koldan oluşur [300]. Orijinal labirent sekiz koldan oluşmakla birlikte yapılan çalışmalarda en az 3 [301] ve en fazla 48 kola sahip [302] modifiye labirentler de kullanılmıştır.

Seçilen protokole göre istenen sayıdaki kollara ödül olarak yem konur. Hayvan labirenteki ve odadaki uzaysal ipuçlarına göre yemin bulunduğu kol veya kolları bulmaya çalışır. Hayvanların bir kolda ödül olup olmadığını kontrol ettikten sonra yeni bir kolu incelemek için her seferinde merkez platforma dönmek zorunda olmaları öğrenmeyi zorlaştıran bir faktördür. Çünkü her defasında 8 olası seçeneği olacaktır [299].

Radyal labirent testi ilaçların bellek performansını nasıl etkilediğini araştırmakta faydalı olduğu gibi, toksik maddelerin bellek performanslarına olumsuz etkilerini araştırmak için de yararlı olduğu gösterilmiştir [303].

Birçok çalışmada kısa süreli ve uzun süreli uzamsal hafızayı ölçmek için yaygın olarak kullanılmıştır [304-309].

AH'nın etyolojisinde oksidatif stres önemli rol oynamaktadır. AH'nda artan oksidatif stres ile ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri, nöronlarda dejenerasyona sebep olmaktadır. Eser element olan selenyumun, antioksidan sistemin bir bileşeni olarak bu dejenerasyonu azalttığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Ancak, selenyumun hangi mekanizma ile bilişsel fonksiyonlar üzerinde olumlu etkileri olduğu tam olarak bilinmemektedir. Çalışmamızda skopolaminin intraperitoneal uygulamasıyla oluşturulan demans modelinde selenyumun öğrenme ve bellek performanslarına etkisinin gösterilmesi, demansta selenyumun olumlu etkilerinin hangi mekanizmalar üzerinden olduğu, TRPM2 ve TRPV1 kanallarının demansa bağlı hücre ölümüyle ilişkileri ve rolleri, demans oluşturulan ratlarda selenyumun apoptozis, oksidatif stres, kalsiyum iyon düzeyleri ve özellikle TRPM2 ve TRPV1 katyon kanalları üzerine düzenleyici etkilerinin ortaya çıkarılması ile hücre hasarlarını sınırlamaya yönelik yeni stratejilerin geliştirilmesine yardımcı olunması hedeflenmektedir.

3. MATERYAL-METOD

Çalışmamız, Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 4257-TU2-15 proje numarası ile desteklenmiştir. Öğrenme deneyi aşamaları ve ilaç uygulamaları Süleyman Demirel Üniversitesi Deneysel Hayvanları ve Tıp Araştırmaları Uygulama ve Araştırma Merkezinde, analizler ise Süleyman Demirel Üniversitesi Biyofizik ve Sinir Bilimleri Anabilim Dalları ile Nörolojik Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi (NÖROBAM) Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Deneysel hayvanlarının bilimsel amaçla kullanılabilmesi için SDÜ Tıp Fakültesi Hayvan Etik Kurulundan 10.02.2015 tarih ve 03 sayılı kararı ile onay alınarak etik kurallarına uygun bir şekilde yapılmıştır.

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler

Laminer Akım Kabini Jouan B4I (Fransa)

Hassas Teraziler, Scaltec SPB 32 (İsviçre)

Soğutmalı Santrifüj, Kubota, (Japonya)

Derin Dondurucu, Uğur (Türkiye)

Inverted Floresan Mikroskop, Zeiss, Axiovert 40CFL (Almanya)

Otomatik Pipetler, Eppendorf (Almanya), Gilson (Fransa)

pH metre, Hanna Instruments (Portekiz)

Manyetik Karıştırıcı, Nüve (Türkiye)

CO₂ İnkübatör, Heal Force, Smart Cell (Japonya)

Hücre Kültürü Flask, Cell Star, Greiner bio-one (Almanya)

96 Kuyucuklu şeffaf mikroplate, Greiner Bio-one (Almanya)

96 Kuyucuklu siyah mikroplate, Greiner Bio-one (Almanya)

Plate Reader Fluorescence, Infinite 200 PRO, TECAN (Avusturya)

Vorteks, Nüve NM 100 (Türkiye)

Floresan Spektrofotometre: (Cary Eclipse, Varian Firması, Avustralya)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Fetal Bovine Serum, Merck (Almanya)
2. DMSO (Dimethyl Sulphoxide) Hybri-Max, Sigma (USA)
3. Falcon tüp (15 ml sterile polypropylene conical bottom Screw cap tip 92159, Biolab, Macaristan)
4. Penicillin/Streptomisin Sigma (USA)
5. RPMI-1640
6. 25 cm²'lik kültür kabı (25, 24cm², Tissue culture flasks, TTP, İsviçre)
7. 75 cm² kültür kabı (75 cm², Tissue culture flasks, TTP, İsviçre)
8. Penisilin-G (100 U/ml) Streptomisin (100µg/ml), (Hyclone, USA)
9. RPMI 1640 (Hyclone, USA)
10. Dihydrorhodamine-123 (DHR-123)
11. EGTA, Merck (Almanya)
12. Triton X-100, Sigma (Almanya)
13. Fura-2 AM, Calbiochem (Almanya)
14. Caspaz-3 kiti, (AC-DEVD-AMC) Sigma (USA)
15. Caspaz-9 kiti, (AC-LEHD-AMC) Bachem (İsviçre)
16. Sodyum selenit, Sigma (USA)
17. Scopolamine hidrobromid, Sigma (USA)
18. İndirgenmiş glutatyon (GSH), Sigma (USA)
19. nonidet-P-40 substitute (NP40), Sigma (USA)
20. 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid, hydrate (MES hydrate), Sigma (USA)

21. Polietilen glikol (PEG), Sigma (USA)
22. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), Sigma (USA)
23. 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), Sigma (USA)
24. Sümen hidroperoksit (CHPx), Sigma (USA)
25. PARP, Sigma (USA)
26. β -actin, Sigma (USA)
27. dithiothreitol (DTT), Sigma (USA)
28. Dihydrorhodamine-123 (DHR-123), Eugene (USA)
29. dimethyl sulfoxide Eugene (USA)
30. tris-glycine gels Eugene (USA)
31. N-acetyl-Leu-Glu (DMSO), Gibco (Istanbul, Turkey).
32. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) Gibco (Istanbul, Turkey).
33. Beyaz damla çikolata, Altınmarka (Türkiye)

3.2. Yöntem

3.2.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada 18-24 aylık, toplam 32 erişkin yaşlı dişi Wistar albino türü rat kullanılmıştır. 2 hayvan 1 kafeste olacak şekilde kafes düzeni ayarlanmıştır. Tüm ratlar için standart sıcaklık (20 °C), nem oranı (%50) ve standart ışık şartları (12 saat karanlık 12 saat aydınlık olacak şekilde) sağlanmıştır. Işınsal 8 kollu labirentte öğrenme, yemek bulma güdüsü ile sağlandığı için deneyden önce ratlar normal kilolarının %85' inden aşağıya inmeyecek şekilde, yem kısıtlamasına tabi tutulmuşlardır. Su kısıtlaması hiç yapılmamış, suya serbestçe erişebilecekleri

ortamda yaşatılmışlardır. Çalışmamızda öğrenme ve bellek testlerini uygulamak amacıyla 8 kollu ışınsal labirent test düzeneği kullanılmıştır.



Şekil 3. Ratların zamanlarını geçirdiklerin kafeslerin görünümü

3.2.2. Sekiz kollu Işınsal labirent Testi (Radial Arm Maze Testi)

Kullandığımız sekiz kollu labirent test düzeneği, siyah pleksiglastan, en uzun iki nokta arası 45 cm olan sekizgen bir platform ve sekizgen platformda kenarlarına dik olarak yerleştirilmiş 85 cm uzunluğunda, 10 cm genişliğinde, kollardan oluşmaktadır. Kolların birbiri ile olan açısı 45 derecedir. Kolların kenarında 2 cm'lik duvar vardır. Ortadaki sekizgen platformun etrafında ise 20 cm'lik duvar bulunur ve kolların sekizgen platform ile bağlantısı manuel olarak indirilip kaldırılabilen giyotin bir kapı ile sağlanır.

Eğitim ve test süresince test odasındaki eşyaların yerleri sabit tutuldu. Test odasının sessiz ve ışısız olması sağlandı. Bunun için pencereler siyah karton ile kaplandı ve dışarıdan ışık girmesi engellendi. Oda duvarlarına yerleri deney süresince sabit olacak şekilde, düzeneğin dışı görsel ipucu oluşturmak amacıyla renkli kağıtlar yerleştirildi. Odadaki tek ışık kaynağı düzeneğe loş ışık verecek şekilde yerleştirildi. Rastgele 4 gruba ayrılmış tüm ratlara 14 gün boyunca 8 kollu ışınsal labirent eğitim protokolü uygulanmıştır.



Şekil 4. Labirentin deney için hazır hale getirilmiş hali görülmektedir. Şekilde de görüldüğü gibi yem/ödül bulunan kolların karşısına renkli kağıtlar asılarak ratların yem/ödül bulunan kodları bu renklerle kodlayarak öğrenmelerine yardımcı olunması hedeflendi. Şeklin sol alt köşesindeki kolda ödül/yem olarak kullanılan beyaz damla çikolatanın testler sırasında bulunduğu konum da görülmektedir.

3.2.2.1. Labirent Testi için Ratların Eğitilmesi

1. ve 2 günlerde ratlar birer birer sekizgen platformun üzerine 5 dakika süre ile koyuldu ve düzeneğe alışmaları sağlandı. Ratlar koyulmadan önce sekizgen platforma ratların daha kolay alışmaları için beyaz damla çikolata serpildi. Bu esnada platformun kenarındaki kollara açılan giyotin kapılar kapalı konumda idi. 2. günün gecesinden itibaren ratlar 24 saatte 16-18 saat aç bırakıldı ve 9. güne kadar ağırlıklarının %15'i kadar kilo kaybetmeleri sağlandı. Bu aç bırakılma süreci test düzeneğinde yem bulma konusundaki motivasyonlarını artırmak için uygulandı.

3-8. günlerde, günde 1 defa olmak üzere ratlar birer birer test düzeneğine yerleştirildi. Bu süreçte rastgele seçilmiş 4 koldaki (1., 3., 5., ve 7. kol) giyotin kapılar açıktı. 3. gün açık olan kollara giyotin kapı girişinden kol uçlarına kadar olmak üzere yem konuldu, merkezi platforma yem konulmadı. Bunun sebebi ratların kollara girme konusunda cesaretlerini artırmak idi. Düzeneğe yerleştirilen ratların en az 5 dakika süreyle düzenekte kalmaları sağlandı. Her rat için ayrılan süre sona erdiğinde labirent %30'lik etil alkol ile temizlenerek her defasında temiz bir labirent zemini sunuldu. Bu işlem eğitim ve test süresince devam etti. 4 ve 5. günlerde kollara yerleştirilen yemler giyotin kapı girişinden daha uzağa, kolların orta ve uç

kısımlarına yerleştirilmeye başlandı. 6-7-8. günlerde yemler sadece açık kolların uç-orta kısmına ve en uç duvardan 1,5 cm uzak olacak şekilde yerleştirildi. Yemlerin 1 cm² alan kaplamasına dikkat edildi.

9-10-11-12-13-14. günlerde ratlar düzeneğe yerleştirilmeden önce, daha önce eğitim esnasında öğrendikleri kolların uç kısımlarına 1 cm² alan kaplayan beyaz damla çikolata yerleştirildi. 8 koldaki tüm giyotin kapılar açık bırakıldı. Ratlar birer birer merkezi platforma alındı. 15. gün test, ratın 4 koldaki yemi de bulması, ya da bunun mümkün olmaması halinde 10 dakika ile sınırlandırıldı. 10. dakikada yemi bulamayan rat düzenekten alındı. Bu şekilde davranış deneylerinin eğitim aşaması tamamlandı.

Bu şekilde tüm ratlar deney protokolüne uygun şekilde 2 hafta süreyle her gün aynı saatte, aynı eğitici tarafından ve aynı kıyafetlerle eğitildi. Eğitim sürecinin bittiği 15. günde başlangıç bellek kayıtları alınmıştır. Tipik bir ratın yiyecek kısıtlaması yapıldığında ve yaklaşık 14 gün labirente alıştırdığında test için hazır olacağı yayınlarda bildirilmektedir [310].

Eğitim dönemi boyunca ratların test düzeneğinde geçirdiği dönemler video ile kaydedildi. Ratların labirentteki eğitim dönemlerinin bitişinin ardından tüm ratlar başlangıç bellek performanslarının saptanabilmesi amacıyla teste tabi tutulmuş ve kısa ve uzun süreli bellek performansları ölçülmüştür.

3.2.2.2. Işınsal Kollu Labirent Ölçümleri ve Hesaplamaları

Labirent testi ile çalışma belleği ve referans belleği hataları tespit edilerek uzun ve kısa süreli bellek performansları saptandı. Ratın labirentte geçireceği maksimum süre 10dk (600sn) ile sınırlandırıldı. Şayet dört koldaki yemin tamamını 10 dakikadan daha az sürede bulduysa, o rat için test tamamlanmış sayıldı.

1. Çalışma belleği hatası (working memory error (WME)); Prensipte olarak ratın yem bulunan kola bir kez girmesi ve yemi alması beklenir. Yem konulmuş kola ikinci kez girmesi WME olarak tanımlanır. Çalışma belleği her denemedeki değişikliklerin hatırlandığı kısa süreli bellek olarak düşünülür (her denemede

önceden girilen kolların pozisyonu için hafıza). Sağlıklı, mutlu ve motive bir ratın bu görevi öğrenebileceği bildirilmektedir [311, 312].

2. Referans belleği hatası (reference memory error (RME)); Prensipte olarak ratın yem bulunmayan kola girmemesi gerekir. Yiyecek konmamış kola ilk girişi RME olarak tanımlanır. Referans belleği bilgi için uzun süreli bellek olarak değerlendirilir ve tekrarlayan denemelerde (yemlenmiş kolların pozisyonuna dair bellek) sabit kalır[311, 312].

Tedavi etkisi, zaman etkisi ve tedavi X zaman etkileşimi için tekrarlayan ölçüm sonuçları istatistiksel olarak analiz edildi. Tüm sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak ifade edildi. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı olarak değerlendirildi. Analizler SPSS programı kullanılarak yapıldı[310].

Eğitim süreci tamamlanan ve başlangıç bellek kayıtları alınan tüm ratlar gruplarına uygun şekilde ilaçlarının verileceği aşamaya geldi.

3.2.2.3. İlaç Uygulama ile Eş Zamanlı Hatırlatma Eğitimleri Aşaması

Başlangıç bellek kayıtlarının alınması sonrası ilaç uygulamaları aşamasına geçildi. Bu süreçte ratların eğitim aldıkları labirenti ve yemlenmiş kolları unutmamaları amacıyla haftada 2 gün her rat için 5 dakika süreyle hatırlatma eğitimleri yapılmıştır.

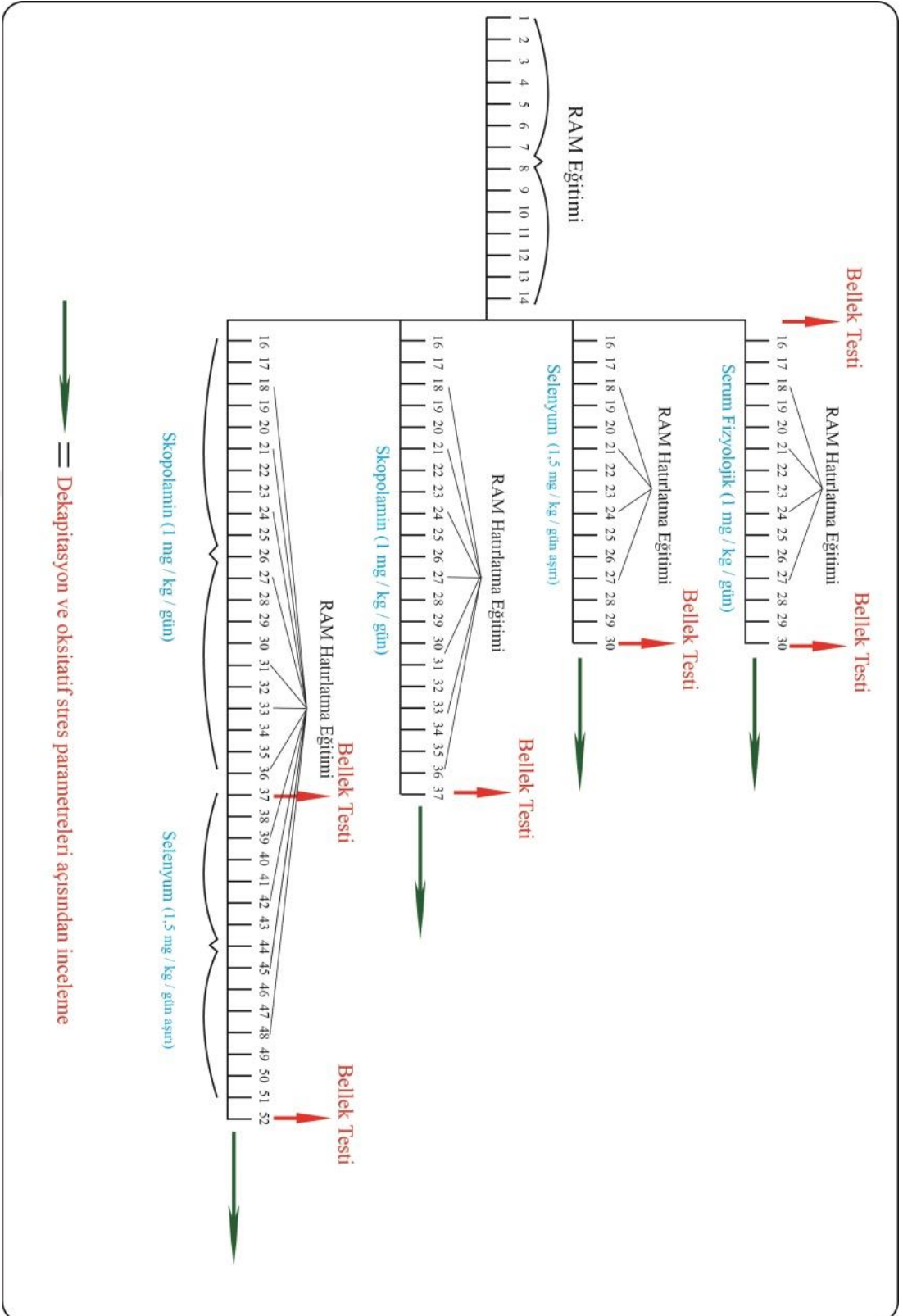
1. Gruba (kontrol grubu $n=8$) 2 hafta boyunca periton içi serum fizyolojik uygulandı bu süreçte haftada 2 kez ışınsal labirentte hatırlatma eğitimleri yapıldı. 2 haftanın sonunda ratlara 8 kollu labirent testi uygulandı ve son bellek kayıtları alındı.

2. Gruba (selenyum grubu $n=8$) 2 hafta boyunca gün aşırı periton içi 1.5 mg/kg/gün dozunda selenyum (sodyum selenit) uygulandı bu süreçte haftada 2 kez ışınsal labirentte hatırlatma eğitimleri yapıldı. 2 haftanın sonunda ratlara 8 kollu labirent testi uygulandı ve son bellek kayıtları alındı.

3. Gruba (skopolamin grubu $n=8$) 3 hafta boyunca periton içi 1 mg/kg/gün dozunda skopolamin %0,9 serum fizyolojik ile sulandırılarak (dilüe edilerek) uygulandı bu süreçte haftada 2 kez ışınsal labirentte hatırlatma eğitimleri yapıldı. 3 haftanın sonunda ratlara 8 kollu labirent testi uygulandı ve son bellek kayıtları alındı.

4. Gruba (skopolamin+selenyum grubu n=8) 3 hafta boyunca hergün periton içi 1 mg/kg/gün dozunda skopolamin %0,9 serum fizyolojik ile sulandırılarak (dilüe edilerek) uygulandı bu süreçte haftada 2 kez ışınsal labirentte hatırlatma eğitimleri yapıldı. 3 haftanın sonunda ratlara 8 kollu labirent testi uygulandı ve o aşamadaki bellek kayıtları alındı. Daha sonra 2 hafta boyunca gün aşırı periton içi 1.5 mg/kg/gün dozunda selenyum uygulandı bu süreçte de haftada 2 kez ışınsal labirentte hatırlatma eğitimleri yapıldı. 5. Haftanın sonunda 8 kollu labirent testi uygulandı ve son bellek kayıtları alındı.





Şekil 5. İlk günden son güne kadar çalışma sürecinde gün gün neler yapıldığı şekilde gösterilmektedir.

Bellek kayıtları alınan, ilaç uygulamaları tamamlanan ratlar dekapite edilerek çeşitli oksidatif stres parametreleri, iyon kanalları, apoptozis süreçleri açısından incelenecekleri laboratuvar aşamasına geçti.

3.2.3. Laboratuvar Analiz Aşaması

İlaç uygulaması biten gruplarda son bellek kayıtlarının alınması sonrası ratlar analizlerin yapılacağı Biyofizik laboratuvarına götürülmüştür. İnhalasyon anestezisi işleminden sonra dekapitasyon yapılarak ekip halinde çalışarak hızlı bir şekilde, hipokampus dokusu çıkarıldı ve hipokampal hücreler elde edildi.

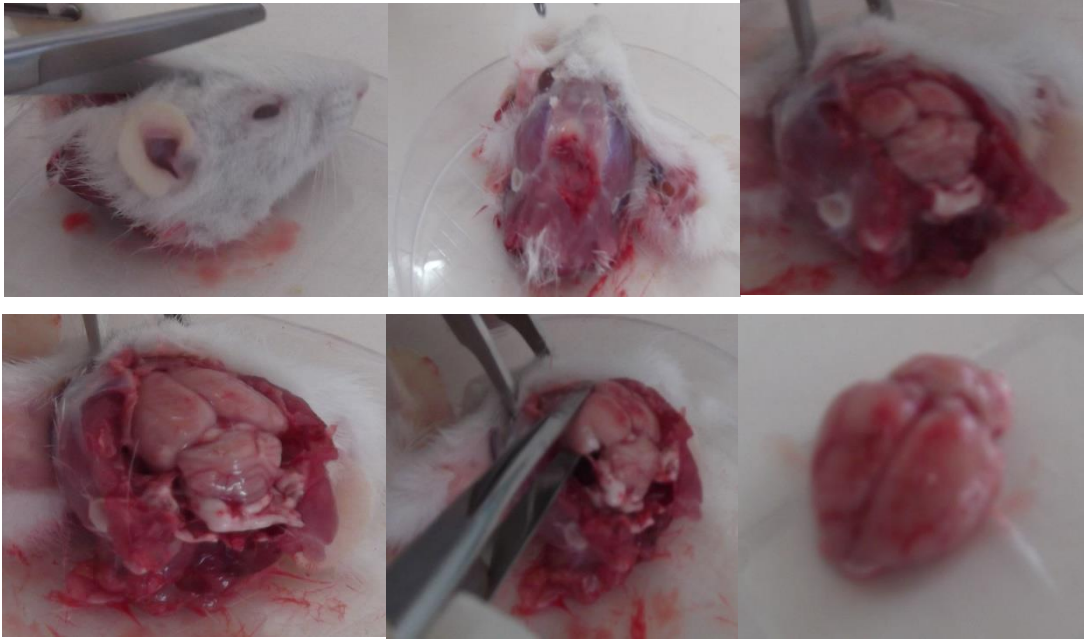
3.2.3.1. Hipokampal Nöron İzolasyonları ve Plazma ile Alyuvar Eldesi

Ratlar eter ile inhalasyon anestezisi işlemine tabi tutuldu. Yeterli anestezi indüksiyonu sağlandıktan sonra dekapitasyon işlemi yapıldı ve takiben hiç vakit kaybedilmeden hipokampus izolasyonlarının elde edildiği beyin dokusu hızla çalışıldı.

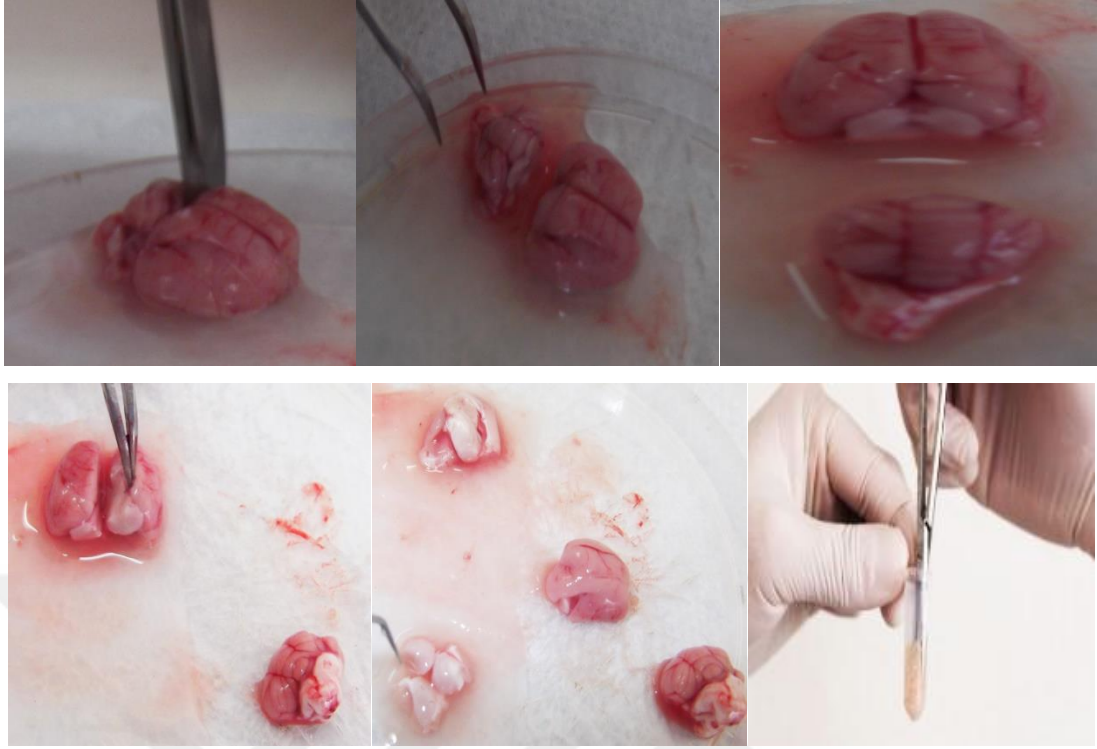
Hipokampus izolasyonu sırasında, kafatası ince uçlu makas aracılığıyla kesilmiş ve beyin bir bütün halinde 3-5 ml HBSS (Hank's Balanced Salts Solution) solüsyonu içerisine çıkarılmıştır. Pens yardımıyla nazikçe tutulan serebellum bistüri yardımıyla beyin dokusundan ayrılmış ve beynin frontal lob uç kısmından sağlı sollu 2 hemisferden küçük parçalar kesilmiştir. Bu işlem hipokampusu daha kolay ve zarar vermeden çıkartabilmek için yapılmıştır. Sonra her iki serebral hemisferi ayırmak için ortadan sagittal kesit atılmıştır. Daha sonra buz aküsü üzerine konulan kâğıt havlu üzerine HBSS solüsyonu dökülerek (3-4 ml) üzerine her bir hemisfer işlem sırası geldiğinde konulmuş ve üzerine tekrar 2-3 ml civarında HBSS solüsyonu dökülmüştür. Sonrasında hipokampal bölge 2 adet pens yardımıyla nazik hareketlerle çıkarılmış ve çıkartılan hipokampuslar içerisinde 1ml HBSS bulunan ependorfa yavaşça konularak mekanik parçalama işlemine geçilir ve sırası ile ilk önce 1 ml hacimli (farklı genişliklerdeki uçlarla) pipet uçları ile daha sonra 200 mikrolitre hacimli pipet uçları ile ve en sonunda da steril insülin iğnelerinden geçirilerek mekanik parçalanma işlemi tamamlanacaktır.

Daha sonra parçalanmış hipokampal dokular 15 ml'lik Falcon tüpüne aktarılarak son hacim 7 ml oluncaya kadar üzerine 37 °C HBSS ilave edilmiş ve son hacim 10 ml oluncaya kadar da Tripsin enzimi doku homojenizasyonu sağlamak amacıyla ilave edilmiştir (3 ml). Yarım saat çalkalamalı su banyosuna her 10 dakikada bir pipetaj yapmak üzere konulmuştur. Yarım saat geçtikten sonra 3 kez 5'er dakika süreyle santrifüje tabi tutularak süpernatantlar dökülmüştür. Dipte kalan hücreler üzerine 5 ml HBSS eklenmiştir. Homojen bir şekilde pipetaj hareketleriyle karıştırılarak yarısı (2,5 ml) ikinci bir 15 ml hacimli falcon tüpüne konulmuştur. 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 bekletilmiştir. Sonra hücreleri yıkamak amacıyla santrifüj işlemine tabi tutulmuş ve süpernatant dökülüp PBS (x1) tamponu ile homojen hale getirilerek floresan boyar maddesi Fura-2-AM maddesi ilave edilerek 45 dakika süre ile 37 °C de çalkalamalı su banyosuna konulmuştur.

Antikoagülan (EDTA) lı kanlar 1500 g santrifüj edilerek plazma ve alyuvar örnekleri elde edildi. Tüplerin alt kısmındaki alyuvar örnekleri 1500 de 3 kez serum fizyolojik ile yıkandı, sonrasında 1/10 oranında fosfat tamponu ile sulandırıldı. Plazma ve alyuvar örnekleri -33 °C de 1 ay aklandıktan sonra antioksidan analizleri yapıldı.



Şekil 6. Ratlardan beyin dokusunun izole edilmesi



Şekil 7. Beyin dokusundan hipokampal dokunun izole edilmesi

3.2.3.2. Antioksidan ve Oksidan Analizleri

Hipokampal nöronlarda lipit peroksidasyon düzeyleri Placer ve arkadaşlarının (1966) bildirdiği yöntemle göre [313], GSH düzeyleri Sedlak ve Lindsay'ın (1968) bildirdiği yöntemle göre [314] ve GSH-Px aktiviteleri Lawrence ve Burk'un (2012) bildirdiklerine yöntemle göre [315], spektrofotometrik olarak yapıldı. Ayrıca, GSH, GSH-Px ve LPO sonuçları protein cinsinden verileceği için, biüret yöntemine göre toplam protein düzeyleri belirlendi.

3.2.3.3. GSH ve GSH-Px Analizleri

GSH düzeyleri Sedlak and Lindsay'in bildirdikleri yöntemle göre [314] spektrofotometre cihazı ile belirlendi. GSH-Px enzim aktiviteleri Lawrence ve Burk tarafından bildirilen yöntemle göre [315] spektrofotometrede belirlendi.

3.2.3.4. LPO Analizi

Hücrelerin LPO düzeylerinin belirlenmesi, Placer ve arkadaşlarının bildirdikleri yöntemle göre [313] tiyobarbitürik asit (TBARS) reaksiyonu ile son derece hassas bir spektrofotometrede (Schimadzu, UV-1800, Japonya) yapıldı.

3.2.3.5. İntraselüler Ca^{+2} Ölçülmesi

Hücre içi kalsiyum miktarının ölçümü için hipokampus hücreleri oda sıcaklığında 45 dakika boyunca $4\mu M$ fura-2 AM flüoresan boyası ile boyandı [316]. Boyanma işleminden sonra yıkamaya tabi tutulan hücre manyetik olarak karıştırılan, şeffaf küvetlere hücre yoğunluğu 2×10^6 olacak şekilde Na^+ -HEPES [(mM cinsinden) NaCl, 140; KCl, 4,7; $CaCl_2$, 1,2; $MgCl_2$, 1,1; glukoz, 10 ve HEPES, 10 (pH 7.4)] solusyonu içerisinde florasan spektrofotometrede (Varian Cary Eclipse, Australia) haznesine yerleştirildi. Fura-2 AM için eksitasyon dalga boyları 340 nm ve 380 nm, 505 nm emisyon dalga boylarında flüoresan ışık ile uyarıldı ve yaklaşık yedi dakika boyunca kayıt alındı. Hücre içi serbest Ca^{+2} iyon düzeyi değişimleri bilgisayar ekranında 340 nm/380 nm dalga boylarındaki uyarımları ile kaydedildi ve Grynkiewicz ve arkadaşlarının metoduna göre hesaplandı [317]. Hipokampus hücreleri izole edilip hücre kültürüne alındıktan sonra Ca^{+2} sinyali çalışmaları yapıldı. Bu ortamda nörotransmitter madde olmadığından kimyasal (ligand) kapılı kalsiyum kanalları aktif değildi. Hücre kültürü ortamında hücrelerde voltaja duyarlı kanallar ile TRPM2 kanalları vardı. Voltaja duyarlı Ca^{+2} kanalları, kalsiyum kanal blokörleri olan diltiazem ve verapamille bloke edildi ve ortamda sadece TRPM2 kanalları kaldı. Gruplar arası farklılık saptandığında, hücreler hem TRPM2 kanal blokörü anthranilic acid (ACA) [318, 319] hem de TRPV1 kanal blokörü KPZ (0.1 mM) ile inkübe edildi. Sonrasında, TRPM2 kanal antagonisti H_2O_2 (0.1-1 mM) ve KAP (0.01 mM) uyarımı yapıp hemen mitokondriyal depolarizasyon miktarları belirlendi [320].

3.2.3.6. Hücre Canlılığı (MTT Analizi)

Bu deneyde sarı renkte olan 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide maddesi canlı hücreler tarafından mitokondrial solunum yolu ile mor renkli formozan kristaline dönüştürülmektedir. Eğer hücreler canlı değilse bu reaksiyon gerçekleşmez. Renk oluşumu da spektrofotometrik yöntemle değerlendirilir ve sonuçlara göre oksidatif stres için apoptoza götürmeyen fakat Ca^{+2} akışını sağlayan en uygun doz miktarı belirlenmektedir.

Spektrofotometrede (UV-1800) 490 nm ve 650 nm dalga boylarında okunup bu iki dalga boyunda okunan değerler birbirinden çıkarıldı. (Abs490 nm – Abs650 nm: x) [321]. Sonuçlar kontrole kıyasla misli artış (fold increase) olarak verildi.

3.2.3.7. Hücre içi ROS Üretimi Tayini

Hipokampus sinir hücrelerinde hücre içi ROS üretimi Biyofizik Anabilim mevcut tabak okuyucu (Pleate reader, infinite pro200 marka, Avusturya) ile yapıldı. Rhodamine 123(Rh 123), DHR 123 hücreye kolayca nüfuz edebilen, florasan olmayan yüksüz bir moleküldür. 2'-DHR-123'ün RH123'e oksidasyonu vasıtasıyla H_2O_2 miktarı bu metotla tayin edilmektedir. Bu oksidasyon sırasında yağların oksidasyonu ile oluşmuş hücre içerisinde serbest oksijen radikalleri miktarı ölçülebilmektedir. DHR-123'ün RH123'e oksidasyonu çok yüksek düzeyde florasan yayıcı bir olaydır. Ne kadar çok florasan yayılırsa o kadar serbest oksijen radikali varlığını göstermektedir. DCFDCF nin yaydığı florasanlar 488 nm emisyon ve 543 nm eksitasyon (uyarım) dalga boylarında okundu. Aradaki fark, değer olarak belirlendi [322, 323]. Değerler, kontrole kıyasla misli artış (fold increase) olarak verildi.

3.2.3.8. Mitokondriyal Membran Depolarizasyon Tayini

Hücre içersine Ca^{+2} iyon akışı, mitokondride depolarizasyon artışı yoluyla ROS üretimini artırmakta, artan hücre içi ROS miktarı, gerek hücre içi organel kapılarını açarak ve gerekse katyon kanallarına zarar vererek sitozolde Ca^{+2} miktarını artırmaktadır. Mitokondriye daha fazla Ca^{+2} girişi depolarizasyonu artırmakta ya

hücre çalışması bozulmakta veya hücre apoptozise gitmektedir. Bu nedenle, mitokondriyal zar depolarizasyonu tayininin yapılması bu halkadaki zinciri tamamlayarak moleküler mekanizmaların aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır.

Analizin yapılışı: Hücreler 0.001 mM JC-1 ile 37 °C de 15 dakika inkübe edildi. JC-1 boyasının mitokondride depolarizasyon artışına paralel girişi artmaktadır. JC-1 inkübasyon sonrası Kırmızıdan yeşile doğru forasan artışı mitokondriyal depolarizasyonu göstermekte ve bu durum plate reader tarafından değişik dalga boylarında hemen beşi sıra cihaz tarafında otomatik olarak belirlenebilmektedir. Yeşil dalga boyları değişimleri 485 nM (Eksitasyon) ile 535 nM (Emisyon) dalga boylarında belirlendi. Kırmızı dalga boyu değişimleri ise 540 nM (Eksitasyon) ile 590 nM (Emisyon) de belirlendi. Emisyon oranları (590/535) değer olarak alındı. Tüm grupların hipokampal hücrelerinde mitokondriyal zar depolarizasyon tayini yapıldı. Gruplar arası farklılık var ise, hücreler hem TRPM2 kanal blokörü ACA hem de TRPV1 kanal blokörü KPZ ile inkübe edildi. Sonrasında, TRPM2 kanal antagonisti H₂O₂ (0.1-1 mM) ve KAP (0.01 mM) ile uyarım yapıp hemen mitokondriyal depolarizasyon miktarları belirlendi [322, 323].

3.2.3.9. Apoptozis Testleri

Pipetaj yaptıktan sonra süpernatant alındı ve plate kuyucuklarına yerleştirilerek 550 nm de Infinite 200 Pro(Avusturya) ELİSA cihazında okundu [320]. Sonuçlar kontrole kıyasla misli artış (fold increase) olarak verilmiştir.

3.2.3.9.1. Kaspaz 3 ve 9 Enzim Aktiviteleri Tayini

Hipokampal nöronlar, öncesinde bir saat süre ile 37°C de 2 mL substrat solüsyonu (20 mM HEPES, 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), %0.1CHAPS, 5 mM dithiothreitol (DTT), ve 8.25 µM kaspaz substratı; pH 7.4 olacak şekilde ayarlandı) içerisinde inkübe edildi. Hücreler daha sonra ultrasonik parçalama işlemine tabi tutuldu [313]. Sonrasında açığa çıkan enzimler spektrofloreometre (Varian Cary Eclipse, Australia) cihazında 360 nm uyarılma ve 460 nm emilme dalga boylarında okundu. Kaspaz 3 ve 9 aktiviteleri floresan boyları ile boyanarak değerlendirildi (AC-DEVD-AMC Kaspaz-3 ve AC-LEHD-AMC

Kaspaz-9 için). Elde edilen veriler floresan birimi / miligram protein olarak değerlendirildi [316, 324].

3.2.3.10. Western Blot Analizleri

Hipocampus örneklerinde Western Blot deneyi için takip edilen bütün işlemler standart prosedürlere uygun olarak yapıldı. Mevcut istenilen proteinlere ait bandların görüntülenebilmesi için ECL Western HRP Substrate (Millipore Luminata Forte, USA) kullanılarak karanlık odada X-ray filmi aracılığıyla proteinlerin görüntülenmesi işlemi yapıldı (GE Healthcare, Amersham Hyperfilm ECL, UK).

3.3. İstatistiksel Analiz

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

4. BULGULAR

4.1. Çalışma Belleği Hataları (WME) ve Referans Belleği Hataları (RME)

Yaşlı sıçanlarda RAM düzeneğinde başlangıçta ve ilaç uygulamaları (SF, skopolamin ve selenyum) sonrası ölçülen çalışma belleği hataları (WME) ve referans belleği hataları (RME) şekil 8’de gösterilmiştir. Şekil incelendiğinde, 2 haftalık RAM eğitimi sonrası yapılan ilk teste kıyasla skopolamin grubunda hem çalışma belleği hatalarında hem de referans belleği hatalarında anlamlı artış (sırasıyla $p<0.05$, $p<0.001$) saptanmıştır. Selenyum grubu sıçanlarda ilk teste kıyasla hem çalışma belleği hem de referans belleği hatalarında anlamlı düzeyde azalma ($p<0.001$) görülmüştür. Skopolamin+selenyum grubunda ilk teste kıyasla skopolamin uygulanması sonrası yapılan 2. testte hem çalışma belleği hem de referans belleği hatalarında anlamlı düzeyde artış ($p<0.001$) gözlenirken, 2. testten sonra selenyum uygulanması sonrası yapılan 3. testte 2. teste kıyasla hem çalışma belleği hem de referans belleği hatalarında anlamlı düzeyde azalma ($p<0.001$) görülmüştür.

Parametreler	Test-1		Test-2		Test-3	
	WME	RME	WME	RME	WME	RME
Kontrol	0.75 ± 0.66	2.13 ± 0.78	0.75 ± 0.43	2.25 ± 0.66	-	-
Skop	0.75 ± 0.40	1.88 ± 0.49	1.63 ± 1.11 ^a	3.38 ± 0.70 ^b	-	-
Se	0.88 ± 0.69	3.38 ± 0.94	0.38 ± 0.48 ^b	1.75 ± 1.09 ^b	-	-
Skop+Se	0.63 ± 0.45	1.88 ± 0.83	2.25 ± 1.07 ^b	4.63 ± 1.37 ^b	0.63 ± 0.48 ^c	2.13 ± 1.36 ^c

Şekil 8. 2 haftalık RAM eğitimi sonrası tüm gruplara uygulanan Test-1, ilaç uygulamaları sonrası tüm gruplara uygulanan Test-2 ve skop+se grubuna uygulanan Test-3 sonrası elde edilen WME ve RME değerleri. (ortalama± SS ve n=8). ^a $p<0.05$ ve ^b $p<0.001$, 1.RAM testine kıyasla. ^c $p<0.001$, 2.RAM testine kıyasla.

4.2. Lipit Peroksidasyonu, İndirgenmiş Glutasyon (GSH) Seviyeleri ve Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesi

Skopolamin ile indüklenen demans modeli oluşturulan sıçan hipokampus sinir hücrelerinde ve kontrol sinir hücrelerinde selenyumun (1,5 mg/kg/gün aşırı) lipit peroksidasyonu, indirgenmiş glutasyon (GSH) seviyeleri ve glutasyon

peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi üzerine etkisi şekil 9’da gösterilmiştir. Bu şekil incelendiğinde, kontrol grubuna kıyasla skopolamin grubunda Lipit peroksidasyon değerlerinin anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlenirken, GSH düzeyleri ve GSH-Px aktiviteleri anlamlı olarak düşük bulunmuştur (sırasıyla $p<0.001$ ve $p<0.01$). Skopolamin grubuna kıyasla selenyum ve skopolamin+selenyum gruplarında lipit peroksidasyon değerlerinin anlamlı düzeyde ($p<0.05$) düşük olduğu gözlenmiştir. Skopolamin grubuna kıyasla selenyum ve skopolamin+selenyum gruplarında GSH ($p<0.001$) düzeyleri ve GSH-Px ($p<0.001$) aktiviteleri anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur.

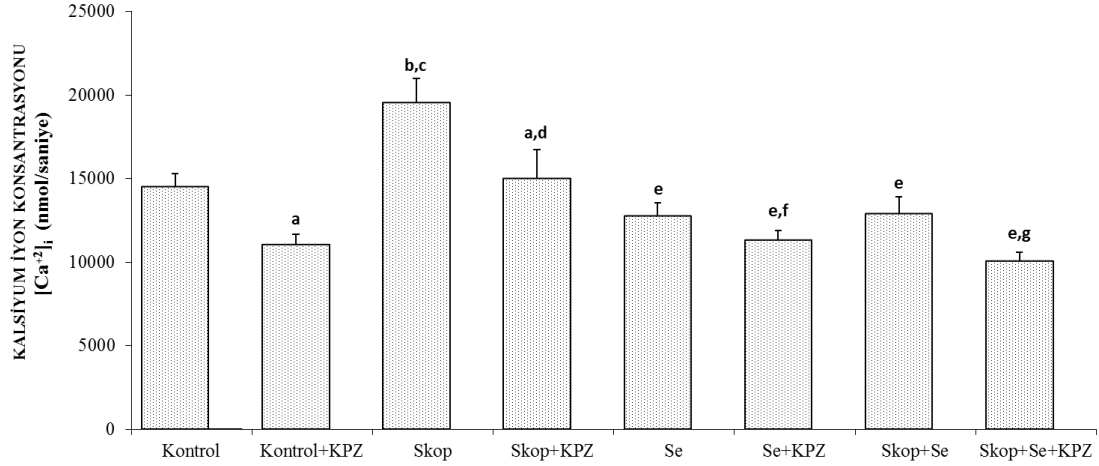
Parametreler	Kontrol (n=8)	Skop (n=8)	Se (n=8)	Skop+Se (n=8)
Lipit peroksidasyon ($\mu\text{mol/g protein}$)	2.16 \pm 0.13	2.77 \pm 0.28 ^a	2.39 \pm 0.32 ^d	2.44 \pm 0.23 ^d
GSH ($\mu\text{mol/g protein}$)	5.32 \pm 0.37	4.54 \pm 0.30 ^a	5.57 \pm 0.28 ^c	5.49 \pm 0.24 ^c
GSH-Px (IU/g protein)	9.80 \pm 0.52	8.57 \pm 0.76 ^b	10.60 \pm 0.57 ^c	10.10 \pm 0.91 ^c

Şekil 9. Skopolamin ile demans oluşturulan yaşlı sıçanların hipokampüs nöronlarındaki GSH, GSH-Px ve lipit peroksidasyon değerleri (ortalama \pm standart sapma). (^a $p<0.001$ ve ^b $p<0.01$. Kontrol grubuna kıyasla. ^c $p<0.001$ ve ^d $p<0.05$. Skop grubuna kıyasla.)

4.3. Selenyumun TRPV1 Kanal Aracılı Hücre İçi Serbest Kalsiyum İyon Düzeyleri ($[\text{Ca}^{+2}]_i$) Üzerine Etkileri

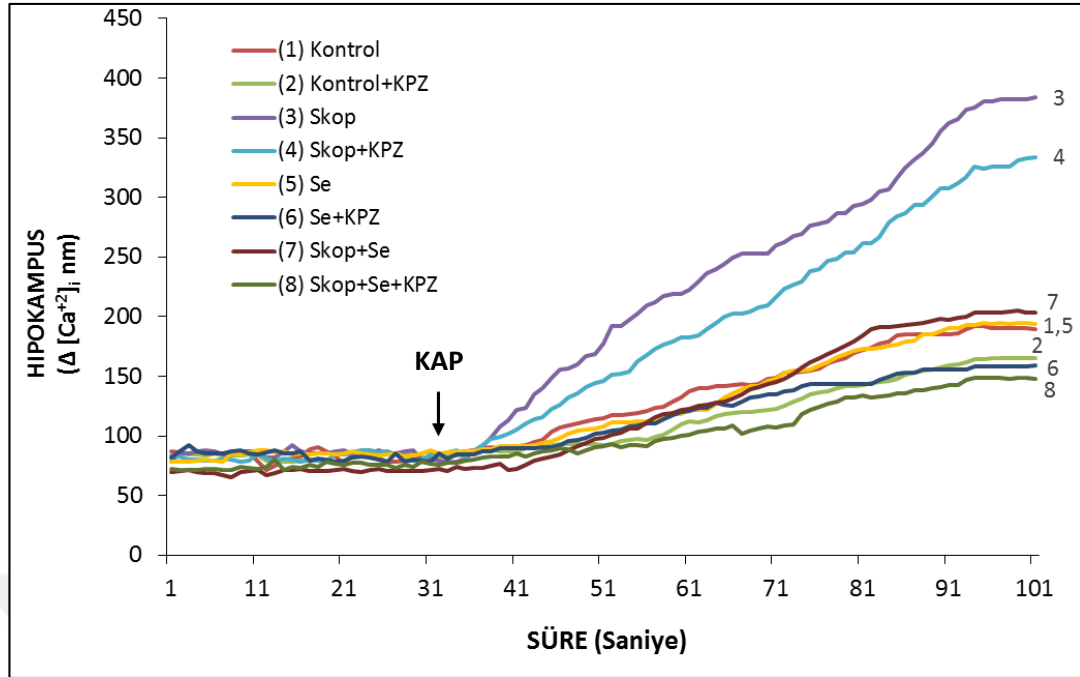
Skopolamin ile indüklenen demans modeli oluşturulan sıçan hipokampüs hücrelerinde ve kontrol sinir hücrelerinde selenyumun TRPV1 kanal aracılı hücre içi serbest kalsiyum iyon düzeyleri ($[\text{Ca}^{+2}]_i$) üzerine etkileri şekil 10 ve 11’de gösterilmiştir. Kalsiyum iyon konsantrasyonu, kontrol grubuna kıyasla kontrol+KPZ grubunda anlamlı düzeyde azalmış ($p<0.05$), skopolamin grubunda ve skopolamin+KPZ grubunda ise anlamlı düzeyde artmıştır (sırasıyla $p<0.001$ ve $p<0.05$). Kalsiyum iyon konsantrasyonu, kontrol+KPZ grubuna kıyasla skopolamin grubunda anlamlı düzeyde artmıştır ($p<0.001$). Skopolamin grubuna kıyasla skopolamin+KPZ grubunda ($p<0.05$) ve selenyum, selenyum+KPZ, skopolamin+selenyum ve skopolamin+selenyum+KPZ gruplarında ($p<0.001$)

kalsiyum iyon konsantrasyonunda anlamlı düzeyde azalma görüldü. Selenyum grubuna kıyasla selenyum+KPZ grubunda anlamlı düzeyde azalma ($p<0.05$) saptandı. Skopolamin+selenyum grubuna kıyasla skopolamin+selenyum+KPZ grubunda anlamlı düzeyde azalma ($p<0.05$) olduğu tespit edildi.



Şekil 10. İntraperitoneal skopolamin, SF ve selenyum alan sıçanların hipokampal nöronları deney hayvanlarından kesilerek çıkarıldı. Fura-2 yüklü sıçan hipokampal nöronları 100 saniye boyunca, normal hücre dışı kalsiyum mevcudiyetinde (1.2 mM)

KAP ile uyarıldı. Nöronlar KPZ tarafından inhibe edildi. (n=8 ve ortalama±SS)
^ap<0.05 ve ^bp<0.001 kontrol grubuna kıyasla. ^cp<0.001 kontrol+KPZ grubuna kıyasla.
^dp<0.05 ve ^ep<0.001 Skop grubuna kıyasla. ^fp<0.05 Se grubuna kıyasla. ^gp<0.05 Skop+Se grubuna kıyasla.

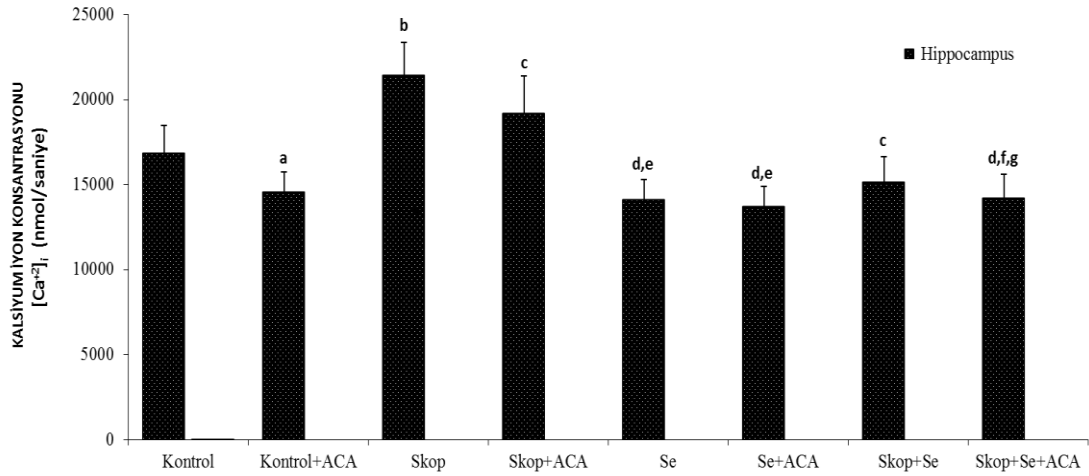


Şekil 11. Skopolamin ile indüklenen demans modeli oluşturulan sıçan hipokampus hücrelerinde ve kontrol sinir hücrelerinde selenyumun TRPV1 kanal aracılı hücre içi serbest kalsiyum iyon düzeyleri ($[Ca^{+2}]_i$) üzerine etkileri grafiksel döküm halinde şekil 11’de gösterilmiştir.

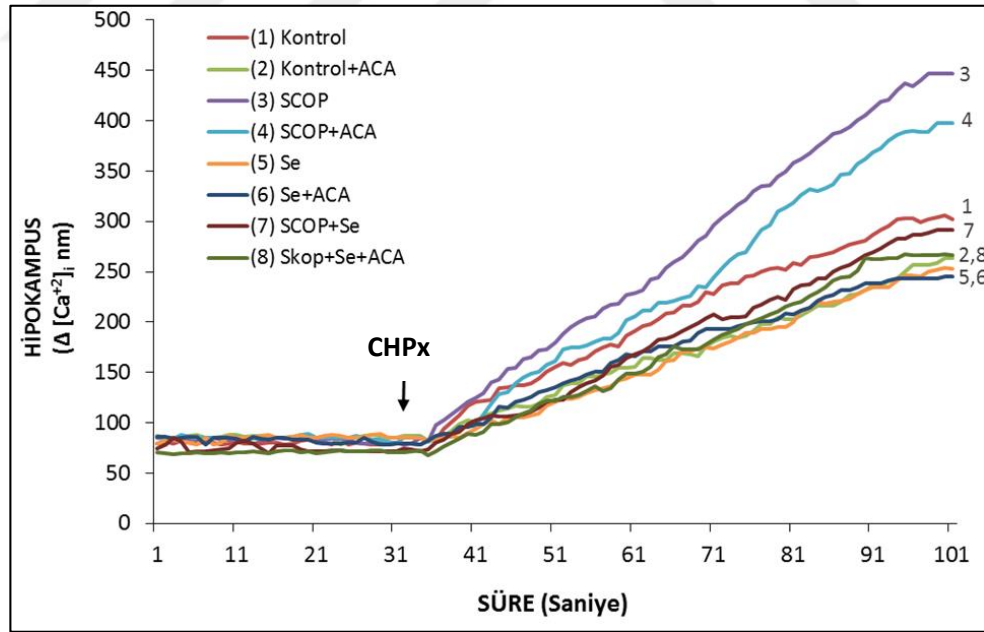
4.4. Selenyumun TRPM2 Kanal Aracılı Hücre İçi Serbest Kalsiyum İyon Düzeyleri ($[Ca^{+2}]_i$) Üzerine Etkileri

Skopolamin ile indüklenen demans modeli oluşturulan sıçan hipokampus sinir hücrelerinde ve kontrol sinir hücrelerinde selenyumun TRPM2 kanal aracılı hücre içi serbest kalsiyum iyon düzeyleri ($[Ca^{+2}]_i$) üzerine etkileri şekil 12 ve 13’de gösterilmiştir. Şekil incelendiğinde, kalsiyum iyon konsantrasyonu, kontrol grubuna kıyasla kontrol+ACA grubunda anlamlı düzeyde azalmış ($p < 0.05$), skopolamin grubunda ise anlamlı düzeyde ($p < 0.001$) artmıştır. Skopolamin grubuna kıyasla skopolamin+ACA, skopolamin+selenyum, selenyum, selenyum+ACA ve skopolamin+selenyum+ACA gruplarında anlamlı düzeyde azalma gözlenmiştir (sırasıyla $p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$). Skopolamin+ACA grubuna kıyasla selenyum, selenyum+ACA ve skopolamin+selenyum+ACA grubunda anlamlı düzeyde azalma gözlenmiştir (sırasıyla $p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.001$).

Selenyum+ACA grubuna kıyasla skopolamin+selenyum+ACA grubunda anlamlı düzeyde artış ($p<0.05$) görüldü.



Şekil 12. İntraperitoneal skopolamin, SF ve selenyum alan sıçanların hipokampal nöronları kesilerek çıkarıldı. Fura-2 yüklü sıçan hipokampal nöronları 100 saniye boyunca, normal hücre dışı kalsiyum mevcudiyetinde (1.2 mM), oksidan kumen hidroperoksit (CHPx ve 1 mM) ile uyarıldı. ^a $p<0.05$ ve ^b $p<0.001$ kontrol grubuna kıyasla. ^c $p<0.05$ ve ^d $p<0.001$ Skop grubuna kıyasla. ^e $p<0.05$ ve ^f $p<0.001$ Skop+ACA grubuna kıyasla. ^g $p<0.05$ Se+ACA grubuna kıyasla. (n=8 ve ortalama±SS)

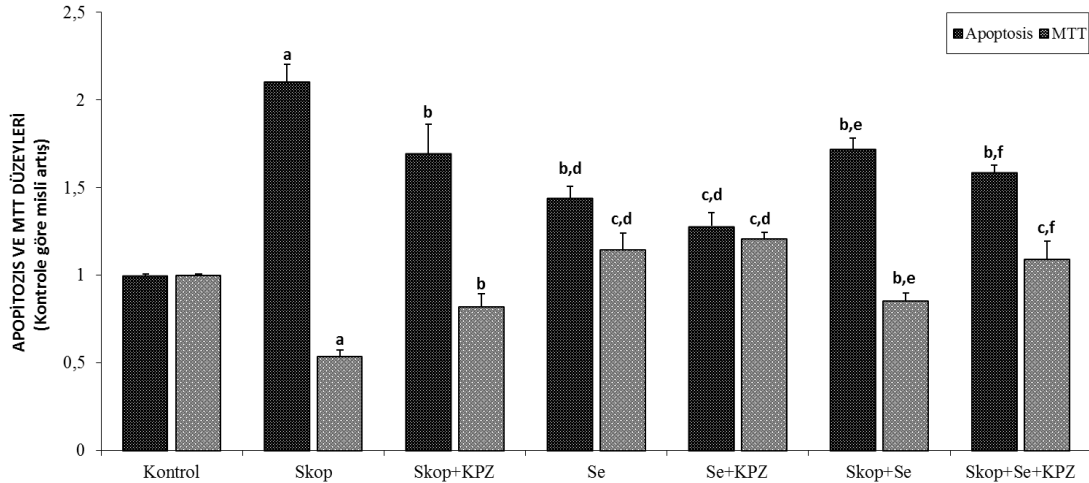


Şekil 13. Skopolamin ile indüklenen demans modeli oluşturulan sıçan hipokampus sinir hücrelerinde ve kontrol sinir hücrelerinde selenyumun TRPM2 kanal aracılı hücre içi serbest kalsiyum iyon düzeyleri ([Ca²⁺]_i) üzerine etkileri grafiksel döküm halinde şekil 13’de gösterilmiştir.

4.5. TRPV1 Aracılı Apoptozis ve MTT Düzeyleri

Sıçanların hipokampal nöronlarında, selenyum ve skopolamin uygulamasının TRPV1 kanal aktivitesi aracılığıyla Apoptozis ve MTT seviyeleri üzerine etkileri Şekil 14’te gösterilmiştir.

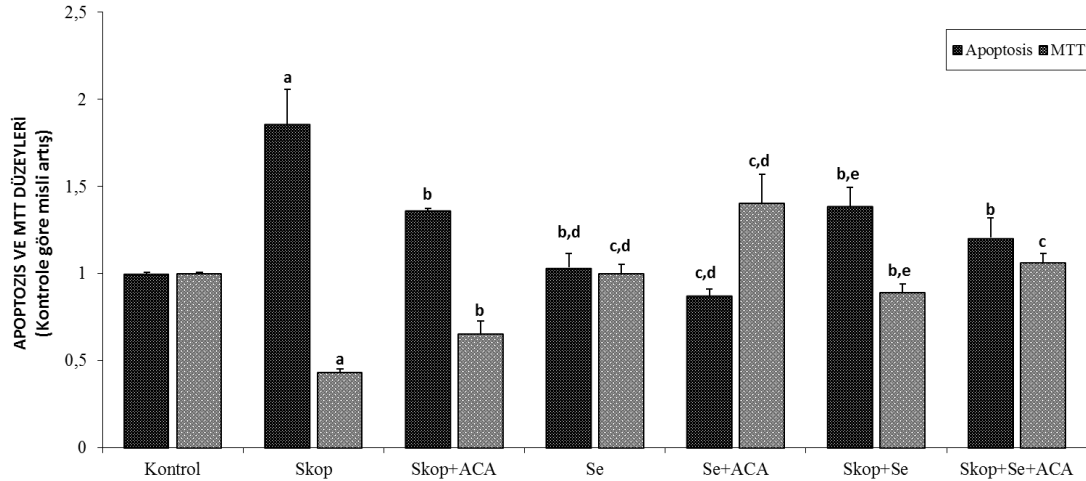
Kontrol grubuna kıyasla skopolamin grubunda apoptozis anlamlı düzeyde artarken ($p<0.001$), hücre canlılığını gösteren MTT anlamlı düzeyde azalmıştır ($p<0.001$). Skopolamin grubuna kıyasla skopolamin+KPZ, selenyum, skopolamin+selenyum, skopolamin+selenyum+KPZ ve selenyum+KPZ gruplarında apoptozis düzeylerinde anlamlı düzeyde azalma görülmüştür (sırasıyla $p<0.05$, $p<0.05$, $p<0.05$, $p<0.05$, $p<0.001$). Skopolamin grubuna kıyasla skopolamin+KPZ, skopolamin+selenyum, selenyum, selenyum+KPZ, skopolamin+selenyum+KPZ gruplarında MTT düzeyi anlamlı düzeyde artmıştır (sırasıyla $p<0.05$, $p<0.05$, $p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$). Skopolamin+KPZ grubuna kıyasla selenyum ve selenyum+KPZ gruplarında apoptozis düzeyleri anlamlı düzeyde azalırken ($p<0.05$), MTT düzeyleri anlamlı düzeyde artmıştır ($p<0.05$). Selenyum ve selenyum+KPZ gruplarına kıyasla skopolamin+selenyum grubunda apoptozis anlamlı düzeyde artarken ($p<0.05$), MTT anlamlı düzeyde azalmıştır ($p<0.05$). Skopolamin+selenyum grubuna kıyasla skopolamin+selenyum+KPZ grubunda, apoptozis anlamlı düzeyde azalırken ($p<0.05$), MTT anlamlı düzeyde artmıştır ($p<0.05$).



Şekil 14. Kontrol, skopolamin, selenyum ve skopolamin+selenyum gruplarının hipokampal nöronları, TRPV1 deneylerinde in vitro KAP (0.01 mM) ile uyarıldı ve onlar KPZ (0.1 mM) tarafından inhibe edildi. Değerler 6 ayrı deneyin ortalama \pm SS olarak sunuldu ve tedavi öncesi seviyeye (deneysel / kontrol) göre misli artış olarak ifade edildi. (^a $p < 0.001$ kontrol grubuna kıyasla. ^b $p < 0.05$ ve ^c $p < 0.001$ Skop grubuna kıyasla. ^d $p < 0.05$ Skop+KPZ grubuna kıyasla. ^e $p < 0.05$ Se ve Se+KPZ gruplarına kıyasla. ^f $p < 0.05$ Skop+Se grubuna kıyasla.)

4.6. TRPM2 Aracılı Apoptozis ve MTT Düzeyleri

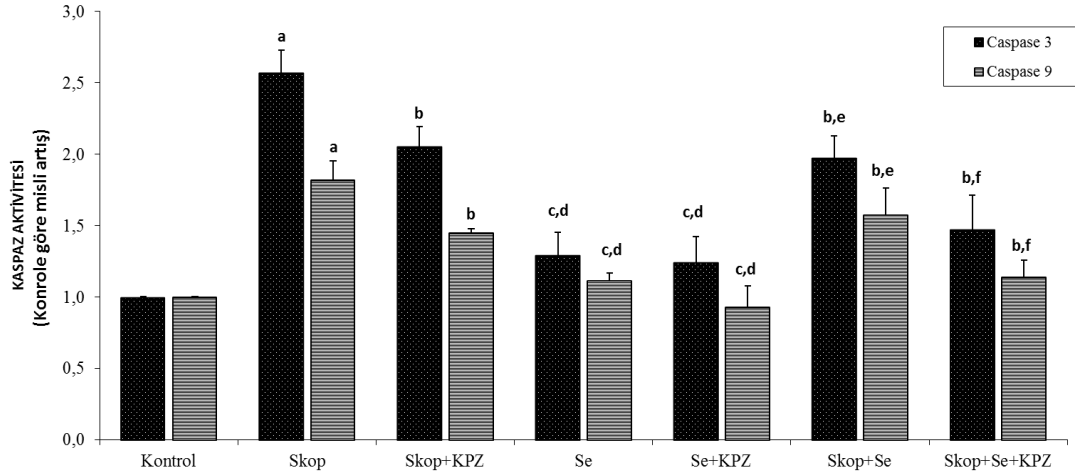
Sıçanların hipokampal nöronlarında, selenyum ve skopolamin uygulamasının TRPM2 kanal aktivitesi aracılığıyla apoptozis ve MTT seviyeleri üzerine etkileri şekil 15'te gösterilmiştir. Şekil 15 incelendiğinde kontrol grubuna kıyasla skopolamin grubunda apoptozis değerleri artarken ($p < 0.001$), hücre canlılığını gösteren MTT azalmıştır ($p < 0.001$). Skopolamin grubuna kıyasla skopolamin+ACA, selenyum, skopolamin+selenyum, skopolamin+selenyum+ACA ve Se+ACA gruplarında apoptozis anlamlı düzeyde azalmıştır (sırasıyla $p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.001$). Skopolamin grubuna kıyasla skopolamin+ACA, skopolamin+selenyum, selenyum, selenyum+ACA ve skopolamin+selenyum+ACA gruplarında MTT anlamlı düzeyde artmıştır (sırasıyla $p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$). Skopolamin+ACA grubuna kıyasla selenyum ve selenyum+ACA gruplarında apoptozis anlamlı düzeyde azalırken ($p < 0.05$), MTT anlamlı düzeyde artmıştır ($p < 0.05$). Selenyum ve selenyum+ACA gruplarına kıyasla skopolamin+selenyum grubunda apoptozis anlamlı düzeyde artarken ($p < 0.05$), MTT anlamlı düzeyde azalmıştır ($p < 0.05$).



Şekil 15. Kontrol, skopolamin, selenyum ve skopolamin+selenyum gruplarının hipokampal nöronları, TRPM2 deneylerinde in vitro CHPx (1 mM) ile uyarıldı ve onlar ACA (0.025 mM) tarafından inhibe edildi. Değerler 6 ayrı deneyin ortalama \pm SS olarak sunuldu ve tedavi öncesi seviyeye (deneysel / kontrol) göre misli artış olarak ifade edildi. ^a $p < 0.001$ kontrol grubuna kıyasla. ^b $p < 0.05$ ve ^c $p < 0.001$ Skop grubuna kıyasla. ^d $p < 0.05$ Skop+ACA grubuna kıyasla. ^e $p < 0.05$ Se ve Se+ACA gruplarına kıyasla.

4.7. TRPV1 Aracılı Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 Aktiviteleri

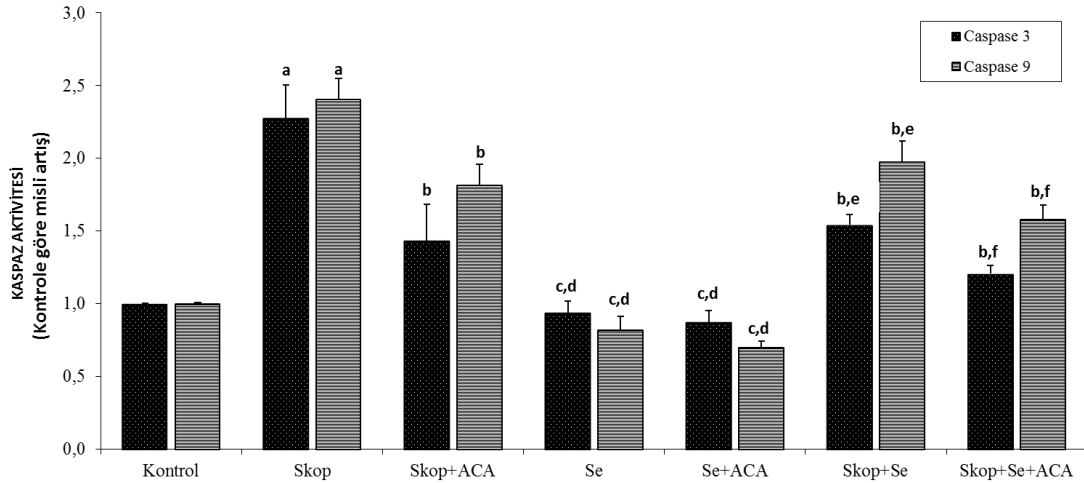
Sıçanların hipokampal nöronlarında, selenyum ve skopolamin uygulamasının TRPV1 kanal aktivitesi aracılığıyla kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivitesi üzerine etkileri şekil 16'da gösterilmiştir. Şekil incelendiğinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında skopolamin grubunda hem kaspaz-3 hem de kaspaz-9 aktivitesinde anlamlı düzeyde artış görüldü ($p < 0.001$). Skopolamin grubuna kıyasla skopolamin+KPZ, skopolamin+selenyum, skopolamin+selenyum+KPZ, selenyum ve selenyum+KPZ gruplarında hem kaspaz-3 hem de kaspaz-9 aktivitesinde anlamlı düzeyde azalma saptandı (sırasıyla $p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.001$, $p < 0.001$). Skopolamin+KPZ grubuna kıyasla selenyum ve selenyum+KPZ gruplarında hem kaspaz-3 hem de kaspaz-9 aktivitesinde anlamlı düzeyde azalma saptandı ($p < 0.05$). Selenyum ve selenyum+KPZ gruplarına kıyasla skopolamin+selenyum grubunda hem kaspaz-3 hem de kaspaz-9 aktivitesinde anlamlı düzeyde artış saptandı ($p < 0.05$). Skopolamin+selenyum grubuna kıyasla skopolamin+selenyum+KPZ grubunda hem kaspaz-3 hem de kaspaz-9 aktivitesinde anlamlı düzeyde azalma saptandı ($p < 0.05$).



Şekil 16. Kontrol, skopolamin, selenyum ve skopolamin+selenyum gruplarının hipokampal nöronları, TRPV1 deneylerinde in vitro KAP (0.01 mM) ile uyarıldı ve onlar KPZ (0.1 mM) tarafından inhibe edildi. Değerler tedavi öncesi seviyeye (kontrolle kıyasla) göre misli artış olarak ifade edildi. (^a $p < 0.001$ ve kontrol grubuna kıyasla. ^b $p < 0.05$ ve ^c $p < 0.001$ Skop grubuna kıyasla. ^d $p < 0.05$ Skop+KPZ grubuna kıyasla. ^e $p < 0.05$ Se ve Se+KPZ gruplarına kıyasla. ^f $p < 0.05$ Skop+Se grubuna kıyasla.)

4.8. TRPM2 Aracılı Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 Aktiviteleri

Sıçanların hipokampal nöronlarında, selenyum ve skopolamin uygulamasının TRPM2 kanal aktivitesi aracılığıyla kaspaz-3 ve kaspaz-9 seviyeleri üzerine etkileri şekil 17'de gösterilmiştir. Şekil incelendiğinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında skopolamin grubunda hem Kaspaz-3 hem de Kaspaz-9 aktivitesinde anlamlı düzeyde artış saptandı ($p < 0.001$). Skopolamin grubuna kıyasla skopolamin+ACA, skopolamin+selenyum, skopolamin+selenyum+ACA, selenyum ve selenyum+ACA gruplarında hem Kaspaz-3 hem de Kaspaz-9 aktivitesinde anlamlı düzeyde azalma saptandı (sırasıyla $p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.001$, $p < 0.001$). Skopolamin+ACA grubuna kıyasla selenyum ve selenyum+ACA gruplarında hem Kaspaz-3 hem de Kaspaz-9 aktivitesinde anlamlı düzeyde azalma saptandı ($p < 0.05$). Selenyum ve selenyum+ACA gruplarına kıyasla skopolamin+selenyum grubunda hem kaspaz-3 hem de kaspaz-9 aktivitesinde anlamlı düzeyde artış saptandı ($p < 0.05$). Skopolamin+selenyum grubuna kıyasla skopolamin+selenyum+ACA grubunda hem kaspaz-3 hem de kaspaz-9 aktivitesinde anlamlı düzeyde azalma saptandı ($p < 0.05$).

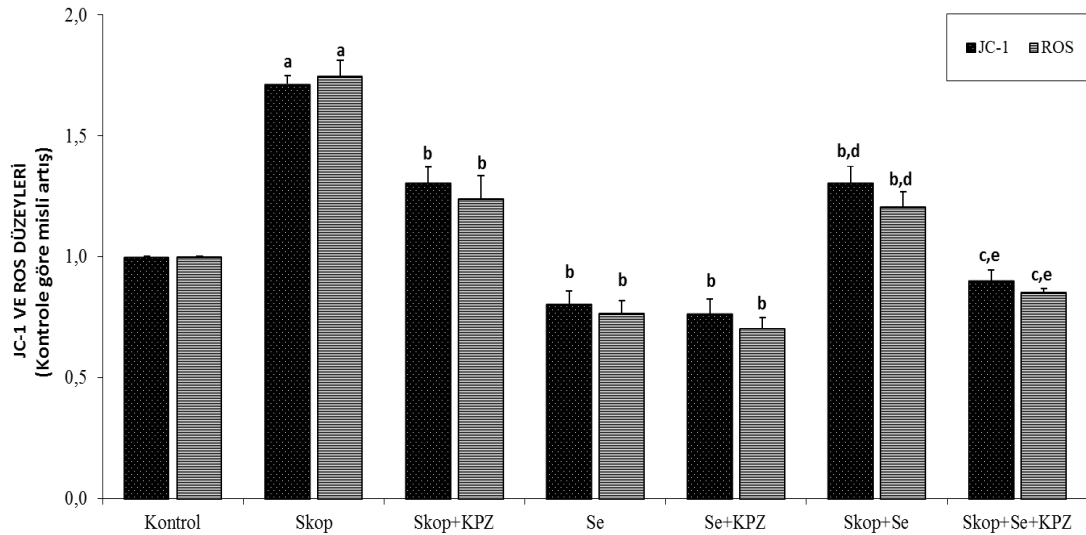


Şekil 17. Kaspaz aktiviteleri materyal metod bölümünde açıklandığı şekliyle hesaplandı. Kontrol, skopolamin, selenyum ve skopolamin+selenyum gruplarının hipokampal nöronları, TRPM2 deneylerinde in vitro CHPx (1 mM) ile uyarıldı ve ACA (0.025 mM) tarafından inhibe edildi. Değerler tedavi öncesi seviyeye (deneysel / kontrol) göre misli artış olarak ifade edildi. ^ap<0.001 kontrol grubuna kıyasla. ^bp<0.05 ve ^cp<0.001 Skop grubuna kıyasla. ^dp<0.05 Skop+ACA grubuna kıyasla. ^ep<0.05 Se ve Se+ACA gruplarına kıyasla. ^fp<0.05 Skop+Se grubuna kıyasla.

4.9. TRPV1 Aracılı Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu (JC-1) ve Hücre İçi ROS Üretimi

TRPV1 kanalı aktivasyonuna bağlı hücre içerisinde aşırı kalsiyum iyon artışı mitokondri zar depolarizasyonuna neden olmakta ve iki yolağı uyarmaktadır. (1) Aşırı ROS üretimi ve apoptotik yol. TRPV1 aracılı sitozolik kalsiyum iyon artışı sonuçları gözlemlendi. Bu nedenle bu tez projesinde apoptotik değerlere ilave olarak mitokondri zar depolarizasyonu ve hücre içi ROS üretimi analizlerinin yapılması da amaçlandı. Hücre içerisinde sıçanların hipokampal nöronlarında, selenyum ve skopolamin uygulamasının TRPV1 kanal aktivitesi aracılığıyla mitokondriyal membran depolarizasyonu (JC-1) ve hücre içi ROS üretim seviyeleri üzerine etkileri Şekil 18'de gösterilmiştir. Şekil 18 incelendiğinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında skopolamin grubunda hem JC-1 hem de ROS düzeylerinde anlamlı düzeyde artış saptandı (p<0.001). Skopolamin grubuna kıyasla skopolamin+KPZ, selenyum, selenyum+KPZ, skopolamin+selenyum ve skopolamin+selenyum+KPZ gruplarında anlamlı düzeyde azalma olduğu görüldü

(sırasıyla $p<0.05$, $p<0.05$, $p<0.05$, $p<0.05$, $p<0.001$). Selenyum ve skopolamin+KPZ gruplarına kıyasla skopolamin+selenyum grubunda anlamlı düzeyde artış gözlemlendi ($p<0.05$). Skopolamin+selenyum grubuna kıyasla skopolamin+selenyum+KPZ grubunda anlamlı düzeyde azalma olduğu saptandı ($p<0.05$).



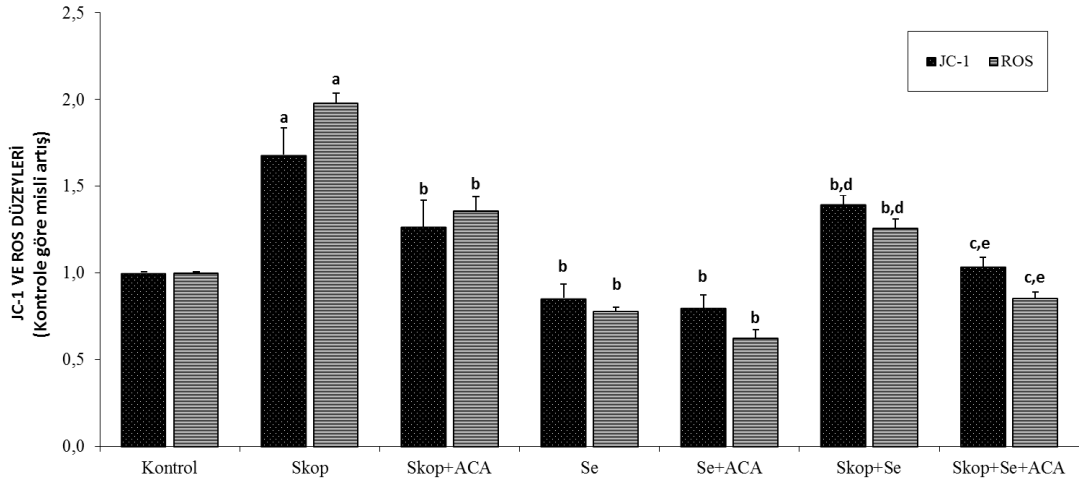
^a $p<0.001$ kontrol grubuna kıyasla. ^b $p<0.05$ ve ^c $p<0.001$ Skop grubuna kıyasla.

^d $p<0.05$ Se ve Skop+KPZ gruplarına kıyasla. ^e $p<0.05$ Skop+Se grubuna kıyasla.

Şekil 18. TRPV1 Aracılı Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu (JC-1) ve Hücre İçi ROS düzeyleri.

4.10. TRPM2 Aracılı Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu (JC-1) ve Hücre İçi ROS Üretimi

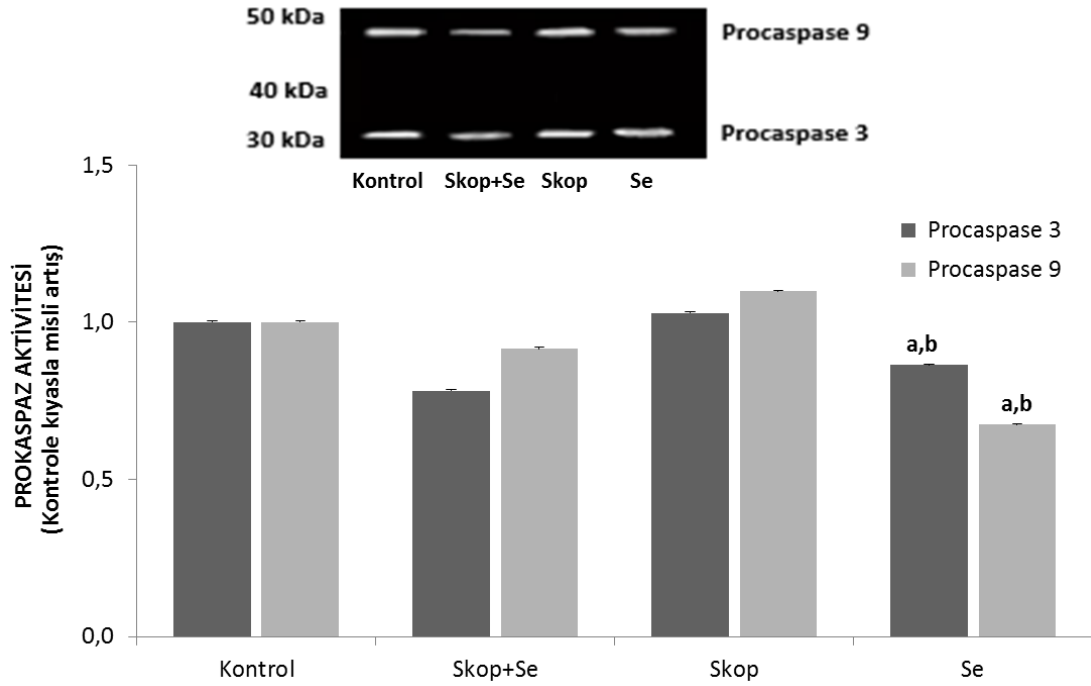
Siçanların hipokampal nöronlarında, selenyum ve skopolamin uygulamasının TRPM2 kanal aktivitesi aracılığıyla mitokondriyal membran depolarizasyonu (JC-1) ve hücre içi ROS üretim seviyeleri üzerine etkileri şekil 19'da gösterilmiştir. Şekil incelendiğinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında skopolamin grubunda hem JC-1 hem de ROS düzeylerinde anlamlı düzeyde artış saptandı ($p<0.001$). Skopolamin grubuna kıyasla skopolamin+ACA, selenyum, selenyum+ACA, skopolamin+selenyum ve skopolamin+selenyum+ACA gruplarında anlamlı düzeyde azalma görüldü (sırasıyla $p<0.05$, $p<0.05$, $p<0.05$, $p<0.05$, $p<0.001$). Selenyum ve skopolamin+ACA gruplarına kıyasla skopolamin+selenyum grubunda anlamlı düzeyde artış görüldü ($p<0.05$). Skopolamin+selenyum grubuna kıyasla skopolamin+selenyum+ACA grubunda anlamlı düzeyde azalma görüldü ($p<0.05$).



Şekil 19. Kontrol, skopolamin, selenyum ve skopolamin+selenyum gruplarının hipokampal nöronları, TRPM2 deneylerinde in vitro CHPx (1 mM) ile uyarıldı ve ACA (0.04 mM) tarafından inhibe edildi. Değerler tedavi öncesi seviyeye (deneysel / kontrol) göre misli artış olarak ifade edildi. ^ap<0.001 kontrol grubuna kıyasla. ^bp<0.05 ve ^cp<0.001 Skop grubuna kıyasla. ^dp<0.05 Se ve Skop+ACA gruplarına kıyasla. ^ep<0.05 Skop+Se grubuna kıyasla.

4.11. Prokaspaz 3, Prokaspaz 9 Aktivitesi

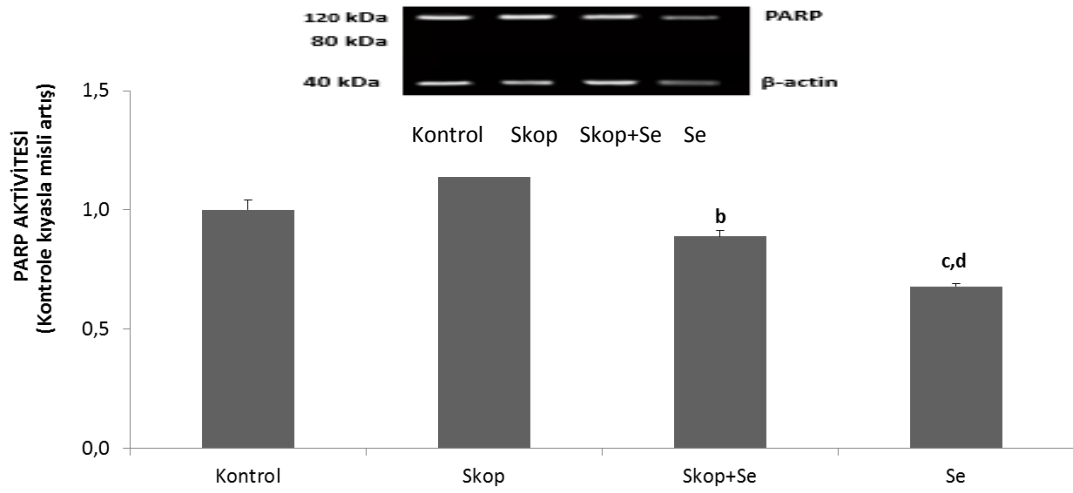
Sıçan hipokampusünde prokaspaz 3, prokaspaz 9 aktivitesi üzerine selenyum uygulamasının etkileri şekil 20’de gösterilmiştir. Şekil 20 incelendiğinde, kontrol grubuna kıyasla selenyum grubunda hem Prokaspaz 3 hem de Prokaspaz 9 düzeyinde anlamlı düzeyde azalma saptanmıştır (p<0.05). Skopolamin grubuna kıyasla selenyum grubunda hem prokaspaz 3 hem de prokaspaz 9 düzeyinde anlamlı düzeyde azalma saptanmıştır (p<0.05).



Şekil 20. Değerler 3 ayrı deneyde ortalama \pm SS olarak sunuldu ve sonuçlar kontrole kıyasla misli artış şeklinde ifade edilmiştir. ^a $p < 0.05$ kontrol grubuna kıyasla. ^b $p < 0.05$ Skop grubuna kıyasla.

4.12. PARP Aktivitesi

Sıçan hipokampusünde PARP faaliyetleri üzerine selenyum uygulamasının etkileri Şekil 21’de gösterilmiştir. Şekil 21 incelendiğinde, kontrol grubuna kıyasla skopolamin grubunda PARP aktivitesinde anlamlı düzeyde artış görüldü ($p < 0.05$). Skopolamin grubuna kıyasla skopolamin+selenyum ve selenyum gruplarında anlamlı azalma gözlemlendi (sırasıyla $p < 0.05$ ve $p < 0.001$). Skopolamin+selenyum grubuna kıyasla selenyum grubunda anlamlı düzeyde azalma saptanmıştır ($p < 0.05$).



Şekil 21. Değerler 3 ayrı deneyde ortalama \pm SS olarak sunuldu ve sonuçlar kontrole kıyasla misli artış şeklinde ifade edilmiştir. ^a $p < 0.05$ kontrol grubuna kıyasla. ^b $p < 0.05$ ve ^c $p < 0.001$ Skop grubuna kıyasla. ^d $p < 0.05$ Skop+Se grubuna kıyasla.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada yaşlı ratlarda skopolamin ile indüklenen demans modeli uygulanarak selenyumun kısa ve uzun süreli bellek üzerine etkisinin yanı sıra AH patogenezinde rol alan oksidatif strese yönelik hipokampal nöronlarda selenyum ve skopolamin uygulanan grupların oksidatif parametreler, apopitozis, TRPV1 ve TRPM2 aracılı kalsiyum iyon düzeyinin belirlenmesi, selenyumun olası etki mekanizmasının aydınlatılması amaçlandı. Çalışmamız hem 8 kollu ışınal labirent düzeneği ile bellek testlerinin uygulanması hem de bu hayvanların dekapite edilerek laboratuvar testlerinin değerlendirilmesini içeren uzun ve yorucu bir serüvene sahiptir. Bu yolla AH'nda selenyumun TRP kanalları üzerindeki etkisini değerlendiren ilk çalışma olma vasfını taşımaktadır.

Selenyumdan eksik beslenmenin ya da vücutta çeşitli şekillerle ölçülen selenyum düşüklüğünün oksidatif stres artışı, bilişsel fonksiyonlarda gerileme, AH gibi nörodejeneratif hastalıklarda artış ile ilişkili olduğuna dair yayınlar mevcuttur. Corrigan ve ark. hipokampus dokularının postmortem çalışmalarında, kontrollerle karşılaştırıldığında AH olan katılımcılarda selenyum düzeylerinde azalmanın varlığını göstermişlerdir [325]. Farklı bir çalışmada AH'na sahip kişilerin beyin selenyum konsantrasyonunun kontrollerin % 60'ı kadar olduğu bildirilmiştir [326]. Bu görüşlerden farklı olarak BOS ve serumda selenyum düzeylerini araştıran bir çalışmada AH ve kontrol grupları arasında anlamlı fark bulunmamıştır [327]. Yetersiz selenyum düzeyleri ve artmış oksidatif stresin AH gibi nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili olduğu bildirilmiştir [156]. Transgenik yolla Selp'den yoksun bırakılmış farelerde, öğrenme bozukluğu ve uzun süreli potansiyasyonda yetersizlik olduğu bildirmiş, Selp'nin kognitif fonksiyonlar için önemli olduğuna değinilmiştir [157]. Gao ve ark. toprakta selenyum eksikliği olan Çin'in kırsal alanlarında yaşayanların vücut selenyum seviyelerinin düşük olduğunu ve bu durumun azalmış bilişsel yeterlilik ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir [8]. Aynı ekip başka bir çalışmalarında AH için risk faktörleri arasında yer alan ApoE4 alel taşıyıcıların tırnak örneklerinde ölçülen selenyum seviyelerinin önemli ölçüde daha düşük olduğunu göstermiştir [328]. Selenyum düzeyi yaşla birlikte azalmakta ve bu durum yaşanan insanlar arasında nöropsikolojik fonksiyonlarda azalmaya katkıda

bulunabilmektedir. Akbaraly ve ark. plazma selenyum düzeyi düşük bireyleri 4 yıl boyunca izlediklerinde bilişsel gerilemede bariz şekilde artmış riske sahip olduklarını göstermişlerdir [176]. Alzheimer hastalığı olan 28 bireyin alındığı bir başka çalışmada, alzheimer hastalarının plazma, eritrosit ve tırnaklarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde daha düşük selenyum düzeyi olduğu gösterilmiştir [168]. Ülkemizde yapılan benzer bir çalışmada da Alzheimer hastalarında plazma selenyum düzeyinin sağlıklı kontrollere kıyasla daha düşük olduğu bulunmuştur [169]. Loeff ve ark. selenyumun AH gibi nörodejeneratif hastalıkların gelişiminde önemli olduğunu, AH'nın ilerlemesi ve selenyum düzeyleri arasında negatif korelasyon olduğunu vurgulamışlardır [173]. Güncel çalışmalar da selenyum eksikliği ile bilişsel gerileme arasında ilişki olduğunu ortaya koymuştur [329]. Koç ve ark. Alzheimer hastalarının ortalama saç selenyum düzeylerinin kontrol katılımcıları için bulunan seviyelerden daha düşük olduğunu bulmuşlardır [330].

Birçok çalışmada selenyum eksikliğinin bilişsel yetersizlik ve AH ile ilişkili olduğunun gösterilmesi araştırmacıları tedavi amacıyla selenyum kullanmaya yöneltmiştir. Son 30 yılda bu konuda birçok farklı dizaynda prelinik ve klinik çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda selenyumun çeşitli formları tercih edilmiştir.

Plesebo kontrollü klinik bir çalışmada 8 mg inorganik sodyum selenit (= 1720µg selenyum) artı 45µg organik selenyum artı 400 mg E vitamini 1 yıl boyunca uygulanmıştır. Sandoz Klinik Geriatrik Değerlendirme Ölçeği değerlendirmelerine göre (SCAG) bellek, konfüzyon ve dezoryantasyonda plesebo grubuna kıyasla düzelme bulunmadığı bildirilmiştir [331]. Çift-kör, plesebo kontrollü bir başka çalışmada, 46 Alzheimer hastası 100 mg Colostrinin, 100 mg selenyum veya plesebo olacak şekilde üç gruba ayrılmıştır. Mini Mental Durum Muayenesi ile ölçülen çalışma sonuçları, bilişsel yeteneklerin plesebo alanlarda bozulurken, Colostrinin (sığır kolostrumundan elde edilen prolin açısından zengin bir polipeptit) ile tedavi edilen deneklerde düzeldiğini ya da stabilize olduğunu, selenyum ile tedavi edilenlerin ise baskın olarak stabilize olduklarını göstermiştir [332]. Corcoran ve ark. Sodyum selenat ile tedavi edilen transgenik TAU441 fareleri, kontrollerle karşılaştırdıklarında Morris Water Maze testinde uzamsal öğrenme ve bellekte önemli ölçüde düzelme olduğunu göstermişlerdir [182]. Transgenik farelerin kullanıldığı başka bir çalışmada NFY patolojili iki bağımsız Tau transgenik fare

suşlarına (P301L mutant pR5 ve K369I mutant K3 fareler) selenyumun (sodyum selenat) kronik oral tedavisi, içeriksel hafızayı ve motor performansı düzeltmiştir [183]. Farelerde skopolamin (1 mg / kg, intraperitoneal) ile indüklenen bellek bozulması modelinde, difenil diselenitin (50 mg/kg, oral) etkinliğinin Y-labirent ve Morris su labirenti testleri kullanarak test edildiği bir çalışmada difenil diselenitin, Y-labirenti testinde skopolamin ile indüklenen bellek bozukluğunu belirgin şekilde düzelttiği, morris su labirentinde, skopolamin grubuna kıyasla kaçış latansında belirgin azalma, yerel platformdaki geçişlerin sayısında artma ve platform kadranında harcanan zamanda artışa yol açtığı böylece difenil diselenitin mekansal uzun süreli bellek ve kısa süreli bellek bozukluklarını iyileştirdiği gösterilmiş, difenil diselenitin AH'nda gözlenen belirli bellek kayıplarının hafifletilmesinde önemli bir terapötik değere sahip olabileceği, kognitif bozukluk tedavisi için yararlı olabileceği bildirilmiştir [333]. Pinton ve ark. serebral ventrikül içine streptozosin uygulayarak oluşturdukları sporadik bir fare AH modelinde, streptozosin uygulanan farelerde öğrenme ve bellek kusuru ve artmış AChE aktivitesi gözlendiğini p,p'-metoksil-difenil diselenit uygulamasının ise öğrenme ve bellek bozukluklarını geri döndürebildiği ve artan AChE aktivitesine karşı koruma sağladığını göstermiştir [334]. Selenyum içeren karışım takviyesinin birçok çalışmada bilişsel düzelme ile ilişkili olduğu [335-338] bazı çalışmalarda ise bilişsel fonksiyon açısından plesebo grubuna göre anlamlı fark bulunamadığı [339] bildirilmiştir. Çalışmalarda selenyum takviyesi için farklı selenyum formlarını kullanıldığı, selenyum alım miktarının 20 ng ile 8 mg arasında geniş bir yelpazede değişkenlik gösterdiği ve çok sayıda ek paralel desteğin alınmasının hangi bileşiğin yararlı olup olmadığını çıkarsamayı engellediği bu nedenle selenyum takviyesinin AH için yararlı olup olmadığının net olarak belli olmadığı bildirilmiştir [173]. Muhtemel AH'ndan etkilenmiş ve Donepezil alan hastalara oksidatif stresi dengelemek için selenyum da dahil en yaygın antioksidanları ihtiva eden bir formülün (Formula F) etkinliğinin araştırıldığı 52 haftalık bir kohort çalışmasında Donepezil artı formula F uygulanan hastaların Mini mental test skorlarında hafif bir iyileşme görülmüş ve yazarlar bulunan sonucu Donepezil artı formula F kombinasyonunun beyinde oksidatif stres düzeyini azalttığı, hastalığın prognozunu iyileştirdiği şeklinde yorumlamışlardır [335]. Doksahexaenoik asit, eikosapentaenoik asit, üridin-mono-fosfat, kolin, fosfolipidler,

folik asit, vitamin B6, B12, C, E ve selenyumdan oluşan multinutrisyonel müdahalenin, APP / PS1 farelerde, Morris water maze testinde daha verimli bir arama stratejisi kullanımını artırarak ve eski platform pozisyonuna ulaşma süresini azaltarak yüzme verimliliğini artırdığı gösterilmiştir [340]. Pinton ve ark. serebral ventrikül içine streptozosin uygulayarak oluşturdukları sporadik bir fare AH modelinde, streptozosin uygulanan farelerde p,p'-metoksil-difenil diselenit diyet takviyesinin, bellek bozukluğunu ve oksidatif stresi geri çevirdiğini, AChE aktivitesini normalize ettiğini, streptozosin ile indüklenen serebral enerji metabolizmasındaki değişiklikleri ise geri çevirmediği göstermişlerdir [341].

Çalışmamızda ilk değişken olarak 8 kollu ışınal labirent düzeneği ile ölçülen kısa süreli bellek hatalarını gösteren WME ve uzun süreli bellek hatalarını gösteren RME gruplarda karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada kullanılan 8 kollu ışınal labirent düzeneği AH için tedavi geliştirme amacı güden güncel çalışmalarda bellek testi olarak sıklıkla tercih edilmektedir [342, 343]. 2 haftalık labirent eğitimi sonrası yapılan ilk teste kıyasla skopolamin grubunda hem WME hem de RME'de anlamlı artış saptanmıştır. Bu durum skopolamin uygulamasının ratlarda hem kısa süreli hem de uzun süreli bellekte bozulmaya neden olduğunu göstermektedir. Skopolamin AH'na yönelik güncel çalışmalar için bellek bozukluğu oluşturmak amacıyla sıklıkla kullanıldığından bu veriler literatür ile uyumludur [342-344].

Selenyum grubu sıçanlarda ilk teste kıyasla hem çalışma belleği hem de referans belleği hatalarında anlamlı düzeyde azalma görülmüştür. Bu durum selenyum uygulamasının ratlarda hem kısa süreli hem de uzun süreli bellekte düzelmeye neden olduğunu göstermektedir. Selenyumun antioksidan olması nedeniyle oksidatif stresi azaltarak, AH ile ilişkili nörodejenerasyonu bu yolla azaltarak bellek üzerine olumlu etkiler yaptığı düşünülebilir. Selenyum uygulamasının birçok çalışmada bilişsel fonksiyonları düzelttiği gösterildiğinden bu veriler literatür ile uyumludur.

Skopolamin+selenyum grubunda ratlara ilk test sonrası 21 gün boyunca skopolamin uygulanmış ve bu sürenin sonunda 2. Test uygulanmıştır. Bu testte ilk teste göre hem WME hem de RME'de anlamlı düzeyde artış gözlenirken, 2. testten sonra 2 hafta süreyle uygulanan selenyum sonrası yapılan 3. testte 2. teste kıyasla

hem WME hem de RME'de anlamlı düzeyde azalma görülmüştür. Bu veriler de yukarıdaki sonuçlar ile benzer şekilde skopolaminin bellek testlerinde oluşturduğu olumsuz etkilerin selenyum uygulaması ile geriye çevrildiği şeklinde yorumlanabilir. Yaşlı ratlarda skopolamin ile daha da kötüleşen bellek performansının selenyum sonrası azalması ilgi çekici gözükmemektedir.

Selenyumun AH ile olan ilişkileri, oksidatif stresi hangi yolla azalttığı, oksidatif stresi azaltma dışında başka etkilerinin de olup olmadığına dair birçok çalışma yapılmıştır. Selenyum verilmesinin AH patogenezinde çok önemli bir yeri olan amiloid üretimini azaltarak, β -amiloid toksisitesi ve oksidatif strese karşı koruma sağladığına dair birçok çalışma yapılmıştır [184, 185, 191, 345]. Bazı çalışmalarda ise selenyum verilmesinin tau protein fosforilasyonunu azalttığı, NFY oluşumunu azalttığı ve nörodejenerasyonu hafiflettiği bildirilmiştir [182, 183, 346]. Farklı çalışmalarda selenyum eksikliğinin selenyum taşıyıcı protein olan Selp düzeylerinde düşmeye yol açtığı, bu durumun bilişsel gerileme ve AH ile ilişkili olabileceği, selenyum ihtiva eden bileşiklerin ve selenyum taşınmasında görev alan Selp'nin çeşitli şekillerde oksidatif stresi azaltıcı etki yaptığı gösterilmiştir [163, 175, 347].

Oksidatif stresin düzeyini ve etkisini tespit etmenin çeşitli yolları bulunmaktadır. Bunlardan bazıları oksidatif stresin membran lipitlerinde oluşturacağı lipit peroksidasyonunun ölçülmesi, indirgenmiş GSH gibi hücreyi oksidatif strese karşı koruyan bazı ürünlerin düzeyinin ölçülmesi veya GSH-Px gibi antioksidan enzim aktivitesinin tespit edilmesi sayılabilir.

Membranda bulunan poliansatüre yağ asitlerinin, ROS tarafından yıkılması sonucu oluşan ve membran lipid yapısını değiştirerek hücre yapı ve fonksiyonlarında bozulmaya yol açan reaksiyon lipit peroksidasyonu olarak adlandırılmaktadır [348]. Lipid peroksidasyon fenomeninin AH'nın patogenezinde önemli etkileri olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Lipitler ROS ve onunla ilişkili lipit peroksitleri, antioksidan enzimler, senil plaklar ve NFY'lar tarafından modifiye edilmektedir. A β membranlarda lipit peroksidasyonunu neden olur ve lipit peroksidasyon ürünlerinin artışına yol açar [142]. Lipid peroksidasyonunun AH'nda membran fosfolipidlerinin tüketilmesinin önemli bir nedeni olduğunu bildirilmiştir [349]. AH olan kişilerin hem

beyin dokusunda hem de kan dolaşımında ROS aracılı LPO'nu işaret eden MDA düzeylerinin artmış olduğu bildirilmiştir [350]. Hritcu ve ark sadece skopolamin ile tedavi edilen sıçanların hipokampuslarında MDA düzeyi artarken, indirgenmiş GSH düzeyi, SOD, GSH-Px ve KAT aktivitesinin azaldığını bildirmişlerdir [342]. AH'nın hücrel ve hayvan modellerinde selenyum ve selenoproteinlerin amiloidojenez ve lipid peroksidasyonunda azalma ile ilişkili olduğu farklı çalışmalarda gösterilmiştir [175, 180, 351]. Gutteridge ve ark. selenyumun hem lipid prekürsörleri hem de lipid peroksidasyonundan kaynaklanan membran bileşenlerini korumak için antioksidan olarak görev aldığını bildirmişlerdir [107]. Hill ve ark. tarafından selenyum eksikliği olan sıçanlara selenyum takviyesi verilen bir çalışmada Selp lipid peroksidasyonunun ortadan kalkmasını sağlamıştır [352]. Selenyum bağlı bir enzim olan GSH-Px4, ROS ve lipid peroksitlerin hücre içi seviyelerinin kontrol edilmesinde önemli bir rol oynar. Chen ve ark. artmış lipid peroksidasyonunun, transgenik yöntemle heterozigot GSH-Px4'ten yoksun bırakılmış farelerde, β sekretaz-1 ifadesinin upregülasyonu ile artmış amiloidojenez yol açtığını göstermişlerdir [353]. Selenyumun GSH-Px4 aracılığıyla amiloid β ve lipid peroksidasyon ile ilişkili toksisiteye karşı β sekretaz-1 ifadesinin azalmasında ve nöroproteksiyonda görev aldığı bildirilmiştir [184]. Akut yüzme egzersizi ile sıçanların beyin dokusunda lipid peroksidasyonunun artırıldığı bir çalışmada, sadece akut yüzme egzersizi uygulanan gruba kıyasla yüzme egzersizi ile birlikte selenyum takviyesi (6 mg/kg/gün sodyum selenit) verilen grupta antioksidan aktivite artmış, serbest radikal oluşumu ve lipid peroksidasyonu azalmıştır [354]. Zhang ve ark. sıçan beyinde T2 toksin ve düşük selenyum düzeyinin lipid peroksidasyonu üzerine etkisini inceledikleri bir çalışmada, düşük selenyumun sıçan beyinde lipid peroksidasyonunu artırdığını, GSH-Px aktivitesini azalttığını ve MDA seviyesini artırdığını, selenyum düşüklüğü durumlarında T2 toksinin lipid peroksidasyon üzerine etkisinin T2 toksinin tek başına etkisinden daha belirgin olduğunu göstermişlerdir [355]. Güncel bir çalışmada ratlarda etanol ile indüklenen oksidatif hasarda selenyumun organik bir formu olan metilselenosisteinin GSH-Px ve SOD gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini geri çevirebildiği, GSH düzeyini artırdığını ve MDA düzeyleri ve karbonil protein seviyelerini azaltabildiği gösterilmiş ayrıca selenyumun E vitamini ile birlikte verilmesinin tek başına verilmesinden daha etkili olduğu da gösterilmiştir [356].

Çalışmamızda kontrol grubuna kıyasla skopolamin grubunda lipit peroksidasyon değerlerinin anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlenirken, skopolamin grubuna kıyasla selenyum ve skopolamin+selenyum gruplarında lipit peroksidasyon değerlerinin anlamlı düzeyde düşük olduğu gözlenmiştir. Sonuçlarımız skopolamin uygulamasının lipid peroksidasyon düzeyini artırdığını göstermiş, skopolamin ile oluşan LPO artışı selenyum uygulaması ile anlamlı düzeyde azalmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında selenyum verilen grupta lipit peroksidasyonu açısından anlamlı farklılık saptanmamıştır. Sonuçlarımız literatür ile uyumlu olarak selenyum verilmesinin LPO artışını hafiflettiğini göstermektedir.

AH patogenezinde yer alan oksidatif stresi değerlendirme çalışmalarında sıklıkla kullanılan diğer bir parametre indirgenmiş GSH düzeyidir. Vücut, GSH ve ona bağımlı antioksidan enzimleri (GSH-Px ve GSH-R) düzenleyerek, serbest radikalleri nötralize etmek için endojen mekanizmaları kullanmaktadır [357]. GSH-Px'ler, hücre ve dokuları tahrip edebilme potansiyeli olan peroksitleri ve diğer ROS'ları azaltmak için antioksidan GSH'ı kullanırlar [358]. AH'nda GSH düzeylerini inceleyen çalışmaların bazıları kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulmazken [359-361] bazı çalışmalarda ise kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde farklılık saptanmıştır [123, 362, 363]. Streptozosin ile indüklenen AH modelinin kullanıldığı bir çalışmada ratlarda selenyum takviyesinin GSH düzeylerini anlamlı ölçüde artırdığı bulunmuştur [181]. Farelerde streptozosin ile oluşturulan başka bir sporadik AH modelinde, p,p'-metoksil-difenil diselenit bütün beyinde streptozosinden kaynaklanan SOD ve glutasyon S-transferaz aktivitesindeki artışa, ROS artışına ve GSH seviyelerinin azalmasına karşı koruma sağladığı ortaya koyulmuştur [364]. Triple transgenik fare modeli ile AH oluşturulan farelerde, selenometyoninin etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada kontrol ile karşılaştırıldığında, selenometyonin verilen grupta GSH seviyesi artmıştır [346]. Alimünyum klorid ile indüklenen oksidatif stres modeli oluşturulan bir çalışmada selenyum GSH, KAT ve GSH-R aktivitesini artırmış, MDA aktivitesini azaltmıştır [365].

Bizim çalışmamızda kontrol grubuna kıyasla skopolamin grubunda GSH düzeyi anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur. skopolamin grubuna kıyasla selenyum ve skopolamin+selenyum gruplarında GSH düzeylerinin anlamlı olarak daha yüksek

olduğu bulunmuştur. Bu veriler skopolaminin GSH düzeyini azalttığını göstermektedir. Bununla birlikte skopolamin ile oluşan azalma selenyum verilmesi ile anlamlı düzeyde gerilemektedir. Ancak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında selenyum verilen grupta GSH düzeyi açısından anlamlı farklılık saptanmamıştır.

AH patogenezinde yer alan oksidatif stresi değerlendirme çalışmalarında sıklıkla kullanılan ve lipid peroksidasyonu ve GSH düzeyi ile yakından ilişkili olan bir diğer parametre GSH-Px aktivitesidir. GSH-Px antioksidan defans mekanizmalarına dahil olan selenyum-bağlı bir enzim olup, H₂O₂'nin hücre içi seviyelerini kontrol etmektedir [137]. Literatür incelendiğinde, bazı çalışmalarda AH ile kontrol grupları arasında GSH-Px aktivitesi açısından anlamlı bir fark bulunmazken [361, 366], bazı çalışmalar AH'nda GSH-Px aktivitesinin azaldığını gösterirken [155, 367] bazı çalışmalarda ise GSH-Px aktivitesinin arttığı gösterilmiştir [362, 368]. Selenyumdan eksik beslenmenin, GSH-Px ve selenoenzim aktivitesini azaltarak deneysel koşullarda beyin antioksidan korumasını azalttığı bildirilmiştir [369]. Xiong ve ark. farelerde travmatik beyin hasarı sonrası oluşan mitokondri solunum fonksiyon bozukluğunun, Ca⁺² girişini ve oksidatif stresi indüklediğini ancak mitokondriyal disfonksiyonun artmış selenyum bağımlı GSH-Px aktivitesi ile geri çevrildiğini bildirmişlerdir [370]. Vücutta 5 adet GSH-Px enzimi bulunmakta olup, GSH-Px1 ve GSH-Px4 beyinde çeşitli oksidanları ortadan kaldırmak için ortaklaşa çalışmaktadır [152]. GSH-Px4'ün hücre içi lipid düzeylerini azaltarak oksidatif stresi hafiflettiği bildirilmiştir [351]. Lu ve ark. ise GSH-Px4'ün doğrudan fosfolipidleri ve kolesterol hidroperoksitleri azalttığını bildirmişlerdir [358]. Crack ve ark. GSH-Px1'den yoksun bırakılmış (Gpx1^{-/-}) farelerin primer kültür nöronlarını kullanarak yaptıkları bir çalışma sonucunda GSH-Px1'in, AH'nın sebebi ve senil plakların ana bileşeni olan amiloid β toksisitesine karşı ve H₂O₂ ile indüklenen oksidatif strese karşı koruma sağladığını göstermişlerdir [371]. GSH-Px türlerinden biri olan GSH-Px4, ROS ve lipid peroksitlerin hücre içi seviyelerinin kontrol edilmesinde önemli bir rol oynar. Selenyum GSH-Px4 üretimi için gereklidir. Chen ve ark. heterozigot GSH-Px4'ten yoksun bırakılmış farelerde, artmış lipid peroksidasyonunun, β sekretaz-1 ifadesinin upregülasyonu ile artmış amiloidojenez yol açtığını göstermişlerdir [353]. Nöroblastoma hücre hatlarında hipoksi ile apoptozis oluşturulan hücrelere selenyum takviyesinin, hipoksi kaynaklı DNA

parçalanmasını inhibe ettiği ve antioksidan düzeylerini (GSH, GSH-R, GSH-Px ve SOD) kontrol düzeylerine geri çevirdiği gösterilmiş, çalışma sonuçları yazarlar tarafından selenyum desteğinin Bel-2 protein upregülasyonunu tetikleyerek ve oksidatif stresi azaltarak hipoksinin indüklediği apoptozisten hücreleri koruduğu şeklinde yorumlanmıştır [372]. Garcia ve ark. kronik alüminyum maruziyeti ile oluşturulan bir fare AH modelinde A β PP dışı transgenik fare (Tg2576) ve vahşi tip fareleri kullanarak yaptıkları bir çalışmada, GSH-Px aktivitesinin hipokampuste alüminyum gibi nörotoksik ajanlar tarafından uyarılan oksidatif strese karşı koruma yeteneğine sahip olduğunu bildirmişlerdir [160]. Sıçanların tedavi öncesi 7 gün selenyum tuzu olan sodyum selenit (0.1 mg / kg) ile ön işleme tabi tutulduğu ve takiben streptozotosin ile indüklenen demans modeli uygulandığı bir çalışmada streptozotosin grubunda protein karbonil ve tiobarbitürik asit reaktif türlerinde önemli bir artış, hipokampuste kolin asetiltransferaz, hipokampus ve serebral kortekste ATP, GSH, GSH-Px ve GSH-R'da önemli bir azalma bulunurken, selenyum takviyesi verilen grupta GSH-Px ve GSH-R düzeylerinin anlamlı ölçüde arttığını bulunmuştur [181]. Gwon ve ark. selenyum ile zenginleştirilmiş diyet ile tedavi edilmiş fareleri, normal diyet alan fareler ile karşılaştırdıkları bir çalışmada GSH-Px aktivitesinde önemli bir artış olduğunu göstermişlerdir [184]. Koç ve ark. azalmış selenyum konsantrasyonlarının azalmış GSH-Px aktivitesine sebep olabileceğini ve AH patogeneğinde, nörodejenerasyonla suçlanan oksidatif stresin olası rolünü desteklediğini bildirmişlerdir [330].

Çalışmamızda kontrol grubuna kıyasla skopolamin grubunda GSH-Px aktivitesi anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur. Skopolamin grubuna kıyasla selenyum ve skopolamin+selenyum gruplarında GSH-Px aktivitesi anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Bu veriler açık bir şekilde skopolamin GSH-Px aktivitesini azalttığını göstermektedir. Skopolamin tüm beyinde artan oksidatif stres ile ilişkili olduğundan antioksidan bir enzim olan GSH-Px aktivitesini azaltması literatür ile uyumludur. Bununla birlikte skopolamin ile oluşan azalma selenyum verilmesi ile anlamlı düzeyde gerilemektedir. Ancak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında selenyum verilen grupta GSH-Px açısından anlamlı farklılık saptanmamıştır. Selenyum grubunda lipid peroksidasyonu, GSH düzeyi ve GSH-Px aktivitesi açısından kontrol grubu ile istatistiki olarak farklılık bulunmamıştır. Bu durum ratların yaşlı olması,

irreversibl aşamaya gelmiş olabilecekleri ya da çalışmada kullanılan selenyum dozunun yetersiz gelmesi yüzünden oluşmuş olabilir.

TRPV1 ve TRPM2 kanallarının hücre içine aşırı miktarda Ca^{+2} girişinden sorumlu olduğu, hücre içine yüksek miktarda giren Ca^{+2} iyonunun mitokondriyi uyarak sitozolik Ca^{+2} düzeyini daha da artırdığı, Ca^{+2} iyonunun apoptozisi indükleyip kaspaz-3 ve kaspaz-9 düzeylerini artırdığı ve sonuçta nöronal ölüme neden olduğu, bu nedenle TRPV1 ve TRPM2 kanalları üzerine antagonist etki eden ve kanalın Ca^{+2} geçirgenliğini azaltan ajanların bu nörodejenerasyon ile sonuçlanan süreci durdurabileceği ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Çalışmamızda selenyum verilmesinin TRPV1 ve TRPM2 kanallarında antagonistik etki yaparak bu nörodejenerasyonla sonuçlanan süreci önleyebileceği ve böylece AH'nın tedavisi ya da önlenmesinde kullanılabileceği savı üzerine kurulmuştur.

Son yıllarda TRPV1 kanallarının tutulumunun sinaptik plastisite, öğrenme ve bellek süreci ve hipokampal çıktı modülasyonu ile ilişkili olduğuna dair yayınlar mevcuttur [373-375]. KAP tarafından TRPV1 aktivasyonunun oksidatif stresi artırdığı gösterilmiştir [376]. TRPV1 kanallarının AH için önemine dair oldukça az sayıda çalışma mevcuttur. Kim ve ark. TRPV1 agonist KAP'a mezensefalik dopaminerjik nöronların maruz kalmasının hücre ölümünü tetiklediğini, bu etkinin TRPV1 antagonistleri KPZ ve iyodo-resiniferatoksin (RTX) tarafından inhibe edildiğini, TRPV1'in indüklediği nörotoksisitenin, Ca^{+2} düzeyinde artış ve mitokondriyal hasar ile birliktelik gösterdiğini bildirmişlerdir. KAP verilen hücrelerde mitokondriyal sitokrom c salınımında artış, kaspaz 3 immünreaktivitesinde artış ve TRPV1 aracılı hücre ölümünde artış gösterilerek, TRPV1 kanallarının aktivasyonunun Ca^{+2} sinyalizasyonu ve mitokondriyal bozulma yoluyla dopaminerjik nöronal hasara katkıda bulunduğu bildirilmiştir [377]. Rat mikroglialarında ve insan mikroglia hücre hatlarında TRPV1 ekspresyonunun incelendiği bir çalışmada, TRPV1 agonistlerinin (KAP ve RTX) Ca^{+2} sinyalizasyonu ve mitokondriyal disfonksiyon aracılığıyla mikroglial hücre ölümüne neden olduğu, bu etkinin TRPV1 antagonistleri (KPZ ve iodo-resiniferatoksin (I-RTX) ile hafifletilebildiği gösterilmiştir [378]. Yamamoto ve ark. TRPV1 kanallarının AH ile ilişkili nöroinflamatuvar süreçlere katkıda bulunabileceğini bildirmişlerdir [236]. TRPV1 kanallarının demir iyonu ile indüklenen nöronal ölüme tutulduğu, bu

kanalın α -tokoferol ile negatif modülasyonunun oksidatif strese karşı kısmen uzun süreli nöronal koruma sağladığı, TRPV1 antagonisti KPZ'in demir iyonu ile hücre içine giren ve nöronal ölüme yol açan Ca^{+2} iyon konsantrasyonunu azalttığı gösterilmiştir [379]. Yapılan bir başka deneysel çalışmada GSH tükenmesi ve homosistein yüksekliğinin TRPM2 ve TRPV1 kanalları aracılığıyla hücre içi kalsiyum düzeyini artırarak hipokampal nöronlar üzerinde mitokondriyal depolarizasyon, hücre içi ROS üretimi, apoptozis ve kaspaz 3 ve 9 aktivitesinde artma gibi zararlı etkilere yol açabileceği, GSH tedavisinin kısmen bu etkileri tersine çevirebileceği gösterilmiştir [258]. Selenyumun TRPV1 kanalları üzerinden Ca^{+2} girişini azaltarak antioksidan rol oynadığı, selenyum ile TRPV1 kanallarının farmakolojik blokajının, KAP ve KAP bağımlı oksidatif strese maruz kalan nötrofiller tarafından tetiklenen hücre hasarını ve ROS formasyonunu azaltarak önleyebileceği bildirilmiştir [9]. Nazıroğlu ve ark. travmatik beyin hasarı oluşturulan ratlara uygulanan N-asetil sistein ve selenyum tedavisinin hipokampüste oksidatif stres, kaspaz 3, kaspaz 9, ROS düzeyleri, apoptozis ve TRPV1 kanal aktivasyonu yoluyla Ca^{+2} 'un hücreye girişi üzerine koruyucu etkileri olduğunu, N-asetil sistein ve selenyumun antioksidan rol oynayarak bu etkileri hafiflettiğini bildirmişlerdir [10].

Çalışmamızda TRPV1 ile ilişkili hücre içi kalsiyum iyon konsantrasyonu, kontrol grubuna kıyasla Kontrol+KPZ grubunda anlamlı düzeyde azalmış, skopolamin grubunda ve skopolamin+KPZ grubunda ise anlamlı düzeyde artmıştır. Skopolamin verilen gruplarda artan Ca^{+2} iyon konsantrasyonu, skopolaminin TRPV1 kanalının açıklığını artırarak bu geçişi artırdığı şeklinde yorumlanabilir. Skopolamin grubuna kıyasla selenyum ve KPZ verilen gruplarda kalsiyum iyon konsantrasyonunda anlamlı düzeyde azalmıştır. Selenyum ve KPZ gruplarında skopolamin grubuna kıyasla hem Ca^{+2} iyon konsantrasyonu daha düşük bulunmuş hem de skopolaminin meydana getirmiş olabileceği kanal açıklığını geri çevirerek Ca^{+2} düzeyinde azalma sağlamıştır. Bu bulgu selenyum [9, 10] ve KPZ'nin [378, 379] Ca^{+2} iyon düzeyini azalttığını gösteren literatür verileri ile tutarlıdır. Selenyum grubuna kıyasla selenyum+KPZ grubunda anlamlı düzeyde azalma saptandı. Skopolamin+selenyum grubuna kıyasla skopolamin+selenyum+KPZ grubunda anlamlı düzeyde azalma olduğu tespit edildi. Bu sonuç KPZ verilmesinin

selenyumun kanal üzerindeki antagonistik etkiyi potansiyelize ettiği şeklinde yorumlanabilir.

Ayrıca çalışmamızda sıçanların hipokampal nöronlarında, selenyum ve skopolamin uygulamasının TRPV1 kanal aktivitesi aracılığıyla Apoptozis ve MTT seviyeleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Kontrol grubuna kıyasla skopolamin grubunda Apoptozis anlamlı düzeyde artarken hücre canlılığını gösteren MTT anlamlı düzeyde azalmıştır. Bu bulgu skopolaminin MTT düzeyini azalttığını gösteren [380] ve nöronal apoptozisi artırdığını gösteren [381] literatür çalışmaları ile uyumludur ve deneysel AH modeli oluşturma amacı ile kullanımını destekler bir sonuçtur. Skopolamin grubuna kıyasla KPZ ve selenyum verilen gruplarda Apoptozis düzeylerinde anlamlı azalma ve MTT düzeylerinde anlamlı artış görülmüştür. Bu sonuç KPZ uygulanmasının TRPV1 kanalı aracılığı ile tetiklenen apoptozisi azalttığı ve MTT düzeyini artırdığı şeklinde yorumlanabilir ve literatür ile uyumludur. Skopolamin grubuna kıyasla selenyum uygulanan gruplarda apoptozis değerleri daha düşük saptandığı gibi daha önce skopolamin verilmesi ile meydana gelen apoptozis artışı ve MTT azalması selenyum uygulaması sonucu gerilemiştir. Bu bulgu selenyumun apoptozisi gerilettiğini gösteren literatür bulguları [10] ile tutarlıdır. Skopolamin+selenyum grubuna kıyasla skopolamin+selenyum+KPZ grubunda, apoptozis anlamlı düzeyde azalırken, MTT anlamlı düzeyde artmıştır. Bu sonuç KPZ verilmesinin selenyumun hücre canlılığı üzerine olumlu etkilerini potansiyelize ettiği şeklinde yorumlanabilir.

Sıçanların hipokampal nöronlarında, selenyum ve skopolamin uygulamasının TRPV1 kanal aktivitesi aracılığıyla kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivitesi üzerine etkileri araştırıldığında, kontrol grubuna kıyasla skopolamin grubunda hem kaspaz-3 hem de kaspaz-9 aktivitesinde anlamlı düzeyde artış görüldü. Skopolamin verilen ratlarda kaspazların artmış olması apoptozisi artırdığını iddia eden literatür verileri ile tutarlıdır. Skopolamin grubuna kıyasla KPZ ve selenyum verilen gruplarda hem kaspaz-3 hem de kaspaz-9 aktivitesinde anlamlı düzeyde azalma görülürken skopolamin kaynaklı artış da hafifletilmiştir. Bu sonuç hem KPZ hem de selenyumun apoptoziste görevli kaspazları azaltarak antiapoptotik etki yaptığını düşündürmektedir ve literatür verileri ile tutarlıdır [10]. Skopolamin+selenyum grubuna kıyasla skopolamin+selenyum+KPZ grubunda hem kaspaz-3 hem de

kaspaz-9 aktivitesinde anlamlı düzeyde azalma saptandı. Bu sonuç KPZ verilmesinin selenyumun kaspazları azaltma fonksiyonunu potansiyelize ettiği şeklinde yorumlanabilir.

TRPV1 kanalı aktivasyonuna bağlı hücre içerisinde aşırı kalsiyum iyon artışı mitokondri zar depolarizasyonuna neden olmakta ve iki yolağı uyarmaktadır. Bu iki yolak ile aşırı ROS üretimi ve apoptotik yol tetiklenmektedir. Çalışmamızda apoptotik değerlere ilave olarak sıçanların hipokampal nöronlarında, selenyum ve skopolamin uygulamasının TRPV1 kanal aktivitesi aracılığıyla mitokondriyal membran depolarizasyonu (JC-1) ve hücre içi ROS üretim seviyeleri üzerine etkileri araştırıldı, kontrol grubuna kıyasla skopolamin grubunda hem JC-1 hem de ROS düzeylerinde anlamlı düzeyde artış saptandı. Skopolamin tüm beyinde ratna oksidatif stres ile ilişkili olduğundan ROS ve JC-1 artışı bu işlevi ile uyumludur. Skopolamin grubuna kıyasla selenyum ve KPZ gruplarında anlamlı düzeyde azalma olduğu görüldü. Bu sonuç hem KPZ hem de selenyumun ROS ve JC-1 düzeyini azaltarak antioksidan rol aldıkları şeklinde yorumlanabilir ve literatür bulguları ile uyumludur [9, 10]. Skopolamin+selenyum grubuna kıyasla skopolamin+selenyum+KPZ grubunda anlamlı düzeyde azalma olduğu saptandı. Bu sonuç KPZ verilmesinin selenyumun antioksidan fonksiyonunu potansiyelize ettiği şeklinde yorumlanabilir.

Literatürde yer alan bazı çalışmalar bizim sonuçlarımızdan farklı şekilde TRPV1 kanallarının bellek üzerine yararlı etkiler gösterdiğini savunmaktadır. Bir çalışmada KAP tarafından hipokampal TRPV1 reseptörlerinin aktivasyonunun juvenil ratlarda stresin, uzun süreli potansiyalizasyon, uzun süreli depresyon ve uzamsal bellek üzerine negatif etkilerini önleyebildiği tanımlanmıştır [382]. Genro ve ark. seçici TRPV1 antagonisti KPZ'in intrahipokampal infüzyonunun bağlamsal korku belleğinin konsolidasyonunu bozduğunu bildirmiştir [383]. Ayrıca başka bir çalışma, TRPV1 ifadesi azaltılmış farelerde hipokampal uzun süreli potansiyalizasyon ve korku hafızasının her ikisinin de bozulduğunu göstermiştir [250]. TRPV1 antagonisti SB366791 aracılığıyla TRPV1 sinyalizasyonunun zayıflaması, dopamin 3 reseptöründen yoksun bırakılmış [D3R^{-/-}] farelerin bellekle ilgili pasif sakınma testi gibi retansiyon testlerindeki yüksek performanslarını geri çevirmiştir [384]. Bir başka çalışmada TRPV1 agonisti KAP'ın, ratlarda soğuk su stresi ile oluşturulan uzaysal bellek bozukluğunu ve perforant yol-dentat girusun

uzun süreli potansiyalizasyonundaki baskılanmayı belirgin şekilde azalttığını, dendritik regresyonu ortadan kaldırdığını, azalmış sinapsin I ve PSD93 gibi bazı bellekle ilişkili proteinleri artırdığını, protein fosfataz 2A'nın inhibisyonunu ortadan kaldırarak tau hiperfosforizasyonunu engellediğini çalışmalarında bulmuş ve TRPV1 aktivasyonunun, soğuk su stresi kaynaklı AH-benzeri nöropatolojik değişiklikleri ve kognitif bozukluğu azaltabileceği şeklinde yorumlamışlardır [385]. Gupta ve ark. kronik serebral hipoperfüzyon ile vasküler demans modeli uyguladıkları bir fare modelinde TRPV1 selektif agonisti atomoksetin verilmesinin serebral hipoperfüzyon ile indüklenen bozulmuş lokomotor aktiviteyi, motor koordinasyonu, öğrenme ve belleği, beyin hasarını, beyinde artmış oksidatif stresi ve yüksek AChE aktivitesini hafiflettiğini bildirmişlerdir [386].

Bizim çalışmamızın sonuçları bu çalışmalardan farklı şekilde TRPV1 inaktivasyonunun bellek ve nöronal hayatta kalım için olumlu etkiler sağladığını göstermiştir.

TRPM2, farklı beyin bölgelerinde ifade edilen, hücre içi ADP, ısı, H₂O₂ ve ROS tarafından aktive edilen kalsiyum geçirgen bir kanaldır [220]. TRPM2, araşidonik asit ve hücre içi Ca⁺² ile pozitif olarak modüle edilmektedir ve aktivasyonu, heterolog ve doğal hücre hatlarında hücre ölümüne yol açmaktadır [223]. Ca⁺²'nin TRPM2 aktivasyonu için önemli olduğu birçok yayında bildirilmektedir [387, 388]. Ancak TRPM2 kanalları vasıtasıyla Ca⁺² girişinin hangi mekanizma ile nöronal ölüme yol açtığı kesin olarak bilinmemektedir. Nöronlarda üretilen ADPR'nin ayrıntılı mekanizması bilinmemekle birlikte, Yu ve ark. ADPR ile TRPM2 kanallarının aktivasyonunun, geri dönüşü olmayan bir depolarizasyona ve nöronal ölüme yol açan düzensiz Ca⁺² girişine yol açtığını bildirmişlerdir [389]. PARP inhibitörleri ise, TRPM2 kanalları üzerinde ADPR'nin doğrudan aktivitesini etkilemeksizin H₂O₂ ile indüklenen TRPM2 kanallarının açılmasını önlemektedir [390]. Milton ve ark. Mitokondride H₂O₂ moleküllerinin aşırı üretiminin, AH gibi birçok nörodejeneratif hastalığın patogenezinde katkıda bulunduğunu ve AH tedavisi için potansiyel bir hedef haline geldiğini bildirmişlerdir [391]. Rat kortikal nöronlarında redoks-duyarlı Ca⁺² geçirgen kanal olarak ifade edilen TRPM2 ekspresyonunun, nöronal ölüme yol açan H₂O₂ ile indüklenen Ca⁺² girişi için kritik rol oynadığı bildirilmiştir [392]. Fonfria ve ark. Aβ ve H₂O₂'nin endojen TRPM2

ifade eden sıçan striatal hücre kültürlerinde ölümü indüklediğini, TRPM2 inhibisyonunun, A β ve H₂O₂ kaynaklı Ca⁺² ve toksisite artışlarını azaltılabileceğini, TRPM2 aktivitesinin ROS'un üretildiği patofizyolojik koşullarda nöronal hücre ölümüne katkıda bulunabileceğini, TRPM2 aktivitesinin azalmasının koruyucu olabileceğini bildirmişlerdir [393]. ROS'un, TRPM2 gibi bazı Ca⁺² kanallarını etkinleştirerek hücrel Ca⁺² homeostazisinde aksamalara neden olduğu, AH'nda varolan bir Ca⁺² kanalının A β ile dolaylı modülasyonu ya da doğrudan A β ile uyarılması sonucu hücre içi kalsiyum düzeyi artışının en yaygın değişiklik olduğu bildirilmiştir [394]. TRPM2 nöronlarda ifade edilmekte olup hücre-içi Ca⁺² dengesi gibi nöronal canlılığın düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. TRPM2, hücre gövdelerinin yanı sıra akson uzamasında da ifade edildiğinden, hücrel redoks durumlarına bağlı Ca⁺² ve Na⁺ girişini düzenleyerek sinaptik iletim ya da akson uzama sinyallerinde fizyolojik rollere sahip olabilir. H₂O₂ proteinler, lipidler ve DNA üzerinde diğer doğrudan eylemlerine ek olarak, patolojik koşullar altında, aşırı üretildiğinde, TRPM2 aracılı Ca⁺² aşırı girişine sebep olabilir. TRPM2 aracılı Ca⁺² aşırı yüklenmesi, H₂O₂ kaynaklı nöron ölümünün önemli bir belirleyicisidir. Böylece TRPM2 kanalları üzerinden Ca⁺² girişinin önlenmesi, in vivo olarak, oksidatif stresten nöronların korunmasında etkili olabilir [392]. Kaneko ve ark. TRPM2'nin tutulumunun hücre ölümüyle ilişkili olduğunu, A β ile aktive edilen mikroglialardan salınan TNF α 'nın, AH'nda TRPM2 aktivasyonu yoluyla nöronal hücre ölümünü tetiklediğini, sıçan kortikal nöronlarında eksprese edilen TRPM2'nin, nöronal hücre ölümüne neden olan H₂O₂'nin indüklediği Ca⁺² girişine neden olduğunu göstermişlerdir [392]. Astroitler beyindeki mikroglia ve nöronlara GSH'ın ana sağlayıcısıdır [395]. Hücre içi GSH sentezinin inhibisyonunun, insan mikroglia ve astroitlerinde TRPM2 kanalları aracılığı ile hücre içine Ca⁺² girişi ile ilişkili bir nöroenflamatuar yanıtı indüklediği, yaşlanma ve nörolojik hastalıklarda nörodejenerasyon sırasında GSH'ın azalmasının hem mikroglia ve astroitlerin kendilerini aktive etmelerine hem de nöronların hücre ölümlerine karşı hassaslaşmasına neden olduğunu, glial hücrelerde GSH seviyelerinin arttırılmasının, baskın bir nöroinflammatuar bileşene sahip olan AH gibi nörodejeneratif hastalıklarda, nöronal koruma sağlayabileceği bildirilmiştir [396]. Lee ve ark. aynı çalışmada SiRNA ile TRPM2 ifadesinin inhibisyonu ile ya da belirli bir kanal blokörü olarak

klotrimazolün kullanımı ile kanalların bloke edilmesinin, Ca^{+2} girişini inhibe ettiğini ve inflamatuvar yanıtı azalttığını göstermişlerdir [396]. TRPM2 kanallarının açılmasıyla hücre içinde artan kalsiyum ile ilişkili hücresel disfonksiyon ve bir dizi olay yoluyla oluşan amiloid β 'nin, beyin endotel hücrelerini direk bozabileceği, vasküler endoteldeki bu bozulmanın yeterli kan akışını engelleyerek ve nöronal canlılık üzerinde olumsuz sonuçlar doğurarak AH patogenezinde rol oynayabileceği bildirilmiştir [238]. Braun ve ark. serebral arterlerde Amiloid β kaynaklı oksidatif stresin ve TRPM2 kanal aktivitesinin baskılanmasının AH patogenezi ile mücadele edebileceğini bildirmişlerdir [239].

TRPM2 kanalları üzerinde yapılan bu çalışmalar bu kanalların AH oluşumunda etkili olduğuna dair güçlü veriler sunmaktadır. TRPM2'nin AH üzerine bu etkisi çoğu çalışmada hücre içi Ca^{+2} düzeyinde artış nedeniyle oluşmaktadır. Yine bu çalışmalarda TRPM2 kanal uyarıcıların Ca^{+2} girişinde artışa sekonder nöronal ölüme neden olduğunu bunun tersi olarak kanal üzerine inhibitör etkili ajanların Ca^{+2} girişini azaltarak inflamatuvar tepkiyi ve nöronal ölümü azaltarak AH için koruyucu rol alabileceği gösterilmiştir. TRPM2 kanalları aracılığı ile hücre içinde artış gösteren Ca^{+2} , mitokondriyal Ca^{+2} homeostazisinde düzensizliğe, mitokondriyal disfonksiyona yol açarak apoptozisi tetikleyici bir rol oynamaktadır. Jeo ve ark. farelerde travmatik beyin hasarı ile indüklenen deneysel modelde nöronlarda selenyumun, ROS üretimi ve sitokrom c salınımının azaltılması, kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivasyonunun inhibisyonu ve apoptotik hücre ölümünün bloke edilmesi yoluyla koruyucu rol üstlendiğini raporlamışlardır [397]. Her ne kadar apoptotik süreç, kaspaz-3-8-9 gibi tüm kaspaz faaliyetlerini içerse de Shang ve ark. selenyumdan zengin Ganoderma lucidum'dan elde edilen SeGLP-2B-1'in kaspaz-3 ve kaspaz-9'un koruyucu etkilerini uyarırken kaspaz-8 aktivitesini uyarmadığını göstermişlerdir [398]. Sistein, kaspazların aktivitesini modüle edebilen serbest radikallerin modifikasyonuna duyarlı olan tiol grubunun reaktivitesi nedeniyle oksidatif bir hedeftir bu da oksidasyon bazlı düzenleme için kaspaz-3 ve -9 hedef yapmaktadır [399]. Kayan ve ark. over hücrelerinde TRPM2 kanalıyla Ca^{+2} girişi üzerine selenyumun koruyucu bir rol oynadığını göstermişlerdir [400]. Farklı iki çalışmada da bütün hücre patch clamp tekniği ile selenyumun TRPM2 akımlarını inhibe ederek antioksidan rol oynadığı gösterilmiştir [240, 241]. Wang ve ark. TRPM2-ifadesi

azaltılmış hücrelerde, antioksidan kapasite ve Bcl-2/Bax oranında azalma, kaspaz-8 aktivitesinin artış gibi apopitozis ile ilgili özellikler göstermişlerdir. Metilselenosisteinin TRPM2-ifadesindeki azalmanın neden olduğu antioksidan kapasitesindeki değişiklikleri, Bcl 2/Bax oranını ve kaspaz-8 aktivitesini geri döndürebileceği gösterilmiştir. Uygun miktarda selenyum takviyesinin TRPM2 ifadesinde azalma ile uyarılan apopitozisi inhibe edebileceği, hücre canlılığını sürdüreceğini göstermiştir. Bu çalışma selenyum ve TRPM2'in nöroprotektif etki yaptığını düşündürmektedir [345]. Ostapchenko ve ark. AH'nda toksik bir peptid olan oligomerik amiloid β 'nin, TRPM2 kanal aktivasyonunu kolaylaştırdığını bildirdiler. AH modeli oluşturdukları yaşlı farelerde, TRPM2'nin genetik eliminasyonunun, sinaptik markırlardaki defisitleri normalize ettiğini, TRPM2 yokluğunun Alzheimer farelerde gözlenen yaşa bağlı uzamsal bellek defisitlerini geri çevirdiğini, nöronal toksisite ve bellek bozuklukları için TRPM2'nin önemli olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu sonuçlar TRPM2'nin demans tedavisinde etkili terapötik ajanların geliştirilmesi için hedef olabileceği şeklinde yorumlanmıştır [401].

Çalışmamızda TRPM2 aracılı hücre içi Ca^{+2} iyon konsantrasyonu ölçülmüştür. Hipokampal hücre içi kalsiyum iyon konsantrasyonu, kontrol grubuna kıyasla Kontrol + ACA grubunda anlamlı düzeyde azalmış, skopolamin grubunda ise anlamlı düzeyde artmıştır. Skopolamin verilen gruplarda artan Ca^{+2} iyon konsantrasyonu, skopolaminin TRPM2 kanalının açıklığını artırarak bu geçişi artırdığı şeklinde yorumlanabilir. Selenyum ve ACA gruplarında skopolamin grubuna kıyasla hem Ca^{+2} iyon konsantrasyonu daha düşük bulunmuş hem de skopolaminin neden olduğu hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu artışı hafifletilmiştir. ACA TRPM2 antagonisti olduğundan hücre içine giren Ca^{+2} miktarını azaltmak suretiyle hücre içi Ca^{+2} düzeyini azaltmaktadır benzer bir mekanizmayla selenyumun da hücre içine giren Ca^{+2} miktarını TRPM2 aracılığı ile azalttığı düşünülebilir. Selenyumun bu etkisi literatür verileri [240, 241, 400] ile uyumludur.

Çalışmamızda sıçanların hipokampal nöronlarında, selenyum ve skopolamin uygulamasının TRPM2 kanal aktivitesi aracılığıyla apopitozis ve MTT seviyeleri üzerine etkileri de incelenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla skopolamin grubunda apopitozis değerleri artarken, hücre canlılığını gösteren MTT azalmıştır. Bu bulgu

skopolaminin MTT düzeyini azalttığını gösteren [380] ve nöronal apoptozisi artırdığını gösteren [381] literatür çalışmaları ile uyumludur ve deneysel AH modeli oluşturma amacı ile kullanımını destekler bir sonuçtur. Skopolamin grubuna kıyasla selenyum ve ACA verilen gruplarda apoptozis anlamlı düzeyde azalmış, MTT anlamlı düzeyde artmıştır. Bu sonuç ACA uygulanmasının TRPM2 kanalı aracılığı ile tetiklenen apoptozisi azalttığı ve MTT düzeyini artırdığı şeklinde yorumlanabilir. Selenyum verilmesinin TRPM2 aracılığı ile apoptotik hücre ölümünü azalttığı ve hücre canlılığını artırdığını bildiren ve literatür verilerini [345, 397] desteklemektedir. Skopolamin grubuna kıyasla selenyum uygulanan gruplarda apoptozis değerleri daha düşük saptandığı gibi daha önce skopolamin verilmesi ile meydana gelen apoptozis artışı ve MTT azalması selenyum uygulaması sonucu gerilemiştir. Bununla birlikte selenyum verilen grupta kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bu sonuçlar selenyum ve ACA'nın hücre canlılığı üzerine olumlu etkiler sağladığı şeklinde yorumlanabilir.

Sıçanların hipokampal nöronlarında, selenyum ve skopolamin uygulamasının TRPM2 kanal aktivitesi aracılığıyla kaspaz-3 ve kaspaz-9 seviyeleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında skopolamin grubunda hem Kaspaz-3 hem de Kaspaz-9 aktivitesinde anlamlı düzeyde artış saptandı. Skopolamin verilen ratlarda kaspazların artmış olması apoptozisi artırdığını iddia eden literatür verileri ile tutarlıdır. Skopolamin grubuna kıyasla selenyum ve ACA verilen gruplarda hem Kaspaz-3 hem de Kaspaz-9 aktivitesinde anlamlı düzeyde azalma saptandı. Bu sonuç hem ACA hem de selenyumun apoptoziste görevli kaspazları azaltarak antiapoptotik etki yaptığını düşündürmektedir. Bu bulgu literatür bulguları ile uyumludur [345, 397]. Skopolamin+selenyum grubuna kıyasla skopolamin+selenyum+ACA grubunda hem Kaspaz-3 hem de Kaspaz-9 aktivitesinde anlamlı düzeyde azalma saptandı. Bu sonuç ACA verilmesinin selenyumun kaspazları azaltma fonksiyonunu potansiyelize ettiği şeklinde yorumlanabilir.

Sıçanların hipokampal nöronlarında, selenyum ve skopolamin uygulamasının TRPM2 kanal aktivitesi aracılığıyla mitokondriyal membran depolarizasyonu (JC-1) ve hücre içi ROS üretim seviyeleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında skopolamin grubunda hem JC-1 hem de ROS düzeylerinde

anlamli düzeyde artiş saptandı. Skopolamin tüm beyinde artan oksidatif stres ile ilişkili olduğundan ROS ve JC-1 artışı bu işlevi ile uyumludur. Skopolamin grubuna kıyasla selenyum ve ACA verilen gruplarda hem JC-1 hem de ROS düzeylerinde anlamli düzeyde azalma görüldü. Bu sonuç hem ACA hem de selenyumun ROS ve JC-1 düzeyini azaltarak antioksidan rol aldıkları şeklinde yorumlanabilir. Litaratürde selenyum verilmesinin ROS düzeyini azalttığını gösteren [397] çalışma sonuçları ile tutarlıdır. Skopolamin+selenyum grubuna kıyasla skopolamin+selenyum+ACA grubunda hem JC-1 hem de ROS düzeylerinde anlamli düzeyde azalma görüldü. Bu sonuç ACA verilmesinin selenyumun antioksidan fonksiyonunu potansiyelize ettiği şeklinde yorumlanabilir.

Kaspazlar hücrede inaktif (zimojen) olarak prokaspaz formunda bulunur. Apoptoz sinyalinin alınmasıyla inaktif prokaspaz enzimler aktifleşerek diğer inaktif kaspazları aspartik birimlerinden keserek aktifleştirirler [402]. Hasarlanmış sitokrom c mitokondriden sitozole salınmakta ve prokaspaz 9'a bağlanarak pro kısmının ayrılmasını ve aktifleşmesini sağlamaktadır [403]. Aktive edilmiş kaspaz 9, prokaspaz 3 ve 6'nın aktivasyonuna aracılık edebilir [404]. Yousuf ve ark. selenyumun iskemi ile indüklenen serebral hasarda rat hipokampüsünde kaspaz 3 düzeyini belirgin şekilde baskıladığını bildirmişlerdir [405]. İnsan nöronal hücre hatlarında sodyum selenit, sodyum selenat ve seleno-metyonin (sırasıyla 0.1, 0.5 ve 0.5 µM) verilmesi sonucu her 3 grupta da apoptozisi gösteren kaspaz 3 düzeyinin kontrol grubuna göre arttığı gösterilmiştir [406]. Nöroblastoma hücrelerinde hipoksi ile indüklenen prokaspaz-3 aktive kaspaz-3 aktivitesinin tedavi öncesi selenyum verilen hücrelerde kontrol grubuna kıyasla anlamli düzeyde azaldığı gösterilmiştir [372]. Huang ve ark. diyetteki selenyum eksikliğinin kas dokusunda apoptotik p53, kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivitesini artırırken, proapoptotik prokaspaz 3 ve prokaspaz 9 aktivitesini azalttığını bildirmişlerdir [407].

Çalışmamızda kontrol grubuna kıyasla selenyum grubunda hem prokaspaz 3 hem de prokaspaz 9 aktivitesinde anlamli düzeyde azalma saptanmıştır. Skopolamin grubuna kıyasla selenyum grubunda hem prokaspaz 3 hem de prokaspaz 9 düzeyinde anlamli düzeyde azalma saptanmıştır. Selenyumun bu etkisi litaratür verileri ile [372] uyumludur. Bu bulgular selenyumun pro-apoptotik enzimlerin aktivitesini azaltarak

daha apoptotik süreç aktive olmadan bile bu süreci baskılayabildiği şeklinde yorumlanabilir.

PARP esas olarak DNA onarımı ve programlanmış hücre ölümü ile ilgili bir dizi hücrel süreçte yer alan bir protein ailesidir. PARP stres ve/veya DNA hasarı ile karşılaşan hücrelerde aktif hale getirilebilir. Yoğun oksidatif stres altında aşırı PARP aktivasyonu hasarlı DNA'nın tamiri için hücrenin ATP'sini tüketen bir girişimde bulunabilir ve bu durum lizis ve hücre ölümüne (nekroz) yol açar. PARP, mitokondriden apoptozis indükleyici faktör salınımını uyaran PAR üretimi ile kaspaz bağımsız programlanmış hücre ölümünü indükleme yeteneğine de sahiptir [408]. ROS birikimi ile indüklenen PARP-1 aşırı aktivasyonunun enerji eksikliği ve sıklıkla nöronal ölüm ile sonuçlanan glikoliz inhibisyonu ve NAD tükenmesine neden olduğu gösterilmiştir [409, 410]. AH olan 20 hastanın otopsi materyalleri ile yaşları eşleştirilmiş kontrol otopsi materyallerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada AH'na sahip hastaların beyinlerinde PARP-1 aktivasyonunun arttığı gösterilmiş, oksidatif stres ve PARP-1 aktivasyonunun AH patogenezinde önemli erken olaylar olduğu bildirilmiştir [411]. Strosznajder ve ark. A β peptidin nörotoksik parçasının yetişkin sıçanların hipokampusünde PARP-1'in aktivitesini belirgin şekilde güçlendirdiğini göstermişlerdir [412]. PARP-1 gen poliformizminin AH ile ilişkili olduğu da bildirilmiştir [413]. Abeti ve ark. AH hastalarının periferal hücrelerinde ve beyinlerinde ayrıca bir transgenik AH modeli oluşturdukları farelerin nöron ve astrositlerinde PAR polimer birikimi ve artmış PARP-1 aktivitesini gördüğünü ve bunun A β plak oluşumu ile eş zamanlı olarak meydana geldiğini göstermişlerdir [414, 415]. PARP üzerine selenyumun etkisini inceleyen az sayıda çalışma mevcut olup AH'nda PARP üzerine selenyumun etkisini araştıran bir çalışma bizim bildiğimiz kadarıyla bulunmamaktadır. Park ve ark. selenyumun in vivo kaspaz 3 benzeri proteazları inhibe ederek PARP bölünmesini baskılayabileceğini bildirmiştir [416]. Selenitin, beyinden türetilmiş nöral progenitör hücre kültüründe ve travmatik beyin hasarı oluşturulmuş farelerde H₂O₂ ile indüklenen apoptozisi inhibe ettiği, bu in vivo koruyucu fonksiyonun H₂O₂ ile indüklenen ROS üretimi, sitokrom c salınımı, kaspaz 3 ve 9 aktivasyonunun inhibisyonu ile ilişkili olduğu, kontrol grubu karşılaştırıldığında total PARP düzeyinde ve apoptotik Bax proteininde azalma olduğu ancak bir anti apoptotik protein olan Bcl-2 düzeyinin arttığı gösterilmiştir

[397]. Yeo ve ark. deneysel rat spinal kord yaralanması modelinde selenitin sitozolde sitokrom-c salınımı, kaspaz aktivasyonu, PARP aktivasyonu ve ROS birikiminin önlenmesi yoluyla apoptotik hücre ölümünü zayıflattığını göstermişlerdir [417]. Bir selenosistein türevi olan 3,3'-diselenodipropionik asid tedavisi yüksek glikoz kaynaklı PARP bölünmesini ve kaspaz aktivasyonunu anlamlı düzeyde baskılamıştır [418].

Çalışmamızda kontrol grubuna kıyasla skopolamin grubunda PARP aktivitesinde anlamlı düzeyde artış görüldü. Bu bulgu skopolaminin daha önce bahsedildiği gibi oksidatif stres ve apoptozis düzeylerinde yaptığı artış ile paralellik göstermektedir. Skopolamin grubuna kıyasla skopolamin+selenyum ve selenyum gruplarında anlamlı azalma gözlemlendi. skopolamin+selenyum grubuna kıyasla selenyum grubunda anlamlı düzeyde azalma saptanmıştır. Bu bulgular skopolaminin PARP aktivitesini artırdığını, selenyum verilmesinin ise skopolamin grubunda ortaya çıkan artışı anlamlı düzeyde azalttığını göstermektedir. Selenyumun PARP düzeyini azaltması daha önce AH dışı çalışmalarda gösterilen ve yukarıda belirtilen çalışma sonuçları [397, 416-418] ile tutarlıdır.

Sonuç olarak yaşlı ratların skopolamin ile indüklenen demans modelinde, TRPV1 ve TRPM2 kanallarının hipokampal nöronlarda Ca^{+2} ile indüklenen nöronal ölüm ile ilişkili olduğu, selenyum tedavisi ile bu kanalların aktivitesinin azaltılmasının nöronlar üzerinde koruyucu etki sağlayabileceği gösterilmiştir. Selenyum tedavisi apoptozis ve ROS düzeyi ile Kaspaz 3-9, prokaspaz 3-9, PARP aktivitesini azaltırken MTT düzeyini artırmıştır. Selenyum tedavisi ayrıca kısa ve uzun bellek hatalarını azaltmış, hipokampal nöronlarda lipid peroksidasyonunu azaltırken GSH düzeyi ve GSH-Px aktivitesini artırmıştır. Çalışmamız skopolaminin neden olduğu nöronal ölümün ve selenyumun bellek üzerine olumlu etkilerinin endojen oksidatif stres yolakları ile olabileceğini göstermiştir. TRPV1 ve TRPM2 kanalları, oksidatif hipokampal hasarın indüklediği demansın tedavisinde önemli bir farmakolojik hedef olarak görünmektedir.

ÖZET

Ratlarda Skopolamin ile İndüklenen Demans Modelinde Selenyumun Apoptoz, Oksidatif Stres ve Kalsiyum İyon Düzeyleri Üzerine Etkisi

Amaç: Demans, yaşlanan nüfus ile birlikte dünya çapında giderek yaygınlaşmaktadır. Alzheimer Hastalığı (AH) demansın en sık sebebidir. AH'nın etyolojisinde oksidatif stresin önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir. AH'nda artan oksidatif stres ile ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri, nöronlarda dejenerasyona sebep olmaktadır. Eser element olan selenyumun, antioksidan sistemin bir bileşeni olarak bu dejenerasyonu azalttığı düşünülmektedir. Ancak, selenyumun hangi mekanizma ile bilişsel fonksiyonlar üzerinde olumlu etkileri olduğu tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışmada skopolamin uygulamasıyla oluşturulan demans modelinde selenyumun bellek, apoptozis, oksidatif stres, kalsiyum iyon düzeyleri, TRPM2 ve TRPV1 katyon kanalları üzerine etkilerinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

Materyal metod: Çalışmada Wistar albino cinsi dişi ratlar, kontrol, skopolamin, selenyum ve skopolamin+selenyum olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Tüm ratlara 2 hafta boyunca 8 kollu labirentte eğitim verildi ve 15. gün başlangıç bellek kayıtları alındı. Kontrol grubuna 2 hafta intraperitoneal serum fizyolojik (1 mg/kg) uygulandı, 30.gün bellek kayıtları alınarak dekapite edildi. Selenyum grubuna 2 hafta boyunca gün aşırı intraperitoneal selenyum (1,5 mg/kg) uygulandı, 30.gün bellek kayıtları alınarak dekapite edildi. Alzheimer modeli oluşturmak amacıyla skopolamin grubuna 3 hafta boyunca günlük skopolamin (1 mg/kg) intraperitoneal uygulandı, 37. gün bellek kayıtları alınarak dekapite edildi. Skopolamin+selenyum grubu ratlara 3 hafta boyunca skopolamin (1 mg/kg) intraperitoneal uygulandı, 37. gün bellek kayıtları alındı, takiben 2 hafta boyunca gün aşırı intraperitoneal selenyum (1,5 mg/kg) uygulandı ve çalışmanın 52. gününde bellek kayıtları alınarak dekapite edildi. Dekapite edilen ratlarda bellek, apoptozis, oksidatif stres, kalsiyum iyon düzeyleri, TRPM2 ve TRPV1 katyon kanalları üzerine selenyum ve skopolaminin etkileri araştırıldı.

Bulgular: Skopolamin uygulanan ratlarda kontrole göre, 8 kollu ışınal labirent testinde kısa ve uzun süreli bellek hatalarının arttığı, selenyum uygulanan ratlarda kısa ve uzun süreli bellek hatalarının azaldığı bulundu. Skopolamin+selenyum grubunda skopolamin ile oluşan bellek bozukluğunun selenyum uygulanması ile gerilediği görülmüştür. Laboratuvar incelemelerinde skopolamin uygulanan ratlarda lipid peroksidasyonu artarken, GSH düzeyi ve GSH-Px aktivitesinin azaldığı, TRPV1 ve TRPM2 kanalları aracılığıyla hücre içine daha fazla kalsiyum girdiği bu nedenle MTT düzeyinin azaldığı, apoptozis, kaspaz 3-9, ROS, JC-1, prokaspaz 3-9 ve PARP aktivitesinin arttığı bulunmuştur. Selenyum uygulaması, skopolamin uygulamasının neden olduğu bu olumsuz etkileri azaltmıştır.

Sonuç: Skopolamin ile oluşturulan demans modelinde selenyum tedavisinin bellek hatalarını anlamlı ölçüde azalttığı bulunmuştur. Ek olarak, selenyum

tedavisinin oksidatif parametreleri, TRPV1 ve TRPM2 kanalları aracılığı ile hücre içine giren kalsiyum düzeyini ve nöronal ölümü azalttığı gösterilmiştir. TRPV1 ve TRPM2 kanalları, oksidatif hipokampal hasarın indüklediği demansın tedavisinde önemli bir farmakolojik hedef olarak görünmektedir.

Anahtar sözcükler: Selenyum, alzheimer, demans, skopolamin, oksidatif stres, TRPV1, TRPM2, bellek hatası.



SUMMARY

Purpose: Dementia is becoming increasingly common around the world with an aging population. Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia. It is reported that oxidative stress plays an important role in the etiology of AD. Oxygen free radicals associated with increased oxidative stress in AD, leads to the degeneration of neurons. Trace element selenium, as a component of the antioxidant system is thought to be reducing this degeneration. However, mechanism of this positive effect on cognitive function facilitated by selenium is not known exactly. In this study, in the dementia model created with scopolamine, it is intended to elucidate the effects of selenium on memory, apoptosis, oxidative stress, calcium ion levels, and TRPV1, TRPM2 cation channels.

Materials and Methods: Wistar female rats in the study were divided into 4 groups; which were control, scopolamine, scopolamine+selenium and selenium. All rats were trained in the 8-arm maze for 2 weeks and in the 15th day initial memory records were taken. Intraperitoneal saline (1 mg / kg) was administered for two weeks to the control group, in the 30th day memory records were obtained and the rats were decapitated. Selenium (1.5 mg / kg) was administered intraperitoneally every other day for 2 weeks to the selenium group, in the 30th day memory records were obtained and the rats were decapitated. To create a model of Alzheimer's, scopolamine (1 mg / kg) was administered intraperitoneally every day for 3 weeks to scopolamine group, in the 37th day memory records were obtained and the rats were decapitated. Scopolamine (1 mg/kg) was administered intraperitoneally every day for 3 weeks to scopolamine+selenium group, in the 37th day memory records were obtained, then selenium (1.5 mg / kg) was administered intraperitoneally every other day for 2 weeks and in the 52th day of trial, memory records were obtained and the rats were decapitated. In rats which were decapitated, the effects of selenium and scopolamine on memory, apoptosis, oxidative stress, calcium ion levels, TRPV1 and TRPM2 cation channels were investigated.

Results: It was determined that in the radial-arm maze test on the scopolamine administered rats, there were more short and long term memory errors; and on the selenium administered rats, there were less short and long term memory errors compared to control. In the scopolamine + selenium group, it has been shown that the memory impairment caused by scopolamine administration was regressed by administering selenium. In the laboratory examinations on the scopolamine-treated rats, it was found that lipid peroxidation increased, GSH levels and GSH-Px activity decreased and more calcium entered the cells via TRPV1 and TRPM2 channels; therefore levels of MTT decreased, apoptosis, caspase 3-9, ROS, JC-1, procaspase 3-9 and PARP activity increased. Selenium application has reduced the negative effects caused by administration of scopolamine.

Conclusion: In dementia model induced by scopolamine, treatment of selenium has been found to be significantly reducing memory errors. In addition, selenium administration has been shown to be reducing oxidative parameters, the level of calcium entering the cell via TRPV1 and TRPM2 channels and neuronal

death. It seems that TRPM2 and TRPV1 channels may become important pharmacological targets in the treatment of memory impairment induced by oxidative hippocampal injury.

Keywords: Selenium, alzheimer, dementia, scopolamine, oxidative stress, TRPV1, TRPM2, WME, RME.



KAYNAKÇA

1. Prince, M., et al., *The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis*. *Alzheimers Dement*, 2013. 9(1): p. 63-75.e2.
2. Picone, P., et al., *Mitochondrial dysfunction: different routes to Alzheimer's disease therapy*. *Oxid Med Cell Longev*, 2014. 2014: p. 780179.
3. Olanow, C.W., *A radical hypothesis for neurodegeneration*. *Trends Neurosci*, 1993. 16(11): p. 439-44.
4. Lange, I., et al., *TRPM2 functions as a lysosomal Ca²⁺-release channel in beta cells*. *Sci Signal*, 2009. 2(71): p. ra23.
5. Pantaler, E. and A. Luckhoff, *Inhibitors of TRP channels reveal stimulus-dependent differential activation of Ca²⁺ influx pathways in human neutrophil granulocytes*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2009. 380(6): p. 497-507.
6. Chen, J. and M.J. Berry, *Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases*. *J Neurochem*, 2003. 86(1): p. 1-12.
7. Berr, C., et al., *Cognitive decline is associated with systemic oxidative stress: the EVA study. Etude du Vieillissement Arteriel*. *J Am Geriatr Soc*, 2000. 48(10): p. 1285-91.
8. Gao, S., et al., *Selenium level and cognitive function in rural elderly Chinese*. *Am J Epidemiol*, 2007. 165(8): p. 955-65.
9. Kose, S.A. and M. Naziroglu, *Selenium reduces oxidative stress and calcium entry through TRPV1 channels in the neutrophils of patients with polycystic ovary syndrome*. *Biol Trace Elem Res*, 2014. 158(2): p. 136-42.
10. Naziroglu, M., et al., *Neuroprotection induced by N-acetylcysteine and selenium against traumatic brain injury-induced apoptosis and calcium entry in hippocampus of rat*. *Cell Mol Neurobiol*, 2014. 34(6): p. 895-903.
11. Association, A.P., *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5®)*. 2013: American Psychiatric Pub.
12. Mesulam, M.M., *Aging, Alzheimer's Disease and Dementia: Clinical and Neurobiological Perspectives*. *Principles of Behavioral and Cognitive Neurology*, New York, Oxford University Press, (2nd edition), . 2000. 432-529.
13. Polat, F. and E. Kumral, *Normal ve patolojik beyin yaşlanması*.
14. Kurumu, T.İ. *İSTATİSTİKLERLE YAŞLILAR Elderly Statistics 2014*. 2015 [cited Mart 2015 Available from: <http://www.tuik.gov.tr>].
15. N°362, W.h.o.M.c.F.s. *Dementia*. 2015:3; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/en/>.
16. Hİ, G., *Öge AE, Baykan B Editörler, Nöroloji 2*. Baskı içinde. nobel Tıp kitabevleri. 2011. 443-488.

17. Elan D. Louis, S.A.M., Lewis P. Rowland, *Merritt's Neurology*. 13th ed, ed. D.E. Louis. 2015, Wolters Kluwer Health, 2015: Lippincott Williams & Wilkins (December 1, 2010). 410-418.
18. Ballard, C., et al., *Alzheimer's disease*. *Lancet*, 2011. 377(9770): p. 1019-31.
19. Wilcock, G.K. and M.M. Esiri, *Plaques, tangles and dementia. A quantitative study*. *J Neurol Sci*, 1982. 56(2-3): p. 343-56.
20. Magini, A., et al., *Abnormal cortical lysosomal beta-hexosaminidase and beta-galactosidase activity at post-synaptic sites during Alzheimer's disease progression*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2015. 58: p. 62-70.
21. Berchtold, N.C. and C.W. Cotman, *Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer's disease: Greco-Roman period to the 1960s*. *Neurobiol Aging*, 1998. 19(3): p. 173-89.
22. Finger, S., Boller, F., and Tyler, K. , *History of Neurology. Handbook of Clinical Neurology (new series)*. 2010, Edinburgh: Elsevier.
23. Jellinger, K.A., *Alzheimer 100--highlights in the history of Alzheimer research*. *J Neural Transm (Vienna)*, 2006. 113(11): p. 1603-23.
24. Ramirez-Bermudez, J., *Alzheimer's disease: critical notes on the history of a medical concept*. *Arch Med Res*, 2012. 43(8): p. 595-9.
25. Boller, F. and M.M. Forbes, *History of dementia and dementia in history: an overview*. *J Neurol Sci*, 1998. 158(2): p. 125-33.
26. Hebert, L.E., et al., *Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census*. *Neurology*, 2013. 80(19): p. 1778-83.
27. *2013 Alzheimer's disease facts and figures*. *Alzheimers Dement*, 2013. 9(2): p. 208-45.
28. Gurvit, H., et al., *The prevalence of dementia in an urban Turkish population*. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*, 2008. 23(1): p. 67-76.
29. Qiu, C., M. Kivipelto, and E. von Strauss, *Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention*. *Dialogues Clin Neurosci*, 2009. 11(2): p. 111-28.
30. Wimo, A., et al., *The economic impact of dementia in Europe in 2008-cost estimates from the Eurocode project*. *Int J Geriatr Psychiatry*, 2011. 26(8): p. 825-32.
31. Bickel, H. and A. Kurz, *Education, occupation, and dementia: the Bavarian school sisters study*. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 2009. 27(6): p. 548-56.
32. Seshadri, S., et al., *The lifetime risk of stroke: estimates from the Framingham Study*. *Stroke*, 2006. 37(2): p. 345-50.
33. Loy, C.T., et al., *Genetics of dementia*. *Lancet*, 2014. 383(9919): p. 828-40.
34. Sivanandam, T.M. and M.K. Thakur, *Traumatic brain injury: a risk factor for Alzheimer's disease*. *Neurosci Biobehav Rev*, 2012. 36(5): p. 1376-81.

35. Strohmeyer, R. and J. Rogers, *Molecular and cellular mediators of Alzheimer's disease inflammation*. J Alzheimers Dis, 2001. 3(1): p. 131-157.
36. Coyle, J.T., *Use it or lose it--do effortful mental activities protect against dementia?* N Engl J Med, 2003. 348(25): p. 2489-90.
37. Stewart, R., M. Prince, and A. Mann, *Vascular risk factors and Alzheimer's disease*. Aust N Z J Psychiatry, 1999. 33(6): p. 809-13.
38. Obisesan, T.O., et al., *High blood pressure, hypertension, and high pulse pressure are associated with poorer cognitive function in persons aged 60 and older: the Third National Health and Nutrition Examination Survey*. J Am Geriatr Soc, 2008. 56(3): p. 501-9.
39. Rawlings, A.M., et al., *Diabetes in midlife and cognitive change over 20 years: a cohort study*. Ann Intern Med, 2014. 161(11): p. 785-93.
40. Shepardson, N.E., G.M. Shankar, and D.J. Selkoe, *Cholesterol level and statin use in Alzheimer disease: I. Review of epidemiological and preclinical studies*. Arch Neurol, 2011. 68(10): p. 1239-44.
41. Almeida, O.P., et al., *Smoking as a risk factor for Alzheimer's disease: contrasting evidence from a systematic review of case-control and cohort studies*. Addiction, 2002. 97(1): p. 15-28.
42. Tyas, S.L., *Alcohol use and the risk of developing Alzheimer's disease*. Alcohol Res Health, 2001. 25(4): p. 299-306.
43. Pendlebury, S.T. and P.M. Rothwell, *Prevalence, incidence, and factors associated with pre-stroke and post-stroke dementia: a systematic review and meta-analysis*. Lancet Neurol, 2009. 8(11): p. 1006-18.
44. Santangeli, P., et al., *Atrial fibrillation and the risk of incident dementia: a meta-analysis*. Heart Rhythm, 2012. 9(11): p. 1761-8.
45. Razay, G., A. Vreugdenhil, and G. Wilcock, *The metabolic syndrome and Alzheimer disease*. Arch Neurol, 2007. 64(1): p. 93-6.
46. Garcia, A. and K. Zanibbi, *Homocysteine and cognitive function in elderly people*. Cmaj, 2004. 171(8): p. 897-904.
47. Kang, J.H. and F. Grodstein, *Postmenopausal hormone therapy, timing of initiation, APOE and cognitive decline*. Neurobiol Aging, 2012. 33(7): p. 1129-37.
48. Lin, F.R., et al., *Hearing loss and cognitive decline in older adults*. JAMA Intern Med, 2013. 173(4): p. 293-9.
49. Balion, C., et al., *Vitamin D, cognition, and dementia: a systematic review and meta-analysis*. Neurology, 2012. 79(13): p. 1397-405.
50. Rafnsson, S.B., et al., *Cognitive decline and markers of inflammation and hemostasis: the Edinburgh Artery Study*. J Am Geriatr Soc, 2007. 55(5): p. 700-7.
51. Wilson, R.S., et al., *Cognitive decline after hospitalization in a community population of older persons*. Neurology, 2012. 78(13): p. 950-6.

52. Yaffe, K., et al., *Sleep-disordered breathing, hypoxia, and risk of mild cognitive impairment and dementia in older women*. *Jama*, 2011. 306(6): p. 613-9.
53. Sabbath, E.L., et al., *Occupational solvent exposure and cognition: does the association vary by level of education?* *Neurology*, 2012. 78(22): p. 1754-60.
54. Gray, S.L., et al., *Cumulative use of strong anticholinergics and incident dementia: a prospective cohort study*. *JAMA Intern Med*, 2015. 175(3): p. 401-7.
55. Katon, W., et al., *Effect of depression and diabetes mellitus on the risk for dementia: a national population-based cohort study*. *JAMA Psychiatry*, 2015. 72(6): p. 612-9.
56. Shah, R.C., et al., *Hemoglobin level in older persons and incident Alzheimer disease: prospective cohort analysis*. *Neurology*, 2011. 77(3): p. 219-26.
57. Solfrizzi, V., et al., *Dietary intake of unsaturated fatty acids and age-related cognitive decline: a 8.5-year follow-up of the Italian Longitudinal Study on Aging*. *Neurobiol Aging*, 2006. 27(11): p. 1694-704.
58. Scarmeas, N., et al., *Mediterranean diet and mild cognitive impairment*. *Arch Neurol*, 2009. 66(2): p. 216-25.
59. Engelhart, M.J., et al., *Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease*. *Jama*, 2002. 287(24): p. 3223-9.
60. Fratiglioni, L. and H.X. Wang, *Brain reserve hypothesis in dementia*. *J Alzheimers Dis*, 2007. 12(1): p. 11-22.
61. Hollingworth, P., et al., *Alzheimer's disease genetics: current knowledge and future challenges*. *Int J Geriatr Psychiatry*, 2011. 26(8): p. 793-802.
62. Bekris, L.M., et al., *Genetics of Alzheimer disease*. *J Geriatr Psychiatry Neurol*, 2010. 23(4): p. 213-27.
63. Karch, C.M. and A.M. Goate, *Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis*. *Biol Psychiatry*, 2015. 77(1): p. 43-51.
64. Brickell, K.L., et al., *Early-onset Alzheimer disease in families with late-onset Alzheimer disease: a potential important subtype of familial Alzheimer disease*. *Arch Neurol*, 2006. 63(9): p. 1307-11.
65. Reisberg, B., et al., *The Global Deterioration Scale for assessment of primary degenerative dementia*. *Am J Psychiatry*, 1982. 139(9): p. 1136-9.
66. Morris, J.C., *The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules*. *Neurology*, 1993. 43(11): p. 2412-4.
67. McKhann, G.M., et al., *The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease*. *Alzheimers Dement*, 2011. 7(3): p. 263-9.

68. Sperling, R.A., et al., *Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease*. *Alzheimers Dement*, 2011. 7(3): p. 280-92.
69. Jack, C.R., Jr., et al., *Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease*. *Alzheimers Dement*, 2011. 7(3): p. 257-62.
70. El-Agnaf, O.M., et al., *Oligomerization and toxicity of beta-amyloid-42 implicated in Alzheimer's disease*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. 273(3): p. 1003-7.
71. Sorrentino, G. and V. Bonavita, *Neurodegeneration and Alzheimer's disease: the lesson from tauopathies*. *Neurol Sci*, 2007. 28(2): p. 63-71.
72. Citron, M., *Strategies for disease modification in Alzheimer's disease*. *Nat Rev Neurosci*, 2004. 5(9): p. 677-85.
73. Petersen, R.C., et al., *Practice parameter: early detection of dementia: mild cognitive impairment (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology*. *Neurology*, 2001. 56(9): p. 1133-42.
74. M., E., *Nöroloji Temel Kitabı*. 2013, Ankara: Güneş Tıp Kitabevi.
75. Braak, E., et al., *Neuropathology of Alzheimer's disease: what is new since A. Alzheimer?* *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 1999. 249 Suppl 3: p. 14-22.
76. Obulesu, M., R. Venu, and R. Somashekhar, *Tau mediated neurodegeneration: an insight into Alzheimer's disease pathology*. *Neurochem Res*, 2011. 36(8): p. 1329-35.
77. Villemagne, V.L., et al., *Amyloid imaging with (18)F-florbetaben in Alzheimer disease and other dementias*. *J Nucl Med*, 2011. 52(8): p. 1210-7.
78. Vemuri, P., et al., *Antemortem differential diagnosis of dementia pathology using structural MRI: Differential-STAND*. *Neuroimage*, 2011. 55(2): p. 522-31.
79. Mosconi, L., et al., *Multicenter standardized 18F-FDG PET diagnosis of mild cognitive impairment, Alzheimer's disease, and other dementias*. *J Nucl Med*, 2008. 49(3): p. 390-8.
80. Hahn, K., et al., *Selectively and progressively disrupted structural connectivity of functional brain networks in Alzheimer's disease - revealed by a novel framework to analyze edge distributions of networks detecting disruptions with strong statistical evidence*. *Neuroimage*, 2013. 81: p. 96-109.
81. Pievani, M., et al., *Functional network disruption in the degenerative dementias*. *Lancet Neurol*, 2011. 10(9): p. 829-43.
82. Teipel, S., et al., *Multimodal imaging in Alzheimer's disease: validity and usefulness for early detection*. *Lancet Neurol*, 2015. 14(10): p. 1037-53.
83. O'Brien, R.J. and P.C. Wong, *Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease*. *Annu Rev Neurosci*, 2011. 34: p. 185-204.

84. Newman, M., I.F. Musgrave, and M. Lardelli, *Alzheimer disease: amyloidogenesis, the presenilins and animal models*. Biochim Biophys Acta, 2007. 1772(3): p. 285-97.
85. Oddo, S., et al., *Blocking Abeta42 accumulation delays the onset and progression of tau pathology via the C terminus of heat shock protein70-interacting protein: a mechanistic link between Abeta and tau pathology*. J Neurosci, 2008. 28(47): p. 12163-75.
86. Guo, J.L. and V.M. Lee, *Seeding of normal Tau by pathological Tau conformers drives pathogenesis of Alzheimer-like tangles*. J Biol Chem, 2011. 286(17): p. 15317-31.
87. Iba, M., et al., *Synthetic tau fibrils mediate transmission of neurofibrillary tangles in a transgenic mouse model of Alzheimer's-like tauopathy*. J Neurosci, 2013. 33(3): p. 1024-37.
88. Medina, M. and J. Avila, *The role of extracellular Tau in the spreading of neurofibrillary pathology*. Front Cell Neurosci, 2014. 8: p. 113.
89. De-Paula, V.J., et al., *Alzheimer's disease*. Subcell Biochem, 2012. 65: p. 329-52.
90. Mesulam, M., *Davranışsal ve Kognitif Nörolojinin İlkeleri*. 2004, İstanbul: Yelkovan Yayınevi (Orjinal eser, 2000).
91. Ferrero-Miliani, L., et al., *Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation*. Clin Exp Immunol, 2007. 147(2): p. 227-35.
92. Gao, H.M. and J.S. Hong, *Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression*. Trends Immunol, 2008. 29(8): p. 357-65.
93. Akiyama, H., et al., *Inflammation and Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 2000. 21(3): p. 383-421.
94. Kara İ, M.A., *İnflamasyon ve Norodejeneratif Hastalıklar*. Türkiye Klinikleri J Med Sci, 2008(28(Suppl)): p. 115-118.
95. Liu, L. and C. Chan, *The role of inflammasome in Alzheimer's disease*. Ageing Res Rev, 2014. 15: p. 6-15.
96. *2015 Alzheimer's disease facts and figures*. Alzheimers Dement, 2015. 11(3): p. 332-84.
97. Galimberti, D. and E. Scarpini, *Progress in Alzheimer's disease*. J Neurol, 2012. 259(2): p. 201-11.
98. Fisher, A., *Cholinergic treatments with emphasis on m1 muscarinic agonists as potential disease-modifying agents for Alzheimer's disease*. Neurotherapeutics, 2008. 5(3): p. 433-42.
99. ÖZTÜRK, G.B. and M.A. KARAN, *Alzheimer hastalığının fizyopatolojisi*. Klinik Gelişim, 2009. 22: p. 32-46.

100. Pakaski, M. and J. Kalman, *Interactions between the amyloid and cholinergic mechanisms in Alzheimer's disease*. Neurochem Int, 2008. 53(5): p. 103-11.
101. ELMACI, N.T., *Alzheimer Hastalığının Patofizyolojisi*. Turkiye Klinikleri Journal of Neurology Special Topics, 2012. 5(3): p. 7-10.
102. Reddy, P.H. and M.F. Beal, *Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease*. Trends Mol Med, 2008. 14(2): p. 45-53.
103. Caspersen, C., et al., *Mitochondrial Abeta: a potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer's disease*. Faseb j, 2005. 19(14): p. 2040-1.
104. ERÖZ, R., et al., *Apoptozis hakkında bilinenler (literatür taraması)*. Duzce Medical Journal, 2012. 14(2).
105. Seifried, H.E., et al., *A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species*. J Nutr Biochem, 2007. 18(9): p. 567-79.
106. Derin, D., A. Yazıcı, and Ş. Erkoç, *Şizofrenik Bozukluğu Olan Hastalarda Serbest Radikal Metabolizması ve Nonenzimatik Antioksidan Savunma Sistemi Elemanlarının İncelenmesi*. Bull Clin Psychopharmacol, 2001. 11: p. 174-182.
107. Gutteridge, J.M., *Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage*. Clin Chem, 1995. 41(12 Pt 2): p. 1819-28.
108. Gutteridge, J.M. and B. Halliwell, *Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future*. Ann N Y Acad Sci, 2000. 899: p. 136-47.
109. Dringen, R., *Metabolism and functions of glutathione in brain*. Prog Neurobiol, 2000. 62(6): p. 649-71.
110. Halliwell, B., *Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life*. Plant Physiol, 2006. 141(2): p. 312-22.
111. Reynolds, A., et al., *Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders*. Int Rev Neurobiol, 2007. 82: p. 297-325.
112. Valko, M., et al., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. 39(1): p. 44-84.
113. Bonda, D.J., et al., *Oxidative stress in Alzheimer disease: a possibility for prevention*. Neuropharmacology, 2010. 59(4-5): p. 290-4.
114. Petersen, R.B., et al., *Signal transduction cascades associated with oxidative stress in Alzheimer's disease*. J Alzheimers Dis, 2007. 11(2): p. 143-52.
115. Sultana, R., et al., *Protein levels and activity of some antioxidant enzymes in hippocampus of subjects with amnesic mild cognitive impairment*. Neurochem Res, 2008. 33(12): p. 2540-6.
116. Zhu, X., et al., *Alzheimer disease, the two-hit hypothesis: an update*. Biochim Biophys Acta, 2007. 1772(4): p. 494-502.
117. Mariani, E., et al., *Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2005. 827(1): p. 65-75.

118. Stuchbury, G. and G. Munch, *Alzheimer's associated inflammation, potential drug targets and future therapies*. J Neural Transm (Vienna), 2005. 112(3): p. 429-53.
119. Mandelkow, E., et al., *Structural principles of tau and the paired helical filaments of Alzheimer's disease*. Brain Pathol, 2007. 17(1): p. 83-90.
120. Butterfield, D.A., et al., *Elevated protein-bound levels of the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal, in brain from persons with mild cognitive impairment*. Neurosci Lett, 2006. 397(3): p. 170-3.
121. Mangialasche, F., et al., *Biomarkers of oxidative and nitrosative damage in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment*. Ageing Res Rev, 2009. 8(4): p. 285-305.
122. Nunomura, A., et al., *Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease*. J Neuropathol Exp Neurol, 2001. 60(8): p. 759-67.
123. Baldeiras, I., et al., *Peripheral oxidative damage in mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease*. J Alzheimers Dis, 2008. 15(1): p. 117-28.
124. Lovell, M.A. and W.R. Markesbery, *Oxidative damage in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease*. J Neurosci Res, 2007. 85(14): p. 3036-40.
125. Nunomura, A., et al., *Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease*. J Neuropathol Exp Neurol, 2006. 65(7): p. 631-41.
126. Mancuso, M., et al., *Mitochondria, mitochondrial DNA and Alzheimer's disease. What comes first?* Curr Alzheimer Res, 2008. 5(5): p. 457-68.
127. Pratico, D., *Alzheimer's disease and the quest for its biological measures*. J Alzheimers Dis, 2013. 33 Suppl 1: p. S237-41.
128. Brennan, A.M., et al., *NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation*. Nat Neurosci, 2009. 12(7): p. 857-63.
129. Cho, D.H., et al., *S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury*. Science, 2009. 324(5923): p. 102-5.
130. Nakamura, T. and S.A. Lipton, *Redox modulation by S-nitrosylation contributes to protein misfolding, mitochondrial dynamics, and neuronal synaptic damage in neurodegenerative diseases*. Cell Death Differ, 2011. 18(9): p. 1478-86.
131. Chauhan, V. and A. Chauhan, *Oxidative stress in Alzheimer's disease*. Pathophysiology, 2006. 13(3): p. 195-208.
132. Varadarajan, S., et al., *Review: Alzheimer's amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity*. J Struct Biol, 2000. 130(2-3): p. 184-208.
133. Mao, P. and P.H. Reddy, *Aging and amyloid beta-induced oxidative DNA damage and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease: implications for early intervention and therapeutics*. Biochim Biophys Acta, 2011. 1812(11): p. 1359-70.

134. Greenough, M.A., J. Camakaris, and A.I. Bush, *Metal dyshomeostasis and oxidative stress in Alzheimer's disease*. *Neurochem Int*, 2013. 62(5): p. 540-55.
135. Hayashi, T., et al., *Lipid peroxidation and 4-hydroxy-2-nonenal formation by copper ion bound to amyloid-beta peptide*. *Free Radic Biol Med*, 2007. 43(11): p. 1552-9.
136. Nakamura, M., et al., *Three histidine residues of amyloid-beta peptide control the redox activity of copper and iron*. *Biochemistry*, 2007. 46(44): p. 12737-43.
137. Naziroglu, M., *Role of selenium on calcium signaling and oxidative stress-induced molecular pathways in epilepsy*. *Neurochem Res*, 2009. 34(12): p. 2181-91.
138. Liochev, S.I. and I. Fridovich, *The Haber-Weiss cycle -- 70 years later: an alternative view*. *Redox Rep*, 2002. 7(1): p. 55-7; author reply 59-60.
139. Blokhina, O., E. Virolainen, and K.V. Fagerstedt, *Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review*. *Ann Bot*, 2003. 91 Spec No: p. 179-94.
140. Castro, L. and B.A. Freeman, *Reactive oxygen species in human health and disease*. *Nutrition*, 2001. 17(2): p. 161, 163-5.
141. Dumont, M. and M.F. Beal, *Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease*. *Free Radic Biol Med*, 2011. 51(5): p. 1014-26.
142. Feng, Y. and X. Wang, *Antioxidant therapies for Alzheimer's disease*. *Oxid Med Cell Longev*, 2012. 2012: p. 472932.
143. Cummings, J.L., *Alzheimer's disease*. *N Engl J Med*, 2004. 351(1): p. 56-67.
144. Weinstock, M. and S. Shoham, *Rat models of dementia based on reductions in regional glucose metabolism, cerebral blood flow and cytochrome oxidase activity*. *J Neural Transm (Vienna)*, 2004. 111(3): p. 347-66.
145. Gerhardsson, L., et al., *Metal concentrations in plasma and cerebrospinal fluid in patients with Alzheimer's disease*. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 2008. 25(6): p. 508-15.
146. Bush, A.I., *The metal theory of Alzheimer's disease*. *J Alzheimers Dis*, 2013. 33 Suppl 1: p. S277-81.
147. Craddock, T.J., et al., *The zinc dyshomeostasis hypothesis of Alzheimer's disease*. *PLoS One*, 2012. 7(3): p. e33552.
148. Brown, K.M. and J.R. Arthur, *Selenium, selenoproteins and human health: a review*. *Public Health Nutr*, 2001. 4(2b): p. 593-9.
149. Kieliszek, M. and S. Blazejak, *Selenium: Significance, and outlook for supplementation*. *Nutrition*, 2013. 29(5): p. 713-8.
150. Strozyk, D., et al., *Zinc and copper modulate Alzheimer Abeta levels in human cerebrospinal fluid*. *Neurobiol Aging*, 2009. 30(7): p. 1069-77.
151. Bellinger, F.P., et al., *Regulation and function of selenoproteins in human disease*. *Biochem J*, 2009. 422(1): p. 11-22.

152. Zhang, S., C. Rocourt, and W.H. Cheng, *Selenoproteins and the aging brain*. Mech Ageing Dev, 2010. 131(4): p. 253-60.
153. Rayman, M.P., H.G. Infante, and M. Sargent, *Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation*. Br J Nutr, 2008. 100(2): p. 238-53.
154. Schomburg, L., U. Schweizer, and J. Kohrle, *Selenium and selenoproteins in mammals: extraordinary, essential, enigmatic*. Cell Mol Life Sci, 2004. 61(16): p. 1988-95.
155. Puertas, M.C., et al., *Plasma oxidative stress parameters in men and women with early stage Alzheimer type dementia*. Exp Gerontol, 2012. 47(8): p. 625-30.
156. Schweizer, U., et al., *Selenium and brain function: a poorly recognized liaison*. Brain Res Brain Res Rev, 2004. 45(3): p. 164-78.
157. Peters, M.M., et al., *Altered hippocampus synaptic function in selenoprotein P deficient mice*. Mol Neurodegener, 2006. 1: p. 12.
158. Papp, L.V., A. Holmgren, and K.K. Khanna, *Selenium and selenoproteins in health and disease*. Antioxid Redox Signal, 2010. 12(7): p. 793-5.
159. Schuessel, K., et al., *Impact of gender on upregulation of antioxidant defence mechanisms in Alzheimer's disease brain*. J Neural Transm (Vienna), 2004. 111(9): p. 1167-82.
160. Garcia, T., et al., *Oxidative stress status and RNA expression in hippocampus of an animal model of Alzheimer's disease after chronic exposure to aluminum*. Hippocampus, 2010. 20(1): p. 218-25.
161. Filipcik, P., et al., *The role of oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease*. Bratisl Lek Listy, 2006. 107(9-10): p. 384-94.
162. Steinbrenner, H. and H. Sies, *Selenium homeostasis and antioxidant selenoproteins in brain: implications for disorders in the central nervous system*. Arch Biochem Biophys, 2013. 536(2): p. 152-7.
163. Takemoto, A.S., M.J. Berry, and F.P. Bellinger, *Role of selenoprotein P in Alzheimer's disease*. Ethn Dis, 2010. 20(1 Suppl 1): p. S1-92-5.
164. de la Monte, S.M., et al., *Therapeutic rescue of neurodegeneration in experimental type 3 diabetes: relevance to Alzheimer's disease*. J Alzheimers Dis, 2006. 10(1): p. 89-109.
165. Swerdlow, R.H., J.M. Burns, and S.M. Khan, *The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: progress and perspectives*. Biochim Biophys Acta, 2014. 1842(8): p. 1219-31.
166. Behne, D., et al., *Evidence for specific selenium target tissues and new biologically important selenoproteins*. Biochim Biophys Acta, 1988. 966(1): p. 12-21.
167. Smorgon, C., et al., *Trace elements and cognitive impairment: an elderly cohort study*. Arch Gerontol Geriatr Suppl, 2004(9): p. 393-402.

168. Cardoso, B.R., et al., *Nutritional status of selenium in Alzheimer's disease patients*. Br J Nutr, 2010. 103(6): p. 803-6.
169. Vural, H., et al., *Alterations of plasma magnesium, copper, zinc, iron and selenium concentrations and some related erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with Alzheimer's disease*. J Trace Elem Med Biol, 2010. 24(3): p. 169-73.
170. Olde Rikkert, M.G., et al., *Differences in nutritional status between very mild Alzheimer's disease patients and healthy controls*. J Alzheimers Dis, 2014. 41(1): p. 261-71.
171. Zhou, J.C., et al., *Selenoprotein gene expression in thyroid and pituitary of young pigs is not affected by dietary selenium deficiency or excess*. J Nutr, 2009. 139(6): p. 1061-6.
172. Nakayama, A., et al., *All regions of mouse brain are dependent on selenoprotein P for maintenance of selenium*. J Nutr, 2007. 137(3): p. 690-3.
173. Loef, M., G.N. Schrauzer, and H. Walach, *Selenium and Alzheimer's disease: a systematic review*. J Alzheimers Dis, 2011. 26(1): p. 81-104.
174. Krishnan, S. and P. Rani, *Evaluation of selenium, redox status and their association with plasma amyloid/tau in Alzheimer's disease*. Biol Trace Elem Res, 2014. 158(2): p. 158-65.
175. Bellinger, F.P., et al., *Association of selenoprotein p with Alzheimer's pathology in human cortex*. J Alzheimers Dis, 2008. 15(3): p. 465-72.
176. Akbaraly, T.N., et al., *Plasma selenium over time and cognitive decline in the elderly*. Epidemiology, 2007. 18(1): p. 52-8.
177. Zhang, Z., X. Shen, and X. Xu, *[Effects of selenium on the damage of learning-memory ability of mice induced by fluoride]*. Wei Sheng Yan Jiu, 2001. 30(3): p. 144-6.
178. Qin, F., Y. Ye, and X. Yao, *[Effects of nano-selenium on the capability of learning memory and the activity of Se-protein of mice]*. Wei Sheng Yan Jiu, 2008. 37(4): p. 502-4.
179. Haratake, M., et al., *Elevated amyloid-beta plaque deposition in dietary selenium-deficient Tg2576 transgenic mice*. Metallomics, 2013. 5(5): p. 479-83.
180. Lovell, M.A., et al., *Organoselenium (Sel-Plex diet) decreases amyloid burden and RNA and DNA oxidative damage in APP/PS1 mice*. Free Radic Biol Med, 2009. 46(11): p. 1527-33.
181. Ishrat, T., et al., *Selenium prevents cognitive decline and oxidative damage in rat model of streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's type*. Brain Res, 2009. 1281: p. 117-27.
182. Corcoran, N.M., et al., *Sodium selenate specifically activates PP2A phosphatase, dephosphorylates tau and reverses memory deficits in an Alzheimer's disease model*. J Clin Neurosci, 2010. 17(8): p. 1025-33.

183. van Eersel, J., et al., *Sodium selenate mitigates tau pathology, neurodegeneration, and functional deficits in Alzheimer's disease models*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(31): p. 13888-93.
184. Gwon, A.R., et al., *Selenium attenuates A beta production and A beta-induced neuronal death*. Neurosci Lett, 2010. 469(3): p. 391-5.
185. Yim, S.Y., et al., *ERK activation induced by selenium treatment significantly downregulates beta/gamma-secretase activity and Tau phosphorylation in the transgenic rat overexpressing human selenoprotein M*. Int J Mol Med, 2009. 24(1): p. 91-6.
186. Tung, Y.T., et al., *Sodium selenite inhibits gamma-secretase activity through activation of ERK*. Neurosci Lett, 2008. 440(1): p. 38-43.
187. Huang, K., et al., *Role of selenium in cytoprotection against cholesterol oxide-induced vascular damage in rats*. Atherosclerosis, 2002. 162(1): p. 137-44.
188. Lewin, M.H., et al., *Selenium supplementation acting through the induction of thioredoxin reductase and glutathione peroxidase protects the human endothelial cell line EAhy926 from damage by lipid hydroperoxides*. Biochim Biophys Acta, 2002. 1593(1): p. 85-92.
189. Rayman, M.P., *The importance of selenium to human health*. Lancet, 2000. 356(9225): p. 233-41.
190. Combs, G.F., Jr., *Selenium in global food systems*. Br J Nutr, 2001. 85(5): p. 517-47.
191. Xiong, S., et al., *Seleno-L-methionine protects against beta-amyloid and iron/hydrogen peroxide-mediated neuron death*. Antioxid Redox Signal, 2007. 9(4): p. 457-67.
192. Searle, J., J.F. Kerr, and C.J. Bishop, *Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance*. Pathol Annu, 1982. 17 Pt 2: p. 229-59.
193. Vaux, D.L., G. Haeccker, and A. Strasser, *An evolutionary perspective on apoptosis*. Cell, 1994. 76(5): p. 777-9.
194. Kinloch, R.A., et al., *The pharmacology of apoptosis*. Trends Pharmacol Sci, 1999. 20(1): p. 35-42.
195. Ulukaya, E., C. Acilan, and Y. Yilmaz, *Apoptosis: why and how does it occur in biology?* Cell Biochem Funct, 2011. 29(6): p. 468-80.
196. Sakamaki, K. and Y. Satou, *Caspases: evolutionary aspects of their functions in vertebrates*. J Fish Biol, 2009. 74(4): p. 727-53.
197. Green, D. and G. Kroemer, *The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria?* Trends in cell biology, 1998. 8(7): p. 267-271.
198. Riedl, S.J. and Y. Shi, *Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. 5(11): p. 897-907.
199. Yi, C.H. and J. Yuan, *The Jekyll and Hyde functions of caspases*. Dev Cell, 2009. 16(1): p. 21-34.

200. Porter, A.G. and R.U. Janicke, *Emerging roles of caspase-3 in apoptosis*. Cell Death Differ, 1999. 6(2): p. 99-104.
201. Liston, P., W.G. Fong, and R.G. Korneluk, *The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2*. Oncogene, 2003. 22(53): p. 8568-80.
202. Henderson, S., et al., *Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death*. Cell, 1991. 65(7): p. 1107-15.
203. Koyama, A.H., et al., *Suppression of apoptotic and necrotic cell death by poliovirus*. J Gen Virol, 2001. 82(Pt 12): p. 2965-72.
204. Thornberry, N.A. and Y. Lazebnik, *Caspases: enemies within*. Science, 1998. 281(5381): p. 1312-6.
205. Cummings, M.C., C.M. Winterford, and N.I. Walker, *Apoptosis*. Am J Surg Pathol, 1997. 21(1): p. 88-101.
206. Green, D.R., *Apoptotic pathways: ten minutes to dead*. Cell, 2005. 121(5): p. 671-4.
207. Enari, M., H. Hug, and S. Nagata, *Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis*. Nature, 1995. 375(6526): p. 78-81.
208. Ferri, K.F. and G. Kroemer, *Organelle-specific initiation of cell death pathways*. Nat Cell Biol, 2001. 3(11): p. E255-63.
209. Everett, H. and G. McFadden, *Apoptosis: an innate immune response to virus infection*. Trends Microbiol, 1999. 7(4): p. 160-5.
210. Rao, R.V., et al., *Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation*. J Biol Chem, 2001. 276(36): p. 33869-74.
211. https://en.wikipedia.org/wiki/Calcium_channel#cite_note-pmid8791458-2.
212. Qi, H., et al., *All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(4): p. 1219-23.
213. Cosens, D. and A. Manning, *Abnormal electroretinogram from a Drosophila mutant*. 1969.
214. Minke, B., C. Wu, and W.L. Pak, *Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in Drosophila mutant*. Nature, 1975. 258(5530): p. 84-7.
215. Mobasher, A. and R. Barrett-Jolley, *Transient receptor potential channels: emerging roles in health and disease*. Vet J, 2011. 187(2): p. 145-6.
216. Hardie, R.C. and B. Minke, *The trp gene is essential for a light-activated Ca²⁺ channel in Drosophila photoreceptors*. Neuron, 1992. 8(4): p. 643-51.
217. Venkatachalam, K. and C. Montell, *TRP channels*. Annu Rev Biochem, 2007. 76: p. 387-417.
218. Montell, C., *The TRP superfamily of cation channels*. Sci STKE, 2005. 2005(272): p. re3.

219. Voets, T. and B. Nilius, *Modulation of TRPs by PIPs*. J Physiol, 2007. 582(Pt 3): p. 939-44.
220. Nilius, B., et al., *Transient receptor potential cation channels in disease*. Physiol Rev, 2007. 87(1): p. 165-217.
221. Nilius, B. and G. Owsianik, *Transient receptor potential channelopathies*. Pflugers Arch, 2010. 460(2): p. 437-50.
222. Pan, Z., H. Yang, and P.S. Reinach, *Transient receptor potential (TRP) gene superfamily encoding cation channels*. Hum Genomics, 2011. 5(2): p. 108-16.
223. Hara, Y., et al., *LTRPC2 Ca²⁺-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death*. Mol Cell, 2002. 9(1): p. 163-73.
224. Zhang, W., et al., *A novel TRPM2 isoform inhibits calcium influx and susceptibility to cell death*. J Biol Chem, 2003. 278(18): p. 16222-9.
225. Naziroglu, M. and A. Luckhoff, *A calcium influx pathway regulated separately by oxidative stress and ADP-Ribose in TRPM2 channels: single channel events*. Neurochem Res, 2008. 33(7): p. 1256-62.
226. Nagamine, K., et al., *Molecular cloning of a novel putative Ca²⁺ channel protein (TRPC7) highly expressed in brain*. Genomics, 1998. 54(1): p. 124-31.
227. Hecquet, C.M. and A.B. Malik, *Role of H₂O₂-activated TRPM2 calcium channel in oxidant-induced endothelial injury*. Thromb Haemost, 2009. 101(4): p. 619-25.
228. Nishida, M., et al., *TRP channels: formation of signal complex and regulation of cellular functions*. Nihon Yakurigaku Zasshi, 2003. 121(4): p. 223-32.
229. Özgül C, N.M., *Nörolojik hücrelerde TRPM2 katyon kanallarının moleküler mekanizmalardaki rolleri*. Journal of Experimental and Clinical Medicine, 2010. 27: p. 144-151.
230. Clapham, D.E., *TRP channels as cellular sensors*. Nature, 2003. 426(6966): p. 517-24.
231. Wehage, E., et al., *Activation of the cation channel long transient receptor potential channel 2 (LTRPC2) by hydrogen peroxide. A splice variant reveals a mode of activation independent of ADP-ribose*. J Biol Chem, 2002. 277(26): p. 23150-6.
232. Perraud, A.L., et al., *Accumulation of free ADP-ribose from mitochondria mediates oxidative stress-induced gating of TRPM2 cation channels*. J Biol Chem, 2005. 280(7): p. 6138-48.
233. Heiner, I., et al., *Expression profile of the transient receptor potential (TRP) family in neutrophil granulocytes: evidence for currents through long TRP channel 2 induced by ADP-ribose and NAD*. Biochem J, 2003. 371(Pt 3): p. 1045-53.
234. Kolisek, M., et al., *Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels*. Mol Cell, 2005. 18(1): p. 61-9.

235. Ishii, M., et al., *Intracellular-produced hydroxyl radical mediates H₂O₂-induced Ca²⁺ influx and cell death in rat beta-cell line RIN-5F*. *Cell Calcium*, 2006. 39(6): p. 487-94.
236. Yamamoto, S., et al., *Transient receptor potential channels in Alzheimer's disease*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. 1772(8): p. 958-67.
237. Wu, L.J., T.B. Sweet, and D.E. Clapham, *International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family*. *Pharmacol Rev*, 2010. 62(3): p. 381-404.
238. Park, L., et al., *The key role of transient receptor potential melastatin-2 channels in amyloid-beta-induced neurovascular dysfunction*. *Nat Commun*, 2014. 5: p. 5318.
239. Braun, A.P., *A novel disease connection for TRPM2 channels*. *Channels (Austin)*, 2014. 8(6): p. 475-6.
240. Zeng, B., G.L. Chen, and S.Z. Xu, *Divalent copper is a potent extracellular blocker for TRPM2 channel*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012. 424(2): p. 279-84.
241. Naziroglu, M., et al., *Selenium modulates oxidative stress-induced TRPM2 cation channel currents in transfected Chinese hamster ovary cells*. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2013. 112(2): p. 96-102.
242. Garcia-Sanz, N., et al., *Identification of a tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor*. *J Neurosci*, 2004. 24(23): p. 5307-14.
243. Caterina, M.J., et al., *The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway*. *Nature*, 1997. 389(6653): p. 816-24.
244. Tominaga, M., et al., *The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli*. *Neuron*, 1998. 21(3): p. 531-43.
245. Gibson, H.E., et al., *TRPV1 channels mediate long-term depression at synapses on hippocampal interneurons*. *Neuron*, 2008. 57(5): p. 746-59.
246. Mezey, E., et al., *Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(7): p. 3655-60.
247. Marinelli, S., et al., *Presynaptic facilitation of glutamatergic synapses to dopaminergic neurons of the rat substantia nigra by endogenous stimulation of vanilloid receptors*. *J Neurosci*, 2003. 23(8): p. 3136-44.
248. Li, D.P., S.R. Chen, and H.L. Pan, *VR1 receptor activation induces glutamate release and postsynaptic firing in the paraventricular nucleus*. *J Neurophysiol*, 2004. 92(3): p. 1807-16.
249. Yang, K., et al., *Capsaicin facilitates excitatory but not inhibitory synaptic transmission in substantia gelatinosa of the rat spinal cord*. *Neurosci Lett*, 1998. 255(3): p. 135-8.
250. Marsch, R., et al., *Reduced anxiety, conditioned fear, and hippocampal long-term potentiation in transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-deficient mice*. *J Neurosci*, 2007. 27(4): p. 832-9.

251. Ramsey, I.S., M. Delling, and D.E. Clapham, *An introduction to TRP channels*. *Annu Rev Physiol*, 2006. 68: p. 619-47.
252. Szallasi, A., F. Cruz, and P. Geppetti, *TRPV1: a therapeutic target for novel analgesic drugs?* *Trends Mol Med*, 2006. 12(11): p. 545-54.
253. Chuang, H.-h., et al., *Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns (4, 5) P2-mediated inhibition*. *Nature*, 2001. 411(6840): p. 957-962.
254. Voets, T., et al., *The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels*. *Nature*, 2004. 430(7001): p. 748-54.
255. Galve-Roperh, I., et al., *Anti-tumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation*. *Nat Med*, 2000. 6(3): p. 313-9.
256. Yoshida, T., et al., *Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation*. *Nat Chem Biol*, 2006. 2(11): p. 596-607.
257. Naziroglu, M., B. Cig, and C. Ozgul, *Neuroprotection induced by N-acetylcysteine against cytosolic glutathione depletion-induced Ca²⁺ influx in dorsal root ganglion neurons of mice: role of TRPV1 channels*. *Neuroscience*, 2013. 242: p. 151-60.
258. Ovey, I.S. and M. Naziroglu, *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. 284: p. 225-33.
259. Takahashi, N., D. Kozai, and Y. Mori, *TRP channels: sensors and transducers of gasotransmitter signals*. *Front Physiol*, 2012. 3: p. 324.
260. Yamada, K. and T. Nabeshima, *Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs*. *Pharmacol Ther*, 2000. 88(2): p. 93-113.
261. Bengoetxea, X., M. Rodriguez-Perdigon, and M. Ramirez, *Object recognition test for studying cognitive impairments in animal models of Alzheimer's disease*. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*, 2014. 7: p. 10-29.
262. Davies, P. and A.J. Maloney, *Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease*. *Lancet*, 1976. 2(8000): p. 1403.
263. Whitehouse, P.J., et al., *Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis*. *Ann Neurol*, 1981. 10(2): p. 122-6.
264. Pepeu, G., *Overview and perspective on the therapy of Alzheimer's disease from a preclinical viewpoint*. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2001. 25(1): p. 193-209.
265. Riedel, G., B. Platt, and J. Micheau, *Glutamate receptor function in learning and memory*. *Behav Brain Res*, 2003. 140(1-2): p. 1-47.
266. Eglen, R.M. and S.R. Nahorski, *The muscarinic M(5) receptor: a silent or emerging subtype?* *Br J Pharmacol*, 2000. 130(1): p. 13-21.

267. Lo Conte, G., et al., *Lesions of cholinergic forebrain nuclei: changes in avoidance behavior and scopolamine actions*. Pharmacol Biochem Behav, 1982. 17(5): p. 933-7.
268. McDonald, M.P. and J.B. Overmier, *Present imperfect: a critical review of animal models of the mnemonic impairments in Alzheimer's disease*. Neurosci Biobehav Rev, 1998. 22(1): p. 99-120.
269. Rang, H., *Rang and Dale's Pharmacology, 6th*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2007.
270. Budzynska, B., et al., *Effects of imperatorin on scopolamine-induced cognitive impairment and oxidative stress in mice*. Psychopharmacology, 2014. 232(5): p. 931-942.
271. Klinkenberg, I. and A. Blokland, *The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: a review of animal behavioral studies*. Neurosci Biobehav Rev, 2010. 34(8): p. 1307-50.
272. Brunton, L., J. Lazo, and K. Parker, *Goodman & Gilman's Tedavinin farmakolojik temeli*. Süzer Ö, Akın D, Süzer AH, Dedeoğlu BD, Küçük hüseyin C.(Çevirenler), 2009. 1: p. 225-30.
273. Caulfield, M.P., *Muscarinic receptors—characterization, coupling and function*. Pharmacology & therapeutics, 1993. 58(3): p. 319-379.
274. Consolo, S., et al., *An in vivo pharmacological study on muscarinic receptor subtypes regulating cholinergic neurotransmission in rat striatum*. Biochemical pharmacology, 1987. 36(18): p. 3075-3077.
275. O., K., *Tıbbi Farmakoloji*. 10.baskı ed. 2002: Hacettepe Taş.
276. Giridharan, V.V., et al., *Prevention of scopolamine-induced memory deficits by schisandrin B, an antioxidant lignan from Schisandra chinensis in mice*. Free Radic Res, 2011. 45(8): p. 950-8.
277. M'harzi, M., et al., *Antagonism of scopolamine-induced memory impairments in rats by the muscarinic agonist RU 35 926 (CI-979)*. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 1995. 51(1): p. 119-124.
278. Taffe, M.A., M.R. Weed, and L.H. Gold, *Scopolamine alters rhesus monkey performance on a novel neuropsychological test battery*. Cognitive Brain Research, 1999. 8(3): p. 203-212.
279. Hasselmo, M.E., *The role of acetylcholine in learning and memory*. Curr Opin Neurobiol, 2006. 16(6): p. 710-5.
280. Lenz, R.A., et al., *The scopolamine model as a pharmacodynamic marker in early drug development*. Psychopharmacology (Berl), 2012. 220(1): p. 97-107.
281. Drachman, D.A. and J. Leavitt, *Human memory and the cholinergic system: a relationship to aging?* Archives of neurology, 1974. 30(2): p. 113-121.
282. Ebert, U. and W. Kirch, *Scopolamine model of dementia: electroencephalogram findings and cognitive performance*. European journal of clinical investigation, 1998. 28(11): p. 944-949.

283. Misane, I. and S.O. Ogren, *Selective 5-HT1A antagonists WAY 100635 and NAD-299 attenuate the impairment of passive avoidance caused by scopolamine in the rat*. Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology, 2003. 28(2): p. 253-264.
284. El-Sherbiny, D.A., et al., *Hypericum perforatum extract demonstrates antioxidant properties against elevated rat brain oxidative status induced by amnesic dose of scopolamine*. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2003. 76(3): p. 525-533.
285. Blokland, A., *Scopolamine-induced deficits in cognitive performance: A review of animal studies*. Scopolamine Rev, 2005. 1.
286. Bihagi, S.W., A.P. Singh, and M. Tiwari, *Supplementation of Convolvulus pluricaulis attenuates scopolamine-induced increased tau and Amyloid precursor protein (A β PP) expression in rat brain*. Indian journal of pharmacology, 2012. 44(5): p. 593.
287. Rosier, A., L. Cornette, and G.A. Orban, *Scopolamine-induced impairment of delayed recognition of abstract visual shapes*. Neuropsychobiology, 1998. 37(2): p. 98-103.
288. Wall, P.M., J. Flinn, and C. Messier, *Infralimbic muscarinic M1 receptors modulate anxiety-like behaviour and spontaneous working memory in mice*. Psychopharmacology, 2001. 155(1): p. 58-68.
289. Prado-Alcalá, R.A., et al., *Cholinergic blockade of the caudate nucleus and spatial alternation performance in rats: overtraining induced protection against behavioral deficits*. Life sciences, 1978. 23(9): p. 889-896.
290. Givens, B. and D.S. Olton, *Bidirectional modulation of scopolamine-induced working memory impairments by muscarinic activation of the medial septal area*. Neurobiology of learning and memory, 1995. 63(3): p. 269-276.
291. Brito, G.N., et al., *Memory and the septo-hippocampal cholinergic system in the rat*. Psychopharmacology, 1983. 81(4): p. 315-320.
292. Abe, H., Y. Ishida, and T. Iwasaki, *Perirhinal N-methyl-D-aspartate and muscarinic systems participate in object recognition in rats*. Neuroscience letters, 2004. 356(3): p. 191-194.
293. Warburton, E.C., et al., *Cholinergic neurotransmission is essential for perirhinal cortical plasticity and recognition memory*. Neuron, 2003. 38(6): p. 987-996.
294. Winters, B.D., et al., *Scopolamine infused into perirhinal cortex improves object recognition memory by blocking the acquisition of interfering object information*. Learning & Memory, 2007. 14(9): p. 590-596.
295. Winters, B.D., L.M. Saksida, and T.J. Bussey, *Paradoxical facilitation of object recognition memory after infusion of scopolamine into perirhinal cortex: implications for cholinergic system function*. The Journal of neuroscience, 2006. 26(37): p. 9520-9529.
296. Okaichi, H. and L.E. Jarrard, *Scopolamine impairs performance of a place and cue task in rats*. Behavioral and neural biology, 1982. 35(3): p. 319-325.

297. Pachauri, S.D., et al., *Protective effect of fruits of Morinda citrifolia L. on scopolamine induced memory impairment in mice: a behavioral, biochemical and cerebral blood flow study*. Journal of ethnopharmacology, 2012. 139(1): p. 34-41.
298. Ebert, U. and W. Kirch, *Scopolamine model of dementia: electroencephalogram findings and cognitive performance*. Eur J Clin Invest, 1998. 28(11): p. 944-9.
299. Olton, D.S. and R.J. Samuelson, *Remembrance of places passed: spatial memory in rats*. Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes, 1976. 2(2): p. 97.
300. Jarrard, L.E., *On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat*. Behavioral and neural biology, 1993. 60(1): p. 9-26.
301. Lenck-Santini, P.P., E. Save, and B. Poucet, *Place-cell firing does not depend on the direction of turn in a Y-maze alternation task*. European Journal of Neuroscience, 2001. 13(5): p. 1055-1058.
302. Cole, M.R. and R. Chappell-Stephenson, *Exploring the limits of spatial memory in rats, using very large mazes*. Animal Learning & Behavior, 2003. 31(4): p. 349-368.
303. Levin, E.D., *Psychopharmacological effects in the radial-arm maze*. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 1988. 12(2): p. 169-175.
304. Prior, H., H. Schwegler, and G. Dücker, *Dissociation of spatial reference memory, spatial working memory, and hippocampal mossy fiber distribution in two rat strains differing in emotionality*. Behavioural brain research, 1997. 87(2): p. 183-194.
305. White, A.M. and P.J. Best, *The effects of MK-801 on spatial working memory and within-session spatial learning*. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 1998. 59(3): p. 613-617.
306. Wise, L.E. and A.H. Lichtman, *The uncompetitive N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist memantine prolongs spatial memory in a rat delayed radial-arm maze memory task*. European journal of pharmacology, 2007. 575(1): p. 98-102.
307. Hemmati, F., et al., *Neurorestorative effect of FTY720 in a rat model of Alzheimer's disease: Comparison with Memantine*. Behavioural brain research, 2013. 252: p. 415-421.
308. Bhagya, V., et al., *The selective noradrenergic reuptake inhibitor reboxetine restores spatial learning deficits, biochemical changes, and hippocampal synaptic plasticity in an animal model of depression*. Journal of neuroscience research, 2015. 93(1): p. 104-120.
309. Janitzky, K., et al., *Increased CRF mRNA expression in the sexually dimorphic BNST of male but not female GAD67 mice and TMT predator odor stress effects upon spatial memory retrieval*. Behavioural brain research, 2014. 272: p. 141-149.

310. Liu, P. and D.K. Bilkey, *The effects of NMDA lesions centered on the postrhinal cortex on spatial memory tasks in the rat*. Behavioral neuroscience, 2002. 116(5): p. 860.
311. Ciobica, A., et al., *The effects of pergolide on memory and oxidative stress in a rat model of Parkinson's disease*. Journal of physiology and biochemistry, 2012. 68(1): p. 59-69.
312. Tarragon, E., et al., *The Radial Arm Maze (RAM) for the evaluation of working and reference memory deficits in the diurnal rodent Octodon degus*. Proc Meas Behav, 2012.
313. Placer, Z.A., L.L. Cushman, and B.C. Johnson, *Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems*. Analytical biochemistry, 1966. 16(2): p. 359-364.
314. Sedlak, J. and R.H. Lindsay, *Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent*. Analytical biochemistry, 1968. 25: p. 192-205.
315. Lawrence, R.A., *Reprint of "Glutathione Peroxidase Activity in Selenium-Deficient Rat Liver"*. Biochemical and biophysical research communications, 2012. 425(3): p. 503-509.
316. Bejarano, I., et al., *Hydrogen peroxide increases the phagocytic function of human neutrophils by calcium mobilisation*. Molecular and cellular biochemistry, 2007. 296(1-2): p. 77-84.
317. Gryniewicz, G., M. Poenie, and R.Y. Tsien, *A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties*. Journal of Biological Chemistry, 1985. 260(6): p. 3440-3450.
318. Xu, S.Z., et al., *Block of TRPC5 channels by 2-aminoethoxydiphenyl borate: a differential, extracellular and voltage-dependent effect*. British journal of pharmacology, 2005. 145(4): p. 405-414.
319. Pantaler, E. and A. Lückhoff, *Inhibitors of TRP channels reveal stimulus-dependent differential activation of Ca²⁺ influx pathways in human neutrophil granulocytes*. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology, 2009. 380(6): p. 497-507.
320. Naziroglu, M., B. Cig, and C. Ozgul, *Neuroprotection induced by N-acetylcysteine against cytosolic glutathione depletion-induced Ca²⁺ influx in dorsal root ganglion neurons of mice: role of TRPV1 channels*. Neuroscience, 2013. 242: p. 151-160.
321. Uguz, A.C. and M. Naziroglu, *Effects of selenium on calcium signaling and apoptosis in rat dorsal root ganglion neurons induced by oxidative stress*. Neurochem Res, 2012. 37(8): p. 1631-8.
322. Uğuz, A.C. and M. Naziroğlu, *Effects of selenium on calcium signaling and apoptosis in rat dorsal root ganglion neurons induced by oxidative stress*. Neurochemical research, 2012. 37(8): p. 1631-1638.

323. Ghazizadeh, V. and M. Nazıroğlu, *Electromagnetic radiation (Wi-Fi) and epilepsy induce calcium entry and apoptosis through activation of TRPV1 channel in hippocampus and dorsal root ganglion of rats*. *Metabolic brain disease*, 2014. 29(3): p. 787-799.
324. Hajnóczky, G. and G. Csordás, *Calcium signalling: fishing out molecules of mitochondrial calcium transport*. *Current Biology*, 2010. 20(20): p. R888-R891.
325. Corrigan, F.M., G.P. Reynolds, and N.I. Ward, *Hippocampal tin, aluminum and zinc in Alzheimer's disease*. *Biometals*, 1993. 6(3): p. 149-54.
326. Hawkes, W.C. and L. Hornbostel, *Effects of dietary selenium on mood in healthy men living in a metabolic research unit*. *Biol Psychiatry*, 1996. 39(2): p. 121-8.
327. Meseguer, I., et al., *Cerebrospinal fluid levels of selenium in patients with Alzheimer's disease*. *J Neural Transm (Vienna)*, 1999. 106(3-4): p. 309-15.
328. Gao, S., et al., *Selenium level is associated with apoE epsilon4 in rural elderly Chinese*. *Public Health Nutr*, 2009. 12(12): p. 2371-6.
329. Pillai, R., J.H. Uyehara-Lock, and F.P. Bellinger, *Selenium and selenoprotein function in brain disorders*. *IUBMB Life*, 2014. 66(4): p. 229-39.
330. Koc, E.R., et al., *A comparison of hair and serum trace elements in patients with Alzheimer disease and healthy participants*. *Turkish journal of medical sciences*, 2015. 45(5): p. 1034-1039.
331. Tolonen, M., M. Halme, and S. Sarna, *Vitamin E and selenium supplementation in geriatric patients : A double-blind preliminary clinical trial*. *Biol Trace Elem Res*, 1985. 7(3): p. 161-8.
332. Leszek, J., et al., *Colostrinin: a proline-rich polypeptide (PRP) complex isolated from ovine colostrum for treatment of Alzheimer's disease. A double-blind, placebo-controlled study*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 1999. 47(6): p. 377-85.
333. Souza, A.C., et al., *Diphenyl diselenide improves scopolamine-induced memory impairment in mice*. *Behav Pharmacol*, 2010. 21(5-6): p. 556-62.
334. Pinton, S., et al., *Organoselenium improves memory decline in mice: involvement of acetylcholinesterase activity*. *Neurosci Lett*, 2010. 472(1): p. 56-60.
335. Cornelli, U., *Treatment of Alzheimer's disease with a cholinesterase inhibitor combined with antioxidants*. *Neurodegener Dis*, 2010. 7(1-3): p. 193-202.
336. Van Rhijn, A., C. Prior, and F. Corrigan, *Dietary supplementation with zinc sulphate, sodium selenite and fatty acids in early dementia of Alzheimer's type*. *Journal of Nutritional Medicine*, 1990. 1(4): p. 259-266.
337. Chandra, R.K., *Effect of vitamin and trace-element supplementation on cognitive function in elderly subjects*. *Nutrition*, 2001. 17(9): p. 709-12.
338. Scheltens, P., et al., *Efficacy of a medical food in mild Alzheimer's disease: A randomized, controlled trial*. *Alzheimers Dement*, 2010. 6(1): p. 1-10.e1.

339. Gariballa, S. and S. Forster, *Effects of dietary supplements on depressive symptoms in older patients: a randomised double-blind placebo-controlled trial*. Clin Nutr, 2007. 26(5): p. 545-51.
340. Wiesmann, M., et al., *Improved spatial learning strategy and memory in aged Alzheimer AbetaPPswe/PS1dE9 mice on a multi-nutrient diet*. J Alzheimers Dis, 2013. 37(1): p. 233-45.
341. Pinton, S., et al., *Therapeutic effect of organoselenium dietary supplementation in a sporadic dementia of Alzheimer's type model in rats*. J Nutr Biochem, 2013. 24(1): p. 311-7.
342. Hritcu, L., et al., *Enhanced behavioral response by decreasing brain oxidative stress to 6-hydroxy-l-nicotine in Alzheimer's disease rat model*. Neurosci Lett, 2015. 591: p. 41-7.
343. Otto, R., et al., *Beta and gamma carboline derivatives as potential anti-Alzheimer agents: A comparison*. Eur J Med Chem, 2014. 87: p. 63-70.
344. Sang, Z., et al., *Design, synthesis and evaluation of scutellarein-O-alkylamines as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease*. Eur J Med Chem, 2015. 94: p. 348-66.
345. Wang, Z., et al., *Design, synthesis, and evaluation of multitarget-directed selenium-containing clioquinol derivatives for the treatment of Alzheimer's disease*. ACS Chem Neurosci, 2014. 5(10): p. 952-62.
346. Song, G., et al., *Selenomethionine ameliorates cognitive decline, reduces tau hyperphosphorylation, and reverses synaptic deficit in the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease*. J Alzheimers Dis, 2014. 41(1): p. 85-99.
347. Mutter, J., et al., *Does inorganic mercury play a role in Alzheimer's disease? A systematic review and an integrated molecular mechanism*. J Alzheimers Dis, 2010. 22(2): p. 357-74.
348. ERDAL, N., et al., *Migrenli hastalarda oksidatif stresin göstergesi olarak lipid peroksidasyonunun incelenmesi*. Düşünen Adam: Psikiyatri ve Nörolojik Bilimler Dergisi, 2005. 18: p. 129-135.
349. Markesbery, W.R., *Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease*. Free Radic Biol Med, 1997. 23(1): p. 134-47.
350. Singh, M., et al., *Role of by-products of lipid oxidation in Alzheimer's disease brain: a focus on acrolein*. J Alzheimers Dis, 2010. 21(3): p. 741-56.
351. Yoo, M.H., et al., *Delineating the role of glutathione peroxidase 4 in protecting cells against lipid hydroperoxide damage and in Alzheimer's disease*. Antioxid Redox Signal, 2010. 12(7): p. 819-27.
352. Hill, K.E. and R.F. Burk, *Selenoprotein P: recent studies in rats and in humans*. Biomed Environ Sci, 1997. 10(2-3): p. 198-208.
353. Chen, K., M. Kazachkov, and P.H. Yu, *Effect of aldehydes derived from oxidative deamination and oxidative stress on beta-amyloid aggregation; pathological implications to Alzheimer's disease*. J Neural Transm (Vienna), 2007. 114(6): p. 835-9.

354. Akil, M., et al., *Selenium supplementation prevents lipid peroxidation caused by arduous exercise in rat brain tissue*. Bratisl Lek Listy, 2011. 112(6): p. 314-7.
355. Zhang, R., et al., [*Combined effects of T-2 toxin and selenium deficiency on lipid peroxidation in rat's brain*]. Wei Sheng Yan Jiu, 2014. 43(1): p. 6-10.
356. Yao, Z., et al., *Synergistic effect of Se-methylselenocysteine and vitamin E in ameliorating the acute ethanol-induced oxidative damage in rat*. J Trace Elem Med Biol, 2015. 29: p. 182-7.
357. Ashok, B.T. and R. Ali, *The aging paradox: free radical theory of aging*. Exp Gerontol, 1999. 34(3): p. 293-303.
358. Lu, J. and A. Holmgren, *Selenoproteins*. J Biol Chem, 2009. 284(2): p. 723-7.
359. Serra, J.A., et al., *Parkinson's disease is associated with oxidative stress: comparison of peripheral antioxidant profiles in living Parkinson's, Alzheimer's and vascular dementia patients*. J Neural Transm (Vienna), 2001. 108(10): p. 1135-48.
360. Aybek, H., et al., *Determination of malondialdehyde, reduced glutathione levels and APOE4 allele frequency in late-onset Alzheimer's disease in Denizli, Turkey*. Clin Biochem, 2007. 40(3-4): p. 172-6.
361. Fernandes, M.A., et al., *Influence of apolipoprotein E genotype on blood redox status of Alzheimer's disease patients*. Int J Mol Med, 1999. 4(2): p. 179-86.
362. Cristalli, D.O., et al., *Peripheral markers in neurodegenerative patients and their first-degree relatives*. J Neurol Sci, 2012. 314(1-2): p. 48-56.
363. Gironi, M., et al., *Oxidative imbalance in different neurodegenerative diseases with memory impairment*. Neurodegener Dis, 2011. 8(3): p. 129-37.
364. Pinton, S., et al., *Neuroprotector effect of p,p'-methoxyl-diphenyl diselenide in a model of sporadic dementia of Alzheimer's type in mice: contribution of antioxidant mechanism*. Cell Biochem Funct, 2011. 29(3): p. 235-43.
365. Lakshmi, B.V., M. Sudhakar, and K.S. Prakash, *Protective effect of selenium against aluminum chloride-induced Alzheimer's disease: behavioral and biochemical alterations in rats*. Biol Trace Elem Res, 2015. 165(1): p. 67-74.
366. Bourdel-Marchasson, I., et al., *Antioxidant defences and oxidative stress markers in erythrocytes and plasma from normally nourished elderly Alzheimer patients*. Age Ageing, 2001. 30(3): p. 235-41.
367. Padurariu, M., et al., *Changes of some oxidative stress markers in the serum of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease*. Neurosci Lett, 2010. 469(1): p. 6-10.
368. Torres, L.L., et al., *Peripheral oxidative stress biomarkers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease*. J Alzheimers Dis, 2011. 26(1): p. 59-68.
369. Castano, A., et al., *Low selenium diet increases the dopamine turnover in prefrontal cortex of the rat*. Neurochem Int, 1997. 30(6): p. 549-55.

370. Xiong, Y., et al., *The protective role of cellular glutathione peroxidase against trauma-induced mitochondrial dysfunction in the mouse brain*. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2004. 13(3): p. 129-37.
371. Crack, P.J., et al., *Lack of glutathione peroxidase-1 exacerbates Abeta-mediated neurotoxicity in cortical neurons*. J Neural Transm (Vienna), 2006. 113(5): p. 645-57.
372. Sarada, S.K., et al., *Selenium protects the hypoxia induced apoptosis in neuroblastoma cells through upregulation of Bcl-2*. Brain Res, 2008. 1209: p. 29-39.
373. Brown, T.E., et al., *Loss of interneuron LTD and attenuated pyramidal cell LTP in Trpv1 and Trpv3 KO mice*. Hippocampus, 2013. 23(8): p. 662-71.
374. Kulisch, C. and D. Albrecht, *Effects of single swim stress on changes in TRPV1-mediated plasticity in the amygdala*. Behav Brain Res, 2013. 236(1): p. 344-9.
375. Eslamizade, M.J., et al., *Alterations in CA1 pyramidal neuronal intrinsic excitability mediated by Ih channel currents in a rat model of amyloid beta pathology*. Neuroscience, 2015. 305: p. 279-92.
376. Chuang, H.H. and S. Lin, *Oxidative challenges sensitize the capsaicin receptor by covalent cysteine modification*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(47): p. 20097-102.
377. Kim, S.R., et al., *Transient receptor potential vanilloid subtype 1 mediates cell death of mesencephalic dopaminergic neurons in vivo and in vitro*. J Neurosci, 2005. 25(3): p. 662-71.
378. Kim, S.R., et al., *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, 2006. 177(7): p. 4322-9.
379. Crouzin, N., et al., *Neuroprotection induced by vitamin E against oxidative stress in hippocampal neurons: involvement of TRPV1 channels*. Molecular nutrition & food research, 2010. 54(4): p. 496-505.
380. Tao, L., et al., *Protective effects of aloe-emodin on scopolamine-induced memory impairment in mice and H₂O₂-induced cytotoxicity in PC12 cells*. Bioorg Med Chem Lett, 2014. 24(23): p. 5385-9.
381. Hou, X.Q., et al., *BushenYizhi formula ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative stress-related neuronal apoptosis in scopolamine-induced senescence in mice*. Int J Mol Med, 2014. 34(2): p. 429-39.
382. Li, H.B., et al., *Antistress effect of TRPV1 channel on synaptic plasticity and spatial memory*. Biol Psychiatry, 2008. 64(4): p. 286-92.
383. Genro, B.P., L. de Oliveira Alvares, and J.A. Quillfeldt, *Role of TRPV1 in consolidation of fear memories depends on the averseness of the conditioning procedure*. Neurobiol Learn Mem, 2012. 97(4): p. 355-60.

384. Micale, V., et al., *Enhanced cognitive performance of dopamine D3 receptor "knock-out" mice in the step-through passive-avoidance test: assessing the role of the endocannabinoid/endovanilloid systems*. *Pharmacol Res*, 2010. 61(6): p. 531-6.
385. Jiang, X., et al., *Capsaicin ameliorates stress-induced Alzheimer's disease-like pathological and cognitive impairments in rats*. *J Alzheimers Dis*, 2013. 35(1): p. 91-105.
386. Gupta, S., et al., *Modulation of transient receptor potential vanilloid subtype 1 (TRPV1) and norepinephrine transporters (NET) protect against oxidative stress, cellular injury, and vascular dementia*. *Curr Neurovasc Res*, 2014. 11(2): p. 94-106.
387. Katano, M., et al., *The juvenile myoclonic epilepsy-related protein EFHC1 interacts with the redox-sensitive TRPM2 channel linked to cell death*. *Cell Calcium*, 2012. 51(2): p. 179-85.
388. Olah, M.E., et al., *Ca²⁺-dependent induction of TRPM2 currents in hippocampal neurons*. *J Physiol*, 2009. 587(Pt 5): p. 965-79.
389. Yu, S.P., L.M. Canzoniero, and D.W. Choi, *Ion homeostasis and apoptosis*. *Curr Opin Cell Biol*, 2001. 13(4): p. 405-11.
390. Fonfria, E., et al., *TRPM2 channel opening in response to oxidative stress is dependent on activation of poly(ADP-ribose) polymerase*. *Br J Pharmacol*, 2004. 143(1): p. 186-92.
391. Milton, N.G., *Role of hydrogen peroxide in the aetiology of Alzheimer's disease: implications for treatment*. *Drugs Aging*, 2004. 21(2): p. 81-100.
392. Kaneko, S., et al., *A critical role of TRPM2 in neuronal cell death by hydrogen peroxide*. *J Pharmacol Sci*, 2006. 101(1): p. 66-76.
393. Fonfria, E., et al., *Amyloid beta-peptide(1-42) and hydrogen peroxide-induced toxicity are mediated by TRPM2 in rat primary striatal cultures*. *J Neurochem*, 2005. 95(3): p. 715-23.
394. Alarcon, J.M., et al., *Ion channel formation by Alzheimer's disease amyloid beta-peptide (A β 40) in unilamellar liposomes is determined by anionic phospholipids*. *Peptides*, 2006. 27(1): p. 95-104.
395. Hirrlinger, J., J.B. Schulz, and R. Dringen, *Glutathione release from cultured brain cells: multidrug resistance protein 1 mediates the release of GSH from rat astroglial cells*. *J Neurosci Res*, 2002. 69(3): p. 318-26.
396. Lee, M., et al., *Depletion of GSH in glial cells induces neurotoxicity: relevance to aging and degenerative neurological diseases*. *Faseb j*, 2010. 24(7): p. 2533-45.
397. Yeo, J.E. and S.K. Kang, *Selenium effectively inhibits ROS-mediated apoptotic neural precursor cell death in vitro and in vivo in traumatic brain injury*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. 1772(11-12): p. 1199-210.

398. Shang, D., et al., *A novel polysaccharide from Se-enriched Ganoderma lucidum induces apoptosis of human breast cancer cells*. *Oncol Rep*, 2011. 25(1): p. 267-72.
399. Elphick, L.M., et al., *Opposing roles for caspase and calpain death proteases in L-glutamate-induced oxidative neurotoxicity*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008. 232(2): p. 258-67.
400. Kayan, M., et al., *Non-ionic contrast media induces oxidative stress and apoptosis through Ca(2)(+) influx in human neutrophils*. *J Membr Biol*, 2012. 245(12): p. 833-40.
401. Ostapchenko, V.G., et al., *The Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) Channel Contributes to beta-Amyloid Oligomer-Related Neurotoxicity and Memory Impairment*. 2015. 35(45): p. 15157-69.
402. Green, D. and G. Kroemer, *The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria?* *Trends Cell Biol*, 1998. 8(7): p. 267-71.
403. Bossy-Wetzel, E. and D.R. Green, *Caspases induce cytochrome c release from mitochondria by activating cytosolic factors*. *J Biol Chem*, 1999. 274(25): p. 17484-90.
404. Deveraux, Q.L., et al., *Endogenous inhibitors of caspases*. *J Clin Immunol*, 1999. 19(6): p. 388-98.
405. Yousuf, S., et al., *Selenium plays a modulatory role against cerebral ischemia-induced neuronal damage in rat hippocampus*. *Brain Res*, 2007. 1147: p. 218-25.
406. Maraldi, T., et al., *Low levels of selenium compounds are selectively toxic for a human neuron cell line through ROS/RNS increase and apoptotic process activation*. *Neurotoxicology*, 2011. 32(2): p. 180-7.
407. Huang, J.Q., et al., *Selenoproteins protect against avian nutritional muscular dystrophy by metabolizing peroxides and regulating redox/apoptotic signaling*. *Free Radic Biol Med*, 2015. 83: p. 129-38.
408. Yu, S.W., et al., *Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(48): p. 18314-9.
409. Ying, W., P. Garnier, and R.A. Swanson, *NAD⁺ repletion prevents PARP-1-induced glycolytic blockade and cell death in cultured mouse astrocytes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. 308(4): p. 809-13.
410. Ying, W., et al., *NAD⁺ as a metabolic link between DNA damage and cell death*. *J Neurosci Res*, 2005. 79(1-2): p. 216-23.
411. Love, S., R. Barber, and G.K. Wilcock, *Increased poly(ADP-ribosylation) of nuclear proteins in Alzheimer's disease*. *Brain*, 1999. 122 (Pt 2): p. 247-53.
412. Strosznajder, J.B., H. Jesko, and R.P. Strosznajder, *Effect of amyloid beta peptide on poly(ADP-ribose) polymerase activity in adult and aged rat hippocampus*. *Acta Biochim Pol*, 2000. 47(3): p. 847-54.

413. Infante, J., et al., *Interaction between poly(ADP-ribose) polymerase 1 and interleukin 1A genes is associated with Alzheimer's disease risk*. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 2007. 23(4): p. 215-8.
414. Abeti, R., A.Y. Abramov, and M.R. Duchen, *Beta-amyloid activates PARP causing astrocytic metabolic failure and neuronal death*. *Brain*, 2011. 134(Pt 6): p. 1658-72.
415. Abeti, R. and M.R. Duchen, *Activation of PARP by oxidative stress induced by beta-amyloid: implications for Alzheimer's disease*. *Neurochem Res*, 2012. 37(11): p. 2589-96.
416. Park, H.S., et al., *Selenite inhibits the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) through a thiol redox mechanism*. *J Biol Chem*, 2000. 275(4): p. 2527-31.
417. Yeo, J.E., J.H. Kim, and S.K. Kang, *Selenium attenuates ROS-mediated apoptotic cell death of injured spinal cord through prevention of mitochondria dysfunction; in vitro and in vivo study*. *Cell Physiol Biochem*, 2008. 21(1-3): p. 225-38.
418. Wang, K., et al., *DSePA Antagonizes High Glucose-Induced Neurotoxicity: Evidences for DNA Damage-Mediated p53 Phosphorylation and MAPKs and AKT Pathways*. *Mol Neurobiol*, 2015.

EKLER

Ek 1. Etik Kurul Onayı

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

TOPLANTI TARİHİ	TOPLANTI SAYISI	KARAR SAYISI
10.02.2015	03	03

İlgi: 06.11.2014 tarih ve 01 sayılı karara ek olarak;
Süleyman Demirel Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 10 ŞUBAT 2015 tarihinde Saat 10:00'da toplanarak aşağıdaki kararları almıştır,

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları A.D. Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Kadir DEMİRCİ'nin yürütücüsü olduğu Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU, Arş. Gör. Hasan BALABAN, Arş. Gör. Ahmi ÖZ, Doktora Öğrencisi İshak Suat ÖVEY'in yardımcı araştırmacı olarak yer aldığı, **"Ratlarda, Skopolamin ile indüklenen demans modelinde selenyumun apoptosis, oksidatif stres ve kalsiyum iyon düzeyleri üzerindeki etkileri"** başlıklı çalışma;

Deney Hayvanının	Türü	Cinsiyeti	Sayısı	Yaşı
	Sıçan (Wistar Albino)	Dişi	38	18 aylık / 350gr

Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından oy birliği ile UYGUN görülmüştür.

Doç. Dr. Efan UZ BAŞKAN	Prof. Dr. Münire ÇAKIR BAŞKAN YARDIMCISI	Doç. Dr. İ. Metin ÇIRIŞ ÜYE
		
Yrd. Doç. Dr. Pınar ASLAN KOŞAR ÜYE	Yrd. Doç. Dr. Gülnur ÖZGÜNER ÜYE	Yrd. Doç. Dr. Müge ÇINA AKSOY ÜYE
KATILMADI	KATILMADI	KATILMADI
Öğr. Gör. İbrahim ONARAN ÜYE	Vet. Hekim İsmail UZ ÜYE	Ecz. Mustafa Serhan DERYAL ÜYE
		