



T. C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TRPM2 KATYON KANALI ANTAGONİSTİ OLAN N-(P-AMİLSİNNAMOİL)
ANTRANİLİK ASİT'İN, SIÇANLARDA STREPTOZOTOSİN İLE OLUŞTURULAN
HAFIZA BOZUKLUĞU MODELİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Mehmet GÖL
DOKTORA TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. Şeniz DEMİRYÜREK

Gaziantep
2018



T. C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TRPM2 KATYON KANALI ANTAGONİSTİ OLAN N-(P-AMİLSİNNAMOİL)
ANTRANİLİK ASİT'İN, SIÇANLARDA STREPTOZOTOSİN İLE OLUŞTURULAN
HAFIZA BOZUKLUĞU MODELİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Mehmet GÖL
DOKTORA TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. Şeniz DEMİRYÜREK

Gaziantep
2018

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**TRPM2 KATYON KANALI ANTAGONİSTİ OLAN N-(P-AMİLSİNNAMOİL)
ANTRANİLİK ASİT'İN, SIÇANLARDA STREPTOZOTOSİN İLE OLUŞTURULAN
HAFIZA BOZUKLUĞU MODELİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Mehmet GÖL

Tez Savunma Tarihi: 16.07.2018
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu çalışmanın bir “Doktora” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Ramazan BAL
Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Doktora” tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Şeniz DEMİRYÜREK
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Doktora” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

İmza

Doç. Dr. Şeniz DEMİRYÜREK

Prof. Dr. Ramazan BAL

Prof. Dr. A. Tuncay DEMİRYÜREK

Prof. Dr. Cemil TÜMER

Dr. Öğr. Üyesi Ahmet DEMİR

BEYAN

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

28. 06. 2018

Mehmet GÖL



TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi, azim, deneyim, meslek sevgisi ile bana örnek olan ve eğitimime büyük emeği geçen Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Ramazan BAL, Doç. Dr. Şeniz DEMİRYÜREK ve Dr. Öğr. Üyesi Davut Sinan KAPLAN'a teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Bilgi ve deneyimleri ile eğitimime değerli katkılar sunan, tez çalışmam sırasında sabır ve özverisini esirgemeyen değerli hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Şeniz DEMİRYÜREK'e ayrıca saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Farmakoloji Anabilim Dalımızdan Prof. Dr. Tuncay DEMİRYÜREK'e bilimsel katkılarından ve yol göstericiliğinden ötürü teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Farmakoloji Anabilim Dalı'ndan, Araş. Gör. Ecz. Ahmet SARACALOĞLU'na, tez çalışmamın immünohistokimyasal çalışmalarla ilgili kısmındaki kıymetli emeklerinden dolayı teşekkür ederim.

Deney hayvanları laboratuvarımızın bütün işleyenlerine teşekkürlerimi sunarım.

Sevgili eşime, en dar zamanlarımı genişlettiği için teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Komisyonu Başkanlığı tarafından (TF.DT.17.08) desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
SİMGE VE KISALTMALAR.....	5
ŞEKİL LİSTESİ.....	10
TABLO LİSTESİ.....	12
RESİM LİSTESİ.....	13
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Alzheimer hastalığı.....	5
2.1.1. Epidemiyoloji.....	6
2.1.2. Etiyopatogenez.....	9
2.1.3. Risk unsurları.....	21
2.1.4. Genetik unsurlar.....	24
2.1.5. Demans benzeri tablolar.....	25
2.1.6. Patolojik süreç.....	29
2.1.7. Tedavi.....	36
2.2. Hafıza.....	37
2.2.1. Hafıza nasıl oluşur?.....	41
2.2.2. Öğrenme ve hafıza.....	43
2.2.3. Deney hayvanlarında hafıza oluşumunun değerlendirilmesinde kullanılan davranış deneyleri.....	43

2.3. Alzheimer hastalığı ve hafıza	51
2.3.1. Alzheimer hastalığında hafıza kaybına ilişkin belirtiler.....	51
2.3.2. Mediyal temporal lob	52
2.4. Memantin.....	53
2.5. Streptozotosin	53
2.6. TRPM2 kanalları	54
2.6.1. TRPM2 kanallarının yapısı	54
2.6.2. TRPM2 kanallarının aktivasyonu ve işlevleri	56
2.6.3. N-(p-amilsinamoil) Antranilik Asit (ACA)	58
3. MATERYAL VE METOD	59
3.1. Streptozotosin ile oluşturulan bilişsel bozukluk modeli (deneysel olarak sıçanlarda streptozotosin ile oluşturulan Alzheimer hastalığı)	59
3.1.1. Streptozotosin uygulanmasıyla diyabetes mellitus ve A β oluşumuna dair kanıtlar 59	
3.2. Çalışma grupları.....	61
3.3. Çalışma takvimi ve farmakolojik girişimler	62
3.4. İntarserebroventriküler streptozotosin uygulaması.....	63
3.5. Morris su tankı deneyleri	66
3.6. Yükseltilmiş T labirenti testi (Elevated plus maze test)	67
3.7. Açık alan habituasyon testi (Open-field test).....	68
3.8. İmmunohistokimyasal çalışma	69
3.8.1. Western blot deneyinde kullanılan solüsyonlar.....	70
3.9. Elisa	72
3.10. İstatistiksel analiz.....	74

4. BULGULAR.....	75
4.1. Morris su tankı sonuçları	75
4.2. Yükseltilmiş T labirenti testi sonuçları.....	80
4.3. Açık alan habituasyon testi sonuçları	81
4.4. İmmunohistokimyasal sonuçlar	83
4.5. Elisa sonuçları.....	87
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	88
5.1. İntraserebroventriküler streptozotosin indüksiyonu TRPM2 kanal proteini ekspresyonunu azaltıyor	90
5.2. ACA farklı hücre içi yolakları etkilemektedir	92
5.3. TRPM2 katyon kanalından iyon akışı fizyolojik olarak önemlidir	93
5.4. NMDA–TRPM2 etkileşimi	94
5.5. GSK–3 α /3 β	95
5.6. Çalışmanın limitasyonları	96
5.7. Sonuç	96
KAYNAKLAR:	97

SİMGE VE KISALTMALAR

AA	Alzheimer hastalığı
Aa	Amino asit
Aβ	Amiloid- β peptit
AAH	Açık alan habituasyonu
AAMI	Yaşlılıkla ilgili unutkanlık (Age associated memory impairment)
Aβ₁₋₄₂	42 aminoasitlik amiloid beta peptit
Aβ₄₂	42 aminoasitlik amiloid beta peptit
Aβ₁₋₄₀	40 aminoasitlik amiloid beta peptit
Aβ₄₀	40 aminoasitlik amiloid beta peptit
ACA	N-(p-amilsinamoil) antranilik asit
ACh	Asetilkolin
AChE	Asetilkolinesteraz
ADP	Adenozin difosfat
ADPR	Adenozin difosforiboz
AGEP	İleri glikasyon son ürünleri (Advanced glycation end-products)
2-APB	2-aminoetoksidifenilborat
AH	Alzheimer hastalığı
AICD	APP hücre içi kısım (APP intracellular domain)
AMPA	α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolepropionik asit
AMPA_r	α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolepropionik asit reseptörü
APO-E ϵ4	Apolipoprotein E epsilon 4 aleli
APP	Amiloid öncülü protein (Amyloid precursor protein)

SOCC	Ca ²⁺ birikimi ile düzenlenen Ca ²⁺ kanalları (store-operated calcium channels)
°C	Sıcaklık için Celsius ölçeği (degrees Celcius)
Ca²⁺	Kalsiyum
[Ca²⁺]	Kalsiyum konsantrasyonu
[Ca²⁺]	İntraselüler kalsiyum konsantrasyonu
CALHM1	Ca ²⁺ homeostaz modülatörü-1 (Calcium homeostasis modulator-1)
CA3-CA1	Cornu Ammonis 3-Cornu Ammonis 1
Cdk5	Siklin bağımlı kinaz 5
CD38	Farklılaşma kümesi (cluster of differentiation 38)
CD157	Farklılaşma kümesi (cluster of differentiation 157)
CRP	C-Reaktif Protein
C terminali	Karboksi terminali
dH₂O	Distile su
DLP-1	Dinamin benzeri protein-1
EAAT	Uyarıcı aminoasit taşıyıcısı (Excitatory aminoacid transporter)
EPM	Elevated plus maze (Yükseltilmiş T labirenti)
ER	Endoplazmik retikulum
FTD	Fronto-temporal demans
GLUT	Glukoz taşıyıcısı
H₂O₂	Hidrojen peroksit
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazin etanosülfonik asit
HNE	4-hidroksi nonenal
HO	Hem oksijenaz

ICV	İntraserebroventriküler
IDE	İnsülin yıkıcı enzim (Insulin degrading enzyme)
IL-1β	İnterlökin 1 beta
IL-6	İnterlökin 6
IP₃	İnozitol-1,4,5-trifosfat
IP₃-Rs	İnozitol-1,4,5-trifosfat reseptörleri
KSH	Kronik serebral hipoperfüzyon
MCU	mitokondriyel Ca ⁺² taşıyıcısı (mitochondrial calcium uniporter)
MDA	Malondialdehit
mHCX	Mitokondriyel zar H ⁺ - Ca ⁺² değiştiricisi (mH ⁺ - Ca ⁺² exchanger, mHCX)
MMCA	Mitokondriyel zar Ca ⁺² ATPaz (Mitochondrial membrane Ca ⁺² ATPase)
MMSE	Mini-mental durum ölçeği (Mini-mental state examination)
mPTP	Mitokondriyel geçirgenlik geiş gözeneği (Mitochondrial permeability transition pore)
MWM	Morris water maze (Morris su labirenti)
MSS	Merkezî sinir sistemi
NCX	Na ⁺ - Ca ⁺² değiştiricisi (Na ⁺ - Ca ⁺² exchanger, NCX)
NAD⁺	Nikotinamid adenin dinükleotit
NAD/P⁺	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
Na₃VO₄	Sodyum ortovanadat
NFT	Nörofibriler yumaklar
NMDA	N-metil D-aspartat
NMDAr	N-metil D-aspartat reseptörü
NDGA	Nordihidroguaiaretik asidin

N terminali	Amino terminali
O₂⁻	Süperoksit radikali
PAMP	Patojen ilişkili moleküler desen (Pathogen associated molecular pattern)
PARG	Poli ADP-riboz glikohidrolaz
PARP	Poli ADP-riboz polimeraz
PET	Pozitron Emisyon Tomografisi
PLA₂	Fosfolipaz A ₂
PMCA	Hücre zarı Ca ⁺² -ATPaz (Plasma membrane Ca ⁺² -ATPase)
PTP	Post tetanik potansiyalizasyon
ROCC	Reseptörle düzenlenen kalsiyum kanalları (Receptor-operated calcium channels)
sAPPα	Çözünebilir amiloid öncülü protein- α (soluble amyloid precursor protein- α)
SP	Senil plaklar
sPLA₂	Sekretuar fosfolipaz A ₂
iPLA₂	Ca ⁺² bağımsız fosfolipaz A ₂
cPLA₂	Ca ⁺² bağımlı fosfolipaz A ₂
PS-1	Presenilin 1
PS-2	Presenilin 2
ROS	Reaktif oksijen ürünleri (ROS, reactive oxygen species)
RNS	Reaktif nitrojen ürünleri (RNS, reactive nitrogen species)
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SERCA	Sarkoplazmik retikulum Ca ⁺² -ATPaz
SPECT	Tek foton emisyon bilgisayarlı tomografi
TBARS	Tiobarbütirik asit reaktif ürünleri

TBH	Travmatik beyin hasarı
TBS	Tris tamponlu salin (Tris buffered saline)
TCA	Trikarboksilik asit döngüsü, Krebs döngüsü
TNF-α	Tümör nekroz faktör-alfa
Tris HCl	Tris (hidroksimetil) aminometan hidroklorid
TRPM2	Transient reseptör potansiyeli melastatin-2 kanalı (Transient receptor potential melastatin-2 channel)
TRPM2-S	TRPM2'nin dominant negatif blokeri (splice variant)
TRPM2^{-/-}	TRPM2 nakavt
VBKK	Voltaj bağımlı kalsiyum kanalları
8-OHG	8-hidroksiguanin
8-OHdG	8-hidroksi-2'-deoksiguanozin

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1.	Serbest radikaller ile amiloidojenik yolun uyarılması 19
Şekil 2.2.	Amnestik ve amnestik olmayan hafif bilişsel bozulmanın tanısal algoritması 28
Şekil 2.3.	Zamanla bilişsel işlev düzeyindeki değişim 29
Şekil 2.4.	Amiloid öncülü protein 32
Şekil 2.5.	Amiloidojenik olmayan yol 33
Şekil 2.6.	Amiloidojenik yol 34
Şekil 2.7.	İşleyen hafıza 41
Şekil 2.8.	Morris su tankı simülasyonu 48
Şekil 2.9.	TRPM2 kanallarının yapısı 55
Şekil 3.1.	Çalışma takvimi 62
Şekil 4.1.	Morris su tankı deneylerinde grupların günlere göre performansları 76
Şekil 4.2.	Grupların Morris su tankı deneylerindeki performanslarının çizgi grafik ile gösterimi 77
Şekil 4.3.	Prob denemesinde grupların platforma olan ortalama uzaklıkları 79
Şekil 4.4.	Prob denemesinde grupların ortalama yüzme hızları 80
Şekil 4.5.	Yükseltilmiş T labirenti testi, grupların labirenti açık ve kapalı alanlarında geçirdiği kümülatif zamanları 81
Şekil 4.6.	Açık alan testi, lökomotor aktivite 82
Şekil 4.7.	Açık alan testi, grupların alanın merkezinde geçirdikleri zamanın kıyaslanması 83
Şekil 4.8.	Hipokampusta gruplara göre GSK-3 α protein ekspresyonları 85

Şekil 4.9.	Hipokampusta gruplara göre GSK-3 α protein ekspresyonları	86
Şekil 4.10.	Hipokampusta gruplara göre GSK-3 β protein ekspresyonları	86
Şekil 4.11.	Serum TNF- α düzeyleri	87
Şekil 4.12.	Serum MDA düzeyleri	88



TABLO LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 3.1. Çalışma grupları	61
Tablo 3.2. Morris su tankı deneylerinde, deney hayvanlarının yüzme denemelerine başlangıç noktaları	67
Tablo 3.3. %10'luk iki (2) jel için gerekli kimyasallar ve miktarları	70



RESİM LİSTESİ

	Sayfa
Resim 2.1. Görsel ipuçları bulunan Morris su tankında yapılan bir deneme	49
Resim 2.2. Üç farklı gruptan wistar sıçana ait ısı haritaları	50
Resim 3.1. Serebral ventriküle metilen mavisi enjeksiyonu	63
Resim 3.2. Anestezi altındaki sıçanın, stereotaksik cihazda pozisyonu	64
Resim 3.3. Bregma ve sagittal sütür görünümü	65
Resim 3.4. İntraserebroventriküler streptozotosin enjeksiyonu	66
Resim 3.5. Yükseltilmiş T labirenti testi	68

ÖZET

TRPM2 KATYON KANALI ANTAGONİSTİ OLAN N-(P-AMİLSİNAMOİL) ANTRANİLİK ASİT'İN, SIÇANLARDA STREPTOZOTOSİN İLE OLUŞTURULAN HAFIZA BOZUKLUĞU MODELİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Mehmet GÖL

Doktora Tezi, Fizyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Şeniz DEMİRYÜREK

Haziran 2018, 130 sayfa

Alzheimer Hastalığı (AH), demans vakalarının büyük çoğunluğunun sebebi olan nörodejeneratif bir hastalıktır. Günümüzde kullanılan ilaçlar AH'nin ilerleyişini durduracak yetkinlikte değildir. Dolayısıyla, yeni ve daha güçlü ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. N-(p-amilsinamoil) antranilik asit (ACA), seçici olmayan ve Ca^{+2} 'a geçirgen bir katyon kanalı olan transient reseptör potansiyeli melastatin-2 (TRPM2) kanalı antagonistidir. Oksidatif stres AH patogenezi için önemli bir etiyolojik etkidir. Hücrel stres iskemiye ve TRPM2 kanallarının açılmasına sebep olarak hücre içi Ca^{+2} birikimine yol açmaktadır. ACA'nın AH'ye bağlı gelişen hafıza bozukluğu üzerine etkisi bilinmemektedir. Bu çalışmanın ana amacı, ACA'nın, streptozotosin (STZ) ile sıçanlarda oluşturulan deneysel uzaysal hafıza bozukluğu üzerine etkisinin araştırılmasıdır. Çalışmaya dahil edilmiş 60 Wistar sıçan, rastgele şu şekilde çalışma gruplarına bölünmüştür: (1) kontrol, (2) kontrol-opere, (3) intraserebroventriküler (ICV) STZ, (4) ICV-STZ + memantin (5 mg/kg ip), (5) ICV-STZ + ACA (25 mg/kg ip) ve (6) ICV + memantin + ACA. Morris su tankı deneylerinde sadece memantin (5 mg/kg) terapötik etkinlik gösterdi. Hipokampal dokuların western blot analizlerinde, 3. grupta TRPM2 protein ekspresyonunun anlamlı bir şekilde azaldığı görüldü ($p < 0.001$). ACA, memantin ve memantine + ACA tedavileri, ICV-STZ grubuna kıyasla, TRPM2 protein ekspresyonunda anlamlı bir artışa sebep olmuşlardır ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.01$). Hipokampal glikojen sentaz kinaz **3 α /3 β** ekspresyonlarında gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p > 0.05$). Sonuç olarak, sıçanlarda ICV-STZ ile oluşturulan uzaysal hafıza bozukluğunda, TRPM2 protein ekspresyonunun azaldığı, ACA, memantine ve ACA + memantin tedavilerini takiben ekspresyonun yeniden arttığı çalışmamızda ilk defa ortaya konulmuştur. Ancak, ACA'nın uzaysal hafıza üzerinde iyileştirici bir etkisi gözlenmemiştir.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer Hastalığı, nörodejenerasyon, TRPM2 kanalları.

ABSTRACT

INVESTIGATION THE EFFECTS OF N-(P-AMYL CINNAMOYL) ANTHRANILIC ACID, AN ANTAGONIST OF TRPM 2 CATION CHANNEL ON A RAT MODEL OF STREPTOZOTOCIN-INDUCED MEMORY IMPAIRMENT

Mehmet GÖL

Ph.D Thesis, Department of Physiology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Şeniz DEMİR YÜREK

June 2018, 130 pages

Alzheimer's disease (AD), a neurodegenerative disease, accounts for great majority of dementias. Current drugs are not capable of halting the progression of AD. So, more effective novel agents are urgently needed. N-(p-amylicinnamoyl) anthranilic acid (ACA) is an antagonist of transient receptor potential melastatin-2 (TRPM2) which is a non-selective, Ca²⁺-permeable cation channel. Oxidative stress is a substantial etiologic entity for AD pathogenesis. Cellular stress leads to ischemia and Ca²⁺ accumulation by activating TRPM2. Effect of ACA on memory impairment associated with AD has not been known. The main purpose of this study is to investigate effect of ACA on a rat model of streptozotocin (STZ)-induced spatial memory impairment. A total of 60 Wistar rats randomly divided into six groups; (1) control, (2) sham-operated, (3) intracerebroventricular (ICV)-STZ, (4) ICV-STZ + memantine (5 mg/kg ip), (5) ICV-STZ + ACA (25 mg/kg ip) and (6) ICV-STZ + ACA + memantine. Only memantine (5 mg/kg) treatment exhibited a therapeutic efficacy in Morris water maze test. Western blot analyses in hippocampal tissues showed that TRPM2 protein expression was markedly suppressed in 3rd group (p<0.001). ACA, memantine or memantine + ACA treatments ameliorated that suppression in comparison to the ICV-STZ group (p<0.05, p<0.01, p<0.01). There was no significant difference in hippocampal glycogen synthase kinase-3 α /3 β protein expressions among groups (p>0.05). In conclusion, our findings showed for the first time that TRPM2 protein expression was significantly suppressed in the rat model of STZ-induced memory impairment while each of the ACA, memantine and ACA + memantine treatments reversed this suppression. However, no improvement in spatial memory following ACA treatment was observed.

Key words: Alzheimer's disease, neurodegeneration, TRPM2 channels.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Alzheimer hastalığı (AH) çağımızın en önemli halk sağlığı sorunlarından biridir. Aynı zamanda ileri yaşlardaki en önemli maluliyet ve ölüm sebeplerindedir. Ne yazık ki hastalığın ilerleyişini engelleyecek nitelikte bir medikal tedaviden günümüzde yoksun bulunmaktayız. Alzheimer hastalığında, nöronal disfonksiyona ve nöron kaybına yol açan patofizyolojik süreç, bilişsel fonksiyonlarda hasta ya da yakınları tarafından farkedilen kontterapötik ajanların bulunması hem de hastalığın patofizyolojik mekanizmasının tam olarak aydınlatılması acil bir ihtiyaç olarak karşımıza çıkmaktadır.

Alzheimer hastalığının patolojik seyri içinde ortaya çıkan anormal ve atipik amiloid- β (A β) peptit üretimi ve senil plak (senil plaklar ya da nöritik plaklar, ekstraselüler A β peptit birikimleri, SP) oluşumunun beyin dokusunda bir çeşit toksisiteye yol açtığı bilinmektedir. Bu A β toksisitesi, oksidatif stres hasarına [1-3], enflamasyona [1, 4-6] ve kalsiyum (Ca²⁺) homeostazında bir bozulmaya yol açarak AH patolojisini tetiklemektedir [7-9]. Oksidatif stres ve enflamasyon AH'nin etiyolojik etkenleri olarak da karşımıza çıkmaktadır. Dahası, bu iki önemli etiyolojik etkenin yaşam boyu birikiminin sebep olduğu serebrovasküler değişimlerin atipik A β peptit oluşumuna sebep olduğuna dair bulgular da bulunmaktadır [10, 11].

Bir nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NAD/P⁺) metaboliti olan serbest adenozin difosforiboz (ADPR), transient reseptör potansiyeli melastatin-2 (TRPM2) kanalının kapılama (gating) mekanizmasının aydınlatılması ile yeni bir hücre içi ikincil haberci olarak tanımlanmış oldu [12]. Serbest ADPR etkisi sonucunda TRPM2 kanalının açılması için eşzamanlı hücre içi Ca²⁺ konsantrasyonunun ([Ca²⁺]) artması ve TRPM2 kanalları ile Ca²⁺'nin etkileşimi de gerekmektedir. TRPM2 aktivasyonu için gerekli olan bu hücre içi [Ca²⁺] artışı da N-metil D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin (NMDAr) aktivasyonu ile sağlanmaktadır [13]. Adenozin difosforibozun, bir ikincil haberci olarak işlev görebilmesi için üretilmesi gerekmektedir. Bilinen ADPR kaynakları, en başta ektoenzim farklılaşma kümesi 38 (cluster of differentiation 38, CD38) ve CD157'dir. Bu ektoenzimler nikotinamid adenin dinükleotidi (NAD⁺), ADPR'ye yıkarlar. Ancak, ADPR üretiminin oksidatif stres ve hücre hasarı ile ilişkilendirildiği ve ADPR'nin hücre içinde üretildiği patofizyolojik mekanizmalar, hücre yaşam döngüsü-TRPM2 etkileşimi

açısından daha dikkat çekicidir. Buna göre poli ADP–riboz polimeraz/poli ADP–riboz glikohidrolaz (PARP/PARG) yolağı, DNA hasarını takiben ortaya çıkan önemli ADPR kaynağıdır. Mitokondri de önemli bir NAD⁺ kaynağı olarak, mitokondriyel hasarı takiben NAD⁺'ı ve başta ADPR olmak üzere NAD⁺ metabolitlerini sitozole salar. Hidrojen peroksit (H₂O₂) ve diğer oksidatif metabolitlerin TRPM2'yi aktive edici etkilerinin hücre içi ikincil haberci molekülü ADPR'dir [14]. TRPM2 kanalları; beyinde, mikroglialarda, striatumda, hipokampal piramidal nöronlarında, substantia nigranın dopaminerjik nöronlarında yaygın olarak bulunmaktadır [15]. Bilindiğı gibi bu kanallar, nöronal hücre ölümünden sorumlu tutulmaktadır [16].

Bu bilgiler ışığında, çalışmamızın amacı, STZ ile deneysel olarak sıçanlarda oluşturulan öğrenme ve hafıza bozukluğu modelinde, TRPM2 kanalının N-(p-amilsinamoil) antranilik asit (ACA) ile farmakolojik inhibisyonunun hafıza üzerindeki etkisini ortaya koymaktır.

2. GENEL BİLGİLER

“Mens” kelimesi Latince’de, Türkçe’deki “bilinç”, “akıl”, “dimağ”, “zihin” gibi kavramların karşılığıdır. Önüne gelen “de” eki ise; bu kavramların sonradan yitirilmiş olduğunu anlatır. Dolayısıyla, Latince’de demans (dementia) doğrudan aklın yoksunluğu (devoid of the mind) anlamına gelmektedir. Demans sendromu, bilinç kaybı olmaksızın ve bir bilişsel gelişim bozukluğu olan mental retardasyondan tamamen ayrı bir mahiyette, sonradan kazanılmış olan ve ilerleyici bir seyir gösteren akıl, idrâk, hafıza ve kişilik bozukluğu durumudur. Rastgele bir zamanda, bir gelişimsel bozukluk sonucu oligofrenik (mental olarak tam gelişmemiş, mental retardasyon) hale gelmiş bir kişi ile demans sendromlu bir hastanın sergiledikleri belirti ve bulgular benzeşebilir ya da neredeyse bütünüyle örtüşebilir. Ancak oligofrenik hastalar, gelişimsel bir bozukluk sebebi ile ulaşmaları gereken normal mental kapasitelerine hiçbir zaman tam erişememişken; demans sendromlu kişiler kendilerinde doğal olarak ve kişi için yeterli düzeyde mevcut olan mental kapasitelerinde genetik ve çevresel unsurların etkisi ile hayatlarının sonraki dönemlerinde kayba uğramışlardır.

Bulgu ve belirtilerin bir demans sendromuna işaret ettiği kanâatine varılabilmesi için, mental işlevlerdeki bozulmanın kalıcı ve ilerleyici bir nitelikte olması gerekir. Dejeneratif, vasküler, enfektif, metabolik ve travmatik pekçok hastalık ya da durum bu sendroma sebep olabilmesine rağmen, 65 yaş ve üzerindeki demans vakalarının yaklaşık %60–70’inde AH’ye ait nöropatolojik değişiklikler bulunur. Yani, birinci basamakta işleyen bir hekim, hastasında demans sendromuna işaret eden bulgu ve belirtiler tespit ettikten sonra, bu hastanın doğrudan Alzheimer hastası olduğunu söylese, %60–70 ihtimalle yanılmamış olur.

2.1. Alzheimer hastalığı

Alzheimer hastalığı, ilk olarak 1907’de, Alman psikiyatrist ve nöropatolog Alois Alzheimer tarafından tanımlanmıştır. Tanımlayıcı vaka, paranoid delüsyonlar, ilerleyici hafıza bozukluğu ve daha sonra ortaya çıkan afazi ile karakterize 51 yaşında bir kadın hastadır. Günümüzde, dünya çapında yaklaşık 50 milyon insan AH ile yaşamaktadır. Bu

sayının 2050'li yıllarda 130 milyonu aşacağı tahmin edilmektedir. Bu hastalığın maliyetinin de 2018 yılında, dünyada 818 milyar dolara ulaşacağı öngörülmüştür [17].

Alzheimer hastalığı, dejeneratif bir beyin hastalığı olup, demansın en sık görülen sebebidir. Demans sendromunda görülen hafıza, konuşma, problem çözme ve diğer bilişsel yetilerle ilgili karakteristik bozukluklar AH'nin en önemli belirtileridir. Ayrıca AH'de zamanla beyin farklı bölgelerinde dejenerasyon da görüldüğü için, yürüme ya da yutma gibi en temel fiziksel yetilerde bozulmalar ortaya çıkmakta ve hastalığın son safhasında hastalar 24 saat aralıksız bakıma ihtiyaç duyan, yatağa bağımlı kişiler haline gelmektedirler. En sonunda, AH kaçınılmaz olarak son safhaya ilerler ve ölümcüldür. Bu sebeple AH sadece hastalıktan muzdarip olan bireylere değil, bu bireylerin yakınları olan kişilere hem maddi hem de manevi bir fatura çıkartmaktadır.

Alzheimer hastalığı, hastanın fiziki muayenesinde henüz herhangi bir bulgu veya belirtinin tespit edilemediği ancak bulgu ve belirtilerin görülmeye başlanmasından yıllar önce patolojik sürecin alttan alta başlayıp devam ettiği ilk andan, hastaların yatağa bağımlı hale geldiği, yakınları ile iletişim bile kuramadığı son safhaya kadar devam eden çok uzun bir patolojik süreçtir. Dünya Sağlık Örgütü'nün [18], Uluslararası Hastalıklar ve İlgili Sağlık Sorunlarının Sınıflandırılması-10 kitapçığında, AH, bilinmeyen bir etiyolojiye sahip, karakteristik nöropatolojik ve nörokimyasal değişikliklere sebep olan, sinsi başlangıçlı, yıllar süren ve yavaş ilerleyişli, beyin primer bir dejeneratif hastalığı olarak tanımlanmaktadır [19].

2.1.1. Epidemiyoloji

Demansın kesin olarak dünya genelindeki insidansını ya da prevalansını bilmek mümkün değildir. Daha çok gelişmiş ülkelerin istatistiksel verilerine dayanarak birtakım veriler ve ötesindeki tahminler ortaya konulmaktadır. Demans sendromu aslında dünya çapında bir epidemidir. Demans sendromlu hastaların 2015 yılında dünya genelinde 47.5 milyon olduğu tahmin edilmiştir. Bu rakamın 2030 yılında 75.6 milyona, 2050 yılında ise 135.5 milyona yükseleceği tahmin edilmiştir. Böylece, her yirmi yılda bir demans prevalansının ikiye katlanacağı öngörülmektedir. Yıllık ortalama 7.7 milyon yeni demans vakası beklenmekte olup her 4.1 saniyede (sn) yeni bir vaka ortaya çıkmaktadır [20].

Demans prevalansında öngörülen bu hızlı artışın esas güdüleyicisi, dünya genelinde yaşlı nüfus oranında meydana gelen artıştır. Yaşlı nüfus oranı, günümüzde gelişmiş ülkeler için

bir dengeye gelmiş ya da gelmek üzere gibi görünmektedir. Oysa gelişmemiş–düşük gelire sahip ülkelerde ya da gelişmekte olan–orta gelir düzeyindeki ülkelerde yaşlı nüfus oranındaki hızlı artış devam ettiği için 2050’li yıllarda beklenen 135.5 milyonluk demans sendromlu popülasyonun önemli bir kısmının düşük veya orta gelir düzeyine sahip ülkelerde yaşıyor olacağını da söyleyebiliriz [21]. Aslında günümüzde de demans sendromluların %63’ü düşük ve orta gelir düzeyindeki ülkelerde, %37’si ise yüksek gelir düzeyine sahip gelişmiş ülkelerde yaşamaktadır [20]. 2040’lı yıllarda, dünya genelindeki toplam demans hastalarının %71’inin gelişmekte olan ülkelerde yaşıyor olacağı tahmin edilmektedir [1]. İleriki yıllarda, gelişmekte olan ülkelerdeki demans prevalansındaki artış hızının, gelişmiş ülkelerdekini aşağı yukarı 3–4 katı olması beklenmektedir. Bu sebeple Türkiye’de de ileriki yıllarda, demans sendromu ve AH’nin önemli bir halk sağlığı sorunu haline geleceği öngörülmektedir.

Türkiye’de demans prevalansı ve insidansı ile ilgili çalışmalar yöresel şekilde yapılmış olup sağladıkları insidans ve prevalans bilgileri sınırlıdır. Öte yandan, Türkiye Alzheimer Derneği’nin de üyesi olduğu Alzheimer Avrupa [22], 2012 yılında Avrupa ülkelerinde demans prevalanslarını açıklamıştır. Türkiye’de demans prevalansının, Avrupa ülkelerinin %1.55’lik ortalama prevalans değerinden önemli oranda daha düşük olmak kaydıyla, bütün popülasyon için %0.44 olduğu bildirilmiştir. Bu durum bizi, Türkiye’deki istatistiksel çalışmaların sağladığı kayıtların yetersiz olduğu, ayrıca demans sendromlu hastalara yeterince ulaşamadığı, hatta önemli oranda tanı konulamayan bir hasta kesimin olduğu sonucuna ulaştırmaktadır. Çünkü, Türkiye’de, yöresel düzeyde yapılan istatistiksel çalışmalarda ulaşılan değerler, batı ülkelerinde ulaşılan değerlere yakındır. Ancak, ülkemizde, ülke çapına yayılmış, eş zamanlı olarak birden çok merkezden yürütülen, prospektif, daha güvenilir insidans ve prevalans sonuçları veren çalışmalar henüz bulunmamaktadır. Yapılan kesitsel ve iki evreli bir prevalans çalışmasında, İstanbul’da yaşayan 70 yaş ve üzerindeki 1019 kişi değerlendirilmiştir. Demans prevalansı %20, AH prevalansı ise %11 düzeylerinde bulunmuştur [23]. Bu bulgular, gelişmiş ülkelerdeki istatistiksel bulgulara yakındır. İzmir’in düşük sosyo–ekonomik düzeydeki bir yerleşim çevresinde yapılan prevalans çalışmasında ise demans prevalansı %22.9 olarak bulunmuştur [24]. Erzurum’da yapılan bir prevalans çalışmasında, Alzheimer prevalansı %6.4 olarak tespit edilmiştir [25]. Şu anda, Türkiye’de yaklaşık olarak 600.000 Alzheimer’lı olduğu tahmin edilmektedir [26]. Bir gözlemsel çalışmada ise; Türkiye’deki Alzheimer’lı hastaların bakımlarını genellikle çocuklarının ya da

eşlerinin üstlendiği ve bu hastaların yıllık bakım maliyetlerinin 1.766 ila 4.930 dolar arasında değiştiği saptanmıştır [27].

Alzheimer hastalığı, en sık görülen demans sebebidir [28]. İlk semptomların tahmini başlama süresinin ardından ortalama beklenen yaşam süresi yaklaşık 8,8 yıldır [29]. Prevalans, yaşla birlikte artmaktadır. Zaten Alzheimer'lı hastaların büyük çoğunluğu 65 yaş ve üstündeki kişilerden oluşmaktadır. Örneğin, 2011 yılında, ABD'deki 65 yaş ve üstünde olduğu tahmin edilen 4.7 milyon Alzheimer'lının, 0.7 milyonunun 65 ila 74 yaşları arasında, 2.2 milyonunun 75 ile 84 yaşları arasında ve 1.8 milyonunun 85 ve daha ileri yaşlarda bulunduğu tespit edilmiştir [30]. 85 yaş ve daha üstünde yaş etkisi ile Alzheimer prevalansı artışı, 65 ila 85 yaşları arasındaki gibi güçlü değildir. Yine, ABD'den elde edilen istatistiksel bilgilere göre Alzheimer hastalarının yaklaşık üçte ikisini kadınlar oluşturmaktadır. Ayrıca, bütün demans çeşitleri kadınlarda daha sık görülmektedir [31]. ABD'de, 45 yaşındaki bir kadının ömür boyu Alzheimer tipi demansa yakalanma olasılığı %19.5 iken, bu olasılık bir erkek için %10.5'tur [32]. ABD'den elde edilen mortalite istatistiklerine göre de AH toplumda altıncı, 65 ve üstündeki yaş grubunda ise beşinci ölüm sebebidir [31].

Yüksek gelir düzeyine sahip ülkelerde, AH prevalans ve insidansının düşme eğiliminde olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da 1990 ila 2005 yılları arasında batıdaki bazı çalışmalarda demans insidansında istikrarlı bir düşüş saptanmıştır. Ayrıca, katılımcıların total beyin hacimlerinin 2005–2006 yıllarında, 1995–1996 yıllarına göre istatistiksel anlamlı biçimde daha büyük olduğu görülmüştür ki bu durum 1995–1996 yıllarındaki katılımcılarda beyin atrofisi lehine bulguların daha güçlü olduğunu göstermektedir [33]. 1982 ila 1999 yılları arasında şiddetli bilişsel bozukluk prevalansında anlamlı bir düşüş saptanmıştır [34]. Bir başka çalışmada, ardışık üç on yıl içinde, demans insidansında –vasküler demans insidansında, Alzheimer tipi demansa göre daha fazla olmak üzere– bir azalma gözlenmiştir [35]. Gelişmiş ülkelerde görülen bu düşüş eğiliminin ana sebebi, bu ülkelerde demans için riskli olan yaş grubuna ulaşan kişilerin birkaç dekat önce aynı yaş grubunda bulunan kişilere göre daha eğitilmiş olması nedeniyle demans için de risk faktörü olarak kabul edilen, özellikle kardiyovasküler hastalıklara yol açan koşullar ile ilgili önleyici tedbirler hakkındaki farkındalığın önceki kuşaklara göre daha yüksek düzeyde olması olarak görülmektedir. Ayrıca kardiyovasküler hastalıklar için günümüzde daha etkin tedavi yöntemlerinin

uygulanmakta ve bu kronik hastalıkların uzun dönem içinde ortaya çıkan olumsuz etkileri görece olarak daha asgari bir seviyede tutulmaktadır. Bu günlerde, batı ülkelerinde yaşlı nüfusun önemli bir kısmını oluşturan kesim “baby boomer” olarak adlandırılan, İkinci Dünya Savaşı’ndan sonra doğmuş ve kendisinden bir önceki kuşağa göre daha iyi eğitim alarak yetişmiş insanlardan oluştuğu için, yaşlılarda eğitim düzeyinin iyileşmesinin, demans insidans ve prevalans oranlarını olumlu etkilediği ve ileriki yıllarda gelişmiş ülkeler açısından bu durumun bir avantaj sağlayacağı düşünülmektedir.

2.1.2. Etiyopatogenez

2.1.2.1. Kolinerjik hipotez

Alzheimer hastalığına yol açan ve seyrine etki eden pekçok unsurun olduğu bilinmektedir. Bu sebeple, AH’nin etiopatogenezini açıklayabilmek için öne sürülen çeşitli hipotezler bulunmaktadır. Acaba hangi nörokimyasal ya da nöropatolojik değişiklik AH için en ön plandadır sorusuna hemen cevap vermek zor olsa da akla gelen ilk hipotez kolinerjik hipotezdir [36].

Alzheimer hastalığındaki kolinerjik disfonksiyon, neokortekse ve amigdalaya ulaşan kolinerjik uzantıları bulunan Mynert’in nucleus basalisinde, hipokampusa kolinerjik uzantılar yollayan medial septal alanda ve Broca’nın diagonal bandında yaygın kolinerjik nöron kaybından kaynaklanmaktadır. Yaşlanma ile beraber de kolinerjik disfonksiyon, yaşlanmanın doğal bir parçası olarak görülmektedir. C57BL ve BALB/c farelerde, hayatlarının 30. ayında, beyinde asetilkolin (ACh) sentezinin %75 oranında azaldığı gözlenmiştir [37]. Yüksek afiniteli kolin transportunda (ACh sentezi için hız kısıtlayıcı basamak değişiklikler görülmesi, K⁺ ile uyarılan ACh salınımında azalma, yaşlılarda, Alzheimer hastalarında ya da Lewy cisimcikli demans, Parkinson kaynaklı demans hastalarında nikotinik ACh reseptörlerinde azalma (Alzheimer’da, özellikle α -4 yüksek afiniteli ACh reseptörleri), Alzheimer hastalarının bazal ön beyin kolinerjik nöronlarında sinir hücresi büyüme faktörü (nerve growth factor–NGF) eksikliği ve kortikal nöronlarında aksonal transportta bozulmalar söz konusudur [38]. İn vivo görüntüleme yöntemleri ile, Alzheimer hastalarının pozitron emisyon tomografisi (positron emission tomography, PET) çalışmalarında kortikal asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesinde ve tek foton emisyonlu bilgisayarlı tomografi (single photon emission computerized tomography, SPECT) çalışmalarında tüm serebral kortekste ve hipokampusta veziküler

ACh taşıyıcısında azalma saptanması bulguları da AH ile kolinerjik hipotezi ilişkilendirmektedir [39]. Kolinerjik hipotezin AH patogenezinde yeri olduğunu gösterilebilmesi için bu bulgularla bilişsel bozukluk arasında doğrudan ilişki kurabilecek verilerin de ortaya konulması gerekmektedir. Buna ilişkin olarak, Zemishlany ve Thorne, düşük doz skopolaminin (muskarinik ACh reseptörlerinin yarışmalı antagonisti) yaşlı bireylerde öğrenmeyi bozduğunu göstermişlerdir [40]. Genç bireylerde, düşük doz skopolaminin böyle bir etkisi görülmemiştir. Bir başka çalışmada, Alzheimer hastası kişilerin, düşük doz skopolamin etkisi ile kısa psikiyatrik puanlama ölçeğinde (Brief Psychiatric Rating Scale, BPRS) ve bazı bilişsel işlevlerinde gerileme tespit edilmiştir. Alzheimer hastası olmayan bireylerde ise skopolaminin daha yüksek dozlarında benzeri bir gerileme gözlenmiştir [41]. Bu durumda, antikolinerjik etkinin hem sağlıklı yaşlılarda bilişsel işlevleri geriletmediği hem de Alzheimer hastası bireylerin antikolinerjik müdahalenin bilişsel işlevler üzerindeki etkilerine daha hassas olduğu görülmektedir.

Merkezî sinir sistemindeki (MSS) bir kolinerjik yetersizlik hem yaşla görülen ve normal kabul edilen bilişsel gerilemeye hem de AH ile ilişkili bilişsel gerilemeye zemin hazırlamaktadır. İleri yaşlarda ve AH'de görülen bilişsel gerilmenin ACh bulunduran nöronların disfonksiyonundan kaynaklandığını ileri süren kolinerjik hipotez, günümüzde AH tedavisi için kolinerjik ajanların kullanımını, tedavi stratejisinin ana ögesi haline getirmiştir. Ayrıca kolinerjik etkili tedavi, depresyon, ajitasyon, psikoz, saldırgan davranışlar gibi AH'nin bilişsel olmayan davranışsal bulgu ve belirtilerinde de iyileşme sağlamaktadır.

2.1.2.2. Enflamasyon

Antikorlar da dahil pek çok molekülün geçişine izin vermeyen kan-beyin bariyerinin varlığı sebebi ile MSS immunolojik etkileşimlerden korunmuş olarak kabul edilmekteydi. Her ne kadar kan-beyin bariyerinin işlevi hakkında bilinenler değişmemiş olsa da MSS'nin periferik immun süreçlerden etkilenmediği görüşü baştan aşağı değişmiş gibi görünmektedir. Son yıllarda, 128 Alzheimer hastası ve 135 sağlıklı kişi ile yapılan bir çalışmada, sitomegalovirüs ve herpes simpleks virus tip-1 gibi viral enfeksiyonların ve borrelia burgdorferi, klamidofila pneumoniae ve helicobakter pilori gibi bakteriyel enfeksiyonların, AH riskini arttırdığı gösterilmiştir [2, 42]. Ateroskleroz, diyabet, periodontit, depresyon ve obezite gibi durumların yanı sıra kronik enflamatuvar hastalıkların da AH riskini arttırdığı, pek çok epidemiyolojik çalışma ile ortaya

konulmuştur [43-45]. Ayrıca, yaşlanmanın da kendi başına bağımsız bir etken olarak, doğal immün cevabı zayıflatan bir unsur olduğu bilinmektedir [42]. Öte yandan, c-reaktif protein (CRP) ve IL-6 gibi akut faz reaktanı ya da pro-enflamatuvar sitokinlerin plazma seviyelerinin, Alzheimer hastalarında klinik olarak demans semptomları görülmeden beş yıl kadar önce, aynı yaş grubundaki kişilere göre daha yüksek olduğu görülmüştür [4]. Ayrıca, AH hastalığı ile ilişkili nöredejenerasyona, MSS kaynaklı enflamatuvar süreçlerin de katkısı söz konusudur. A β ₁₋₄₂ protofibrillerinin -protofibriller, toparlak (spherical) A β oligomerlerinin boncuk dizileri gibi birleşmesi ile oluşmaktadır- mikrogliya hücrelerinde TNF- α üretimini artırarak enflamatuvar cevabın oluşumunu tetiklediği gösterilmiştir [46]. IL-1 β , TNF- α ve IL-6 gibi sitokinlerin, hem beyin omurilik sıvısında (BOS) hem de periferik dolaşımında, AH seyri boyunca düzenli olarak yükseldiği gözlenmektedir [1, 5]. Yaygın ve kronik bir enflamatuvar yanıt gösteren romatoid artiritli hastalarda, daha az sıklıkta AH'ye rastlanılmasının, uzun süreli non-steroidal olmayan anti-enflamatuvar ilaç kullanımına bağlı olabileceği düşünülmektedir [1, 2]. Giderek artan sayıda araştırma, sistemik bir enflamatuvar uyarının bile sitokinler, serbest radikaller ve lipid metabolitler gibi pro-enflamatuvar mediyatörlerin salınımını gerçekleştiren mikrogliyal aracılığı ile MSS'de bir enflamatuvar olayı tetikleyebildiği yönünde bulgular ortaya koymaktadır [6, 42]. Buna göre; perifer kaynaklı IL-1 β , TNF- α , IL-6 gibi pro-enflamatuvar sitokinler ve lipopolisakkaritler gibi patojen ilişkili moleküler desenler (pathogen associated molecular pattern, PAMP) kan-beyin bariyerinden parenkime sızarak ya da bu periferik mediyatörler aracılığı ile vagus siniri gibi afferent yollar uyarılarak, enflamatuvar yanıt MSS'ye taşınmaktadır [47]. Bu sebeple, anti-enflamatuvar etkinliği olduğu bilinen ajanların, AH'de terapötik değerinin olabileceği düşünülmektedir.

2.1.2.3. Oksidatif stres

Yaşlanmanın, oksidatif stresi arttırdığı bilinmektedir. Son yıllarda biriken veriler, Alzheimer hastalarının, MSS'de artmış oksidatif stres yükü altında olduğunu göstermektedir. Beyin dokusu, oksidatif strese karşı oldukça dirençsizdir. Çünkü antioksidan moleküller açısından yetersizdir [48, 49]. Yaşlanma kısmen de olsa; reaktif oksijen ürünlerinin (Reactive oxygen species, ROS; Reactive nitrogen species, RNS) birikiminden ve hücrenin veya dokunun bu ürünleri ortadan kaldırma ya da bu ürünlerin zararlı etkilerini önleme yetisinin azalmış olmasından kaynaklanan bir süreçtir.

Alzheimer hastalığında, en erken evrelerinden başlayarak, beyin dokusunun oksidatif stresin etkisinde kaldığı bilinmektedir [50]. Amiloid- β peptitler, bir defa oluşunca; özellikle $A\beta_{1-42}$ peptitler, dimer, trimer, oligomer, protofibriller ve büyük çözünmeyen fibriller halinde bir araya gelmeye başlarlar [10]. Amiloid- β peptitlerin oksidatif stresi tetiklediğine ilişkin mekanizmalardan bahsedilmekle beraber, oksidatif stresin de $A\beta$ peptit üretimini arttırdığına dair bulgular bulunmaktadır [51, 52].

Alzheimer hastalığında oksidatif stres yükünün arttığını gösteren güçlü kanıtlar bulunmaktadır. Bu kanıtlar, Alzheimer hastalarının beyininde, Fe, Al, Hg gibi serbest radikal oluşumunu tetikleyebilecek metallere artması [53], lipit peroksidasyonunun artması, çoklu-doymamış yağ asitlerinin azalması, ventriküler sıvıda lipit peroksidasyon ürünü bir aldehit bileşiği olan 4-hidroksi-nonenal (HNE)'in artması, protein ve DNA oksidasyonunun artması, azalmış enerji metabolizması, azalmış sitokrom-c oksidaz düzeyi, ileri glikasyon son ürünlerinin (advanced glycation end products, AGEs), malondialdehit (MDA), karboniller, peroksinitrit, hem oksijenaz-1 (HO-1), süperoksit dismutaz-1 (SOD-1) gibi moleküllerin ve enzimlerin nörofibriller yumaklarda (neurofibrillary tangles, NFT) tespit edilmesi ve SP'de HO-1 ve SOD-1 enzimleri ile AGEs'in bulunmuş olması olarak sıralanabilir [3, 54, 55].

Bunların yanı sıra, $A\beta$ peptidin kendisi de serbest radikal üretebilecek etkileşimlere girebilir. Alzheimer hastalığının, oksidatif stres hipotezine göre, $A\beta_{1-42}$, çift katlı lipit zar yapılarına girerek ve bir çeşit reaktif oksijen kaynağı gibi etki göstererek, lipit peroksidasyonunu başlatmakta ve hücre içi oksidatif stres oluşumunu tetiklemektedir [10]. Çalışmalar, oksidatif stresin amiloid öncülü protein seviyelerini [56] [57] ya da β veya γ -sekretaz enzimlerinin aktivitesini arttırarak [58, 59] amiloid öncülü proteinin [56] amiloidojenik yol ile daha çok işlenmesine yol açtığını ortaya koymuştur. Peroksinitritten kaynaklanan nitrozatif stresin tirozin modifikasyonlarına neden olmasından dolayı AH patogeneğinde γ -sekretazın herhangi bir modifikasyona uğrayıp uğramadığı konusu önem kazanmaktadır. Çünkü, peroksinitrit ilişkili nitrotirozinasyon, AH'de görülmektedir [60, 61]. Özellikle nitrozatif stresle gerçekleşen γ -sekretaz modifikasyonunun, yaşlanma sürecinde sporadik AH'ye zemin hazırladığı sonucuna ulaşılmıştır. Nitrozatif stres ile $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ oranının, kontrol grubuna göre neredeyse iki kat arttığı gösterilmiştir [62].

Alzheimer hastalığında oksidatif stres sürecinin, patolojik sürecin en erken evrelerinde ortaya çıktığı düşünülmektedir. Hafif bilişsel bozuklukta (HBB, mild cognitive impairment–MCI), protein oksidasyonunun veya nitrasyonunun oksidatif stres belirteci olan protein karboniller, beyinde artmış olarak karşımıza çıkmaktadır [63]. Buna ek olarak, HBB’de, nükleik asit oksidasyonunun biyobelirteci 8–hidroksi–2’–deoksiguanozin (8–OHdG), 8–hidroksiguanin (8–OHG), 5–hidroksisitozin, 2,6–diamino–4–hidroksi–5–formamidoprimidin ve 4,6–diamino–5–formamidoprimidin seviyelerinin hem mitokondriyal hem de nükleer DNA için arttığı görülmüştür [64]. Sağlıklı kişilerle kıyaslandığında, AH veya HBB gelişmiş bireylerde, proteine bağlı ve serbest HNE, tiobarbütirik asit reaktif ürünlerinin (TBARS), izoprostan ve MDA seviyeleri kanda, idrarda ve BOS’da yükselmiş olarak görülmektedir [10, 65]. Geç başlangıçlı AH (Late onset form of Alzheimer’s disease) grubunda, yani genetik bir zemini olmayan ve genellikle 65 yaş üzerinde görülen Alzheimer’da, lipid peroksidasyon yan ürünü olan hidroperoksitlerin kandaki seviyeleri, kontrol gruplarına göre, B12 ve folat eksikliği, ileri derecede kalp yetmezliği, ileri derece böbrek veya karaciğer hastalığı, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, kanser, steroid kullanımı, NSAİİ veya antibiyotik kullanımı gibi eşlik eden durumlardan bağımsız olarak yüksek bulunmuştur [66].

Ayrıca, AH kliniğinin tam anlamıyla belirmesinden önce ortaya çıkan, henüz SP’nin veya NFT’nin belirgin bir şekilde saptanamadığı, Alzheimer’a doğru geçici bir süreç olduğu düşünülen HBB tanısı almış kişilerde, BOS’da, plazmada ve idrarda, özellikle esansiyel yağ asitlerinin peroksidasyonu ile ortaya çıkan izoprostan seviyelerinin, aynı yaş grubundaki kişilere göre anlamlı derecede artmış olduğu gözlenmiştir. İzoprostan seviyelerinin bilişsel bozulmanın şiddeti ile ilişkili olduğu da ortaya konulmuştur. Hafif bilişsel bozukluğu olan kişilerde hipokampusta, üst ve orta temporal giruslarda genel olarak protein peroksidasyon ürünlerinin artmış olduğu görülmüştür [67, 68]. Bu durum, oksidatif stres etkisi ile beyinde meydana gelen değişikliklerin, AH’nin klinik tablosuna öncülük ettiğini düşündürmektedir.

Antioksidan savunma düzeneklerinden kurtulan ROS’un hücre yaşam döngüsü ve sinir hücrelerinde sinaptik plastisite ile ilgili sinyal yollarını etkilediği bilinmektedir. Hücre içinde açığa çıkan ROS, mitokondriyel geçirgenlik geçiş gözenağı (mitochondrial permeability transition pore, mPTP), sarkoplazmik retikulum Ca^{+2} –ATPaz (SERCA), inozitol–1,4,5–trifosfat reseptörleri (IP₃–Rs) ve ryanodin reseptörlerinin kinetiğini

etkileyerek Ca^{+2} homeostazının mitokondri ve endoplazmik retikulumda (ER) bozulmasına yol açmaktadırlar. Yaşlanma sürecinde, insanlarda da primatlarda da HNE, karbonillenmiş proteinler ve 8-OHG gibi ROS etkisiyle modifiye olmuş son ürünler hem beyinde hem de diğer dokularda birikmektedir [69]. Yaşlanmayı aerobik metabolizmanın sonucu olarak yıllar içinde biriken oksidatif stres hasarının bir sonucu olarak gören yaşlanmanın serbest radikal hipotezi [53], AH için de birikmiş bir oksidatif stres hasarı ile hastalık patogeneziyi açıklamayı hedefleyen görüşlere öncülük etmiştir. Oksidatif stres birikiminin tetiklediği enerji metabolizması bozukluğu, hücrede Ca^{+2} homeostazının devam ettirilmesini de zorlaştırır. Örneğin; özellikle zardaki lipitlerin peroksidasyonu, hücre içi Ca^{+2} dengesini bozucu sonuçlar doğurur. Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) ve H_2O_2 , hidroksi radikal oluşumu ile lipitlerin peroksidasyonuna sebep olur. Hidroksi radikaller, zar lipitlerindeki çift bağları hedef alarak bir dizi aldehit oluşumuna yol açar. Bu aldehitlerden, özellikle lipit peroksidasyonuna has olan HNE, protein zinciri üzerindeki sistein, lizin ve histidin kalıntılarının kovalent modifikasyonuna neden olarak, Ca^{+2} homeostazı için önemli olan Na^+/K^+ ATPaz, hücre zarı Ca^{+2} -ATPaz (PMCA), nöronal glukoz taşıyıcısı 3 (GLUT3), voltaj bağımlı Ca^{+2} kanalları (VBKK, voltage gated calcium channels) ve astrositlerdeki glutamat taşıyıcısının (EAAT2) işlevini bozar [70].

Sinir hücresi mitokondrisinde, sürekli bir dizi fisyon ve füzyon süreçleri devam etmektedir. Bu süreçlerde görevli bazı proteinlerin, Alzheimer'da ya da oksidatif stres durumlarında ekspresyonları değişir. Örneğin; mitokondriyel fisyon proteinlerinden dinamin benzeri protein-1 (dynamine like protein-1, DLP-1), Alzheimer'lı beyinde artmış olarak bulunmaktadır. Dinamin benzeri protein-1'in S-nitrozilasyonu (oksidatif-nitrozatif stres sebebi ile), mitokondriye translokasyonunu kolaylaştırır. Bu durumun, AH veya herhangi bir sebeple artmış oksidatif stres hallerinde, sinir hücresi mitokondrilerinin fisyon-füzyon dengesini kuramamasına ve mitokondrilerin fisyona meyilli bir hale gelmesine sebep olmaktadır. Mitokondri parçalanması ile elektron transport zincirinin de işlevsiz hale gelmesi, ROS oluşumunu arttırarak bir kısır döngüye yol açar. Böylece, mitokondrinin Ca^{+2} tamponlama özelliği de kaybedilmiş olur [68].

Bu sebeplerle, özellikle yaşlanma ve eşlik eden kronik hastalıklar ile perifer veya MSS kaynaklı veya oksidatif stres yükünün azaltılmasının, AH'de terapötik değerinin olacağı bilinmektedir.

2.1.2.4. Alzheimer hastalığı ve Ca⁺² homeostazı

Kalsiyum iyonlarının, kalp atımı, kas kasılması, T hücreleri ile antijen sunan hücreler arasındaki etkileşim, sitotoksik T hücrelerinde görülen ekzositoz, hormon sekresyonu, apoptoz, gen yazılımı (transcription), uyarılabilir hücrelerde elektriksel uyarımlar, sinir hücrelerinde sinaptik plastisite, hücre zarının uyarılabilirlik özelliğinin en elverişli düzeyde devam ettirilmesi, çevresel uyaranların algılanması, işlenmesi ile uygun cevabın ortaya çıkarılması ve bilişsel işlevlerin gerçekleşmesi için nörotransmitter salınımı gibi fizyolojik süreçlerde hayati öneme sahip bir yeri olduğu bilinmektedir [71]. Kalsiyum iyonunun bu geniş yelpazede sıralanan bütün işlevleri düşünüldüğünde, Ca⁺² homeostazındaki sapmaların, sinir hücresi fizyolojisini etkilemesi beklenir.

Kalsiyum, sahip olduğu pekçok işlevinin yanısıra bütün ökaryotik hücrelerde, hücre içinde görevli evrensel bir uyarım elementidir. Kalsiyum iyonunun öteden beri hücre ölümü süreçlerinde hayati rollere sahip olduğu da bilinmektedir. Örneğin; doku veya hücrede enflamasyon, ısı, radyasyon, travma, toksinler vb. dışarıdan ulaşan unsurlar ile ortaya çıkan ve hücre zarının haraplanması, kromatin sindirimi, DNA hidrolizi ve sonuçta hücre lizisi süreçleri ile kendini gösteren nekroz için esas patofizyolojik düzeneğin, mitokondriyel enerji metabolizmasının çöküşü ve dramatik olarak azalan ATP seviyeleri ile hücre içinde artan [Ca⁺²] sonucunda fosfolipazlar, endonükleazlar ve protezlar gibi pek çok katabolik enzimin aktif hale gelmesiyle meydana geldiği bilinmektedir [72].

Hücre içi Ca⁺² iyonunun nöronal sinyal yollarındaki merkezî önemi, Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklar ile Ca⁺² homeostazı arasında bir ilişki olabileceğini düşündürmektedir. Oldukça geniş bir yelpazede çeşitlendiriliyor ve değerlendiriliyor olmalarına rağmen; nörodejeneratif hastalıklar patofizyolojilerinde çarpıcı benzerlikler barındırmaktadırlar. Kalsiyum homeostazında ve ilgili sinyal yollarında bozukluklar, hemen bütün nörodejeneratif hastalıklarda karşımıza çıkmaktadır [73]. Son birkaç on yılda, yaşlanma sürecini de Ca⁺² homeostazındaki sapmalar ile ilişkilendirebilecek bulgulara ulaşılmıştır. Ulaşılan bulgular, nöron hücresindeki Ca⁺² sinyal yollarındaki bozulmaların hem normal yaşlanma sürecinin bir parçası olduğunu hem de AH (Şekil 2.1.), Parkinson hastalığı (PH), amyotrofik lateral skleroz (ALS), Huntington hastalığı (HH), spinoserebellar ataksiler (SSA) gibi nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde yer aldığını ortaya koymaktadır. Yaşlanma ile hücrenin Ca⁺² homeostazını devam ettirme

yeteneğinde bir azalma olduğu bilinmektedir [7]. Periferik sinir hücrelerinde, SERCA'nın etkinliğinin yaşlanmayla azaldığı ortaya konmuştur [8].

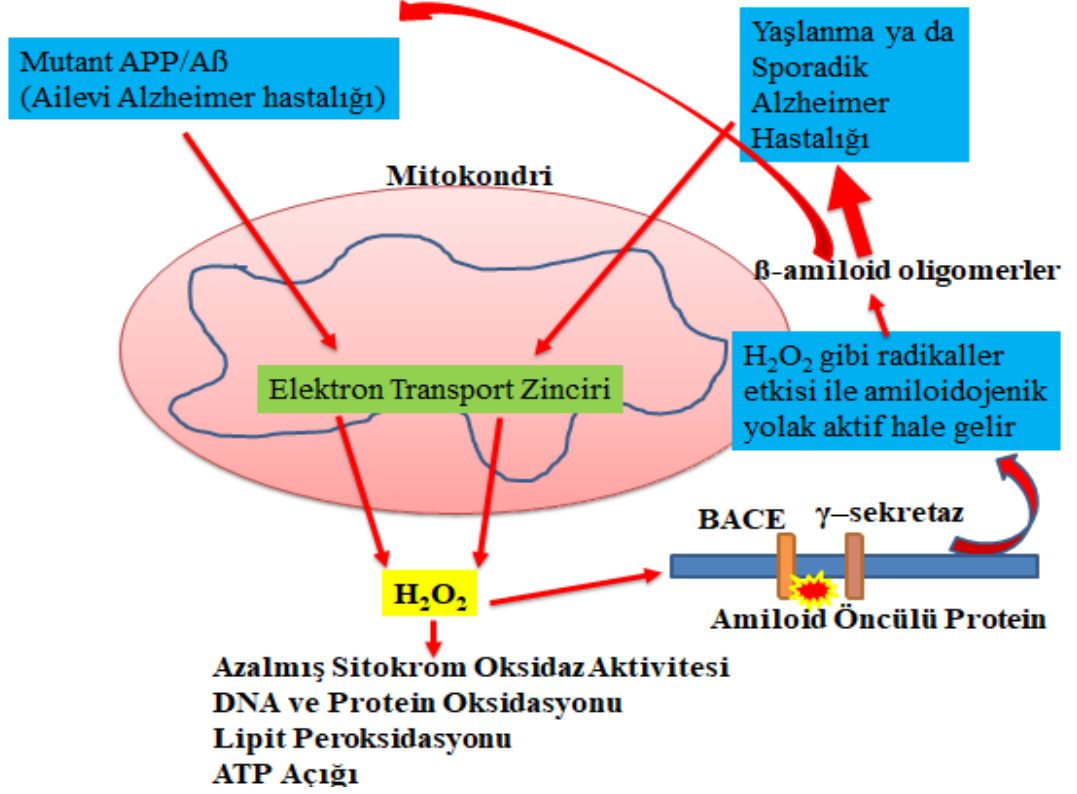
Kalsiyum sinyalleri, sinir hücresine ait uzantıların gelişimi (neurite outgrowth), sinaptik plastisite, sinaps oluşumu (synaptogenesis) ve apoptoz gibi fizyolojik devamlılıkla ya da hücre yaşam döngüsü ile ilgili birçok hayati işlevin devam ettirilmesinde veya aktiflenmesinde yer alır. Ca^{+2} , bir ikincil haberci olarak da işlev görür. Hatta, depolarizasyon durumunu ve sinaps hareketlerini, sinir hücresinin biyokimyasal içeriği ile ilişkilendiren esas hücre içi ikincil haberci Ca^{+2} 'dir. Hücre, oldukça hassas bir şekilde hücre içi $[Ca^{+2}]$ 'yı ayarlar ve bu konsantrasyon, oldukça dar bir fizyolojik aralıkta tutulur. Kalsiyum iyonu konsantrasyonu ekstraselüler alanda yaklaşık olarak 1.2 mM iken ER içinde 0.5 mM, hücre içinde ise 100 nM kadardır. Böylece hücre dışında Ca^{+2} iyonu, hücre içine göre yaklaşık olarak 10.000 kat daha fazla bulunur. Bu durum, Ca^{+2} iyonunun, Na^{+} veya K^{+} 'ya göre çok daha hassas bir dengesinin olduğunu ortaya koymaktadır. Kalsiyum, sinir hücresi sitozolüne VBKK aracılığıyla, reseptörle düzenlenen Ca^{+2} kanalları (ROCC, receptor-operated calcium channels, ROCC ile ya da Ca^{+2} birikimi ile düzenlenen Ca^{+2} kanalları (store-operated calcium channels, SOCC) ile girer. Voltaj bağımlı kalsiyum kanalları, Ca^{+2} kanallarının L-tip alt ailesine ait, yaşlanma ve Alzheimer'da rolü olduğu bilinen kanallardır. Endoplazmik retikulum zarında bulunan IP_3 ve ryanodin reseptörlerinin uyarılması ile ER'deki depolardan sitozole Ca^{+2} salınması gerçekleşir [9]. Hücre zarında, fizyolojik koşullarda Ca^{+2} iyonunun hücre dışına akışını sağlayan $Na^{+}-Ca^{+2}$ değiştiricisinin ($Na^{+}-Ca^{+2}$ exchanger, NCX) de -ki bu değiştirici, bir defada üç Na^{+} iyonunu hücre içine almasına karşılık bir Ca^{+2} iyonunu dışarı atar, hücre içine alınan Na^{+} iyonları daha sonra $Na^{+}-K^{+}$ ATPaz ile hücre dışına çıkarılacağı için aslında ATP bağımlı bir değişim hareketidir- Ca^{+2} homeostazının sağlanmasında önemli bir işlev görür. Bunların yanı sıra SERCA, PMCA, mitokondriyel zar Ca^{+2} ATPaz (MMCA), mitokondriyel zar $H^{+}-Ca^{+2}$ değiştiricisi ($mH^{+}-Ca^{+2}$ exchanger, mHCX) ve mitokondriyel Ca^{+2} taşıyıcısı (calcium uniporter, MCU) $[Ca^{+2}]$ 'nın fizyolojik aralıkta devam ettirilmesine yardımcı olmaktadır [74]. Eğer hücre içi Ca^{+2} düzeyi iskemi, oksidatif stres, inflamatuvar olaylar, radyasyon, travma vb. sebeplerle olması gerekenin üstündeki konsantrasyonlara çıkarsa, bu durum enzim yıkımına, aşırı ROS üretimine ve sonuç olarak hücrede mitokondriyel işlevlerin ve biyoenerji döngüsünün sekteye uğramasına yol açar [75].

Kalsiyum iyonu, sinir hücredeki dendritlerin nörotransmitterlere cevaben ortaya çıkardıkları yapısal ya da işlevsel olarak hücre çekirdeğine gen yazılımını düzenleyen sinyallerin ulaşması ve nörotransmitter salınımının başlatılması gibi çok çeşitli karmaşık sürece de aracılık eder. Hücrede zar potansiyeli büyük ölçüde Na^+ ve K^+ iyonlarına bağlıdır. Kalsiyum ise, zar potansiyeline yanıt olarak hücre içi işlevlerde gerekli değişikliklerin ortaya çıkmasına aracılık eden bir hücre içi ikincil habercigörevindedir. Kalsiyum homeostazında meydana gelen bozulmalar ise hücrenin fizyolojik işlevlerine ket vurmasının yanısıra hücrenin en nihai işlevlerini etkileyecek moleküler değişikliklere sebep olabilir. Bu değişiklikler, lokal olarak nöron hücresi dendritlerinde dentritik budanma (dentritic pruning) biçiminde ortaya çıkabileceği gibi, sinaps kaybı (synapse loss), sinaptik geçirgenliğin ve plastisite disfonksiyonu, hücre iskeleti (cytoskeletal) patolojileri, A β (amyloidogenesis) veya hiperfosforile tau proteini üretimi, mitokondriyel disfonksiyon, oksidatif stres ve enflamasyona yol açarak bir nöronu ya da nöronal ağı bütünüyle etkileyebilir. Kalsiyum homeostazındaki bu sapmalar sebebiyle en sonunda MSS'de mikroglial aktivasyonu ve enflamatuvar süreçlerini içeren doğal immun yanıt tetiklenmektedir. Ancak yine de Ca^{+2} homeostazındaki bozulmanın hem yaşlanma hem de AH ile arasındaki mekanistik ilişkinin, AH için etkin bir terapötik müdahalenin keşfedilmesini sağlayacak en önemli unsurları hala gizemini korumaktadır [76]. Bu durumda Ca^{+2} 'a geçirgen katyon kanalları muhtemel birer terapötik etkinlik alanı olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak hangi katyon kanalının ne ölçüde ve ne şekilde yaşlanma ve AH ile ilişkili olduğu konusunda katedilecek çok yol olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca, sözü edilen katyon kanallarının her birinin hücre içi [Ca^{+2}]'na ne ölçüde etki ettiği, bu etkinin sitoplazmada lokal bir alanda mı yoksa bütün sitozoldeki Ca^{+2} etkileyerek mi ortaya çıktığı da önem taşımaktadır. Yine de Ca^{+2} kanalları ile AH arasında, patolojik süreci bütünüyle açıklamaya da göz önüne serilen önemli bazı mekanistik ilişkiler mevcuttur. Örneğin; multimerik, kompleks yapıda olan ve fonksiyonel bir iyon kanalı oluşturan, iyon seçici bölgesi NMDAR ile benzerlikler taşıyan Ca^{+2} homeostaz modülatörü-1 (CALHM1) kanalından hücre içine kalsiyum akışı A β peptit üretimini azaltmakta ve çözünebilir amiloid öncülü protein- α (sAPP α) üretimini ise arttırmaktadır [77]. Öte yandan, presenilinde meydana gelen ailevi AH ile ilişkili mutasyonların ise ER'den IP $_3$ aracılı Ca^{+2} arttırırken, SOCC'dan kalsiyum akışını azalttığı görülmüştür [78].

Hücre içi ve dışı $[Ca^{+2}]$ 'nın hassas dengesi devam ettirilerek bu karmaşık hücrel işlevlerin yerine getirilmesinin, elbette sinir hücresi için bir külfeti olacaktır. Zar potansiyelinde meydana gelen bir değişiklikten sonra, sinyal yollarını harekete geçiren artan hücre içi $[Ca^{+2}]$ 'nın eski düzeylerine döndürülmesi için ATP'ye bağımlı bir şekilde Ca^{+2} iyonunun hücre dışına ya da hücre içi Ca^{+2} depolarına taşınması gerekir. Yaşlanma veya kimi nörodejeneratif hastalıklarla beraber, sinir hücresi uyarılması, zar potansiyelinin değişmesi, hücre içi Ca^{+2} yoğunluğundaki değişiklikler ve bu değişikliklerin eski düzeylerine döndürülmesi ile ilgili süreçleri yürütme kapasitesinde gerilemeler görülmektedir.

Kalsiyum homeostazı sağlayan kalsiyuma geçirgen katyon kanallarının yanında bu dengenin devam ettirilmesi ile ilgili organeller de bulunmaktadır. Mitokondri, Ca^{+2} homeostazı sağlamakla görevli en önemli organellerden biridir. Mitokondri hem trikarboksilik asit döngüsü [79] [79] ve oksidatif fosforilasyon ile yüksek enerjili NADH ve ATP gibi ara ürünler sağlar hem de hücre içinde önemli bir Ca^{+2} deposu ve ROS kaynağı olarak görev yapar. Mitokondrideki proton pompası, negatif bir zar içi ortam oluşturduğu için, mitokondri matriksi Ca^{+2} birikimi için elverişli bir hale gelmektedir. Hücre içi artan $[Ca^{+2}]$, MCU'yu aktive etmekte, mitokondri matriksinde artan $[Ca^{+2}]$, TCA'nın pirüvat dehidrogenaz, izositrat dehidrogenaz ve α -ketoglutarat dehidrogenaz enzimlerinin ve dolayısıyla F_1F_0 -ATPaz'ın etkinlik düzeyini arttırmakta ve böylece ATP ve NADH gibi yüksek enerjili ara ürünlerin üretimi artmaktadır. Böylece mitokondri bir çeşit hücre içi Ca^{+2} tamponu olarak işlev görür. Ayrıca Ca^{+2} , hücrenin enerji metabolizmasında rol oynayan önemli bir ikincil haberci olarak karşımıza çıkmaktadır [10]. Bu sebeple, mitokondrinin Ca^{+2} tamponlama kapasitesi hem hücre içi Ca^{+2} dengesini devam ettirmekte hem de O_2 tüketiminin ve ortaya çıkan ROS'un miktarını belirlemektedir. Hücre sitozolüne girmiş bir Ca^{+2} iyonunun, hücre zarındaki Ca^{+2} -ATPaz, SERCA veya hücre zarındaki dolaylı olarak enerji bağımlı NCX ile sitozolden uzaklaştırılması, elektron taşıyıcı zincirle 3 proton pompalanmasına yani 1 ATP'ye mül olmaktadır. Oysaki, Ca^{+2} 'un mitokondri matriksine alınması için 2 proton pompalanması yani 0.67 ATP harcanması gerekmekte, böylece daha az oksijen harcanmakta ve daha az miktarda ROS açığa çıkmaktadır. Bu sebeple, mitokondrinin Ca^{+2} tamponlama özelliği, özellikle sinir hücresi gibi uyarılabilir hücrelerde daha da önemli bir hale gelmektedir [69]. Bu durum, mitokondriyal disfonksiyonun ve enerji metabolizması ile ilgili

bozuklukların, Ca^{+2} dishomeostazına ve hücre harabiyetine nasıl yol açabileceğini de göstermektedir.



Şekil 2.1. Serbest radikaller ile amiloidojenik yolun uyarılması. Serbest radikaller, β -sekretaz aktivitesini artırarak, amiloidojenik yolun çalışmasına ve bu yol ile amiloidojenik olmayan yola göre çok daha fazla A β peptit üretilmesine sebep olur. Amiloidojenik yol ile oluşan A β peptitler presipite olarak SP oluşturmaya daha meyillidirler. A β peptitler, ayrıca, mitokondriyel etkiler de gösterirler. Sonuçta, elektron transport zincirinin işlevi bozulur ve mitokondriyel kaynaklı serbest radikal üretimi artar. Bu durumda, mitokondrinin Ca^{+2} tamponlama işlevi de bozulur. Kaynak [80]'den uyarlanmıştır.

Kalsiyum homeostazı ile ilgili olan bir diğer hücre içi organel de ER'dir. Kalsiyum depolanması, sentezlenen proteinlerin katlanması (folding), modifikasyonu ve kimi özelliklerine göre sınıflandırılması (sorting) gibi işlemler ER'nin görevlerindedir. Bu işlevlerin bir kısmının veya tamamının yerine getirilememesi halinde, ER stresi ortaya çıkar. Amiloid- β (1-40) peptit etkisine bırakılan, kaspaz-12 nakavt ve doğal fenotipteki farelerin kortikal nöronları gözlemlendiğinde, kaspaz-12 nakavt farelerin kortikal nöronlarında, doğal fenotipli olanlara göre, anlamlı miktarda daha düşük oranda apoptoz görülmüştür. Kaspaz-12'nin, yalnızca ER stresine yol açan unsurlar ortaya çıktığında apoptotik yolların aktive olmasını sağladığı, ER stresinden başka hücre içindeki

apoptotik yolların çeşitli etkenlerle aktifleşmesinin kaspaz-12 aracılı apoptotik yollar üzerinde belirleyici olmadığı görülmüştür. Bu sebeple, interlökin-1 β dönüştürücü (converting) enzim alt ailesinin (subfamily) bir üyesi olan ve aktivite düzeyi büyük ölçüde ER ile ilgi parametrelerden etkilenen kaspaz-12'nin, A β aracılı apoptozu yönlendirdiği ortaya konmuştur [81]. Alzheimer hastalığı etiolojisinde, presenilin mutasyonları genetik unsurlardan biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Genç, erişkin veya yaşlı olup da mutant presenilin-1 (PS-1) üreten farelerde –ki, bu fareler, 3 haftalıktan 2 yaşın üzerinde olanlar olmak üzere değişik yaşlardadır– ER ile ilgili sinyal bozukluklarının olduğu ve PS-1 mutasyonunun farelerin sinir hücrelerinde Ca⁺² homeostazında sapmalara yol açtığı gösterilmiştir [9]. Bir transmembran proteini olan PS-1 proteinine ait gen mutasyonunun, Ca⁺² homeostazında bozulmalara sebep olduğu gibi A β üretimini arttırdığı da bilinmektedir [82].

Amiloid- β peptitlerin doğrudan Ca⁺² homeostazına etkileri de bulunmaktadır. Amiloid- β peptit oligomerleri, hücre zarına glikozil fosfatidilinozitol (GPI anchor) ile çengellenen ve A β peptit reseptörü olarak da işlev gören hücrel prion proteini (PrPC) ile birlikte, NMDAr gibi iyon kanallarından hücre içine doğru Ca⁺² girişini yol açmakta ya da A β peptit oligomerleri, doğrudan hücre zarında Ca⁺² akışını sağlayan kanallar oluşturmaktadırlar [83]. Bununla beraber, NFT oluşumu ile de Ca⁺² dishomeostazı arasında bir etkileşim ortaya konulmaktadır. Nörofibriler yumaklar bulunduran sinir hücre sitozollerinde, hem protein bağımlı hem de protein bağımsız Ca⁺² miktarının, NFT bulundurmayan sinir hücrelerine göre daha fazla olduğu görülmüştür [82]. Amiloid- β peptitler, Ca⁺² duyarlı reseptörlerle etkileşerek hücre içi IP₃ seviyesinin yükselmesine de sebep olabilirler. İnozitol trifosfat reseptörleri aktivasyonu ile ER'den hücre içine Ca⁺² iyonlarının salınması sağlanmaktadır. Amiloid- β peptit oligomerlerin etkisi sonucunda, aktive olan hücre içi IP₃-Ca⁺² sinyal yolları, aslında, sağlıklı bireylerde uyku-uyanıklık döngüsünün uyku süresince yavaşlar, bu şekilde uykuda yeni öğrenilen bilgilerin hafızaya kaydı süreci gerçekleşir. Bu bulguların irdelenmesiyle ve yeni katkılarla, Alzheimer'daki uyku-uyanıklık döngüsü ile ilgili şikâyetlerin ve en son öğrenilenlerden başlayarak zamanla daha eski öğrenilmiş bilgilerin de unutulmaya devam ettiği ilerleyici hafıza kaybının patogenezi açıklamak mümkün olabilir [84]. Amiloid- β peptitler ayrıca, sinir hücre zarındaki Ca⁺²-ATPaz'ın ve NCX'in fizyolojik işleyişi için elektrokimyasal bir gradyan sağlayan Na⁺-K⁺-ATPaz'ı inhibe ederek de dinlenme halindeki sinir hücresinde, hücre içi Ca⁺² yoğunluğunun artmasına sebep olurlar [85]. Sinir hücrelerinde Ca⁺²

tamponu olarak kabul edilen kalbindin–D28k'nin Alzheimer'da azaldığı bilinmektedir. A β peptit oligomerlerin, Ca⁺² homeostazına olan bu etkilerinin, Ca⁺² ile ilgili bütün yollarda değişikliklere sebep olacağı açıktır. Kısacası, hücre dışı ortamda birikmeye başlayan A β peptit oligomerleri, çeşitli mekanizmalar ile sinir hücresi içinde [Ca⁺²]'nın artmasına sebep olmaktadır ve böylece AH'de ortaya çıkan çoğu semptomlar doğrudan Ca⁺² homeostazı ile ilişkilendirilebilmektedir.

Hem nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisinde hem de yaşlanma sürecinin zemininde var olduğu görülen Ca⁺² homeostazı bozuklukları, karşımıza özellikle yaşlanma ve AH'yi açıklayan önemli hipotezlerden biri olan Ca⁺² hipotezini çıkarmaktadır. Bu durum, Ca⁺² sinyal yollarındaki herhangi bir aşamayı etkileyebilecek veya artan hücre içi [Ca⁺²]'da optimizasyon sağlayabilecek terapötik ajanların kullanılmasının, başta AH olmak üzere, nörodejeneratif hastalıklar açısından terapötik değerinin olabileceğini düşündürmektedir.

2.1.3. Risk unsurları

Alzheimer hastalığı ya da başka bir sebeple ortaya çıkan demans sendromu için ne gibi risk unsurlarının olduğunu tespit edebilmek önemlidir. Çünkü AH, klinik olarak hastada tipik bulgular ortaya çıkmadan yıllar öncesinde başlayan bir nörodejeneratif süreçtir. İşte tam da bu sebeple, AH'ye bakış açısı uzun yıllar sonunda, bu hastalığı yaşlılığın doğal bir sonucu ya da bir yaşlılık hastalığı olarak kabul eden görüşten, yaşam boyu risk teşkil eden pek çok faktörün birleşmesi sebebiyle beyinde biriken hasar sonucunda ve kişinin bilişsel rezerv kapasitesinin düzeyine göre, sıklıkla yaşlılık döneminde ortaya çıkan bir hastalık olduğunu kabul eden başka bir görüşe dönüşmüştür.

Risk unsurlarını ortadan kaldıracak ya da etkilerini hafifletecek tedbirlerin hayata geçirilmesinin demans insidans ve prevalansını azaltacağı öngörülmektedir. Ayrıca, bütün dünyada ortalama insan hayatının uzuyor olması da ileri yaşla birlikte insidans ve prevalanslarında artış görülen AH gibi nörodejeneratif hastalıkları gün geçtikçe daha büyük bir halk sağlığı sorununu dönüştürmektedir. Alzheimer hastalığının multifaktöryel bir etiolojiye sahip olduğu ve hastalığı geriletecek hatta ilerleyişini durduracak bir medikal tedaviden günümüzde yoksun olduğumuz düşünüldüğünde, hastalık için belirlenen risk unsurlarından kaçınmak ve bu risk unsurları hakkında toplumu

bilgilendirerek gerekli halk sağlığı çalışmalarını gerçekleştirmek, şu anda AH ile mücadele edebilmek için en makl seçenek olarak karşımıza çıkmaktadır.

Alzheimer hastalığının oluşumu için tetikleyici ya da risk unsuru olan pek çok genetik ve çevresel etmen bulunmaktadır. AH için en önemli risk unsurunun yaş olduğu görülmektedir. 40'lı ve 50'li yaşlarında erken başlangıçlı AH (Early-onset form of Alzheimer's Disease) tanısı alan bireyler olsa da hastaların büyük çoğunluğu (%95'ten fazlası) 65 yaş ve üstündeki bireylerdir. 65 yaşından sonra, AH'ye yakalanma olasılığı 85 yaşına kadar her beş yılda bir ikiye katlanarak artmaktadır. Alzheimer hastalığı kaynaklı demans prevalansı 60 ila 85 yaşları arasında 15 kat kadar artmaktadır [86]. Yaşlı nüfus oranının dünyada giderek artıyor olması ile demans insidans ve prevalansının da ileriki yıllarda yukarı yönlü bir seyir izlemesi doğal olarak beklenmektedir.

Çoğu prevalans çalışmasında kadınlar arasındaki prevalansın daha yüksek olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Nörotrofik faktör gibi de işlev görebilen strojen, MSS'de mitokondrileri Aβ peptitlerin oksidatif etkisine karşı koruyucu etki göstermekte ve ROS düzeyini düşürmektedir. Post-menopozal dönemde kadınlar, östrojenin bu koruyucu etkisinden mahrum kalmış olurlar. Nitekim; epidemiyoloji çalışmalarında, post-menopozal dönemlerinde östrojen replasman tedavisi alan kadınlar arasında daha düşük demans prevalansları ile yzleşilmektedir [87]. Bununla beraber, demansa yakalanma olasılığı açısından cinsiyette bir fark bulunmadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur [88].

Serebrovasküler hastalıklar, AH için en önemli risk faktörlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Aslında AH için öne sürülen vasküler risk unsurları, kardiyovasküler ya da serebrovasküler hastalıklar için belirlenmiş risk unsurlarını eksiksiz içerir. Serebrovasküler hastalıklar, zaman içinde demans benzeri klinik durumlara sebep olabilir. Serebrovasküler hastalıklar sebebi ile ileriki yıllarda vasküler demans görülebilir. Serebrovasküler hastalıklara, ileriki yıllarda sıklıkla AH'ye özgü bulgular da eşlik edebilir. Zaten, AH patogenezi de önemli vasküler bileşenler içermektedir. Bir inme öyküsünün, kişinin inme öncesindeki bilişsel işlev düzeyinden bağımsız olarak, ileriki yıllarda demans sendromuna yakalanma olasılığını ikiye katladığı ortaya konulmuştur. İnme sonrasında demans sendromuna yakalanan bireylerin büyük çoğunluğunda ya vasküler demans ya da AH teşhis edilmiştir [89].

Kişi, hayatının orta yaşlı yıllarını sürerken, bir veya birden çok kardiyovasküler risk unsuru ile birlikte yaşaması, ileriki yıllarda demans sendromuna yakalanma olasılığını yaş, ırk, cinsiyet ve eğitim düzeyinden bağımsız olarak arttırmaktadır. İleri yaşlarda, örneğin 60'lı yaşlardan sonra ortaya çıkan hipertansiyondan daha önemlisi; kişinin orta yaşlarda hayatını hipertansif olarak devam ettirip ettirmediğidir. Orta yaşlardaki hipertansiyon demans için bir risk faktörü olarak belirlenmiştir. Demans patolojisinin gelişmesiyle ileri yaşlarda kan basıncında bir düşme eğilimi ortaya çıkmaktadır. Orta yaşlarında, kişinin yüksek diastolik kan basıncı sergilemesi, ileriki yaşlarında azalmış plazma AB düzeyi ile artmış AH riskine sebep olmaktadır. Azalmış plazma AB düzeyinin artmış kortikal birikim sebebi ile ortaya çıktığı belirlenmiştir [90]. Hipertansiyon, yüksek kolesterol, diyabetes mellitus ve sigara gibi kardiyovasküler risk unsurlarının her biri kendi başına ileriki yaşlarda demans sendromuna yakalanma olasılığını %20 ila %40 düzeyinde arttırmaktadır [88]. Pekçok çalışmada, AH ile ilişkili bulunan başlıca vasküler risk unsurları; diyabetes mellitus, hipertansiyon, sigara, hiperkolestrolemi, aterosklerozis, yüksek fibrinojen konsantrasyonu, yüksek serum homosistein düzeyi, alkolizm ve atrial fibrilasyondur [1].

Alzheimer hastalığının kişinin bilişsel rezervi ile ilişkisi başlı başına bir hipotez oluşturmuştur. Bilindiği gibi, AH'ye ait belirti ve bulgular, patogenezi oluşturan beyin hasarı başladıktan yıllar sonra gözlenmekte, bu sebeple hastalığın ilerlediği ancak kişinin normal olduğu bir zaman dilimi ortaya çıkmış olmaktadır. Bu sebeple Alzheimer, kişinin hayatının önemli bir bölümünde, sinsi başlangıçlı ve kesintisiz devam eden bir patolojiye normal düzeyde eşlik eden bir bilişsel kapasitenin görüldüğü demans tipi olarak da tanımlanmaktadır. Bilişsel rezerv, hayat boyu maruz kalınan, AH için risk oluşturan bağlı olarak beyinde ortaya çıkan patolojiler karşısında, beynin bilişsel gerilemeyi engelleyecek nörofizyolojik stratejiler üretme ve bilişsel kapasite düzeyini destekleyecek yeni kaynaklar bulma yeteğidir. Doğal olarak bu yetenek kişiden kişiye değişiklik göstermektedir. Kişinin bilişsel rezerv düzeyi, doğuştan gelen özellikleriyle sedanter hayat tarzı ya da düzenli egzersiz arasındaki seçimi, beslenme alışkanlıkları, sosyal aktivite düzeyi, sigara–alkol tüketimi, yaşam tarzına bağlı olarak gelişen veya ortaya çıkan hipertansiyon, hiperlipidemi, diyabetes mellitus, akut koroner sendromlar ve inmeler gibi özellikle kardiyovasküler hastalıklar gibi pekçok unsura bağlı etkilerin yaşam boyu birikimiyle belirlenir [91]. Yüksek eğitim düzeyi de bilişsel rezervi güçlendirici bir faktördür. Eğitim düzeyinin yükseldikçe, Alzheimer hastalarının,

hastalığın ilk teşhisindeki mini-mental durum ölçeği (MMSE) puanları da yükselmektedir [92]. Nörofizyolojik olarak daha fazla nöronal işlerlik ve yetkinlik sağladığı ve bilişsel rezervi arttırarak Alzheimer patolojisinin klinik semptomlar ortaya çıkarabilmesi için gereken beyindeki hasar eşliğini yükselttiği görüşü sebebi ile düşük eğitim seviyesi AH'de bir diğer önemli risk faktörü olarak kabul edilmektedir.

Travmatik beyin hasarının (TBH) öyküsü olan kişilerde bütün demansların görülme, TBH öyküsü bulunmayanlara göre takipte 1.24 tehlike oranı (hazard ratio), spesifik olarak AH görülme oranı ise 1.16 tehlike oranıyla yüksek bulunmuştur [93]. Şiddetli bir kafa travması takiben, kişilerin üçte birinde A β birikimleri olduğu görülmüştür. Travmatik beyin hasarı sonrasında A β birikimleri bulunan kişilerde Apolipoprotein E (APO-E) ϵ 4 aleli sıklığı AH çalışmalarındakinden bile daha yüksekken, TBH sonrasında A β birikimi gözlenmeyenlerde bu sıklık Alzheimer hastalığı bulunmayan kontrol gruplarındaki düzeylerde dir. Böylece APO-E ϵ 4 alelinin, AH için bir risk unsuru olan TBH etkisini güçlendirdiği görülmektedir [94].

2.1.4. Genetik unsurlar

Apolipoprotein E ϵ 4 aleli taşıyıcılığı hem ateroskleroz için orta düzeyde hem de genel popülasyonda AH için bilinen en önemli genetik risk faktörüdür. Bu taşıyıcılık, AH oluşması için kesin olarak gerekli ya da tek başına yeterli bir durum olmasa da 19. kromozom üzerinde bir lokasyona sahip olan APO-E geni, geç başlangıçlı AH ile ilişkisi açısından en çok araştırılan gen dir. Apolipoprotein E, hücre kültürlerinde makrofajlardan kolesterolün çıkışını azaltarak köpük makrofajlar oluşmasına yol açmaktadır. Periferde karaciğer kaynaklı, beyinde ise astrositler tarafından üretilen APO-E, hücreden kolesterol çıkışını azaltıcı etkisi ile nöronlarda muhtemel bir A β üretimindeki artışı tetiklemektedir [44]. Kanda lipitleri taşıyıcı bir molekül olarak işlev gören APO-E insanlarda tip 2, tip 3 ve tip 4 şeklinde üç değişik tipte bulunmaktadır. APO-E proteini, trigliserit ve kolesterol metabolizmasında merkezî bir role sahiptir. Gendeki polimorfizm AH'ye yakalanma riskini ve beyinde biriken A β peptit miktarını etkilemektedir. Kafkas toplumlarında, APO-E ϵ 4 alelinin bir kopyasını taşıyanlarda geç başlangıçlı AH'ye yakalanma riskinin üç kat ve APO-E ϵ 4 alelini homozigot olarak bulunduranlarda sekiz arttığı görülmüştür. Öte yandan, APO-E ϵ 2 aleli taşıyanlarda, taşımayanlara göre AH açısından hem daha düşük bir risk hem de eğer AH gelişirse hastalık için daha geç bir başlangıç yaşı söz konusudur. APO-E polimorfizminin AH ile ilişkisi toplumdan topluma farklılıklar da

göstermektedir. Amiloid öncülü protein, PS-1 ve Presenilin-2 (PS-2) genindeki mutasyonların da erken başlangıçlı AH'ye sebep olduğu bilinmektedir. Bunların haricinde, dokuzuncu kromozom üzerindeki ubikuilin-1 geni, 10. kromozom üzerindeki kolesterol 25-hidroksilaz, insülin yıkıcı enzim (insulin degrading enzyme, IDE), alfa T katenin, kolin asetil transferaz, glutatyon S-transferaz ve ürokinaz plazminojen aktivatörü genleri ile 12. kromozom üzerindeki alfa-2 makroglobulin ve düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü ilişkili protein genleri, birbirinden farklı mekanizmalar aracılığıyla, AH ile muhtemel ilişkisi olan genler olarak görülmektedir [95]. Örneğin, IDE, A β peptitleri yıkan bir metalloproteinazdır. Bu enzimi kodlayan gende meydana gelen bir mutasyon, şüphesiz A β peptitlerin ortamdan temizlenmesini sekteye uğratabilir.

2.1.5. Demans benzeri tablolar

Unutkanlık ile ilgili her türlü belirti ve bulgu AH'ye veya demansa mı işaret eder? Unutulmamalıdır ki ileri yaşlarda unutkanlık sıklıkla karşılaşılan bir şikâyettir. İleri yaşlarında, hayatına devam eden bir insan, en çok kullandığı eşyalarını, örneğin kol saatini, nişan yüzüğünü, evinin anahtarlarını vb. nereye bıraktığını unutabilir, en yakınlarının bile bir anlığına ismini hatırlayamayabilir. Birkaç gün önce okuyup çok etkisinde kaldığı bir kitap hakkında bir arkadaşı ile konuşurken kitabın ismini bir türlü çıkaramayabilir, markete girdiğinde, markete ne almak için geldiğini unutabilir, yolda gördüğü yabancı birine, örneğin valilik binasını tarif ederken, o kişiye şehrin çok bilinen, biricik büyük binasını gördüğünde sağa dönmesi gerektiğini söyleyecekken o binanın ismini unuttuğunun farkına varabilir. Bu isimlerin, adlandırmaların dilinin ucunda olduğu hissini yaşayabilir ama ama bir türlü söyleyemez. Buna benzer durumlar zaman zaman orta yaşlı kişilerde de görülebilir. Yaş ilerledikçe bu tür durumlar sıklaşabilir ve daha da can sıkıcı, hatta kişi için ürkütücü bir hal alabilir. Çünkü kişiler, uzun yıllar içinde devam eden bu şikâyetlerle yüz yüze kaldıklarında, ister istemez kendilerinde demans ile ilişkili bozuklukların olup olmadığı konusunda düşünmeye başlarlar.

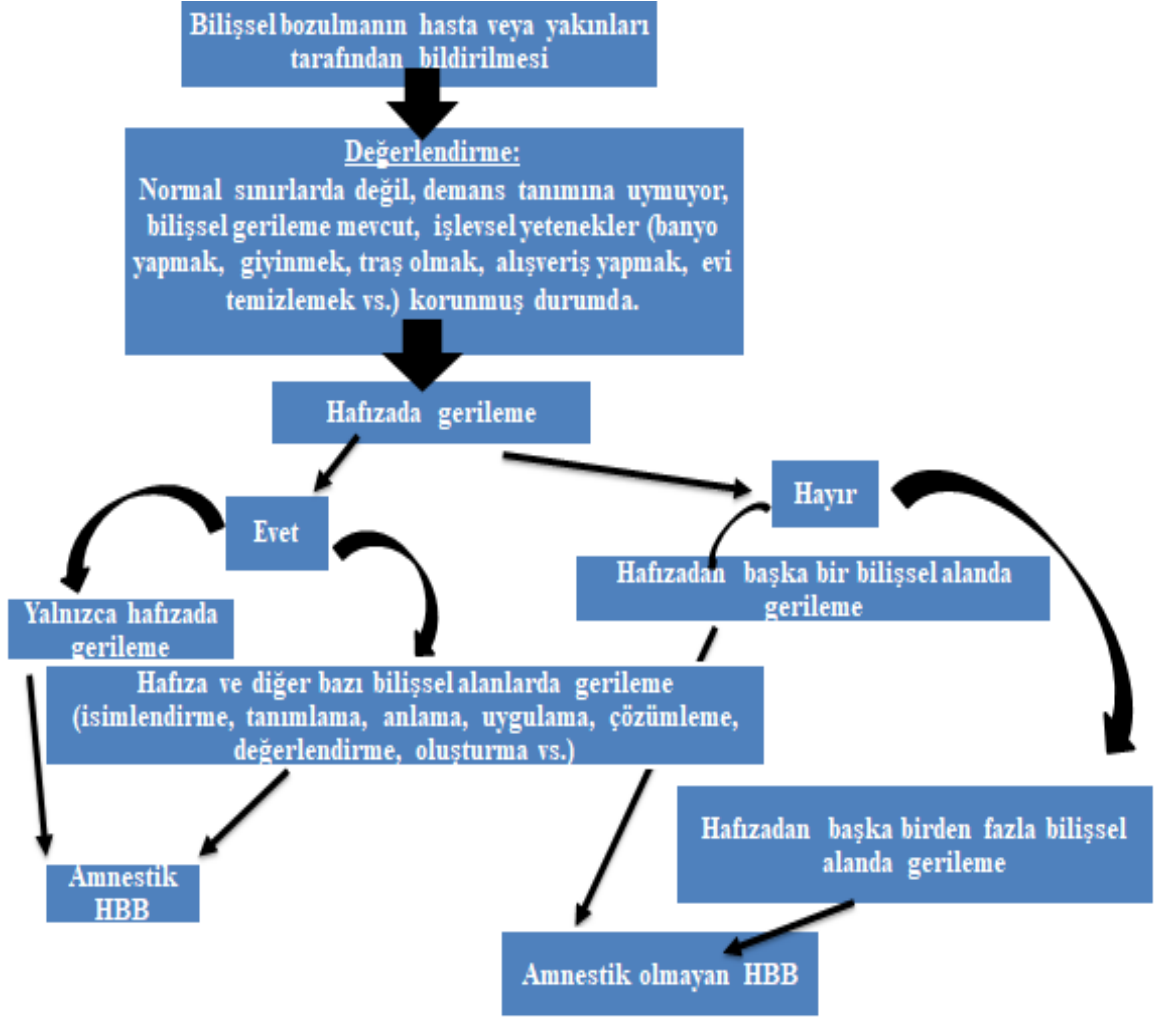
Yaşla beraber bilişsel işlevlerde bir gerilemenin gözlenmesi doğaldır. Ancak demansa atfedilecek belirtiler ile yaşa bağlı olarak ortaya çıkan değişiklikler arasında önemli farklılıklar bulunmaktadır. Yaşla bağlı olarak ortaya çıkan hafıza ve bilişteki gerilemeler kişinin günlük performansını çok az etkilerken yapmak istediklerine engel olmaz. Ancak demansta, dil, hafıza, problem çözme, soyut düşünce, sözel kavrama, muhakeme gibi

entellektüel yetilerden en az ikisinde günlük yaşamı etkileyecek şekilde bir bozulma bulunur [96]. Yukarıda verilen unutkanlık örnekleri ya da hafıza başta olmak üzere entellektüel yetilerle ilgili bozulmalar, kişinin günlük hayatını, iş hayatını, ailesi ve arkadaşları ile ilişkilerini etkiler. Bilişteki bu gerilemeler kişinin, eğlenmek için hayatında yer verdiği kişisel uğraşlarını veya sosyal etkinliklerini devam ettirmekte zorlanmasına sebep olabilir, hatta bu gerilmeler ileri düzeylerde ise kendisini mesleğini ve mesaisini takip edemez hale getirebilir. Bu durum kişinin kendisinin veya bir yakınının dikkatini çekiyorsa, demans açısından sorgulanması için bir sağlık kuruluşuna başvurulmalıdır. Bir sağlık kuruluşuna başvurulmasını gerektirecek bu hal, aslında objektif değerlendirmenin sonucunda değil, kişinin kendi kendine ya da akraba ve yakınları ile karşılaştırarak atacağı bir adımdır. Kişi demans tanısı aldığı anda, erken tanı ve müdahale ileriki yıllardaki hayatını kolaylaştırır. Nörodejeneratif bir hastalığın başlangıcı –erken evresi– olarak ortaya çıkan hafıza ile ilgili yetilerde gerileme durumu ile yaşa bağlı olarak gözlemlenen hafızadaki zayıflamayı ayırt etmek çok güçtür. Epizodik (benlik hafızası) ile ilgili gerilemeler sağlıklı yaşlılarda da tespit edilebilmektedir [97]. Oysaki, epizodik hafıza ile ilgili bulgular aynı zamanda AH'nin ilk belirti ve bulgularını oluşturmaktadır.

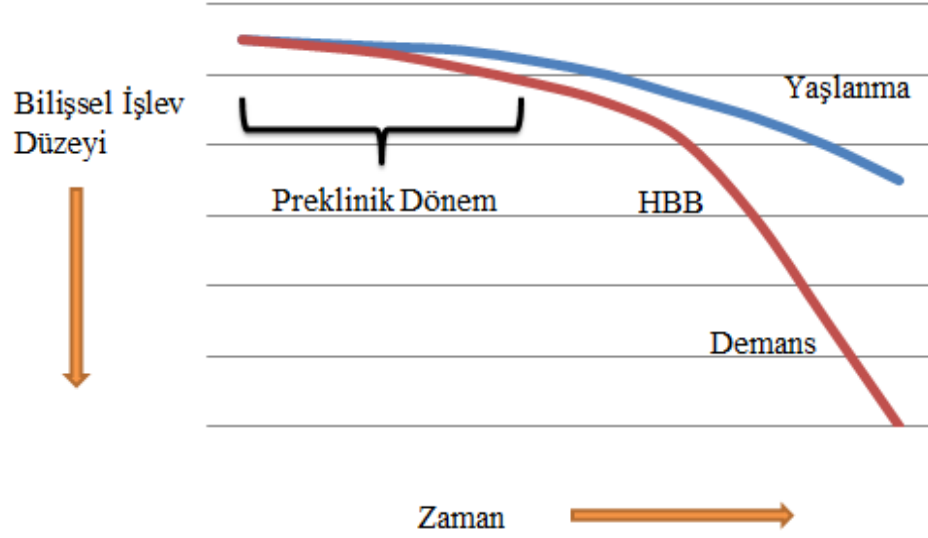
Demansta ya da AH'de görülen bilişsel gerileme zamana yayılmış şekilde oldukça yavaş seyirli ve sinsidir. İleri evredeki bir Alzheimer hastasının, yaşlılıkla ilgili hafızada gerileme hali bulunan bir kişiden ayırılması oldukça kolaydır. Ancak, erken evre AH ile yaşa bağlı bilişsel yavaşlamaya ait bulgu ve belirtiler kolaylıkla birbirleri ile örtüşebilir. Demanstan ayrı bir klinik içerik olan yaşlılıkla ilgili unutkanlığın (age associated memory impairment–MI) tanınması gerekir. Yaşlılıkla ilgili unutkanlık tanısı, 50 veya üstü yaşlarında olan, kendilerinde daha genç yaşlarında sahip oldukları hafıza yetilerine göre bir gerileme hisseden, depresyonda olmayan, demans sendromu tanı kriterlerine uymayan, genç erişkinler için hafıza testinde ortalamanın en az bir standart sapma kadar altında bir performans sergileyen ve şu anda hafıza ile ilgili olarak hissettikleri zayıflamaya katkı sunacak ya da zemin hazırlayacak bir ek medikal veya psikiyatrik hastalığı bulunmayan kişilere konulur [98]. Unutkanlık şikâyetleri olan kişi değerlendirildikten sonra, şikâyetlerinin yaşlılıkla ilgili bilişsel bir gerilemeye bağlı olarak meydana geldiğinin anlaşılması, onun hayatı boyunca demansa yakalanmayacağı anlamına gelmemektedir. Yaşlılıkla ilgili unutkanlık kavramı ile açıklanabilen durumda olan kişilerden de hayatlarının ileriki yıllarında demans sendromuna yakalananlar olmaktadır. [87]. Bunun yanında, son yıllarda oldukça sık kullanılan bir HBB'dir. Hafif

bilişsel bozukluk, AH hastalığı açısından da son derece önemli bir tanımlamadır. Hafif bilişsel bozuklukta da kişinin kendisinin ya da yakınlarının fark ettiği biliş ile ilgili değişiklikler meydana gelir ancak bu değişiklikler kişinin günlük hayatını olumsuz etkileyecek ya da bir birey olarak hayatını yardım görmeye ihtiyaç duymaksızın bağımsız bir biçimde devam ettirmesini engelleyecek düzeyde değildir. Hafif bilişsel bozukluk, kişiyi, AAMI ile demansın erken evresi arasında bir yerde bulunduğunu gösterdiği kabul edildiği için ayrıca önemli bir tanımlamadır. Demans sendromundan ayrı tutulan bu tanımlamalarda kişinin eskiye nazaran bilişsel işlev ve yetilerinde bir gerileme vardır. Ancak, bulgu ve belirtilerin demans olarak tanımlanabilmesi için bilişsel gerilemenin yanında kişinin günlük yaşamını kendi başına ve bağımsızca bir ölçüde yürütemiyor olması gerekir. Hem AAMI hem de HBB tanısı alan kişilerin durumu zaman içinde tam bir demans sendromuna dönüşebileceği gibi, zamanla biliş ve hafızada bir düzelme de gözlemlenebilir (Şekil 2.2.). Hafif bilişsel bozukluğun önemi, normal yaşlanma süreci içinde bir kişiye göre, HBB tanısı almış bir kişinin durumunun demans sendromuna dönüşme olasılığının daha yüksek olmasından kaynaklanmaktadır (Şekil 2.3.). Amerikan toplumunda, yıllık demans sendromu insidansı %1–2 iken, HBB tanısı almışlar arasında yıllık insidans %5 ila %10 arasındadır [99]. Amnestik hafif bilişsel bozukluk, HBB'nin sıklıkla AH'na ilerlediği düşünülen türüdür (Şekil 2.2.). Amnestik hafif bilişsel bozuklukta, amaca yönelik davranışın gerçekleştirilmesi, dikkat, planlama gibi yürütücü işlevler, dilin kullanımı, görsel–uzaysal yetenekler korunmuş olarak görülür. Ancak eskiye nazaran artmış unutkanlık hali dikkati çeker. Amnestik olmayan HBB'de ise unutkanlık sorununa rastlanmaz, başka bilişsel yetiler ile ilgili sorunlar söz konusudur. Klinik çalışmalarda, Amnestik tip HBB'nin, %90'lara varan düzeylerde AH tipi demansa dönüştüğüne dair bulgulara ulaşılmıştır [100] (Şekil 2.2.). Bu durum, AH ile ilgili patolojinin, AH'nin sebep olduğu bilişsel bozulmalar teşhis edilebilir şekilde ortaya çıkmadan çok önceleri başladığı görüşünü desteklemektedir. Günümüzde ise AH için medikal tedavi, hastalık patogenezi başladıktan ve ancak bilişsel bozulma klinikte teşhis edilebilir hale geldikten sonra başlamaktadır.

Bu sebeple, hastalığın patogenezi en erken seviyelerde aydınlatacak çalışmalara ve daha etkili ve spesifik, hastalığın prodromal dönemini hedef alacak terapötik farmakolojik ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır.



Şekil 2.2. Amnestik ve amnestik olmayan hafif bilişsel bozulmanın tanısal algoritması. HBB; hafif bilişsel bozukluk. Kaynak [99]'ten uyarlanmıştır. Hafızada gerileme şikâyeti titizlikle değerlendirilmelidir.



Şekil 2.3. Yaşa, genetiğe ve çevreye bağlı etkenler, serebrovasküler ve kardiyovasküler risk etkenleri ve bunlara bağlı olarak yıllarca devam eden beyinde A β peptit birikimi, NFT oluşumu, glial aktivasyon, sinaptik disfonksiyon ve sinaps ve nöron kaybı neticesinde, kişinin bilişsel rezerv gücüne de bağlı olarak demans ortaya çıkmaktadır. Risk etkenlerinden kaçınmış bir kişi, bilişsel rezervi de yeterli ise normal bir yaşlanma ya da normal bir yaşlanma ile uyumlu olarak bilişsel yetilerinde gerileme gösterir (HBB: Hafif Bilişsel Bozukluk) [101].

2.1.6. Patolojik süreç

2.1.6.1. Makroskopik değişiklikler

Alzheimer hastalığının kesin tanısı için henüz bir biyolojik belirtece sahip olunmadığından dolayı, hastalığın kesin tanı kriterleri bütünüyle postmortem otopsi çalışmalarından elde edilmiş verilere dayanmaktadır. Otopsi çalışmalarında, Alzheimer hastalarının beyinde makroskopik olarak kortikal bir atrofinin ve frontal, temporal ve parietal loblarda serebral oluklarda genişlemenin meydana geldiği görülmüştür. Bu makroskopik kortikal atrofi, Alzheimer hastalarında tipik olarak primer motor, duyu ve görme alanlarını içermez. Bütün bunlara rağmen, özellikle ileri yaştaki yaşlılarda yapılan otopsi serilerinde, Alzheimer hastası olan ve sağlıklı bireyler arasında, beyin atrofi ve

kortikal tabakada incelme bulgularının birbirine benzer ölçüde bulunduğu gözlenmiştir [102]. Bu sebeple, sadece beyinde atrofi bulguları Alzheimer hastalarında makroskopik olarak görülebilen ve dikkat çekici bir ayırddedici özellik olmasına rağmen, tek başına Alzheimer tanısı için yeterli görülemez.

Alzheimer hastalarında beyin dokusunun kaybına, lateral ventriküllerdeki görece makroskopik bir büyüme (hydrocephalus ex vacuo) eşlik eder. Ancak, bu durum da ileri yaştaki sağlıklı yaşlılar ile Alzheimer tanısı almış olanlar arasında kesin bir ayrım yapılabilmesini sağlamaz. Yine de hipokampal atrofi ile beraber özellikle lateral ventriküllerin temporal boynuzlarında bir genişlemenin tespit edilmesi, bir nöropatoloğa Alzheimer'ın mikroskobik kanıtlarına da erişme olasılığının yüksek olduğunun işaretini sunan en önemli makroskopik bulgudur [103].

2.1.6.2. Nörodejenerasyon

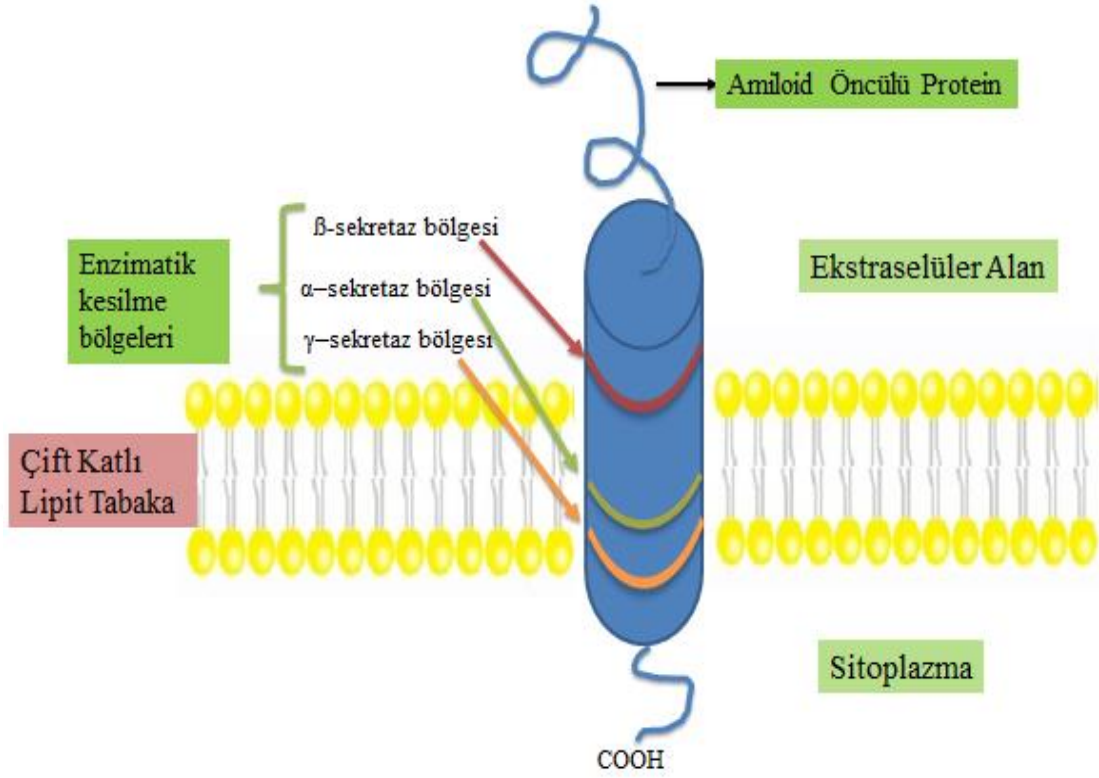
2.1.6.2.1. Amiloid öncülü proteinin işlenmesi

Beyin atrofisinin yanısıra bölgesel sinir hücreleri ve sinaptik bağlantıların kaybı, A β peptit bulunduran SP ve NFT, AH'nin birincil derecede patolojik karakteristikleridir. Alzheimer hastalığında, amiloid proteini içeren plak oluşumu hastadan hastaya değişen miktarlarda serebrovasküler damar çepçerlerinde de karakteristik olarak görülür [104].

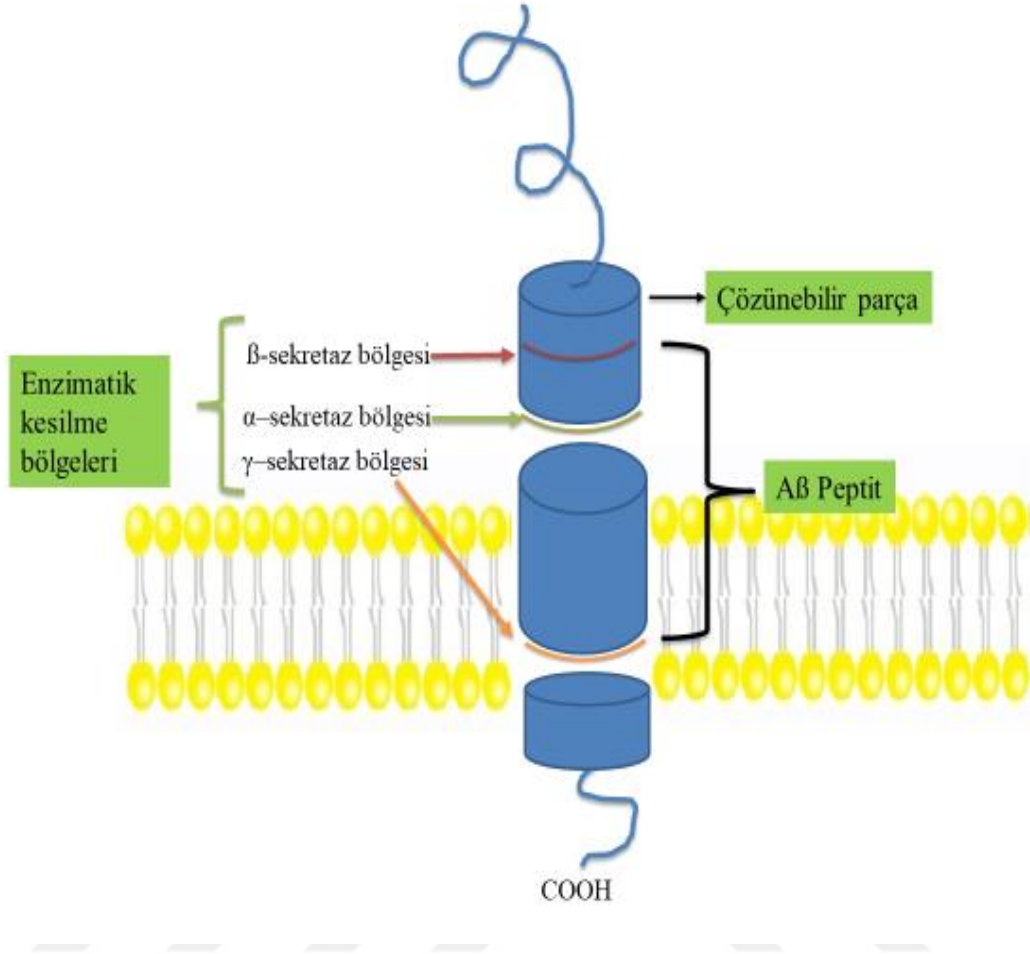
Senil plaklardan izole edilen söz konusu A β peptit, 39 ila 43 aminoasit (aa) arasında değişen uzunluklarda görülen bir oligopeptittir, çoğunlukla en sık görülen izoformları olan 40 veya 42 aa'lık bir uzunlukta (A β -40, A β -42), APP'nin [56] enzimatik olarak yıkılmasıyla meydana gelir (Şekil 2.4.). Amiloid öncülü protein, tek bir transmembran bölüm (domain) içeren, reseptör olarak da işlev görebilen ve hem sinir dokusunda hem de diğer dokularda bulunan bir hücre yüzeyi proteindir. Amiloid öncülü protein geni, 21. kromozomun uzun kolunda bulunup, mutasyonları otozomal dominant erken başlangıçlı AH ile ilişkili bulunmuştur. A β bölgesi, hücre dışı kısımdan transmembran bölüme doğru uzanır. A β proteini hayat boyu çözünebilir formunda salınır ve MSS'de yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Amiloid öncülü proteinin işlenmesi önce ekstrasellüler, sonra da transmembran kısımlarının enzimatik kesilmesi ile gerçekleşir (Şekil 2.4.). Bu işlenme, ilk enzimatik etkiyi gerçekleştiren enzime göre iki farklı yolla olabilir. Eğer ilk kesilme, α -sekretaz enzimi aracılığıyla APP'nin hücre dışı kısmındaki A β bölgesi içinden gerçekleşirse; APP amiloidojenik olmayan (Şekil 2.5.) yol ile işlenmiş olur (non-

amyloidogenic pathway). Amiloid öncülü protein β -sekretaz'dan daha çok α -sekretaz enziminin etkisine maruz kalır. Bu kesilmeden sonra çözünebilir sAPP α peptit fragmanı ortaya çıkar ve hücre zarında 83 aa kalıntılı olan, ikinci olarak γ -sekretaz enziminin etki edeceği C83 oluşur. γ -sekretaz etkisinden sonra da APP hücre içi kısım (AICD) meydana gelir. Bu kısım, muhtemelen transkripsiyonel sinyal yollarında işlev görmektedir. Çözünebilir sAPP α 'nın izoformları serin proteaz inhibitörleri gibi işlev gören bir Kunitz proteaz inhibitörü bölgesi içerir ve ekstraselüler olarak koagülasyon kaskadının inhibisyonunda görev alır [105]. Eğer ilk kesilme, β -sekretaz enzimi (Şekil 2.6.) ile proteinin N terminal tarafına daha yakın bir noktadan olursa; bu da proteinin amiloidojenik yol ile işlenmesine sebep olur (amyloidogenic pathway) [106, 107]. β -sekretaz enzimi etkisi ile kesilen proteinin karboksi terminali tarafında kalan kısmı C99 olarak isimlendirilen kısımdır. Protein, α -sekretaz veya β -sekretaz enzimlerinin etkisi ile kesildikten sonra, C terminal tarafına daha yakın bir noktadan, yapısında PS-1 ve PS-2 proteinlerini de barındıran γ -sekretaz enzim kompleksi tarafından kesilir [108].

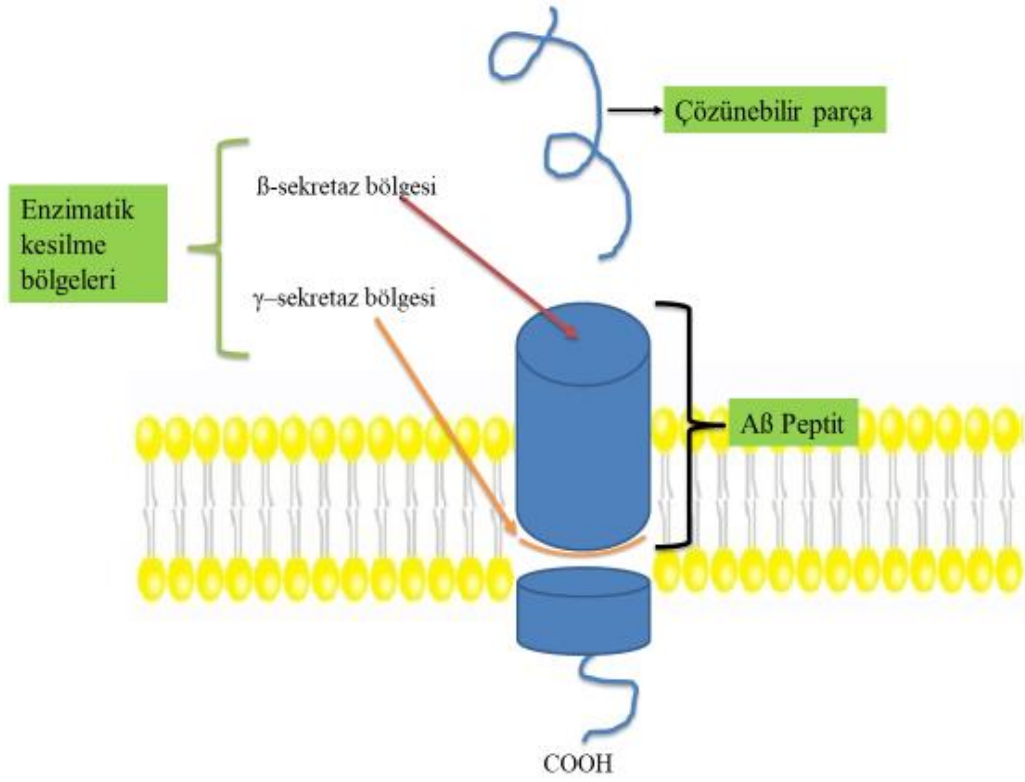
Amiloid- β proteini (Şekil 2.4.) aslında intrasellüler bir proteindir. Alzheimer hastalığının patolojik seyri içinde, intrasellüler birikimleri görülen tau proteinleri gibi, normal olmayan şekilde, çözünmeyen fibriler yapılar oluşturmaya başlarlar.



Şekil 2.4. Bir transmembran zar proteini olan APP'nin hücre zarında konumlanması ve β -sekretaz, α -sekretaz ve γ -sekretaz enzimlerinin, hücre zarının çift katlı lipit zarı içinde konumlanmış APP üzerinde etki ettikleri bölgelerin temsili gösterimi. β -sekretaz ve α -sekretaz enzimi etki bölgesi γ -sekretaz enziminin etki bölgesine göre proteinin N terminali tarafında bulunmaktadır. Protein önce β -sekretaz ya da α -sekretaz etkisine, sonra da γ -sekretaz etkisine maruz kalır.



Şekil 2.5. α -sekretaz ve γ -sekretaz enzimlerinin etkisi ile gerçekleşen, APP'nin amiloidojenik olmayan yol ile işlenme yolağının temsili gösterimi. Bu yolakta, α -sekretaz, APP'yi, A β peptit dizisinin bulunduğu bölgenin içinden keser. Dolayısıyla, bu yolakta, A β peptite ait aminoasit dizisinin devamlılığı bozulmuş olur. Bu sebeple, bu yolakta, α -sekretazın etkisinden sonra, A β peptit oluşma şansı kalmamıştır. α -sekretaz etkisinden sonra, proteinin N terminalinde bir çözünebilir polipeptit kısım olan sAPP α meydana gelir. A β peptit dizisinin bir kısmı bu çözünebilir parça içinde kalmıştır.



Şekil 2.6. $A\beta_{1-40}$ ve $A\beta_{1-42}$ üretimi için APP'nin N terminali tarafında β -sekretaz, daha sonra C terminali tarafında γ -sekretaz etkinlik göstermelidir. Özellikle β -sekretaz, enzimi etkinliğinin ve etki bölgesinin hedef alınması, $A\beta$ peptit üretimini azaltacağı düşünüldüğü için, AH tedavisinde olası terapötik müdahale alanlarından biridir [108].

2.1.6.2.2. Nörofibriller yumaklar

Nörofibriller yumaklar, ilk olarak Alois Alzheimer tarafından piramidal nöronların perikaryal sitoplazmaları içinde fibröz inklüzyonlar olarak tanımlanmışlardır [109]. Bu yumak görünümlü intraselüler birikimler, mikrotübül assosiyasyon protein Tau'nun hiperfosforile varyantının kümeleşmesi ile oluşmaktadır. Yapılan çalışmalar, NFT Alzheimer hastalarındaki yaygınlığının ve her bir yumağın yoğunluğunun, hastalığın şiddeti ve süresi ile arttığını göstermektedir.

Alzheimer hastalığının karakteristik patolojik bulgularından biri de NFT'dir. Nörofibriller yumaklar, hiperfosforile tau (tubulin associated unit) proteininin oluşturduğu ikili helikal yapıdaki filamanların nöron içinde oluşturduğu inklüzyonlardır. Akson ve dendritlerde, bu inklüzyonlara, nöropil iplikçikler (neuropile threads, NTs) denir. Tau proteininin, mikrotübül bağımlı aksonal transportta önemli bir rolünün olduğu

düşünülmektedir. Tau proteininin hiperfosforilasyonu, hücre içinde tau proteini birikimlerine sebep olduğu gibi tau proteininin mikrotübüllere bağlanma yeteğini de azaltmakta ve hücre iskeletinin yapısını bozmaktadır [110].

Tau proteini ile ilgili bütün genetik mutasyonların dominant olduğu görülmüştür. Bu durum mutasyonların tau proteinine toksik bir işlev kazandırdığını düşündürmektedir. Tau proteini çökeltileri, ailesel olarak mikrotübül assosiyasyon protein tau (MAPT) gen mutasyonlarının görüldüğü frontotemporal demansta olduğu gibi A β patolojisi olmaksızın da ortaya çıkabilirler. Ancak, AH'de, tau patolojisinin A β tarafından tetiklendiğine dair kanıtlar, frontotemporal demans (FTD) mutant P301L tau transjenik farelerde, intraserebral A β enjeksiyonunu takiben, tau proteini hiperfosforilasyonunun ve NFT oluşumunun arttığının gözlemlendiği çalışmalara dayanmaktadır. A β fibillerin, P301L tau transjenik farelere enjeksiyonu sonrası, farelerde NFT oluşumunun gözlenmesi, AH'de, amiloid beta oluşumunun, NFT oluşumuna öncülük ettiğini ve hem ekstrasellüler amiloid beta'nın NFT oluşumunu tetiklediğini hem de NFT için gerekli olduğunu düşündürmektedir [111]. Başka bir çalışmada ise, 3 aylık P301S transjenik farelerde, mikroglial aktivasyonun ve sinaptik bozulmanın, NFT oluşumuna sebep olduğu görülmüştür. FK506 (takrolimus) ile immün supresyon sonrası, mikroglial aktivasyonun baskılanması ile tau patolojisinin ilerleyişini zayıfladığı ve tau agregasyonunun azaldığı görülmüştür. Transjenik farelere, toll-like reseptör 4 (TLR4) ligandı olan lipopolisakkarid uygulanması ile, MSS'de meydana gelen enflamasyonu takiben, APP'nin işlenmesinin etkilenmemesine rağmen, siklin bağımlı kinaz-5 (cdk5) aracılığı ile tau hiperfosforilasyonunun arttığı gözlenmiştir. Ayrıca, cdk5'in selektif ve güçlü bir inhibitörü olan roskovitinin, hipokampusta lipopolisakkarit ile uyarılmış tau hiperfosforilasyonunu engellediği görülmüştür [112, 113].

Alzheimer hastalığı patogenezinde, enflamasyonun önemli bir yeri olduğu düşünülmektedir. Alzheimer Hastalığı'nda; plazmada, beyin dokusunda ve BOS'ta, IL-1, IL-6 ve TNF- α gibi bazı proenflamatuvar sitokinlerin seviyesi artarken, anti-enflamatuvar sitokinlerin seviyesi azalmaktadır. Alzheimer'da gözlenen enflamasyonda, IL-1 sinyal yolağının merkezî bir rolünün olduğu düşünülmektedir. Buna göre; IL-1 β sinyal yolağının inhibisyonu, cdk/p25, GSK-3 β ve p38-MAPK gibi bazı tau kinazların aktivitesini azaltmaktadır. Böylece IL-1 β inhibisyonunun, fosforile tau seviyelerinin

azalmasına sebep olduğu gösterilmiş ve AH için terapötik etkinliğinin olup olamayacağı konusu gündeme gelmiştir.

2.1.7. Tedavi

Günümüzde Alzheimer tedavisi, gelenekselleşmiş olan ve ancak sadece bulguların niteliğinde bir düzelmeye yol açabildiği bilinen farmakolojik tedavinin yanı sıra hastalık seyrinde olumlu etki olacağı umulan yaklaşımlardan oluşmaktadır. Alzheimer'ın patolojik seyrini durduracak, nöron kaybını kesin olarak önleyecek bir tedavi yaklaşımı ise henüz bulunmamaktadır.

Alzheimer'a özgül farmakolojik tedaviye ait ilaçların en başında, beyinde azalan ACh miktarını arttırmak amacı ile kullanılan, özellikle hafif veya orta şiddetli Alzheimer'da etkinliği gösterilmiş asetilkolinesteraz inhibitörleri (KE-İ, ChE-I) gelmektedir. Bu ilaçlar, sinaptik aralıkta, asetilkolinesteraz ve daha az oranda işlev gören bütirikolinesteraz enzimlerini inhibe ederler. Böylece, ACh'nin sinaptik aralıkta kalış ve etki süresi uzamış olur. Bu grupta kullanılan ilaçlar; diğerlerine göre periferik asetilkolinesteraz inhibe edici etkinliği oldukça zayıf olan ve oldukça iyi tolere edilebilen donepezil (5-10 mg, ARICEPT), rivastigmin (3-12 mg, EXCELON) ve galantamindir (4-24 mg, RAZADYNE). Bu ilaçların her üçünün de Alzheimer'ın klinik semptomları üzerinde, randomize kontrollü çalışmalarda etkinliklerinin görülmüş olmasına rağmen, hastalarda, Alzheimer patolojisi yine de yavaşça ilerlemekte ve beynin farklı yerlerine yayılmaya devam etmektedir. Takrin (COGNEX), kullanan hastaların yaklaşık üçte birinde karın bölgesinde kramplar, bulantı–kusma, ishal gibi yan etkilerin, yaklaşık yarısında da serum transaminazlarında yükselme görülmesinden ötürü yaygın şekilde tercih edilmeyen bir kolinesteraz inhibitörüdür. Ayrıca, takrin ile gözlenen hepatotoksik yan etki, donepezil, rivastigmin ve galantamin ile ortaya çıkmamaktadır. İkinci sınıf ilaç, voltaja bağımlı, yarışmalı etkinliği olmayan selektif ve orta derecede afiniteli glutamat NMDAR antagonisti memantindir. Orta şiddette veya şiddetli Alzheimer'da, memantin, klinik bozulmayı yavaşlattığı ortaya konulmuştur. Tek başına donepezilin, bulguların niteliğinde düzelmeye sağlayamadığı, ilerlemiş Alzheimer'da, donepezil+memantin birleşik tedavisi kullanılmaktadır [114].

E vitamini gibi antioksidan ajanlar da hastalık seyrinde olumlu bir etki yapacağı umulan moleküllerden olmakla birlikte yapılan çalışmalar birbirinden farklı sonuçlar ortaya çıkartmıştır. Hafif veya orta şiddette Alzheimer hastası olan 613 kişide yapılan çalışmada, 4 yıl boyunca günde 2000 IU E vitamini alan bireylerin, takiplerinde, plasebo alan gruba göre, bilişsel bir düzelme gözlenmiş ve hasta bakıcı rolünü üstlenenlerin hastalarla ilgili yükünün ve sorumluluklarının hafiflediği ortaya konulmuştur. Ancak, yalnızca memantin ve memantin ile α -tokoferol kullanan gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir [115]. Bir başka çalışmada, E vitamininin hastalığı ortaya çıkışını engellemediği, bilişsel düzelme sağlayamadığı ancak demansa ait bilişsel bulguların ilerleyişini yavaşlattığı görülmüştür [116].

Klinik öncesi çalışmalarda, östrojenin serebral kan akımını iyileştirdiği, kolinerjik nöronların atrofisini önlediği, oksidatif stresi azalttığı ve sinir dokusunda büyüme faktörleri üzerinde düzenleyici etkiye sahip olduğu ortaya konulmuştur. Ancak, Alzheimer'da, östrojen replasman tedavisinin (ÖRT) yararlı olduğu yönünde herhangi bir bulguya ulaşılamamıştır.

Statinler ve anti-enflamatuvar ilaçlar ile yapılan klinik öncesi çalışmalarda, bu ilaçların tedavi edici değerinin olabileceğini ortaya koyan bulgular olsa da klinik çalışmalarda söz konusu bulguları yeteri kadar destekler nitelikte değildir.

2.2. Hafıza

Hafıza, kişinin sürekli yeniden düzenleyip şekillendirdiği, MSS'nin sadece bir bölgesine lokalize olmayan nörofizyolojik bir yapılanma sürecidir. Zaman zaman bir bilgisayarın bilgi işletim sistemine benzer. Hafızayı bir bilgisayarın işletim sistemine benzetecek olursak; bu modelleme içinde hafızayı oluşturan, birbiri ile eşgüdüm halinde işleyen bazı ana sistemler ve çok sayıda farklı alt sistem bulunduğunu belirtmemiz gerekir. Bu modellemedeki ana sistemlerin ve farklı alt sistemlerin karşılığı olarak, beyinde hafıza ile ilgili makroskopik açıdan yalnızca bir bölüm ya da bir nöroanatomik ağ bulunmaz, bunun yerine bu belirli alt sistemlerin bazılarını içeren hafıza ile ilgili birden çok bölge ve farklı farklı nöroanatomik ağlar mevcut bulunmaktadır.

Hafıza dediğimiz bu bilgi işletim sistemini iki ana hafıza sistemi oluşturur. Bunlar; gerçekler, olaylar, kişiler, mekânlar ve nesnelere için deklaratif hafıza (bildirimsel hafıza, declarative memory–explicit memory ve algılar, motor yetenekler için non deklaratif

hafıza (refleksif hafıza, non-declarative memory-implicit memory) olarak adlandırılır. Dekleratif hafıza işlevlerinin yürütüldüğü beyin bölgeleri, frontal loblar, medial temporal loblar ve hipokampusdur. Alzheimer hastalarında veya bilateral medial temporal lob lezyonlarında olduğu gibi hipokampusun hasarlandığı durumlarda uzun süreli deklaratif hafıza (long-term declarative memory) zarar görür. Bu kişiler dün gördükleri, konuştukları birini bugün hatırlayamazlar. Hipokampus, uzun süreli epizodik hafıza (long term episodic memory) ve uzaysal hafızanın (spatial memory) olduğu yerdir [117].

Dekleratif hafıza ile ilgili yetilerin, yaşla beraber bir miktar gerilemesi doğaldır. Eski bir arkadaşımızın adını hatırladığımızda, bakkaldan alacaklarımızı sırasıyla aklımıza getirdiğimizde, sınava girdiğimizde ihtiyaç duyduğumuz bilgileri hatırladığımızda, bir telefon numarasını öğrenip kısa bir süre için ezberlemede ya da banka kartımızın şifresini hatırladığımızda deklaratif hafıza ile ilgili nöroanatomik ağlar işlev görmüş olurlar.

Dekleratif hafıza da epizodik hafıza/benlik hafızası (episodic memory) ya da olaylar hafızası ve semantik hafıza (semantic memory) ya da anlamsal hafıza/gerçekler hafızası olarak iki başlıkta sınıflandırılabilir. Kişinin “Ben iki gün önce bahar şenliklerinde idim.” gibi bir bildirim epizodik hafızanın tezahürüdür. Yani bu hafıza kişinin yaşamına ait özgün olayları ya da zaman dilimlerini uzun süreli olarak saklayan ve bilinçli bir şekilde oluşmuş olan hafızadır. Daha başka örnekler şu şekilde sıralanabilir; geçen ay seyrettiğiniz bir filme ait konu içeriği, birkaç hafta önce katıldığınız yakın bir arkadaşınızın düğününe ait bazı anılar, dün akşam yediğiniz yemek vs. Epizodik hafıza ile ilgili bozukluklara ait belirtiler, AH’de de ilk görülen bilişsel bozulmalardandır [118]. Alzheimer hastalarında, FTD hastalarına göre epizodik hafıza ile ilgili test sonuçları (recall memory test) anlamlı şekilde düşük bulunmuştur [119]. Epizodik hafıza ile ilgili bozukluklar, AH için ayırt edicidir. Öte yandan “Hipokampusun hafıza ile ilgili görevleri vardır.” gibi bir bildirim, kelime hazinemiz, 2x2’nin dört ettiği veya Ankara’nın ülkemizin başkenti olması gibi bir bilgi ise semantik hafıza ile ilgilidir. Semantik hafıza genel geçer bilgileri saklamamızı sağlar.

Non deklaratif hafıza bir diğer ana sistemdir. Yaşla birlikte, non deklaratif hafızada bir bozulma beklenmez. Bu hafıza, bilinç ve farkındalık olmaksızın, gayret ve niyet edilmesi gerekmeksizin anlık olarak algılarımızı ve davranışlarımızı etkiler. Yani bu hafızada, deklaratif hafızadaki gibi bilinçli bir şekilde hatırlamak, tanımak, bilmek, söylemek söz konusu değildir. Kortikal alanlar, serebellum ve bazal gangliyonlar bu hafızanın olduğu

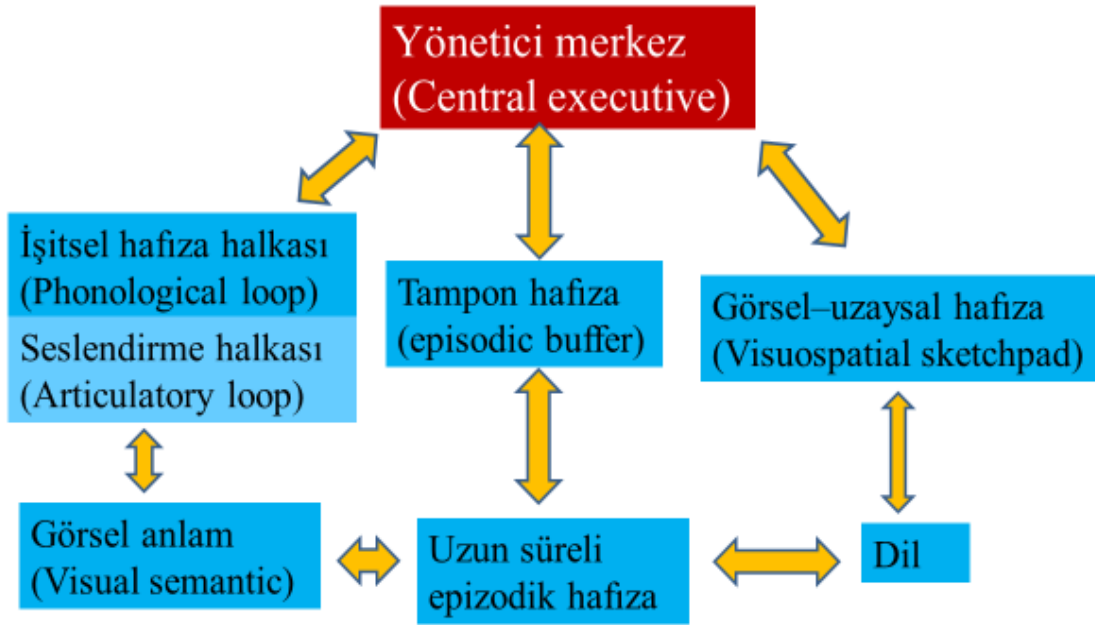
yerlerdir. Non deklaratif hafızanın alt sistemlerinden biri, hazır hale getirme (priming) işlemidir. Bu, bilinçsiz bir şekilde geçmiş bir tecrübeye dayanarak, halihazırda verilecek yeni cevabın hızını ve etkinliğini en uygun hale getiren hafızadır. Örneğin, birkaç dk önce bir dizi kelimenin sessiz harflerini yazmanız istendiyse ve bu kelimelerden biri “zorunlu” kelimesi ise, birkaç dk sonra, eksik harfleri tamamlayarak kelimeler bulmanız için size bir liste verildiğinde “...unlu” şeklindeki bir harf dizisini “zorunlu” olarak tam bir kelimeye hızlıca dönüştürürsünüz. Oysa, “...eyli” şeklindeki harf dizisini “düzeyle” şekline tamamlamanız daha uzun bir zaman alır. Non deklaratif hafızanın diğer alt sistemleri motor hafıza (procedural memory) ve klasik koşullanmadır.

Buraya kadar bahsettiklerimiz uzun süreli hafızanın bileşenleridir. Uzun süreli hafıza dışında iki diğer önemli kavram; kısa süreli hafıza (short-term memory) veya işleyen hafızadır (working memory). Hissedilenler veya algılananlar, sürekli hafızada saklanmaz ya da her defasında uzun süreli saklanmaz. Aslında hafızada bir anda kalan bilgi, hemen yakın zamanda alınan bütün duyuşal girdilerin (sensory inputs) sadece küçük bir kısmıdır. Dolayısıyla beyin, deposunda her girdiğe yer açmaz, bunun yerine beyin duyuşal girdilerin en önemlilerini farkederek makul bir seçicilik gösterir (a judicious selectivity). Elbette, kişinin hemen birkaç sn ya da dk içinde ihtiyaç duyacağı bazı bilgiler de olabilir. Bu bilgileri, günlerce aylarca ya da yıllarca saklamasına gerek yoktur. Yani, bazı önemli duyuşal girdilerin taşıdığı bilgileri, geçici olarak, birkaç dk içinde ihtiyaç duyduğunda kolayca erişebileceği bir alanda depolaması gerekir. Bir bilgiyi kısa süreli olarak zihninizde tutuyor ve de bu bilgiyi işliyorsak (manipulation); burada işleyen hafızadan söz etmek gerekir. İşleyen hafızanın kapsamı, kişinin özellikli bir anda aklından geçen her şeydir. İşleyen hafızanın görevini açıklamak için sıklıkla kullanılan en iyi örnek zihinsel aritmetiktir. Örneğin; siz 36 ile 49’u zihninizden çarpıyorsanız, en başta bu iki sayıyı ve çarpma işleminin kurallarını zihninizde tutmanız gerekir, sonrasında da çarpma işleminin kuralları gereği adım adım ilerlerken ulaştığınız ara sonuçları yine zihninizde tutmanız, en sonunda da ulaşılan sonuçları yine çarpma işleminin sonuçları gereği toplayarak sonucu ulaşmanız gerekir. Bundan başka, lokantada yediği yemeğin ücretinin üzerine uygun gördüğü bahşisi ekleyip hesabı ödemek, telefon defterinden bir numaraya bakıp ezberledikten sonra ahizeyi kaldırıp rakamları hatırlayarak tuşlara basmak işleyen hafıza aracılığı ile gerçekleştirilen zihinsel süreçlerdir. Akşam haberlerini dinlerken yeni bilgilerin öğrenilmesi ise anlık olarak bilginin işlenmesidir. Bir öğrencinin, dersi dinlerken öğrendiği bilgilerin geçici olarak işlenmesinde ve yeni bir şey öğrenmek için o

derste dinlenip işlenilen bilgilere ihtiyaç duyulduğunda ulaşmasını sağlayan da yine işleyen hafızadır. İşleyen hafıza, aslında anlık olarak sınırlı miktarda bir bilgiyi işlememizi ve saklamamızı sağlayan, bilinçli bir kısa süreli hafıza oluşumu sağlar.

İşleyen hafıza ile kısa süreli hafıza sık sık birbirinin yerine kullanılan kavramlardır. Her ne kadar birbirlerinin yerlerine kullanılan isimlendirmeler olsalar da teorik olarak, işleyen hafıza dediğimizde, yukarıda açıklandığı gibi, bilginin hem depolanmasından hem de yönetilmesinden bahsederken, kısa süreli hafıza kavramı, beyin tarafından seçilmiş bir bilginin kısa süreliğine saklanması işlevinin isimlendirilmesidir. Böylece, kısa süreli hafıza, işleyen hafızanın bir alt birimi durumundadır. İşleyen ve kısa süreli hafıza kavramlarının pek çok hipotetik modellemesi bulunmaktadır. Nöropsikolojide kısa süreli hafıza kavramı, işleyen hafıza kavramından daha eski olmasına rağmen, en çok kabul gören hipotetik modellemelerden biri, kısa süreli hafızanın, işleyen hafıza için depo görevi gören bir bileşen olarak konumlandırıldığı modeldir (Şekil 2.7.). İşleyen hafıza ile kısa süreli hafıza arasında bir nöroanatomik ya da nörofizyolojik ayrışmadan da söz edilebilir.

İşleyen hafıza bileşenleri bilgiyi sadece işleyen, depolayan ve gerektiğinde hatırlanmasını sağlayan oluşumlar değildir. Bunlar aynı zamanda, muhakeme, hesaplama veya dil gibi yüksek düzeydeki bilişsel işlevleri de desteklerler. İşitsel hafıza halkası ve seslendirme halkası sözel bilginin, görsel–uzaysal hafıza ise görsel bilginin kısa süreli olarak işlenmesinden ve depolanmasından sorumludur. Bu iki bileşen, kısa süreli hafızayı oluşturmaktadır. Yönetici merkez ile etkileşim halinde görülen işitsel hafıza halkası, seslendirme halkası, görsel–uzaysal hafıza ve dil ile ilgili beyin bölgeleri ve nöronal ağlar, işleyen hafızanın motor komponentini oluşturmaktadır. İşleyen hafızayı ve kısa süreli hafızayı açıklayan ve ilişkilendiren daha başka modeller ve bu modellerden bazıları bu iki kavramı birbiri ile etkileşimi olan bağımsız iki sistem gibi kabul ediyor olsa da işleyen hafızayı, kısa süreli hafızanın bir bileşeni ya da alt birimi olarak kabul eden bir model bulunmamaktadır. Tam tersine daha çok kabul edilen görüşe göre; kısa süreli hafıza, işleyen hafızanın bir bileşenidir [120]. Bu modele göre, kısa süreli hafızaya ait bilgiyi saklama ve muhafaza etme yeteneği, bilgiyi işleyebilen ve kullanabilen merkezî yönetici nöral ağ ile etkileşim içindeyken işleyen hafıza işlev görmüş olur (Şekil 2.7.).



Şekil 2.7. İşleyen hafızanın bileşenleri görülmektedir. İşleyen hafıza, bilgisayarlardaki RAM'a (Random Access Memory) benzetilebilir.

Yukarıda, zihinsel aritmetik örneğinde olduğu gibi, işleyen hafıza, karmaşık zihinsel süreçlerde (complex span), her defasında bir kısa süreli hafıza bileşenini kullanmaktadır. Zihnimizden çarpma işlemini yürütürken, çarpma işleminin kurallarını aklımızda tutuyor, buna ek olarak çarpma işleminin her basamağında ulaştığımız sonucu geçici olarak hafızamıza kaydederek ilerliyoruz.

İşte bu ihtiyaç için bir kısa süreli hafıza olmalıdır. Bu hafıza türü özellikle zihinsel hesaplamalarla veya anlık olarak algılanan, farkedilen bilgileri ya da hissedilenleri işleme ile ilgilidir.

2.2.1. Hafıza nasıl oluşur?

Yeni bir bilgiyi nasıl öğrendiğimiz sorusunu cevaplayabilmek için hâlâ yeterli bir bilgi birikimine sahip değiliz. Yeni bir ders konusu okuduğumuzda, beynimiz okuduğumuz bilgileri depolamak için yeni sinir hücreleri üretmez. Bunun yerine öğrenmenin gerçekleşmesi için nöronlar arasındaki sinaptik bağlantılar güçlenir. Bu güçlenme, sinaptik ileti kuvvetinin değişebilmesi anlamına gelen sinaptik plastisiteye bir örnek olan

uzun süreli potansiyalizasyon (long-term potentiation, LTP) ile sağlanır. Öğrenme ve hafıza için en bilinen ve kabul gören fizyolojik mekanizma olan LTP, çok büyük çoğunlukla hipokampusta ve hipokampusun CA3 ve CA1 bölgeleri arasında uzanan Schaffer kolleterallerinde (CA3 bölgesindeki sinir hücrelerinin, CA1 bölgesindeki sinir hücreleri ile sinaps yapan aksonları) çalışılmıştır.

Sinaptik geçirgenlik kuvvetinde değişme, fizyolojik mekanizmalar LTP'dekine benzer olsa da farklı şekillerde karşımıza çıkar. Kısa dönemli sinaptik plastisitenin fizyolojik mekanizmaları, nöromüsküler kavşakta pek çok çalışmada ortaya konulmuştur. Presinaptik terminale, birbirine çok yakın zamanda ulaşan birkaç aksiyon potansiyeli sinaptik fasilitasyona (sinaptic facilitation) yol açar. Böylece, bir aksiyon potansiyeli sonucunda presinaptik terminalde biriken Ca^{+2} miktarına göre daha fazla Ca^{+2} iyonunun presinaptik terminalde birikmesi ve daha fazla miktarda nörotransmitterin sinaptik aralığa salınması sağlanır. Birkaç aksiyon potansiyelinden daha fazla, tetanus düzeyine varacak şekilde çok sayıda aksiyon potansiyelinin presinaptik terminale ulaşması ise bir diğer sinaptik plastisiteye, post tetanik potansiyalizasyona (post-tetanic potentiation, PTP) yol açar. Tetanusa sebep olan aksiyon potansiyeli dizisi sonlandıktan sonra bile, PTP nörotransmitter salınımının birkaç dk boyunca devam etmesini sağlayabilir. Sinaptik fasilitasyon ya da PTP ile birbiri ardına presinaptik terminale ulaşan aksiyon potansiyelleri de presinaptik terminaldeki nörotransmitter barındıran sinaptik veziküllerin tükenmesine, tekrar eden uyarımlar da presinaptik terminalin post sinaptik terminali uyarma kuvvetinde azalmaya ve sinaptik depresyona (sinaptic depression) sebep olur. Böylece, yakın zamanda sinaptik geçiş hikâyesine göre, post sinaptik hücrenin uyarılma gücü değişkenlik gösterir. Yakın zamandaki bu sinaptik geçiş hikâyesi, iki hücre arasında, bir tecrübe olarak müteakip etkileşimleri şekillendirir. Nörofizyolojik ve yapısal değişiklikler meydana getiren bu tecrübe hafızayı oluşturur.

Merkezî sinir sisteminde LTP ve LTD (long-term depression, LTD)'yi açıklayabilmek için, çoğunlukla MSS'de ve CA3 ve CA1 bölgeleri arasında uzanan Schaffer kolleterallerinde, yapılmış çalışmalara göz atmakta fayda vardır. Bilindiği gibi sinaptik plastisite, nöronlar arasındaki bağlantının kuvvetlenmesi ya da zayıflaması anlamına gelmektedir. Sözünü ettiğimiz gibi, güçlü bir uyarım potansiyalizasyona, zayıf bir uyarım ise depresyona yol açar. Bu uyarımlar, dakikalarca ya da saatlerce devam ederse, o zaman LTP veya LTD ortaya çıkar. Nörotransmitter salınımının sıklığı, miktarı, süresi, post

sinaptik alanda etki ettiği bölge, o bölgede bulunan reseptörlerin çeşidi ve karakteri, reseptörlerin bulunduğu bölgedeki etki ettikleri hücre içi ikincil haberci, reseptörlerin bulunduğu hücre içi mikroçevredeki ikincil habercilerin ve hücre içi iyonların konsantrasyonları sinaptik bağlantıda meydana gelen değişim üzerinde belirleyici unsurlardır. Ayrıca, LTP ve LTD'nin oluşması için; proteinlerin sentezlenme düzeylerinde meydana gelecek değişimleri sağlayacak transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ya da inhibisyonu, proteinlerin post–translasyonel modifikasyonları, dendritik veya sinaptik uzantıların uzaysal olarak pozisyonlarının değişmesini sağlayan hücre adezyon moleküllerinin sentezlenme miktarındaki değişimler, sinaptik bağlantılarda uzun süreli değişikliklerin meydana gelebilmesi için gereklidir.

2.2.2. Öğrenme ve hafıza

Düşünerek, hissederek, görerek, koklayarak, duyarak, temas ederek ya da kas–iskelet sistemimizi kullanarak vb. yaşadığımız her tecrübe, eş zamanlı olarak bir sinir ağını oluşturan sinir hücrelerinin aktivasyonuna sebep olur. O özgün tecrübe her tekrarlanışında, sinir ağını oluşturan sinir hücreleri arasındaki bağlantılar kuvvetlenir. Böylece öğrenme gerçekleşir. Yani öğrenme; edinilen tecrübe ile davranışlarda meydana getirdiği değişikliklerdir. Öğrenme; tecrübeden elde edilen bilginin kazanılması, hafıza ise bu bilginin alıkonulması ve depolanması sürecidir.

Öğrenmenin gerçekleşmesi, teorik olarak sinir hücreleri arasındaki bağlantıların kuvvetlenmesine ya da değişmesine, yani sinaptik plastisiteye bağlıdır. Sinaptik plastisite; sinapsın yapısında ya da biyokimyasal özelliklerinde meydana gelen değişiklikler neticesinde, sinapsın postsinaptik nöron üzerindeki etkisinin değişmesidir.

2.2.3. Deney hayvanlarında hafıza oluşumunun değerlendirilmesinde kullanılan davranış deneyleri

Öğrenme ve hafızayı değerlendiren deneysel çalışmalar, günümüzde sıklıkla fare ya da sıçanlarla yapılmaktadır. Deney hayvanını, bir deneysel öğrenme prosedürüne tabi tuttuktan sonra, hayvanın gerçekten öğrenip öğrenmediğini, yine bir test prosedürü içinde öğrenmiş olması gereken bilgiyi kullanmasını teşvik ederek, bilginin davranışlarını yönlendirip yönlendirmediğini gözlemleyerek ortaya çıkarabiliriz. Örnek olarak; Morris su tankı (MWM) deneylerinin prop (irdeleme) denemelerinde, deney hayvanının yerinde kaldırılmış platformu arama davranışını verebiliriz. Daha önceki denemelerde platformun

yerini öğrenmiş deney hayvanında, platformu havuzdan kaldırdığımızda, hayvanın platformun olması gereken yeri hatırlayarak ve ilgili yerlerde yüzerek platformu bulmaya çalıştığını veya aradığını görmemiz gerekir. Öğrenme ve hafıza oluşumunun tek kanıtı, bilginin hatırlanıyor olmasıdır.

2.2.3.1. Açık alan habituasyonu testi

Açık alan habituasyonu (AAH), deney hayvanının, ödüllendirici ya da uzaklaştırıcı bir uyararı bulunmayan açık bir alana konması ve belirlenmiş bir süre içinde, bu alanı keşfetmeye işleyen hayvanın gözlemlenmesidir. Açık alan habituasyonunda kullanılan bu alan simetrik bir geometrik şekil, bir dairesel alan ya da bir dörtgen olabilir. Öğrenme ve hafızanın değerlendirilebilmesi için öğrenme (acquisition) ve test (testing) seansı bulunmalıdır. Öğrenme ve test seansları, başlıca iki parametre açısından kıyaslanır. Birincisi arka ayakları üstünde yükselme hareketi (rearing), ikincisi ise alanının zemininin bölündüğü varsayılan küçük alancıklar arasındaki geçiş (crossing) sayısıdır. Arka ayakları üstünde yükselme hareketi; sıçan ve fare gibi küçük kemirgenlerde, doğuştan gelen, yeni bir ortamı keşfetme hareketidir. Küçük alancıklar arasında geçiş hareketi de yine bir keşfetme çabasının sonucudur. Hafızayı değerlendirmek için genelde, bir öğrenme seansından 24 saat kadar sonra test seansı gerçekleştirilir. Test seansında, arka ayaklar üstünde yükselme ve küçük alancıklar arasında yer değiştirme hareketinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış olması, normal bir hafıza oluşumu anlamına gelir. Terapötik bir girişimden sonra, test seansının arka ayaklar üstünde yükselme ve alancıklar arasında yer değiştirme hareketleri bakımından öğrenme seansından farklılık olmadığı görülürse, bu tedavi “amnestik” olarak değerlendirilir. Test seansında, söz konusu hareketler istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde azalmışsa, uygulanan tedavi “etkin” ya da “kolaylaştırıcı” (facilitatory) diye nitelendirilir [121].

2.2.3.1.1. Açık alan habituasyonu testi ile değerlendirilen diğer deneysel değişkenler

Açık alan habituasyonu ile özellikle uygulanan tedavinin lökomotor aktiviteye ve deney hayvanın genel performansına etkisi, davranış deneyleri içeren çalışmalarda sıklıkla değerlendirilir. Bu amaçla kullanıldığında, tek bir seans yeterli olur.

Deneysel hayvanlarda kaygı (anxiety) düzeyinin ortaya çıkarılması da bütün fizyolojik ve farmakolojik çalışmalar için önemlidir. Açık alan habituasyonu testi, yükseltilmiş T labirenti testi (elevated plus maze test) gibi çeşitli deneylerde, aynı şartlardaki deney

hayvanları farklı kaygı düzeyleri sergileyebilirler. Buna rağmen bu deneyler deney hayvanlarında kaygı durumunun gözlemlenmesi için kullanılmaktadır. Açık alan habituasyonu, lökomotor aktivitenin değerlendirilmesinin yanında, kaygı durumunun değerlendirilmesi için de sıklıkla başvurulan bir deney metodudur. Kaygı düzeyinin değerlendirilmesi için yapılan test seansından önce bir ortama alışma (acclimatisation) olabilir. Kaygı düzeyi yüksek olan hayvanlar, açık alanın merkezindeki kısmından kaçınırken, duvara yakın şekilde alan içinde (thigmotaxis) hareket ederler. Donma davranışının sıklığı da (freezing behaviour) kaygı düzeyinin yüksekliği lehine değerlendirilir [122].

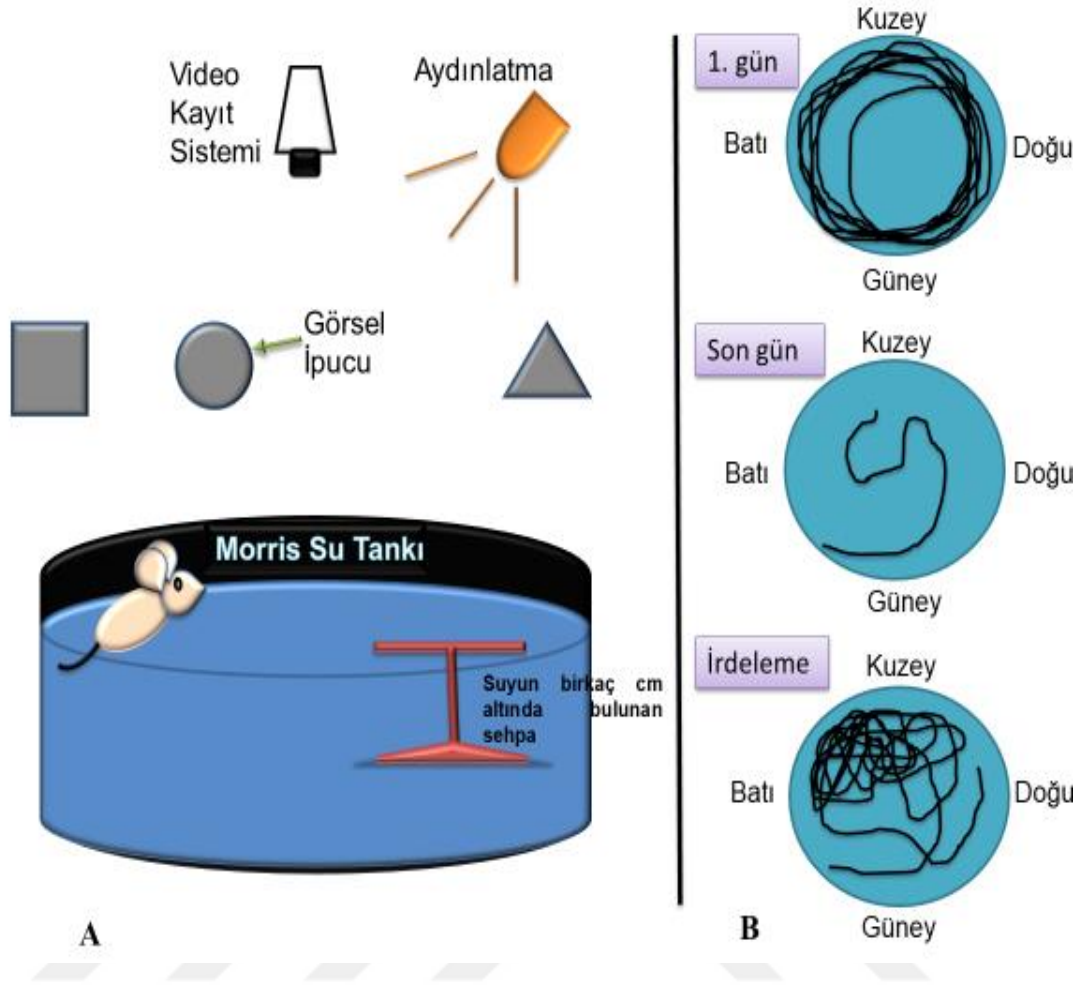
2.2.3.2. Morris su tankı testi

Doğada, sıçanlar ve fareler zamanlarının büyük kısmını güvenli bir yuva kuracakları yerleri arayarak ve buralarda bulunarak, gıda arayarak aynı zamanda tehlikeden, avcılardan kaçarak geçirirler. Dolayısıyla, bu hayvanlar, uzaysal öğrenme ve hafıza deneyleri için iyi bir seçenektirler. Sıçanlar ve fareler doğuştan iyi yüzücü olmalarına rağmen, yine doğaları gereği sudan hoşlanmaz ve su tankında yüzerken sudan kaçmaya çalışırlar. Hayvanlar, rengi matlaştırılmış su ile dolu bir tank içinde yüzdürülürler. Kullanılan deney hayvanı açık renkli tüylere sahipse; siyah renkli bir su tankı ve suyun rengini hem koyulaştırmak hem de matlaştırmak için çeşitli koyu renkli kimyasal boyalar ya da koyu renkli gıda boyaları kullanılabilir. Eğer hayvan koyu renkli ise, bu defa suyun rengini hem beyazlatmak hem de matlaştırmak için açık-beyaz renkli kimyasallar ya da gıda boyaları kullanılabilir. Deneyde sıçan mı fare mi kullanılıyor olduğuna göre çeşitli boyutlarda su tankı kullanılabilir. Tankın çapı genelde 120 cm ile 220 cm arasında değişmektedir. Araştırmacı, hayvanın birkaç defa bulmayı başardığı ya da araştırmacı tarafından yönlendirildiği sudan kaçmak için üzerine çıktığı platformu, tankın içinde herhangi bir yere, su seviyesinin birkaç cm altında kalacak şekilde yerleştirir. Deney hayvanının, platformun konumunu uzaysal olarak ilişkilendireceği görsel ipuçlarını da su tankının etrafına ya da tankı su seviyesi üzerinde kalan duvarına yerleştirebilir. Su tankının bulunduğu odanın duvarındaki poster niteliğindeki resim veya şekiller görsel ipuçları olabileceği gibi, oda penceresinin konumu da görsel ipuçlarından biridir. Tankın duvarına genelde kuzey, güney, doğu ve batı yönlerinde yapıştırılmış kâğıt üzerindeki kare, daire, yıldız gibi şekiller de görsel ipuçlarına dahildir. Birkaç günlük denemelerden sonra, deney hayvanı, görsel ipuçlarından da faydalanarak tankın içindeki platformun

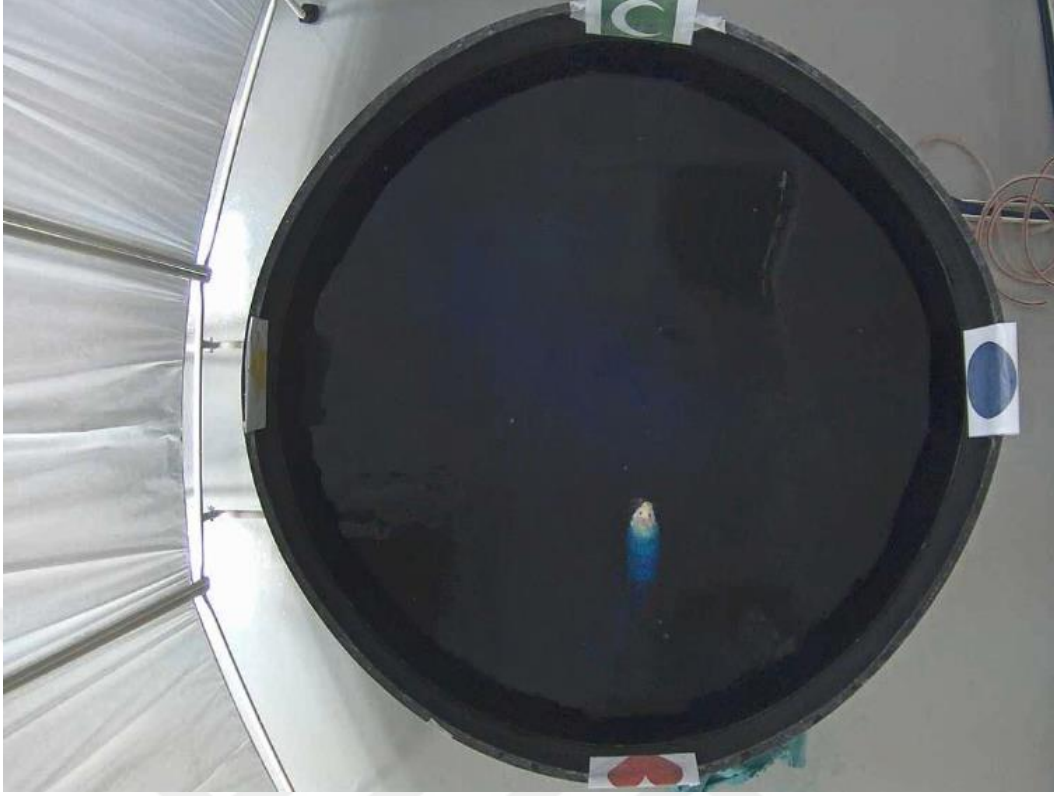
konumunu öğrenir (Resim 2.1.). Denemeler devam ettikçe, hayvan platformun konumunu daha iyi kavramaya ve son denemelerinde, platforma ulaşmak için havuz içinde yüzerek aldığı mesafeyi en kısa hale getirmeye başlar (Resim 2.2.) [123]. Uzaysal hafızanın oluşup oluşmadığını, araştırmacı, deney prosedürünün sonunda platformu kaldırdıktan sonra hayvanı yüzdürüp, hayvanın su tankının en çok hangi kısmında yüzdüğünü gözlemleyerek değerlendirir [122]. Şekil 2.8.'de MWM deneylerine ait bir örnek yer almaktadır. Çalışma video-kamera sisteminin bağlı olduğu bir bilgisayar programı tarafından kayıt altına alınmaktadır. Üstte, kontrol grubu için, öğrenme deneylerinin birinci gününde, deney hayvanı çoğunlukla tankın çeperinde, tankın duvarına temas ederek (thigmotaxis) yüzmektedir (Şekil 2.8. B). Platform, su tankının kuzeybatısındaki dörtte birlik alan içerisindedir. Su tankının kuzey-güney ve doğu-batı yönleri, deneylere başlamadan önce belirlenir. Belirlenen yönler, gerçek yönler olabileceği gibi, çalışmacı bu yönleri rastgele de belirleyebilir. Çalışmacı, bu seçimi rastgele yaptığında, genelde, tankın kendisine bakan tarafını, güney tarafı olarak belirleyebilir. Ortadaki şekilde görüldüğü gibi, öğrenme deneylerinin son gününde, deney hayvanı kısa bir yüzme mesafesinden sonra platforma ulaşmaktadır. Alta, öğrenme denemeleri bittikten 24 saat sonra, platform havuzdan kaldırılarak yapılan prop denemesinde de deney hayvanının, çoğunlukla platformun bulunduğu alanda yüzdüğü görülmektedir (Şekil 2.8. B). Streptozotosin ile oluşturulan deneysel Alzheimer modelinde hem öğrenme deneylerinin son gününde hem de prop denemesinin yapıldığı günde, hayvanın yüzerken takip ettiği yolun, çoğunlukla ilk günde ortaya çıkan haritaya benzemesi beklenir. Yüzülen mesafe, platforma ulaşma süresi ve yüzme hızı gibi değişkenler, deney sonunda genelde alınan video kayıtları üzerinde çalışılır. Platformun yerini öğrenmiş olan hayvan, platform kaldırıldıktan sonra, o civarda onu arayarak yüzecektir. Bu son değerlendirme denemesine prop denemesi denir. İrdeleme denemesi ile hayvanın, ne kadar öğrendiği ve öğrendiği bilgiyi ne ölçüde kullanabildiği ortaya konur (Resim 2.1.). Kayıtlarla deney hayvanına ait ısı haritaları da elde edilebilir. Bu haritalar, hayvanın arama davranışı hakkında bilgi verir. Resim 2.2. A'daki ısı haritası, çalışmamızda, STZ ile deneysel olarak Alzheimer hastalığı oluşturulmuş grupta bulunan bir wistar albino sıçana aittir. Günde 9 deneme içeren ve ardışık olarak 4 gün devam eden öğrenme (acquisition) denemelerinden sonra 5. günde yapılan prop denemesinde bilişsel bozukluk oluşmuş wistar sıçanın daha çok havuzun çeperinde yüzdüğü görülmektedir. Resim 2.2. B'deki ısı haritası ise; STZ ile deneysel olarak Alzheimer hastalığı oluşturulduktan sonra 13 gün boyunca günde 5 mg/kg intraperitoneal (ip) memantin almış bir wistar sıçanıdır. Arama davranışı

platformun bulunduğu bölgede yoğunlaşmaktadır. Bu sebeple iyileşmiş olarak değerlendirilmektedir. Resim 2.2. C'deki görünüm, STZ yerine, bilateral ve ICV olarak %0.9'luk NaCl (her bir ventriküle 6–7 μ L serum fizyolojik) almış olan, kontrol–opere (sham–operated) grubundan bir wistar sıçana ait olan ısı haritasıdır. B ve C'deki ısı haritalarında, wistar sıçanların yüzerken bulunmayı tercih ettikleri bölgelerin platformun konumu ile ilişkili olduğu gözlenmektedir. Platform, fotoğraflardaki havuzun üst ve sol kadranına, suyun 2 cm altına yerleştirilmiştir. A'da, sıçanın yzş bölgeleri bütün havuza yayılmış, belli bir bölgeye yığılmamış ve platformun konumu ile ilişkisiz olarak görünmektedir.





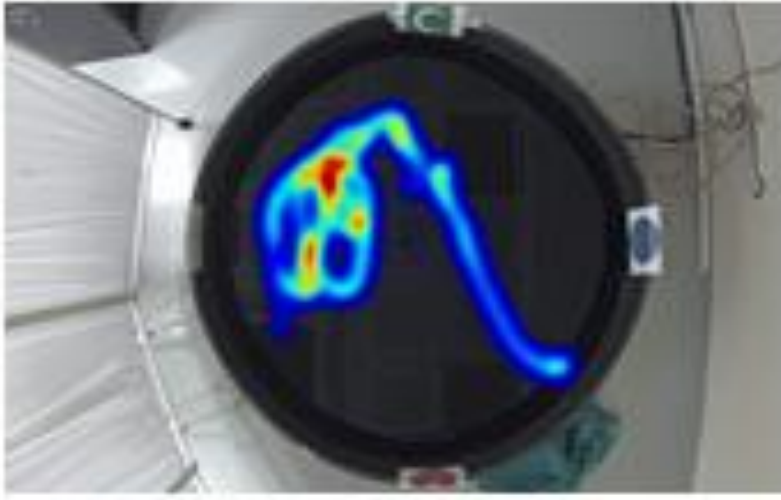
Şekil 2.8. A) Morris su tankının, tank içindeki platformun, görsel ipuçlarının, aydınlatmanın ve video-kamera kayıt sisteminin temsili konumlanışı görülmektedir. B) Deney hayvanının, su tankında, üç farklı günde yüzerken takip ettiği yol temsili olarak haritalanmıştır (track mapping).



Resim 2.1. Bizim çalışmamızda, STZ ile oluşturulmuş deneysel Alzheimer grubuna ait wistar sıçanlardan birinin ilk gün öğrenme denemelerinden biri görülüyor. Su tankının dört yanında görsel ipuçları yer almaktadır.



A.



B.



C.

Resim 2.2. Çalışmamızdaki üç farklı gruptan üç adet Wistar türü sıçanın, prop denemelerindeki yüzüşlerinin ardından ortaya çıkarılan ısı haritaları (heat map).

Morris su tankı deneyi, uzun süreli potansiyalizasyon, NMDAr fonksiyonları ile ve dolayısıyla hipokampal devre ile ilişkilendirilir. NMDA antagonizmasının uzaysal öğrenmeyi bozduğu gözlenmiştir [124, 125].

2.2.3.3.Pasif sakınma testi

Pasif sakınma testi, deney hayvanının, belirlenmiş bir içerikle (a particular context) itici bir olayı (an aversive event) ilişkilendirdiği şartlandırma paradigmasıdır (conditioning paradigm). Bu itici olay, sıklıkla hayvanın üzerinde gezindiği platformdan uygulanan düşük amperli bir elektriksel şoktur. Pasif sakınma testinde, deney hayvanının şartlandırılmamış uyarının (unconditioned stimulus–US) meydana gelmemesi için, içgüdüsel olarak kendisinde var olan karanlık kısma geçme isteğini ve bu yöndeki hareketini baskıladığı görülürse, yani deney hayvanı bir kaçınma hareketi sergilerse, öğrenme gerçekleşmiş demektir. Aktif sakınmada ise öğrenmenin gerçekleştiğine, deney hayvanının şartlandırılmış uyarıya (conditioned stimulus–CS, neutral stimulus) cevaben US'den kaçınmak için, hayvanın doğası gereği gerçekleşmesi düşük ihtimalli olan bir harekette bulunursa karar verilir. Pasif sakınma testi de uzaysal hafıza ile ilgili bir bileşen de içerir. Ancak, deneysel olarak hipokampal disfonksiyon geliştirildiğinde de pasif sakınma testinde öğrenme gözlenebilir [126].

2.3. Alzheimer hastalığı ve hafıza

2.3.1.Alzheimer hastalığında hafıza kaybına ilişkin belirtiler

Alzheimer hastalığının hafıza ve biliş ile ilgili ayırtedici bazı belirtileri bulunmaktadır. Özellikle en son öğrenilenlerin unutulduğu hafıza kaybı, Alzheimer hastalığının en çok bilinen belirtisidir. Bunun yanı sıra önemli bir tarih veya olayın unutulması, aynı şeyin tekrar tekrar sorulması, unutulmaması için bilgilerin not alınması ya da telefona–tablete kaydedilmesi gibi yöntemlere başvurulmaya başlanması veya önceden kendi başına yapılabilen şeyler için diğer aile bireylerinden yardım alınmaya ihtiyaç duyulması hastalıktaki hafıza kaybı ile ilgili diğer önemli belirtilerindendir. Hastalar, aylık faturalarını takip edemeyebilir, daha önceleri kolaylıkla yaptıkları bazı işlere konsantre olmakta zorluk çekip, bu işleri yapmakta eskisine göre çok daha uzun zaman harcar hale gelebilir. Tanıdık bir yere gitmekte, bilindik bir cihazı kullanmakta (telefon, televizyon, mikrodalga fırın vb.) veya her zaman oynadığı bir oyunun kurallarını hatırlamakta güçlük çekebilir. Zaman ve mekân ile ilgili algı ve değerlendirmelerinde bozulmalar olabilir,

örneğin; tarihi, mevsimi unutulabilir, nerede olduklarını ve oraya ne için geldiklerini hatırlayamayabilirler. Görme ve okuma problemleri, özellikle araç kullanırken büyük bir zorluk meydana getirecek şekilde, mesafeyi değerlendirmede ve renkleri veya renkler arasındaki ton farklılıklarını algılamada güçlükler yaşayabilirler. Hastalar, bir sohbet katılmada ve sohbeti devam ettirmede zorlanabilirler, Meselâ, sohbetin içinde bir yerde aniden durabilir, nasıl devam edeceğini bilemeyebilir, devam edecek bir söz bulamayabilir ve kendini veya daha önce söylediğini tekrar etmeye başlayabilir. Her zaman kullandıkları eşyaları, kullandıktan sonra normalde bırakmadıkları yerlere koyup, tekrar ihtiyaç duyulduğunda o eşya bulunamadığı zaman yakınlarından bazılarını hırsızlıkla suçlayabilirler. Hastalığın daha ileri evrelerinde, genel olarak hemen her konuda değerlendirmede ve karara vermede zorluk çektikleri için, alışverişte ölçüyü kaçırabilir, telefon veya televizyon aracılığı ile büyük miktarlarda para harcayabilirler. Hobilerini (düzenli olarak hafta sonlarında arkadaşları ile görüşmek, yemek yapmak, fotoğrafçılık, el sanatları ile uğraşmak, spor yapmak, tuttıkları takımın maçlarını takip etmek vb.) devam ettirmekte güçlük çekebilirler. Duygu durumlarında dalgalanmalar ve hatta kişilik değişimleri gözlenebilir, akli karışık, şüpheli, kaygılı–korkulu, depresif olabilirler. Kırılgan olabilir, kendilerini rahat hissettikleri ortamda, çevrede, kişilerdeki bir değişiklikte tedirgin veya üzgün bir hal alabilirler.

2.3.2. Mediyal temporal lob

Hafıza ile ilgili en önemli bilgilere aslında yalnızca bir kişi sayesinde ulaşılmıştır. 1953 yılında, epilepsi hastalığı sebebi ile radikal bir beyin ameliyatı geçiren, 2008 yılında vefat etmiş Henry Molaison adlı hastadan edinilen tecrübe ve gözlemler, bugün hafıza ile ilgili olan bilgilerimizin büyük çoğunluğunu teşkil etmektedir. 27 yaşında bu radikal ameliyatı geçiren genç adamın epilepsi nöbetlerinin sıklığı, artık hayatının gidişatı üzerindeki olumsuz tesiri yok denecek kadar azalmıştı. Ameliyatta mediyal temporal loblar, hipokampusunun büyük kısmını kapsayacak şekilde çıkarılmıştı [127]. Ancak bu genç adam, ameliyattan önceki yaşantısı ile ilgili şeyleri hatırlayabiliyor olmasına rağmen, ameliyattan sonra karşılaştığı yeni bir yüzü ya da olayı dakikalar içinde unutuyordu. Bir başka deyişle, günlük olayları (everyday occasions) hatırlayamıyordu. Bu hastadaki hafıza kaybı, Alzheimer hastalarında görülen hafızayla ilgili belirti ve bulgulara oldukça benzemektedir.

2.4. Memantin

Memantin (1-amino-3,5-dimetiladamantan hidroklorit), bir glutamat reseptörü alt tipi olan NMDA (N-metil-D-aspartat, glutamat reseptörü ve voltaj bağımlı katyon kanalı) reseptör antagonistidir. Alzheimer'da veya başka nörodejeneratif durumlarda (hafif ve orta derecede şiddetli Alzheimer hastalığında, hafif ve orta derecede şiddetli vasküler demansta, hafif bilişsel bozuklukta, kronik ağrılarda), toksisiteyi azaltmak, belirti ve bulgulara iyileşme sağlamak için kullanılmaktadır. Alzheimer'da, memantin NMDAr'yı antagonize etmesiyle, glutamaterjik sistemin aşırı aktivasyonu ve nörotoksite engellenmiş olmaktadır.

N-metil-D-aspartat reseptörleri, en azından kısmen de olsa öğrenme, hafıza ve beyin hasarının yol açtığı nöron hasarından/kaybından sorumludur. NMDAr'nin, nöron hücrelerinin işlevi ve akıbetine olan etkisi, reseptörün iki önemli sıradışı özelliği sayesinde söz konusu olmaktadır. Birincisi, reseptörün açılabilmesi ve iyon akışını sağlaması için iki olayın eş güdümünde gerçekleşmesi gerekir (associativity). Bu iki olay; reseptöre glutamatın bağlanması ve hücre zarının depolarize olmasıdır. Reseptörü, istirahat zar potansiyelinde, Mg^{+2} iyonları kanalı bloke etmektedirler. İkincisi, NMDAr kanalı hücre içine bir Ca^{+2} akışı sağlar. Artan hücre içi Ca^{+2} , nöronun özelliklerini değiştiren pekçok hücre içi mekanizmayı harekete geçirir.

Memantin, AH'de kullanılan kolinerjik ajanlardan en önemli farkı nöroprotektif olarak kabul edilmesidir. Glutamat, beyinde bilinen en önemli eksitatör nörotransmitterdir. Glutamatın NMDAr ile etkileşimi, fizyolojik olarak öğrenme ve hafıza oluşumu için gereklidir. Bununla birlikte, NMDAr'nin aşırı uyarımı, nöron hasarına ve kaybına yol açmaktadır. Memantin, düşük afiniteli, yarışmasız (uncompetitive), ekstrasinaptik ve açık durumdaki NMDAr'nin antagonistidir [128].

2.5. Streptozotosin

Streptozotosin, özellikle pankreasın insülin sentezleyen β hücrelerine toksik etki gösteren bir glukozamin-nitrozüre bileşiğidir. Deneysel tıp çalışmalarında, sıçanlara ya da farelere ICV uygulanması ile sporadik AH modeli oluşturulmaktadır. ICV STZ uygulaması, beyinde oksidatif strese yol açmaktadır [129].

2.6. TRPM2 kanalları

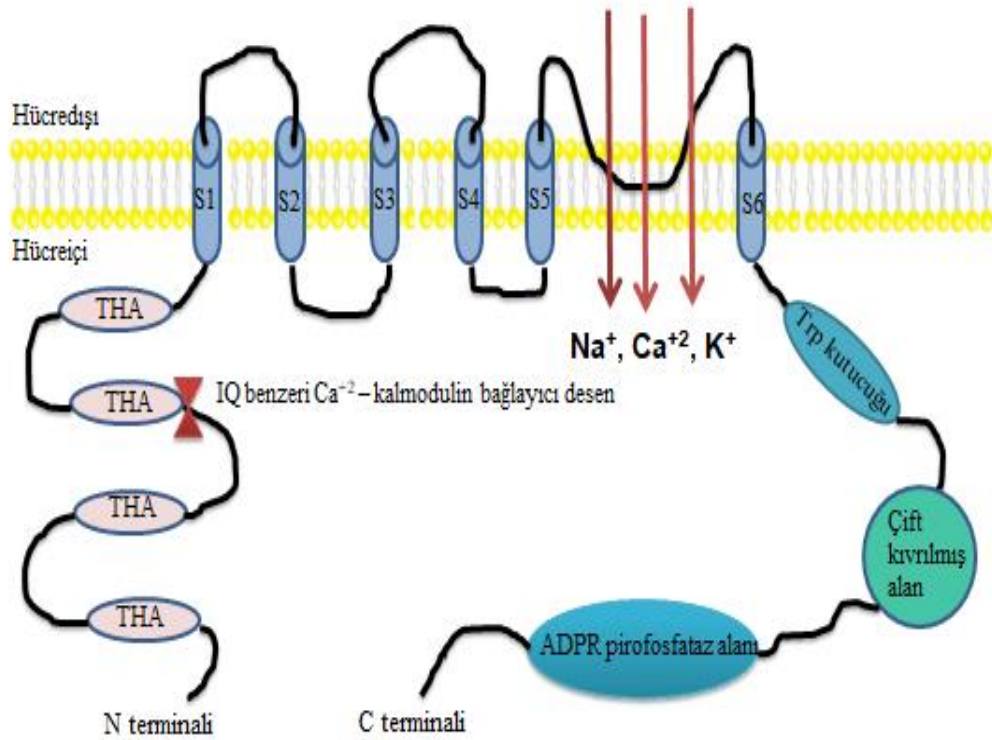
Transiyent reseptör potansiyeli melastatin-2 kanalları, non selektif bir katyon kanalı olarak işlev görürler. Bu kanallar “channenzyme” (channel+enzyme=channenzyme) sınıfı iyon kanalı olarak da adlandırılırlar. Çünkü iyon kanalı olarak işlev görmelerinden başka aa dizileri içinde enzimatik aktiviteye sahip bir bölge içerirler [130]. Bu bölge karboksi terminallerinde (C terminal) bulundukları adenosin difosfat riboz (ADPR) pirofosfataz homoloğu olan bölgedir. Melastatin ile ilişkili geçici reseptör potansiyeli kanalları 2 (TRPM2); voltaj bağımsız, oksidan moleküllere duyarlı ve seçici olmayan bir tek değerli-çift değerli (monovalent-divalent) katyon kanalıdır. Klasik olarak bu kanalların, enflamatuvar yanıtı teşvik ederek ve hücre içi Ca^{+2} aşırı birikimine sebep olarak hücre hasarına ya da hücre ölümüne sebep olduğu bilinmektedir. TRPM2'nin içinde bulunduğu TRP kanalları üst ailesi, altı alt aileden ve toplam 28 üyeden oluşmaktadır. Bu alt aileler aminoasit sekans analizlerine göre; kanonik (canonical-C), vaniloid (vanilloid-V), melastatin (melastatin-M), polisistin (polycystin-P), mukolipin (mucolipin-ML) ve ankirindir (ankyrin-A).

Transiyent reseptör potansiyeli melastatin-2 kanalları, vücuttaki bütün dokularda, hem uyarılabilir (excitable) hem de uyarılamayan (non-excitable) hücrelerde bulunurlar. Bu kanallar beyinde de yaygın olarak eksprese edilirler. Beyinde başlıca mikrogliyalarda [131, 132], astrositlerde [133], hipokampusta [134, 135], kortekste [136], striatal nöronlarda [137] ve dopaminerjik nöronlarda [138] eksprese edilmektedir. Merkezi sinir sistemi dışındaki dokularda da kalpte, dalakta, kemik iliğinde, plasentada, endometriyumda, gastrointestinal traktusta ve pankreatik β hücreleri, tükrük bezleri, endotel hücreleri ve immun sistem hücreleri (nötrofiller, makrofajlar, megakaryositler, monositler, T ve B lenfositleri, mast hücreleri) gibi çeşitli hücre tiplerinde varlığı gösterilmiştir [139].

2.6.1. TRPM2 kanallarının yapısı

Transient reseptör potansiyeli melastatin-2 kanallarının homotetramer yapısını oluşturan dört protein zincirinden her biri hem amino terminali (N terminali) hem de karboksi terminali (C terminali) hücre içinde bulunan, altı adet transmembran bölgeden oluşmaktadır (Şekil 2.11.). İşlevsel TRPM2 kanalı Şekil 2.11.'de görülen yapının dört tanesinin bir homotetramer oluşturması ile ortaya çıkar. Transient reseptör potansiyeli melastatin ailesine ait kanalları oluşturan bu dört polipeptit zincirinin her birinin 600-700

aa'lık N terminali kısımlarında dört alt alan bulunur. Bu alanlar TRPM kanal ailesinin diğer üyelerinde de bulunan, korunmuş bölgelerdir. Kanal oluşturan aa dizisi ise, S5 ve S6 transmembran bölgeleri arasında uzanır.



Şekil 2.9. TRPM2 kanalının hücre zarındaki konumlanışına ait topolojik model. TRPM2 kanalı altı transmembran kısımdan oluşmaktadır (S1–S6). Katyonların geçişini sağlayan kanalı oluşturan protein dizisi halkası, S5 ile S6 arasında bulunmaktadır. Şekilde görülen TRPM2 kanalına ait topolojik model, fonksiyonel TRPM2'nin bir monomeridir. Fonksiyonel bir TRPM2 kanalının oluşması için, dört adet monomerin bir araya gelmesi ve dört adet protein dizisi halkasının birleşerek katyon kanalını oluşturması gerekir. Bir monomerin N terminali dört adet TRPM alt ailesi homoloji kısmı içerir (Melastatin Homology Domain–MHD). 2. MHD'de Ca^{+2} -kalmodulin bağlayıcı IQ benzeri motif bulunur (IQ like motif). C terminalinde, bir TRP kutucuğu, bir çift kıvrılmış alan ve ADPR pirofosfataz (NUDIX) alanı bulunur.

2.6.2. TRPM2 kanallarının aktivasyonu ve işlevleri

Transient reseptör potansiyeli melastatin-2 kanallarının; oksidatif strese duyarlı olduğu ve hücre içine büyük miktarda Ca^{+2} girişine sebep olarak hücre ölümüne yol açtığı ve enflamatuvar cevabı alevlendirdiği bilinmektedir. Her ne kadar TRPM2 kanalları aktive olduklarında hem monovalen hem de divalen katyonların geçişini sağlarlar da apoptozise ya da hücre ölümüne yol açıcı etkileri, $[Ca^{+2}]_i$ artışı sebebi ile ortaya çıkmaktadır [140]. Aslında TRMP2 kanalları, aktivasyonlarının ardından hücre ölümüne yol açmaları ya da enflamatuvar cevabı teşvik etmeleri gibi görülen en son etkilerini, hücrenin redoks durumu ile hücre içi Ca^{+2} homeostazı arasındaki fizyolojik ya da patofizyolojik ilişkiyi kurarak gerçekleştirmektedir. Reaktif oksijen ve nitrojen ürünleri düzeyindeki sapmalar ile hücre içi Ca^{+2} düzeyindeki değişimler ve takibeden hücre hasarı birbirleri ile ilişkilidir. Bu yüzden hem oksidatif stres hem de Ca^{+2} dishomeostazı AH gibi nörodejeneratif hastalıklar için de potansiyel birer terapötik hedefdir.

TRMP2 regülasyonunda esas görevli hücre içi haberci ve kanalın aktivasyonuna sebep olan NAD^{+} -metaboliti ADP-riboz (ADPR) molekülü, hücresel stresin bir sonucudur. Bu sebeple, TRPM2 kanalları oksidatif ve metabolik stresi algılayıp, hücre içi Ca^{+2} homeostazını ve zar potansiyelini etkileyecek iyon akımlarını sağlayarak işlev görür.

Adenozin difosfat riboz, TRPM2'nin esas regülatörüdür. ADPR, TRPM2 proteininin C terminalindeki ADPR pirofosfataz alanına yüksek bir spesifisite ile bağlanarak, riboz 5-fosfata ve adenozin monofosfata (AMP) dönüşür. ADPR'nin TRPM2 proteinine bağlanması ile hem kanal aktive olur hem de ADPR riboz 5-fosfata ve AMP'ye hidroliz olur. Aktivasyonu sonucunda, hücre içine Na^{+} , K^{+} ve Ca^{+2} katyonlarının farklı geçirgenlik düzeylerinde geçişi sağlanır. ADPR'den başka NAD, halkasal ADP-riboz (cyclic ADP-ribose, cADPR), NADP ve 2'-okso-asetile ADPR (2'-oxo-acetylated ADPR) TRPM2 agonisti olarak etki gösterdiği belirtilen diğer hücre içi habercilerdir [141].

Hücre içi Ca^{+2} regülasyonu hem hücrenin normal işleyişi hem de patolojik mekanizmalar açısından önem taşımaktadır. Özellikle ani hipoksik-iskemik hasarlarından sonra, nekroz, apoptoz veya sağkalım (survival) gibi seçeneklerden hangisi ile hücrenin kaderinin belirleneceği, hücre içi $[Ca^{+2}]_i$ 'nin belli (set-point) bir eşige gelip gelmeyeceğine bağlıdır. Bu eşik değeri hücreden hücreye ya da hasarın çeşidine veya şiddetine göre değişebilir. Bazı çalışmalarda, hücre için öldürücü etkisi olmayan

konsantrasyonlarda H₂O₂'in hücre içine Ca²⁺ girişini arttırdığı gözlemlenmiştir. Ancak, TRPM2 kanalları ile hücre içine taşınan esas iyon Na⁺ iyonudur. Hücre dışı Ca²⁺ ve araşidonik asit (AA) de TRPM2 kanallarının en bilinen regülatörlerindedir. Araşidonik asit varlığında, hücre içi depolardan sitozole salınan Ca²⁺, hücre dışı Ca²⁺ etkinliğine ihtiyaç duyulmaksızın TRPM2 kanallarının aktive olmasını sağlar. Ancak, TRPM2 kanalları üzerinde pozitif düzenleyici etki gösteren Ca²⁺ iyonu, hücre dışı kompartmanda bulunan Ca²⁺ iyonudur. Düşük ve hücre için ölümcül olmayan konsantrasyonlarda H₂O₂ uygulamasını takiben, hücre içi NAD⁺ düzeylerinde bir artış tespit edilmiştir. Hücre içi artan NAD⁺ yoğunluğu ve NAD(P)⁺/NAD(P)H oranı, H₂O₂ etkisine ikincil olarak ortaya çıkmaktadır [16]. Böylece oksidatif stres, hücre içi NAD⁺ yoğunluğunu değiştirmekte, NAD⁺ da TRPM2'yle etkileşime girerek kanalın açılmasını sağlamaktadır. Sıçan insülinoma RIN-5F hücrelerinde, TRPM2 kanalı ekspresyonunun bir antisens oligonükleotit (antisense oligonucleotide) dizisi ile baskılanmasından sonra H₂O₂ etkisi ile meydana gelen hücre içine doğru Ca²⁺ akımının (inward Ca²⁺ current) ve oksidatif stres aracılı hücre ölümünün engellendiği görülmüştür [142].

Amiloid-β peptitlerin nörodejenerasyona neden olan etkilerine de oksidatif stres aracılık etmektedir [10]. Alzheimer hastalığında hem sinir dokusunda hücre dışı alanda hem de orta ve küçük çaplı arter çeperlerinde Aβ birikimi, hastalığı patolojik seyrinin en önemli karakteristiklerinden biridir. Striatal hücre kültüründe hem H₂O₂ hem de Aβ uygulamasında sonra [Ca²⁺]_i, ROS ve hücre ölümü artmaktadır. TRPM2'nin fonksiyonel inhibisyonu ile hücre içine Ca²⁺ akışında, ROS yoğunluğunda ve hücre ölümünde azalma gözlenmiştir. Bu durum, Aβ toksisitesine oksidatif stres mekanizmalarının eşlik ettiğine dair önemli bir bulgu olduğu gibi, yüksek düzeyde TRPM2 protein ekspresyonu sergileyen striatumda Aβ ile ilişkili oksidatif stres ve hücrel toksisite kaskadında TRPM2 kanallarının da belirleyici olduğunu göstermektedir [143].

Kronik serebral hipoperfüzyon (KSH), hem nörodejeneratif hem mental bozukluklar olmak üzere MSS hastalıklarının etiolojisinde sıklıkla karşılaşılan ve bilişsel bozulmalara sebep olan patolojik bir süreçtir. Özellikle leptomeningeal ve kortikal arteriyollerde amiloid yapılı proteinlerin birikimi olarak tanımlanan serebral amiloid anjiyopati (cerebral amyloid angiopathy, CAA) de AH patogenezi için karakteristiktir. Serebral amiloid anjiyopati, kronik serebral hipoperfüzyon sebeplerinden biridir. İlerleyen yaşla beraber, MSS'nin kanlanmasında yetersizlikler oluşmakta, bu yetersizlikle başta

Alzheimer tipi olmak üzere demansa yol açmaktadır. Aslında, bütün kardiyovasküler risk faktörleri ya da obezite, ateroskleroz, hipertansiyon gibi kardiyovasküler ve metabolik hastalıklar ileri yaşlarda KSH'e zemin hazırlamaktadır. Kronik serebral hipoperfüzyonun beyin dokusunda sebep olduğu enflamatuvar cevaba da TRPM2 kanalları aracılık etmektedir. Kronik serebral hipoperfüzyon patogenezine TRPM2 kanallarının katkısı yine ROS aracılığı ile olmaktadır. Kronik serebral hipoperfüzyon beyinde ROS düzeylerini arttırmaktadır. Reaktif oksijen ürünleri, TRPM2 için endojen bir agonisttir [16]. Artmış ROS sebebi ile aktiflenen mikroglialardaki TRPM2 kanalları sitokin üretimini arttıran yolları tetiklemekte ve en sonunda beyaz cevher hasarı (white matter injury) ortaya çıkmaktadır. Mikroglialardaki TRPM2 kanal aktivitesi, MSS'nin enflamatuvar hastalıkları için potansiyel bir terapötik hedef olarak görülmelidir [132].

2.6.3. N-(p-amilsinamoil) Antranilik Asit (ACA)

N-(p-amilsinamoil) antranilik asit, ilk olarak, lökotrien C₄ (LC₄) ve lökotrien D₄ (LD₄) bağımlı bronkokonstriksiyonu engellemek için, LC₄-LD₄ antagonisti olarak kullanılmıştır [144]. Daha sonraları, ACA ile fosfolipaz A₂ (PLA₂) inhibisyonunun, AA birikimini engelleyerek glukoza cevaben meydana gelen insülin salınımını ortadan kaldırdığı gözlenmiştir. Burada AA, glukoza cevaben ortaya çıkan insülin salınımı için bir hücre içi haberci görevi görmektedir [145]. Başka bir çalışmada, sıçan mezengial hücre kültüründe, endotelin-1 aracılı prostoglandin E₂ üretimini inhibe ettiği görülmüştür [146].

Sonraları ACA'nın hücre içi etkilerine TRPM2 kanal inhibisyonunun yol açtığına dair bulgulara da ulaşılmıştır. İnsan TRPM2 geni ile enfekte edilmiş HEK293 hücrelerinde, ekstrasellüler 20 µM ACA uygulanması ile, ADPR ile uyarılan bütün hücre akımlarının ve H₂O₂ ile tetiklenen Ca²⁺ akımının -ADPR ve H₂O₂ ile uyarılan TRPM2 aktivitesinin -tamamen engellendiği tüm hücre yama kenetleme (whole cell patch clamp technique) tekniği ile gözlemlenmiştir. P-bromofenasil bromit ve araşidonil triflurometil keton gibi diğer PLA₂ inhibitörleri aynı etkiyi ortaya çıkarmamıştır [147].

Nötrofil ve makrofajların iskemik hasar sonrasında beyin dokusuna göç etmeleri, TRPM2 kanal aktivasyonu ile sağlanır. Hayvanlarda serebral inme modellerinde, TRPM2 nakavtlığının (TRPM2^{-/-}) nöroprotektif etki gösterdiği görülmüştür. Benzer şekilde TRPM2'nin ACA ile fonksiyonel inhibisyonu da inme modelinde nöroprotektif bir etkinlik göstermiştir [148].

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Streptozotosin ile oluşturulan bilişsel bozukluk modeli (deneysel olarak sıçanlarda streptozotosin ile oluşturulan Alzheimer hastalığı)

3.1.1. Streptozotosin uygulanmasıyla diyabetes mellitus ve A β oluşumuna dair kanıtlar

Bir deney hayvanında, Alzheimer modeli oluşturularak yeni terapötik etkinliği olabilecek ajanların denenebilmesi için, kullanılan yöntemin deney hayvanlarında, insandaki AH patolojisini iyi taklit etmesi ve insanda, AH ile ortaya çıkan bilişsel ve davranışsal bozuklukları yeterli bir ölçüde üretebilmesi gerekmektedir. Transjenik deney hayvanları, ailesel Alzheimer hastalığında bulunan A β ile ilişkili mutasyonları barındırdıkları için, bu hayvanlarla yapılan çalışmalar, bilişsel gerilemeye ait moleküler mekanizmalarla ilgili önemli bilgilerin ortaya çıkmasına sebep olmuştur. Ancak ailesel Alzheimer, bütün vakaların yaklaşık %5'ini oluşturmaktadır. Bu sebeple, transjenik deney hayvanlarının, sporadik AH için iyi bir model olamayacağına dair görüşler bulunmaktadır [149].

Streptozotosin, esas olarak anti-kanser olarak tanımlanmış bir glukozamin-nitrozüre bileşiğidir. İntraperitoneal enjeksiyonu sonrası, pankreatik β hücreleri üzerine sitotoksik etki gösterir ve insülin eksikliğine sebep olur. Streptozotosinin, deney hayvanlarında, ICV veya ip enjeksiyonunun, bilişsel yetileri geriletmediği [150], A β ve β -sekretaz seviyelerini yükselttiği, ICV enjeksiyon sonrası sıçanlarda A β yıkıcı işlev gören endotelin dönüştürücü enzim-1 (endothelin converting enzyme-1, ECE-1) ve insülin yıkıcı enzim (insülin degrading enzyme, IDE) seviyelerini azalttığı [151-153] ortaya konulmuştur. Deneysel DM I ve DM II modellerinde; oluşması beklenen insülin eksikliğinin veya insülin rezistansının, AH'deki A β patolojisini tetiklediği gözlenmiştir. İntraserebroventriküler STZ enjeksiyonunun da beyin dokusunda insülin rezistansı oluşturarak, AH'deki nöral patolojinin zeminini hazırladığı düşünülmektedir [150]. Ayrıca, subdiyabetojenik dozlarda ICV STZ enjeksiyonunun, özellikle frontal ve parietal loblarda glukoz kullanımını, ATP/FK (ATP/fosfokreatin) ve ATP/ADP oranlarını azalttığı gösterilmiştir [154-156]. Alzheimer'da, beyinde, insülin reseptör düzeylerinin

azaldığı görülmüştür [157]. Diyabetes mellitus tip 2'li hastaların postmortem incelemelerinde, A β 'nin Alzheimer'da olduğu gibi, beynin aynı bölgelerinde biriktiği gözlemlenmiştir [150]. Alzheimer'ın erken evrelerinde, ilerleyen yaşa bağlı bir patoloji olduğu düşünülen hücre içi genişlemiş endozomal birikimlerin varlığı, APP ile β -sekretazın hücre içinde endozomlarla taşındığı, APP'den A β oluşumunun kısmen endozomlar içinde gerçekleştiği ve DM II'nin yaşa bağımlı endozomal patolojiyi tetiklediği gösterilmiştir [153, 158, 159]. Bu sebeplerle DM ile ilişkili bozulmuş insülin sinyal yollarının AH'nin erken evrelerinde genişlemiş endozomal birikimlere yol açtığı görülmektedir. Bu bulgulara ek olarak, insülinin veya insülin benzeri büyüme faktörünün (insülin like growth factor, IIGF), IP₃-kinaz/Akt sinyal yolağı aracılığı ile, tau fosforilasyonunda görev alan glikojen sentaz 3 β kinazın (GSK-3 β) fosforillenmesine (serin-9 veya serin-21) ve inaktif hale gelmesine yol açtığı görülmüştür [153, 160]. İnsülin eksikliği ya da direnci sebebi ile inaktif hale gelemeyen GSK-3 β tau hiperfosforilasyonuna sebep olmaktadır. Ayrıca Alzheimer modeli oluşturulmuş farelerde insülin tedavisinin, Alzheimer patolojisini geriletmediği görülmüştür [161]. Sonuç olarak, DM sebebi ile insülin bağımlı sinyal mekanizmalarının bozulması sonucunda A β yıkıcı enzim seviyelerinin azaldığı, β ve γ sekretaz aktivitelerinin, A β birikiminin ve tau fosforilasyonunun arttığı düşünülmektedir.

3.2. Çalışma grupları

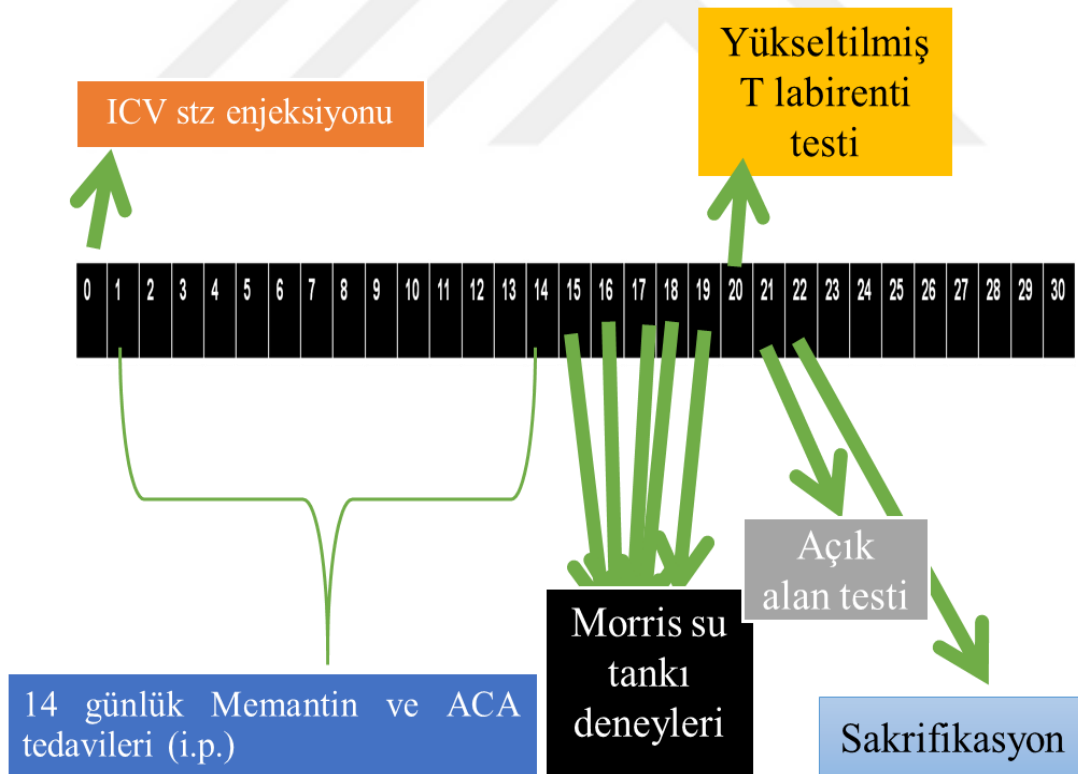
Çalışma grupları şu şekilde oluşturulmuştur (Tablo 3.1.):

Tablo 3.1. Çalışma grupları

	Uygulama süresi	Grup başına hayvan adedi
Kontrol	14 gün	10
Kontrol-opere	14 gün	10
ICV + STZ	14 gün	10
ICV STZ + memantin (5 mg/kg ip.).	14 gün	10
ICV STZ + N-(p-A milsinamoil) antranilik asit (25mg/kg ip.).	14 gün	10
ICV STZ + memantin (5 mg/kg ip.) + N-(p-amilsinamoil) antranilik asit (25mg/kg ip.).	14 gün	10
Araştırmada kullanılacak toplam hayvan sayısı		60

3.3. Çalışma takvimi ve farmakolojik girişimler

Çalışmaya toplam 60 adet Wistar türü sıçan dahil edilmiştir. Çalışma takvimi şekil 12’de gösterilmiştir. 0. günde tek doz ICV 3 mg/kg STZ enjeksiyonunu [162, 163] takiben, 14 gün boyunca ACA ve memantin + ACA grubuna ip olarak N-(p-amilsinamoil) antranilik asit enjeksiyonu yapılmıştır (Şekil 3.1.) [148]. Memantin; memantin ve memantin+ACA grubuna 14 gün boyunca, standart bir doz olarak kabul edildiği dozda, 5 mg/kg ip olarak enjekte edilmiştir [164]. Kontrol-opere gruba, ICV’lere (her iki tarafa da), bilateral, 0. günde toplam 10 µL/300 g izotonik NaCl verilmiştir. Ayrıca kontrol-opere gruba günlük olarak, ip yol ile N-(p-Amilsinamoil) antranilik asit (ACA)’nın çözücüsü olan dimetil sülfoksit (DMSO) fosfat tamponu solüsyonu (PBS) içinde çözülmüş olarak 500 µL (400 µL PBS+100 µL DMSO) uygulanmıştır. Memantin alan gruplarda memantin; izotonik NaCl solüsyonunda, aynı hacimde (500 µL) çözülerek ip verilmiştir. Kontrol grubuna herhangi bir girişim uygulanmamış ya da bu grupta terapötik amaçlı herhangi bir farmakolojik ajan kullanılmamıştır (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Çalışma takvimi

3.4. İntarserebroventriküler streptozotosin uygulaması

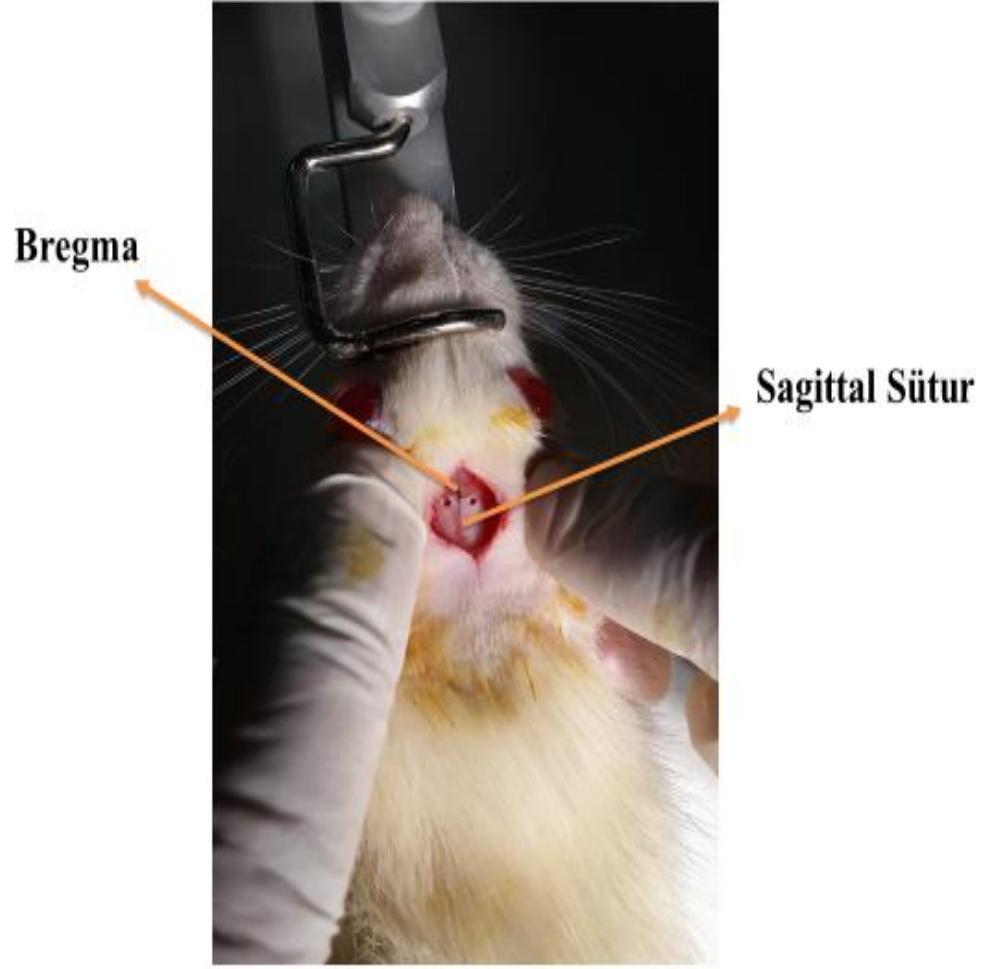
Sıçanlara, ketamin hidroklorür (100 mg/kg, ip) ve ksilazin hidroklorür (5 mg/kg, ip) kullanılarak anestezi uygulanmıştır (40–50 dk anestezi etkisinde kalmışlar, bu süreden sonra sıçanlar kendiliğinde uyanmışlardır). Anestezi işlemi sonrasında stereotaksik cihaza yerleştirilen sıçanların kafa derileri iyodin solüsyonu ile temizlendikten sonra, orta hatta sagittal, düz, yaklaşık 1.5 cm kadar bir kesi yapılmış ve kemik mikro delici sistem aracılığı ile kullanılabilen dril (drill) ile enjeksiyonun yapılacağı belirlenen noktalara bilateral iki delik açılmıştır (burr-hole). Çalışmaya başlamadan önce ön çalışmamızda, açılan bu deliklerden sol taraftakine metilen mavisi verilmiş, sol taraf lateral ventriküle ulaşır ulaşamadığımız test edilmiştir (Resim 3.1.). Deliklerin açılmasında, kemik mikrodeleri sisteme takılan, uçlarında 0,3 mm çapında haraplayıcı bir topuzu bulunan driller kullanılmıştır. Paxinos and Watson atlasına [165] göre ICV STZ uygulanan koordinatlar; bregmadan posteriora 0.8 mm, sagittal süturdan laterale 1.5 mm, beyin yüzeyinden aşağıya 3.6 mm'dir [129] (Resim 3.2., Resim 3.3. ve Resim 3.4.).



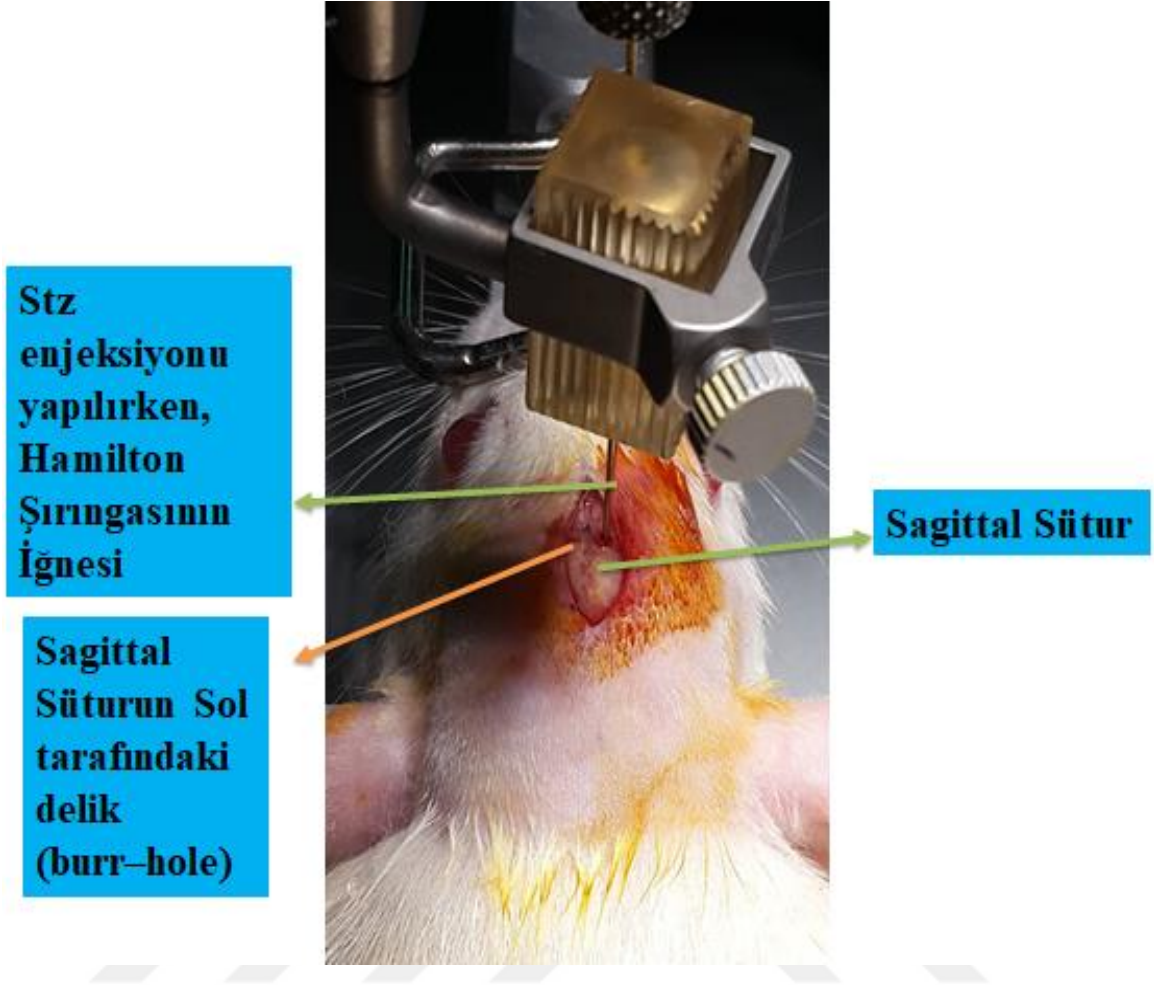
Resim 3.1. Belirtilen koordinatlardan, Hamilton şırıngası ile metilen mavisi verildiği bölgede, soldaki resimde, kortekste, metilen mavisinden kaynaklanan mavimsi renklenme ve sağ serebral ventriküle metilen mavisi enjekte edildikten sonra ventrikül içinde ve çeperinde biriken boyanın sebep olduğu renklenme. Sağdaki resimde, yine sağ serebral ventrikülün posteriordan, doku Bouin solüsyonu ile fikse edildikten sonraki görünümü. Soldaki kesitin kalınlığı 0.5 mm'dir.



Resim 3.2. Anestezi altındaki sıçanın, stereotaksik cihazda pozisyonu.



Resim 3.3. Bregma referans noktası kabul edilerek, sagittal suturen her iki tarafından serebral ventriküllere ulaşmak için açılan delikler.



Resim 3.4. Sıçana, ICV STZ enjeksiyonu yapılırken. Orta hatta sagittal suture görülmektedir. Sagittal sutureun sağ tarafındaki kemik mikro delici sistem ile kafatası alt yüzeyinden 3.6 mm Hamilton şırıngası ile inilerek STZ enjekte edilmiştir. Hemen ardından, sagittal sutureun sol tarafında görülen delikten de sol serebral ventriküle STZ enjeksiyonu yapılacaktır.

DeneySEL Alzheimer modeli oluşturulacak hayvanlara, %0.9'luk NaCl içinde çözülmüş olan STZ, Hamilton şırınga ile 0. günde, tek doz, bilateral, ICV 3 mg/kg dozunda uygulanmıştır [166]. Enjeksiyon, sagittal sutureun hem sağ tarafına (300 g ağırlığındaki sıçan için 0.45 mg STZ/5 µL) hem de sol tarafına (0.45 mg STZ/5 µL) yapılmıştır.

3.5. Morris su tankı deneyleri

Yarı tesadüfî olarak (semi-randomly), MWM'deki yüzme denemeleri ve son gündeki prop denemesi için her bir hayvanın başlangıç noktaları aşağıda gösterilen tablodaki gibidir (Tablo 3.2.).

Tablo 3.2. Morris su tankı deneylerinde, deney hayvanlarının yüzme denemelerine başlangıç noktaları.

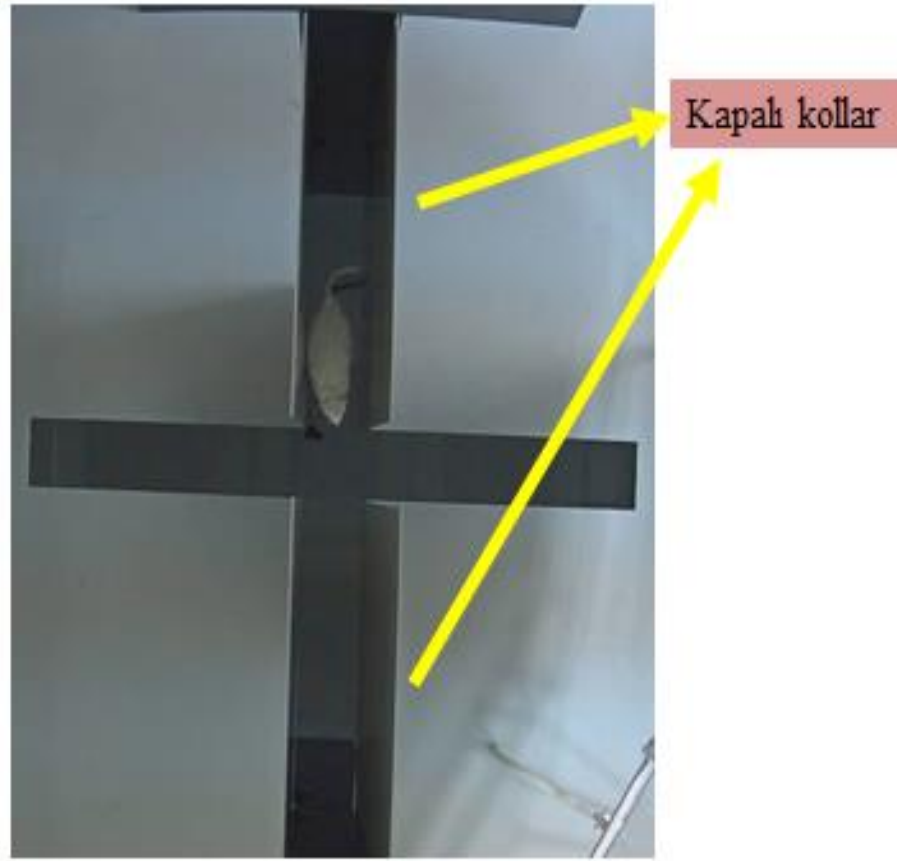
Gün	1. Deneme	2. Deneme	3. Deneme	4. Deneme
1.	Kuzey	Doğu	Güneydoğu	Kuzeybatı
2.	Güneydoğu	Kuzey	Kuzeybatı	Doğu
3.	Kuzeybatı	Güneydoğu	Doğu	Kuzey
4.	Doğu	Kuzeybatı	Kuzey	Güneydoğu
5.	Kuzeydoğu	Prop denemesi		

Belirtilen konumlardan, yarı rastlantısal olarak başlayan testlerde, her sıçanın platformu bulabilmesi için en fazla 60 sn beklenmesi, platformu bulamayan sıçanların platforma taşınarak platform üzerinde 5 sn kalmalarının sağlanması ve denemeler arasında, her sıçan için 20 sn'lik bir bekleme süresi belirlenmiştir. Her denemede, sıçanın platformu bulma süresi kaydedilerek, ardışık denemelerde platforma ulaşma sürelerinde anlamlı azalma gözlenmesi; başarılı bir öğrenme olarak kabul edilmiştir.

3.6. Yükseltilmiş T labirenti testi (Elevated plus maze test)

Çalışmanın 19. gününde, tüm gruplara yükseltilmiş T labirenti testi yapılmıştır. Test süresi 5 dk olarak belirlenmiştir. Artı şeklinde, deney hayvanının üzerinde yürütmesine izin veren dört kollu, yerden yüksekliği 90 cm olan bir deney düzeneği kullanılmıştır. Kollardan ikisinin etrafı kapalı, ikisinin ise açıktır (Resim 3.5.). Deney hayvanının açık kollarda mı yoksa kapalı kollarda mı daha çok kaldığı ya da her bir grubun açık kollarda veya kapalı kollarda ortalama kalış süresine göre terapötik ajanın anksiyete üzerindeki

etkisi değerlendirilir. Bazı modifikasyonları ile öğrenme ve hafıza deneylerinde de kullanılmaktadır. Çalışmamızda, grupların platformun orta noktasına ortalama uzaklıkları ve grupların açık kollarda geçirdikleri toplam zaman değerlendirilmiştir.



Resim 3.5. Deney hayvanının yükseltilmiş T labirenti test platformundaki pozisyonu. Dört koldan ikisinin etrafı kapalıdır. Deney hayvanları, doğaları gereği kapalı kollarda kalmaya daha yatkındırlar.

3.7. Açık alan habituasyon testi (Open-field test)

Çalışmanın 20. gününde, tüm gruplara AAH testi uygulanmıştır. Test süresi 5 dk olarak belirlenmiştir. Deney hayvanlarının lökomotor aktiviteleri, AAH ile değerlendirilmiştir. Bu deney için etrafı deney hayvanının aşır çıkamayacağı yükseklikte ahşap korunakla çevrili, 90 cm x 90 cm alanında bir platform kullanılmıştır [167].

3.8. İmmunohistokimyasal çalışma

Sıçanların hipokampus bölgesi çıkartıldıktan hemen sonra sıvı azotla dondurularak kriyo tüplere konuldu ve analiz için -80°C 'de saklandı. Doku lizatlarını hazırlamak için taze olarak HEPES Buffer [β -gliserofosfat (20 mM), sodyum pirofosfat (20 mM), benzamidin (10 mM), ditiyotritol (1 mM), HEPES (pH 7.5) (20 mM), Na_3VO_4 (0.2 mM), NaF (20 mM), EDTA (2 mM), leupeptin (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), aprotinin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)] hazırlandı. Dokular HEPES buffer ile homojenize edildi (TissueLyser LT, Qiagen, Germany) ve analiz için -80°C saklandı. Doku lizatlarındaki protein konsantrasyonu BCA (Bikinkoninik asit) yöntemi ile 562 nm'de microplate reader ile ölçüldü (Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek, USA). Protein ölçümü yapıldıktan sonra, her kuyucukta eşit protein olacak şekilde hesaplamalar yapıldı. 1 mm kalınlığında 10 kuyucuklu %10'luk jel hazırlandı (Tablo 3.3.). Hazırlanan örnekler protein denatürasyonu için 95°C 'de 5 dk. ısıtıldı. Jeldeki kuyucuklara hazırlanan örnekler ve protein marker (10-260 kDa, cat. no: 26634, Thermo Fischer, USA) yüklendi. Elektroforez tankına yerleştirilen jele, running buffer ile 1 saat 50 V ve 2 saat 80 V'da elektroforez işlemi yapıldı. Jel boyutunda kesilen PVDF membran metanol ile 1 dk. aktifleştirildikten sonra Transfer Buffer ile yıkandı ve sonra siyah filtre-ıslak beyaz watman kâğıdı-jel-membran- ıslak beyaz watman kâğıdı-siyah filtre olacak şekilde kasete yerleştirildi. Jelden membrana proteinlerin geçmesini istediğimizden jel negatif uca (katot), membran pozitif uca (anot) yerleştirildi. Tank transfer buffer ile dolduruldu ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 25 V'da gece boyu ıslak transfer işlemi yapıldı. Transfer işlemi ponceau boyaması ile kontrol edildi. Ponceau kırmızısından kurtulmak için membran 3 kez 10 dk. TBST (Tris Buffer Saline %0.05 Tween) ile yıkandı. Renk kaybolduktan sonra membran %5 NFDN/TBST ile 1 saat oda sıcaklığında bloklandı. Bloklama işleminden sonra membran 3 kez 10 dk. TBST ile yıkandı. GSK $3\alpha/\beta$ primer antikor (sc-7291, Santa-Cruz, USA) %3 BSA içeren TBST ile 1/500 oranında dilüe edildi ve membran $+4^{\circ}\text{C}$ 'de gece boyu inkübe edildi. TRPM2 (TRPM2-L, full-length TRPM2 isoform) primer antikor (NB110-81601, Novus Biologicals, USA) %2 BSA içeren TBST ile 1/1000 oranında dilüe edildi ve membran $+4^{\circ}\text{C}$ 'de gece boyu inkübe edildi. Loading kontrol olarak da TBST ile 1/1000 oranında dilüe edilen beta-aktin kullanıldı (sc-47778, Santa-Cruz, USA). Sabah oda sıcaklığında 3 kez 5 dk. TBST ile yıkandı. Sekonder antikor (mouse anti-rabbit HRP, sc-2357, Santa-Cruz, USA) %2 BSA içeren TBST ile 1/1000 oranında dilüe edildi; sekonder antikor (m-IgG κ BP-HRP, sc-516102, Santa-Cruz, USA) %3 BSA içeren TBST ile 1/1000 oranında dilüe edildi; sekonder antikor (m-IgG κ

BP-HRP, sc-516102, Santa-Cruz, USA) 1/1000 oranında TBST ile dilüe edildi ve sırasıyla TRPM2, GSK 3 α / β ve β -aktin membranları ile oda sıcaklığında 1.5 saat inkübe edildi. 3 kez 10 dk TBST ile yıkandı. ECL prime (cat. no.34080, Thermo Fischer, USA) ile kemilüminesans olarak bantlar görüntülendi (ImageLab, Bio-Rad, USA) ve beta aktine göre normalize edilerek dansitometrik analizi yapıldı.

Tablo 3.3. %10'luk iki (2) jel için gerekli kimyasallar ve miktarları

%10'luk 2 jel için	Stack (ml)	Resolving (ml)
Acrylamide/Bis (%30)	0,85	3,325
Tris-HCl (1M, ph:6.8)	0,625	
Tris-HCl (1.5M, ph:8.8)		2,5
SDS (%10)	0,05	0,1
Distile su	3,4	3,975
Amonyum persülfat (%10)	0,05	0,1
TEMED	0,005	0,004
Total Hacim	5	10

3.8.1. Western blot deneyinde kullanılan solüsyonlar

HEPES (2x, ph 7.5)

HEPES asit	0.12 g
NaCl	0.16 g
Na ₂ HPO ₄	0.0021 g

Hacim dH₂O ile 10 ml'ye ayarlanır.

Na₃VO₄ (0.2 M, pH 10.0, activated)

Na ₃ VO ₄	1.84 g
H ₂ O	50 ml

Not: Çözelti rengi sarıdan beyaz olana kadar kaynatılır ve pH 10'da stabilize olana kadar işlem tekrar edilir.

Sample Buffer

1 M Tris-HCl (pH 6.8)	2.4 ml
SDS	0.8 g
Bromfenol mavisi	40 mg
dH ₂ O	3.1 ml
Gliserol	4 ml

Kullanılacak miktarın %5 kadar β -merkaptoetanol eklenmelidir.

Running Buffer (pH 8.3) 1x

Tris-Base	25 mM	3.03 g
Glisin	192 mM	14.4 g
SDS	%0.1	1 g

Hacim dH₂O ile 1 L'ye ayarlanır.

Transfer Buffer (Towbin) (pH 8.3) 1x

Tris	25 mM	3.03 g
Glisin	195 mM	14.63 g
Metanol		200 ml

Hacim dH₂O ile 1 L'ye ayarlanır.

Ponceau Boyası

Asetik asit	25 ml
Ponceau kırmızısı	0.5 g
dH ₂ O	500 ml

TBS (pH 7.4) 10x

Tris (25 mM)	3 g
NaCl (137 mM)	8 g
KCl (27 mM)	2 g

Hacim dH₂O ile 100 ml'ye ayarlanır.

TBST (pH 7.4)

TBS (10x)	0.1 L
dH ₂ O	0.8 L
Tween 20 (%0.05)	0.5 ml

Hacim dH₂O ile 1 L'ye ayarlanır.

Blocking Buffer (%5 NFDM)

Non-Fat-Dry Milk	5 g
TBST	100 ml

3.9. Elisa

Sıçanların serumlarında TNF- α düzeyleri, sıçan TNF- α elisa kiti ile tespit edilmiştir (Katalog no: KRC3011; Thermo Fisher Scientific, USA). Bu elisa kiti; katı bazlı sandviç elisa tekniği (solid-phase sandwich enzyme-linked immunosorbent assay) prensibine dayanan bir kittir. Serumlar hazırlanırken sıçanlardan alınan kan numuneleri, 30 dk boyunca oda ısısında (18–26 °C) bırakılmış ve pıhtılaşmaları beklenmiştir. Daha sonra numuneler +4 °C'de ve 2000 rpm'de (revolutions/min), soğutmalı bir santrifüj cihazında 10 dk santrifüj edilmiştir. Ortaya çıkan süpernatant serum numunesi olarak kullanılmak üzere pastör pipeti ile polipropilen tüplere alınmıştır. Hemolizli ve lipemik serum numuneleri çalışmadan çıkarılmıştır. Serum numuneleri hemen kullanılmayacakları için 0.5 ml'lik hacimlerde, saklanmak için polipropilen tüplere konulmuştur. Serumların donma-çözülme siklusları geçirmesinden kaçınılmış, elde edildikten sonraki bir gün içinde –20 °C'de, daha sonra kullanılacakları zamana kadar –80 °C'de muhafaza edilmiştir.

Analiz için altı kuyucuk şeridi belirlenmiştir. Kullanılmayacak olan kuyucukların ya da kuyucuk şeritlerinin ileriki kullanımlar için 2–8 °C'de muhafaza edilerek saklanması planlanmıştır. Serum numuneleri, inkübasyon tamponu ile 1/2 oranında seyreltilmiştir. Çalışmaya başlarken, bütün standartlar, kontroller ve serumlar laboratuvar getirilerek oda ısısına ulaşmaları için bekletilmiştir. Elisa kitiyle birlikte temin edilmiş olan yıkama tamponu konsantrasi, eğer gerekirse (wash buffer concentrate) distile su ile 25 defa seyreltildi (ör: 50 ml 1.25 litreye veya 100 ml 2.5 litreye). Yıkamalar, manuel olarak

yapılmıştır. Yıkamalar için, bir aspirasyon pipeti kullanılmıştır. Pipetin kuyucuğa temas etmemesine özen gösterilmiştir. Aspirasyondan sonra en az 0.4 mL yıkama tamponu her aspire edilen kuyucuğa eklenerek, en az 30 sn kuyucukta bekletilmiştir. Sonra, yeniden aspire edilmiştir. Standart TNF- α solüsyonu (2.000 pg/ml) standart seyreltici tampon (standard diluent buffer) ile bir dizi seyreltme işlemine tabi tutulmuştur. Buna göre; 225 μ L Standart TNF- α solüsyonu, 375 μ L standart seyreltici tampon bulunan tüpe aktarıldığında ve yavaşça karıştırıldığında 750 pg/mL'lik standart sıçan TNF- α solüsyonu elde edilmiştir. Geri kalan yedi tüpün her birine 300 μ L'lik standart seyreltici tampon eklenerek sırasıyla 375, 187.5, 93.8, 46.9, 23.4, 11.7, and 0 pg/mL'lik standart sıçan TNF- α solüsyonu elde edilmiştir. Seri şekilde seyreltilmiş TNF- α solüsyonları, hemen bir saat içinde kullanılmıştır.

Bütün bu hazırlıklar tamamlandıktan sonra elisa prosedürüne geçilmiştir. Standart solüsyonların bir saat içinde kullanılması sağlanacak şekilde dilüsyonlarının hazırlanmasına dikkat edilmiştir. 100 μ L'lik standart, kontrol ve bilinmeyen serum numuneleri kuyucuklara eklenmiştir. Oda sıcaklığında, iki saat inkübasyona bırakılmıştır. İki saat sonunda kuyucuklar aspire edilmiş ve seyreltilmemiş yıkama solüsyonu ile dört defa yıkanmıştır. Sonra, 100 μ L'lik sıçan TNF- α biyotin konjugat solüsyonu (detection antibody) kör kuyucuklar haricindeki her kuyucuğa eklenmiştir. Bir saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Ardından, yine kuyucuklar aspire edilmiş ve seyreltilmemiş yıkama solüsyonu ile dört defa yıkanmıştır. Üçüncü aşamada, 100 μ L'lik seyreltilmemiş %50 gliserol çözeltisi halinde bulunan streptavidin-HRP (enzim) solüsyonu, kör kuyucuklar haricindeki her kuyucuğa eklenmiştir. 30 dk inkübasyon sonrasında seyreltilmemiş yıkama solüsyonu ile dört defa yıkanmıştır. Bağlı bulunan enzimin etki edeceği 100 μ L'lik stabilize kromogen substrat solüsyonu, kör kuyucuklar da dahil olmak üzere her kuyucuğa eklenmiştir. Karanlıkta, 30 dk inkübasyona bırakılmıştır.

Son olarak durduma solüsyonu da eklendikten sonra, 450 nm dalga boyundaki abzorban değerleri tespit edilmiştir. Kör kuyucuklara ait abzorban değerleri, diğer kuyucuklara ait bütün değerlerden çıkarılmıştır. Standart değerleri kullanılarak standart eğrisi elde edilmiştir. Bilinmeyen numunelerin değerleri, bu eğriye göre pg/ml cinsinden tespit edilmiştir.

Serumlarda, MDA düzeyleri, MDA elisa kiti ile tespit edilmiştir (Katalog no: 201–11–0157; Sunred Biological Technology, Shanghai). Aynı prensiple işleyen bu kit ile de MDA düzeyleri nmol/ml cinsinden tespit edilmiştir.

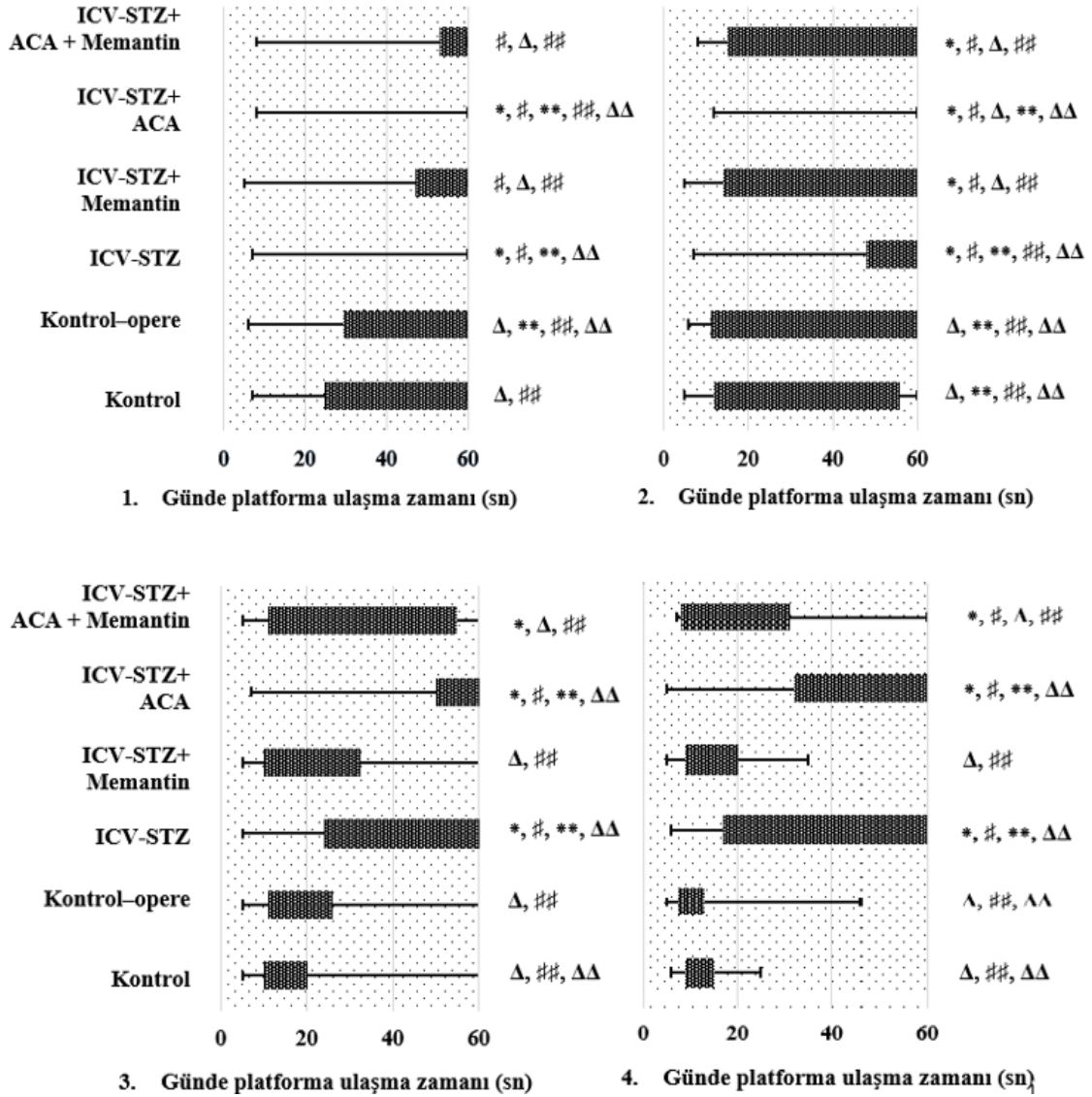
3.10. İstatistiksel analiz

Çalışmamızda grupların normal dağılıp dağılmadığı ortaya konulduktan sonra, ikili kıyaslamalar, her ikisi de normal dağılan gruplar için T testi ile, en az biri normal dağılmayan gruplar için Mann-Whitney U testi ile yapılmıştır. Her biri normal dağılan ikiden fazla grubun birbiri ile kıyaslaması ANOVA testi ile, en az bir grubun normal dağılım göstermediği çoklu kıyaslamalar ise Kruskal Wallis testi ile yapılmıştır. Normal dağılım göstermeyen en az bir grubun bulunduğu çoklu kıyaslamalara ait ileri düzey değerlendirmeler Pairwise çoklu kıyaslama testleri ile yapılmıştır. Hesaplamalar için SPSS 24 yazılım programı kullanılmıştır. Normal dağılan grupların tanımlayıcı istatistikleri ortalama \pm standart hata, normal dağılmayan grupları medyan (%25–%75 persentil değerleri) şeklinde ifade edilmiştir. Kullanılan testlerde anlamlılık düzeyi için $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Morris su tankı sonuçları

N-(p-amilsinnamoil) antranilik asitin, STZ ile oluşturulmuş deneysel öğrenme ve uzaysal hafıza bozukluğu modelinde, MWM deneylerinde, uzaysal hafızada bir düzelme sağlayamadığı görülmüştür. Daha önceki çalışmalarda, APP/PS1 farelerde TRPM2 nakavt halin (TRPM^{-/-}), uzaysal hafızada bir düzelmeye sebep olduğu görülmüştür [168]. Çalışmamızda uzaysal hafızada iyileşme sadece memantin grubunda gözlenmiştir (Şekil 4.1. ve 4.2.). Memantin + ACA kombinasyon tedavisi, öğrenme denemelerinde (acquisition trials) bir miktar iyileşme sağlasa da prob denemesinde kombinasyon tedavisi alan grup ICV-STZ grubu ile istatistiksel olarak benzerdir (Şekil 4.3). Prob denemesindeki grupların ortalama yüzme hızları arasında istatistiksel anlamlı bir fark yoktur (Şekil 4.4.).



Şekil 4.1. Memantin, ACA ve ACA + memantine kombinasyonu tedavisinin, ICV-STZ uygulaması sonrasında, sıçanlarda, MWM deneylerinde 4 (dört) gün boyunca, platforma ulaşma zamanları üzerine olan etkilerinin kutu-bıyık (box-whisker) grafiğinde gösterimi. Grupların platformu bulma zamanları normal dağılım göstermemektedir. Tanımlayıcı istatistik değeri olan platformu bulma zamanı, medyan (Q₁ – Q₃) olarak ifade edilmiştir. Her gün için grupların kıyaslaması Kruskal Wallis testini takiben, Pairwise çoklu kıyaslama testleri ile yapılmıştır. ICV-STZ intraserebroventriküler streptozotosin, ACA N-(p-amilcinnamoil) antranilik asit, Q₁ – Q₃ alt çeyrek – üst çeyrek.

* p<0.05 kontrol grubu ile kıyaslandığında

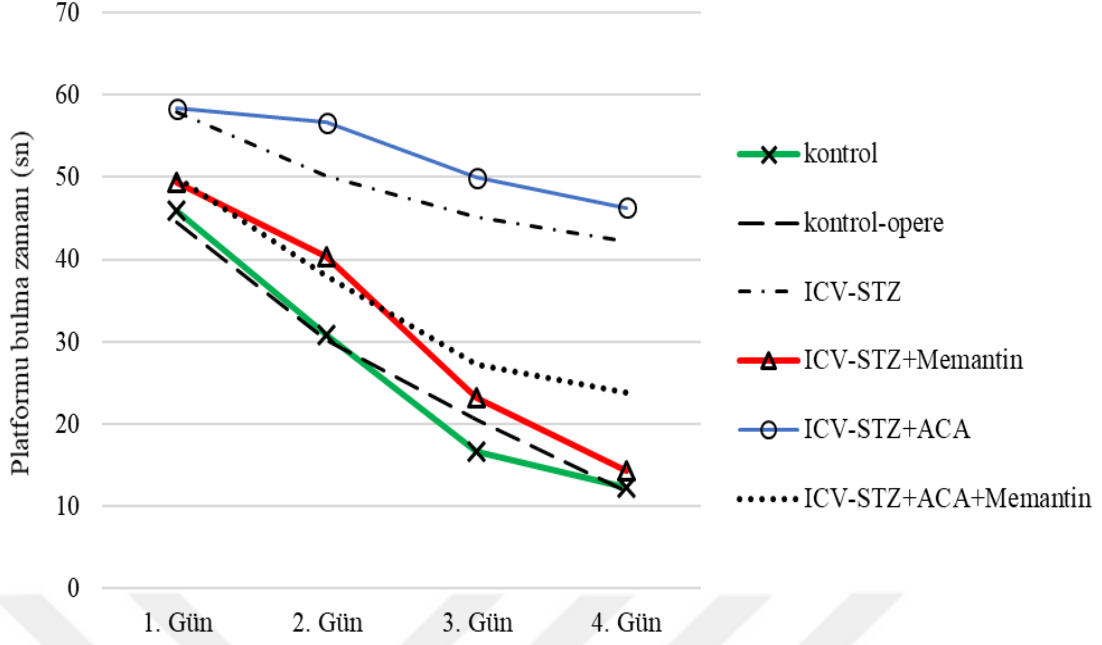
p<0.05 kontrol-opere grubu ile kıyaslandığında

Δ p<0.05 ICV-STZ grubu ile kıyaslandığında

** p<0.05 ICV-STZ + memantin (5 mg/kg) grubu ile kıyaslandığında

p<0.05 ICV-STZ + ACA (25 mg/kg) grubu ile kıyaslandığında

ΔΔ p<0.05 ICV-STZ + ACA (25 mg/kg) + memantin (5 mg/kg) grubu ile kıyaslandığında



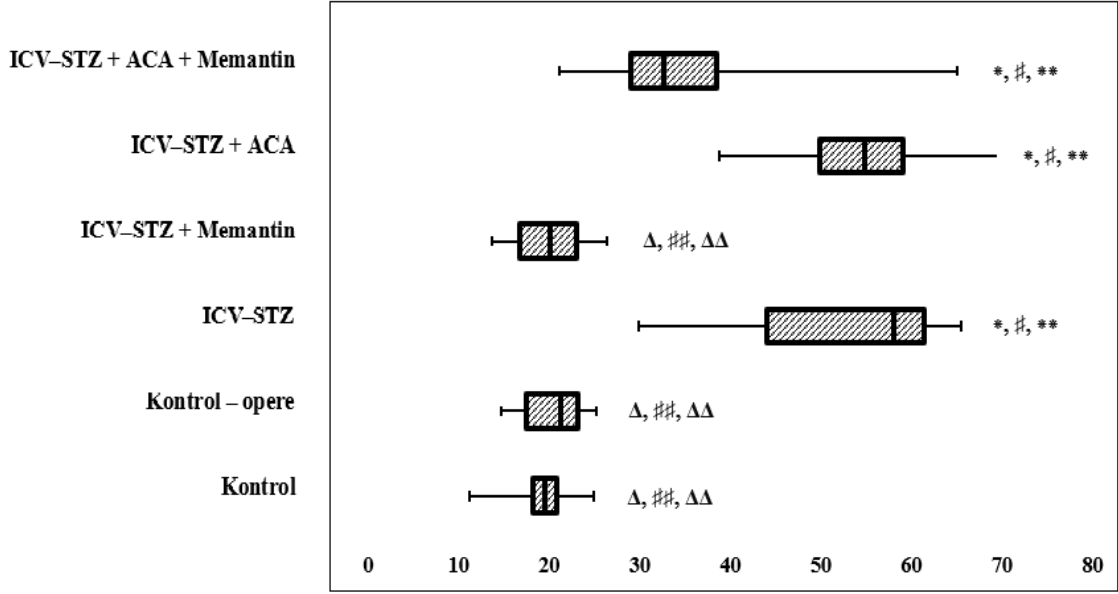
Şekil 4.2. Grupların platformu bulma zamanlarının, günlere göre gelişiminin çizgi grafikte gösterimi. Normal dağılım göstermeyen (şekil 4.1.) değişkenlere ait tanımlayıcı istatistik değeri, grupların günler içindeki gelişimini ve performanslarının birbirlerine göre değişimini çizgi grafik ile gösterebilmek için, her grup ve gün için, ortalama ± standart hata ($\bar{X} \pm S_x$) şeklinde ifade edilmiştir. Kontrol grubu, 1. Gün 45.88 sn ± 1.98, 2. Gün 30.87 sn ± 2.18, 3. Gün 16.65 sn ± 1.18, 4. Gün 12.36 sn ± 0.46. Kontrol-opere grubu, 1. Gün 44.5 sn ± 2.16, 2. Gün 30.27 sn ± 2.21, 3. Gün 20.61 sn ± 1.43, 4. Gün 11.8 sn ± 0.75. ICV + STZ grubu, 1. Gün 58 sn ± 0.73, 2. Gün 50.2 sn ± 1.63, 3. Gün 45.12 sn ± 1.94, 4. Gün 42.14 sn ± 2.08. ICV + STZ + Memantin (5 mg/kg) grubu, 1. Gün 49.41 sn ± 2.02, 2. Gün 40.34 sn ± 2.25, 3. Gün 23.24 sn ± 1.96, 4. Gün 14.3 sn ± 0.81. ICV + STZ + ACA (25 mg/kg) grubu, 1. Gün 58.34 sn ± 0.84, 2. Gün 56.64 sn ± 1.29, 3. Gün 49.95 sn ± 1.97, 4. Gün 46.32 sn ± 2.12. ICV + STZ + ACA (25 mg/kg) + Memantin (5 mg/kg) grubu, 1. Gün 50.07 sn ± 1.99, 2. gün 37.95 sn ± 2.31, 3. Gün 27.23 sn ± 2.31, 4. Gün 23.8 sn ± 2.33.

Platforma varış zamanları açısından, kontrol grubu ile kontrol-opere grup arasında, birinci günde anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p > 0.05$) (Şekil 4.2.). Kontrol grubunun birinci gündeki platforma varış zamanları ICV-STZ grubuna göre anlamlı şekilde düşüktür ($p < 0.001$). Birinci gün ortalamaları açısından memantin grubu, kontrol-opere, ICV-STZ ve ICV-STZ + ACA gruplarının her birinden istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklıdır ($p < 0.05$). Sadece ACA tedavisi alan grubun birinci gün değerleri hem kontrol hem de kontrol - opere gruptan anlamlı şekilde yüksektir ($p < 0.001$). İkinci günde performansı hem kontrol hem de kontrol - opere grubunun gerisinde kalarak istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı olan memantin grubunun üçüncü ve dördüncü günlerde, MWM deneylerinde sergilediği performans ile kontrol ve kontrol - opere gruplarının üçüncü ve dördüncü gün performansları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p > 0.05$). İntraserebroventriküler STZ uygulamasını takiben memantin

+ ACA kombinasyon tedavisi alan grubun MWM deneylerindeki performansı, dördüncü güne gelindiğinde hem kontrol hem de kontrol – opere grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha kötüydü ($p < 0.05$). Ancak bu grubun dördüncü gün performansı hem ICV–STZ grubundan hem de hem de ICV–STZ + ACA grubundan istatistiksel olarak daha iyiydi ($p < 0.05$). Bu bulgumuza göre; memantin + ACA kombinasyon tedavisinde ACA, memantin iyileştirici etkisini zayıflatmış olarak karşımıza çıkmaktadır. Çünkü, yalnızca memantin alan grubun dördüncü gün performansı ile kontrol ve kontrol – opere gruplarının bu performansları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p > 0.05$). Memantin + ACA grubu, dört günlük öğrenme deneyleri süresince ICV – STZ grubuna göre daha iyi bir performans sergilemiş olsa da öğrenme denemelerinin son gününde (dördüncü günde) memantin tedavisi ile başarılı olduğu gibi kontrol grupları ile aynı düzeyde bir performans sağlayamamıştır (Şekil 4.1., Şekil 4.2.). Prob denemesinde ise memantin + ACA grubu memantin tedavisi grubundan ve kontrol gruplarından istatistiksel olarak farklıdır (Şekil 4.3.). Bütün bunlara ek olarak, yalnızca ACA tedavisi alan grubunun, MWM deneylerindeki performansı, istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmasa da tanımlayıcı istatistik değerleri dördüncü günde ICV – STZ grubunun gerisindedir (Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.).

Prob denemesinde; ICV – STZ, ACA ve memantin + ACA gruplarının su tankında yüzerlerken platformun konumlandığı alanın merkez noktasına ortalama uzaklıkları, kontrol–opere, kontrol ve memantin gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde fazladır (Şekil 4.3.).

Prob denemesinde grupların yüzme hızları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 4.4.).



Platformun orta noktasına prob denemesi süresince ortalama uzaklık (cm)

Şekil 4.3. Memantin, ACA ve memantin + ACA kombinasyon tedavisinin, MWM deneylerinin prob denemesi süresince, grupların platformun orta noktasına olan ortalama uzaklıkları üzerine etkisinin kutu-bıyık (box-whisker) grafiği ile gösterimi. Her grup için değerler normal dağılım göstermediği için tanımlayıcı istatistik değerleri medyan (Q₁ – Q₃) olarak ifade edilerek kıyaslanmıştır. Grupların platformun orta noktasına olan uzaklıklarının medyan (Q₁ – Q₃) değerleri şu şekildedir: 1) kontrol grubu 19.53 cm (17.22–22.24), 2) kontrol-opere grubu 21.20 cm (23.82–16.92), 3) ICV-STZ grubu 58.06 cm (36.34–61.53), 4) ICV-STZ + memantin (5 mg/kg) grubu 20.06 cm (22.98–15.68), 5) ICV-STZ + ACA (25 mg/kg) grubu 54.82 cm (49–61.23) ve 6) ICV-STZ + ACA + memantin grubu 32.59 cm (28.58–45.08). ICV-STZ, ICV-STZ + ACA and ICV-STZ + ACA + memantin gruplarının platforma olan uzaklık değerleri, kontrol, kontrol-opera ve ICV-STZ + memantin gruplarının değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı şekilde fazlaydı (p<0.05). Grupların kıyaslaması Kruskal Wallis testini takiben, Pairwise çoklu kıyaslama testleri ile yapılmıştır. ICV-STZ intraserebroventriküler streptozotosin, ACA N-(p-amilcinnamoil) antranilik asit, Q₁ – Q₃ alt çeyrek – üst çeyrek.

* p<0.05 kontrol grubu ile kıyaslandığında

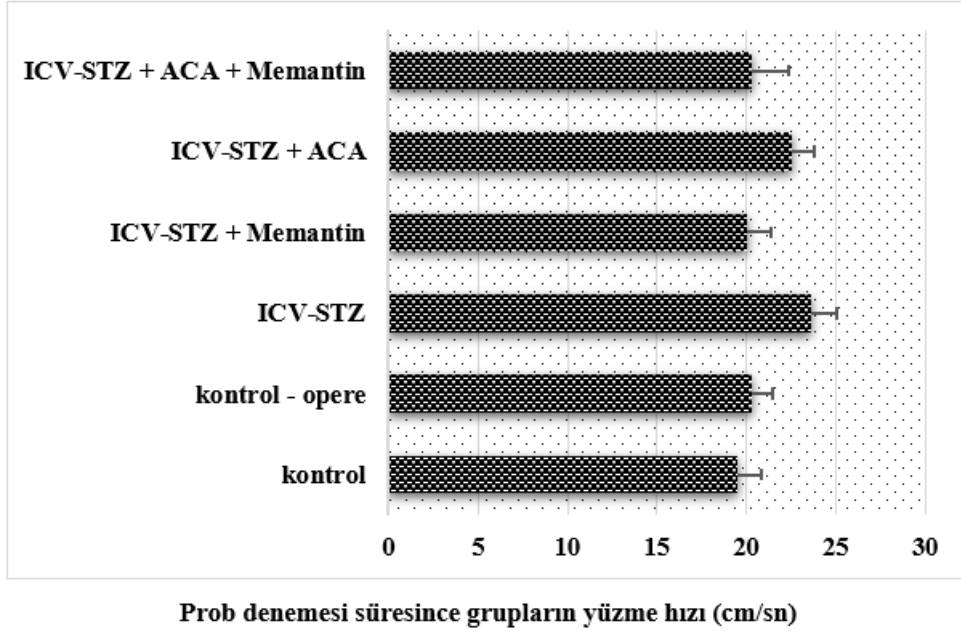
p<0.05 kontrol-opere grubu ile kıyaslandığında

Δ p<0.05 ICV-STZ grubu ile kıyaslandığında

** p<0.05 ICV-STZ + memantin (5 mg/kg) grubu ile kıyaslandığında

p<0.05 ICV-STZ + ACA (25 mg/kg) grubu ile kıyaslandığında

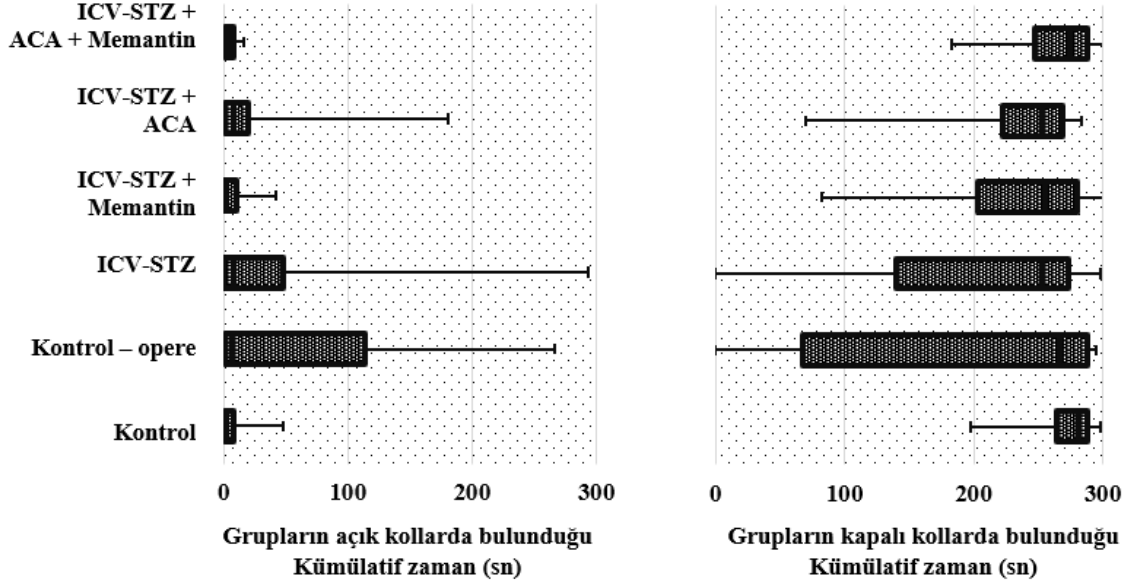
ΔΔ p<0.05 ICV-STZ + ACA (25 mg/kg) + memantin (5 mg/kg) grubu ile kıyaslandığında



Şekil 4.4. Prob denemesi süresince grupların ortalama yüzme hızları. Normal dağılım gösteren değerler; ortalama \pm standart hata ($\bar{X} \pm S_x$) olarak ifade edilecek olursa, her grup için şu şekildedir: 1) kontrol grubu $19.36 \text{ cm/sn} \pm 1.35$, 2) kontrol – opere grubu $20.41 \text{ cm/sn} \pm 1.17$, 3) ICV–STZ grubu $23.59 \text{ cm/sn} \pm 1.46$, 4) ICV–STZ + memantin grubu $19.84 \text{ cm/sn} \pm 1.42$, 5) ICV–STZ + ACA grubu $22.58 \text{ cm/sn} \pm 1.18$ ve 6) ICV–STZ + ACA + memantin grubu $20.26 \text{ cm/sn} \pm 1.98$. Tek yönlü ANOVA analizi ile grupları yüzme hızları arasında anlamlı bir fark ortaya konulamamıştır ($p > 0.05$). ICV–STZ intraserebroventriküler streptozotosin, ACA N-(p–amilcinnamoil) antranilik asit.

4.2. Yükseltilmiş T labirenti testi sonuçları

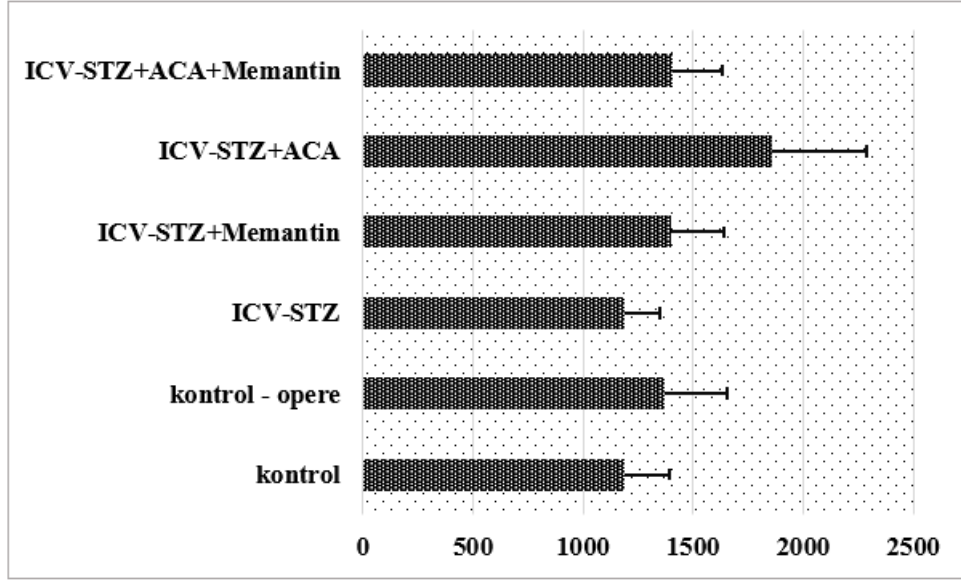
Grupların, açık kollarda ve kapalı kollarda ortalama kalış süreleri değerlendirilerek uygulanan tedavinin deney hayvanlarının anksiyete düzeyi üzerine olan etkisi ortaya konulmuştur (Şekil 4.5.) ($p > 0.05$) [169].



Şekil 4.5. Yükseltilmiş T labirenti testi sırasında, grupların açık ve kapalı kollarda geçirdikleri kümülatif zamanın gösterimi. Grupların içinde normal dağılım göstermeyen değişkenlerin her grup için medyan ($Q_1 - Q_3$) değerleri şu şekildedir: Açık kollardaki kümülatif zamanlar, 1) kontrol grubu 1.88 sn (0.36 – 9.72), 2) kontrol – opere grubu 6.66 sn (0.63 – 169.56), 3) ICV-STZ grubu 7.48 sn (0.4 – 95.6) 4) ICV-STZ + Memantin grubu 2.2 sn (0 – 20.74), 5) ICV-STZ + ACA grubu 8.52 sn (0.9 – 48) ve 6) ICV-STZ + ACA + Memantin grubu; 3.32 sn (0.52 – 10.46). Kapalı kollardaki kümülatif zamanlar, 1) kontrol grubu 281.72 sn (244.84 – 292.36), 2) kontrol – opere grubu 266.8 sn (4.02 – 288.64) 3) ICV-STZ grubu 252.72 sn (116.44 – 282.9) 4) ICV-STZ + Memantin grubu 255.72 sn (187.1 – 281.16), 5) ICV-STZ + ACA grubu 252.6 sn (216.84 – 274.62) ve 6) ICV-STZ + ACA + Memantin grubu 274.44 sn (218.14 – 288.64). Grupların hem açık hem de kapalı kollarda harcadığı kümülatif zamanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$). ICV-STZ intraserebroventriküler streptozotosin, ACA N-(p-amilcinnamoil) antranilik asit, $Q_1 - Q_3$ alt çeyrek – üst çeyrek.

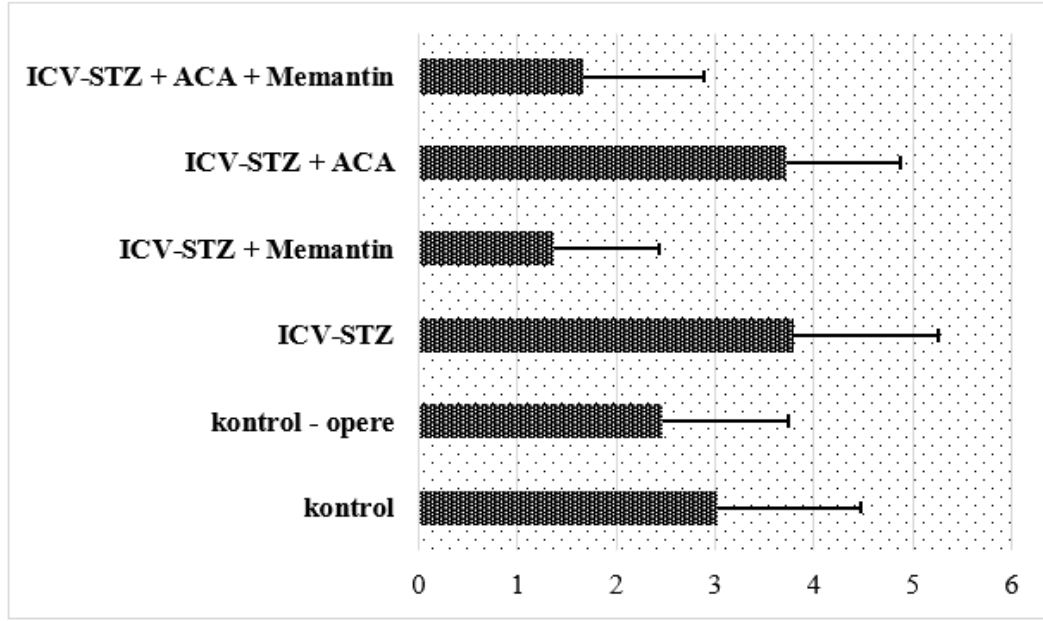
4.3. Açık alan habituasyon testi sonuçları

Açık alan testi sonuçlarına göre gruplar arasında lökomotor aktivite (katedilen ortalama toplam mesafe) ve alanın merkezinde harcanan kümülatif zaman açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 4.6., Şekil 4.7.) ($p>0.05$) [167].



Açık alan testinde grupların kat ettiği toplam mesafe (cm)

Şekil 4.6. Grupların AAH'de kat ettikleri ortalama mesafe açısından [170], aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0.05$). Gruplar içinde normal dağılan değişkenler için tanımlayıcı istatistik değerleri ortalama \pm standard hata ($\bar{X} \pm S_x$) olarak şu şekildedir: 1) kontrol grubu $1188.11 \text{ cm} \pm 202.99$, 2) kontrol-opere $1369.3 \text{ cm} \pm 287.05$, 3) ICV-STZ grubu $1190.12 \text{ cm} \pm 159.64$, 4) ICV-STZ + Memantin grubu $1398.17 \text{ cm} \pm 241.54$, 5) ICV-STZ + ACA grubu $1861.02 \text{ cm} \pm 459.52$ ve 6) ICV-STZ + ACA + Memantin grubu $1405.49 \text{ cm} \pm 230.64$. ICV-STZ intraserebroventriküler streptozotosin, ACA N-(p-amilcinnamoil) antranilik asit.



Açık alan testinde, alanın belirlenmiş merkezi bölgesinde her grubun harcadığı kümülatif zaman (sn)

Şekil 4.7. Açık alan testinde, belirlenen merkezi bölgede her grubun harcadığı kümülatif zamanlara ait ortalama \pm standart hata ($\bar{X} \pm S_x$) şeklinde ifade edilen tanımlayıcı istatistik değerleri şu şekildedir: 1) kontrol grubu $3.03 \text{ sn} \pm 1.44$, 2) kontrol – opere grubu $2.46 \text{ sn} \pm 1.29$, 3) ICV–STZ grubu $3.79 \text{ sn} \pm 1.46$, 4) ICV–STZ + Memantin grubu $1.37 \text{ sn} \pm 1.05$, 5) ICV–STZ + ACA grubu $3.73 \text{ sn} \pm 1.14$ and 6) ICV–STZ + ACA + Memantin grubu $1.66 \text{ sn} \pm 1.22$. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0.05$). ICV–STZ intraserebroventriküler streptozotosin, ACA N-(p-amilcinnamoil) antranilik asit.

4.4. İmmunohistokimyasal sonuçlar

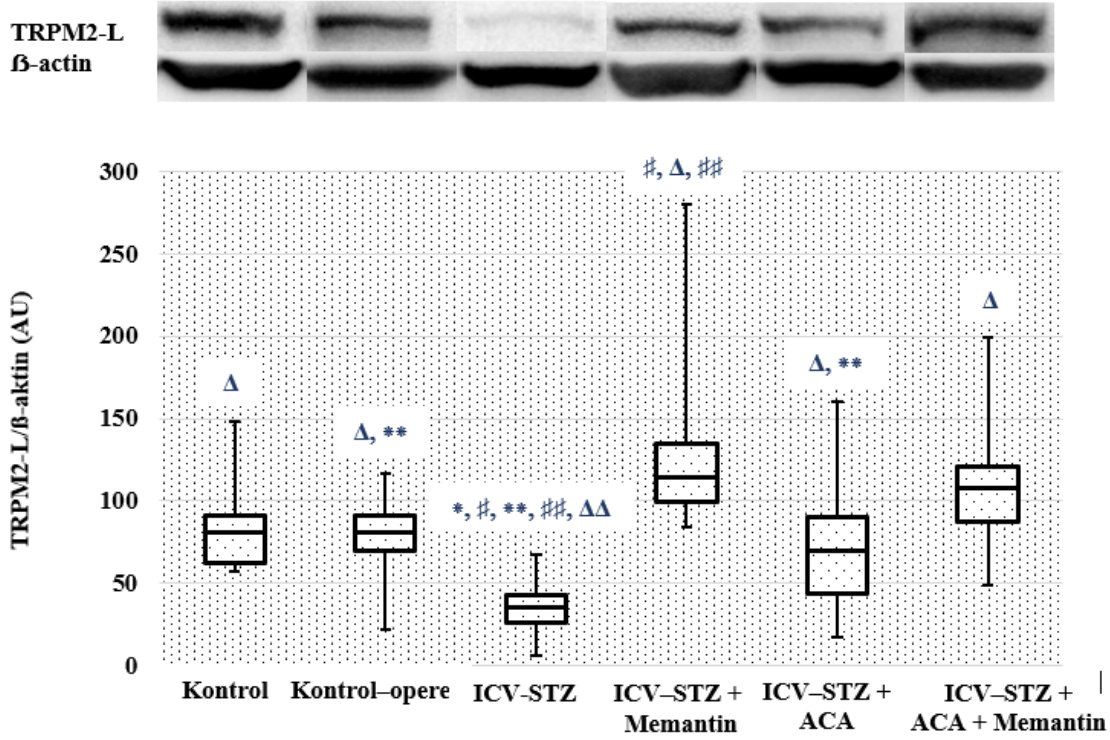
İmmunohistokimyasal çalışmada, western blot immunohistokimyasal yöntem ile hipokampusta TRPM2 kanal proteini ile glikojen sentaz **3 α** ve **3 β** proteinlerinin (GSK–3 α/β) ekspresyonları incelenmiştir.

Bu çalışmada, STZ ile deneysel olarak sıçanlarda oluşturulan öğrenme ve uzaysal hafıza bozukluğu modelinde, ilk defa TRPM2 kanal protein ekspresyonu kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Diabetojenik dozların çok altındaki dozlarda, çalışmamızda olduğu gibi 3 mg/kg dozunda ICV–STZ, sıçanlarda ya da farelerde öğrenme ve uzaysal hafıza bozukluğu modeli oluşturmak için kullanılmaktadır. Streptozotosinin ICV uygulanması ile oluşturduğu toksik etkileri arasında Ca^{+2} homeostazisine olan önemli etkileri de mevcuttur. Streptozotosinin ICV uygulanmasından sonra, hücre içi aşırı Ca^{+2} yüküne sebep olduğu bilinmektedir. İntraserebroventriküler STZ uygulanmasından sonra,

hücrede glutamat ekzitotoksitesinde görülen ultrastrüktürel değişimler, hücre içi aşırı Ca^{2+} birikimi ve mitokondriyel disfonksiyon olarak ortaya çıkmaktadır [171].

Streptozotosin etkisi ile TRPM2 kanal proteini ekspresyonlarının azaldığı görülmektedir (Şekil 4.8.). Kontrol–opere grup ile kontrol grubu arasında istatistiksel bir fark bulunmamaktadır ($p>0.05$). İntraserebroventriküler STZ grubunda TRPM2 kanal proteini ekspresyonu, kontrol ve kontrol–opere gruplara göre anlamlı şekilde azalmıştır ($p<0.01$). Diğer üç gruptaki TRPM2 kanal proteinlerinde ICV–STZ grubuna göre olan artışlar istatistiksel olarak anlamlıdır (ICV–STZ + ACA, ICV–STZ + memantin ve ICV–STZ + ACA + memantin gruplarının herbiri için $p<0.01$). İntraserebroventriküler STZ grubunda, TRPM2 kanal proteini ekspresyonundaki kontrol–opere grubuna göre azalış istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.01$). Glikojen sentaz kinaz–**3a** ve **3b** (fosforile ve non fosforile hallerinin toplam kantifikasyonu) ekspresyonları açısından ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemektedir (Şekil 4.9. ve Şekil 4.10.).

Bu sonuçlara göre; STZ etkisi ile kanal proteini ekspresyonunun azaldığı söylenebilir. Memantin tedavisi sonucunda, TRPM2 ekspresyonunda kontrol – opere gruba göre aşırı bir artış (overexpression) görülmektedir. Yalnızca ACA tedavisi ise TRPM2 kanal proteini ekspresyonunu, STZ uygulaması sonrasında, kontrol ve kontrol – opere grupları ile istatistiksel olarak benzer düzeylere döndürmüş olsa da yalnızca memantin tedavisi kadar büyük bir artış sağlamamıştır (Şekil 4.8.). Memantin + ACA kombinasyon tedavisinde ACA, MWM deneylerinde olduğu gibi memantinin etkisini azaltmış olarak görülmektedir. Ancak, MWM deneylerindeki aksine, ACA'nın memantinin etkisini azaltıcı etkisi, TRPM2 protein ekspresyonu açısından ICV–STZ + ACA ve ICV–STZ + memantin + ACA grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı yol açmamıştır. Ancak yalnızca memantin alan grupla kontrol – opere grubu arasındaki istatistiksel olarak anlamlı fark, kombinasyon tedavisi alan grupla kontrol – opere grubu arasında bulunamamıştır.



Şekil 4.8. Hipokampusta, gruplara göre TRPM2–L kanal proteini ekspresyonları. ICV–STZ uygulamasının TRPM2–L kanal proteini ekspresyonunu baskıladığı görülmektedir. ACA tedavisi ile kanal proteini ekspresyonu kontrol grupları ile benzer düzeylere dönmekte, memantin tedavisi ile ise daha yüksek düzeylere (overexpression) çıkmaktadır. Kruskal Wallis testini takiben Pairwise çoklu kıyaslama testleri ile istatistiksel analiz yapılmıştır. ICV–STZ intraserebroventriküler streptozotosin, ACA N–(p–amilcinnamoil) antranilik asit, TRPM2–L full–length TRPM2 isoform ve AU arbitrary units.

* p<0.05 kontrol grubu ile kıyaslandığında

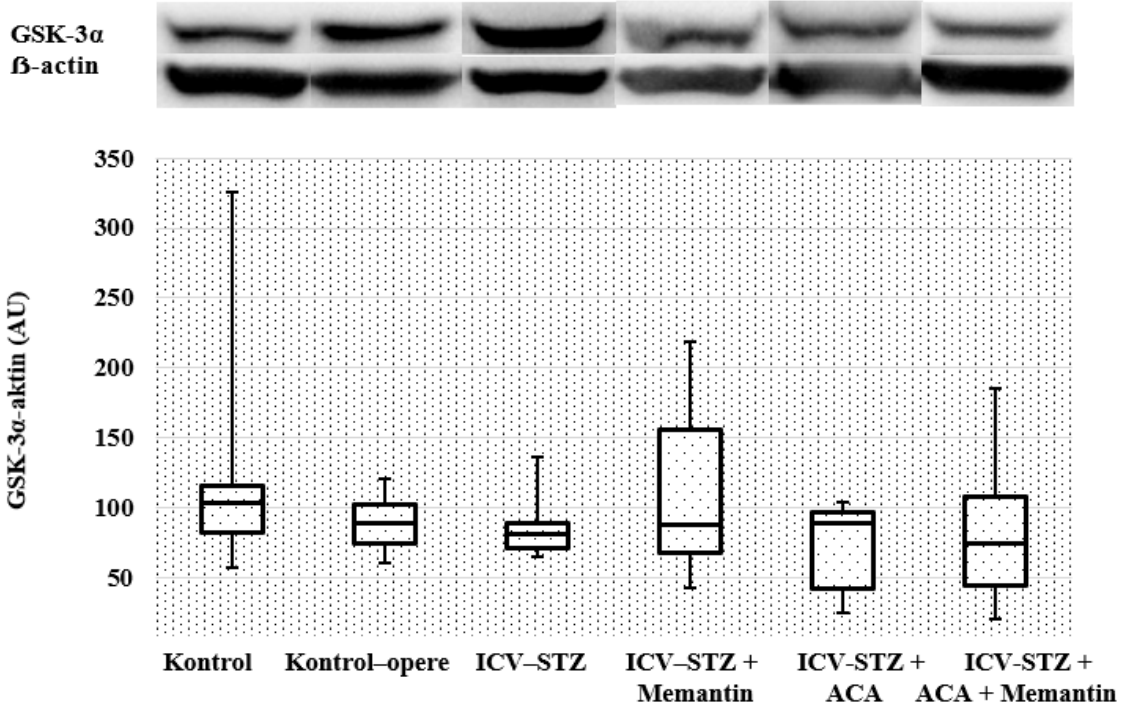
p<0.05 kontrol–opere grubu ile kıyaslandığında

Δ p<0.05 ICV–STZ grubu ile kıyaslandığında

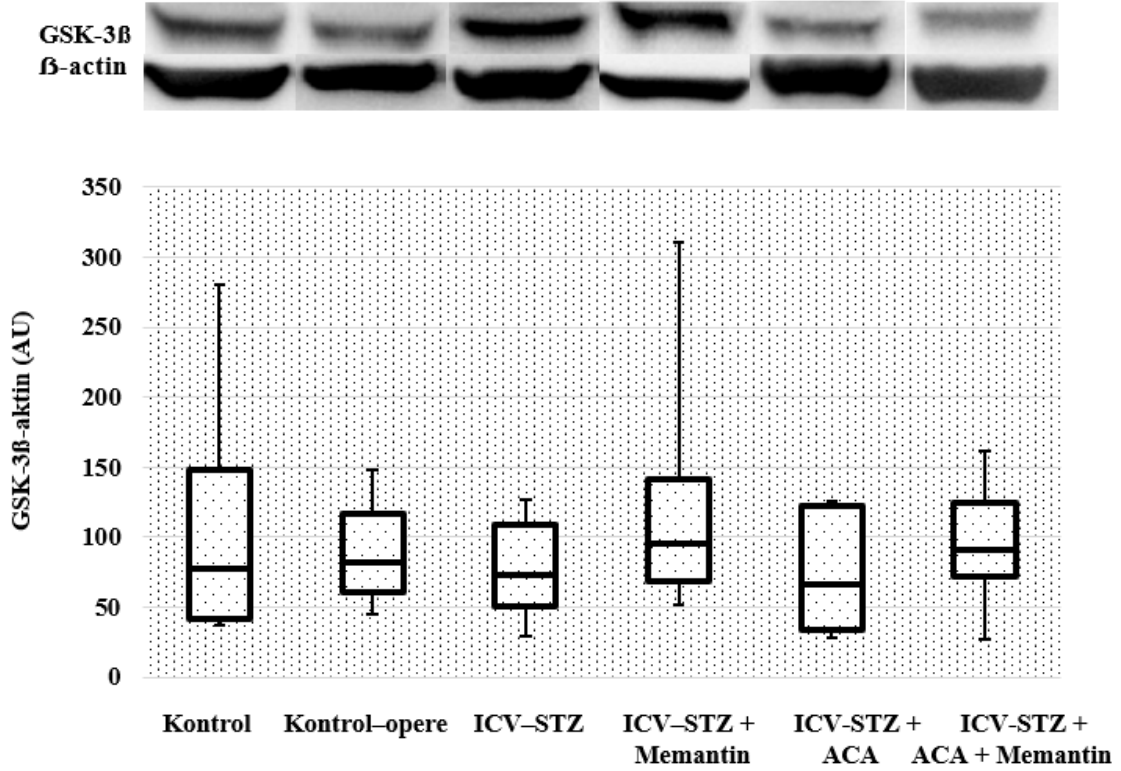
** p<0.05 ICV–STZ + memantin (5 mg/kg) grubu ile kıyaslandığında

p<0.05 ICV–STZ + ACA (25 mg/kg) grubu ile kıyaslandığında

ΔΔ p<0.05 ICV–STZ + ACA (25 mg/kg) + memantin (5 mg/kg) grubu ile kıyaslandığında



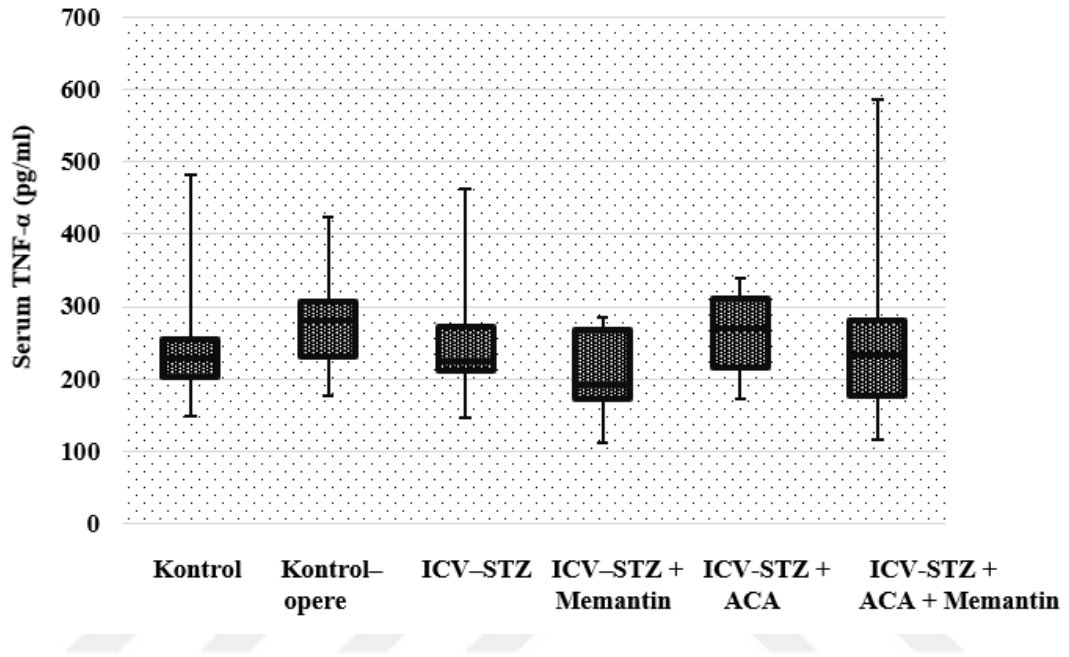
Şekil 4.9. Hipokampusta, gruplara göre GSK-3 α sitoplazmik proteininin ekspresyonları. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$). ICV-STZ intraserebroventriküler streptozotosin, ACA N-(p -amilcinnamoil) antranilik asit ve AU arbitrary units.



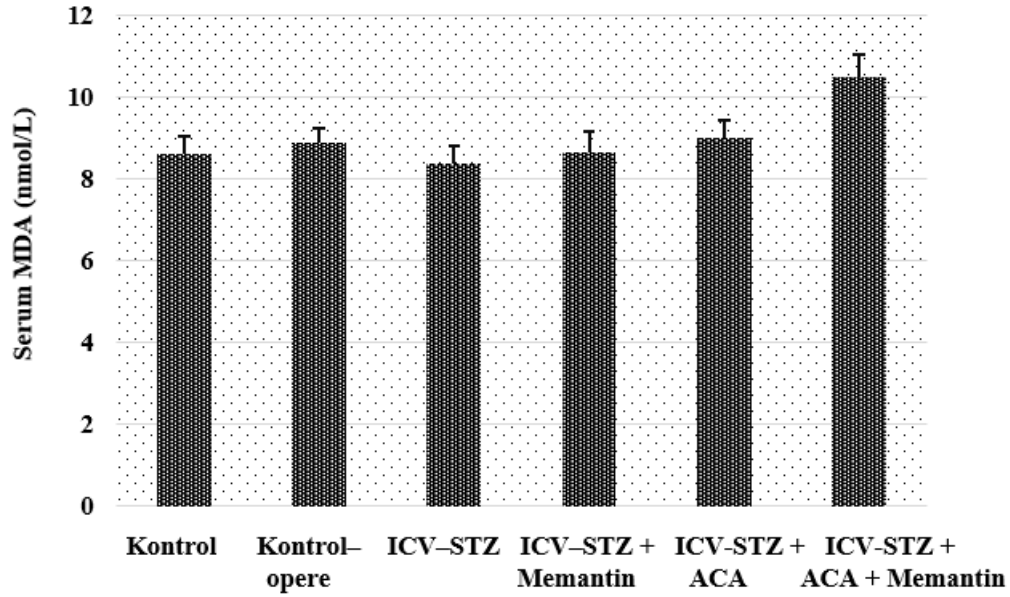
Şekil 4.10. Hipokampusta, gruplara göre GSK-3 β sitoplazmik proteininin ekspresyonları. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$). ICV-STZ intraserebroventriküler streptozotosin, ACA N-(p -amilcinnamoil) antranilik asit ve AU arbitrary units.

4.5. Elisa sonuçları

Hem TNF- α hem de MDA serum seviyeleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p>0.05$).



Şekil 4.11. Serumda gruplara göre TNF- α (pg/ml) düzeyleri arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). ICV-STZ intraserebroventriküler streptozotosin ve ACA N-(p-amilsinnamoil) antranilik asit.



Şekil 4.12. Serumda, gruplara göre MDA (nmol/L) düzeyleri arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). ICV-STZ intraserebroventriküler streptozotosin ve ACA N-(p-amilsinnamoil) antranilik asit.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, ACA (25 mg/kg) ve ACA (25 mg/kg) + Memantin (5 mg/kg) kombinasyon tedavisinin, ICV-STZ uygulamasını takiben sıçanlarda oluşturulan uzaysal hafıza bozukluğu üzerine olan etkileri gözlemlenmiştir. Sonuçlar şu şekildedir: 1) ICV-STZ uygulamasını takiben parenteral ACA tedavisi, Morris su tankı deneylerinden elde edilen verilere göre uzaysal öğrenme ve hafıza üzerinde iyileştirici bir etki göstermemiştir, 2) ACA (25 mg/kg) tedavisi, memantin (5 mg/kg) tedavisi ile combine edildiğinde, sadece memantin tedavisinin uzaysal hafıza üzerinde, tek başına memantin tedavisinin gösterdiği iyileştirici etki görülmemiştir, 3) ICV-STZ uygulaması, hipokampusta TRPM2-L kanal proteini ekspresyonunu baskılamıştır ve 4) Memantin ve ACA tedavileriyle STZ'nin hipokampustaki TRPM2-L kanal proteini üzerindeki baskılayıcı etkisi tersine çevrilmiştir.

Morris su tankı deneylerinde, beklendiği gibi memantin, STZ ile oluşturulan uzaysal hafıza bozukluğunda bir düzelme sağlamıştır. Serbest oksijen radikallerinin artışı ile aktivasyonu gerçekleştiği bilinen TRPM2 kanallarının ACA ile farmakolojik olarak antagonize edilmesi, uzaysal hafızada herhangi bir düzelme sağlamamıştır. Uzaysal

hafızada, düzelme tek başına ACA tedavisinin kullanıldığı grupta görülmediği gibi, memantin + ACA tedavisi de alan grupta da prob denemesinde açıkça ortaya konulduğu üzere bir iyileşme sağlamamıştır. Morris su tankı deneylerinin aksine, yükseltilmiş T labirenti ve AAH testlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Yükseltilmiş T labirenti testinde, grupların anksiyete davranışları, açık ve kapalı kollarda kalış zamanlarının birbirleri ile kıyaslanmasıyla yapılmıştır. Açık alan habituasyon testinde ise grupların lökomotor aktiviteleri arasında herhangi bir fark gözlenmemiştir. Streptozotosin enjeksiyonu sonrasında, TRPM2–L kanal proteinlerine ait protein ekspresyonu, kontrol ve kontrol–opere gruplara göre anlamlı şekilde azalmıştır. TRPM2 kanalının protein ekspresyonu ACA etkisi ile kontrol grupları ile benzer seviyelere, memantin etkisi ile ise kontrol – opere grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek seviyelere (overexpression) gelmiştir. GSK–3 α ve GSK–3 β 'nın protein ekspresyonları açısından ise gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir.

Önceleri TRPC7 ya da LTRPC2 olarak da isimlendirilen [16, 71]. TRPM2 kanalları, ADPR ile hem C terminalinde etkileşen bir kısım içeren (nucleation box) hem de aktive olan ve Ca⁺² iyonuna geçirgen, seçici olmayan bir katyon kanalıdır. TRPM2 kanalları beyinde yaygın olarak bulunmaktadır [16, 172]. Merkezî sinir sistemi içinde, TRPM2 ekspresyonu, mikroglialarda, astrositlerde, hipokampal nöronlarda, substantia nigrada, kortekste, striatumda ve dorsal kök ganglionunda tespit edilmiştir. Hipokampusta TRPM2 mRNA'sı piramidal hücre tabakasında özellikle ekstrasinaptik bölgelerde yoğun şekilde görülmüştür. Reaktif oksijen ve nitrojen ürünlerinin etkisi veya intrasellüler ADPR yoğunluğunun artması ile sonucunda VDKK veya NMDAR'den hücre içine akan Ca⁺², TRPM2 kanal akımına sebep olmaktadır [173].

TRPM2 kanallarının, MSS'de yaygın olarak bulunması sebebi ile önemli görevleri olduğu düşünülmüş ve buna ilişkin çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu kanalların hipokampusta CA3–CA1'deki sinapslarda sinaptik geçişe katkı sunması, mikroglialarda yoğun olarak bulunarak, mikrogliaların ROS ve lipopolisakkarit ile ilişkili aktivasyonlarında rol almaları, sitokin salınımı uyarıcı gibi fizyolojik görevlerinin enflamasyonu alevlendirici ve ROS'a cevaben nöronal hücre ölümüne sebep olan yolakları tetikleyici etkileri de bulunmaktadır [139]. Alzheimer hastalığında, TRPM2 kanallarını rollerini araştıran çalışmalar mevcuttur. Bu kanalların spesifik bir

blokörlerinin olmaması, hücrenin redoks statüsünü ve hücre içi Ca^{+2} homeostazını etkileyen pek çok unsurun bulunması ve TRPM2 kanallarına bağlanan ekstrasellüler bir ligandın yokluğu bu kanalların aktivitelerinin farmakolojik ajanlarla düzenlenmesini oldukça zorlaştırmaktadır. Flufenamik asit, klotrimazol, ekonazol veya 2-APB gibi TRPM2 blokörlerinin ya da antagonistlerinin kanala spesifisiteleri kısıtlıdır. Çünkü, TRPM2 kanalları üzerindeki etkilerinde başka hücre içi farklı fizyolojik svaryaüreçler içinde de yer almaktadırlar. Bu sebeple, bu kanalların AH patogeneğinde muhtemel bir rolünü ortaya koymayı amaçlayan çalışmalar ya hücre kültürü çalışmalarından ya da TRPM2^{-/-} deney hayvanları ile yapılan çalışmalardan oluşmaktadır. Primer striatal hücre kültürlerinde, monomerik A β maruziyeti sonrasında artan hücre içi $[Ca^{+2}]$ ve hücre ölümü oranı, bir dominant kısım negatif varyantın (a dominant negative blocker splice variant, TRPM2-S) etkisi ile azaltılmıştır [143]. TRPM2 genetik delesyonunun, deney farelerinde uzaysal hafıza üzerinde iyileştirici etkisinin olduğu görülmüştür [168].

5.1. İntraserebroventriküler streptozotosin indüksiyonu TRPM2 kanal proteini ekspresyonunu azaltıyor

Çalışmamızda, TRPM2 kanal proteini ekspresyonunun STZ'ye cevaben azalması, ACA ve memantin tedavisine cevaben ekspresyon miktarının artması şeklinde elde ettiğimiz bulgular literatürde ilk defa bizim çalışmamızda görülmüştür. Oksidatif stresin TRPM2 kanal proteini ekspresyonunda değişikliklere sebep olduğu bilinmektedir [148, 174]. Her ne kadar, TRPM2 reseptörlerinin hücre içi bir oksidatif stres algılayıcısı (oxidative stress sensor) olduğu bilinse de öğrenme ve uzaysal hafıza bozukluğu modelinde, ICV-STZ grubunda TRPM2 protein ekspresyonunun azalışı, STZ ile indüklenen aşırı ROS/RNS birikimi ve hasarı neticesinde TRPM2 protein ekspresyonunu düzenleyici olarak ortaya çıkan fizyolojik bir negatif geri-besleme (negative feed-back regulation) mekanizmasından kaynaklanmış olabilir (135). Ayrıca azalan TRPM2 ekspresyonu, TRPM2 ilgili hücre içi yolların tamamen ya da büyük oranda işlevsizleştiği anlamı da taşımamaktadır. Bir çalışmada, STZ etkisi ile TRPM2'ye ait fonksiyonel varyant kantitatif olarak azalmış olmasına rağmen ileri derecede aktive olmuş mevcut TRPM2 kanalları sebebi ile pulmoner kapiller filtrasyon katsayısının artmış olduğu görülmüştür. Bu kanalların inhibisyonu ise kronik hiperglisemiye yol açmış ve oksidatif stres sonucunda artan pulmoner kapiller filtrasyon katsayısını düşürücü etki göstermiştir [175]. Dolayısıyla TRPM2 kaynaklı patofizyolojik cevabın, hücrenin redoks statüsüne bağlı

olarak gelişen kanal proteini ekspresyonundaki ve kanal geçirgenliğindeki değişikliklerin bir kombinasyonu olarak şekillendiğini düşünmekteyiz. Başka bir çalışmada, oksidatif stresi arttırdığı bilinen TBH'den sonra, TRPM2 mRNA ve kanal proteini ekspresyonlarının arttığı gözlenmiştir. Ancak protein ekspresyonundaki anlamlı artış, post-travmatik üçüncü güne kadar ortaya çıkmamıştır [176]. Bir diğer çalışmada ise, TRPM2 kanal proteini ekspresyonunda, oksidatif stresörler olan rotenon ve paraquatın akut ve kronik etkisine karşı farklı değişiklikler ortaya çıktığı görülmüştür. Örneğin rotenonun, akut ve düşük doz maruziyetine karşı TRPM2 mRNA transkripsiyonu artarken, akut ve yüksek doz tesirinde aynı artış gözlenmemiştir. Bununla beraber, rotenonun dört günlük kronik maruziyetinde, TRPM2 mRNA transkripsiyonu istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır. Kronik rotenon maruziyetiyle mRNA transkripsiyonunda görülen artışın aksine, kanal proteini ekspresyonunda anlamlı bir artış meydana gelmemiştir. Parakuatın düşük dozunun akut veya kronik maruziyette, TRPM2 mRNA transkripsiyonunda anlamlı artış meydana gelmiştir. Rotenon maruziyetinden sonra hücre kültürü, TRPM2 kanalının direkt aktivatörlerinden biri olan H₂O₂'ye maruz bırakıldığında ise TRPM2 mRNA ve kanal proteinleri ekspresyonlarında herhangi anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Rotenon ve parakuat etkisiyle mRNA transkripsiyonundaki artışın düşük doz maruziyeti ile gerçekleşmiş oluşu dikkat çekicidir [177]. Bu bulgular hem TRPM2 mRNA transkripsiyonundaki değişikliklerin hem de kanal proteini ekspresyonunda ortaya çıkan değişikliklerin de oksidatif stresörün çeşidine, yoğunluğuna ve maruziyetin süresine göre farklılık gösterdiğine işaret etmektedir [135]. Ayrıca, TRPM2 kanal proteini ekspresyonunun, hücre içi Ca⁺² homeostazını sağlamayı amaçlayan fizyolojik geri-besleme mekanizmalarının etkisi altında olduğunu da düşündürmektedir. Bütün bunlara ilâveten çalışmamızda, STZ ile TRPM2 protein ekspresyonunun azalması, ekspresyonun ACA tedavisi ile yeniden kontrol ve kontrol – opere gruplarıyla benzer düzeylere dönmesi ve memantin tedavisi ile istatistiksel olarak anlamlı şekilde kontrol–opere ve ACA tedavisi gruplarına göre daha yüksek seviyelere gelmesi; STZ uygulamasının ve ACA tedavisinin, hipokampusta TRPM2 kanallarının ekspresyonunda değişikliklere sebep olduğunu gösterdiği gibi, memantin tedavisi sonucu ortaya çıkan aşırı ekspresyon, aydınlatılmayı bekleyen TRPM2 kanalları ile NMDAr arasında olası bir patofizyolojik mekanizma önermektedir [15].

5.2. ACA farklı hücre içi yolları etkilemektedir

Transient reseptör potansiyeli-2'in bilişsek işlevler üzerine etkilerini ortaya koyan çalışmalar, hücre kültürlerinde, TRPM2'ye ait genin fiziksel olarak genomdan çıkarılması veya baskılayıcılarla çalışmasının engellenmesi ile etkisinin görülmemesi (knock-out) yoluyla veya TRPM2 kanalını oldukça yüksek spesifisite ile bloke eden TRPM2 kanal proteininin çeşitli varyantlarının ekspresyonu sağlanarak (co-expression) gerçekleştirilmektedir [143, 168, 174]. Dolayısıyla bu çalışmalar, bir farmakolojik ajanın kullanılmasıyla farklı patofizyolojik yolların etkilenmesi sonucunda, kullanılan medikal ajanın beklenen etkisine ulaşamaması ve daha farklı bazı sonuçların görülmesi gibi risklerden görece olarak muaftır.

Çoğu nörodejeneratif hastalık oksidatif stres ile ilişkilendirilmektedir. Alzheimer hastalığı da bunlardan biridir [3, 10, 53]. Özellikle hücre içi H_2O_2 artışının nörodejenerasyona yol açtığına dair güçlü kanıtlar bulunmaktadır [178]. Reaktif oksijen ürünleri aslında fizyolojik devamlılık için gereklidir. Oksijen radikalleri, hücresel solunumda, mitokondriyel elektron transport zinciri reaksiyonlarının bir yan ürünü olarak sürekli ortaya çıkmaktadır. Oksijen radikalleri fizyolojik mekanizmaların içinde işlevsel olarak yer aldıkları içi ROS/RNS düzeyi hücre içinde kararlı bir durumda (steady-state level) ikame ettirilir [179]. Buna rağmen, hücrenin redoks statüsünde ROS/RNS birikimi sonucunda oksidatif stres lehine bir kayma oluşması ve TRPM2 kanallarını aktive eden özellikle H_2O_2 'nin birikimi, MSS nöronlarında apoptotik mekanizmalar aracılığı ile hücre ölümüne sebep olmaktadır [180]. Hidrojen peroksit uygulamasını takiben, agaroz jelde hücre kültüründen elde edilen DNA'nın katmanlanması (DNA laddering) görülmekte, nükleer ve kromatin yapısında apoptoz ile uyumlu morfolojik değişiklikler meydana gelmektedir. Ayrıca, H_2O_2 uygulamasından sonra, hücre içi $[Ca^{+2}]$ dramatik bir artış gözlenmiştir. Bu bulgular, hücrenin H_2O_2 maruziyeti ile apoptotik mekanizmalar arasında bulunan güçlü bir bağı gözler önüne sermektedir [181]. Hidrojen peroksit, mitokondriyel disfonksiyona, hücre içi ATP yoğunluğunun azalmasına ve PARP aktivasyonuna sebep olarak da düşük konsantrasyonlarındaki maruziyetiyle nekroza ve yüksek konsantrasyonlarında ise apoptoza sebep olmaktadır [182]. Hidrojen peroksidin, toksik etkisi hücre dışı Ca^{+2} 'un yokluğunda ortadan kalkmaktadır. Bu durum hücre içine Ca^{+2} girişinin, H_2O_2 maruziyeti ardından gerçekleşen nöronal hücre ölümünün hücre içi $[Ca^{+2}]$ 'da artışa bağlı olarak gerçekleştiğini göstermektedir. Kortikal nöron hücre

kültürlerinde, gen sessizleştirme (gene silencing) ile TRPM2 geni hedef alındıktan sonra, H₂O₂ ile uyarılan [Ca²⁺]_i'nin baskılandığı gözlenmiştir. Bu bulgular, oksidatif stres kaynaklı nekroz ve apoptoz süreçlerine H₂O₂ ve TRPM2 kanallarının aracılık ettiğine işaret etmektedir [136].

N-(p-amilsinamoil) antranilik asit; etkinliği sekretuar (sPLA₂), Ca²⁺'dan bağımsız (iPLA₂) ya da Ca²⁺ bağımlı (cPLA₂) gibi fosfolipaz A₂ (PLA₂)'nin farklı alt tiplerine has olmayan geniş spektrumlu bir fosfolipaz A₂ (PLA₂) inhibitörüdür [183]. Her ne kadar ACA bilinen en güçlü TRPM2 antagonizmasını sağlasa da [147] PLA₂ ile ilgili hücre içi yolları da etkilemektedir. TRPM2 kanalları, hücre içi bir oksidatif stres algılayıcısı ve oksidatif stres kaynaklı nöronal hücre ölümünün sebebi olarak görülmektedir. Ancak, ACA'nın sistemik olarak uygulanması ile sadece TRPM2 antagonizmasına bağlı etkilerin ortaya çıkmasından bahsetmek mümkün değildir. Araşidonik asit, PLA₂'nin enzimatik etkinliği ile fosfolipitlerden ayrılan hem hücre içi hem de hücre dışı bir mediyatördür. Araşidonik asit metabolizması ile hafıza işlevlerini ilişkilendiren çalışmalar bulunmaktadır. Wistar türü sıçanlar ile yapılan bu çalışmalardan birinde, AA salınımını azaltan nordihidroguaiaretik asidin (NDGA) Morris su tankı deneylerinde uzaysal hafızayı bozucu etkisi gösterilmiştir [184]. Fujita ve ark. [185] hipokampusta iPLA₂'nin yüksek yoğunluklarda bulunması sebebiyle kullandıkları iPLA₂ inhibitörü bromoenol laktonun, uzaysal hafıza üzerinde olumsuz etkilerinin olduğunu göstermişlerdir.

5.3. TRPM2 katyon kanalından iyon akışı fizyolojik olarak önemlidir

En başta kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar olmak üzere, TRPM2 kanallarının pek çok patolojik süreç ile ilişkilendiren çalışmaların [186] sıkça karşımıza çıkması sebebi ile bu kanalların fizyolojik işlevleri zaman zaman göz ardı edilmektedir. Örneğin, bilindiği gibi, nötrofiller gibi granülositler ve makrofajlar gibi monositik serinin hücreleri, çeşitli patojenlerle karşılaştıklarında aktive olup ROS üretebilirler. İmmun sistemin önemli bir komponenti olan bu olaya oksidatif patlama (respiratory burst) denir. Transient reseptör potansiyeli melastatin-2 kanalları, artan ROS yükünü ve [Ca²⁺]_i'yi takiben bir pozitif geri-besleme mekanizması ile oksidatif patlama sürecinde yer almaktadırlar. Hidrojen peroksit ya da TNF- α maruziyeti karşısında TRPM2 kanallarında sürekli ve yoğun iyon akışı ve artmış [Ca²⁺]_i apoptozise ve hücre ölümüne yol açarken, [Ca²⁺]_i'de geçici yükselmeler ERK1/2 ve Bcl-2 genlerinin transkripsiyonunu arttırarak hücreyi apoptozisten korumaktadır [140]. Hücreler tarafından, evrensel bir ikincil haberci olan

[Ca²⁺]_i 'nın çok hassas bir dengede devam ettirilmektedir. Hücre içinde [Ca²⁺] artışı apoptotik mekanizmaların aktivasyonunu sağladığı gibi, [Ca²⁺]_i 'nın yetersizliği de bazı patolojilere yol açmaktadır. Bir prolin – lösin yer değiştirme mutasyonuna (substitution mutation) uğramış CALHM1 (Ca²⁺'a geçirgen bir katyon kanalı) azalmış [Ca²⁺]_i 'a sebep olarak Aβ birikimini arttırmaktadır [77]. Bu defa TRPM2 kanal proteininde yine bir prolin – lösin yer değiştirme mutasyonunun, farklı kinetik özelliklerde bir TRPM2 kanalı meydana çıkmasına yol açarak hem ALS hem de PH patolojisine katkısı olabileceği farkedilmiştir [187]. Burada da dikkat çekici bulgu; bu TRPM2 mutasyonu ALS ve PH patogenezi ile ilişkilendirilirken, mutasyonun, TRPM2 kanalının kinetik özellikleri üzerindeki etkisi sebebiyle hücrede bir [Ca²⁺]_i artışı değil, azalışına yol açmasıdır. Yani, [Ca²⁺]_i artışı apoptotik mekanizmaları aktive ettiği gibi, [Ca²⁺]_i 'da bir azalış da çeşitli patolojilere zemin hazırlamaktadır. Transient reseptör potansiyeli melastatin–2 kanallarının fizyolojik işleyişe sağladığı katkıya bir diğer örnek ise; mikrogliaların ve diğer fagositik hücrelerin anti–enflamatuvar cevap oluşturma ve ortamdaki uzaklaştırma (clearance) işlevlerinin gerçekleştirilebilmesi için TRPM2 kaynaklı Ca²⁺ akımının gerekli olmasıdır [131, 188]. Sözünü ettiğimiz TRPM2 mutasyonu ile PH ve ALS patolojisi arasındaki ilişki aydınlatılmaya muhtaçtır. Ancak, TRPM2 kanallarının aktivasyonu ile meydana gelen apoptotik hücre ölümünü yegâne terapötik hedef olarak görülmesi, TRPM2 kanalının muhtemel fizyolojik işlevlerinin hakettiği ilgiden yoksun kalması anlamına gelmektedir. Öyle görünüyor ki TRPM2 kanalları hücreyi oksidatif stres maruziyeti sonucunda apoptoza götüren patofizyolojik süreci fitilini ateşliyor olsa da hücre içi hassas Ca²⁺ dengesinin korunması ile ilgili mekanizmalarda da önemli roller üstlenmektedir [135].

5.4. NMDA–TRPM2 etkileşimi

TRPM2 kanallarının kaybı, NMDA aracılığı ile ortaya çıkan sinaptik plastistede, özellikle uzun süreli depresyonda değişikliklere sebep olmaktadır. TRPM2 kanallarının normal işleyişi GSK–3β kinaz aracılı LTD süreci için önemlidir. TRPM2 kanallarının yokluğunda, AMPA reseptörlerinin CA1 bölgesindeki sinaptik geçişe katkısının ve LTD'nin oluşumunun azaldığı görülmüştür [13]. LTD oluşumundaki yetersizliğin

uzaysal hafıza oluşumunu engellediği de daha önce tespit edilmiştir. Memantin ile uygulanan terapötik girişim uzaysal hafızada iyileşme sağlamaktadır [189].

Morris su tankı deneylerinde elde ettiğimiz bulgular literatür ile uyumlu görünmektedir. ACA aracılı TRPM2 antagonizması uzaysal hafızada bir düzelme sağlamamıştır. Bu bulgu ile uyumlu olarak, PLA₂ inhibisyonu ile uzaysal hafızanın bozulduğuna dair kuvvetli deliller sunan, literatürde çeşitli kaynaklar da bulunmaktadır [184, 185].

5.5. GSK-3 α /3 β

Özellikle GSK-3 β enzim izofromu MSS ile ilişkilidir. Alzheimer hastalığında GSK-3 enzimlerinin tutarlı bir şekilde artması söz konusu değildir. Ancak bu enzim düzeylerinin, STZ ile oluşturulan deneysel Alzheimer modelinde nasıl değiştiğini daha detaylı bir şekilde ortaya koyabilmek için, hem GSK-3 α hem de GSK-3 β enzimlerinin aktif ve inaktif formlarına ait düzeylerin ayrı ayrı tespit edilmesi gerekir [190]. Glikojen sentetaz kinaz 3 enziminin inhibisyonu ya da aktivitesinin azaltılması hem SP hem de NFT'nin oluşumunu önleyeceği için, GSK-3 enzim etkinliği bir terapötik müdahale alanı olarak görülmektedir [190]. Bizim çalışmamızda, total GSK-3 α / β düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamış olsa da daha önceki çalışmalarda TRPM2 kanalı aktivasyonunun fosforile GSK-3 α / β düzeylerini düşürdüğü [191], TRPM2 nakavtlığının hücre kültürü çalışmalarında NMDA bağımlı LTD'yi baskıladığı ortaya çıkmıştır. Ayrıca, TRPM2^{-/-} hücrelerde sinaptik aralıkta bulunan AMPA reseptörlerinin sayısında bir azalış da söz konusudur. Transient reseptör potansiyeli nakavt hücrelerde LTD'nin baskılanışına aracılık eden hücre içi mekanizmaların GSK enzimleri ile yürütülüyor olması güçlü bir olasılıktır [13].

Bu çalışma, her ne kadar TRPM2 kanalları oksidatif stres algılayıcısı ve hücre içi nekrotik ya da apoptotik süreçleri tetikleyerek nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilendiriliyor olsa da bu patofizyolojik işlevlerinin yanısıra, hücre içi Ca⁺² homeostazını düzenleyici ve hafıza oluşumuna katkı sunucu etkinlik gösterdiklerine dair bulgulara, önceki çalışmalarla uyumlu olarak işaret etmektedir.

TRPM2 kanalı için yüksek sensitivite ve spesifisiteye sahip farmakolojik ajanlara sahip olmadığımızdan dolayı, bu kanalların, özellikle hafıza oluşumu ve NMDA ile muhtemel ilişkisini daha detaylı bir şekilde ortaya koyacak hücresel düzeyde çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

5.6. Çalışmanın limitasyonları

Çalışmamızda, total GSK-3 α/β sitozolik proteinlerinin immunohistokimyasal olarak kantitatif değerlendirilmesi yapılmıştır. Oysa, GSK-3 α/β proteinlerinin fonksiyonel ya da non fonksiyonel hallerinin kantifikasyonu, ACA'nın MWM deneyleri ile öğrenme ve hafızaya olan etkisi için daha açıklayıcı bir mekanistik yaklaşım ortaya koymamızı sağlayabilir. Çünkü GSK-3 sitozolik proteinlerinin disregülasyonu, tau proteini hiperfosforilasyonu ve AH da dahil olmak üzere çeşitli MSS patolojileri ile ilişkilendirilmektedir [190, 192]. İntraserebroventriküler STZ uygulamasının da GSK-3 β 'nin fonksiyonel formunda kantitatif olarak artışa sebep olduğu bilinmektedir [193]. Hipokampal dokuya ELISA kitlerinin uygulanamaması sebebiyle, oksidatif stres ile ilgili parametrelere sadece serumda bakılabilmiş olması bir diğer limitasyondur.

5.7. Sonuç

Çalışmamızda, tek başına ACA tedavisinin, MWM deneylerinden elde edilen bulgulara göre; memantin iyileştirici etkisini azalttığını ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmasa da yalnızca ACA tedavisi alan grubun ICV-STZ grubuna göre daha kötü bir performans sergilediği ortaya konulmuştur. Bu sebeple, ACA tedavisi ICV-STZ ile oluşturulan öğrenme ve uzaysal hafıza bozukluğu modelinde, hafıza üzerinde iyileştirici bir etkisi olmadığı gibi deney grubundaki öğrenme ve hafıza gücünü ilerletmiştir. Hem STZ uygulaması hem de memantin ve ACA tedavileri TRPM2 kanal proteini ekspresyonlarında değişikliklere sebep olmuştur. NMDAr kanalları ile TRPM2 kanallarının öğrenme ve hafıza yolları muhtemel etkileşimlerinin yeni çalışmalara açıklanmaya ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR:

1. Selekler, K. (2009) Alzheimer Hastalığı'nın Epidemiyolojisi, Risk Faktörleri ve Koruyucu Faktörleri. *Turkiye Klinikleri J Neurol-Special Topics* **2009;2(1):10-3**
2. Bu, X. L., Yao, X. Q., Jiao, S. S., Zeng, F., Liu, Y. H., Xiang, Y., Liang, C. R., Wang, Q. H., Wang, X., Cao, H. Y., Yi, X., Deng, B., Liu, C. H., Xu, J., Zhang, L. L., Gao, C. Y., Xu, Z. Q., Zhang, M., Wang, L., Tan, X. L., Xu, X., Zhou, H. D., and Wang, Y. J. (2015) A study on the association between infectious burden and Alzheimer's disease. *European journal of neurology* **22**, 1519-1525
3. Çetin, F. (2013) Role of Oxidative Stress in A β Animal Model of Alzheimer's Disease: Vicious Circle of Apoptosis, Nitric Oxide and Age. pp. 77-99
4. Engelhart, M. J., Geerlings, M. I., Meijer, J., Kiliaan, A., Ruitenberg, A., van Swieten, J. C., Stijnen, T., Hofman, A., Witteman, J. C., and Breteler, M. M. (2004) Inflammatory proteins in plasma and the risk of dementia: the rotterdam study. *Archives of neurology* **61**, 668-672
5. Brosseron, F., Krauthausen, M., Kummer, M., and Heneka, M. T. (2014) Body fluid cytokine levels in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a comparative overview. *Molecular neurobiology* **50**, 534-544
6. Solito, E., and Sastre, M. (2012) Microglia function in Alzheimer's disease. *Frontiers in pharmacology* **3**, 14
7. Buchholz, J. N., Behringer, E. J., Pottorf, W. J., Pearce, W. J., and Vanterpool, C. K. (2007) Age-dependent changes in Ca²⁺ homeostasis in peripheral neurones: implications for changes in function. *Aging cell* **6**, 285-296
8. Buchholz J.N., P. J. W., Vanterpool C.K., Behringer E.J. and Duckles S.P. (2012) Calcium Regulation in Neuronal Function with Advancing Age: Limits of Homeostasis. In *Senescence* pp. 531-559, www.intechopen.com
9. Stutzmann, G. E. (2007) The pathogenesis of Alzheimers disease is it a lifelong "calciumopathy"? *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* **13**, 546-559
10. Butterfield, D. A., Swomley, A. M., and Sultana, R. (2013) Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress in Alzheimer disease: importance in disease pathogenesis and progression. *Antioxidants & redox signaling* **19**, 823-835
11. Dietrich, H. H., Xiang, C., Han, B. H., Zipfel, G. J., and Holtzman, D. M. (2010) Soluble amyloid-beta, effect on cerebral arteriolar regulation and vascular cells. *Molecular neurodegeneration* **5**, 15
12. Fonfria, E., Marshall, I. C., Benham, C. D., Boyfield, I., Brown, J. D., Hill, K., Hughes, J. P., Skaper, S. D., and McNulty, S. (2004) TRPM2 channel opening in response to oxidative stress is dependent on activation of poly(ADP-ribose) polymerase. *British journal of pharmacology* **143**, 186-192
13. Xie, Y. F., Belrose, J. C., Lei, G., Tymianski, M., Mori, Y., Macdonald, J. F., and Jackson, M. F. (2011) Dependence of NMDA/GSK-3 β mediated metaplasticity on TRPM2 channels at hippocampal CA3-CA1 synapses. *Molecular brain* **4**, 44
14. Perraud, A. L., Takanishi, C. L., Shen, B., Kang, S., Smith, M. K., Schmitz, C., Knowles, H. M., Ferraris, D., Li, W., Zhang, J., Stoddard, B. L., and Scharenberg, A.

- M. (2005) Accumulation of free ADP-ribose from mitochondria mediates oxidative stress-induced gating of TRPM2 cation channels. *The Journal of biological chemistry* **280**, 6138-6148
15. Knowles, H., Li, Y., and Perraud, A. L. (2013) The TRPM2 ion channel, an oxidative stress and metabolic sensor regulating innate immunity and inflammation. *Immunologic research* **55**, 241-248
 16. Hara, Y., Wakamori, M., Ishii, M., Maeno, E., Nishida, M., Yoshida, T., Yamada, H., Shimizu, S., Mori, E., Kudoh, J., Shimizu, N., Kurose, H., Okada, Y., Imoto, K., and Mori, Y. (2002) LTRPC2 Ca²⁺-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Molecular cell* **9**, 163-173
 17. Martin Prince, A. C.-H., Martin Knapp, Maëlen Guerchet, Maria Karagiannidou. (2016) World Alzheimer Report 2016 Improving healthcare for people living with dementia coverage, quality and costs now and in the future. Alzheimer's Disease International, <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2016.pdf>
 18. Beeri, M. S., Silverman, J. M., Davis, K. L., Marin, D., Grossman, H. Z., Schmeidler, J., Purohit, D. P., Perl, D. P., Davidson, M., Mohs, R. C., and Haroutunian, V. (2005) Type 2 diabetes is negatively associated with Alzheimer's disease neuropathology. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* **60**, 471-475
 19. Organization, W. H. (2016) ICD-10. World Health Organization, <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2016/en#/F00-F09>
 20. Organization, W. H. (2015) The Epidemiology and Impact of Dementia. Vol. 2018, http://www.who.int/mental_health/neurology/dementia/dementia_thematicbrief_epidemiology.pdf
 21. International, A. s. D. (2013) The Global Impact of Dementia 2013–2050. <https://www.alz.co.uk/research/GlobalImpactDementia2013.pdf>
 22. Europe, A. (2013) The Prevalence of Dementia in Europe, 2013. <https://www.alzheimer-europe.org/Policy-in-Practice2/Country-comparisons/2013-The-prevalence-of-dementia-in-Europe>
 23. Gurvit, H., Emre, M., Tinaz, S., Bilgic, B., Hanagasi, H., Sahin, H., Gurol, E., Kvaloy, J. T., and Harmanci, H. (2008) The prevalence of dementia in an urban Turkish population. *American journal of Alzheimer's disease and other dementias* **23**, 67-76
 24. Keskinoglu, P., Giray, H., Picakcife, M., Bilgic, N., and Ucku, R. (2006) The prevalence and risk factors of dementia in the elderly population in a low socio-economic region of Izmir, Turkey. *Archives of gerontology and geriatrics* **43**, 93-100
 25. Ertekin, A., Demir, R., Özdemir, G., Özel, L., Özyıldırım, E., & Ulvi, H. . (2015) An Investigation of the Risk Factors and Prevalence of Alzheimer's Disease in the Eastern Region of Turkey: A Population Based Door-to-Door Survey.
 26. Association, T. A. s. (2017) Türkiye'de Alzheimer Hastalarının Sayısı Artıyor. <http://www.alzheimerderneği.org.tr/haber/turkiyede-genc-alzheimer-hastalarinin-sayisi-artiyor/>

27. Zencir, M., Kuzu, N., Beser, N. G., Ergin, A., Catak, B., and Sahiner, T. (2005) Cost of Alzheimer's disease in a developing country setting. *International journal of geriatric psychiatry* **20**, 616-622
28. Joseph Jankovic MD, J. C. M. M. P., Gerald M Fenichel MD, Robert B. Daroff MD (2012) *Bradley's Neurology in Clinical Practice*, 6th edition
29. Wattmo, C., Londos, E., and Minthon, L. (2014) Risk Factors That Affect Life Expectancy in Alzheimer's Disease: A 15-Year Follow-Up. *Dementia and geriatric cognitive disorders* **38**, 286-299
30. Hebert, L. E., Weuve, J., Scherr, P. A., and Evans, D. A. (2013) Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census. *Neurology* **80**, 1778-1783
31. Association, A. s. (2018) Alzheimer's Association Report, 2018 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia* **14**, 367-429
32. Chene, G., Beiser, A., Au, R., Preis, S. R., Wolf, P. A., Dufouil, C., and Seshadri, S. (2015) Gender and incidence of dementia in the Framingham Heart Study from mid-adult life. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* **11**, 310-320
33. E.M.C. Schrijvers, B. F. J. V., P.J. Koudstaal, A. Hofman, M.A. Ikram and M.M.B. Breteler. (2012) Is dementia incidence declining?
Trends in dementia incidence since 1990 in the Rotterdam Study. *Neurology*
34. Amtul, Z., and Rahman, A. U. (2016) Neural Plasticity and Memory: Is Memory Encoded in Hydrogen Bonding Patterns? *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* **22**, 9-18
35. Satizabal, C., Beiser, A. S., and Seshadri, S. (2016) Incidence of Dementia over Three Decades in the Framingham Heart Study. *The New England journal of medicine* **375**, 93-94
36. Bartus, R. T., Dean, R. L., 3rd, Beer, B., and Lippa, A. S. (1982) The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* **217**, 408-414
37. Gibson, G. E., Peterson, C., and Sansone, J. (1981) Neurotransmitter and carbohydrate metabolism during aging and mild hypoxia. *Neurobiology of aging* **2**, 165-172
38. Auld, D. S., Kornecook, T. J., Bastianetto, S., and Quirion, R. (2002) Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Progress in neurobiology* **68**, 209-245
39. Terry, A. V., Jr., and Buccafusco, J. J. (2003) The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **306**, 821-827
40. Zemishlany, Z., and Thorne, A. E. (1991) Anticholinergic challenge and cognitive functions: a comparison between young and elderly normal subjects. *The Israel journal of psychiatry and related sciences* **28**, 32-41
41. Sunderland, T., Tariot, P. N., Cohen, R. M., Weingartner, H., Mueller, E. A., 3rd, and Murphy, D. L. (1987) Anticholinergic sensitivity in patients with dementia of the

- Alzheimer type and age-matched controls. A dose-response study. *Archives of general psychiatry* **44**, 418-426
42. Lim, S. L., Rodriguez-Ortiz, C. J., and Kitazawa, M. (2015) Infection, systemic inflammation, and Alzheimer's disease. *Microbes and infection* **17**, 549-556
 43. Biessels, G. J., Kappelle, L. J., and Utrecht Diabetic Encephalopathy Study, G. (2005) Increased risk of Alzheimer's disease in Type II diabetes: insulin resistance of the brain or insulin-induced amyloid pathology? *Biochemical Society transactions* **33**, 1041-1044
 44. Casserly, I., and Topol, E. (2004) Convergence of atherosclerosis and Alzheimer's disease: inflammation, cholesterol, and misfolded proteins. *Lancet* **363**, 1139-1146
 45. Singhrao, S. K., Harding, A., Simmons, T., Robinson, S., Kesavalu, L., and Crean, S. (2014) Oral inflammation, tooth loss, risk factors, and association with progression of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **42**, 723-737
 46. Paranjape, G. S., Gouwens, L. K., Osborn, D. C., and Nichols, M. R. (2012) Isolated amyloid-beta(1-42) protofibrils, but not isolated fibrils, are robust stimulators of microglia. *ACS chemical neuroscience* **3**, 302-311
 47. Perry, V. H., Cunningham, C., and Holmes, C. (2007) Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. *Nature reviews. Immunology* **7**, 161-167
 48. Halliwell, B. (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of neurochemistry* **97**, 1634-1658
 49. Kanamaru, T., Kamimura, N., Yokota, T., Iuchi, K., Nishimaki, K., Takami, S., Akashiba, H., Shitaka, Y., Katsura, K., Kimura, K., and Ohta, S. (2015) Oxidative stress accelerates amyloid deposition and memory impairment in a double-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience letters* **587**, 126-131
 50. Gamba, P., Testa, G., Gargiulo, S., Staurengi, E., Poli, G., and Leonarduzzi, G. (2015) Oxidized cholesterol as the driving force behind the development of Alzheimer's disease. *Frontiers in aging neuroscience* **7**, 119
 51. Cutler, R. G., Kelly, J., Storie, K., Pedersen, W. A., Tammara, A., Hatanpaa, K., Troncoso, J. C., and Mattson, M. P. (2004) Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 2070-2075
 52. Resende, R., Moreira, P. I., Proenca, T., Deshpande, A., Busciglio, J., Pereira, C., and Oliveira, C. R. (2008) Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Free radical biology & medicine* **44**, 2051-2057
 53. Beckman, K. B., and Ames, B. N. (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiological reviews* **78**, 547-581
 54. Markesbery, W. R. (1997) Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free radical biology & medicine* **23**, 134-147
 55. Sastre, J., Pallardo, F. V., and Vina, J. (2000) Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. *IUBMB life* **49**, 427-435

56. Jolivald, C. G., Hurford, R., Lee, C. A., Dumaop, W., Rockenstein, E., and Masliah, E. (2010) Type 1 diabetes exaggerates features of Alzheimer's disease in APP transgenic mice. *Experimental neurology* **223**, 422-431
57. Coma, M., Guix, F. X., Ill-Raga, G., Uribealago, I., Alameda, F., Valverde, M. A., and Munoz, F. J. (2008) Oxidative stress triggers the amyloidogenic pathway in human vascular smooth muscle cells. *Neurobiology of aging* **29**, 969-980
58. O'Connor, T., Sadleir, K. R., Maus, E., Velliquette, R. A., Zhao, J., Cole, S. L., Eimer, W. A., Hitt, B., Bembinster, L. A., Lammich, S., Lichtenthaler, S. F., Hebert, S. S., De Strooper, B., Haass, C., Bennett, D. A., and Vassar, R. (2008) Phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 α increases BACE1 levels and promotes amyloidogenesis. *Neuron* **60**, 988-1009
59. Quiroz-Baez, R., Rojas, E., and Arias, C. (2009) Oxidative stress promotes JNK-dependent amyloidogenic processing of normally expressed human APP by differential modification of alpha-, beta- and gamma-secretase expression. *Neurochemistry international* **55**, 662-670
60. Smith, M. A., Richey Harris, P. L., Sayre, L. M., Beckman, J. S., and Perry, G. (1997) Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **17**, 2653-2657
61. Ràfols, F. X. G. (2008) Study of the Pathophysiological Role of Nitric Oxide on the Amyloid-induced Toxicity Attending to the Biochemical Modifications and Cellular Damages. p. 196, University of Pompeu Fabra
62. Guix, F. X., Wahle, T., Vennekens, K., Snellinx, A., Chavez-Gutierrez, L., Ill-Raga, G., Ramos-Fernandez, E., Guardia-Laguarta, C., Lleo, A., Arimon, M., Berezovska, O., Munoz, F. J., Dotti, C. G., and De Strooper, B. (2012) Modification of gamma-secretase by nitrosative stress links neuronal ageing to sporadic Alzheimer's disease. *EMBO molecular medicine* **4**, 660-673
63. Keller, J. N., Schmitt, F. A., Scheff, S. W., Ding, Q., Chen, Q., Butterfield, D. A., and Markesbery, W. R. (2005) Evidence of increased oxidative damage in subjects with mild cognitive impairment. *Neurology* **64**, 1152-1156
64. Wang, J., Markesbery, W. R., and Lovell, M. A. (2006) Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in mild cognitive impairment. *Journal of neurochemistry* **96**, 825-832
65. Markesbery, W. R., Kryscio, R. J., Lovell, M. A., and Morrow, J. D. (2005) Lipid peroxidation is an early event in the brain in amnesic mild cognitive impairment. *Annals of neurology* **58**, 730-735
66. Cervellati, C., Romani, A., Bosi, C., Magon, S., Passaro, A., Bergamini, C. M., and Zuliani, G. (2015) Serum levels of hydroperoxides and multimorbidity among older patients with mild cognitive impairment or late-onset Alzheimer's disease. *Aging Clin Exp Res* **27**, 799-804
67. Pratico, D., Clark, C. M., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Rokach, J., and FitzGerald, G. A. (2000) Increased 8,12-iso-iPF2 α -VI in Alzheimer's disease: correlation of a noninvasive index of lipid peroxidation with disease severity. *Annals of neurology* **48**, 809-812

68. Wang, X., Wang, W., Li, L., Perry, G., Lee, H. G., and Zhu, X. (2014) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochimica et biophysica acta* **1842**, 1240-1247
69. Gleichmann, M., and Mattson, M. P. (2011) Neuronal calcium homeostasis and dysregulation. *Antioxidants & redox signaling* **14**, 1261-1273
70. Camandola, S., and Mattson, M. P. (2011) Aberrant subcellular neuronal calcium regulation in aging and Alzheimer's disease. *Biochimica et biophysica acta* **1813**, 965-973
71. Harteneck, C. (2005) Function and pharmacology of TRPM cation channels. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **371**, 307-314
72. Orrenius, S., Gogvadze, V., and Zhivotovsky, B. (2015) Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. *Biochemical and biophysical research communications* **460**, 72-81
73. Zundorf, G., and Reiser, G. (2011) Calcium dysregulation and homeostasis of neural calcium in the molecular mechanisms of neurodegenerative diseases provide multiple targets for neuroprotection. *Antioxidants & redox signaling* **14**, 1275-1288
74. Magi, S., Castaldo, P., Macri, M. L., Maiolino, M., Matteucci, A., Bastioli, G., Gratteri, S., Amoroso, S., and Lariccia, V. (2016) Intracellular Calcium Dysregulation: Implications for Alzheimer's Disease. *BioMed research international* **2016**, 6701324
75. Naziroglu, M. (2011) TRPM2 cation channels, oxidative stress and neurological diseases: where are we now? *Neurochemical research* **36**, 355-366
76. Workgroup, A. s. A. C. H. (2017) Calcium Hypothesis of Alzheimer's disease and brain aging: A framework for integrating new evidence into a comprehensive theory of pathogenesis. *Alzheimer's & Dementia* **13**, 178-182
77. Dreses-Werringloer, U., Lambert, J. C., Vingtdeux, V., Zhao, H., Vais, H., Siebert, A., Jain, A., Koppel, J., Rovelet-Lecrux, A., Hannequin, D., Pasquier, F., Galimberti, D., Scarpini, E., Mann, D., Lendon, C., Campion, D., Amouyel, P., Davies, P., Fosskett, J. K., Campagne, F., and Marambaud, P. (2008) A polymorphism in CALHM1 influences Ca²⁺ homeostasis, Aβ levels, and Alzheimer's disease risk. *Cell* **133**, 1149-1161
78. LaFerla, F. M. (2002) Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nature reviews. Neuroscience* **3**, 862-872
79. Cooper, V., Metcalf, L., Versnel, J., Upton, J., Walker, S., and Horne, R. (2015) Patient-reported side effects, concerns and adherence to corticosteroid treatment for asthma, and comparison with physician estimates of side-effect prevalence: a UK-wide, cross-sectional study. *NPJ primary care respiratory medicine* **25**, 15026
80. Reddy, P. H. (2006) Amyloid precursor protein-mediated free radicals and oxidative damage: implications for the development and progression of Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* **96**, 1-13
81. Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A., and Yuan, J. (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* **403**, 98-103

82. Mattson, M. P., and Chan, S. L. (2003) Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Cell calcium* **34**, 385-397
83. Berridge, M. J. (2010) Calcium hypothesis of Alzheimer's disease. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **459**, 441-449
84. Berridge, M. J. (2014) Calcium regulation of neural rhythms, memory and Alzheimer's disease. *The Journal of physiology* **592**, 281-293
85. Mark, R. J., Hensley, K., Butterfield, D. A., and Mattson, M. P. (1995) Amyloid beta-peptide impairs ion-motive ATPase activities: evidence for a role in loss of neuronal Ca²⁺ homeostasis and cell death. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **15**, 6239-6249
86. Mayeux, R., and Stern, Y. (2012) Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **2**
87. Emre, M., Gürvit H, Bilgiç B. (2013) *Temel Nöroloji Kitabı Vol. 5*, Güneş Tıp Kitabevleri Ltd. Şti.
88. Whitmer, R. A., Sidney, S., Selby, J., Johnston, S. C., and Yaffe, K. (2005) Midlife cardiovascular risk factors and risk of dementia in late life. *Neurology* **64**, 277-281
89. Reitz, C., Bos, M. J., Hofman, A., Koudstaal, P. J., and Breteler, M. M. (2008) Prestroke cognitive performance, incident stroke, and risk of dementia: the Rotterdam Study. *Stroke* **39**, 36-41
90. Shah, N. S., Vidal, J. S., Masaki, K., Petrovitch, H., Ross, G. W., Tilley, C., DeMattos, R. B., Tracy, R. P., White, L. R., and Launer, L. J. (2012) Midlife blood pressure, plasma beta-amyloid, and the risk for Alzheimer disease: the Honolulu Asia Aging Study. *Hypertension* **59**, 780-786
91. Stern, Y. (2012) Cognitive reserve in ageing and Alzheimer's disease. *The Lancet. Neurology* **11**, 1006-1012
92. Pradier, C., Sakarovitch, C., Le Duff, F., Layese, R., Metelkina, A., Anthony, S., Tifratene, K., and Robert, P. (2014) The mini mental state examination at the time of Alzheimer's disease and related disorders diagnosis, according to age, education, gender and place of residence: a cross-sectional study among the French National Alzheimer database. *PloS one* **9**, e103630
93. Fann, J. R., Ribe, A. R., Pedersen, H. S., Fenger-Gron, M., Christensen, J., Benros, M. E., and Vestergaard, M. (2018) Long-term risk of dementia among people with traumatic brain injury in Denmark: a population-based observational cohort study. *The lancet. Psychiatry* **5**, 424-431
94. Nicoll, J. A., Roberts, G. W., and Graham, D. I. (1995) Apolipoprotein E epsilon 4 allele is associated with deposition of amyloid beta-protein following head injury. *Nature medicine* **1**, 135-137
95. Lohmann, E. (2009) Genetic Aspects of Alzheimer's Disease. *Turkiye Klinikleri J Neurol-Special Topics* 2009
96. Chertkow, H., Feldman, H. H., Jacova, C., and Massoud, F. (2013) Definitions of dementia and predementia states in Alzheimer's disease and vascular cognitive impairment: consensus from the Canadian conference on diagnosis of dementia. *Alzheimer's research & therapy* **5**, S2

97. Collie, A., Maruff, P., Shafiq-Antonacci, R., Smith, M., Hallup, M., Schofield, P. R., Masters, C. L., and Currie, J. (2001) Memory decline in healthy older people: implications for identifying mild cognitive impairment. *Neurology* **56**, 1533-1538
98. Larrabee, G. J., and McEntee, W. J. (1995) Age-associated memory impairment: sorting out the controversies. *Neurology* **45**, 611-614
99. Petersen, R. C. (2011) Clinical practice. Mild cognitive impairment. *The New England journal of medicine* **364**, 2227-2234
100. Petersen, R. C., Thomas, R. G., Grundman, M., Bennett, D., Doody, R., Ferris, S., Galasko, D., Jin, S., Kaye, J., Levey, A., Pfeiffer, E., Sano, M., van Dyck, C. H., Thal, L. J., and Alzheimer's Disease Cooperative Study, G. (2005) Vitamin E and donepezil for the treatment of mild cognitive impairment. *The New England journal of medicine* **352**, 2379-2388
101. Budson, A. E., and Solomon, P. R. (2012) New diagnostic criteria for Alzheimer's disease and mild cognitive impairment for the practical neurologist. *Practical neurology* **12**, 88-96
102. Terry, R. D. (1986) Interrelations among the lesions of normal and abnormal aging of the brain. *Progress in brain research* **70**, 41-48
103. Perl, D. P. (2010) Neuropathology of Alzheimer's disease. *The Mount Sinai journal of medicine, New York* **77**, 32-42
104. Swerdlow, R. H. (2007) Pathogenesis of Alzheimer's disease. *Clinical interventions in aging* **2**, 347-359
105. Smith, R. P., Higuchi, D. A., and Broze, G. J., Jr. (1990) Platelet coagulation factor XIa-inhibitor, a form of Alzheimer amyloid precursor protein. *Science* **248**, 1126-1128
106. Eisele, Y. S., and Duyckaerts, C. (2016) Propagation of Ass pathology: hypotheses, discoveries, and yet unresolved questions from experimental and human brain studies. *Acta neuropathologica* **131**, 5-25
107. Da Mesquita, S., Ferreira, A. C., Sousa, J. C., Correia-Neves, M., Sousa, N., and Marques, F. (2016) Insights on the pathophysiology of Alzheimer's disease: The crosstalk between amyloid pathology, neuroinflammation and the peripheral immune system. *Neuroscience and biobehavioral reviews* **68**, 547-562
108. Selkoe, D. J., American College of, P., and American Physiological, S. (2004) Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies. *Annals of internal medicine* **140**, 627-638
109. Graeber, M. B., Kosel, S., Egensperger, R., Banati, R. B., Muller, U., Bise, K., Hoff, P., Moller, H. J., Fujisawa, K., and Mehraein, P. (1997) Rediscovery of the case described by Alois Alzheimer in 1911: historical, histological and molecular genetic analysis. *Neurogenetics* **1**, 73-80
110. Alonso, A., Zaidi, T., Novak, M., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2001) Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 6923-6928

111. Gotz, J., Chen, F., van Dorpe, J., and Nitsch, R. M. (2001) Formation of neurofibrillary tangles in P3011 tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science* **293**, 1491-1495
112. Yoshiyama, Y., Higuchi, M., Zhang, B., Huang, S. M., Iwata, N., Saïdo, T. C., Maeda, J., Suhara, T., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. (2007) Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron* **53**, 337-351
113. Kitazawa, M., Oddo, S., Yamasaki, T. R., Green, K. N., and LaFerla, F. M. (2005) Lipopolysaccharide-induced inflammation exacerbates tau pathology by a cyclin-dependent kinase 5-mediated pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **25**, 8843-8853
114. M., P. D. a. A. (2016) Treatment of Dementia. (DeKosky, S. T., and Schmäder, K.E., ed) Vol. 2018, Wolters Kluwer, <https://www.uptodate.com/contents/treatment-of-dementia>
115. Dysken, M. W., Sano, M., Asthana, S., Vertrees, J. E., Pallaki, M., Llorente, M., Love, S., Schellenberg, G. D., McCarten, J. R., Malphurs, J., Prieto, S., Chen, P., Loreck, D. J., Trapp, G., Bakshi, R. S., Mintzer, J. E., Heidebrink, J. L., Vidal-Cardona, A., Arroyo, L. M., Cruz, A. R., Zachariah, S., Kowall, N. W., Chopra, M. P., Craft, S., Thielke, S., Turvey, C. L., Woodman, C., Monnell, K. A., Gordon, K., Tomaska, J., Segal, Y., Peduzzi, P. N., and Guarino, P. D. (2014) Effect of vitamin E and memantine on functional decline in Alzheimer disease: the TEAM-AD VA cooperative randomized trial. *Jama* **311**, 33-44
116. Sano, M., Ernesto, C., Thomas, R. G., Klauber, M. R., Schafer, K., Grundman, M., Woodbury, P., Growdon, J., Cotman, C. W., Pfeiffer, E., Schneider, L. S., and Thal, L. J. (1997) A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. *The New England journal of medicine* **336**, 1216-1222
117. Amtul, Z., and Atta Ur, R. (2015) Neural plasticity and memory: molecular mechanism. *Reviews in the neurosciences* **26**, 253-268
118. Kalenzaga, S., and Clarys, D. (2013) [Relationship between memory disorders and self-consciousness in Alzheimer's disease]. *Geriatric et psychologie neuropsychiatrie du vieillissement* **11**, 187-196
119. Perry, R. J., and Hodges, J. R. (2000) Differentiating frontal and temporal variant frontotemporal dementia from Alzheimer's disease. *Neurology* **54**, 2277-2284
120. Aben, B., Stapert, S., and Blokland, A. (2012) About the Distinction between Working Memory and Short-Term Memory. *Frontiers in psychology* **3**, 301
121. Quillfeldt, J. (2016) Behavioral methods to study learning and memory in rats. In *Rodent Model as Tools in Ethical Biomedical Research*. pp. 271-311
122. Matt Carter, J. C. S. (2015) Animal Behaviour. In *Guide to Research Techniques in Neuroscience*. pp. 33-70
123. Sidney A. Simon, M. A. L. N. (2009) Spatial Memory Tasks, The Morris Water Maze Task. In *Methods of Behaviour Analysis in Neuroscience*. (Buccafusco, J. J., ed) p. 3

124. Vorhees, C. V., and Williams, M. T. (2006) Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature protocols* **1**, 848-858
125. Morris, R. G., Anderson, E., Lynch, G. S., and Baudry, M. (1986) Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* **319**, 774-776
126. Ögren, S. O. a. S., O. (2010) Passive Avoidance. Oliver Stiedl, <https://www.researchgate.net/publication/235525891>
127. (2007) H.M.'s Brain and the History of Memory. Vol. 2018, Brian Newhouse, www.npr.org/templates/story/story.php?storyId=7584970
128. Kuns, B., and Varghese, D. (2018) Memantine. In *StatPearls, Treasure Island (FL)*
129. Agrawal, R., Tyagi, E., Shukla, R., and Nath, C. (2009) A study of brain insulin receptors, AChE activity and oxidative stress in rat model of ICV STZ induced dementia. *Neuropharmacology* **56**, 779-787
130. Cheung, J. Y., and Miller, B. A. (2017) Transient Receptor Potential-Melastatin Channel Family Member 2: Friend or Foe. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* **128**, 308-329
131. Kraft, R., Grimm, C., Grosse, K., Hoffmann, A., Sauerbruch, S., Kettenmann, H., Schultz, G., and Harteneck, C. (2004) Hydrogen peroxide and ADP-ribose induce TRPM2-mediated calcium influx and cation currents in microglia. *American journal of physiology. Cell physiology* **286**, C129-137
132. Miyanohara, J., Kakae, M., Nagayasu, K., Nakagawa, T., Mori, Y., Arai, K., Shirakawa, H., and Kaneko, S. (2018) TRPM2 Channel Aggravates CNS Inflammation and Cognitive Impairment via Activation of Microglia in Chronic Cerebral Hypoperfusion. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **38**, 3520-3533
133. Lee, M., Cho, T., Jantaratnotai, N., Wang, Y. T., McGeer, E., and McGeer, P. L. (2010) Depletion of GSH in glial cells induces neurotoxicity: relevance to aging and degenerative neurological diseases. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **24**, 2533-2545
134. Olah, M. E., Jackson, M. F., Li, H., Perez, Y., Sun, H. S., Kiyonaka, S., Mori, Y., Tymianski, M., and MacDonald, J. F. (2009) Ca²⁺-dependent induction of TRPM2 currents in hippocampal neurons. *The Journal of physiology* **587**, 965-979
135. Bai, J. Z., and Lipski, J. (2010) Differential expression of TRPM2 and TRPV4 channels and their potential role in oxidative stress-induced cell death in organotypic hippocampal culture. *Neurotoxicology* **31**, 204-214
136. Kaneko, S., Kawakami, S., Hara, Y., Wakamori, M., Itoh, E., Minami, T., Takada, Y., Kume, T., Katsuki, H., Mori, Y., and Akaike, A. (2006) A critical role of TRPM2 in neuronal cell death by hydrogen peroxide. *Journal of pharmacological sciences* **101**, 66-76
137. Hill, K., Tigue, N. J., Kelsell, R. E., Benham, C. D., McNulty, S., Schaefer, M., and Randall, A. D. (2006) Characterisation of recombinant rat TRPM2 and a TRPM2-like conductance in cultured rat striatal neurones. *Neuropharmacology* **50**, 89-97

138. Chung, K. K., Freestone, P. S., and Lipski, J. (2011) Expression and functional properties of TRPM2 channels in dopaminergic neurons of the substantia nigra of the rat. *Journal of neurophysiology* **106**, 2865-2875
139. Faouzi, M., and Penner, R. (2014) Trpm2. *Handbook of experimental pharmacology* **222**, 403-426
140. Zhang, W., Hirschler-Laszkiewicz, I., Tong, Q., Conrad, K., Sun, S. C., Penn, L., Barber, D. L., Stahl, R., Carey, D. J., Cheung, J. Y., and Miller, B. A. (2006) TRPM2 is an ion channel that modulates hematopoietic cell death through activation of caspases and PARP cleavage. *American journal of physiology. Cell physiology* **290**, C1146-1159
141. Wehrhahn, J., Kraft, R., Harteneck, C., and Hauschildt, S. (2010) Transient receptor potential melastatin 2 is required for lipopolysaccharide-induced cytokine production in human monocytes. *Journal of immunology* **184**, 2386-2393
142. Herson, P. S., Lee, K., Pinnock, R. D., Hughes, J., and Ashford, M. L. (1999) Hydrogen peroxide induces intracellular calcium overload by activation of a non-selective cation channel in an insulin-secreting cell line. *The Journal of biological chemistry* **274**, 833-841
143. Fonfria, E., Marshall, I. C., Boyfield, I., Skaper, S. D., Hughes, J. P., Owen, D. E., Zhang, W., Miller, B. A., Benham, C. D., and McNulty, S. (2005) Amyloid beta-peptide(1-42) and hydrogen peroxide-induced toxicity are mediated by TRPM2 in rat primary striatal cultures. *Journal of neurochemistry* **95**, 715-723
144. Nakai, H., Konno, M., Kosuge, S., Sakuyama, S., Toda, M., Arai, Y., Obata, T., Katsube, N., Miyamoto, T., Okegawa, T., and et al. (1988) New potent antagonists of leukotrienes C4 and D4. 1. Synthesis and structure-activity relationships. *Journal of medicinal chemistry* **31**, 84-91
145. Konrad, R. J., Jolly, Y. C., Major, C., and Wolf, B. A. (1992) Inhibition of phospholipase A2 and insulin secretion in pancreatic islets. *Biochimica et biophysica acta* **1135**, 215-220
146. Fukunaga, M., Fujiwara, Y., Ochi, S., Yokoyama, K., Shoji, T., Fukuhara, Y., Orita, Y., Kamada, T., Badr, K. F., and Ueda, N. (1996) Mechanism of induction of prostaglandin E2 production by endothelin 1 in cultured rat mesangial cells. *Experimental nephrology* **4**, 340-349
147. Kraft, R., Grimm, C., Frenzel, H., and Harteneck, C. (2006) Inhibition of TRPM2 cation channels by N-(p-amylcinnamoyl)anthranilic acid. *British journal of pharmacology* **148**, 264-273
148. Gelderblom, M., Melzer, N., Schattling, B., Gob, E., Hicking, G., Arunachalam, P., Bittner, S., Ufer, F., Herrmann, A. M., Bernreuther, C., Glatzel, M., Gerloff, C., Kleinschnitz, C., Meuth, S. G., Friese, M. A., and Magnus, T. (2014) Transient receptor potential melastatin subfamily member 2 cation channel regulates detrimental immune cell invasion in ischemic stroke. *Stroke* **45**, 3395-3402
149. Nazem, A., Sankowski, R., Bacher, M., and Al-Abed, Y. (2015) Rodent models of neuroinflammation for Alzheimer's disease. *Journal of neuroinflammation* **12**, 74
150. Kamat, P. K., Kalani, A., Rai, S., Tota, S. K., Kumar, A., and Ahmad, A. S. (2016) Streptozotocin Intracerebroventricular-Induced Neurotoxicity and Brain Insulin

- Resistance: a Therapeutic Intervention for Treatment of Sporadic Alzheimer's Disease (sAD)-Like Pathology. *Molecular neurobiology* **53**, 4548-4562
151. Liu, Y., Liu, L., Lu, S., Wang, D., Liu, X., Xie, L., and Wang, G. (2011) Impaired amyloid beta-degrading enzymes in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of endocrinological investigation* **34**, 26-31
 152. Devi, L., Alldred, M. J., Ginsberg, S. D., and Ohno, M. (2012) Mechanisms underlying insulin deficiency-induced acceleration of beta-amyloidosis in a mouse model of Alzheimer's disease. *PloS one* **7**, e32792
 153. Kimura, N. (2016) Diabetes Mellitus Induces Alzheimer's Disease Pathology: Histopathological Evidence from Animal Models. *International journal of molecular sciences* **17**, 503
 154. Nitsch, R., and Hoyer, S. (1991) Local action of the diabetogenic drug, streptozotocin, on glucose and energy metabolism in rat brain cortex. *Neuroscience letters* **128**, 199-202
 155. Duelli, R., Schrock, H., Kuschinsky, W., and Hoyer, S. (1994) Intracerebroventricular injection of streptozotocin induces discrete local changes in cerebral glucose utilization in rats. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* **12**, 737-743
 156. Hoyer, S., and Lannert, H. (1999) Inhibition of the neuronal insulin receptor causes Alzheimer-like disturbances in oxidative/energy brain metabolism and in behavior in adult rats. *Annals of the New York Academy of Sciences* **893**, 301-303
 157. Long-Smith, C. M., Manning, S., McClean, P. L., Coakley, M. F., O'Halloran, D. J., Holscher, C., and O'Neill, C. (2013) The diabetes drug liraglutide ameliorates aberrant insulin receptor localisation and signalling in parallel with decreasing both amyloid-beta plaque and glial pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuromolecular medicine* **15**, 102-114
 158. Nixon, R. A. (2007) Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *Journal of cell science* **120**, 4081-4091
 159. Jiang, Y., Mizisin, A. P., Rearden, A., and Jolival, C. G. (2010) Diabetes induces changes in ILK, PINCH and components of related pathways in the spinal cord of rats. *Brain research* **1332**, 100-109
 160. Dozza, B., Smith, M. A., Perry, G., Tabaton, M., and Strocchi, P. (2004) Regulation of glycogen synthase kinase-3beta by products of lipid peroxidation in human neuroblastoma cells. *Journal of neurochemistry* **89**, 1224-1232
 161. Chen, Y., Zhao, Y., Dai, C. L., Liang, Z., Run, X., Iqbal, K., Liu, F., and Gong, C. X. (2014) Intranasal insulin restores insulin signaling, increases synaptic proteins, and reduces Abeta level and microglia activation in the brains of 3xTg-AD mice. *Experimental neurology* **261**, 610-619
 162. Lannert, H., Wirtz, P., Schuhmann, V., and Galmbacher, R. (1998) Effects of Estradiol (-17beta) on learning, memory and cerebral energy metabolism in male rats after intracerebroventricular administration of streptozotocin. *Journal of neural transmission* **105**, 1045-1063

163. Murtishaw, A. S., Heaney, C. F., Bolton, M. M., Sabbagh, J. J., Langhardt, M. A., and Kinney, J. W. (2016) Effect of acute lipopolysaccharide-induced inflammation in intracerebroventricular-streptozotocin injected rats. *Neuropharmacology* **101**, 110-122
164. Kumar, A., Ekavali, Mishra, J., Chopra, K., and Dhull, D. K. (2016) Possible role of P-glycoprotein in the neuroprotective mechanism of berberine in intracerebroventricular streptozotocin-induced cognitive dysfunction. *Psychopharmacology* **233**, 137-152
165. George Paxinos, C. W. (1997) The rat brain in stereotaxic coordinates.
166. Correia, S. C., Santos, R. X., Santos, M. S., Casadesus, G., Lamanna, J. C., Perry, G., Smith, M. A., and Moreira, P. I. (2013) Mitochondrial abnormalities in a streptozotocin-induced rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Current Alzheimer research* **10**, 406-419
167. Badescu, S. V., Tataru, C. P., Kobylinska, L., Georgescu, E. L., Zahiu, D. M., Zagrean, A. M., and Zagrean, L. (2016) Effects of caffeine on locomotor activity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of medicine and life* **9**, 275-279
168. Ostapchenko, V. G., Chen, M., Guzman, M. S., Xie, Y. F., Lavine, N., Fan, J., Beraldo, F. H., Martyn, A. C., Belrose, J. C., Mori, Y., MacDonald, J. F., Prado, V. F., Prado, M. A., and Jackson, M. F. (2015) The Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) Channel Contributes to beta-Amyloid Oligomer-Related Neurotoxicity and Memory Impairment. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **35**, 15157-15169
169. Tomasova, L., Hvizdosova, N., Bolekova, A., Smajda, B., and Kluchova, D. (2014) Vitamin A and amygdala: functional and morphological consequences. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* **35**, 1585-1589
170. Lambert, J. C., Grenier-Boley, B., Harold, D., Zelenika, D., Chouraki, V., Kamatani, Y., Slegers, K., Ikram, M. A., Hiltunen, M., Reitz, C., Mateo, I., Feulner, T., Bullido, M., Galimberti, D., Concari, L., Alvarez, V., Sims, R., Gerrish, A., Chapman, J., Deniz-Naranjo, C., Solfrizzi, V., Sorbi, S., Arosio, B., Spalletta, G., Siciliano, G., Epelbaum, J., Hannequin, D., Dartigues, J. F., Tzourio, C., Berr, C., Schrijvers, E. M., Rogers, R., Tosto, G., Pasquier, F., Bettens, K., Van Cauwenberghe, C., Fratiglioni, L., Graff, C., Delepine, M., Ferri, R., Reynolds, C. A., Lannfelt, L., Ingelsson, M., Prince, J. A., Chillotti, C., Pilotto, A., Seripa, D., Boland, A., Mancuso, M., Bossu, P., Annoni, G., Nacmias, B., Bosco, P., Panza, F., Sanchez-Garcia, F., Del Zompo, M., Coto, E., Owen, M., O'Donovan, M., Valdivieso, F., Caffarra, P., Scarpini, E., Combarros, O., Buee, L., Campion, D., Soinenen, H., Breteler, M., Riemenschneider, M., Van Broeckhoven, C., Alperovitch, A., Lathrop, M., Tregouet, D. A., Williams, J., and Amouyel, P. (2013) Genome-wide haplotype association study identifies the FRMD4A gene as a risk locus for Alzheimer's disease. *Molecular psychiatry* **18**, 461-470
171. Genrikhs, E. E., Stelmashook, E. V., Golyshev, S. A., Aleksandrova, O. P., and Isaev, N. K. (2017) Streptozotocin causes neurotoxic effect in cultured cerebellar granule neurons. *Brain research bulletin* **130**, 90-94

172. Kaewthamasorn, M., Takeda, M., Saiwichai, T., Gitaka, J. N., Tiawsirisup, S., Imasato, Y., Mossaad, E., Sarani, A., Kaewlamun, W., Channumsin, M., Chaiworakul, S., Katepongpun, W., Teeveerapunya, S., Panthong, J., Mureithi, D. K., Bawm, S., Htun, L. L., Win, M. M., Ismail, A. A., Ibrahim, A. M., Sukanuma, K., Hakimi, H., Nakao, R., Katakura, K., Asada, M., and Kaneko, O. (2018) Author Correction: Genetic homogeneity of goat malaria parasites in Asia and Africa suggests their expansion with domestic goat host. *Scientific reports* **8**, 7641
173. Belrose, J. C., and Jackson, M. F. (2018) TRPM2: a candidate therapeutic target for treating neurological diseases. *Acta pharmacologica Sinica* **39**, 722-732
174. Fonfria, E., Mattei, C., Hill, K., Brown, J. T., Randall, A., Benham, C. D., Skaper, S. D., Campbell, C. A., Crook, B., Murdock, P. R., Wilson, J. M., Maurio, F. P., Owen, D. E., Tilling, P. L., and McNulty, S. (2006) TRPM2 is elevated in the tMCAO stroke model, transcriptionally regulated, and functionally expressed in C13 microglia. *Journal of receptor and signal transduction research* **26**, 179-198
175. Lu, S., Xiang, L., Clemmer, J. S., Mittwede, P. N., and Hester, R. L. (2014) Oxidative stress increases pulmonary vascular permeability in diabetic rats through activation of transient receptor potential melastatin 2 channels. *Microcirculation* **21**, 754-760
176. Cook, N. L., Vink, R., Helps, S. C., Manavis, J., and van den Heuvel, C. (2010) Transient receptor potential melastatin 2 expression is increased following experimental traumatic brain injury in rats. *Journal of molecular neuroscience : MN* **42**, 192-199
177. Roedding, A. S., Tong, S. Y., Au-Yeung, W., Li, P. P., and Warsh, J. J. (2013) Chronic oxidative stress modulates TRPC3 and TRPM2 channel expression and function in rat primary cortical neurons: relevance to the pathophysiology of bipolar disorder. *Brain research* **1517**, 16-27
178. Kristian, T., and Siesjo, B. K. (1998) Calcium in ischemic cell death. *Stroke* **29**, 705-718
179. Lushchak, V. I. (2014) Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem-Biol Interact* **224**, 164-175
180. Whittemore, E. R., Loo, D. T., and Cotman, C. W. (1994) Exposure to hydrogen peroxide induces cell death via apoptosis in cultured rat cortical neurons. *Neuroreport* **5**, 1485-1488
181. Whittemore, E. R., Loo, D. T., Watt, J. A., and Cotman, C. W. (1995) A detailed analysis of hydrogen peroxide-induced cell death in primary neuronal culture. *Neuroscience* **67**, 921-932
182. Cole, K. K., and Perez-Polo, J. R. (2002) Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition prevents both apoptotic-like delayed neuronal death and necrosis after H₂O₂ injury. *Journal of neurochemistry* **82**, 19-29
183. Harteneck, C., Frenzel, H., and Kraft, R. (2007) N-(p-aminocinnamoyl)anthranilic acid (ACA): a phospholipase A(2) inhibitor and TRP channel blocker. *Cardiovascular drug reviews* **25**, 61-75

184. Holscher, C., Canevari, L., and Richter-Levin, G. (1995) Inhibitors of PLA2 and NO synthase cooperate in producing amnesia of a spatial task. *Neuroreport* **6**, 730-732
185. Fujita, S., Ikegaya, Y., Nishiyama, N., and Matsuki, N. (2000) Ca²⁺-independent phospholipase A2 inhibitor impairs spatial memory of mice. *Japanese journal of pharmacology* **83**, 277-278
186. Nilius, B., Owsianik, G., Voets, T., and Peters, J. A. (2007) Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiological reviews* **87**, 165-217
187. Hermosura, M. C., Cui, A. M., Go, R. C., Davenport, B., Shetler, C. M., Heizer, J. W., Schmitz, C., Mocz, G., Garruto, R. M., and Perraud, A. L. (2008) Altered functional properties of a TRPM2 variant in Guamanian ALS and PD. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 18029-18034
188. Partida-Sanchez, S., Gasser, A., Fliegert, R., Siebrands, C. C., Dammermann, W., Shi, G., Mousseau, B. J., Sumoza-Toledo, A., Bhagat, H., Walseth, T. F., Guse, A. H., and Lund, F. E. (2007) Chemotaxis of mouse bone marrow neutrophils and dendritic cells is controlled by adp-ribose, the major product generated by the CD38 enzyme reaction. *Journal of immunology* **179**, 7827-7839
189. Sacai, H., Sasaki-Hamada, S., Sugiyama, A., Saitoh, A., Mori, K., Yamada, M., and Oka, J. (2014) The impairment in spatial learning and hippocampal LTD induced through the PKA pathway in juvenile-onset diabetes rats are rescued by modulating NMDA receptor function. *Neuroscience research* **81-82**, 55-63
190. Bhat, R. V., Budd Haeberlein, S. L., and Avila, J. (2004) Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies. *Journal of neurochemistry* **89**, 1313-1317
191. Jang, Y., Lee, S. H., Lee, B., Jung, S., Khalid, A., Uchida, K., Tominaga, M., Jeon, D., and Oh, U. (2015) TRPM2, a Susceptibility Gene for Bipolar Disorder, Regulates Glycogen Synthase Kinase-3 Activity in the Brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **35**, 11811-11823
192. Salkovic-Petrisic, M., Tribl, F., Schmidt, M., Hoyer, S., and Riederer, P. (2006) Alzheimer-like changes in protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 in rat frontal cortex and hippocampus after damage to the insulin signalling pathway. *Journal of neurochemistry* **96**, 1005-1015
193. Gao, C., Liu, Y., Jiang, Y., Ding, J., and Li, L. (2014) Geniposide ameliorates learning memory deficits, reduces tau phosphorylation and decreases apoptosis via GSK3beta pathway in streptozotocin-induced alzheimer rat model. *Brain pathology* **24**, 261-269

EK 1: Çalışmanın Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul'u Onayı



T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
UNIVERSITY OF GAZİANTEP
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU BAŞKANLIĞI
LOCAL ETHICS COMMITTEE OF ANIMAL EXPERIMENTS
ARAŞTIRMA BAŞVURU ONAYI
RESEARCH APPLICATION CONSENT



TOPLANTI TARİHİ(Meeting Date)	TOPLANTI SAYISI(Meeting No)	TOPLANTI YERİ(Meeting Place)
13.12.2017	11	Temel Tıp Bilimleri

BAŞVURU BİLGİLERİ Application Information	Araştırmanın Başlığı Research Title	Deneysel olarak, sıçanlarda oluşturulan Alzheimer hastalığı modelinde, TRPM 2 kalsiyum iyon kanalı antagonisti olan N-(p-amilsinamoil)antranilik Asit (ACA)'in nörodejeneratif ve oksidatif süreçte etkisinin araştırılması
		Investigation of the effects of N-(p-Amylcinnamoyl) anthranilic Acid (ACA) which is an TRPM 2 calcium ion channel antagonist, to neurodegenerative and oxidative processes on an Alzheimer's Disease model constituted with experimental rats
	Başvuru Tarihi Application Date	27.10.2017
	Protokol no Protocol no	48

KARAR BİLGİLERİ Decision	Karar No: 2017/32 Decision No: 2017/32
	<input checked="" type="checkbox"/> Kabul (Accepted) <input type="checkbox"/> Red (Not Accepted) Doç. Dr. Şeniz DEMİRYÜREK'in yürütücüsü olduğu ve uygunluk kararı alınan (Etik kurul karar no: 2016/14) daha önceki başvurusu ile ilgili değişiklik önerisi incelenmiş, değişiklik başvurusunun "uygun" olduğuna toplantıya katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir.

Yürütücü Coordinator	Doç. Dr. Şeniz DEMİRYÜREK Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fiziyojji Anabilim Dalı

ETİK KURUL BİLGİLERİ	GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU YÖNERGESİ
ÇALIŞMA ESASI	

Ünvanı/Adı/Soyadı	Kurumu	İlişki	Katılım	İmza
Prof. Dr. A. Tuncay Demiryürek (Başkan)	GAÜN Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	H	E	
Yrd. Doç. Dr. Davut Sinan Kaplan (Başkan Yardımcısı)	GAÜN Tıp Fakültesi Fiziyojji AD.	E	E	
Prof. Dr. Behçet Al (Üye)	GAÜN Tıp Fakültesi Acil Tıp AD.	H	E	
Doç. Dr. İbrahim Halil Kılıç (Üye)	GAÜN Fen Edebiyat F. Biyolojji	H	H	KATILMADI
Doç. Dr. Mehmet Kahraman (Üye)	GAÜN Fen Edebiyat F. Kimya	H	E	
Yrd. Doç. Dr. Ebru Deniz Karslı (Üye)	GAÜN Dış Hekimliği F. Çene Cerrahisi AD.	H	E	
Yrd. Doç. Dr. Berna Kaya Uğur (Üye)	GAÜN Tıp Fakültesi Anestezi ve Reanimasyon AD	H	E	
Öğr. Gör. Ahmet Sarper Bozkurt (Üye)	GAÜN Teknik Bilimler MYO Bitkisel ve Hayvansal Üretim	H	E	
Veteriner Hekim Celal Özsöyler (Üye)	Gaziantep Büyükşehir Belediyesi Hayvanat Bahçesi	H	H	KATILMADI
Tekniker Hakan Parlar (Üye)	Serbest, Dernek Üyesi	H	E	

E: Evet, H: Hayır

ÖZGEÇMİŞ

Araş. Gör. Dr. Mehmet GÖL

Doğum Tarihi: 09.08.1982

Doğum Yeri: Kilis / Merkez

Uyruğu: Türkiye Cumhuriyeti

Medenî Hâli: Evli, 1(bir) çocuk

Tel: +90 536 469 8213

E – posta: fatih172@gmail.com

mgol@gantep.edu.tr

EĞİTİM DURUMU:

1993 – 2000: Kilis Hacı Mehmet Koçarslan Anadolu Lisesi

2000 – 2008: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi (İngilizce)

2012 – Günümüz: Gaziantep Üniversitesi, Fizyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı

İŞ DENEYİMİ:

2008 – 2011: Van Erciş Pay Sağlık Ocağı, Van Erciş 5 nolu Sağlık Ocağı, Van Çatak Devlet Hastanesi.

2011 – 2012: Kilis 112 Acil Sağlık Hizmetleri Komuta Kontrol Merkezi.

2012 – 2015: Kilis İl Sağlık Müdürlüğü Yönetim Hizmetleri Şube Müdürlüğü,

Kilis İl Sağlık Müdürlüğü Sağlık Hizmetleri Şube Müdürlüğü,

Kilis İl Sağlık Müdürlüğü 112 Acil Sağlık Hizmetleri Şube Müdürlüğü.

2015 Aralık'tan günümüze kadar: Gaziantep Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi.