



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ALZHEIMER HASTALIĞINDA TACROLIMUSUN SIÇAN  
HİPOKAMPUSU ÜZERİNE ETKİLERİNİN DAVRANIŞ  
MODELİ VE HİSTOMORFOMETRİK YÖNTEMLER İLE  
ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**AYŞE KÖYLÜ**

**Samsun  
Aralık 2016**





ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ALZHEIMER HASTALIĞINDA TACROLIMUSUN SIÇAN  
HİPOKAMPUSU ÜZERİNE ETKİLERİNİN DAVRANIŞ  
MODELİ VE HİSTOMORFOMETRİK YÖNTEMLER İLE  
ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**AYŞE KÖYLÜ**

**Danışman  
Doç. Dr. Berrin Zuhâl Altunkaynak**

**Samsun  
Aralık 2016**

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ayşe KÖYLÜ tarafından Doç. Dr. Berrin Zuhul ALTUNKAYNAK danışmanlığında hazırlanan “Alzheimer Hastalığı’nda Tacrolimus’un Sıçan Hipokampusu Üzerine Etkilerinin Davranış Modeli ve Histomorfometrik Yöntemler ile Araştırılması” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 23/12/2016 tarihinde yapılan sınav ile Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir.

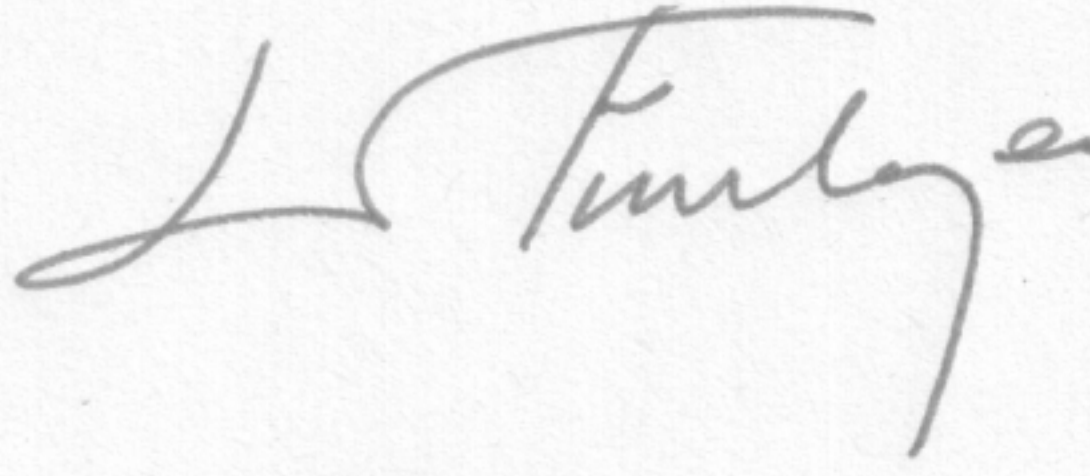
Başkan: Doç. Dr. Berrin Zuhul ALTUNKAYNAK, Ondokuz Mayıs Üniversitesi



Üye: Doç. Dr. Aydın HİM, Ondokuz Mayıs Üniversitesi



Üye: Doç. Dr. Levent TUMKAYA, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi



ONAY

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

... / ... / ...

**Prof. Dr. Ahmet UZUN**  
**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü**

## TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimime başladığım günden bu aşamaya kadar olan süreçte bana göstermiş olduğu sabır, vermiş olduğu emek ve bilimsel desteği için tez danışmanım ve hocam Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Berrin Zuhul ALTUNKAYNAK'a,

Bilimsel yönden gelişmemde ve çalışmam için gereken tüm imkânlara vesile olan hocam Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Süleyman KAPLAN'a ve anabilim dalımızda görev yapan diğer öğretim üyelerine,

Sadece tez dönemimde değil her anımda yanımda olan ve problemlerin üstesinden gelmemde bana yardım eden, her biri kendi alanında başarılı olan dostlarım Arş. Görv. Sümeyye GÜMÜŞ UZUN, Arş. Görv. Burcu DELİBAŞ ve Arş. Görv. Adem KOCAMAN'a sonsuz teşekkür ederim. Histolojik çalışmalarında bana yol gösteren ve büyük emekler veren Arş. Görv. Gamze ALTUN, Arş. Görv. Ömür Gülsüm DENİZ, doktora öğrencileri Elfide Gizem KIVRAK, Ahmad YAHYAZADEH ve Işınso ALKAN'a teşekkür ederim. Deneysel stereotaksi çalışmalarında bana vakit ayıran ve yardımcı olan Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'ndan Arş. Görv. Fatma Banu ŞEN'e teşekkürü bir borç bilirim.

Bütün eğitim ve öğretim hayatım boyunca her zaman yanımda olan, bana maddi ve manevi destek veren, her şeyden çok değerli olan ebeveynlerim Prof. Dr. Mustafa KÖYLÜ ve Pakize KÖYLÜ'ye çok ama çok teşekkür ediyorum.

Sabır ve özveriyle yapıp bitirdiğim bu tez çalışmam ailem ve dostlarıma atfedilmiştir.

## ÖZET

### ALZHEIMER HASTALIĞINDA TACROLIMUSUN SIÇAN HİPOKAMPUSU ÜZERİNE ETKİLERİNİN DAVRANIŞ MODELİ VE HİSTOMORFOMETRİK YÖNTEMLER İLE ARAŞTIRILMASI

**Amaç:** Günümüzde Alzheimer Hastalığı insan popülasyonunda en sık görülen demans hastalığıdır ve insan hayat kalitesini oldukça düşürmektedir. Çalışmamızda bir calcineurin inhibitörü olan tacrolimusun (FK506) Alzheimer Hastalığı'nda görülen nöronal azalmaya olan etkisini araştırmayı amaçladık.

**Materyal ve Metot:** Araştırmamızda 15 adet *Wistar albino* türü erkek sıçan ile çalışıldı. 15 erkek sıçan beşerli üç gruba ayrıldı. Birinci gruba sadece davranışsal mekânsal bellek testi olan Morris su tankı testi yapıldı. İkinci gruba intraserebraventriküler yoldan streptozotocin injekte edildi ve injeksiyondan 14 gün sonra denekler Morris su tankı testine tabi tutuldu. Üçüncü gruba intraserebraventriküler yoldan streptozotocin injekte edilmeden önce tacrolimus etken maddeli ilaç olan Prograf oral yoldan 10 gün boyunca verildi. Aynı gruba streptozotocin injeksiyonundan 14 gün sonra Morris su tankı testi yapıldı.

**Bulgular:** Araştırmamızın sonucunda intraserebraventriküler yoldan streptozotocin injekte edilen gruptaki deneklerin hipokampusuna ait CA1, CA3 ve DG bölgelerindeki ortalama nöron sayıları kontrol grubu ile kıyaslandığında önemli derecede azalma ( $p<0,01$ ) olduğu tespit edildi. Benzer bulgular tacrolimus etken maddeli ilaç verilen grupta da vardı. Fakat bu iki grup birbirleri ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede bir fark tespit edilemedi ( $p>0,05$ ). Morris su tankı testi sonuçlarına göre kontrol grubu ile diğer iki grup karşılaştırıldığında aralarında anlamlı derecede bir fark olduğu tespit edildi ( $p<0,01$ ).

**Sonuç:** Tacrolimus etken maddeli ilacın streptozotocin ile oluşturulan bilişsel ve kısa süreli hafızadaki hasar ile nöronal kaybı önlemede etkisiz olduğu bulundu. Farklı doz ve gün sayıları ile ileri düzeyde bir araştırma önerilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Alzheimer Hastalığı; Hipokampus; Öğrenme; Stereoloji; Tacrolimus.

Ayşe KÖYLÜ, Yüksek Lisans Tezi

Ondokuz Mayıs Üniversitesi-Samsun, Aralık-2016

## ABSTRACT

### RESEARCHING THE EFFECTS OF TACROLIMUS ON THE RAT HIPPOCAMPUS IN ALZHEIMER'S DISEASE BY BEHAVIOR MODEL AND HISTOMORPHOMETRIC METHODS

**Aim:** Alzheimer's disease is the most common dementia disease in the human population and it decreases the quality of human life. We aimed to investigate the effect of a calcineurin inhibitor tacrolimus (FK506) on neuronal loss at Alzheimer's disease in this study.

**Material and Method:** Fifteen male *Wistar albino* species rats were studied in our research. Fifteen male rats were divided into three groups. To the first group only the Morris water maze test was applied to assess the spatial memory. The second group was injected with intracerebroventricular streptozotocin and then applied to Morris water maze test after 14 days. To the third group before the intracerebroventricular injection of streptozotocin, tacrolimus was given orally for 10 days. Morris water maze test was performed 14 days after the injection of streptozotocin for the same group.

**Results:** The intracerebroventricular streptozotocin injected group had a significant decrease ( $p < 0.01$ ) when comparing with control group in the mean number of neurons in the hippocampus CA1, CA3 and DG regions. Similar results were also found in the group receiving tacrolimus. However, when these two groups were compared with each other no significant difference was found ( $p > 0.05$ ). According to the Morris water maze test results, there was a significant difference between the control group when comparing with the other groups ( $p < 0.01$ ).

**Conclusion:** Tacrolimus was found to be ineffective in preventing neuronal loss by cognitive and short-term memory damage induced by streptozotocin. An improved study is recommended by different doses and days.

**Keywords:** Alzheimer's Disease; Hippocampus; Learning; Stereology; Tacrolimus

Ayşe KÖYLÜ, Master Thesis

Ondokuz Mayıs University-Samsun, December-2016

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b><sup>13</sup>C-PIB</b>	:	Pittsburgh bileşik-B karbon 13
<b>A</b>	:	Alzheimer hastalığı
<b>ADAM10</b>	:	Disintegrin ve metalloproteinaz etki alanı içeren protein 10
<b>ADAM17</b>	:	Disintegrin ve metalloproteinaz etki alanı içeren protein 17
<b>ADAM9</b>	:	Disintegrin ve metalloproteinaz etki alanı içeren protein 9
<b>AH</b>	:	Alzheimer Hastalığı
<b>AICD</b>	:	Amiloid öncü hücre içi etki alan proteini
<b>APP</b>	:	Amiloid öncü proteini
<b>Aβ</b>	:	Amiloid beta
<b>BACE1</b>	:	Beta sekretaz 1
<b>BDNF</b>	:	Beyin türevli nörotrofik faktör
<b>CaM</b>	:	Calmodulin
<b>CaN</b>	:	Calcineurin
<b>CDK5</b>	:	Siklin-bağımlı kinaz 5
<b>cm</b>	:	Santimetre
<b>CNI</b>	:	Calcineurin inhibitörü
<b>CYP3A</b>	:	Sitokrom P450 3A
<b>dk</b>	:	Dakika
<b>DNA</b>	:	Deoksiribo nükleik asit
<b>gr</b>	:	Gram
<b>GSH</b>	:	Glutasyonun
<b>GSK3β</b>	:	Glikojen sentaz kinaz 3β
<b>HE</b>	:	Hematoksilen-Eosin
<b>IL-2</b>	:	İnterlökin 2
<b>K</b>	:	Kontrol
<b>kg</b>	:	Kilogram
<b>MARK</b>	:	Mikrotübül afiniteli düzenleyici kinaz



<b>MDA</b>	:	Malondialdehit
<b>ml</b>	:	Mililitre
<b>MWM</b>	:	Morris su tankı
<b>NFAT</b>	:	Aktif T hücrelerin nükleer faktörü
<b>NFTs</b>	:	Nörofibriler yumak
<b>NMDA</b>	:	N-metil-D-aspartat
<b>°C</b>	:	Santigrat
<b>PS-1</b>	:	Presinin 1
<b>PS-2</b>	:	Presinin 2
<b>RNA</b>	:	Ribo nükleik asit
<b>sAPP</b>	:	Çözülebilir amiloid öncü protein
<b>sn</b>	:	Saniye
<b>STZ</b>	:	Streptozotocin
<b>T</b>	:	Alzheimer+Tacrolimus
<b>TREM-2</b>	:	Miyeloid hücrelerde sentezlenen tetikleyici reseptör 2 protein
<b><math>\alpha</math>-APP</b>	:	Alfa-amiloid öncü protein
<b><math>\alpha</math>-sekretaz</b>	:	Alfa sekretaz
<b><math>\beta</math>-APP</b>	:	Beta-amiloid öncü protein
<b><math>\beta</math>-sekretaz</b>	:	Beta sekretaz
<b><math>\gamma</math>-sekretaz</b>	:	Gama sekretaz

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	iii
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	v
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	3
2.1. Alois Alzheimer ve Alzheimer Hastalığının Tarihçesi .....	3
2.2. Alzheimer Hastalığı .....	5
2.2.1. Eski Bir Hipotez: Amiloid Hipotezi .....	5
2.2.2. Yeni Bir Hipotez: Inverse Warburg Etkisi .....	8
2.3. Alzheimer Hastalığının Moleküler Mekanizması .....	10
2.3.1. APP ve Tau Oluşumları.....	10
2.3.2. Sinaptik Fonksiyonda A $\beta$ 'nin Etkisi .....	11
2.3.4. Aksonal Fonksiyonda Tau Hiperfosforilasyonunun Etkisi .....	12
2.4. Deneysel Hayvan Modeli .....	13
2.4.1. Streptozotocin.....	14
2.4.2. Streptozotocin ve DNA .....	14
2.4.3. Streptozotocin ve Alzheimer Hastalığı Hayvan Modeli.....	15
2.5. Tacrolimus (FK506).....	15
2.5.1. Calcineurin .....	16
2.5.2. Tacrolimus ve Emilim .....	18
2.5.3. Tacrolimus ve Toksikite.....	19
2.6. Stereoloji .....	19
2.6.1. Fiziksel Disektör Yöntemi.....	20
2.7. Limbik Sistem .....	20
2.7.1. Formatio Hipokampi .....	21
<b>3. MATERYAL ve METOD</b> .....	<b>22</b>
3.1. Çalışma Grupları .....	22
3.2. Streptozotocinin İnjesiyonu .....	24
3.3. Morris Su Tankı (MWM) Testi.....	29
3.3.1. Pre-Test Aşaması.....	30

3.3.2. Morris Su Tankı (MWM) Testi Aşaması .....	31
3.4. Perfüzyon Fiksasyonu .....	31
3.4.1. Perfüzyon Fiksasyon Basamakları .....	32
3.5. Histolojik İşlemler.....	33
3.6. Stereoloji Çalışmaları.....	35
3.6.1. Örnekleme Stratejisinin Belirlenmesi .....	35
3.6.2. Fiziksel Disektör ve Nöron Sayımı .....	37
3.7. İmmünohistokimyasal Çalışmalar.....	38
3.7.1. İmmünohistokimyasal Boyama Protokolü .....	39
3.8. İstatistiksel Analiz ve Hata Katsayısının Bulunması .....	40
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>41</b>
4.1. Morris Su Tankı Testi Bulguları .....	41
4.1.1. Pre-test1 Bulguları.....	41
4.1.2. Pre-test2 Bulguları.....	42
4.1.3. MWM Test Bulguları .....	43
4.2. Stereolojik Bulgular .....	45
4.2.1. CA1 Bölgesinden Elde Edilen Bulgular.....	46
4.2.2. CA2 Bölgesinden Elde Edilen Bulgular.....	47
4.2.3. CA3 Bölgesinden Elde Edilen Bulgular.....	48
4.2.4. DG Bölgesinden Elde Edilen Bulgular .....	50
4.3. Histolojik Bulgular.....	51
4.3.1. CA1 Bölgesinden Elde Edilen Bulgular.....	51
4.3.2. CA2 Bölgesinden Elde Edilen Bulgular.....	54
4.3.3. CA3 Bölgesinden Elde Edilen Bulgular.....	57
4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular .....	60
4.4.1. Entorhinal Korteks Bölgesinden Elde Edilen Bulgular.....	60
4.4.2. DG Bölgesinden Elde Edilen Bulgular .....	64
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>67</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>73</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>74</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>80</b>
EK 1- Etik Kurul Onayı .....	80

**ÖZGEÇMİŞ .....** **81**



## 1. GİRİŞ

Alzheimer hastalığı (AH) nörodejeneratif kronik bir demans hastalığıdır. Hastalığın görülme sıklığı 60-65 yaş aralığındaki insan popülasyonunda %0,1 iken bu oran logaritmik bir şekilde artıp 85 yaşından sonra %47'lere kadar çıkmaktadır. Hastalığın oluşmasında birçok sebep vardır. AH'nın yaygın bilinen nedenlerinden biri olan genetik bir hastalık olduğu yönündeki bilgiler doğru olmakla birlikte aslında genetik faktör riski çok düşük olan bir hastalıktır. Hastalığın yaklaşık %1'i kalıtsal olma özelliği taşır. Bu nedenle AH'nın temelinde yatan sebeplerin araştırılması ve hastalığın seyrini değiştirecek tedavilerin geliştirilmesi daha da önem kazanmaktadır. 2050 yılında dünya nüfusunun %25'inden fazlasının 65 yaşın üzerinde olacağı düşünülürse AH bugünde olduğu gibi gelecekte de önemli bir sağlık sorunu olacaktır (Öztürk ve Karan, 2009).

AH'nın bugüne kadar bilinen kesinleşmiş bir tedavisi henüz bulunmamaktadır. AH'nın temel nedenlerinden biri beyindeki nöron denilen sinir hücrelerinin içerisinde bulunan tau proteinlerinin hiperfosforilasyonları sonucunda nörofibril yumakların oluşmasıdır. Buna ek olarak hücre dışında yani nöronlar arasında amiloid plak birikimlerinin meydana gelmesidir (Esen, 2010). Her iki oluşum da nöronların birbirleriyle iletişimlerini önceleri kısıtlayıp daha sonra tamamen kesmektedir. Nöronlar arası iletişimin kesilmesi sonucunda hastada önceleri hafızada zayıflık, günlük işlerinde unutkanlık gibi etkiler bırakmaktadır. Peş peşe gelen nöron ölümlerinin sonucunda ise beyin hacminde makroskopik bir azalma ve geri dönüşümü olmayan demans ortaya çıkmaktadır (Alzheimer's Association, 2016).

Hipokampusun fonksiyonlarına dair yapılan ilk ciddi çalışma 1957 yılında Scoville ve Milner tarafından hipokampusun hafıza ile ilgili bir bağlantısının olabileceği keşfi ile başlamıştır. Günümüzde iyi bilinmektedir ki hipokampusun özellikle kısa süreli hafıza başta olmak üzere uzaysal öğrenme, navigasyon, duygulanım ve Papez devresi mekanizmalarında önemli görevleri vardır (İzci ve Erbaş, 2015).

Tacrolimus, FK506 olarak bilinir, immünosupresif özelliklere sahip bir makrolid antibiyotiktir. Etkilerini hedef hücrelerdeki gen ekspresyonunun bozulması esasına göre uygular. Takrolimus, bir immünofilin olan FK506 bağlayıcı proteine (FKBP) bağlanır. Bağlanma sonucunda oluşan kompleks yapı calcineurin fosfatazi

inhibe eder. Nihayetinde kalsiyuma bağımlı meydana gelen olaylardan bazıları olan interlökin-2 gen transkripsiyonunu, nitrik oksit sentaz aktivasyonunu, hücre degranülasyonunu ve apoptoz olaylarını inhibe eder (Thomson ve ark., 1995). Tacrolimusun birçok çalışmada koruyucu ve önleyici etkileri olduğu rapor edilmiştir. Noto ve ark. (2007) göre orta serebral arter (MCA) oklüzyonu ile indüklenen geçici fokal beyin iskemisinin neden olduğu iskemi-reperfüzyon hasarına takrolimusun nöroprotektif etkisi vardır. Yousuf ve ark. (2007) FK506 tedavisinin spinal kord hipoksisine bağlı olarak ortaya çıkan hasarın FK506'nın antioksidan özelliği sayesinde nöroprotektif bir etkiye yol açtığını yaptıkları çalışmada göstermişlerdir. Texas Medical Branch Üniversitesi'ndeki araştırmacılar (Galveston, Texas, Amerika Birleşik Devletleri) organ nakli olan hastalarda AH olgusunun genel popülasyon ile kıyaslandığında ortalmanın oldukça altında kaldığını rapor etmişlerdir. Çünkü organ nakli olan hastaların calcineurin inhibitörü kullanmalarından dolayı AH patolojisine yakalanmalarını büyük oranda önlenmektedir (Tagliatela ve ark., 2015).

Tez çalışmamızın amacı, bir calcineurin inhibitörü olan tacrolimus etken maddesinin streptozotocin (STZ) kullanılarak oluşturulan deneysel AH hayvan modeli üzerindeki koruyucu etkisinin histomorfometrik, stereolojik ve davranış testi analizlerini kullanarak araştırmaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Alois Alzheimer ve Alzheimer Hastalığının Tarihçesi

Alois Alzheimer 14 Haziran 1864 yılında Marktbreit, Almanya'da doğmuş, 1887 yılında Berlin Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde doktora tezini yapmıştır. “Über die Ohrenschmalzdrüsen” (ceruminal bezler) başlıklı çalışmayı yaparak ilk histolojik görüntülerini elde etmiştir. Meslektaşı Franz Nissl'in teşvikiyle sinir sistemi histopatolojik çalışmalarına yönelmiştir. 25 Kasım 1901 yılında Auguste Deter adlı bir hasta Alzheimer'ın hekim olarak çalıştığı Frankfurt hastanesine gelerek ona muayene olmuştur. Hastada anlamada zorluk, hafızada zayıflık, afazi, uyum sorunu, öngörülmeleyen davranışlar, paranoya, işitsel halüsinasyonlar ve belirgin psikososyal bozukluklar olduğu tespit edilmiştir. 1906 yılında hastası ölünce Alzheimer beyin otopsi üzerinde ilk defa kullanılacak olan gümüş boyama ile beyin kesitlerini boyamıştır. Aynı yıl bir kongrede “Serebral Kortekste Tuhaf Bir Hastalık” adlı araştırmasını sunmuştur. Alzheimer 1907 yılında bir dergide “Serebral Korteksin Özgün Bir Hastalığı” adlı bir makale yayınlamıştır. Bu makalesinde hastası olan Auguste D.'nin ismini vermeden bulduğu histopatolojik bulguları paylaşmıştır. Nörofibrillerde tuhaf değişikliklerin olduğunu şu cümleler ile ifade etmiştir; “Neredeyse normal hücrenin merkezinde bir veya birkaç fibril karakteristik kalınlık ve tuhafıktaydı. Üst katlarda çok sayıda küçük miliyer odaklar (plaklar) bulunmaktaydı. Bunlar kortekste birikmiş tuhaf materyaller idi. Son zamanlarda bu tuhaf hastalık vaka olarak fazla sayıda doğrulanmıştır” (Muarer ve ark., 1997). 1911 yılında kendi el çizimi olan şekilleri tekrar makaleyi düzenleyerek yayınlamıştır (Şekil 1). O dönemde yaşlı insanların beyninde var olan senil plaklar zaten biliniyordu fakat Alzheimer ilk defa gümüş boyama yöntemini kullanarak nörofibril yumak olgusunu bilim dünyasına kazandırmıştır.



**Şekil 1.** Alois Alzheimer'ın kaleminden nörofibril yumak çizimleri (Muarer ve ark., 1997)

Araştırmaların tarihsel seyir özeti (Özgör ve ark., 2013);

- 1901 yılında 51 yaşındaki Auguste Deter'in kliniğe gelişi
- 1906 yılında Auguste Deter'in septisemi sonucunda ölümü
- 1906 yılında Alzheimer "Güney-Batı Alman Akıl Hastalıkları Uzmanları Kongresi"nde bu olguyu "Serebral Korteksin Tuhaf Bir Hastalığı" adıyla sunması
- 1907 yılında sunmuş olduğu bu olguyu "Genel Psikiyatri ve Adli Tıp Dergisi"nde "Serebral Korteksin Özgün Bir Hastalığı" başlığı ile yayınlaması
- 1937 yılında James W. Papez "Papez Devresi" ile AH'nın ilk evre bozulmasına ışık tutması
- 1970 yılında Apolipoprotein E'nin keşfedilmesi
- 1984 yılında A $\beta$ 'nin Glenner ve Wong tarafından keşfedilmesi
- 1986 yılında Marc Kirschner tarafından Tau proteinin keşfedilmesi
- 1987 yılında AH ile ilgili ilk belirleyici genin bulunması (21. kromozomda kodlanan amiloid prekürsör proteini)
- 1992 yılında Peter St. George-Hyslop tarafından Presenilin 1 ve Presenilin 2 mutasyonlarının erken başlangıçlı ailesel AH'na sebep olduğunun belirlenmesi
- 1993 yılında AH ile ilgili ilk risk faktörünün ApoE'nin bir formu olan E4 adlı genin olduğunun belirlenmesi
- 2003 yılında AH'nın ulusal genetik çalışmalarına başlanması
- 2012 yılında AH ile ilgili yeni bir gen olan TREM-2 varyant risklerinin tanımlanması



Günümüzde ise Dr. Katarina ve ekibi *Drosophila melanogaster* türü sinek ile yaptıkları çalışmada lizozim enzimi ile A $\beta$ <sub>1-42</sub> arasında bir korelasyon olduğunu keşfetmiştir (Sandin ve ark., 2016).

## **2.2. Alzheimer Hastalığı**

Önbeyin nöronlarında özellikle medyal bölümde kolinerjik bazallar ile Meynert alanındaki çekirdek basalların kolinerjik hipokampal/kortikal fonksiyon kaybına bağlı bilişsel zayıflamanın meydana geldiği (cognitive decline) ve neticesinde demansın ortaya çıktığı nörodejeneratif bir hastalıktır. Tüm korteksin kolinerjik inervasyonu temel limbik yapılardan biri olan basal ön beyindeki Meynert çekirdeğinden sağlanır. Hastaların beyinleri histopatolojik olarak incelendiğinde nöron içinde tau proteininin aşırı hiperfosforilasyonuna bağlı olarak biriken nörofibril yumaklar ve nöronlar arasında meydana gelen amiloid plakların varlığı bu hastalığın tipik belirleyicilerindedir (Sastre ve ark., 2006). Ölüm genellikle hastalığın teşhisinden ortalama 9 yıl sonra aspirasyonpnömoni sebebiyle olmaktadır (Heneka ve O'Banion, 2007).

Hastaların beyin otopsi sonuçları incelendiğinde ciddi serebral atrofilerin varlığı tespit edilmiş ve özellikle öğrenme ve hafıza bölgeleri ile ilişkili olan temporal, pariyetal loblar ile frontal korteks, hipokampus ve amigdaladaki anormal değişiklikler göze çarpmıştır. Kolesterol transportunda görevli bir protein olan Apolipoprotein E'nin e4 aleli; normal beyaz populasyonda %16 iken Alzheimer hastalarında %35-50 sıklıkta bulunmaktadır. e4 aleli diğer alellerden daha fazla miktarda A $\beta$  agregasyonuna neden olmakta, buna karşın daha az etkin A $\beta$  temizlenmesini sağlamaktadır. ApoE'nin tau proteininin artmış fosforilasyonuna ve birikimine neden olduğu düşünülmektedir (Heneka ve O'Banion, 2007).

AH ile ilişkili birkaç hipotez sunulabilir ama en eski ve bilinen hipotez olan amiloid hipotezi ile henüz alana yeni giren Inverse Warburg Effekt hipotesine göz atmakta yarar var.

### **2.2.1. Eski Bir Hipotez: Amiloid Hipotezi**

Amiloid hipotezi, ailesel kaynaklı AH için bir modeldir ve bu model ilk defa 1984 yılında Glenner ve Wong tarafından geliştirilmiştir (Glenner ve Wong, 1984). AH'nın amiloid plakların üretilmesi ile temizlenmesi arasındaki anormal işleyişten kaynaklandığını ileri sürerek bir amiloid kaskad hipotezi öne sürmüşlerdir. Fakat

günümüzde bu hipotez ile ilgili görüş ayrılıkları belirmeye başlamıştır. Deneysel gözlemler ile modeller arasındaki tutarsızlıklar fikir ayrılıklarına sebep olmuştur. Bu fikir ayrılıkları birkaç maddeyle özetlenebilir (Demetrius ve ark., 2015);

- Bilişsel açıdan bozukluk göstermeyen bireylerde de nöritik plaklar sürekli olarak meydana gelmektedir.
- Plak yoğunluğu ile demans arasında çok zayıf bir ilişki vardır.
- Bilişsel açıdan hastalıklı olmayan bireylere otopsi yapıldığında onlarda da büyük oranda amiloid plakların varlığına rastlanmıştır.

Sonuç olarak ailesel olmayan yani sporadik AH'nın moleküler temelini açıklamak için amiloid hipotezi yetersiz kalmaktadır. Ayrıca normal ve patolojik yaşlanmanın her ikisinde de belirgin amiloid plak birikimi gözlenmektedir (Tablo 1).

**Tablo 1.** Normal ile patolojik yaşlanma arasında görülen farklar (Demetrius ve ark., 2015'den uyarlanmıştır)

Karşılaştırma Yöntemi	Normal yaşlanma	Patolojik yaşlanma
<b>Klinik</b>	Kısa süreli hafızada hafif defektler	Kısa ve uzun süreli hafızada şiddetli defektler
<b>Moleküler</b>	Hafif amiloid plak birikimi	Şiddetli ve yaygın amiloid plak birikimi
<b>Hücreyel</b>	Sinaptik fonksiyonlarda bozulma	Nöron kaybı ve sinaptik kayıp, dendritik dallanmalarda kayıp

Amiloid hipotezi nöron merkezli bir mekanizmayı Inverse Warburg Effekt ise nöron-astrozit ilişkili bir mekanizmayı savunmaktadır. Inverse Warburg Effekt Hipotezi, AH'nın şu üç kaskad mekanizması sonucunda ortaya çıktığını ileri sürmektedir; 1. Mitokondrial bozukluk, 2. Inverse Warburg Effekt, 3. Doğal seleksiyon (Demetrius ve ark., 2015).

Beynin enerji ihtiyacı diğer organlara nazaran daha fazladır. Hem oksijen ihtiyacının hem de besin ihtiyacının eksiksiz yerine getirilmesi gerekmektedir. Enerji ihtiyacının büyük bir kısmı mitokondrideki oksidatif fosforilasyon mekanizmasında yer alan trikarboksilik asit üzerinden glikozun oksidasyonu ve metabolize olması ile üretilmektedir. Nöron ve glia hücrelerin beyin serebral enerji tüketimine olan katkıları

hesaplanmıştır. Dinlenme halinde enerji tüketiminin büyük bir kısmı (~%88) nöronlara ait iken enerji tüketiminin az bir kısmı (~%12) glia hücrelerine aittir. Uzun süre direkt glikoz kullanımının ve mitokondri tarafından gerçekleştirilen oksidasyonun hem dinlenme halinde hem de aktivite boyunca ATP ihtiyacının giderilmesinde temel kaynak olduğu düşünülmektedir (Demetrius ve ark., 2015).

Güncel araştırmalar nöronların glikoliz olayı için kritik bir enzim olan PFKFB3'ü düşük oranda eksprese ettiğini göstermiştir. Sonuç şu ki nöronlar artmış enerji ihtiyacını gidermek için glikolizizi sınırlı bir şekilde up-regüle (hücrenel bileşiklerin miktarında artış) edebilmektedir. Buna karşılık astrositler yüksek oranda PFKFB3 eksprese edebilmekte ve ayrıca malat-aspartat şantı için önemli bir bileşim olan aspartat-glutamat taşıyıcı ara'ları da düşük oranda eksprese etmektedir. Aspartat-glutamat taşıyıcı ara'lar, sitolik olan NADH'ları mitokondri içine taşımakta, laktat formasyonu yerine glikoz-türevi piruvat oksidasyonunu desteklemektedir. Bu model nöronların neden esasen oksidatif hücreler olduğunu ve astrositlerin de neden yüksek glikolitik kapasitelerin olduğunu açıklar (Yalcin ve ark., 2009).

Amiloid prokürsor (öncül) proteini (APP) vücudumuzda hemen her hücrede varlığını gösterir. APP hücrede eksprese olan bir transmembran proteinidir. Bu protein iki yol ile kesilir :  $\alpha$  ve  $\beta$  yolları.  $\alpha$  yolunda  $\alpha$ -sekretaz aktivitesi hâkim olup çözünebilen (soluble) APP (sAPP) oluşmaktadır.  $\beta$  yolunda ise  $\beta$  ve  $\gamma$ -sekretaz aktiviteler ile A $\beta$  peptidleri oluşmaktadır. A $\beta$  uzunluğunun sebep olduğu A $\beta$  nörotoksisitesinin  $\gamma$ -sekretaz tarafından oluşturulduğu bilinmektedir. A $\beta$  nörotoksisitesinin oluşabilmesi için fibril oluşumunun A $\beta$ \_42 ile A $\beta$ \_40'dan daha fazla olması gerekmektedir. Beyinde meydana gelen senil plaklar, nörofibrillar plaklar ve ilerleyen dönemlerdeki nöron kayıpları, A $\beta$  oluşumunun bir neticesidir. Nöron kayıpları entorhinal korteksten başlar ve limbik sistemi terk ettiğinde superior temporal sulkusta tespit edilir (Topçuoğlu ve Selekler, 1998).

A $\beta$ 'nin fibriller oluşturarak lokal mikroglia ve astrositleri aktive ettiği, bu hücrelerden salınan moleküllerin nöronlarda nörotoksik etkiler oluşturduğu bilinmektedir. Bu nörotoksik etkilere maruz kalan nöronlarda dejeneratif değişiklikler olmaktadır. Bu dejeneratif değişikliklere en popüler örnek ise tau proteinin hiperfosforilasyonu sonucunda meydana gelen çift helikal filamentler oluşmasıdır. A $\beta$  kalsiyum ve sodyum iyonlarına karşı geçirgenliği artmış iyon kanalları gibi

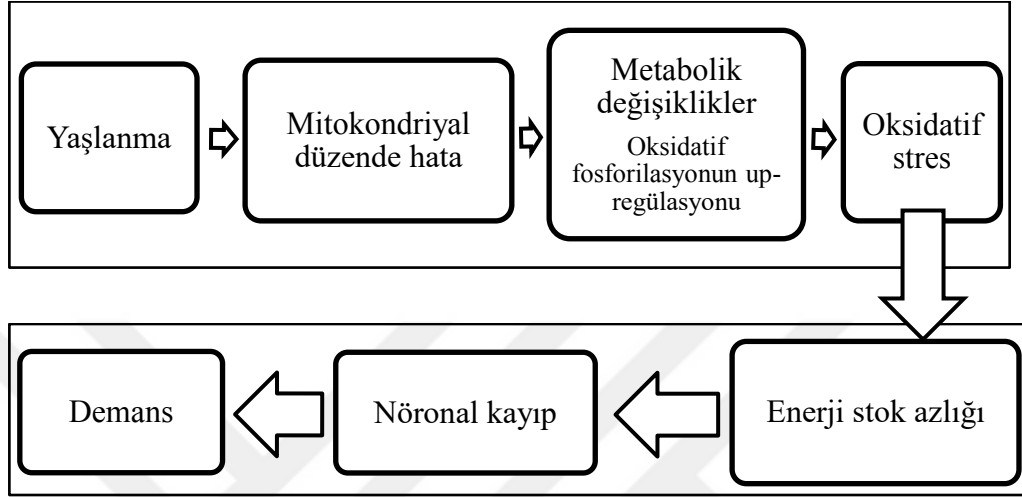
davranması neticesinde sitotoksositeye sebep olur. Bir başka etki de yüksek seviyede A $\beta$  glutameterjik sinaptik iletiyi hem glutameterjik dendritik çıkıntıları azaltarak sinaptik glutamat alımını engellemesi hem de reseptör sayısını azaltması sonucunda desensitizasyona sebep olması ve neticesinde bozmasına dair bulgular vardır. Sonuçta tüm kaskad nöronlarında programlanmış hücre ölümü yani apoptozis meydana gelmektedir (Topçuoğlu ve Selekler, 1998).

### **2.2.2. Yeni Bir Hipotez: Inverse Warburg Effekt**

Inverse Warburg Effect nöron ve glial hücrelerde nöron-astrozit arasındaki enerji talep ve tedarigi ile ilgili bir hipotezdir. Bu model hem nöron hem de astrositlerdeki beyin enerji metabolizması hakkında bilgi vermektedir. Her iki hücre tipi de enerji kaynağı olarak glikozu kullanmaktadır. Astrositler aeobik yoldan büyük miktardaki glikozu laktata çevirmekte ve laktat hücre dışı ortama salınmaktadır. Nöronlarda ise glikoz-tüevli ve laktat-tüevli piruvat aerobik yoldan metabolize olmakta ve oksidatif fosforilasyon baskın enerji ürünü olarak ortaya çıkmaktadır. Nöronlar glikolizis yolundan enerji üretimini artıramazlar çünkü glikolizis mekanizmasını düzenleyen bazı enzimlerin aktiviteleri bloke olmaktadır. Bu nedenle nöronlardaki bazı mitokondriler hasara uğradığında artmakta olan enerji ihtiyacı iki yol ile karşılayabilmekte. İlki metabolik bir up-regülasyon olan ve laktat üretiminin artması sonucunda devreye giren astrositlerdeki glikolizisi düzenleme mekanizması; ikincisi astrositler tarafından üretilen laktatı ek bir enerji kaynağı olarak kullanan nöronlardaki oksidatif fosforilasyon aktivitesinin up-regülasyon mekanizmasıdır. İşte oksidatif fosforilasyonun up-regülasyonun sonucunda meydana gelen olaylar sporadik AH'nı tetiklemekte ve bu olay Inverse Warburg Effekt olarak adlandırılır. Normal bir oksidatif fosforilasyon aktivitesi sağlıklı iki nöron arasında gerçekleşir (Demetrius ve ark., 2015).

Yaşlanmada protein çökmesine cevap olarak şaperon ve proteasomlarda bir gerileme ve bu nedenle de amiloid formasyona zemin hazırlanmaktadır. Metabolik düzeyde yaşlanma süreci, nöronların uygun kalorige enerji alımını ve bu enerjiyi ATP'ye dönüştürmedeki verimliliğinde bir azalmaya yol açacaktır. Nöroenerjetik model bu azalmış verimliliğin nöronlardaki oksidatif fosforilasyonun up-regülasyonunu içeren bir kaskadı tetiklediğini ve nöronal kayıp ile demansa neden olabileceğini varsaymaktadır. Özetle, yaşlanmanın sonucu olarak mitokondride meydana gelen düzensizlikler sonucunda oksidatif strese sebep olan oksidatif fosforilasyonun up-

regülasyonu meydana gelir. Up-regüle olmuş mitokondride aynı seviyedeki enerji ihtiyacını karşılamak için gereken standart substrattan daha fazlasına ihtiyaç vardır. Bu olay bir enerji kıtlığına sebep olur. Enerji substratları için savaşamaz hale gelen nöronlar sonunda ölür ve demans ortaya çıkar (Şekil 2) (Demetrius ve ark., 2015).



Şekil 2. AH'na geçiş aşamaları (Demetrius, 2015'den uyarlanmıştır)

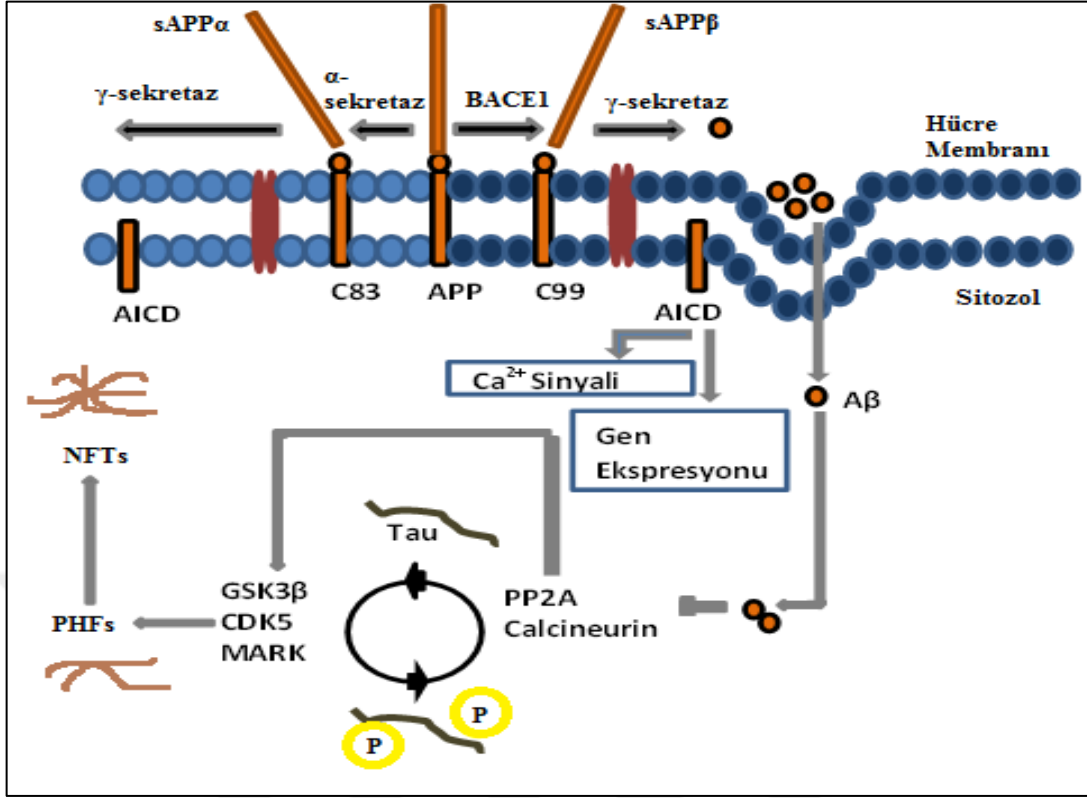
Tau proteinleri, hücre iskeleti proteinlerinden biri olan mikrotübüllerin organizasyonu ve stabilizasyonunda rol alan ana proteinlerdir. Santral sinir sisteminde altı farklı izoformu olan tau proteininin geni 17. Kromozom üzerindedir. Tau proteinin hiperfosforilasyonu sonucunda oluşan agregatların, ki apoptozis olayını tetiklediği bilinmekte, lokalizasyon bölgeleri entorrhinal korteks, hipokampus, parahipokampus, amigdala, kortikal asosyasyon alanları ve buralara projekte olan subkortikal çekirdeklerdir. AH'nda tau hiperfosforilasyonuna yol açan kilit kinaz aktivitesi tam bilinmemektedir. Ancak bir serin-treonin kinaz olan CDK5, içinde tau proteinin de bulunduğu pek çok hücre iskelet proteinlerini, sinaptik proteinlerini ve transkripsiyon faktörlerini fosforlamaktadır. Bu nedenle AH'nda CDK5 hiperaktivasyonunun tau hiperfosforilasyonunda ve nörodejeneratif süreçte rol aldığı düşünülmektedir (Heneka ve O'Banion, 2007). Fakat unutulmamalıdır ki tau proteinin hiperfosforilasyonu sadece AH'na özgü bir patolojik durum değildir, başka nörolojik vakalarda da görülebilir örneğin travmatik beyin hasarı (Yoshiyama ve ark., 2005).

### 2.3. Alzheimer Hastalığının Moleküler Mekanizması

AH yıkıcı nörodejeneratif bir hastalıktır. A $\beta$ 'nin aşırı sentezlenmesi veya ortamdan temizlenmesinde kaynaklanan bir sorun ile başlar. Çünkü normal bir yaşlanma sürecinde de A $\beta$  birikmesi gerçekleşmektedir. A $\beta$  kendi kendisine çökelmekte ve oligomerlere dönüşmektedir ki bu oligomerler o kadar büyük boyutlara gelir ki kan damarlarında ve parankimada yoğun nöritik plaklar oluşturur. A $\beta$  oligomerleri ve plaklar sinapslar için güçlü toksik birikimlerdir. Bu birikimler proteazom fonksiyonlarını (hasar görmüş veya gereksinim olmayan hücre proteinlerinin parçalanmasında işlev gören enzimatik kompleksler birliği) bloke eder, mitokondriyal aktiviteyi inhibe eder, hücre içi Ca<sup>2+</sup> seviyelerini değiştirir ve inflamasyon sürecini başlatır. A $\beta$ 'nin normal fizyolojik fonksiyonlarını kaybetmesi ayrıca nöronal fonksiyon bozukluğuna neden olur. A $\beta$  ayrıca sinyal yollarını regüle eden mikrotübül ilişkili tau proteininin fosforilasyon mekanizmasını etkiler. Tau'nun hiperfosforilasyonu onun normal aksonal iletim fonksiyonlarını engeller ve bu olay nörofibril yumaklar ile toksik çözülebilen tau'ların oluşmasına neden olur (Murphy ve LeVinn, 2010).

#### 2.3.1. APP ve Tau Oluşumları

Amiloid öncü proteini (APP) iki yol ile üretilir. Bunlar, non-amiloidjenik ve amiloidjenik yol. Non-amiloidjenik yolda APP,  $\alpha$ -sekretaz (ADAM9, ADAM10 ya da ADAM17) sayesinde sAPP $\alpha$  ve C83 substratları üretilir. Amiloidjenik yolda yani hücre membranı geçişlerinde, BACE1 sAPP $\beta$ 'yi serbest bırakır o da C99 substratını üretir.  $\gamma$ -sekretaz (PS1 ya da PS2 tarafından meydana gelen) sayesinde C99'un bölünmesi A $\beta$  salınımına neden olur ve hücre içi alanı serbestleştirir. AICD, bir gen ekspresyonunu ve Ca<sup>2+</sup> sinayalini modüle eder. A $\beta$  oligomerleri nöron içinde üretilir ve tau patolojisine sebep olur (Şekil 3) (LaFerla, 2008).



**Şekil 3.** APP ve tau proteinin oluşumunu özetleyen bir resim. **sAPPα**: Çözülebilir amiloid öncü protein, **BACE1**: Beta sekretaz 1, **sAPPβ**: Çözülebilir beta öncü protein, **AICD**: Amiloid öncü hücre içi etki alan proteini, **APP**: Amiloid öncü protein, **PP2A**: Protein fosfotaz 2, **GSK3β**: Glikojen sentaz kinaz 3beta, **CDK5**: Siklin bağımlı kinaz 5, **MARK**: Mikrotübül afinite düzenleyici kinaz, **NFTs**: Çözülebilir nörofibriler yumak, **PHFs**: Eşleştirilmiş sarmal filamentler, **Aβ**: Amiloid beta (LaFerla, 2008' den uyarlanmıştır)

AH'nda tau anormal şekilde hiperfosforilasyona uğramakta ve nöron içi fibrillere neden olmaktadır. Fazla sayıda kinaz tau hiperfosforilasyon mekanizmasında rol almaktadır ki bunların içinde GSK3β, CDK5 ve MARK vardır. Bu kinazların aktivite olmaları sonucunda hâlihazırda ortamda bulunan inflamator sitokinlerin kendisi de tau hiperfosforilasyonu tetiklemektedir. Tau fosforilasyonu proteasom sistemi (ubiquitin tarafından etiketlenen ve proteinleri yıkan bir protein kompleksi) tarafından bozulmaktadır (LaFerla, 2008).

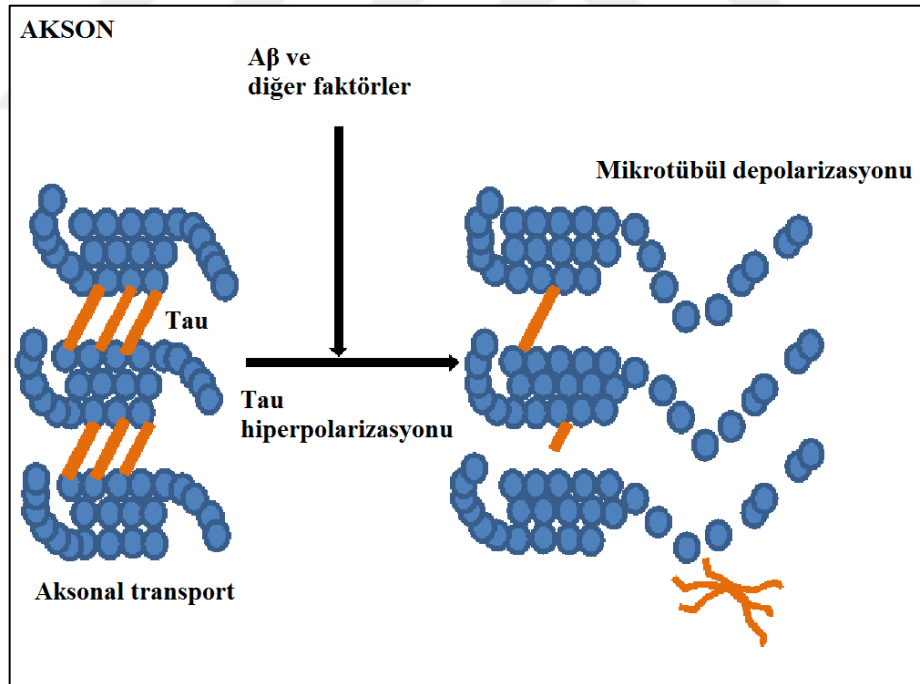
### 2.3.2. Sinaptik Fonksiyonda Aβ'nin Etkisi

Sinaptik fonksiyon bozukluğu birkaç yapısal değişiklikler ile tetiklenmektedir ki bunların içinde dendritik filiz kayıpları, post sinaptik dejenerasyon ve Aβ ile uyarılmış nörokimyasal değişiklikler bulunmaktadır. Aβ'nin sinaptik aktivitede modüler

rolü olduğu bilinmektedir. AH'nda asetilkolin seviyelerinde bir azalma olur ve asetilkolinesteraz inhibitörleri terapötik ajanlar olarak tedavide kullanılmaktadır. Muskarinik M1 reseptörleri APP'leri değiştirir ve non-amiloid yola yönlendirir. Bu nedendir ki M1 agonistleri A $\beta$  seviyesini azaltacak muhtemel terapötik ajanlar olarak kullanılmaya sunulabilir (LaFerla, 2008).

#### 2.3.4. Aksonal Fonksiyonda Tau Hiperfosforilasyonunun Etkisi

Tau yüksek oranda çözülebilen mikrotübül bağlayıcı bir proteindir. Tau mutasyonları beyinde frontatemporal hasarlara neden olur. AH'nda olduğu gibi 17. kromozom bölgesindeki mutasyonlar Parkinson Hastalığı'na da neden olmaktadır. MARK, CDK5 ve GSK3 $\beta$  tarafından modüle olan tau'nun hiperfosforilasyonu mikrotübüllerde stabilizasyon mekanizmasını bozmakta ve onları stabil olmayan bir şekle getirmektedir. Bu ise aksonal iletiminde hasar ve nöronal fonksiyon bozukluğuna, sonucunda ise hücre içi nörofibril yumak oluşumuna neden olmaktadır (Şekil 4) (LaFerla, 2008).



Şekil 4. Nörofibril yumak oluşum mekanizması. A $\beta$ : Amiloid beta (LaFerla, 2008' den uyarlanmıştır)



## 2.4. Deneysel Hayvan Modeli

Seçilen hayvan modeli bir hastalığın çalışılmasında önemi azımsanmayacak kadar büyüktür. Çünkü yapılan klinik öncesi deney çalışmaların büyük bir oranı yanlış veya yetersiz model seçilmesinden dolayı olumsuz sonuçlanmaktadır (Grieb, 2015).

Erken AH'na sebep olan üç gen bölgesi tespit edilmiştir. Bu gen bölgesindeki mutasyonlar sonucunda kodlanan  $\beta$ -APP ve presininler (PS-1 ve PS-2) AH'nda erken dönem otozomal dominant formları meydana getirmektedir. 1995'den yakın tarihe kadar 300'e yakın deniz canlısıyla yapılan bilimsel araştırmalar neticesinde insan formatına uygun bir AH modeli çıkmamıştır. Bunun nedenlerinden en önemlisi AH'nın patofizyolojik mekanizmasının tam olarak anlaşılammış olmasıdır. Bu sebepten ötürü günümüzde transgenik hayvan modellerinde çalışılmaya başlanmıştır. Fakat son zamanlarda AH modelinin oluşturulmasında STZ injeksiyonlu hayvan modelleri popüler olmaya başlamıştır (Grieb, 2015).

*In vivo* ve *in vitro* çalışmalarda beynin glikoz metabolizmasını bloke eden 2-deoksiglikoz inhibitörü kullanılmıştır. *In vitro* denemelerde hücreler  $\beta$ -APP<sub>695</sub> ekspresör plazmidi ile transfere uğratıldığında endoplazmik retikulum ve Golgi kompleksinde amiloidjenik COOH-terminal türevleri meydana gelmiştir. 2-deoksiglikoz ve sodyum asit kombinasyonu tarafından hücreler uyarıldığında hücre içi enerji metabolizması engellenmektedir. Sıçanlara intraperitoneal yoldan 500 mg/kg 2-deoksiglikoz verildiğinde beyin korteksinin gri maddesinde bulunan  $\beta$ -APP'nin azaldığı ve eşzamanlı olarak fosforilasyon seviyesinde bir azalma ve tau protein defosforilasyon seviyesinde bir artma gözlenmiştir. Amiloid plak tortuları ile frontal ve parietal orta hat yapıları arasında yüksek bağlantı ve metabolik aktivite bakımından bir ilişki olduğu ortaya çıkmıştır. Pozitron emisyon tomografisi (PET) ile taranan beyinde, beyin oksijen tüketimi (<sup>15</sup>O<sub>2</sub>), glikoz tüketimi (<sup>19</sup>F-deoksiglikoz) ve A $\beta$  yüklemesinin (<sup>13</sup>C-PIB) genç yetişkin insan beynindeki oksijenli glikolizisin uzaysal dağılımının hastalardaki A $\beta$  depozitlerinin lokalasyonunda bir korelasyon olduğu bilgisine varılmıştır (Zhang ve ark., 2014). Genç yetişkinlerdeki bölgesel oksijenli glikolizis ile ileriki dönem AH patolojisinin oluşması arasında olası bir bağlantı olduğu bulgusuna varılmıştır (Grieb, 2015).

### 2.4.1. Streptozotocin

Formülü  $C_8H_{15}N_3O_7$ , molekül ağırlığı 265, 22 gr/mol olan STZ [Sinonim: N-(Methylnitrosocarbamoyl)- $\alpha$ -D-glucosamine, Streptozocin] serbest radikaller olan superoksit ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve nitrojendioksit ( $NO_2$ ) salınımına sebep olarak sonuçta DNA yapısının bozulmasına yol açar (Li, 2001).

1963 yılında deneysel olarak diyabet oluşturulabileceği keşfedilen STZ, *Streptomyces achromogenes* türü bakterisinden elde edilen glikozamin-nitrozüre bir bileşimidir. O tarihten bu yana STZ hayvan modellerinde tip 1 diyabetin oluşturulmasında sıkça kullanılmaktadır (Bolzan ve Bianchi, 2002). Beynin intraserebral ventriküllerine yapılacak tek ya da çift doz STZ kronik olarak özellikle frontal ve parietal kortekste serebral glikoz alınımını ve aynı zamanda ATP ile fosfokreatin konsantrasyonunu da azaltır. Neticede AH'nın moleküler, patolojik ve psikolojik sonuçlarına benzer etkilere neden olur (Grieb, 2015).

### 2.4.2. Streptozotocin ve DNA

STZ tesirli bir alkalat ajanı olarak bilinir ve DNA'ya direkt metil grupları ekler. Örneğin sıçan böbreği DNA'sındaki N<sup>7</sup>-methylguanine (N<sup>7</sup>-MeG), O<sup>6</sup>-methylguanine (O<sup>6</sup>-MeG) N<sup>7</sup>-methyladenine ve N<sup>3</sup>-methyladenine seviyelerini önemli derecede artırmaktadır. DNA çift zincirini kırabilecek en düşük STZ doz miktarı sıçanlar için 2,5 mg/kg iken yaygın diyabet modelinin oluşturulabilmesi için verilmesi gereken en düşük doz ise 60 mg/kg'dır. Son zamanlarda STZ ile DNA hasarının oluşturulması için insan hücre dizisi ve genomlarından izole edilen <sup>32</sup>P-işaretli DNA fragmanları da kullanılmaktadır. STZ sık sık DNA'nın guanin bazlarından başlayarak bir modifikasyon başlatmaktadır ki bu tipik bir metilat ajanı olan N-methyl-N-nitrozüre'ye benzerlik göstermektedir. Kısacası bu olay bize STZ'nin metil katyonları üzerinden guanin bazlarını etkileyerek DNA hasarına sebep olduğunu gösterir (Bolzan ve Bianchi, 2002).

STZ hem apoptozis hem de nekroz ile hücre ölümlerine sebep olmaktadır. Saini ve ark. (1996) deniz canlısı pankreatik beta hücre dizi çalışmalarında düşük doz STZ'nin apoptozise, yüksek dozun ise nekroza sebep olduğunu keşfetmişlerdir. STZ pankreatik beta hücrelerindeki ksantin oksidazın sebep olduğu  $O_2$  radikal üretimini artmasından sorumludur. Ayrıca  $H_2O_2$  üretimini stimüle eder ve sıçan pankreatik adalarındaki DNA'nın fragmanlarına ayrılmasına neden olur. Bu etkiler 0,1 mM ile

maksimum 1 mM'deki STZ konsantrasyonlarda ortaya çıkar. Güncel çalışmalar STZ'nin nitrik oksiti (NO) indükte ederek de DNA hasarına neden olduğunu göstermiştir. STZ'nin kromozomal hasarlara da yol açtığı bilinmektedir. Özellikle mitotik evrede çeşitli kromozomal anomalilere yol açmaktadır. İnsanda STZ'ye olan hücrel duyarlılıklar hücrenin çeşitine bağlıdır. Örneğin insan kolon kanser hücre *in vitro* çalışmalarda STZ'nin kromozom yapısını değiştirebilme özelliği var iken aynı mekanizma insan lenfositleri için geçerli değildir. Son olarak, STZ'nin bir hücreye zarar vermesi ortamdaki serbest radikal üretimine de bağlıdır (Bolzan ve Bianchi, 2002).

### **2.4.3. Streptozotocin ve Alzheimer Hastalığı Hayvan Modeli**

Serebral ventriküllere injekte edilen STZ beyinde oksidatif strese ve bilişsel kayba neden olup sporadik AH hayvan modellerin oluşturulmasında kullanılır. STZ beyindeki glikoz ve enerji metabolizmasının azalmasında rol oynar. Bu ise beyin hipokampusundeki kolin asetiltransferaz seviyelerini azaltarak öğrenme ve hafıza olaylarına ciddi ket vurmaktadır. Güncel yaklaşımlar lateral ventriküllere injekte edilen STZ'nin sonucunda meydana gelen oksidatif stres parametrelerine odaklanmıştır. Lipit peoksidaz ve glutatyonun (GSH) son ürünü olan malondialdehit'in (MDA) seviyelerine yönelik hesaplamalara gidilmiştir. STZ injekte edilmiş sıçan beyinlerinde kademeli olarak MDA'nın seviyesinde bir artış ve GSH seviyelerinde bir azalış gözlenmiştir. Bu sonuç bize STZ'nin nasıl öğrenme ve hafızaya olumsuz etki yaptığının bir göstergesidir. Çünkü oksidatif stres ile ilişkili MDA seviyelerindeki artış ile GSH seviyelerindeki azalış öğrenme ve hafızadaki olumsuz sürecinin bir kanıtıdır. Bu da bize sıçanlara uygulanacak olan STZ'nin lateral ventriküllere enjeksiyonun ardından meydana gelen süreçte AH modelinin oluşturulabileceğini göstermektedir (Li, 2001). STZ enjeksiyonunun üzerinden geçen 14 gün model oluşumu için yeterli bir süreçtir (Santos ve ark., 2012).

### **2.5. Tacrolimus (FK506)**

Formülü  $C_{44}H_{69}NO_{12}$ , molekül ağırlığı 804,031 gr/mol olan tacrolimus (Prograf, Astellas), *Streptomyces tsukubaensis* tarafından üretilen immünbaskılayıcı bir antibiyotiktir (Drugs.com, 2016).

Nöroimmünofilin ligandlar sinir hasarlarında ve nörolojik hastalıklarda tedavi amacıyla kullanılan bir bileşik sınıfıdır. Nörotrofinlere (sinir büyüme faktörüne)

nazaran bu bileşikler hızlı bir şekilde kan-beyin bariyerini geçebilir ve oral olarak verildiğinde iskemi, travmatik sinir hasarı ve insan nörodejeneratif bozuklukların araştırılmasında kullanılan birçok deney hayvan modelinde etkisini gösteren bir bileşik olma özelliği taşır. İki ligandı (cyclosporin A ve FK506) insan immünbaskılayıcı ilaçlarda kullanılmaktadır. Hem cyclosporin A hem de FK506 nöroprotektif aktiviteler göstermektedir fakat sadece FK506 ve onun türevlerinin nörorejeneratif aktiveleri çok yüksektir. FK506 güçlü bir immünbaskılayıcıdır ve *in vitro* ortamda T hücre proliferasyon blokörü olarak görev alır. Calcineurinin T lenfositlerinde aracılık ettiği sinyal transdüksiyonunu engellemektedir. Bileşik, FK506 bağlayıcı protein 12 (FKBP12) ile etkileşime girmektedir. Bu ise CaN substratı ile etkileşime girmektedir. FK506, FKBP12'nin aktivasyonunu inhibe ederek sarkoplazmik retikulumdan elde edilen  $Ca^{2+}$  salınımını artırmaktadır. FK506 ayrıca  $Na^+/Ca^{2+}$  konsantrasyon değişimini de inhibe etmektedir (Drugs.com, 2016).

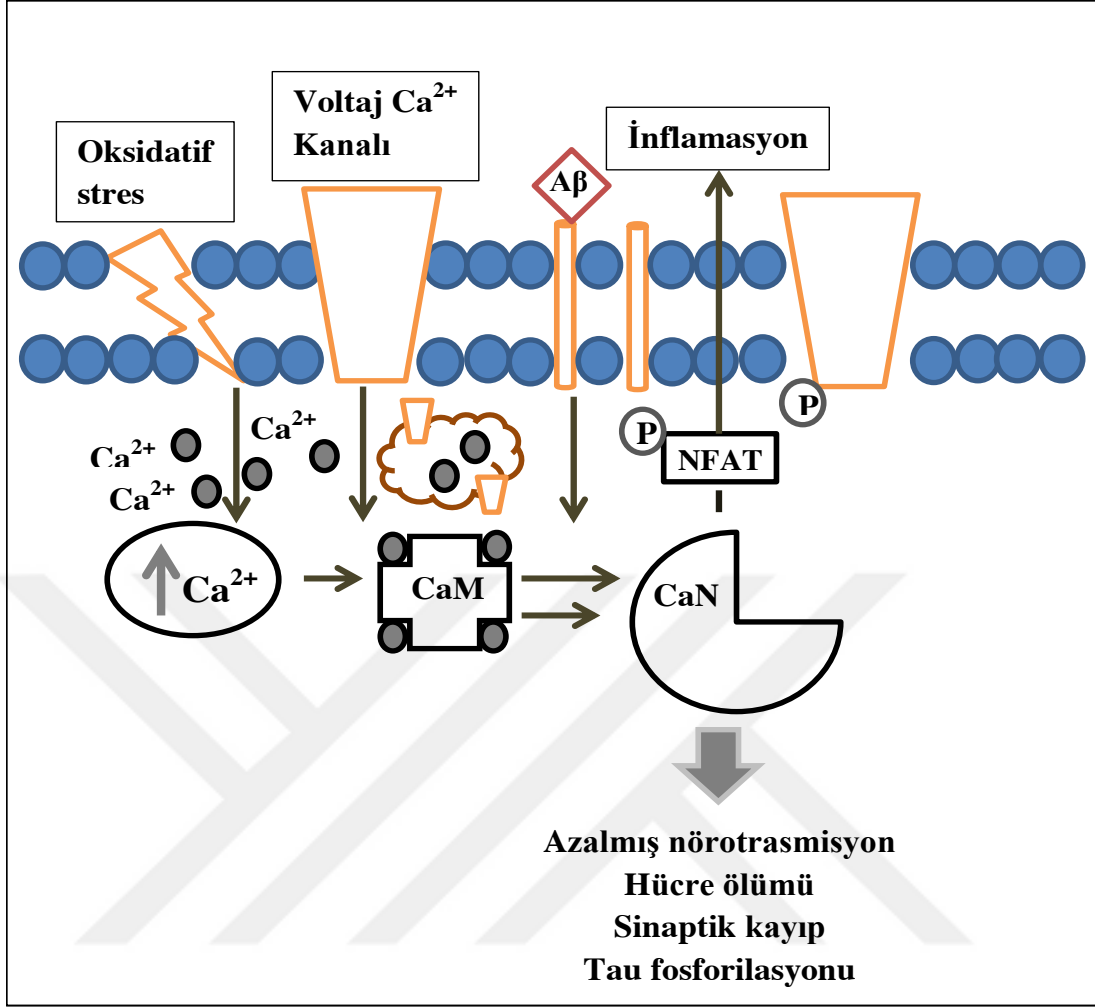
Tacrolimusun calcineurini inhibe etmesi sonucunda IL-2 sekresyonu inhibe olur. Özellikle beyinde yüksek düzeyde bulunan CaN hemen her dokuda bulunur. Beynin total protein miktarının %1'ini kapsadığını gösteren bir takım çalışmalar vardır (Shenolikar, 1994). Calcineurinin katalitik alt ünitesi korteks, striatum ve hipokampüste eksprese olmaktadır. Calcineurin inhibitörlerinin Huntington hastalığında olduğu gibi koruyucu etkileri vardır. Bunlar,  $Ca^{2+}$  bağımlı eksitotoksisite ve calpain aktivasyonudur (Pardo ve ark., 2006). Hücre içi  $Ca^{2+}$  konsantrasyonu apoptozisde çok önemli bir rol oynar. Hücre içi  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunun geçici olarak yükselmesi kasılma, sekresyon, fertilizasyon, proliferasyon, metabolizma, kalp atışı ve hafıza gibi metabolik olaylarda sinyal görevi görür. Ancak,  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunun uzun süreli yükselmesi ( $10 \mu M$ 'ın üzerine çıkması) apoptozisi uyarır ve artık hücre için tehlikeli bir durum arz eder. Calpain merkezi sinir sistemi ile ilgili hastalıklarla ilişkili  $Ca^{2+}$  bağımlı proteolitik bir enzimdir. Calpain ve CaN ikisi birlikte hücre içi  $Ca^{2+}$  seviyesinde rol alır (Wu ve ark., 2007). Hücre içi  $Ca^{2+}$  düzeyinin artışı calpainin aşırı aktivasyonuna neden olur. Hücre iskeleti ve membran proteinlerinin parçalanması hızlanır ve sinir hücrelerin bütünlüğü bozulur. Sonucunda hücre ölümü gerçekleşir ( Ünal ve ark., 2015).

### **2.5.1. Calcineurin**

Protein fosfataz 2B (PP2B) olarak da bilinen calcineurin (CaN), merkezi sinir sisteminde yüksek oranda sentezlenen  $Ca^{2+}$ 'a duyarlı serin/treonin fosfatazdır. CaN'in

sinaptik fonksiyon üzerinde rolü vardır. Özellikle L- tipi  $Ca^{2+}$  kanallarını,  $K^+$  kanallarını ve voltaja-bağımlı  $Na^+$  kanallarını defosforilasyona uğratabilmektedir. CaN'ın bu iyon kanallarına etkisinden ötürü onun nöronların aktivasyonunda da etkili olabileceği söylenebilir. CaN ayrıca bazı nörotransmitter maddelerin örneğin glutamatın pre-sinaptik alandan salınımını da etkilemektedir (Reese ve Tagliatela, 2011).

Yaşlanan beyin CaN'in hiperaktivasyonuna duyarlıdır. Calmodulin (CaM) tarafından aktive olan CaN, fosfataz etkileşim mekanizmasını bozar. Bunun sonucunda gerçekleşen olaylar dizisi tau'nun hiperfosforilasyonuna kadar gider. CaN ayrıca birçok hücrel proteinlerin defosforilasyonuna aracılık eder. Tüm bunlar varsayımsal olarak AH'nın olası dört sonucuna neden olur: sinaptik protein kaybı, nöral inflamasyon, nöronlar arası iletişim azalması ve hiperfosforile tau. Oksidatif stres, voltaj  $Ca^{2+}$  kapıların açılmasında artış ve A $\beta$  oligomerlerin membran proteinlerine bağlanması sonucu internal  $Ca^{2+}$  salınımına neden olur. Hücre içi  $Ca^{2+}$  miktarındaki artışa bağlı olarak  $Ca^{2+}$  CaM bağlanması sonucunda CaN'in aktivasyonu gerçekleşir (Şekil 5) (Reese ve Tagliatela, 2011). Bu da demek oluyor ki hücre içi  $Ca^{2+}$  miktarı artışı ne kadar fazlaysa o kadar CaN aktivasyon sayısında artış meydana gelir.



**Şekil 5.** CaN ve yaşlanan AH beynindeki rolleri. **CaM:** Calmodulin, **CaN:** Calcineurin, **NFAT:** Aktive edilmiş T hücrelerinin nükleer faktörü, **Aβ:** Amiloid beta (Reese ve Tagliatela 2011'den uyarlanmıştır)

### 2.5.2. Tacrolimus ve Emilim

Tacrolimusun plazma proteinine bağlanması yaklaşık %99'dur. Albümin ve alfa-1-asit glikoproteine bağlanmakta ve eritrositlerle yüksek oranda birleşmektedir. Tacrolimusun yayılması tüm kan ile plazma arasındaki birçok faktöre bağlıdır. Bu faktörlerin içinde hematokrit oran, plazma yayımı esnasındaki sıcaklık, ilaç konsantrasyonları ve plazma protein konsantrasyonları yer almaktadır. Oksidaz sistemi, primer olarak sitokrom P-450 sistemi (CYP3A) tarafından metabolize olmaktadır (Robert ve ark., 2007).

### 2.5.3. Tacrolimus ve Toksikite

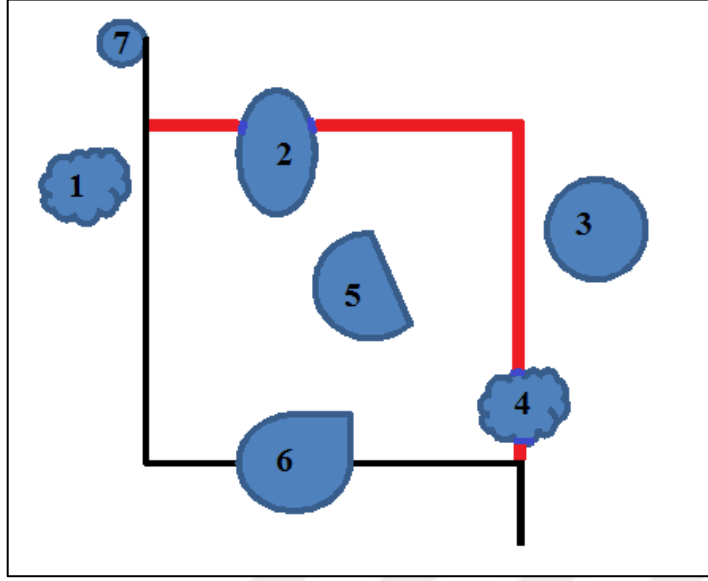
Erkek ve dişi sıçan; erkek ve dişi farelerde yapılan karsinejenik çalışmalar literatürde bulunmaktadır (Becker ve ark., 2006). Çünkü bu ilaç bir immünbaskılayıcı özelliği olan bir ilaçtır ve dikkatli kullanılması gerekmektedir. Uygun dozaj miktarı ile toksitite ve karsinejenik olayların önüne geçilebilir. 80 haftalık fare oral ve 104 haftalık sıçan oral çalışmalarında tacrolimus dozajına bağlı olarak gelişen bir tümöre rastlanmamıştır. En yüksek doz miktarı farelerde 3,0 mg/kg/gün; sıçanlarda 5,0 mg/kg/gün'dür (Drugs.com, 2016). Biz çalışmamızda sıçanlara 10 gün boyunca günde 0,5 mg/kg dozajında tacrolimus ilacını oral yoldan verdik. Yüksek dozda alındığında tacrolimus nörotoksik etki yapabilir. En yaygın olan nörotoksik etkiler posterior geri dönüşümlü ensefalopati sendromu (PRES), deliryum (bilinç bozukluğu) ve komadır. Şiddeti düşük oranda görülen etkiler ise titreme, parestezi (uyuşma, karıncalanma veya yanma hissi) ve baş ağrısıdır (Drugs.com, 2016).

### 2.6. Stereoloji

Stereoloji üç boyutlu yapıların, iki boyutta olan görüntüleri üzerinden yapılan sayı, hacim, uzunluk gibi sayısal veriler hakkında bilgi almamızı sağlayan bir bilim dalıdır. Stereoloji, tarafsız sayım ve ölçüm prensiplerine dayanır (Korkmaz ve ark., 2002). Tanecik sayımı yapmak için tanecik izdüşümlerinden yararlanılır. Bu tanecik izdüşümlerinin belli bir alanda sınırlandırılması gerekmektedir. İşte burada devreye 'tarafsız sayım çerçevesi' girer (Şekil 6). Tarafsız sayım çerçevesinin sayım kuralları maddeler halinde belirtilmiştir (Gunderson, 1977).

- İzdüşümleri sayım çerçevesinin içinde kalan tanecikler sayılır.
- Çerçevenin yasak kenarlarına temas eden tanecikler sayılmaz.
- Yasak kenarlara ait olan uzantılara temas eden tanecikler sayılmaz.

Aşağıda bir tarafsız sayım çerçevesi örneği görülmektedir (Şekil 6). Tarafsız sayım kurallarına göre sayıma dâhil edilmeyen tanecikler 1, 3, 6 ve 7; sayıma dâhil edilen tanecikler ise 2, 4 ve 5'dir. Siyah kenar yasak kenar-sayılmayan kenar, kırmızı kenar ise serbest kenar-sayılan kenarı göstermektedir.



Şekil 6. Tarafsız sayım çerçevesi (Gundersen, 1977'den uyarlanmıştır)

### 2.6.1. Fiziksel Disektör Yöntemi

Birbirinin ardışığı iki kesit arasında yapılan tanecik sayımıdır. Ardışık iki kesitin aynı kalınlıkta ve lam üzerindeki pozisyonların birbirine paralel olması sayım açısından sağlıklı sonuçlar verecektir. Burada kural, sayım çerçevesinin sayılabilir alanlarında olan ve paralel kesitlerden ilkinde olup ikincisinde olmayan taneciklerin sayıma dâhil edilmesidir (Akalan ve Demirkan, 2013).

### 2.7. Limbik Sistem

Limbik kelime olarak “kenar” veya “sınır” anlamına gelir. İlk başlarda limbik sistemin sadece korteks serebri ve hipotalamus arasında kalan bölge ile sınırlandırıldığı sanılıyordu fakat ilerleyen yıllarda bu bölgenin sınırlarının daha da geniş bir alana dağıldığı görüldü. Duygu, davranış ve içgüdülerin düzenlenmesinde rol alan yapıları da içerdiği anlaşıldı (Snell, 2016).

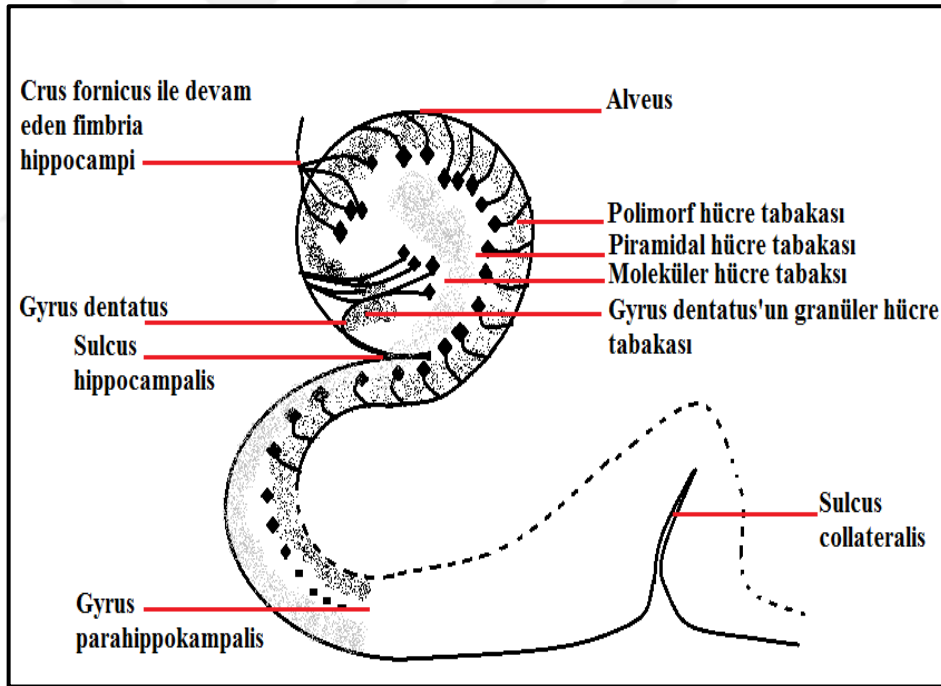
Anatomik olarak limbik sistemin içinde yer alan yapılar şunlardır: subkolloza alanı, gyrus cinguli, gyrus parahipokampalis, formatio hipokampi, korpus amigdaloidum, korpus mamillare ve nuklei anterior talami (Snell, 2016). Limbik sistemde iki önemli subkortikal merkez (formatio hipokampi ve korpus amigdaloidum) bulunmaktadır. Formatio hipokampi bölgesindeki bağlantılar mekân hafızası (spatial memory) ve yakın hafızanın uzak hafızaya dönüşmesi ile ilgilidir ve bu nedenle öğrenmede önemli bir yer tutar (Cumhur, 2001). Özellikle öğrenme ile ilgili bir bölge



olmasından ötürü biz de çalışmamızda hipokampus bölgesini araştırmayı tercih ettik. Korpus amigdaloidum'un bağlantıları ise duygusal davranışlar ile ilgilidir (Cumhur, 2001).

### 2.7.1. Formatio Hipokampi

Formatio hipokampi; hipokampus, gyrus dentatus ve gyrus parahippokampalis'ten oluşur. Hipokampus, lateral ventrikülün alt boynuzu boyunca uzanan kıvrılmış bir gri cevher kabartısıdır. Ön ucu pes hipokampi'yi oluşturur. Altında alveus denilen ince bir beyaz cevher tabakası uzanır. Alveus, hipokampus'ten başlayan sinir liflerinden oluşur. Bu lifler medialde birleşir ve fimbria hipokampi denilen demeti oluşturur. Hipokampus arkada korpus kallozumun splenium kısmının altında son bulur. Gyrus dentatus, gyrus parahippokampalis ve fimbria hipokampi arasında uzanan bir gri cevher parçasıdır (Şekil 7) ( Snell, 2016).



Şekil 7. Hipokampus ve ilgili bölümlerin koronal kesiti (Snell, 2016'dan uyarlanmıştır)

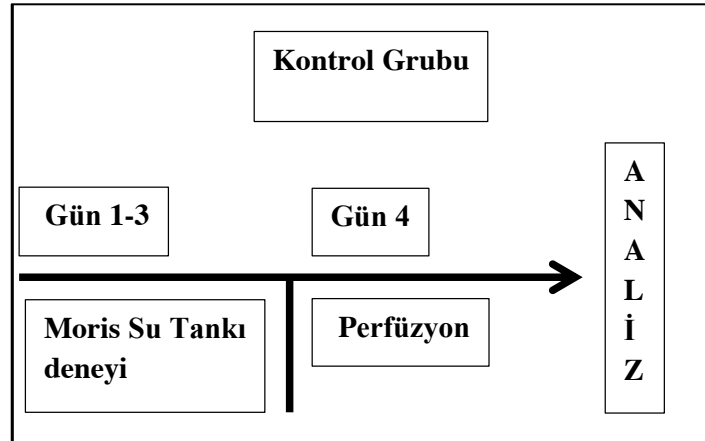
### 3. MATERYAL ve METOD

Çalışmanın başından sonuna kadar deney hayvanlarına “Ondokuz Mayıs Üniversitesi Deneysel Hayvanları Yerel Etik Kurulu” karar ve yönergesine uygun kurallar doğrultusunda muamelede bulunuldu. Çalışmamızda 8-10 haftalık *Wistar albino* türü yetişkin 15 erkek sıçan (250-300 gr) denek olarak kullanıldı. Denekler ortak kafesten rastgele seçildi, hepsi bir kafeste iki sıçan olacak şekilde ayrı ayrı kafeslere alındı ve aynı ortamda yaşatıldı. Her kafesin etiketi ayrı ayrı hazırlandı ve ilgili kafeslere yapıştırıldı. Toplamda üç grubumuz yani kontrol, Alzheimer ve Alzheimer+Tacrolimus grupları ve her grupta beşer denek yer aldı. Araştırma merkezi  $22\pm 2$  °C derece, 12 saatlik aydınlık-karanlık siklus ortama sahipti ve deneklerin yemi sıçan pellet yemi olup içme suları normal musluk suyu olarak verildi.

#### 3.1. Çalışma Grupları

Çalışmamızda toplamda üç grup yer almaktadır. Bu gruplar aşağıda tanımlanmıştır;

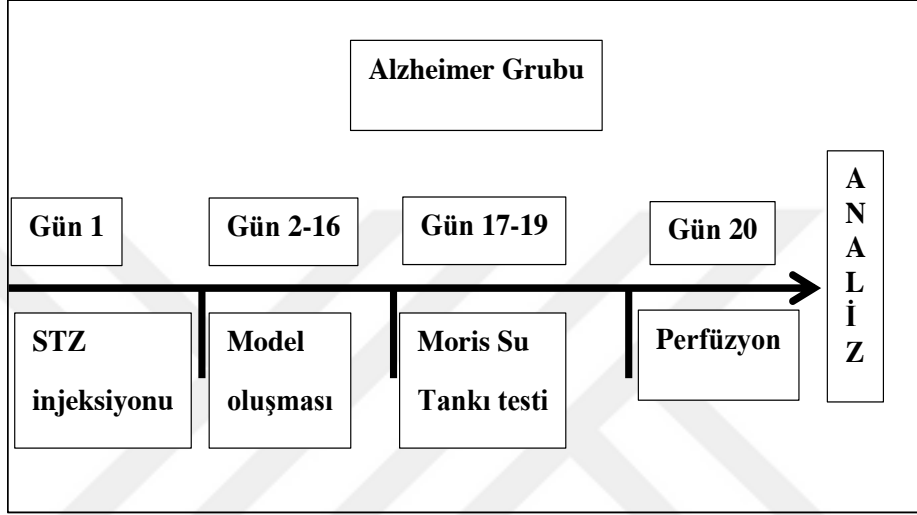
**Kontrol grubu (K Grubu):** Deneklere sadece davranış testi olan Morris su tankı testi yapıldı ve ardından sakrifiye edilerek beyinleri alındı. Beyinlerinden histomorfometrik analizler yapıldı (Şekil 8).



Şekil 8. Kontrol (K) grubu çalışma basamakları

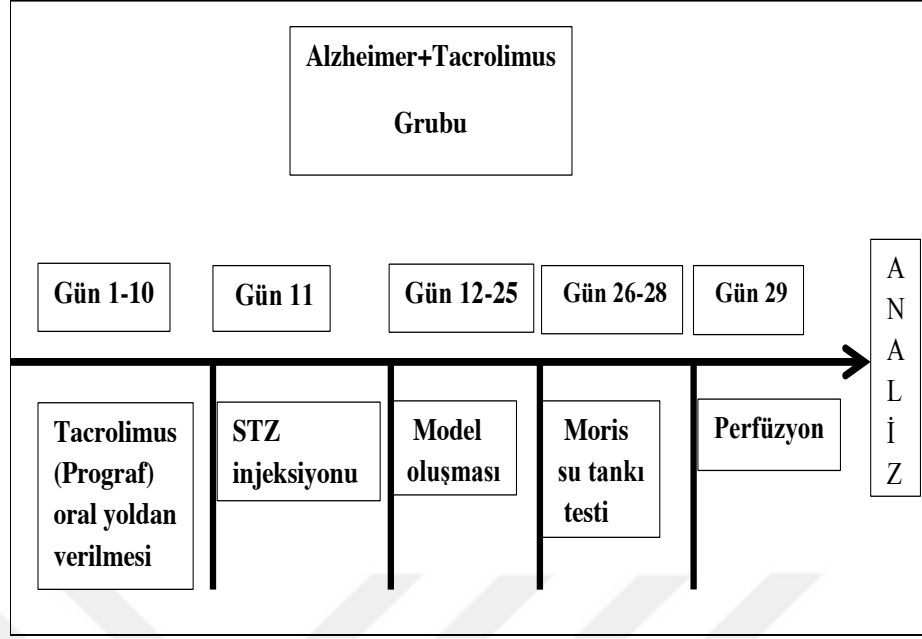
**Alzheimer grubu (A Grubu):** STZ uygun doz miktarı (3 mg/kg) için tartıldıktan sonra pH'ı 4,4 olan sitrat tamponda çözüldü. Bir hayvana uygulanacak olan 5 µl hacmindeki sıvı Hamilton mikro şırıngaya çekildi (Arora ve ark., 2013). Her bir denegin sağ lateral ventrikülünün içine açılan delikten girilerek yavaş yavaş (1 µl/dk)

injekte edildi. İşlemler bitince kafa derileri cerrahi dikiş ipleri ile dikildi ve ardından denekler kendilerine ait içi sıcak su torbası bulunan kafeslerine alındı ve sessiz ortamda ayılmaya bırakıldı. Modelin oluşması için 14 gün beklendi (Arabpoor ve ark., 2012). 14 günün ardından deneklere davranış testi olan Morris su tankı testi yapıldı ve ardından sakrifiye edilerek beyinleri alındı. Beyinlerinden histomorfometrik analizler yapıldı (Şekil 9).



Şekil 9. Alzheimer (A) grubu çalışma basamakları

**Alzheimer + Tacrolimus grubu (T Grubu):** Tacrolimus etken maddeli ilaç olan Prograf (0,5 mg/kg) distile suda çözüldükten sonra gavaj yardımıyla oral yoldan 10 gün boyunca deneklere verildi. İlaç günlerinin ardından deneklerin sağ lateral ventriküllerine intraserebral yoldan STZ (3 mg/kg) aynı Alzheimer grubuna yapılan işlemler gibi injekte edildi ve ilerleyen 14 gün boyunca modelin oluşması için beklendi. Deneklere davranış testi olan Morris su tankı testi yapıldı ve ardından sakrifiye edilerek beyinleri alındı. Beyinlerinden histomorfometrik analizler yapıldı (Şekil 10).



Şekil 10. Alzheimer+Tacrolimus (T) grubu çalışma basamakları

### 3.2. Streptozotocinin İnjesiyonu

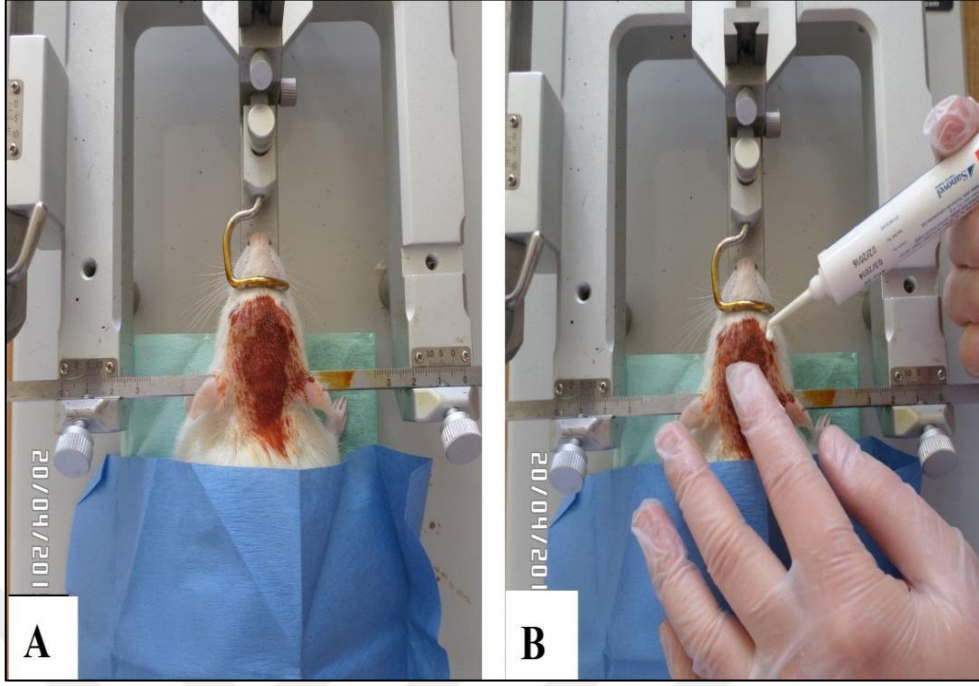
STZ (SIGMA S0130-50MG) pH'ı 4,0; 0,05 M sitrat tamponda çözüldü ve kullanılmadığı zamanlarda -20 °C derece ışık almayan ortamda saklandı. Denekler ksilazin (10 mg/kg) ve ketasol (50 mg/kg) karışımı ile anestezi altına alındıktan sonra sırasıyla deneklere aşağıdaki işlemler yapıldı:

- Cerrahi operasyondan önce ve sonrasında bütün ekipmanlar %70 etanol ile sterilize edildi.
- Deneğin baş kısmının üstü, kulaklarının arkası ve gözlerinin üstüne kadar olan kılları tıraş edildi.
- Denek sterotaksi cihazına konumlandırıldı (Şekil 11).



**Şekil 11.** Sterotaksi cihazına konumlandırılmış denek

- Deneği sterotaksi cihazına sabitlemek için cihazdaki demir çubuklar deneğin kulaklarının içine sokuldu ve ‘tık’ sesi duyulması kadar ilerletildi.
- Deneğin ağzı açılarak sterotaksi cihazında bulunan demir tablaya ısıtıldı. Nihayetinde hem kulaktan hem de ağızdan denek sterotaksi cihazına sabitlenmiş oldu.
- Deneğin kafasına tentirdiyot sürüldü ve steril hale getirildi (Şekil 12A).
- Deneğin gözlerine göz pomadı sürüldü. Amaç gözlerinin kurumasını önlemektir (Şekil 12B).



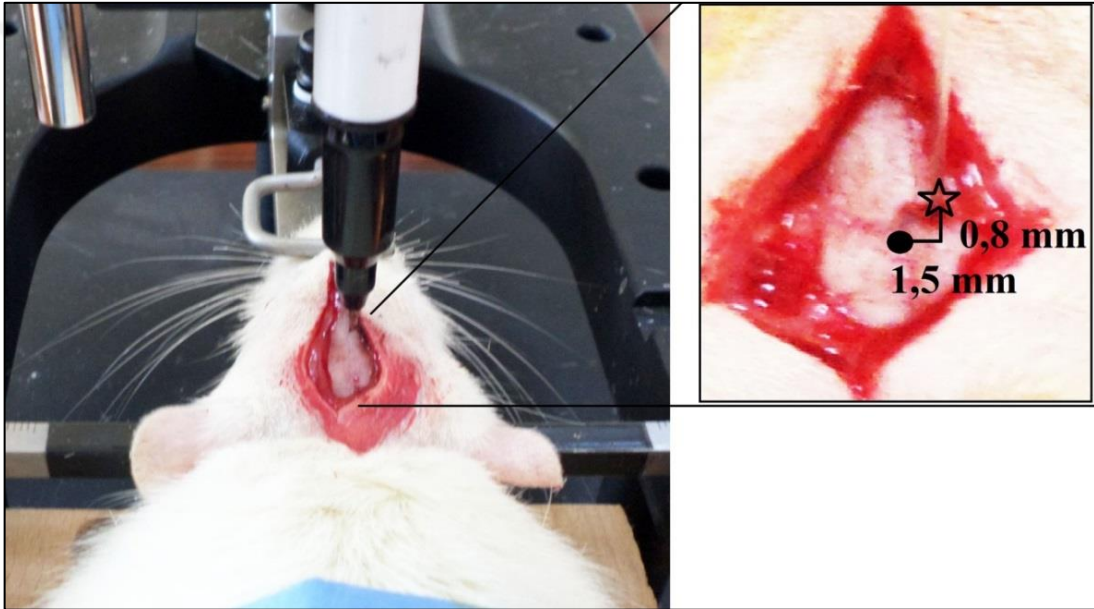
**Şekil 12. A:** Sterotaksi cihazına konumlanmış denek, **B:** Operasyona hazır hale getirilmiş denek

- Keskin bir bistüri ile saçlı deride enseden başlayarak gözlerinin üstüne kadar sagittal bir kesik açıldı (Şekil 13).



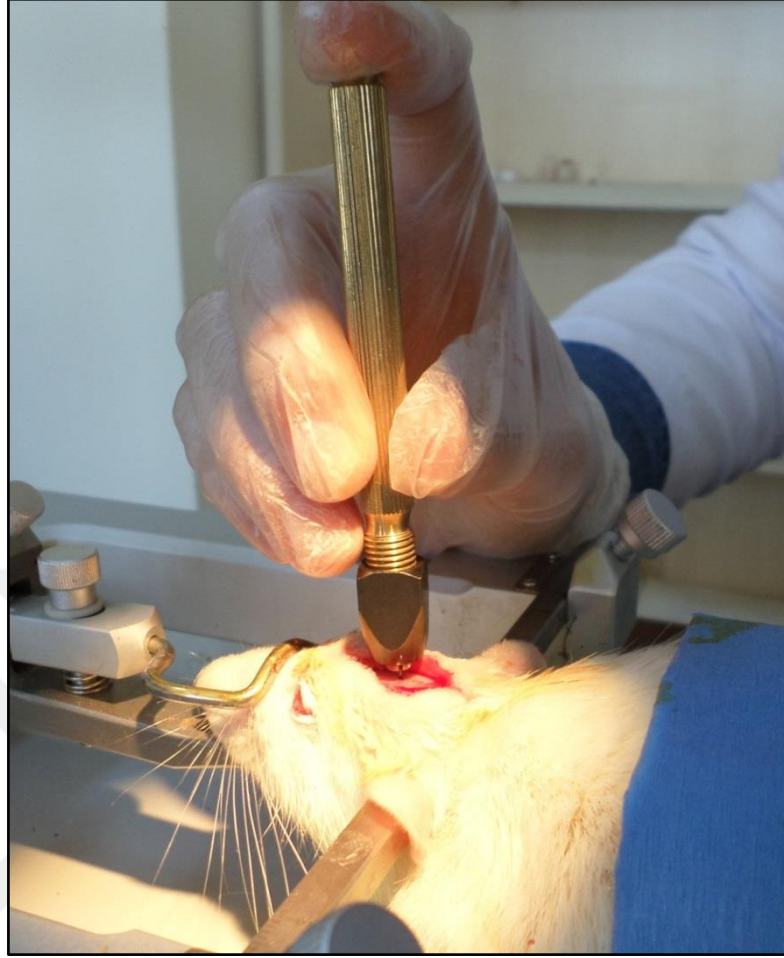
**Şekil 13.** Saçlı deride sagittal bir kesik

- Bregmanın pürüzsüzce ortaya çıkması için fasya bistüri ile kazıldı.
- Kafatasının fazla kanlanması durumunda serum fizyolojik sıkılarak gazlı bez ile silindi.
- Stereotaksi cihazındaki koordinatlar belirlendi. Bunun için stereotaksi cihazında bulunan kola mürekkep uçlu bir kalem takıldı ve bregma işaretlendi. Bregma “0” olarak kabul edildi (Şekil 14).
- Delik koordinasyonları bregmanın 0,8 mm posterioru, 1,5 mm lateral sagittal süturu ve beyin yüzeyinin 3,6 mm altı olacak şekilde literatür bilgisine dayandırılarak belirlendi (Arora ve ark., 2013).



**Şekil 14.** Koordinatları belirlenmiş olan sağ lateral ventrikülün mürekkep kalem ile işaretlenmesi. Küçük resimde: **Siyah nokta;** Bregma. **Yıldız;** Sağ lateral ventrikül için giriş yeri

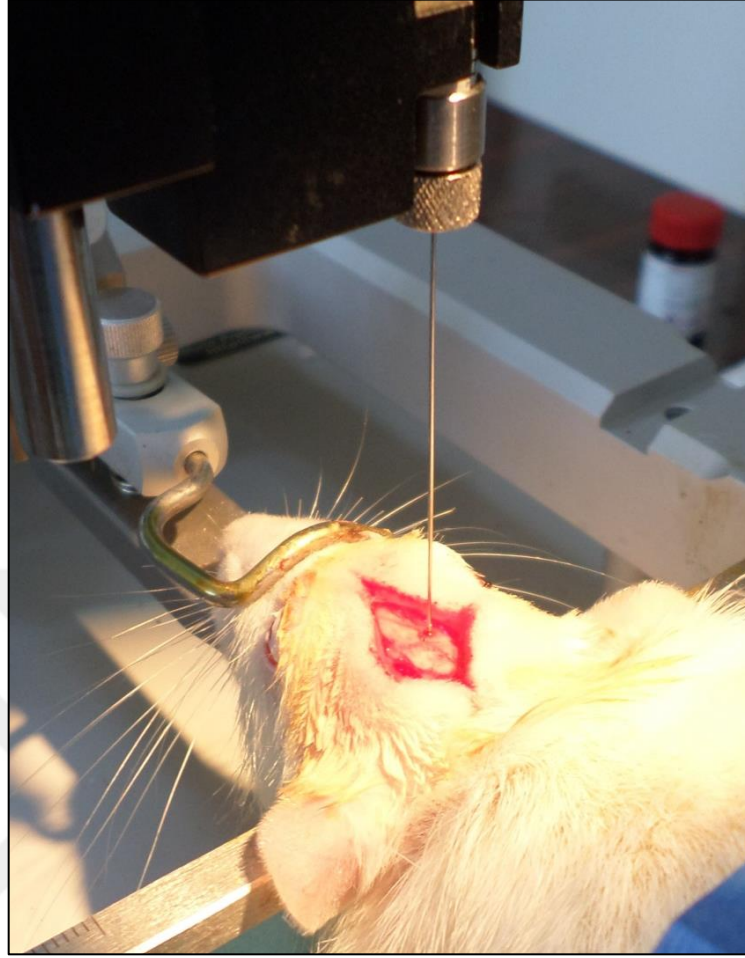
- İşaretlemenin ardından delici dişçi turu ile işaretli nokta basınç uygulanılarak delindi (Şekil 15).



**Şekil 15.** İşaretlenmiş olan sağ lateral ventriküle injeksiyonun yapılabilmesi için delik açıldı

- Sterotaksi cihazındaki mürekkep kalemi yerinden çıkartılıp yerine Hamilton mikro injektörü yerleştirildi.
- Hamilton mikro injektörünün içine 5 µl sitrat tamponda çözülmüş STZ (3 mg/kg) çekildi.
- Laterel ventriküle girebilmek için sterotaksin z-koordinatı 3,6 mm içeriye girecek şekilde ayarlandı.
- STZ (3 mg/kg) sağ lateral ventriküle Hamilton mikro şırınga ile yavaş yavaş (1µl/dk) injekte edildi (Şekil 16).
- İnjesiyonun ardından Hamilton injektörü hemen dışarı çekilmeden 2 dakika boyunca içeride bırakıldı.
- Hamilton injektörü dışarı çıkartılarak delik 1 dakika boyunca üzerine pamuk tutularak bastırıldı.





**Şekil 16.** Hamilton mikro şırınga ile STZ injeksiyonu

- Kafa derisi cerrahi dikiş ipi ile dikildi ve ardından bir antibakteriyel sprey ile steril edildi.
- Denek, içinde sıcak su torbası bulunan sessiz bir ortamda dinlenmeye alındı.
- Operasyondan sonra deneklerin içme sularına antibiyotik eklendi ve üç gün boyunca almaları sağlandı.

### **3.3. Morris Su Tankı (MWM) Testi**

Morris su tankı (Morris Water Maze, MWM) testi uzaysal hafıza ve öğrenmenin ölçülmesi adına kemirgenler ile denenmeye uygun bir davranış testidir (Vorhees ve Williams, 2006). Testin modeli bir havuz ve ortasında bir platformdan oluşmaktadır. Amaç, deneklerin havuza bırakıldıktan sonra havuzun ortasında bulunan platforma çıkmalarıdır. Denekler birkaç uygulamanın ardından platforma daha kısa zamanda çıkmaktadırlar. Bu paradigma Richard G. Morris tarafından 1984 yılında

oluşturulmuş olup davranış sinirbiliminde altın bir standart olarak kabul görmektedir (Nunez, 2008).

MWM testinin iki aşaması vardır. İlk aşama, “pre-test” (pre-training) denilen alıştırma günleridir. Pre-test bir veya iki gün yapılabilmektedir. Biz çalışmamızda iki gün yapmayı tercih ettik (Gün 1 ve gün 2 ).İlk aşamadan sonra ise asıl test gününün olduğu MWM test günü gelir (Gün 3). Havuzun öncelikle yuvarlak olmasına dikkat edilir. Yarıçapı 180 cm ve derinliği 90 cm olmalıdır. Video kamera ile çekim yapılacak ise videonun kadrajına tüm düzeneğin girmiş olmasına dikkat edilmelidir. Havuz musluk suyu ile doldurulur ve suyun sıcaklığının sabit 26 °C derecede olmasına özen gösterilir. Platform havuzun ortasına yerleştirilmeli ve sabitlenmelidir. Platform su seviyesinden 2,5 cm yukarda kalmalıdır. Böylelikle deneklere platform bir kaçış yeri olarak gösterilecek ve öğretilecektir. Denekler sudan kaçmak için bu platforma çıkacaklardır (pre-training aşaması). Antrenmanlardan sonra denekler testin bir sonraki aşamasına geçer. İkinci aşamada havuza platformun su seviyesinin hemen altında kalacak şekilde musluk suyu doldurulur. Bu aşamada havuzun içine toksik olmayan beyaz pudra dökülür ve havuz suyunun beyaz olması sağlanır. Böylelikle platform gözden saklanmış olur. Denekler ikinci aşamada da suya bırakılır. Deneklerin bu son testte yüzerek direkt platformun olduğu yere yönelmeleri ve eskiden orada olan fakat o anda görülmeyen platformun önce çevresinde yüzüp sonra platforma çıkmaları beklenir (Nunez, 2008).

### **3.3.1. Pre-Test Aşaması**

- Test için platform havuzun merkezine konumlandırıldı. Havuz sıcaklığı 26 °C derece olan musluk suyu ile doldurulurdu. Deneklerin platformun varlığından haberdar olmaları amacıyla platform su seviyesinden 2,5 cm yukarda kaldı.
- Testin dört farklı başlama pozisyonu vardır. Bu pozisyonlar: kuzey, güney, batı ve doğu pozisyonlarıdır. Denek bir pozisyondan havuza önce kuyruğu suyu girecek şekilde nazikçe bırakılırdı. Deneğin strese girmemesi için ani hareketlerden ve sestten kaçınıldı.
- Deneğin havuzu en fazla 60 sn boyunca yüzerek keşfetmesine izin verildi. Denekler önceleri havuzun kenarlarında yüzdüler. Fakat daha sonra platformu bulmayı öğrendiler ve platforma çıktılar.

- Deneklerin suda 60 sn'den fazla kalmaları halinde boğulma veya aşırı strese mahal vermemek adına deneklere platforma çıkmaları için bir kereye mahsus yardım edildi.
- Deneklerden platforma çıkmaları halinde platformun üzerinde 10-15 sn boyunca kalmaları beklenildi. Eğer denek platformdan düşerse veya inmek isterse nazikçe tekrar platformun üzerine bırakıldı. Bu antrenman denegin platformun sudan kaçmak için güvenli bir bölge olduğu bilgisini öğretmek ve kazandırmak amacıyla yapılmaktadır (kısa süreli hafıza).
- Denek platforma çıkınca kronometre durdurulurdu ve süre kaydedildi. Sürenin başlangıcı denegin suya girmesi bitişi ise platforma çıkışıdır. Bitiş ile başlangıç arasındaki süre bize o denegin bu aşamadaki performansını gösterdi.
- Anlatılan işlemlerin hepsi tüm deneklere uygulandı ve kayıt altına alındı.

### 3.3.2. Morris Su Tankı (MWM) Testi Aşaması

- Havuzun içi su ile doldurulurdu. Suyu toksik olmayan beyaz toz atıldı ve su karıştırılırdı.
- Suyun sıcaklığı (26° C derece) ve ortamın fiziksel şartları pre-test günlerinde olduğu gibi aynı koşullara sahipti.
- Bu aşamada havuzun su seviyesi platform ile eşit düzeydeydi. Suyun içine beyaz tozun da katılmasıyla denekler platformu dışardan göremediler.
- Pre-test günlerindeki işlemlerin hepsi bütün deneklere uygulandı ve platforma çıkma süreleri kronometre ile kayıt altına alındı.

MWM testi sıçanlardaki çalışma belleğini, referans bellek araştırmalarını ve görev stratejisini ölçmek için ideal bir testtir. Hipocampus uzaysal / ilişkisel hafıza ile ilişkilidir. MWM testi spesifik olarak uzaysal hafızayı ölçmek için vardır. Bu testte uzaysal hafızanın ölçülmesinin dışında birde stresi yönetme görevi ile görev kurallarının öğrenilmesinin ölçülmesi yer almaktadır (Nunez, 2008).

### 3.4. Perfüzyon Fiksasyonu

Fiksasyon (tespit), dokunun *in vivo* ortamındaki haline en yakın halde kalmasına olanak sağlayan ve çürümesini engelleyen işlemler sürecidir (Tel, 1991). Bu amaçla yaygın olarak kullanılan madde %10'luk formaldehittir. Malzemeler; serum fizyolojik, %10'luk formaldehit, kanul ve hayvan perfüzyon levhasıdır.

**Serum fizyolojik (SF):** Binde beşlik NaCl (sodyumklorür, sofr tuzu) çözeltilisinden ibarettir ve vücut sıvıları ile aynı ozmolariteye sahiptir. Piyasadan hazır alınabildiği gibi laboratuvar ortamında da hazırlanabilir.

**Formaldehit:** Hem perfüzyon fiksasyonu işlemi esnasında hem de sonrasında çıkarılan organların kesit alma işlemine kadar geçen sürede saklanmasında kullanılır. Formaldehit iyi bir tespit sıvısıdır ve sıkça tercih edilmektedir. Formolün %37'lik ve %40'lık çözelti halleri piyasada bulunmaktadır. Biz çalışmamızda bu stoklardan %10'luk sulu çözelti hazırladık ve perfüzyon esnasında bu şekliyle kullandık.

**Kanül:** Serum fizyolojik ve %10'luk formaldehit sıvılarının kalbin içerisine akıtılabilmesi amacıyla kullanılır.

**Hayvan perfüzyon levhası:** Deneklerin anestezi altına alınmasından sonra perfüzyon levhasına alınması amacıyla kullanılır. Deneğin perfüzyon fiksasyon işlemleri süresi boyunca yapılacak olan müdahaleler esnasında sabit bir pozisyonda kalması amacıyla tercih edilir.

### **3.4.1. Perfüzyon Fiksasyon Basamakları**

Perfüzyon işlemleri Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi bünyesinde bulunan personeller tarafından yapıldı. Deneklere ketamin (50 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) birlikte aynı enjektör içinde intramuskular yoldan tek doz olarak verildi. Ketamin- ksilazin karışımının derin anestezi etkisini göstermesi yaklaşık 4 dk sürdü. Denekler perfüzyon levhasına alındı ve ön ile arka bacakları ayaklarından masaya flaster yardımıyla sabitlendi. Keskin bir makas yardımıyla toraks duvarı *processus xiphoides*'dan başlanıp kostaların her iki yanından parasternal çizgiden kesildi ve kranial yönde deri kaldırıldı. Ardından perikardiumu kesildi. Öncesinde 5000 ünite heparin 1 ml %0,9'luk serum fizyolojik içinde çözüldü ve sol ventriküle enjektör yardımıyla girilerek verildi. Kanın vücuttan tamamen uzaklaştırılması amacıyla kanül yardımıyla sol ventriküle %0,9'luk serum fizyolojik solüsyonu verildi ve tüm vücuda pompalanması için beklendi. Yaklaşık 10 dk sonra yine aynı yoldan %10'luk formaldehit sol ventriküle verildi ve tüm vücuda pompalanması için beklendi. Bu esnada deneğin vücudunun formaldehiti almasıyla birlikte titremesi gözlemlendi. Bu olay formaldehitin tüm vücuda pompalandığının göstergesidir. Önce akciğerlerin ardından karaciğerin beyaz renk alması, kuyruğun dikleşmesi ve kafanın sertleşmesi işlemin kusursuzca yapıldığının göstergesidir. Tüm

bu işlemlerden sonra deneğin beyini alındı ve %10 formaldehit dolu kapların içine atıldı. Kapların üzerine deneğin ait olduğu grup ismi, sakrifiye edildiği tarih ve %10 formaldehit yazan bilgilerin yer aldığı etiketler yapıştırıldı. Haftada birkaç kez taze %10 formaldehit yenilenmesi yapıldı. Uygun sertliğe erişen beyinler daha sonra histolojik işlemlere başlanması için kullanıldı.

### **3.5. Histolojik İşlemler**

Histolojik işlemlerin ilki doku takip işlemidir. Dokulardan formaldehitin tamamen uzaklaştırılması için dokular akan musluğun altında 24 saat boyunca yıkandı. Yıkamanın ardından 1 saat boyunca %70 etil alkol dolu kaptaki bekletildi. Ardından 12 saat boyunca içinde %80 etil alkol bulunan kaptaki bekletildi. Sırasıyla %96 ve %100 etil alkollerde ikişer saat bekletildi. Alkol serilerinin tamamlanmasının ardından sıra ksilenlere geldi. Birinci ksilende bir saat, ikinci ksilende bir saat ve üçüncü ksilende bir saat olmak üzere toplamda üç saat ksilen dolu kaplarda bekletildi. Son aşama olan içi sıcak parafin dolu kaplar serisine geçildi. Birinci parafinde bir saat, ikinci parafinde bir saat ve üçüncü parafinde bir saat olmak üzere toplamda üç saat, 56 °C derecedeki etüv içerisinde parafin dolu kaplarda bekletildi. Sıra gömme işlemine gelindi. Metal gömme levhaların içine önce 56 °C derece sıcaklığındaki sıvı parafin döküldü ve ardından her bir levha ikilisinin içine bir organ gelecek şekilde pens yardımıyla gömme işlemi yapıldı. Her bloğa ait etiketin üzerine deneğin grubu ve kaçınıcı hayvan olduğu bilgisi yazıldı. Gömme işleminden yaklaşık bir saat sonra tamamen donan parafin bloklar levhaların içinden çıkartıldı ve mikrotom (Leica RT 2255, Nussloch; Germany) ile kesit işlemine başlanabildi.

Mikrotom, alınan doku örneklerinin son derece ince bir şekilde kesilerek boyama işlerinin ardından mikroskop altında incelenmesine imkân tanıyan bir kesme aracıdır. Parafin bloklar mikrotomun blok tutucu başlığına sıkıştırıldı ve ardından yukarı-aşağı hareketi ile bloğun mikrotom bıçağına sürütmesiyle ince kesitler alındı. Alınan kesitler fırça yardımıyla benmari havuzu denilen ve içi 43,5 °C derece distile su ile dolu olan havuza bırakıldı. Amaç kesitin sıcak suyun içinde pürüzsüzce açılmasını sağlamaktır. Üzerinde deney hayvanının grubu, kesit kalınlığı, örneklem sayısı ve kesit numarası bilgileri yazan temiz lam üzerine kesitler benmari havuzundan alındı. Ardından yatay bir şekilde tahta lam sepetlerine dizildi. Lam sepetleri dolduktan sonra

sepetler içi 56 °C derece sıcaklığındaki etüve yerleştirildi. Dört saat boyunca etüv içerisinde kaldıktan sonra boyama işlemine başlandı (Tel, 1991).

**Tablo 2.** Cresyl Violet boyama basamakları (Bancroft ve Stevens, 1982).

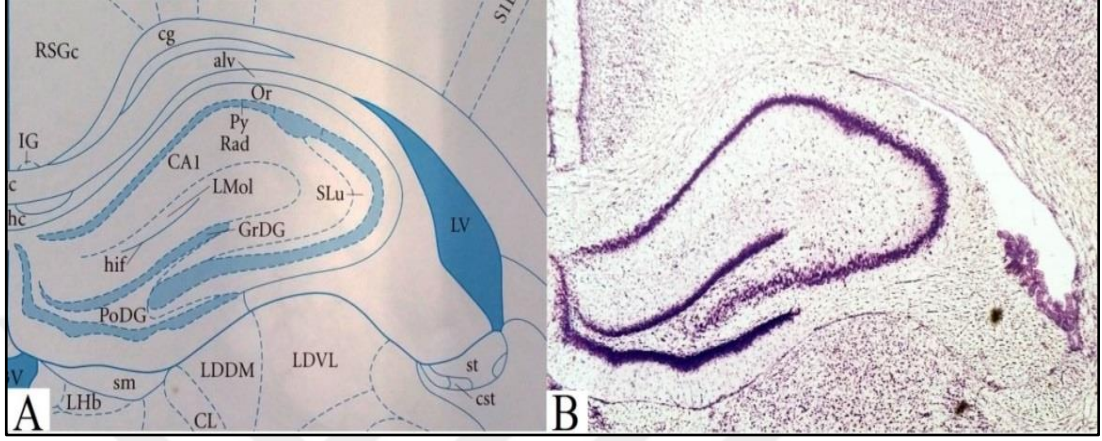
<b>Kullanılan Kimyasal</b>	<b>Süre</b>
Ksilen	30 dk.
Ksilen	30 dk.
Ksilen	30 dk.
Ksilen	30 dk.
%100 Etil alkol	10 dk.
%100 Etil alkol	10 dk.
%96 Etil alkol	10 dk.
%80 Etil alkol	10 dk.
%70 Etil alkol	10 dk.
Distile Su	10 dk.
Cresyl Violet Boya	4 dk.
%70 Etil alkol	2 dk.
%80 Etil alkol	2 dk.
%96 Etil alkol	1 dk.
Ayrıştırıcı	Daldır çıkart
%96 Etil alkol	2 dk.
%100 Etil alkol	1 dk.
Ksilen	30 dk.
Ksilen	30 dk.

Paraformaldehit ya da formaldehit ile fikse beyin preparatlarındaki nöronların sitoplazmasındaki Nissl içeriğinin boyanması için Cresyl Violet boya kullanıldı (Tablo 2). Nörofil mavi-mor boyanmaktadır. Bu boya beyin ve omurilikteki yapıları göstermek amacıyla sıkça kullanılır. Bazal anilin boyası RNA içeriğini maviye boyamaktadır. Nissl yapıları RNA'ya nazaran koyu mavi boyanır ve sitoplazmada benekli koyu mavi yapılar şeklinde gözükür (Bancroft ve Stevens, 1982).

Boyama işlemine başlamadan önce Cresyl Violet boyası hazırlandı (100ml distile su içine hazır halde kullanıma hazır 0,1 gr Cresyl Violet tozu katılır) ve 56 °C derecedeki etüve koyuldu. Böylelikle stereolojik analizlerin yapılması kesitler hazırlanmış oldu.

### 3.6. Stereoloji Çalışmaları

Sayım işlemine başlamadan önce beyinde bulunan hipocampusun önce alanını tespit etmemiz gerekti. Hipocampusun CA1, CA2, CA3 ve DG bölgelerinin tespiti için atlastan faydalanıldı (Şekil 17) (Paxinos ve Watson, 2006).



Şekil 17. Atlasından alınan bir görüntü **A:** İlgili bölgelerin koordinatları **B:** Mikroskoptaki görüntüsü (Paxinos ve Watson, 2006)

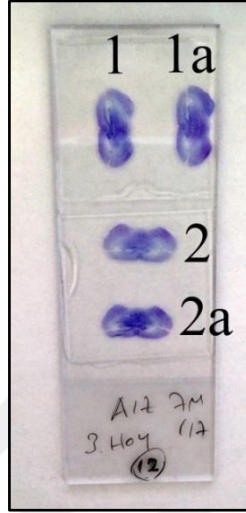
#### 3.6.1. Örnekleme Stratejisinin Belirlenmesi

Sayım işlemlerine başlamadan önce stereolojide önemli yer tutan örnekleme stratejisini belirlememiz gerekir. Stereolojide sonuçların tarafsız ve doğru olması için örnekleme stratejisi önemli yer tutar. Belirlenen örnekleme stratejisi ile sonuca daha etkin ve kısa yoldan ulaşmak mümkündür. Çalışmamızda kullanılan deney hayvan sayısı, kesit sayısı, kesit alan görüntülenmesi ve örneklemenin nasıl olacağı literatürdeki bilgiler ışığında gerçekleştirildi (Gundersen ve Østerby, 1981; Gundersen ve Jenson, 1987; Gundersen ve ark., 1999).

Çalışmamızda her grup için beş adet deney hayvanının kullanılması ile yaklaşık 0,05'lik bir hata katsayısı elde etmede yeterli olacağı literatür araştırılarak belirlendi (Cruz-Orive ve Weibel, 1990). Yine literatürde her bir hayvan dokusundan 10 kesit almanın ve kesit kalınlığının çalışmamızda yer alan hücre çeşitlerine uygun olacak şekilde 7 µm olmasının yeterli olacağı da belirlendi (Gundersen ve Jenson, 1987; Pakkenberg ve Gundersen, 1988; Gundersen ve ark., 1999).

Fiziksel disektör yöntemi ile hücre sayımı gerçekleştirildiği için her bir gruba ait bloklardan hipokampus bölgesinden itibaren olmak üzere kesitler alındı. Örneğin ilk kesit 1.kesit ardışık gelen kesit ise 7.kesit olarak adlandırıldı. Böylelikle kesit

örneklememiz 1/7 oldu. Fiziksel disektör kesit çiftleri oluşturmak için ise her lamın üzerine örneğin n. kesiti ve ardından (n+1). kesiti aldık (n kesit sayısını ifade etmektedir) (Şekil 18).

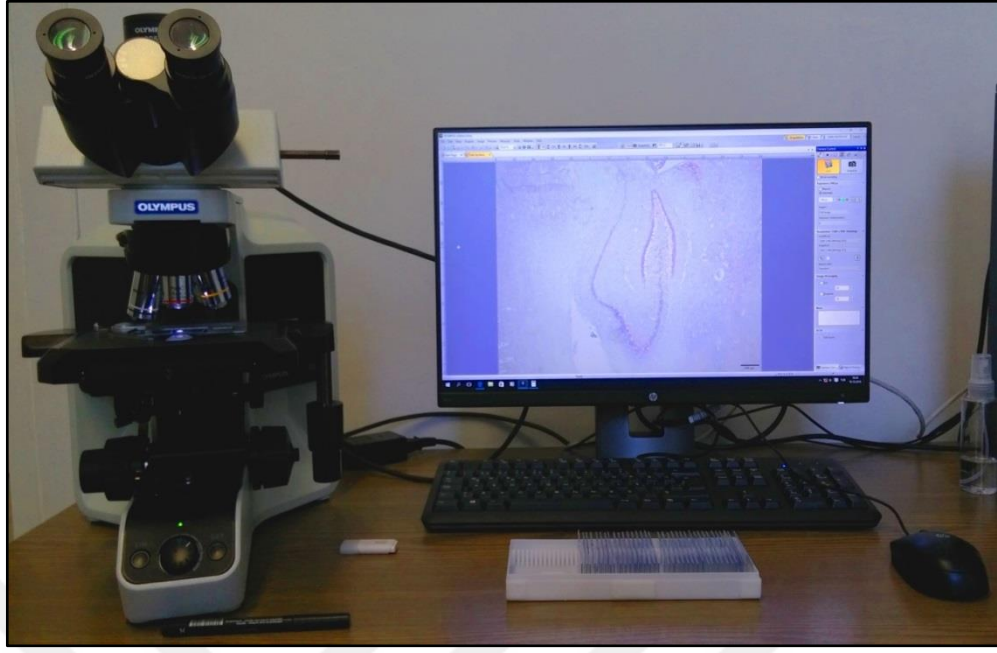


**Şekil 18.** Fiziksel disektör kesit çiftleri

Kesit seviyesinde örnekleme stratejisi belirlendikten sonra alan örnekleme ve sayım çerçevesinin büyüklüğünün tespiti literatüre uygun bir şekilde yapıldı (Pakkenberg ve Gunderson, 1988; Gunderson ve ark., 1999). Literatürdeki bilgilere göre sayım çerçevesinin içine girecek partikül sayısının yaklaşık üç-dört adet olması gerekir.

Kesit alanların örnekleme, görüntülenmesi ve hipokampusun CA1, CA2, CA3 ve DG bölgelerinde yer alan nöron sayımları için Olympus BX43F (Tokyo, Japonya) marka mikroskop kullanıldı (Şekil 19).

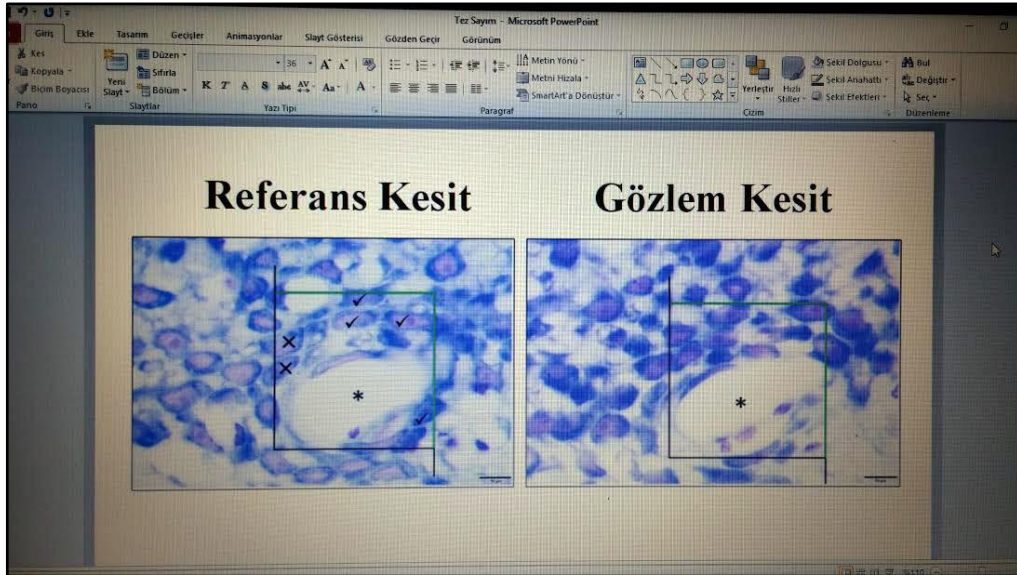




Şekil 19. Mikroskop ve bilgisayar düzeneği

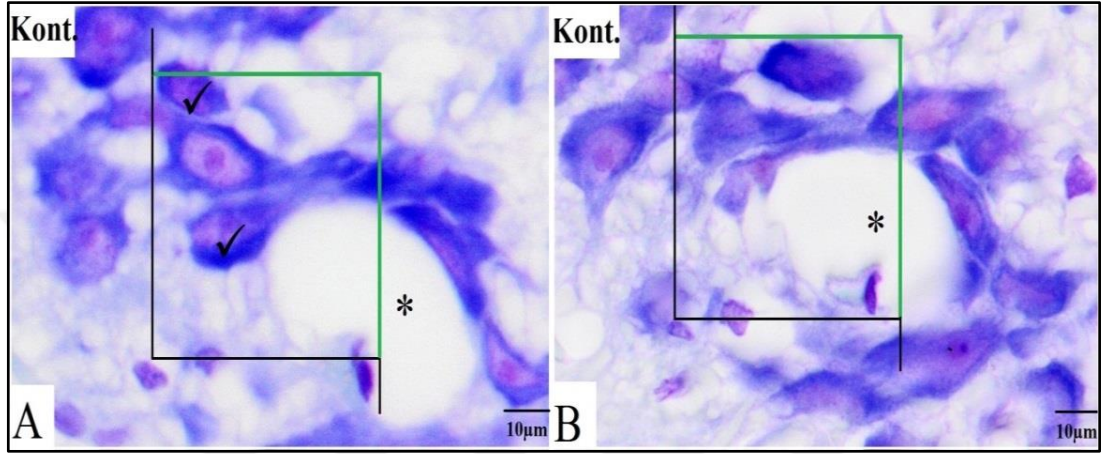
### 3.6.2. Fiziksel Disektör ve Nöron Sayımı

Stereolojik prosedüre uygun olarak hazırlanan fiziksel disektör çift görüntüleri bilgisayar ortamına alındı ve Microsoft PowerPoint 2010 programı kullanılarak sayım yapıldı (Şekil 20).



Şekil 20. Microsoft PowerPoint programı

PowerPoint'ta her fiziksel disektör çift resimleri (mikroskopta 100'lük büyütmede çekilen) yan yana alınarak ekran üzerine tarafsız sayım çerçevesi asetat kâğıdı kapatıldı ve hücre sayımı kurallara uygun olarak gerçekleştirildi (Gundersen, 1977). Bu kurala göre gözlem kesitinde yer alan fakat referans kesitinde yer almayan nöron izdüşümleri sayıma dâhil edildi. Sayım çerçevesinin sayıma dâhil edilen ve edilmeyen olmak üzere iki çeşit kenarı bulunmaktadır (Şekil 21).



**Şekil 21.** Sayım işlemi için hazırlanan iki resim. **A:** Referans kesit görüntüsü, **B:** Gözlem kesit görüntüsü  
**Siyah yıldız:** Damar, **Bar:** 10 µm. Boya: Cresyl Violet

Fiziksel disektör yöntemiyle hücre sayımında aslında önce obje yoğunluğunu hesaplıyoruz. Bu değeri hücre sayısına çevirmek için bir de aynı kesite ait olan referans hacminin hesaplara dâhil edilmesi gerekir. İlgili kesitten elde edilen sayımlar obje yoğunluğudur ( $N_v$ ). Bilgisayar ile yapılan alan hesaplarının kesit kalınlığı ile çarpılması sonucunda referans hacmine ulaştık. Objeye yoğunluğu ile referans hacminin ( $V_{ref}$ ) çarpılması sonucunda da toplam hücre sayısı ( $N$ ) elde edilir. Formül aşağıda verildiği gibidir;

$$N = N_v \times V_{ref}$$

### 3.7. İmmünohistokimyasal Çalışmalar

Astrositler, merkezi sinir sistemde yer alan nöronların hayatta kalmaları için pek çok kritik görev üstlenmiştir. Örneğin enerji metabolizmasında görev almaları, kan-beyin bariyerinin korunması, hücre dışı glutamat seviyesinin düzenlenmesi ve nöronları reaktif oksijen türevlerinden koruması bunlardan birkaçını oluşturmaktadır. Astrositler fiziksel veya kimyasal nöronal hasarlarda aşırı glial fibrillar asidik protein (GFAP)

sentezleyerek bir reaksiyona yol açarlar. GFAP, astrositlere özel bir ara iskelet filaman proteinidir. Ki67, hücre bölünme evrelerindeki bütün aktif fazlarda (G1, S ve G2) kullanılabilir güvenilir bir markerdir fakat dinlenme evresinde (G0) görev yapmaz. İnterfaz evresinde Ki67 antijeni özellikle çekirdekte saptanır çünkü mitoz esnasında protein içeriğinin çoğu kromozomal yüzeyde yer almaktadır (Ghoneim ve ark., 2015). Smith ve Lippa (1995) yaptıkları bir çalışmada Ki67'nin AH nörofibril dejenerasyon patojenisinde, diğer nörodejenerasyon hastalıklarında, normal yaşlanmada, nöral neoplazmada ve gangliogliomada kullanılabilirliğini rapor etmiştir.

### 3.7.1. İmmünohistokimyasal Boyama Protokolü

Örneklerin analizi HRP/AEC (ABC) Detection IHC Kit, Abcam (2016) ile aşağıda belirtilen adımlar izlenerek immünohistokimyasal olarak boyandı:

- İncelenen doku örnekleri olan kesitler alkol serilerinden geçirilerek deparafinize edilir.
- Kesitlerin üzerini kaplayacak kadar %3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 97 ml metanol) (Merck millipore, Darmstadt, Germany) damlatılır ve 10 dakika boyunca inkübe edilir.
- Bu işlemi takiben tampon çözeltide (Sitat Buffer, Merck millipore, Darmstadt, Germany) iki kez yıkanır.
- Primer antikor eklenir ( anti-Ki67, 1:100 dilüe, Abcam, UK).
- Tampon çözeltide dört kez yıkanır. Biotinylated Goat Anti-Rabbit (Invitrogen, California, USA) eklenir ve 10 dakika boyunca inkübe olması için oda sıcaklığında beklenir. Tampon çözeltide dört kez yıkanır.
- Streptavidin Peroxidase (Invitrogen, California, USA) ile 10 dakika inkübe olması için oda sıcaklığında beklenir.
- Dört kez tampon çözeltide yıkanır. Tepkimeye giren alanların gözlemlenmesi için AEC Kromojen (Invitrogen, California, USA) eklenir ve renk değişimi beklenir ve dört kez tampon çözeltide yıkanır.
- Sitoplazmik alanların boyanması için Lilly's Modifiye Mayer Hematoksilen (Merck millipore, Darmstadt, Germany) ile kesitler boyanır.
- Aquatex (Merck millipore, Darmstadt, Germany) ile yüzey kaplanır.
- Işık mikroskopik incelemelerde kahverengi boyanan hücreler Ki67 pozitif hücreler olarak kabul edildi.

### 3.8. İstatistiksel Analiz ve Hata Katsayısının Bulunması

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi amacıyla SPSS 21.0 yazılımı kullanıldı. Öncesinde normallik testi yapıldı ve verilerin normal dağılımında olduğu tespit edildikten sonra tek yönlü varyans analizi olan ANOVA yapıldı. Klinik çalışmalarda sıkça kullanılan ANOVA, ikiden fazla grubun birbiri ile karşılaştırılmasında kullanılır (Kim, 2014).

Stereolojik yöntemlerle hesaplanan CA1, CA2, CA3 ve DG bölgelerinde yer alan nöron sayılarının istatistiği için ANOVA kullanıldı ve  $p < 0,05$  istatistiksel açıdan anlamlı olarak değerlendirildi. Gunderson ve Jensen (1987) tarafından hazırlanan ve gözden geçirilen verilere ait hata katsayısı (CE) kullanıldı.  $\sum Q$ -'ye ait hata katsayısı, toplam varyansın karekökünün,  $\sum Q$ -'ye bölünmesi sonucunda elde edilir. Formül aşağıdaki şekli gibidir (Gunderson ve ark., 1999);

$$CE(Q- \text{top}) = \sqrt{\text{Toplam varyans} / \sum Q}$$

## 4. BULGULAR

### 4.1. Morris Su Tankı Testi Bulguları

#### 4.1.1. Pre-test1 Bulguları

K grubuna ait beş erkek sıçan önce kuyrukları girecek şekilde suya bırakıldı. Sıçanlar önce havuzu kenarlardan başlamak üzere keşfetti. Havuzun ortasında yer alan platformu hemen hemen aynı sürelerde keşfettiler. Hepsi platforma başarılı bir şekilde çıktı. Platformda 10 sn boyunca kalmaları sağlandı. Platformdan alındıktan sonra havlu ile kurutuldu ve kafeslerine geri koyuldular.

A grubuna ait beş erkek sıçan önce kuyrukları girecek şekilde suya bırakıldı. Bu grupta yer alan sıçanlar havuzun kenarlarından başlamak üzere havuzu baştan sona yüzdüler. Platformu bulma süreleri kontrol grubuna göre daha geç sürede gerçekleşti. K grubu ile A grubu arasında pre-test1 sonuçları bakımından ileri derecede anlamlı bir fark ( $p=0,000$ ; One-way ANOVA) çıktı.

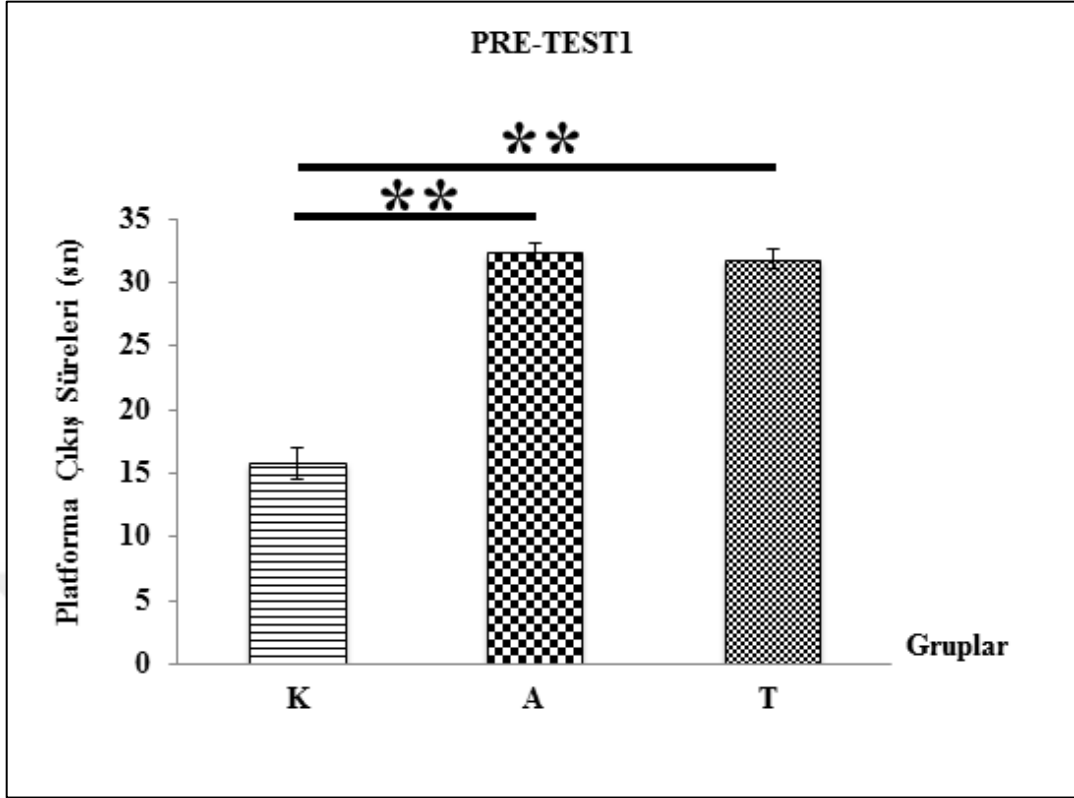
T grubuna ait beş erkek sıçan önce kuyrukları girecek şekilde suya bırakıldı. Bu grupta yer alan sıçanlar A grubunda yer alan sıçanlara benzer şekilde davranışlar gösterdi. K grubu ile T grubu arasında pre-test1 sonuçları bakımından ileri derecede anlamlı bir fark ( $p=0,000$ ; One-way ANOVA) çıktı. A grubu ve T grubu arasında anlamlı bir fark çıkmadı ( $p=0,913$ ; One-way ANOVA).

Her bir gruba ait test sonuçlarının ortalaması ve standart sapma değerleri (Tablo 3) verildi.

**Tablo 3.** Gruplara ait pre-test1, pre-test2 ve MWM testi ortalama  $\pm$ SD değerleri

	<b>K Grubu</b>	<b>A Grubu</b>	<b>T Grubu</b>
PreTest1	15,8 $\pm$ 3,114	32,4 $\pm$ 1,673	31,8 $\pm$ 1,923
PreTest2	12,8 $\pm$ 2,588	32,6 $\pm$ 1,140	32,4 $\pm$ 1,140
MWM	11,6 $\pm$ 1,341	29,6 $\pm$ 2,07	32,6 $\pm$ 1,816

Gruplara ait pre-test1 sonuçlarının ortalaması grafik halinde (Şekil 22) verildi.



Şekil 22. Gruplara ait pre-test1 sonuçları. Değerler ortalama  $\pm$  standart hata olarak ifade edildi.

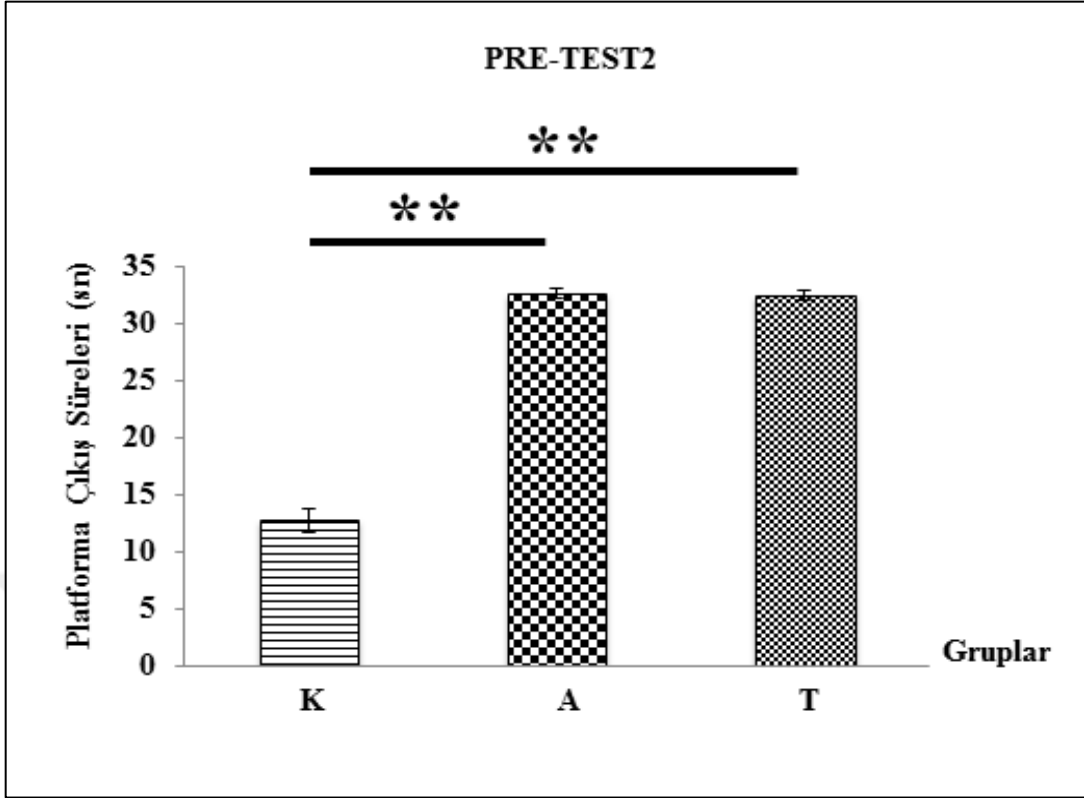
\*\*: Gruplar arasında hesaplanan  $p < 0,01$  düzeyindeki anlamlılık seviyelerini gösterir

#### 4.1.2. Pre-test2 Bulguları

K grubuna ait erkek sıçanlar yine en kısa sürede platforma çıkmayı başardı. A ve T gruplarına ait sıçanlar platforma yönelmede kontrol grubuna göre daha başarısız oldular. K grubu ile A grubu arasında pre-test2 sonuçları bakımından ileri derecede anlamlı bir fark ( $p=0,000$ ; One-way ANOVA) çıktı. K grubu ile T grubu arasında da ileri derecede anlamlı bir fark ( $p=0,000$ ; One-way ANOVA) çıktı. A grubu ve T grubu arasında anlamlı bir fark çıkmadı ( $p=0,982$ ; One-way ANOVA).

Her bir gruba ait test sonuçlarının ortalaması ve standart sapma değerleri (Tablo 3) verildi.

Gruplara ait pre-test2 sonuçlarının ortalaması grafik halinde (Şekil 23) verildi.



Şekil 23. Gruplara ait pre-test2 sonuçları. Değerler ortalama  $\pm$  standart hata olarak ifade edildi.

\*\*: Gruplar arasında hesaplanan  $p < 0,01$  düzeyindeki anlamlılık seviyelerini gösterir

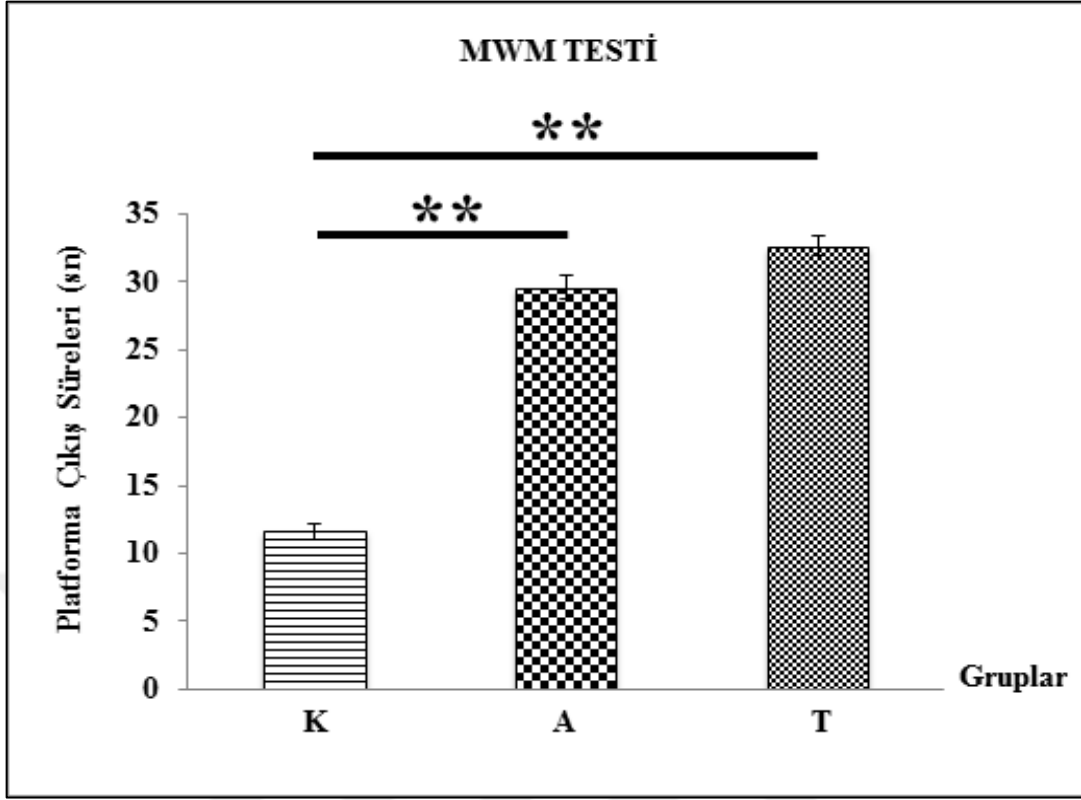
#### 4.1.3. MWM Test Bulguları

MWM test gününde havuzun içine pudra döküldü ve su seviyesi platform ile eşit duruma getirildi. Suyun sıcaklığı her zamanki gibi 26 °C derece olacak şekilde ayarlandı. K grubuna ait sıçanların bazıları pre-test1 ve pre-test2'de olduğu gibi önce havuzun kenarlarında yüzmeye başladı ve dışarıya çıkış yolu aradılar. Fakat daha sonra kenarlardan başlayarak merkeze doğru yöneldiler. A ve T grubuna ait sıçanlardaki performans ilk iki testtekine benzerdi.

K grubu ile A grubu arasında MWM test sonuçları bakımından ileri derecede anlamlı bir fark çıktı ( $p=0,000$ ; One-way ANOVA). K grubu ile T grubu arasında ileri derecede anlamlı bir fark çıktı ( $p=0,000$ ; One-way ANOVA). A grubu ve T grubu arasında anlamlı bir fark çıkmadı ( $p=0,049$ ; One-way ANOVA).

Her bir gruba ait test sonuçların ortalaması ve standart sapma değerleri (Tablo 3) verildi.

Gruplara ait MWM test sonuçların ortalaması grafik halinde (Şekil 24) verildi.

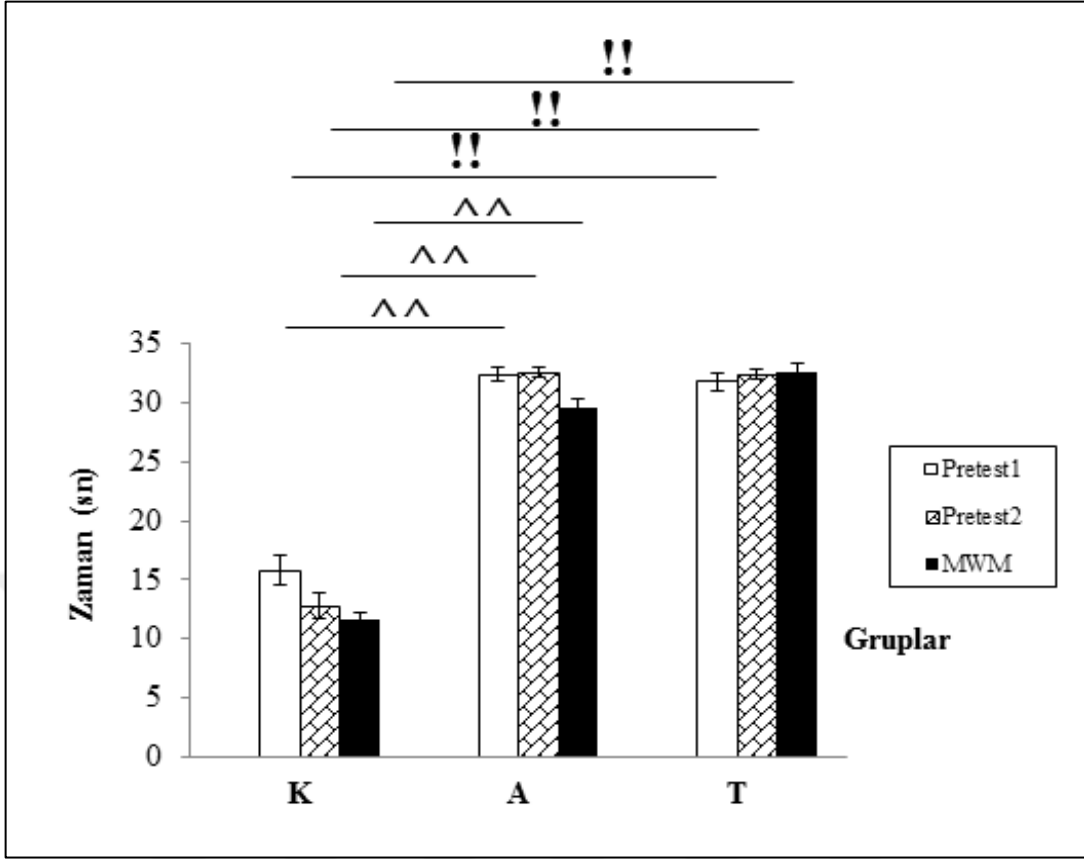


Şekil 24. Gruplara ait MWM test sonuçları. Değerler ortalama  $\pm$  standart hata olarak ifade edildi.

\*\*: Gruplar arasında hesaplanan  $p < 0,01$  düzeyindeki anlamlılık seviyelerini gösterir

Morris su tankı testinin sonuçlarına göre bütün test günleri için yani pre-test1, pre-test2 ve MWM testi günlerinde K grubunun diğer gruplar ile kıyaslandığında performans düzeyleri daha yüksekti. K grubundaki denekler daha hızlı öğrendi ve platform gizli iken platformu daha kısa sürede hatırladı. Ayrıca yer-yön bulma kabiliyetleri diğer gruplardaki deneklere göre daha başarılı bulundu. Tüm grupların pre-test1, pre-test2 ve MWM testi günlerindeki platforma çıkış sürelerinin ortalaması verildi (Şekil 25).





**Şekil 25.** Morris su tankı testi pre-test1, pre-test2 ve MWM test günleri için sonuçları. K grubu ile A grubu; K grubu ile T grubu arasında pre-test1, pre-test2 ve MWM testi günleri için anlamlı bir fark çıkmıştır. (^) ve (!);  $p < 0,01$  anlamlı farkı temsil etmektedir

#### 4.2. Sterolojik Bulgular

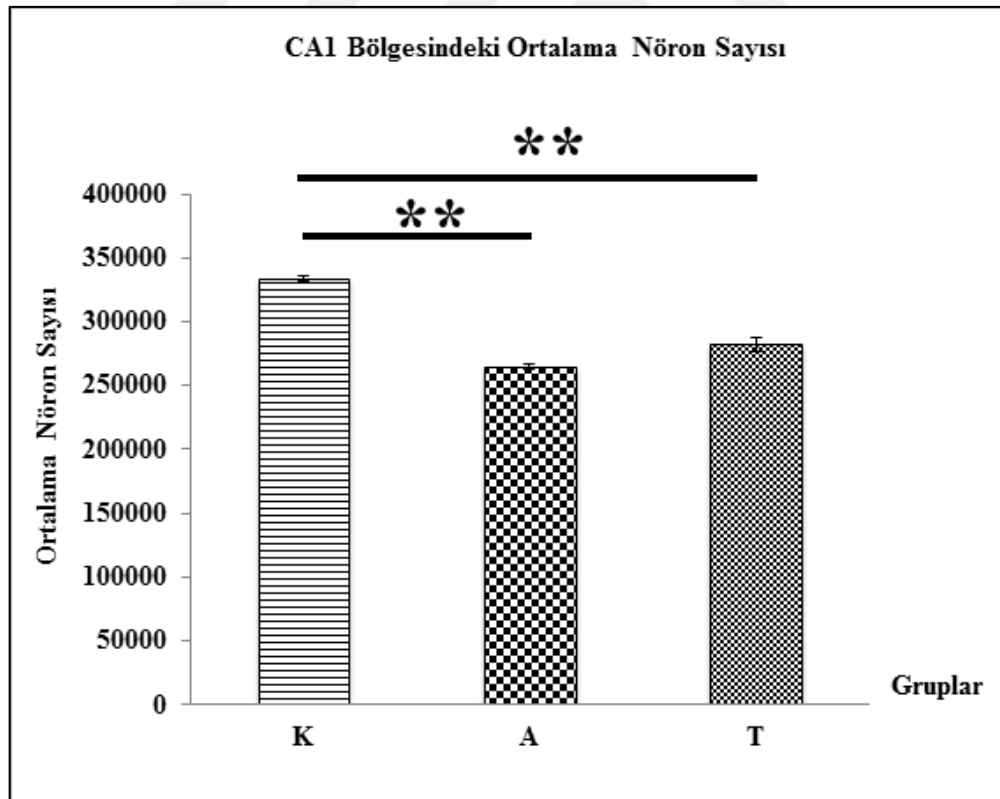
Çalışmamızda deneklerden elde edilen beyin kesitleri üzerinde yapılan fiziksel disektör metodu ile CA1, CA2, CA3 ve DG bölgelerinden ortalama nöron sayıları hesaplandı. Elde edilen bulgular alt başlıklar halinde sunuldu.

#### 4.2.1. CA1 Bölgesinden Elde Edilen Bulgular

CA1 bölgesindeki ortalama nöron sayısı sonuçları (Tablo 4) ve (Şekil 26) verilmiştir.

**Tablo 4.** CA1 bölgesindeki nöron sayı değerleri, ortalamaları ve SEM değerleri görülmektedir

	K	A	T
1	334285	271392	284761
2	340502	259532	290683
3	334908	265461	284499
4	328148	259912	290681
5	328148	266051	259976
Ortalama	333198,2	264469,6	282120
SEM	2082,87383	1965,2474	5097,474604



**Şekil 26.** CA1 bölgesinde hesaplanan ortalama nöron sayı değerleri ( $\pm$ SEM) görülmektedir.

\*\*: Gruplar arasında hesaplanan  $p < 0,01$  düzeyindeki anlamlılık seviyelerini gösterir

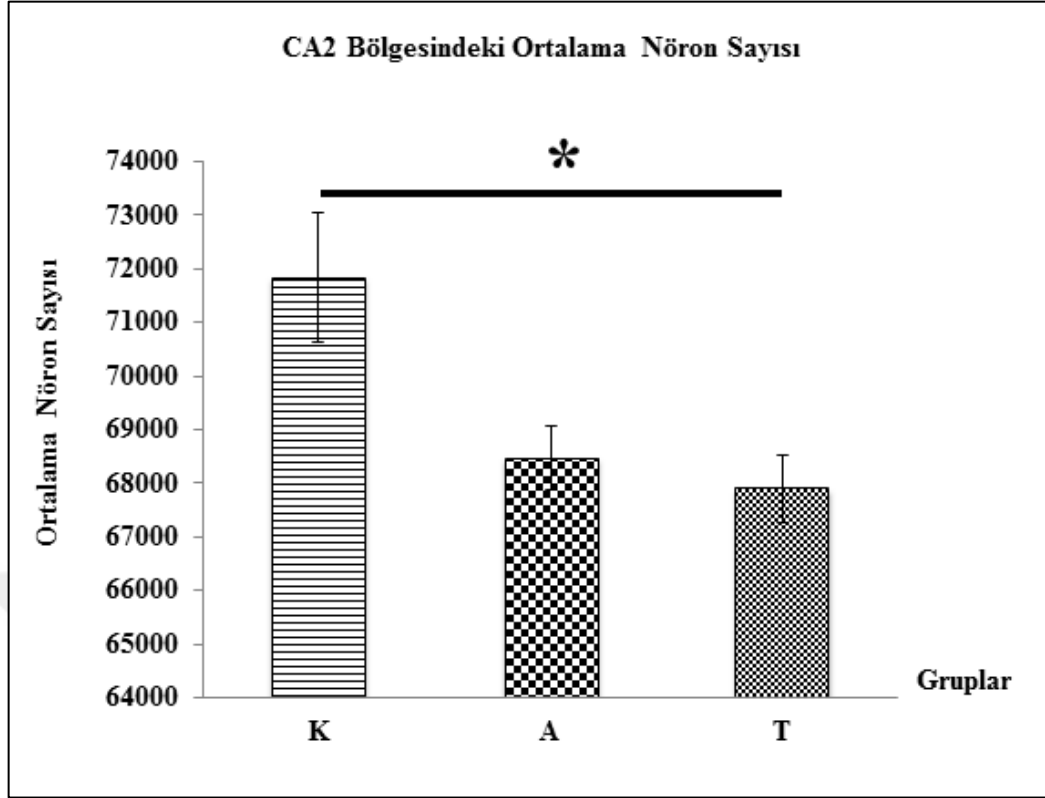
Stereolojik bulgulardan elde edilen nöron sayısı hesaplamalar sonucunda K grubu ile A ve T grupları arasında ileri derecede anlamlı bir fark ( $p=0,000$ ; One-way ANOVA) bulundu. A grubu ile T grubu arasında ise yine anlamlı bir fark ( $p=0,016$ ; One-way ANOVA) bulundu.

#### 4.2.2. CA2 Bölgesinden Elde Edilen Bulgular

CA2 bölgesindeki ortalama nöron sayısı sonuçları (Tablo 5) ve (Şekil 27) verilmiştir.

**Tablo 5.** CA2 bölgesindeki nöron sayı değerleri, ortalamaları ve SEM değerleri görülmektedir

	K	A	T
1	73244	67852	67849
2	74371	70515	66688
3	67996	66640	67850
4	74425	67913	70457
5	69169	69387	66576
Ortalama	71841	68461,4	67884
SEM	1216,05878	602,116839	624,9476778



**Şekil 27.** CA2 bölgesinde hesaplanan ortalama nöron sayı değerleri ( $\pm$ SEM) görülmektedir.\*: Gruplar arasında hesaplanan  $p < 0,05$  düzeyindeki anlamlılık seviyesini gösterir

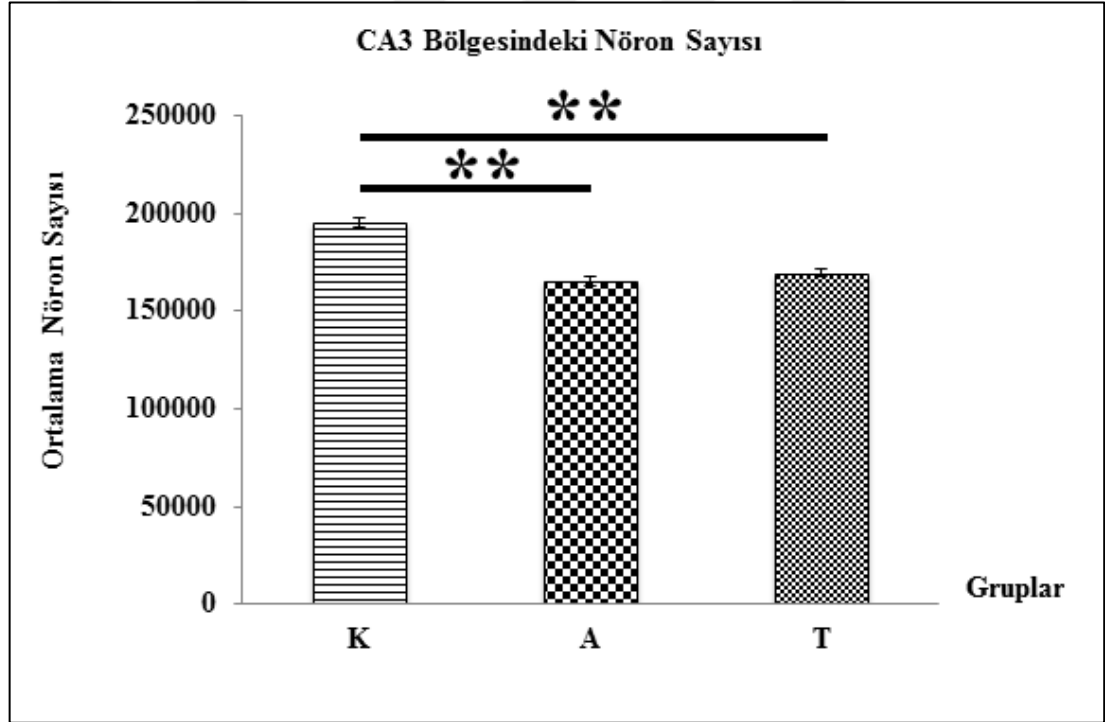
Stereolojik bulgulardan elde edilen nöron sayısı hesaplamalar sonucunda K grubu ile A grubu arasında anlamlı bir fark ( $p=0,070$ ; One-way ANOVA) bulunmadı. K grubu ile T grubu arasında anlamlı bir fark ( $p=0,033$ ; One-way ANOVA) bulundu. A grubu ile T grubu arasında ise anlamlı bir fark ( $p=0,907$ ; One-way ANOVA) bulunmadı.

#### 4.2.3. CA3 Bölgesinden Elde Edilen Bulgular

CA3 bölgesindeki ortalama nöron sayısı sonuçları (Tablo 6) ve (Şekil 28) verilmiştir.

**Tablo 6.** CA3 bölgesindeki nöron sayı değerleri, ortalamaları ve SEM değerleri görülmektedir

	K	A	T
1	203204	173222	169431
2	192019	169174	173257
3	192100	161906	169462
4	187688	161988	173103
5	199717	158045	161718
Ortalama	194945,6	164867	169394,2
SEM	2532,21337	2465,37721	1871,966013



**Şekil 28.** CA3 bölgesinde hesaplanan ortalama nöron sayı değerleri ( $\pm$ SEM) görülmekte. \*\*: Gruplar arasında hesaplanan  $p < 0,01$  düzeyindeki anlamlılık seviyelerini gösterir

Stereolojik bulgulardan elde edilen nöron sayısı hesaplamalar sonucunda K grubu ile A grubu arasında ileri derecede anlamlı bir fark ( $p=0,000$ ; One-way ANOVA); K ile T grubu arasında ileri derecede anlamlı bir fark ( $p=0,000$ ; One-way ANOVA)

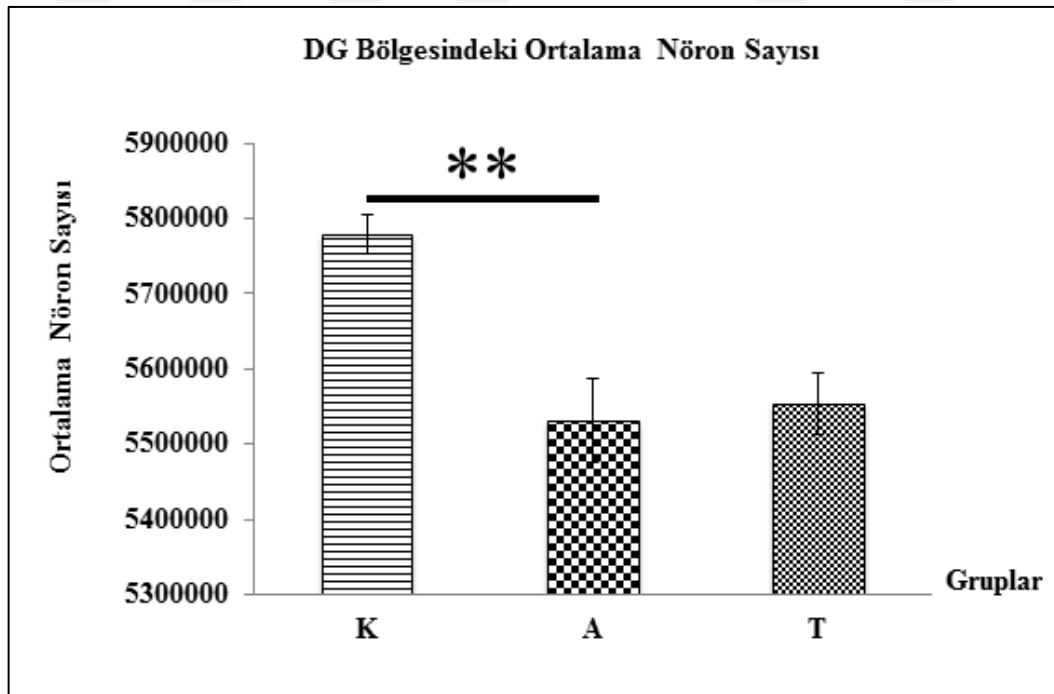
bulundu. A grubu ile T grubu arasında ise anlamlı bir fark çıkmadı ( $p=0,454$ ; One-way ANOVA).

#### 4.2.4. DG Bölgesinden Elde Edilen Bulgular

DG bölgesindeki ortalama nöron sayısı sonuçları (Tablo 7) ve (Şekil 29) verilmiştir.

**Tablo 7.** DG bölgesindeki nöron sayı değerleri, ortalamaları ve SEM değerleri görülmektedir

	K	A	T
1	5828324,57	5335020,95	5577329,14
2	5707635,24	5460000	5699721,33
3	5826934,86	5584706,67	5574700,57
4	5826029,71	5577127,62	5458088,57
5	5707545,71	5698530,67	5457891,43
Ortalama	5779294,02	5531077,18	5553546,21
SEM	26184,4762	55327,18857	40319,87081



**Şekil 29.** DG bölgesinde hesaplanan ortalama nöron sayı değerleri ( $\pm$ SEM) görülmekte. \*\*: Gruplar arasında hesaplanan  $p < 0,01$  düzeyindeki anlamlılık seviyesini gösterir

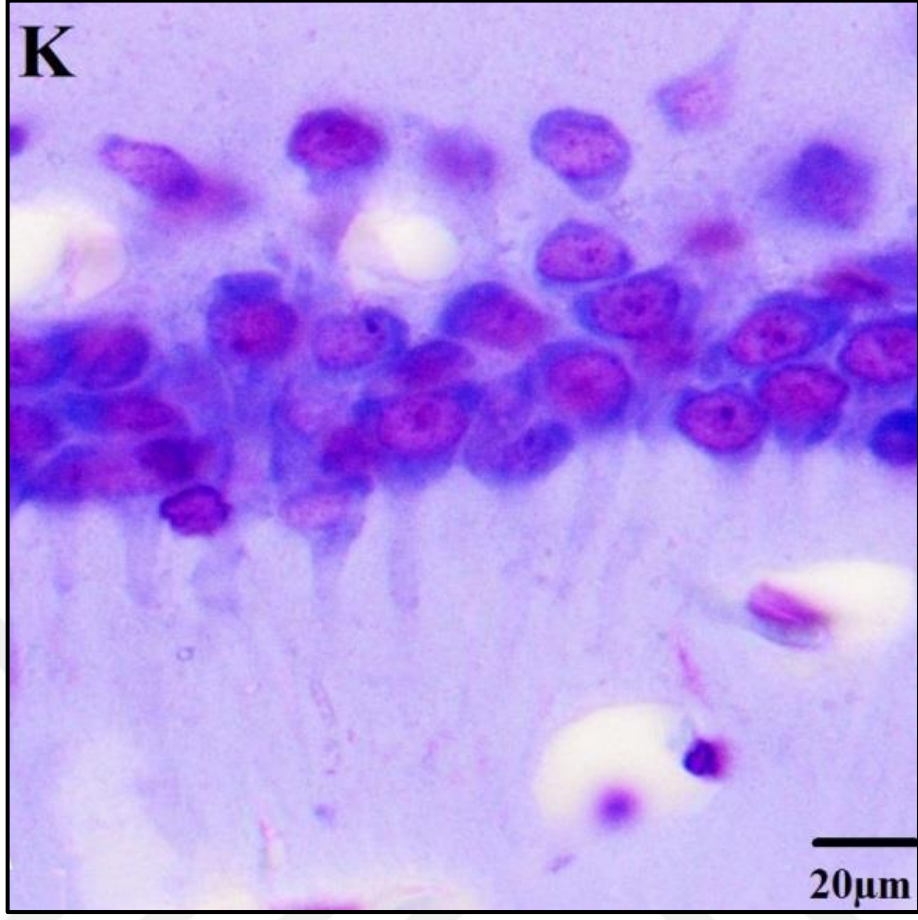
Stereolojik bulgulardan elde edilen nöron sayısı hesaplamalar sonucunda K grubu ile A grubu arasında ileri derecede anlamlı bir fark ( $p=0,008$ ; One-way ANOVA); K grubu ile T grubu arasında ise anlamlı bir fark ( $p=0,014$ ; One-way ANOVA) bulundu. A grubu ile T grubu arasında anlamlı bir fark çıkmadı ( $p=0,940$ ; One-way ANOVA).

### **4.3. Histolojik Bulgular**

Her üç grubun preparat kesitlerinin hipokampus CA1, CA2 ve CA3 bölgelerine ait Cresyl Violet ile boyanan kesit görüntüleri ışık mikroskobu altında incelendi ve stereolojik bulguları aşağıda verildi.

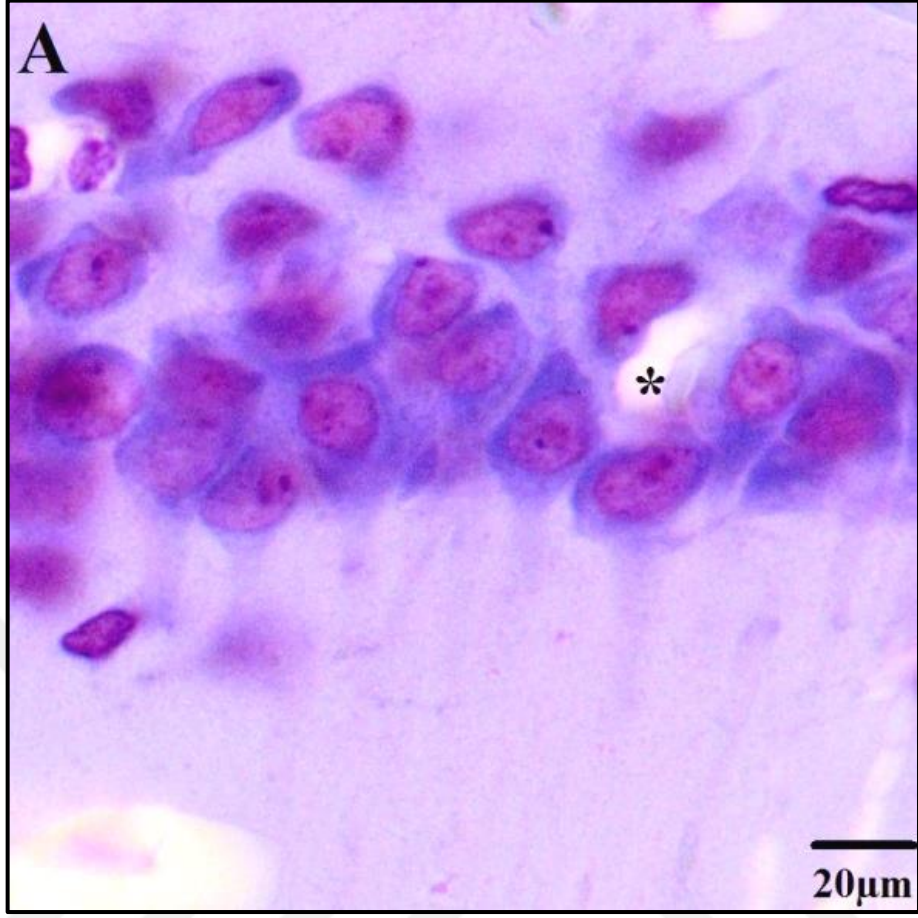
#### **4.3.1. CA1 Bölgesinden Elde Edilen Bulgular**

K grubuna ait kesitlerde nöronların hacmi ve şekli normal görünümdeydi. Benzer görüntü A ve T gruplarına ait CA1 bölgesindeki nöronlarda da tespit edildi. Tüm gruplara ait perikaryon sınırları düzgün ve piramidal şekilli idi. K grubunda bir alana düşen nöron sayısı A ve T gruplarına göre daha fazlaydı. Ayrıca A ve T gruplarındaki nöronlar arasına dağılmış olan kapillerin çapları daha genişti (Şekil 30-32).

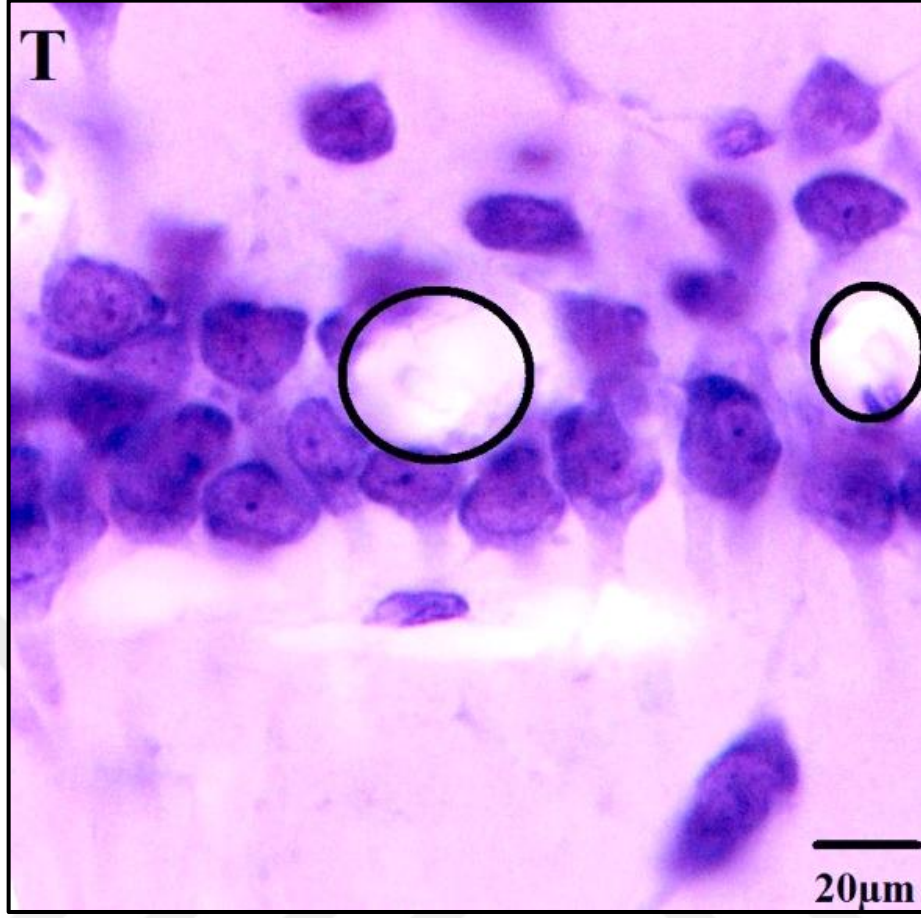


**Şekil 30.** K grubuna ait hipokampus CA1 bölgesinden elde edilen ışık mikroskopik görüntüsü görülmektedir. x100 büyütme, **Boya:** Cresyl Violet





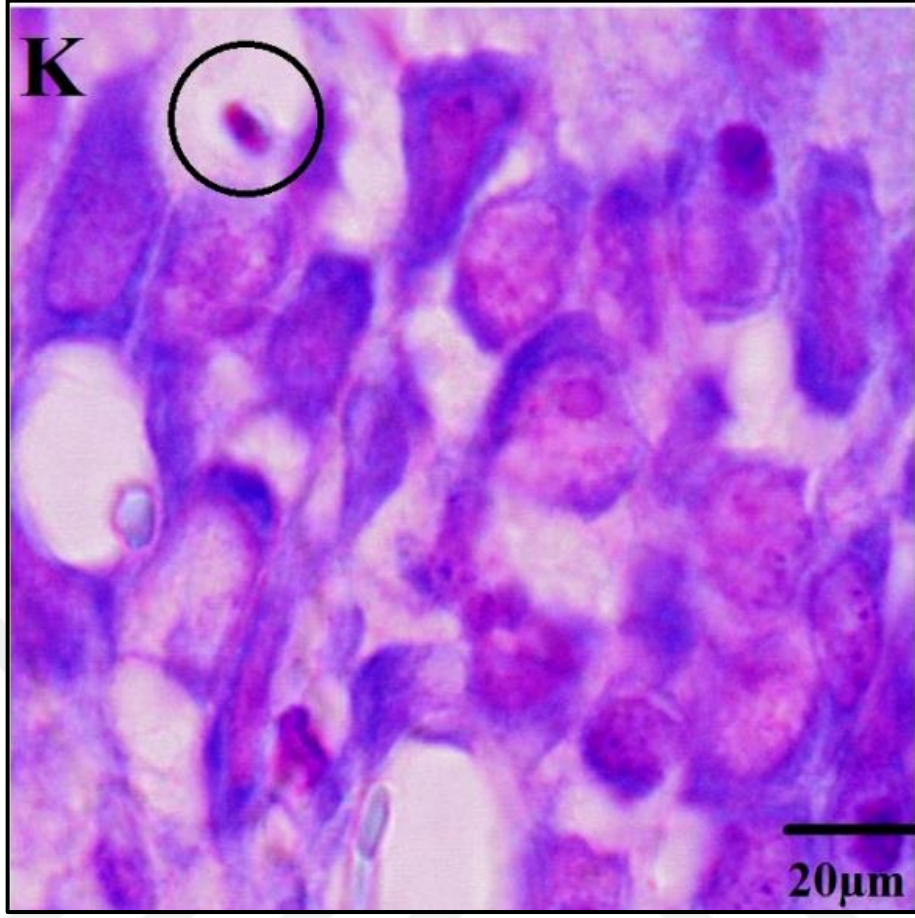
**Şekil 31.** A grubuna ait hipokampus CA1 bölgesinden elde edilen ışık mikroskopik görüntüsü görülmektedir. **Yıldız:** Kapiller. x100 büyütme, **Boya:** Cresyl Violet



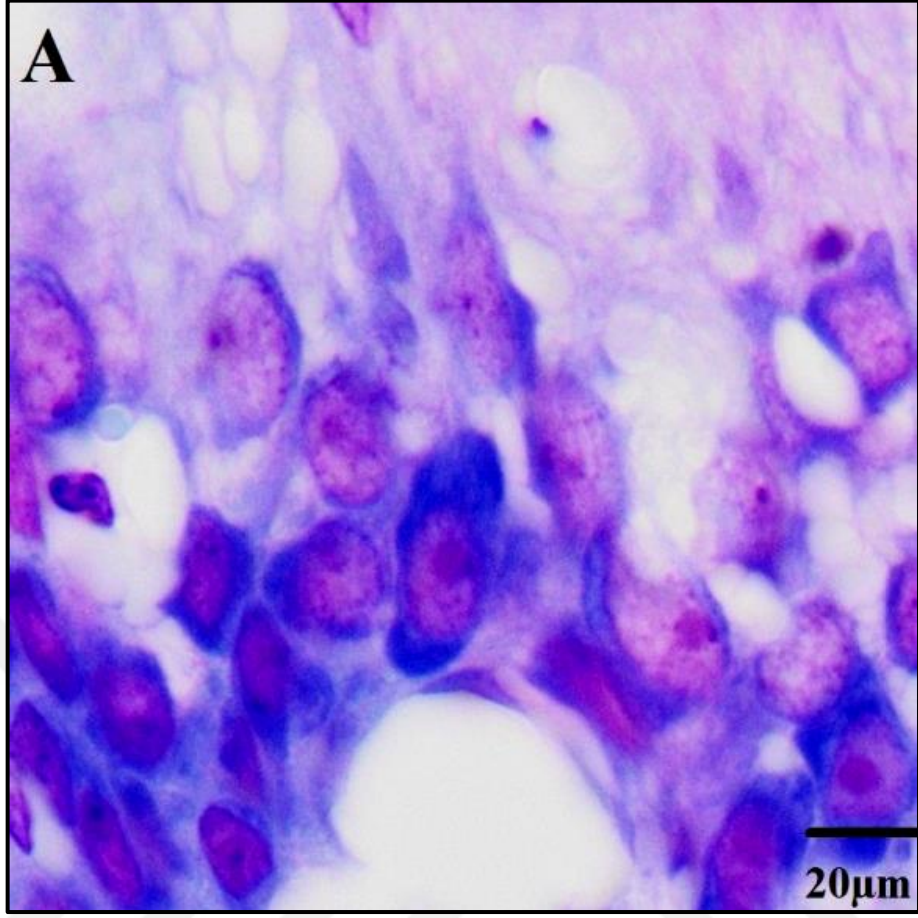
**Şekil 32.** T grubuna ait hipokampus CA1 bölgesinden elde edilen ışık mikroskopik görüntüsü görülmektedir. **Siyah halka:** Kayıp nöron, x100 büyütme, **Boya:** Cresyl Violet

#### 4.3.2. CA2 Bölgesinden Elde Edilen Bulgular

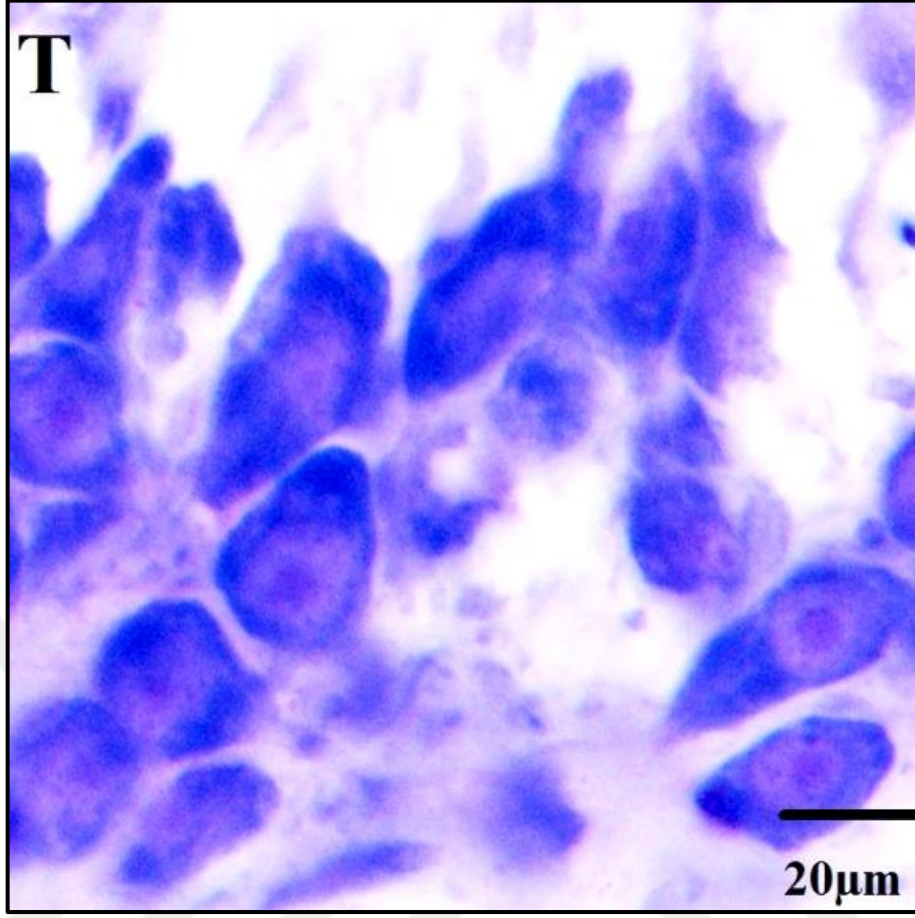
K (Şekil 33), A (Şekil 34) ve T gruplarına (Şekil 35) ait kesitlerde nöronların hacmi ve şekli normal görünümdeydi. Perikaryon sınırları düzgün ve piramidal şekilli idi. K grubunda bir alana düşen nöron sayısı A ve T gruplarına göre daha fazlaydı. Stereolojik bulgulara benzer bir şekilde A ve T grupları arasında CA2 bölgesindeki nöronlar için kayda değer bir fark gözlenmedi.



**Şekil 33.** K grubuna ait hipokampus CA2 bölgesinden elde edilen ışık mikroskopik görüntüsü görülmektedir. **Siyah halka:** Glia hücresi, x100 Büyütme. **Boya:** Cresyl Violet



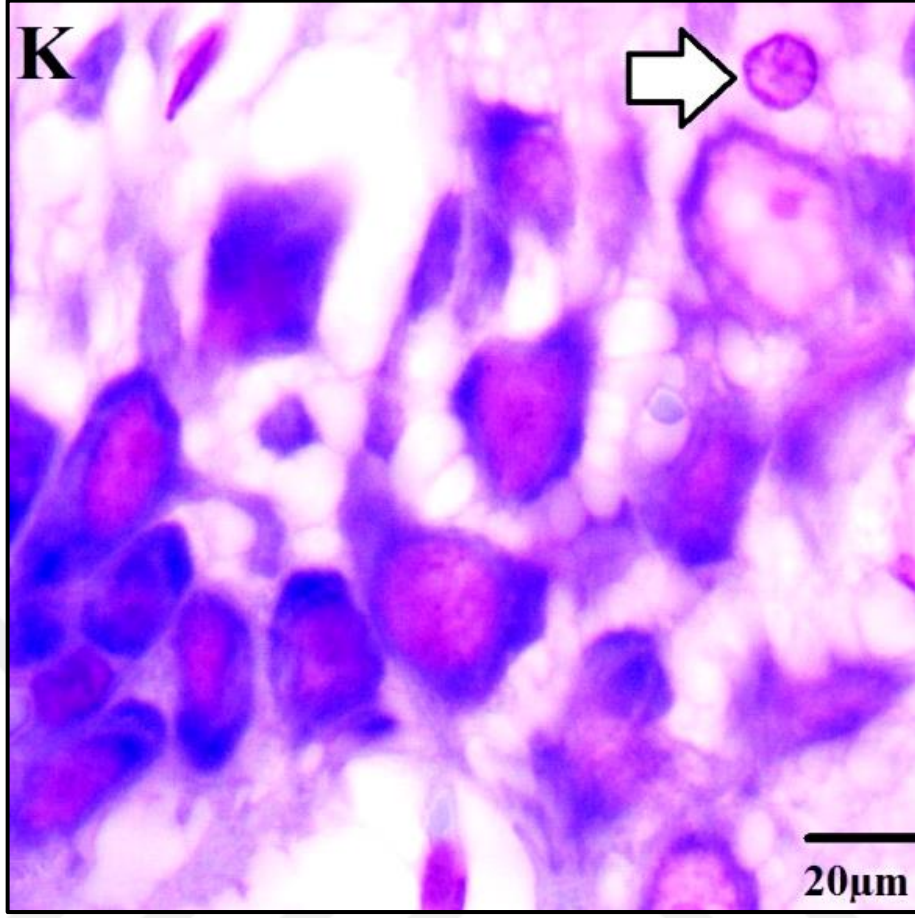
**Şekil 34.** A grubuna ait hipokampus CA2 bölgesinden elde edilen ışık mikroskobik görüntüsü görülmektedir. x100 Büyütme. **Boya:** Cresyl Violet



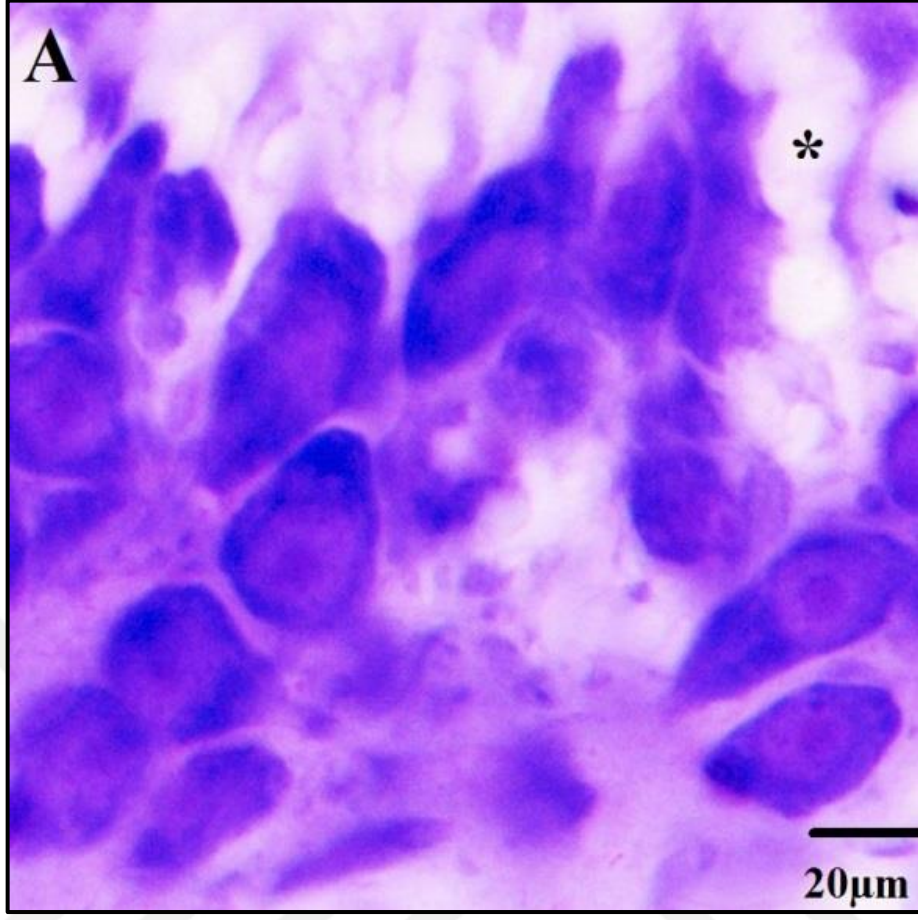
**Şekil 35.** T grubuna ait hipokampus CA2 bölgesinden elde edilen ışık mikroskopik görüntüsü görülmektedir. x100 Büyütme. **Boya:** Cresyl Violet

#### **4.3.3. CA3 Bölgesinden Elde Edilen Bulgular**

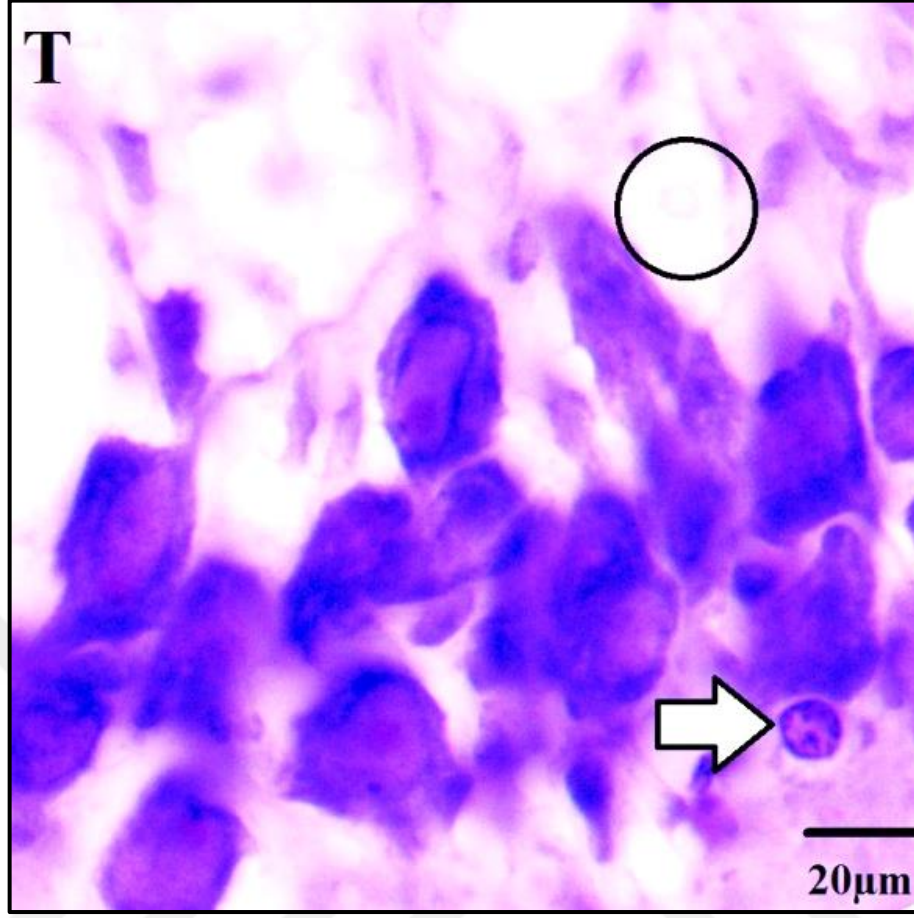
K grubuna (Şekil 36) ait piramidal hücrelerin normal görünümlü küresel şeklindeki çekirdekleri ve hücrelerin sınırları düzgün görünüme sahipti. A (Şekil 37) ve T gruplarına (Şekil 38) ait nöronların bazılarında ise hacim olarak küçülme ve tipik üçgen görünümünden farklılaşma olduğu tespit edildi.



**Şekil 36.** K grubuna ait hipokampus CA3 bölgesinden elde edilen ışık mikroskopik görüntüsü görülmektedir. **Beyaz ok:** Glia hücresi. x100 büyütme, **Boya:** Cresyl Violet



**Şekil 37.** A grubuna ait hipokampus CA3 bölgesinden elde edilen ışık mikroskopik görüntüsü görülmektedir. **Yıldız:** Kapiller. x100 büyütme, **Boya:** Cresyl Violet



**Şekil 38.** T grubuna ait hipokampus CA3 bölgesinden elde edilen ışık mikroskobik görüntüsü görülmektedir. **Siyah halka:** Kayıp nöron, **Beyaz ok:** Glia hücresi. x100 büyütme, **Boya:** Cresyl Violet.

#### **4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular**

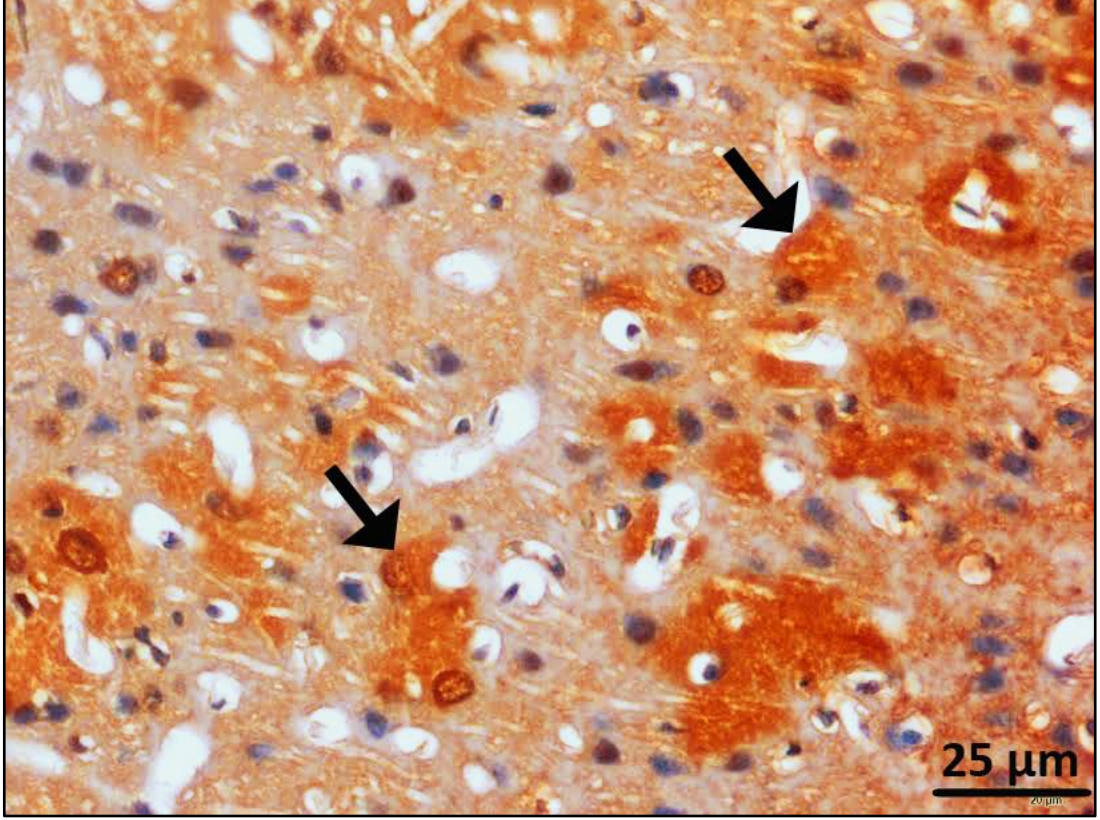
##### **4.4.1. Entorhinal Korteks Bölgesinden Elde Edilen Bulgular**

Entorhinal korteks hipokampus ile neokorteksarasında yer alan bir bölgedir ve bu iki bölge arasında uzanan bir iletişim ağına sahiptir (Witter, 2011). Fyhn ve ark., (2004) göre entorhinal korteks uzaysal hafıza konusunda hipokampuse göre daha önemli görevler üstlenmektedir. Anıların depolanması, istenildiğinde geri çağırılması ve kodlanmasında önemli roller üstlenir. AH'nda ilk etkilenen yer entorhinal kortektir. Sonra sırasıyla DG ve ardından CA3 bölgesi gelmektedir.

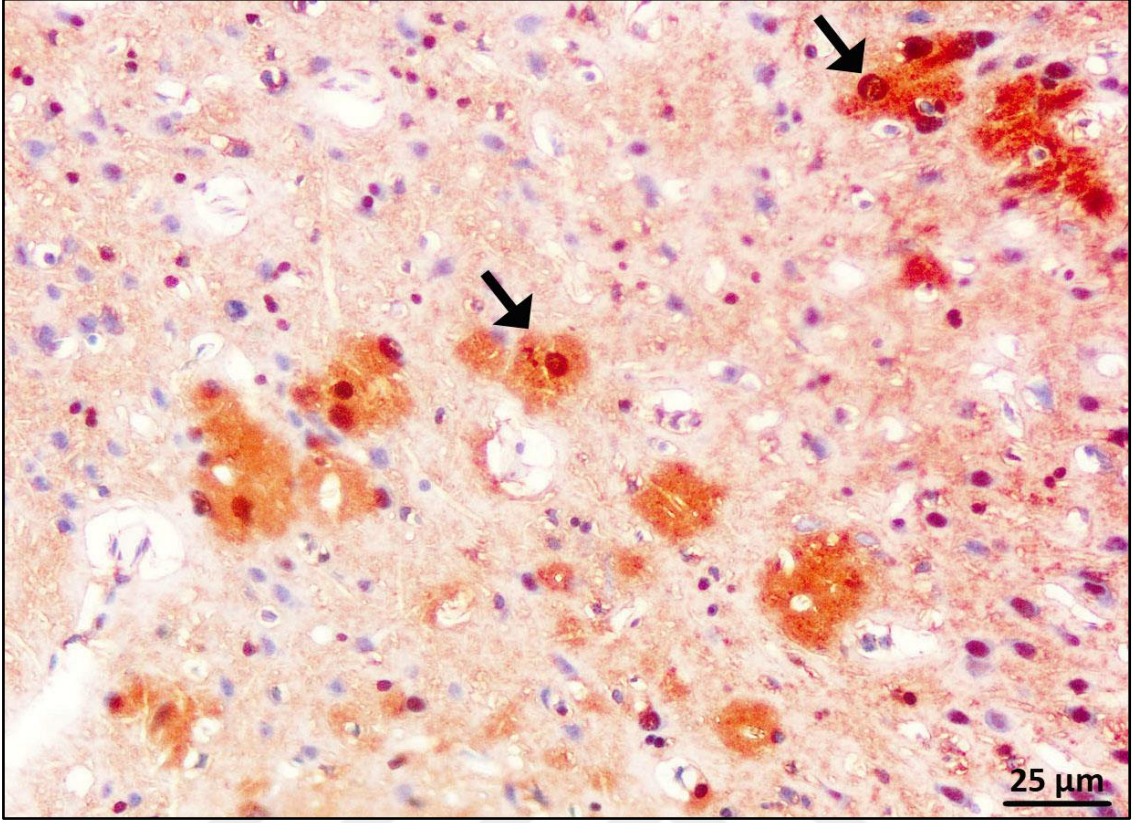
Biz çalışmamızda entorhinal kortekste mitotik aktiviteyi de inceledik. İmmünohistokimyasal sonuçlara göre özellikle K grubunda (Şekil 39) Ki67 pozitif



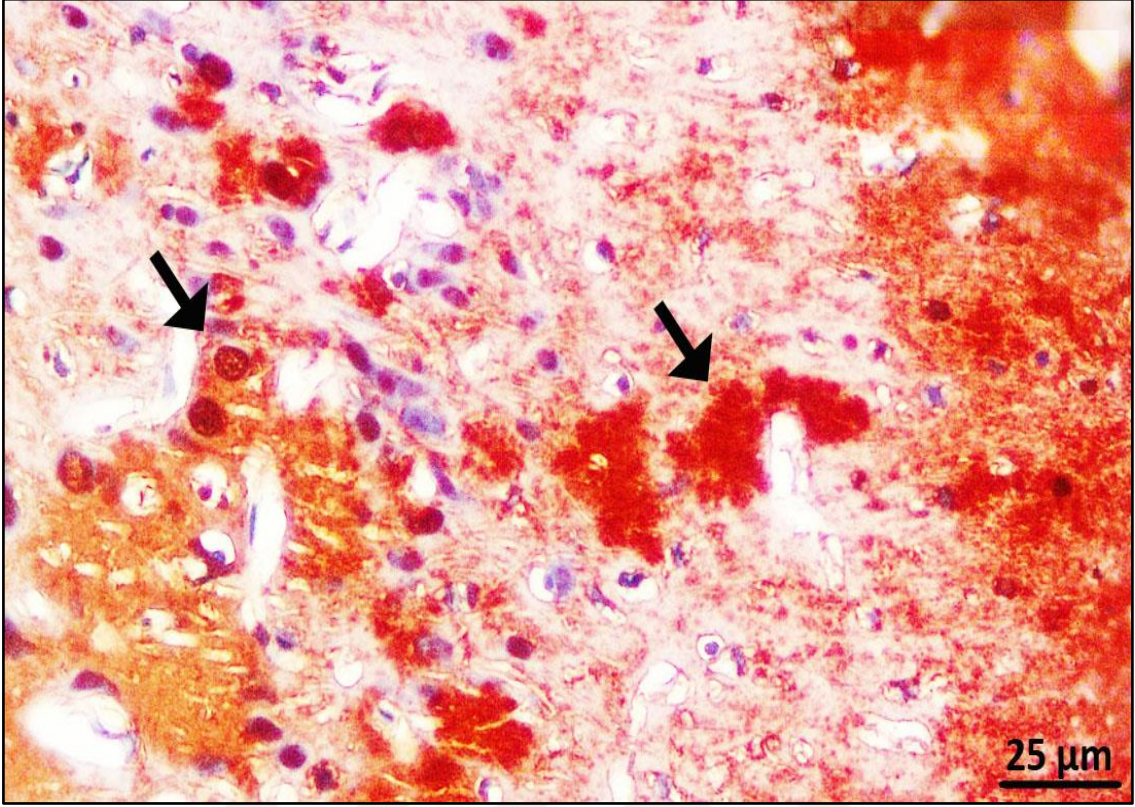
hücreler A ve T gruplarına kıyasla daha yoğun olarak izlendi. A grubu (Şekil 40) ve T grubunda da (Şekil 41) pozitif boyalı hücreler bulunmaktaydı.



**Şekil 39.** Entorhinal korteksteKi67 ekspresyonu. K grubundaki mitotik aktivite yoğunluğu dikkat çekmektedir. **Ok:** Pozitif boyanan hücre, **Zemin boya:** Mayer's Hematoksilen



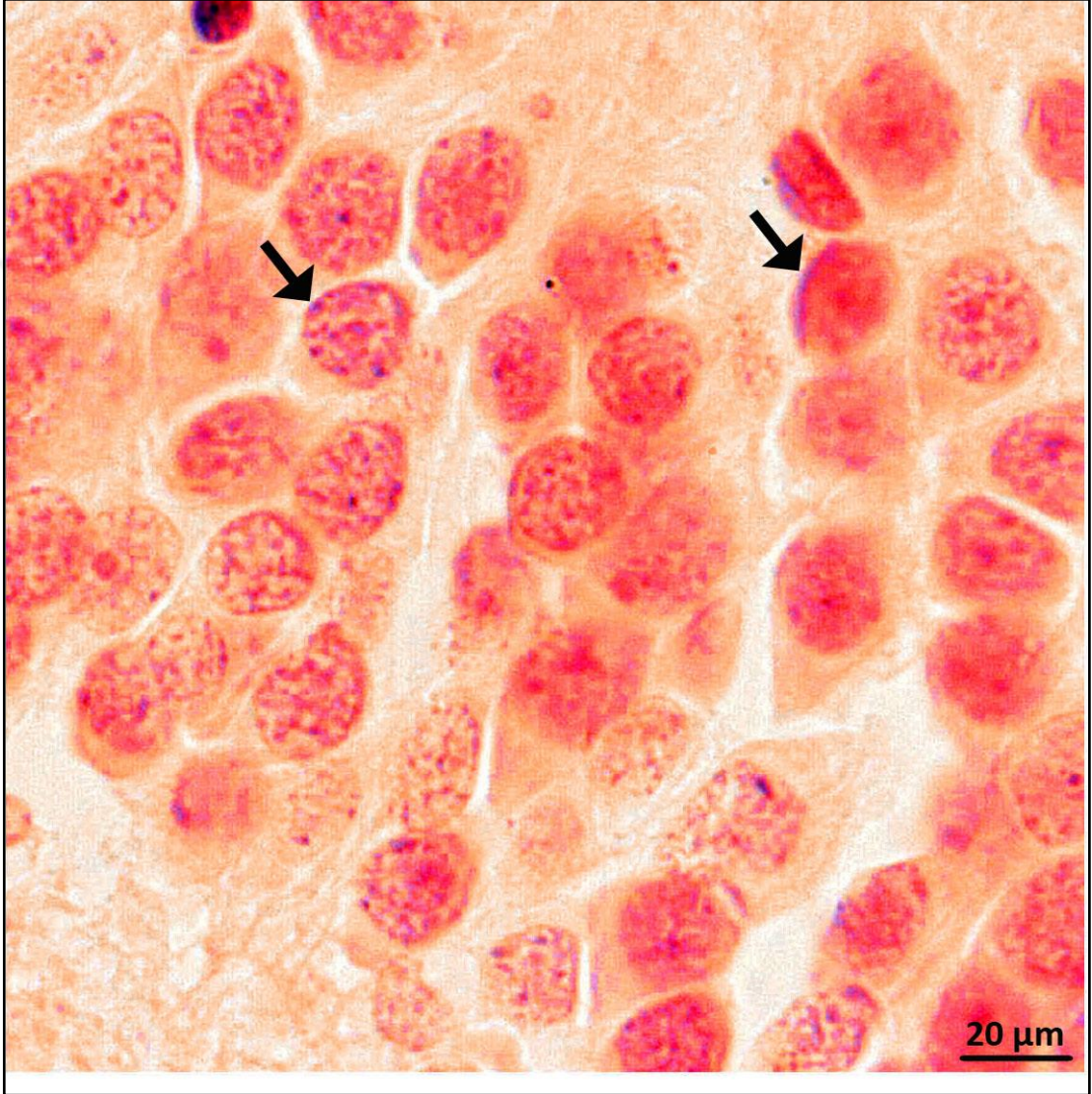
**Şekil 40.** A grubuna ait entorhinal korteksteki nöronal çekirdeklerde Ki67 ekspresyonu. **Ok:** Pozitif boyanan hücre, **Zemin boya:** Mayer's Hematoksilen



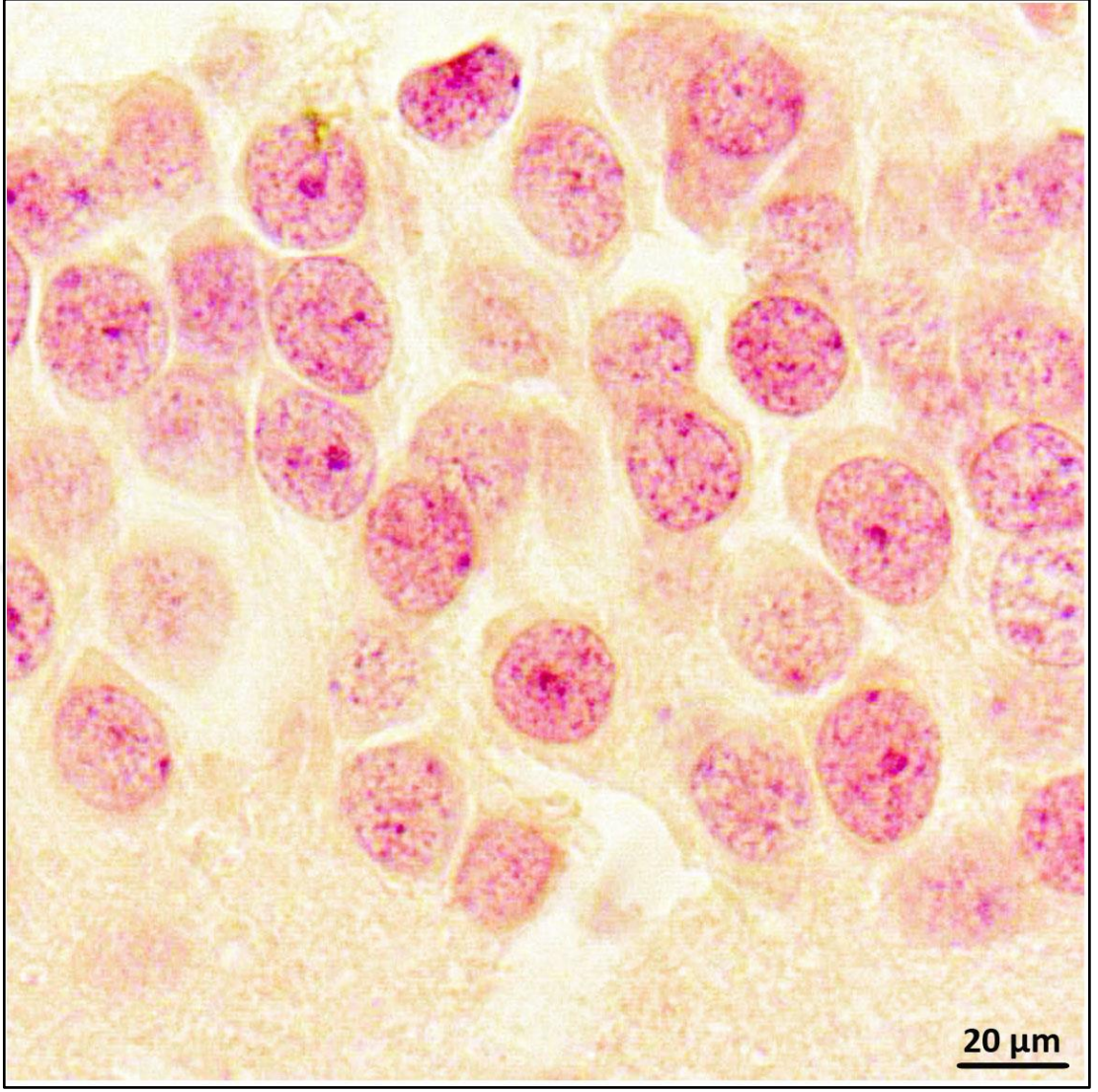
**Şekil 41.** T grubuna ait entorhinal korteksteeki nöronal çekirdeklerde Ki67 ekspresyonu. **Ok:** Pozitif boyanan hücre, **Zemin boya:** Mayer'sHematoksilen

#### 4.4.2. DG Bölgesinden Elde Edilen Bulgular

Mitotik aktivite hipokampusun dentat gyrusunda gözlenmesine karşın CA1, CA2 ve CA3 bölgelerinde gözlenmedi. K grubuna ait dentat gyrusun subgranüler zonunda Ki67 pozitif hücre sayısı yoğun olarak gözlemlendi (Şekil 42), A grubu (Şekil 43) ve T grubunda (Şekil 44) belirgin bir pozitifliğe rastlanmadı.



**Şekil 42.** K grubuna ait dentat gyrusun subgranüler zonu izlenmektedir. **Ok:** Ki67 ile pozitif boyanan hücre çekirdekleri. x100 Büyütme. **Zemin boya:** Mayer's Hematoksilen



**Şekil 43.** A grubuna ait dentat gyrusun subgranüler zonu izlenmektedir. Ki67 ile pozitif boyanan hücre gözlenmemektedir. x100 Büyütme. **Zemin boya:** Mayer's Hematoksilen



**Şekil 44.** T grubuna ait dentat gyrusun subgranüler zonu izlenmektedir. Ki67 ile pozitif boyanan hücre gözlenmemektedir. x100 Büyütme. **Zemin boya:** Mayer's Hematoksilen

## 5. TARTIŞMA

AH geri dönüşümü olmayan ve devamlı ilerleyen, yavaş yavaş anıları silen ve düşünme yetisini zayıflatan, en basit günlük işleri yapmayı sekteye uğratan bir hastalıktır. Çoğu insanda 60'lı yaşların ortasında belirtileri görülmeye başlar. Yaşlı nüfus arasında demasa neden olan en yaygın hastalıktır (National Institute on Aging, 2016). En önemli problemi şu durumda teşhis aşamasıdır. Çünkü hastalığın beyinde ortaya çıkmasından birkaç sene sonra belirtileri örneğin unutkanlık, kişilik bozuklukları, dil sorunları vs. görülebilmekte ya da hastanın ölümünden sonra yapılan otopsinin ardından beyin atrofisi tespit edilebilmektedir. Sürecin ne zaman başladığı veya hastalığın temelini oluşturan etmenlerin neden meydana geldiği halen aydınlatılabilmemiş değildir. Bu nedenle zaten var olan hastalığın seyrini değiştirebilecek veya onu yavaşlatacak ilaçlar kullanılmaktadır. Bu ilaçların çoğunu da kolinesteraz inhibitörleri oluşturmaktadır (Alzheimer's Australia, 2016).

İlaç şirketlerinin neden kolinesteraz inhibitörü kullandıklarının cevabı nöronlar arası iletişim ağının içinde gizlidir. Nöronlar birbirleriyle iletişim kurarken sinaps boşluğuna presinaptik veziküllerden nörotransmitter denilen çeşitli kimyasal içerikler salarlar. İşte bu kimsayal içeriklerin en önemlisi asetilkolindir. AH olan insanların beyin asetilkolin seviyeleri normalden düşüktür. Kolinesteras enzimleri beyindeki asetilkolinleri yıkıma uğratar. Bu nedenle en azından hastalığın seyrini yavaşlatmak adına kullanılacak olan kolinesteras inhibitörleri sayesinde ortamdaki asetilkolin seviyesi korunmaktadır (Wang ve ark., 2016).

The Food and Drug Administration (FDA) tarafından 1993 yılında piyasaya sürülen ilk ilaç bir kolinesteras inhibitörü olan "Tacrine" olmuştur (Alzheimer's Association, 2016). Onu sırasıyla 1996'da "Donepezil", 2001'de "Galantamine", 2003'de "Rivastagmine" ve son olarak 2014 yılında Donepezil ve Memantine ikilisi olan "Namzaric" izlemiştir. Biogen ilaç şirketi "Aducanumab" (amiloid plaklara bağlanarak plak sayısını azaltan bir antikor) adlı ilaçla 2015 yılında başlattığı faz III klinik çalışmalarına 2016 yılında da devam etmektedir (Biogen, 2016).

AH riskini en aza indirmek adına bilim insanları değişik öneriler yayınladılar. Örneğin alternatif tıptaki önerilenlerden bazıları antioksidan (koenzim Q10) kullanımı, *Ginkgo biloba* ve omega 3 yağ asiti destekleyici besinler tüketilmesi yönündedir. Düzenli egzersiz yapmak, kitap okumak, gazete okumak, şiir ezberlemek veya adres-

numara gibi günlük yaşamda karşımıza çıkan bilgileri akılda tutmak da önerilenler arasında yer almaktadır (Alzheimer's Association, 2016). Literatüre henüz yeni kazandırılan bir olgu da organ nakli ile AH arasında bir ilişkinin kurulmasıdır. Organ nakli olan insanların AH'na yakalanma riski oldukça düşük çıkmıştır (Tablo 8). Tagliatela ve ark. (2015) göre organ nakli olan insanlarda CNI kullanmalarından ötürü demans görülme riski CNI almayanlara göre oldukça düşük çıkmıştır. Bu olgu bilim dünyasına AH tedavisi için yeni bir bakış açısı getirebilir. Belki de geliştirilecek yeni immunsupresif içerikli ilaçlar AH için terapötik adaylar olmaya hak kazanabilir.

**Tablo 8.** Genel popülasyonda demans teşhisi konmuş değişik yaş gruplarına ait insanlar ile organ nakli için CNI tedavisi almış demanslı hasta grubu arasındaki karşılaştırma **CNI:** Calcineurin inhibitörü (Tagliatela ve ark., 2015'den uyarlanmıştır)

Yaş	Genel Populasyondaki Demans Hasta Yüzdesi	CNI Tedavisi Almış Populasyondaki Demans Hasta Yüzdesi
<65	%0,07	%0,09 (2/2057)
>65	%11	%1,02 (6/587)
>75	%15,3	%0,6 (1/149)
>85	%32	%0 (0/14)

Beynin yaşlanması  $Ca^{2+}$  regülasyonundaki değişimler ile ilişkilidir (Foster ve ark., 2001). American Academy of Neurology (2016) yaşları 70 ile 92 arasında değişen 700 kadın gönüllüyü beş yıl boyunca takip etmiş ve sonunda ekstra  $Ca^{2+}$  takviyesi alan kadınların demansa yakalanma riskinin almayanlara göre iki kat daha fazla olduğunu tespit etmiştir. Yaşlanmayla birlikte voltaj bağımlı kalsiyum kanallarında artışa bağlı olarak hücre içi  $Ca^{2+}$  seviyesinde artma yaşanır. Hücre içindeki  $Ca^{2+}$  CaM ile bağlanır ve sonucunda CaN'in aktivasyonunda artış yaşanır (Reese ve Tagliatela, 2011). Yaşlandıkça beyinde var olan CaN'in aktivasyonunda, ekspresyonunda değil, bir artma yaşanır ve sonunda nöronların fonksiyonunda ve bilişsel zekâda bir takım değişiklikler baş göstermeye başlar (Foster ve ark., 2001). Biz çalışmamızda bir CNI olan tacrolimus etken maddeli ilacı deneklere STZ injeksiyonu ile AH modeli yapmadan önce oral yoldan gavaj yardımıyla 10 gün boyunca her gün aynı saatlerde verdik. Bizim hipotezimiz dışardan verilecek olan tacrolimus ile demanslı beyinde aktivasyonu normalden fazla olan CaN'ni inhibisyona uğratmak böylelikle CaN'nin yol açtığı



sinaptik protein kayıplarını, nöral inflamasyonu, nöronlar arası iletişim bozukluklarını ve hiperfosforile tau oluşumlarını (Reese ve Tagliatela, 2011) yavaşlatmak veya imkân vermemektir. Nihayetinde nöron dejenerasyonunun ve sayısal azalmanın önüne geçebilmektir.

Histokimyasal ve stereolojik analiz sonuçlarımıza göre hipokampusun CA1 bölgesinde K grubu ile A grubu; K grubu ile T grubu arasında ileri derecede anlamlı bir fark ( $p=0,000$ ; One-way ANOVA) tespit edildi. Hem A hem de T grubunda K grubuna göre nöron sayısında bir azalma gözlemlendi. Yani A ve T gruplarına ait deneklerimizde CA1 bölgesinde nöron azalması tespit edildi. West ve ark.(1994) göre hipokampusun diğer bölgeleri ile kıyaslanıldığında özellikle nöron kaybının görüldüğü bölge CA1 bölgesidir. K grubu ile A grubu arasındaki bu anlamlı fark beklenen bir durumdu fakat A grubu ile T grubu arasında anlamlı derecede bir farkın çıkmaması bizim hipotezimizi çürütmektedir. Çünkü biz CNI'nin koruyucu etkisi sayesinde CA1 bölgesinde nöron kaybının hiç olmaması değil ama en azından K grubu nöron sayısına yakın bir değerde çıkmasını bekliyorduk. Bu sonucun görülmesinde tacrolimus etken maddeli ilacın doz miktarının ya da ilacın uygulama süresi olan 10 günün yetersiz kalmasından ötürü meydana gelen eksikliklerin yol açabileceği düşünülebilir.

Hipokampusun CA2 bölgesinin analizleri sonucunda sadece K grubu ile T grubu arasında anlamlı derecede ( $p=0,033$ ; One-way ANOVA) bir fark olduğu tespit edildi. K grubuna göre A grubunda nöron azalması tespit edilemedi. Literatürde AH'nda hipokampusun CA2 bölgesindeki nöron kaybı ile ilgili kaynak sayısı diğer hipokampusun bölgeleri ile kıyaslanıldığında çok daha az karşımıza çıkmaktadır. Bunun muhtemel nedeni CA2 bölgesinde meydana gelen nöron kaybının önemsenmeyecek boyutta olması olabilir. Padurariu ve ark., (2012) göre CA2 bölgesindeki nöron sayısında azalma vardı ama önemli derecede değildi ( $p>0,01$ ). Bizim çalışmamızda da nöron azalması anlamlı derecede tespit edildi ( $p<0,05$ ) fakat CA1 ya da CA3 bölgelerinde tespit edilen nöron azalması kadar anlamlı çıktığı söylenemez. Stereolojik analizleri sonucunda tacrolimusun CA2 bölgesindeki nöronlara olumsuz etkisi olduğu görülmüştür. CA2 bölgesindeki ortalama nöron sayısı diğer iki grup ile kıyaslandığında neden T grubunda daha az çıktığı bilinmemektedir.

Hipokampusun CA3 bölgesinin analizleri sonucunda CA1 bölgesinde gözlenen duruma yakın tespitler elde edildi. Yine K grubu ile A grubu; K grubu ile T grubu

arasında anlamlı derecede bir fark ( $p=0,000$ ; One-way ANOVA) tespit edildi. Hem A grubu hem de T grubunda, K grubuna kıyasla nöron sayısında bir azalma gözlemlendi. Padurariu ve ark. (2012) göre AH olan insanların hipokampus CA3 bölgelerinde nöron kaybı olmaktadır. Bizim yapmış olduğumuz stereoloji çalışmaları sonucunda elde ettiğimiz CA1 ve CA3 bölgelerindeki nöron kayıpları analiz sonuçlarımız literatür bilgisi ile de desteklendi (West ve ark., 1994; Casadesus 2011; Padurariu ve ark., 2012).

Hipokampusun DG bölgesinin analizleri sonucunda K grubu ile A grubu arasında ileri derecede anlamlı bir fark ( $p=0,008$ ; One-way ANOVA) olduğu tespit edildi. K grubu ile T grubu arasında ise anlamlı bir fark ( $p=0,014$ ; One-way ANOVA) bulundu. A grubu ile T grubu arasında da anlamlı bir fark çıkmadı ( $p=0,940$ ; One-way ANOVA).

AH'nda amiloid plak birikimi veya tau nörofibrillerin varlığı nöron kaybı ile kıyaslandığında daha önemsiz kalmaktadır. Demansa neden olan asıl olay nöronal kayıptır (Andrade-Moraes ve ark., 2013). Biz de çalışmamızda nöronal kayıpların üzerinde durduk. Hipokampusun CA1 ve CA3 bölgelerinde anlamlı derecede nöron kaybı olduğunu stereolojik bulgulardan elde ettik. Özetle, hem CA1 hem de CA3 bölgeleri için K grubu ile A grubu arasında ve K grubu ile T grubu arasında anlamlı derecede ( $p<0,01$ ) nöron kaybı gözlemlendi. Fakat A ile T grupları arasında anlamlı bir fark çıkmadı. STZ injeksiyonundan önce verilen tacrolimus etken maddeli ilaç CaN'nin olumsuz etkisini bertaraf etmede yetersiz kaldı. Muhtemelen ilacın verilme süresinden kaynaklanan bir olumsuzluk olabilir. Arora ve ark. (2013) yaptıkları bir çalışmada FK506'nın intraserebral STZ injeksiyonlu sıçanlarda nörotoksititeyi hafiflettiğini rapor etmişlerdir. Kullandıkları FK506 doz miktarı bir deney grubu için 0,5 mg/kg iken diğer deney grubu için 1,0 mg/kg'dır ve 21 gün boyunca deneklere verilmiştir. Ayrıca STZ injeksiyonundan sonra ilaç verilmeye başlanmıştır. Biz çalışmamızda deneklere 10 gün boyunca 0,5 mg/kg tacrolimus henüz STZ injeksiyonu yapılmadan önce oral yoldan verdik. Taglialatela ve ark. (2015) göre organ nakli olan hastalar tacrolimus etken maddeli ilaç kullanmakta ve de demansın görülme oranının oldukça düşük çıktığını bir makalede yayınlamışlardır. Eğer öyleyse muhtemelen bizim kullandığımız ilacın doz miktarı yetersiz kaldı veya kullanılan süre az geldi. Çünkü sundukları olguya bakarsak o zaman tacrolimusun nöron sayısındaki azalmayı engellemesi gerekti fakat biz öyle bulmadık, etkisiz kaldığını gördük.

AH'nda etkilenen alanlar ilk olarak entorhinal korteks, CA1 ve subiculum bölgeleridir (Li ve ark., 2008). Biz çalışmamızda mitotik hücre aktivasyonunu entorhinal kortekste gözlemledik. Entorhinal korteks bilişsel fonksiyonlar için esastır. Bu nedenle bu bölgede görülen hasar gliyal bozukluk gibi nöronal ve sinaptik değişimlerden kaynaklanan ve hafıza defektleri ile sonuçlanan AH gelişimi için temel ögedir (Yeh ve ark., 2011). Biz çalışmamızda entorhinal kortekste her üç grupta da mitotik aktiviteli hücreler olduğunu belirledik.

May-Britt Moser ve Edvard Moser beynin sanki bir GPS gibi koordinasyonları belirleyip haritalamayı sağlayan, insanın durağan haldeki pozisyonu hakkında beyne bilgi veren, beyindeki yer ve durumu belirleyen hücreler olan “grid hücre” keşfinden sonra 2014 Nobel Fizyoloji (Tıp) ödülünü almaya hak kazandılar. Entorhinal korteksin AH'nda etkilenen ilk bölge olduğunu ve hastaların neden bir anda nerede olduklarını veya ne yaptıklarını unuttuklarını bu bölgedeki lezyonlardan kaynaklandığını da ifade ettiler (Abbott, 2014). Entorhinal korteks hem anatomik hem de fizyolojik yapısından dolayı yüzeysel (I-III) ve derinsel (IV-VI) olmak üzere iki farklı organizasyondan oluşur. Yüzeysel organizasyon alanı hipokampuse giden bilgilerin ana kaynağıdır. AH'nda entorhinal kortekste nöronal kayıp ve atrofi görülmektedir. Fakat gen ekspresyonu hakkındaki bilgiler sınırlı düzeydedir (Ding ve ark., 2014).

Korteksten hipokampuse doğru akan bilgi iletimini kontrol eden DG hipokampuse açılan ana kapıdır (Lee ve ark., 2016). Arabpoor ve ark. (2012) göre DG bölgesinde nörojenez neden olan veya apoptozu önleyen faktörler öğrenme ve hafızayı geliştirebilir. Yaptıkları bir çalışmada DG bölgesi için kontrol grubu ile Alzheimer grubunu kıyasladıklarında, kontrol grubunda daha fazla mitotik aktiviteli hücre olduğunu tespit etmişlerdir. Biz de çalışmamızda K grubunda DG bölgesinde mitotik hücre yoğunluğunu tespit ettik fakat A ve T gruplarında tespit edemedik.

20. yüzyılın başlarından itibaren öğrenme ve hafıza sürecinin ölçülmesinde çok sayıda deneysel prosedür geliştirilmiştir. Öncelikle mekânsal öğrenmeyi ve geri çağırma ölçmek üzere tasarlanan bu deney özellikle kemirgenlerde yaşlanmanın, deneysel lezyonların ve ilaç etkilerini değerlendirmek için oldukça yararlı olmuştur. MWM testi davranış fizyologları ve farmakologlar tarafından en çok kullanılan ve kabul gören deneydir ayrıca 1982 yılından beri 2500'den fazla makalede çalışmaları yayınlanmıştır (Terry, 2009). Biz de çalışmamızda kısa süreli hafıza ile yer-yön bulma

becerilerini ölçmek için MWM testini uyguladık. K grubu ile A grubu ve T grubu karşılaştırıldığında ileri derecede anlamlı bir fark olduğu görüldü ( $p < 0,01$ ; One-way ANOVA). K grubunun performansı diğer iki grup ile kıyaslandığında daha başarılı olduğu ortaya çıktı. Stereolojik analizler ile birleştirildiğinde, A ve T grubunda görülen nöronal azalma ile beyinde etkilenen hipokampus ve entorhinal korteks MWM test sonuçları ile örtüşmektedir. A grubu ile T grubu arasında anlamlı derecede fark görülmemesi ( $p = 0,049$ ; One-way ANOVA) yine stereolojik analizler ile örtüşmektedir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- STZ injeksiyonu sonucunda elde edilen AH model deneklerde (A grubu) genel olarak hipokampusunun CA1, CA3 ve DG bölgelerinde anlamlı derecede ( $p < 0,01$ ; One-way ANOVA) nöron kaybı olduğu bulgusuna varıldı.
- Tacrolimus deneklere STZ injeksiyonundan önce verildi (T grubu). Tacrolimusun nöron koruyucu olduğu etkisine rastlanmadı. K grubu ile T grubu arasında nöron sayısı bakımından genel olarak hipokampusun ilgili bölgeleri için anlamlı bir fark çıktı ( $p < 0,01$ ; One-way ANOVA); T grubundaki ortalama nöron sayısı K grubundaki ortalama nöron sayısından az bulundu. Yani tacrolimus nöron azalmasının önüne geçemedi. A grubu ile T grubu arasında anlamlı bir fark çıkmadı ( $p > 0,05$ ; One-way ANOVA).
- Morris su tankı testinde K grubuna ait deneklerin yer-yön hafızası ve kısa süreli bellek kapasitesi A grubu ve T grubu ile kıyaslanıldığında daha başarılı bulundu. K grubu ile diğer iki grup arasında anlamlı derecede fark tespit edildi ( $p < 0,01$ ; One-way ANOVA). A grubu ile T grubu arasında anlamlı bir fark çıkmadı ( $p > 0,05$ ; One-way ANOVA).
- Yapılan immünohistokimyasal işlemler ile entorhinal korteksteki Ki67 ile pozitif boyanmış hücrelerin stereolojik olarak sayımlarının da yapılması bilimsel çalışmalar için destekleyici nitelikte olabilir. Bu nedenle pozitif boyanmış hücrelerin sayımı ve analizi bundan sonra yapılacak olan çalışmalarda önerilir.
- Farklı dozaj miktarları ve ilacın verileceği gün sayısının da artırılması ile farklı çalışmalar yapılması yönünde bir önerimiz vardır. İnsan popülasyonu içinde organ nakli olan insanlarda AH riskine bağlı olarak ortaya çıkan demansın görülme oranı azımsanmayacak kadar az düzeyde ortaya çıkmıştır. Bundan dolayı bizim kanaatimiz tacrolimus gibi immüno-supresif ilaç çalışmalarına bu hastalık için şimdi ve gelecekte önem verilmelidir.

## KAYNAKLAR

- Abbott A. Neuroscience: Brains of Norway. *Nature* 2014; 514(7521): 154-157.
- Abcam 2016. Mouse and Rabbit Specific HRP/AEC (ABC) Detection IHC Kit <http://www.abcam.com/mouse-and-rabbit-specific-hrpaec-abc-detection-ihc-kit-ab93705.html>, 2016.
- Akalan MA, Demirkan AÇ. Stereoloji ve Veteriner Hekimlikte Kullanım Alanları. *YYU Veteriner Fakültesi Dergisi* 2013; 24(2): 95–100.
- Alzheimer's Association 2016. Current Alzheimer's Treatments. <http://www.alz.org/>, 2016.
- Alzheimer's Australia 2016. Drug treatments for Alzheimer's disease. Cholinesterase inhibitors. <https://www.fightdementia.org.au/>, 2016.
- American Academy of Neurology 2016. Calcium supplements linked to dementia risk in women with certain health conditions. [www.sciencedaily.com/releases/2016/08/160817171555.htm](http://www.sciencedaily.com/releases/2016/08/160817171555.htm), 2016.
- Andrade-Moraes CH, Oliveira-Pinto AV, Castro-Fonseca E, Silva CG, Guimaraes DM, Szczupak D, Parente-Bruno DR, Carvalho LRB, Polichiso L, Bruna V. Gomes BV, Lays M, Rodriguez RD, Leite REP, Ferretti-Rebustini REL, Jacob-Filho W, Pasqualucci CA, Grinberg LT, Lent R. Cell number changes in Alzheimer's disease relate to dementia, not to plaques and tangles. *Brain* 2013; 136: 3738–3752.
- Arabpoor Z, Hamidi G, Rashidi B, Shabrang M, Alaei H, Sharifi MR, Salami M, Dolatabadi HR, Reisi P. Erythropoietin improves neuronal proliferation in dentate gyrus of hippocampal formation in an animal model of Alzheimer's disease. *Adv Biomed Res* 2012; 1: 50.
- Arora RB, Kumar K, Deshmukh RR. FK506 attenuates intracerebroventricular streptozotocin induced neurotoxicity in rats. *Behav Pharmacol* 2013; 24: 580–589.
- Bancroft J, Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 2nd Ed., New York, Churchill Livingstone, 1982; 131-135.
- Becker JC, Houben R, Vetter CS, Bröcker EB. The carcinogenic potential of tacrolimus ointment beyond immune suppression: a hypothesis creating case report. *BMC Cancer* 2006; 6: 7.
- Biogen 2016. Aducanumab (A $\beta$  mAb). [https://www.biogen.com/en\\_us/research-pipeline/biogen-pipeline.html](https://www.biogen.com/en_us/research-pipeline/biogen-pipeline.html), 2016.
- Bolzan AD, Bianchi MS. Genotoxicity of streptozotocin. *Mutation Research* 2002; 512: 121-134.

- Cruz-Orive LM, Weibel ER. Recent stereological methods for cells biology: A brief survey. *J Am Physiol* 1990; 258: 148-156.
- Cumhur M, Temel Anatomi, 1. Baskı, Ankara, Metu Press, 2001, 376-377.
- Demetrius LA, Magistretti PJ, Pellerin L. Alzheimer's disease: the amyloid hypothesis and the inverse warburg effect. *Front Physiol* doi.org/10.3389/fphys.2014.00522
- Ding B, Xi Y, Gao M, Li Z, Xu C, Fan S, He W. Gene expression profiles of entorhinal cortex in Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Dement* 2014; 29(6): 526-532.
- Drugs.com 2016. Tacrolimus.  
<https://www.drugs.com/>, 2016.
- Foster TC, Sharrow KM, Masse JR, Norris CM, Kumar A. Calcineurin Links Ca<sup>2+</sup> Dysregulation with Brain Aging. *J Neurosci* 2001; 21(11): 4066–4073.
- Fyhn M, Molden S, Witter MP, Moser EI, Moser MB. Spatial representation in the entorhinal cortex. *Science* 2004; 305: 1258–1264.
- George D, Mallery M. SPSS for Windows Step by Step: a Simple Guide and Reference, 17.0 update, 10. Baskı, Boston, Pearson, 2010.
- Ghoneim FM, Khalaf HA, Elsamanoudy AZ, El-khair SMA, Helaly AMN, El-Hassanin M, Mahmoud EHM, Elshafey SH. Protective effect of chronic caffeine intake on gene expression of brain derived neurotrophic factor signaling and the immunoreactivity of glial fibrillary acidic protein and Ki-67 in Alzheimer's disease. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8(7): 7710-7728.
- Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing a unique cerebrovascular amyloid fibrillar protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 122: 1131-1135.
- Grieb P. Intracerebroventricular streptozotocin injection as a model of Alzheimer's disease: in search of a relevant mechanism. *Mol Neurobiol* 2015;doi 10.1007/s12035-015-9132-3.
- Gundersen HJ. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. *J Microsc* 1977; 111: 219-223.
- Gundersen HJG, Jensen EBV, Kieu K, Nielsen J. The efficiency of systematic sampling in stereology-reconsidered. *J Microsc* 1999; 193: 199-211.
- Gundersen HJG, Jensen EBV. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* 1987; 147: 229-263.
- Gundersen HJG, Østerby R. Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or "Do more less well !" *J Microsc* 1981; 121: 65-73.

- Heneka MT, O'Banion KM. Inflammatory processes in Alzheimer Disease. *J Neuroimmunol* 2007; 184: 69-91.
- Casadesus G. Handbook of animal models in Alzheimer's disease. 1st Ed., The Netherlands, IOS Press BV. 2011;92-93.
- İzci Y, Erbaş YC. Hipokampus: Yapısı ve Fonksiyonları. *Türk Nöroşir Derg* 2015; 25(3): 287-295.
- Korkmaz A, Ayas B, Çiftçi N. Fiziksel disektör çiftlerinin görüntü yakalama kartı ile görüntülenmesi: etkin ve ekonomik yeni bir stereolojik uygulama. VI. Ulusal Histoloji-Embriyoloji Kongresi, Bildiri Özetleri. 2002.
- LaFerla FM. Amyloid- $\beta$  and tau in Alzheimer's disease. <http://www.nature.com/nrn/posters/ad/index.html>, 2016.
- Lee CT, Kao MH, Hou WH, Wei YT, Chen CL, Lien CC. Causal Evidence for the Role of Specific GABAergic Interneuron Types in Entorhinal Recruitment of Dentate Granule Cells. *Sci Rep* 2016;10(6): 36885.
- Li B, Yamamori H, Tatebayashi Y, Shafit-Zagardo B, Tanimukai H, Chen S, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Failure of Neuronal Maturation in Alzheimer Disease Dentate Gyrus. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008; 67(1): 78–84.
- Li L. Streptozotocin. *Free Radic Biol Med* 2001; 77: 222.
- Maurer K, Volk S, Gerbaldo H, Auguste D and Alzheimer's disease. *J Lancet* 1997; 349: 1546–1549.
- Murphy MP, LeVine H. Alzheimer's disease and the  $\beta$ -amyloid peptide. *J Alzheimers Dis* 2010; 19(1): 311.
- National Institute on Aging 1974. About Alzheimer's Disease: Alzheimer's Basics. <https://www.nia.nih.gov/alzheimers/topics/alzheimers-basics>, 2016.
- Noto T, Furuichi Y, Ishiye M, Matsuoka N, Aramori I, Mutoh S, Yanagihara T. Tacrolimus (FK506) limits accumulation of granulocytes and platelets and protects against brain damage after transient focal cerebral ischemia in rat. *Biol Pharm Bull* 2007; 30(2): 313-317.
- Nunez J. Morris water maze experiment. *J Vis Exp* 2008; 19: 897.
- Özgör C, Soylu C, Arsoy E, Küçükerden M, Örcen A. Alzheimer hastalığının kronolojik olarak incelenmesi, 1.ODTÜ Sinirbilim Günleri, 2013.
- Öztürk GB, Karan MA. Alzheimer hastalığının fizyopatolojisi. *Klinik Gelişim* 2009; 22: 32-46.



- Padurariu M, Ciobica A, Mavroudis I, Fotiou D, Baloyannis S. Hippocampal neuronal loss in the CA1 and CA3 areas of Alzheimer's disease patients. *Psychiatr Danub* 2012; 24(2): 152-158.
- Pakkenberg B, Gundersen HJG. Total numbers of neurons and glial cells in human brain nuclei estimated by disector and fractionator. *J Microsc* 1988; 150: 1-20.
- Pardo R, Colin E, Re'gulier E, Aebischer P, De'glon N, Humbert S, Saudou F. Inhibition of calcineurin by fk506 protects against polyglutamine-Huntingtin toxicity through an increase of Huntingtin phosphorylation at S421. *J Neurosci* 2006; 26: 1635–1645.
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates, 6. Baskı, İngiltere, Academic Press, 2006; 54-55.
- Reese LC, Tagliatela G. A Role for Calcineurin in Alzheimer's Disease. *Curr Neuropharmacol* 2011; 9: 685-692.
- Robert AM, Buijsch O, Maarten HL, Christiaans L, Stolk ML, Johan E, De Vries, Cheung CY, Undre AN, Hooff JPV, Marja P, Visser VD, Bekers O. Tacrolimus pharmacokinetics and pharmacogenetics: influence of adenosine triphosphate-binding cassette B1 (ABCB1) and cytochrome (CYP) 3A polymorphisms. *Fundam Clin Pharmacol* 2007; 21(4): 427-435.
- Saini KS, Thompson C, Winterford CM, Walker NI, Cameron DP. Streptozotocin at low doses induces apoptosis and at high doses causes necrosis in a murine pancreatic beta-cell line, INS-1. *Biochem Mol Bio Int* 1996; 39: 1229–1236.
- Sandin L, Bergkvist L, Nath S, Kielkopf C, Janefjord C, Helmfors L, Zetterberg H, Blennow K, Li H, Nilsberth C, Garner B, Brorsson AC, Kagedal K. Beneficial effects of increased lysozyme levels in Alzheimer's disease modelled in *Drosophila melanogaster*. *FEBS J* 2016; 283(19): 3505–3672.
- Santos TO, Mazucanti CHY, Xavier GF, Torráo AS. Early and late neurodegeneration and memory disruption after intracerebroventricular streptozotocin. *Physiol Behav* 2012; 107: 401-413.
- Sastre M, Klockgether T, Heneka MT. Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms. *Int J Devl Neuroscience* 2006; 24: 167-176.
- Shenolikar S. Protein serine/threonine phosphatases—new avenues for cell regulation. *Annu Rev Cell Biol* 1994; 10: 55–86.
- Smith TW, Lippa CF. Ki-67 immunoreactivity in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995; 54: 297-303
- Snell RS, Klinik Nöroanatomi, 3. Baskı, Ankara, Nobel Kitabevi, 2016, 307-311.

- Tagliatela G, Rastellini C, Cicalese L. Reduced Incidence of Dementia in Solid Organ Transplant Patients Treated with Calcineurin Inhibitors. *J Alzheimers Dis* 2015; 47(2): 329-333.
- Tel N. Patoloji, 1. Baskı, Eskişehir, T.C. Anadolu Üniversitesi Yayınları No: 495 Açıköğretim Fakültesi Yayınları No: 224, 1991; 6.
- Terry AV. Spatial Navigation (Water Maze) Tasks. Buccafusco JJ. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. 2nd Ed., Georgia, Augusta, CRC Press/Taylor & Francis; 2009; 154-165.
- Thomson AW, Bonham CA, Zeevi A. Mode of action of tacrolimus (FK506): molecular and cellular mechanisms. *Ther Drug Monit* 1995; 17(6): 584-591.
- Topçuoğlu ES, Selekler K. Alzheimer Hastalığı. *Turk Geriatri Derg* 1998; 1: 63-67.
- Ünal A, Korulu Ş, Karabay A. Neuroprotective strategies against calpain-mediated neurodegeneration. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 2015; 11: 297–310.
- Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature Protocols* 2006; 1: 848–858.
- Wang YQ, Qu DH, Wang K. Therapeutic approaches to Alzheimer's disease through stimulating of non-amyloidogenic processing of amyloid precursor protein. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2016; 20(11): 2389-2403.
- West MJ, Coleman PD, Flood DG, Troncoso JC. Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet* 1994; 17: 344(8925): 769-772.
- Witter M. Entorhinal cortex. *Scholarpedia* 2011; 6(10): 4380.
- Wu Y, Liang S, Oda Y, Ohmori I, Nishiki T, Takei K, Matsui H, Tomizawa K. Truncations of amphiphysin I by calpain inhibit vesicle endocytosis during neural hyperexcitation. *EMBO J* 2007; 26(12): 2981–2990.
- Yalcin A, Telang S, Clem B, Chesney J. Regulation of glucose metabolism by 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatases in cancer. *Exp Mol Pathol* 2009; 86(3): 174-179.
- Yeh CY, Vadhwana B, Verkhatsky A, and Rodríguez JJ. Early astrocytic atrophy in the entorhinal cortex of a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. *ASN Neuro* 2011; 3(5): e00071.
- Yoshiyama Y, Uryu K, Higuchi M, Longhi L, Hoover R, Fujimoto S, McIntosh T, Lee VM, Trojanowski JQ. Enhanced neurofibrillary tangle formation, cerebral atrophy, and cognitive deficits induced by repetitive mild brain injury in a transgenic tauopathy mouse model. *J Neurotrauma* 2005; 22(10): 1134-1141.



Yousuf S, Atif F, Keshewani V, Agrawal SK. Neuroprotective effects of Tacrolimus (FK-506) and Cyclosporin (CsA) in oxidative injury. *Brain Behav* 2011; 1(2): 87–94.

Zhang S, Smailagic N, Hyde C, Noel-Storr AH, Takwoingi Y, McShane R, Feng J. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;doi: 10.1002/14651858.CD010386.



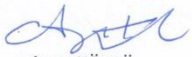
## EKLER

### EK 1- Etik Kurul Onayı

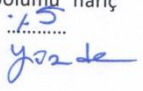
		<b>T.C.</b> <b>ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ</b> <b>Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü</b>			
<b>Öğrencinin</b>					
<b>Adı Soyadı</b>	:	Ayşe Köylü			
<b>Numarası</b>	:	12220026			
<b>Anabilim Dalı</b>	:	Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı			
<b>Tez Konusu</b>	:	Alzheimer Hastalığı'nda Tacrolimus'un (FK506) Sıçan Hipokampusu Üzerine Etkilerinin Davranış Modeli Ve Histomorfometrik Yöntemler İle Araştırılması			

**BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ**

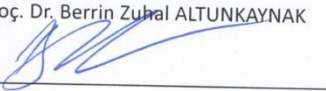
Hazırladığım *Yüksek Lisans* tezimin, proje aşamasından sonuçlanmasına kadarki süreçte bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet ettiğimi, tez içindeki tüm bilgileri bilimsel ahlak ve gelenek çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak yaptığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu, ayrıca Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 22/05/2015 tarih ve 2015/303 sayılı kararı uyarınca tez savunma sınavından önce, tez danışmanım tarafından tezin "kaynaklar" bölümü hariç tamamının intihal kontrol programında (Turnitin) tarandığını, intihal kontrol programı raporlarında benzerlik endeksinin %30'u aşmadığını, taahhüt ederim.

06 /12/2016  
  
Ayşe KÖYLÜ

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE**

Yukarıda adı soyadı, tez konusu yazılı olan, tez danışmanlığını yürüttüğüm öğrencinin tezi tamamlanmış olup, tezin; tez savunma sınavı öncesinde Üniversitemiz Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı'nın "TURNİTİN" programında "kaynaklar" bölümü hariç tamamının tarandığını, intihal kontrol programı raporlarında benzerlik endeksinin 15 (Beş) olduğu tespit edilmiştir. TURNİTİN PROGRAMINDAN alınan rapor ektedir. 

06/12/2016

Doç. Dr. Berrin Zuhra ALTUNKAYNAK  


Kurupelit Kampüsü 55139 ATAKUM / SAMSUN Ayrıntılı bilgi için irtibat:  
Telefon: 0 362 312 19 19 / 6347 Fax: 0 362 45757 63  
e-posta: sagbilen@omu.edu.tr Elektronik Ağ: http://sagbilens.omu.edu.tr

## **ÖZGEÇMİŞ**

**Adı Soyadı:** Ayşe KÖYLÜ

**Doğum Yeri:** Samsun

**Doğum Tarihi:** 03.01.1988

**Medeni Hali:** Bekâr

**Bildiği Yabancı Diller:** İngilizce

**Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):**

**2007-2009:** Gazi Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Biyoloji Öğretmenliği

**2009-2012:** Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Biyoloji Öğretmenliği

**2013-2016:** Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

**Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:**

**E-posta:** ayskoylu@gmail.com