

**SIÇANLARDA OKADAİK ASİT İLE OLUŞTURULAN
NÖRODEJENERASYONA ACA' NIN ETKİSİ**

Murat ÇAKIR

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Halil DÜZOVA
Doktora Tezi-2016**

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIÇANLARDA OKADAİK ASİT İLE OLUŞTURULAN
NÖRODEJENERASYONA
ACA' NIN ETKİSİ**

Murat ÇAKIR

**Fizyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Halil DÜZOVA**

Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından 2015/105 Proje numarası ile desteklenmiştir.


**MALATYA
2016**

Varlığıyla hayata anlam katan Ođluma...

KABUL VE ONAY SAYFASI


İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan; **Murat ÇAKIR**'ın "**Sıçanlarda Okadaik Asit ile Oluşturulan Nörodejenerasyona ACA'nın Etkisi**" konulu bu çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

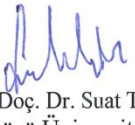
Tez Savunma Tarihi 01/09/2016


Prof. Dr. Cemil TÜMER
Mustafa Kemal Üniversitesi
Jüri Başkanı


Doç. Dr. Hakkı Murat BİLGİN
Dicle Üniversitesi
Üye


Doç. Hani DÜZOVA
İnönü Üniversitesi
Tez Danışmanı
Üye


Yrd. Doç. Dr. Aslı TAŞLIDERE
İnönü Üniversitesi
Üye


Yrd. Doç. Dr. Suat TEKİN
İnönü Üniversitesi
Üye

ONAY

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/....../2016 tarih ve 2016/..... sayılı Kararıyla da uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

ÖZET	vii
ABSTRACT.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Alzheimer Hastalığı.....	3
2.1.1. Risk Faktörleri.....	4
2.1.1.1. Yaş.....	4
2.1.1.2. Cinsiyet.....	4
2.1.1.3. Genetik Faktörler.....	5
2.1.1.4. Kafa Travması	6
2.1.1.5. Kardiyovasküler ve Metabolik Hastalıklar	6
2.1.2. Alzheimer Hastalığının Patolojisi	7
2.1.2.1. Alzheimer Hastalığı ve Tau Hiperfosforilasyonu	7
2.1.2.2. Alzheimer Hastalığı ve Oksidatif Stres	9
2.1.2.3. Alzheimer Hastalığı ve Nöroinflamasyon.....	10
2.1.2.4. Amiloid Beta Oluşumu.....	11
2.1.2.5. Yaşlanma Hipotezi	12
2.1.2.6. Kolinergic Hipotez.....	13
2.1.2.7. Glutamaterjik Nöronlar	13
2.1.2.8. Prion hipotezi	14
2.1.3. Alzheimer Hastalığının Tanısı	14
2.1.4. Alzheimer Hastalığının Belirtileri	15
2.1.4.1. Bilişsel bozukluk	15
2.1.4.2. Depresyon.....	15

2.1.4.3.	Ajitasyon ve Agresyon	16
2.1.4.4.	Psikoz	16
2.1.5.	Alzheimer Hastalığının Tedavisi.....	17
2.1.5.1.	Memantin	17
2.1.5.2.	Asetilkolinesteraz İnhibitörleri.....	18
2.1.6.	Alzheimer Hastalığı Deney modelleri.....	19
2.1.6.1.	Yaşlı Hayvan Modelleri	19
2.1.6.2.	Kolinerjik Fonksiyon Bozukluğu Esasına Dayanan Modeller	20
2.1.6.3.	Beyin İçi Amiloid Beta Uygulanması	20
2.1.6.4.	İntraserebroventriküler Streptozotocin Uygulanması	20
2.1.6.5.	Kolşisin ile Oluşturulan Model	21
2.1.6.6.	Ağır metallerin uygulanması ile oluşturulan model.....	21
2.1.6.7.	Transgenik Modeller	21
2.1.6.8.	Okadaik Asit ve Okadaik Asit ile Oluşturulan Alzheimer Modeli	22
2.1.6.9.	Okadaik Asitin Nörodejeneratif Etkisi	23
2.2.	N-(p-amylcinnamoyl) Anthranilik Asit.....	24
2.3.	Fosfolipaz A ₂ ve Nörodejenerasyon.....	26
2.4.	TRPM2 Kanalları ve Nörodejenarasyon	26
3.	MATERYAL VE METOT.....	30
3.1.	Deney Hayvanları.....	30
3.2.	Deney Grupları.....	30
3.3.	Deneyin uygulanması.....	31
3.3.1.	Yapay Beyin Omurilik Sıvısının Hazırlanması.....	31
3.3.2.	Ventrikül Koordinatlarının Belirlenmesi	31
3.3.3.	Hayvanların Stereotaksik Alete Yerleştirilmesi	34
3.3.4.	Morris Su Tankı Testi	35
3.3.5.	Morris Su Tankı Platformuna Sıçanların Alıştırılma Süreci.....	36

3.3.6.	Dokuların Alınması	37
3.4.	Histolojik Analiz	37
3.5.	Dokuların Biyokimyasal Analizlere Hazırlanması	38
3.5.1.	SOD Enzim Aktivitesi Ölçümü.....	38
3.5.2.	Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivitesi Ölçümü	39
3.5.3.	Glutasyon ölçümü	39
3.5.4.	Malondialdehit Ölçümü.....	40
3.5.5.	Protein Ölçümü	40
3.5.6.	Tümör Nekroz Faktör Alfa ve İnterlökin Bir Beta Ölçümü.....	40
3.6.	İstatistiksel Analiz	42
4.	BULGULAR	43
4.1.	Deney Gruplarının Vücut Ağırlıkları	43
4.2.	Histopatolojik Değerlendirme	43
4.2.1.	Kontrol Grubu Histolojik Değerlendirme	43
4.2.2.	Sham Grubu Histolojik Değerlendirme.....	47
4.2.3.	ACA Grubu Histolojik Değerlendirme	49
4.2.4.	OKA GrubuHistolojik Değerlendirme	52
4.2.5.	OCA+ACA Grubu Histolojik Değerlendirme.....	54
4.3.	Morris Su Labirenti Deneyi Sonuçları	58
4.3.1.	Morris Su Labirenti Testinde 1. Güne Göre Diğer Günlerin Karşılaştırması	58
4.3.2.	Morris Su Labirenti Testi Sonuçlarının Gruplar Arası Karşılaştırılması	61
4.4.	Oksidatif Stres Analizi Sonuçları	64
4.4.1.	Grupların Korteks Dokusu MDA Seviyelerinin Karşılaştırması	64
4.4.2.	Grupların Hipokampus Dokusu MDA Seviyelerinin Karşılaştırılması	65
4.4.3.	Grupların Korteks Dokusu GSH Seviyelerinin Karşılaştırması.....	65
4.4.4.	Grupların Hipokampus Dokusu GSH Seviyelerinin Karşılaştırması.....	66
4.4.5.	Grupların Korteks Dokusu GSH-PX Enzim Aktivasyonu Seviyelerinin Karşılaştırması.....	67

4.4.6.	Grupların Hipokampus Dokusu GSH-PX Enzim Aktivasyonu Seviyelerinin Karşılaştırması.....	68
4.4.7.	Grupların Korteks Dokusu SOD Enzim Aktivasyonu Seviyelerinin Karşılaştırması.....	68
4.4.8.	Grupların Hipokampus Dokusu SOD Enzim Aktivasyonu Seviyelerinin Karşılaştırması.....	69
4.5.	Korteks ve Hipokampus Dokusu TNF- α ve IL-1 β Seviyeleri	71
4.5.1.	Grupların Korteks Dokusu TNF- α Seviyelerinin Karşılaştırması.....	71
4.5.2.	Grupların Hipokampus Dokusu TNF- α Seviyelerinin Karşılaştırması	72
4.5.3.	Grupların Korteks Dokusu IL-1 β Seviyelerinin Karşılaştırması.....	73
4.5.4.2.	Grupların Hipokampus Dokusu IL-1 β Seviyelerinin Karşılaştırması.....	74
5.	TARTIŞMA.....	75
7.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	82
	KAYNAKLAR	84
	EK.1. Özgeçmiş	96
	EK 2. Etik Kurul Onayı	99

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmama 2015/105 no'lu proje ile maddi destek sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi' ne.

Tez araştırmamı destekleyen, katkı ve yardımlarını esirgemeyen danışmanım Sayın Doç. Dr. Halil DÜZOVA' ya, tez çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji öğretim üyeleri Prof. Dr. Nigar VARDI ve Yrd. Doç. Dr. Aslı TAŞLIDERE' ye, Bezmialem Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Elif TAŞLIDERE' ye, Fizyoloji anabilimdalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Sedat YILDIZ' a, Prof. Dr. Süleyman SANDAL' a, tez deneylerinde laboratuvar desteğini esirgemeyen İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ' e ve İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji öğretim üyesi Prof. Dr. Hakan PARLAKPINAR' a, tez çalışmamın istatistiksel analizlerinin yapımında katkı ve yardımlarını esirgemeyen Tıp Bilişimi ve Biyoistatistik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Saim YOLOĞLU' na, tez deneyleri sırasında katkı ve yardımlarını esirgemeyen İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Suat TEKİN' e, Fizyoloji Anabilim Dalı araştıma görevlisi Tuba TAPAN' a, Doktora öğrencisi Gül Büşra KAYA' ya, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü doktora öğrencisi Berna ÖZYAZGAN ve yüksek lisans öğrencisi Merve DURHAN' a

Hayatım boyunca sevgisini ve sabrını esirgemeyen aileme, tez çalışmalarım süresince gösterdiği anlayış ve desteğinden dolayı sevgili eşim Ümmühan ÇAKIR' a,

Sonsuz sevgi ve saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

Murat ÇAKIR

ÖZET

Sıçanlarda Okadaik Asit ile Oluşturulan Nörodejenerasyona ACA' nın Etkisi

Amaç: Son zamanlarda yapılan çalışmalarda Transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) ve Fosfolipaz A2 (PLA₂) inhibitörlerinin nöronlar üzerinde koruyucu etkisi olduğu anlaşılmıştır. Bu çalışmada sıçanlarda Okadaik asit (OKA) ile oluşturulan nörodejenerasyon modelinde TRPM2 ve PLA₂ inhibitörü N-(p-amylicinnamoyl) anthranilik asit (ACA)'nın koruyucu etkisini belirlemeyi amaçladık.

Materyal ve Metot: Bu çalışmada 50 adet erkek Sprague-Dawley sıçan randomize olarak 5 gruba bölündü (n=10). 1) Kontrol, 2) Sham: icv olarak yBOS ve ip olarak çözücü enjeksiyonu yapıldı. 3) ACA: 13 gün boyunca ip olarak 25 mg/kg/gün ACA enjeksiyonu yapıldı. 4) OKA: 10 µl yBOS' ta çözünen okadaik asit (200 ng) icv bilateral olarak enjekte edildi. 5) OKA+ACA: 10 µl yBOS' ta çözünen okadaik asit (200 ng) icv bilateral olarak enjekte edildi. 13 gün boyunca ip 25 mg/kg/gün ACA enjeksiyonu yapıldı. 13 günün sonunda sıçanlara Morris su labirenti testi uygulandı. Korteks ve hipokampus dokusunda histopatolojik bulgular, SOD, GSH-PX enzim aktivitesi ve MDA, GSH, TNF- α , IL-1 β seviyeleri ölçüldü.

Bulgular: OKA grubunda platform bulma süresi ve mesafesi kontrol, sham, ACA ve OKA+ACA gruplarına göre uzadı (P< 0.05). OKA grubunda diğer gruplara göre MDA, TNF- α seviyesi artarken SOD, GSH-PX enzim aktivasyonu ve GSH seviyesi azaldı (P< 0.05). OKA+ACA grubunda OKA grubuna göre MDA, TNF- α seviyesi azalırken; SOD, GSH-PX enzim aktivasyonu ve GSH seviyesi arttı. OKA+ACA grubunda korteks ve hipokampus bölgelerinde dejenere nöron ve kaspaz-3 pozitif hücre sayısı OKA grubuna göre anlamlı olarak azaldı (P< 0.05).

Sonuç: Okadaik asit ile oluşturulan nörodejenerasyon modelinde, ACA uygulaması oksidatif stresi ve nöroinflamasyonu önleyici etki gösterdi. ACA uygulaması bilişsel fonksiyonlardaki azalmayı ve nörodejenerasyonu önledi.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer Hastalığı, Fosfolipaz A2, N-(p-Amylicinnamoyl) anthranilik Asit (ACA), nörodejenerasyon, Okadaik asit, TRPM2 kanalı

ABSTRACT

The Effect of ACA Induced Okadaic Acid Neurodegeneration in Rats

Aim: Recent studies it has been shown that the TRPM2 and PLA2 inhibitors may have a protective effect on neurons. This study was aimed to investigate the protective effect of TRPM2 and PLA₂ inhibitor N-(p-amylicinnamoyl)anthranilic acid (ACA) in a neurodegenerative model induced by Okadaic acid (OKA).

Material and Method: Male Sprague-Dawley rats were randomly divided into five group (n=10); 1) control, 2) sham: rats were injected icv with aCSF and treated vehicle for 13 day, 3) ACA: rats were treated with ACA ip 25 mg/kg/day for 13 days, 4) OKA: OKA was dissolved in aCSF and injected icv (200 ng) in a volume of 10 μ l bilaterally and 5) OKA+ACA: rats injected icv with OKA (200 ng) and treated with ACA ip 25 mg/kg/day for 13 days. After 13 days of surgical operations and injections, Morris water maze test was performed. The histopathological finding, SOD, GSH-PX enzyme activation and MDA and GSH, TNF- α , IL-1 β levels in tissues the hippocampus and cerebral cortex were measured.

Results: The latency to platform and distance moved of OKA group rats were significantly increased in comparison to control, sham and ACA, OKA+ACA groups. In while the MDA, TNF- α levels of tissues were significantly increased in OKA group; SOD, GSH-PX enzyme activation and GSH levels were decreased compared to all of other groups (P< 0.05). OKA+ACA group comparison to OKA group, increased SOD and GSH-PX enzyme activation and GSH levels, and conversely decreased the levels of MDA, TNF- α . When OKA+ACA rats compared to OKA rats, it was found that numbers of degenerated neurons and caspase 3 positive cells of cortex and hippocampus regions were significantly reduced.

Conclusion: ACA administration prevented to oxidative stress and neuroinflammation of OKA induced neurodegeneration. ACA ameliorated to cognitive decline and neurodegeneration.

Key words: Alzheimer's Disease, Okadaic acid, N-(p-amylicinnamoyl)anthranilic acid (ACA), Neurodegeneration, TRPM2 channel, Phospholipases A₂

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A β	:Amiloid beta protein
ACh	: Asetilkolin
AChE	:Asetilkolinesteraz
ACA	: N-(p-amylcinnamoyl) anthranilik asit
AH	: Alzheimer hastalığı
ApoE	: Apolipoprotein E
APP	: Amiloid prekürsör protein
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
BuChE	: Butirilkolinesteraz
ChAT	: Asetilkolin tranferaz
CDK5	: Cyclin-dependent kinase 5
DSM	: Tanısal ve Sayımsal El Kitabı
ERK2	: Extracellular signal regulated kinase
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
PLA2	: Fosfolipaz A2
GSH	: Redükte glutatyon
GSSG	: Okside glutatyon
GSH-PX	: Glutatyon peroksidaz
GSK3	: Glikojen sentaz kinaz 3
GR	: Glutatyon redüktaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
IFN- γ	: İnterferon gamma
IL-1 β	: İnterlökin 1 beta
IL-6	: İnterlökin 6
IL-18	: İnterlökin 18
IL-17A	: İnterlökin 17 A
İcv	: İntraserebroventriküler
İp	: İnteraperitoneal

iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
LTP	: Uzun süreli potansiyalizasyon
MARK	: Microtubule-affinity-regulating kinase
MDA	: Malondialdehit
MSS	: Merkezi sinir sistemi
NAD	: Nikodinamid adenin dinükleotid
NBT	: Nitrobluetetrazolium
NFY	: Nörofibriler yumak
NMDA	: N-metil-D- aspartat
PHF	: Çift sarmal helikal filamentler
PP1	: Protein fosfotaz 1
PP2A	: Protein fosfotaz 2A
PP2B	: Protein fosfotaz 2B
PP2C	: Protein fosfotaz 2C
PSEN1	: Presenilin 1
PSEN2	: Presenilin 2
PGE2	: Prostaglandin E2
ROS	: Reaktif oksijen türleri
OKA	: Okadaik asit
COX ₂	: Siklooksijenaz-2
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOR	: Serbest oksijen radikali
O ⁻	: Süperoksit radikali
TNF- α	: Tümör nekrozis faktör α
TRMP2	: Transient receptor potential melastatin 2
XO	: Ksantin oksidaz
yBOS	: Yapay beyin omurilik sıvısı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 2.1.	Cinsiyete göre görülen AH insidansı (Janicki ve ark. değiştirilerek)	5
Şekil 2.2.	Genetik olarak görülen AH tipleri (Bagyinszky ve ark değiştirilerek).....	6
Şekil 2.3.	Nörofibriler yumak oluşumunun mekanizması (Liu ve ark. değiştirilerek)	9
Şekil 2.4.	Non-amiloidojenik ve amiloidojenik yolak (Read ve ark. değiştirilerek)	12
Şekil 2.5.	İcv okadaik asit uygulamasıyla AH patogenezi arasındaki benzerlik (Kamat ve ark. Değiştirilerek)	24
Şekil 2.6.	N-(p-amylicinnamoyl) anthranilik asit'in molekül yapısı	25
Şekil 2.7.	TRPM2 kanalının moleküler yapısı (Clapham ve ark. değiştirilerek).....	29
Şekil 3.1.	Sıçan beyin atlasına göre lateral ventrikül koordinatları	32
Şekil 3.2.	Deneyde kullanılan stereotaksik alet, matkap ve soğuk ışık kaynağı	32
Şekil 3.3.	Kafa derisinin göz hizasından orta hattan kesilmesi.....	33
Şekil 3.4.	Hamilton enjektörü ile icv enjeksiyon işlemi	33
Şekil 3.5.	Kafa derisinin dikilmesi.....	34
Şekil 3.6.	Morris su tankı ve test odası	36
Şekil 3.7.	TNF- α standart hazırlanması	41
Şekil 3.8.	IL-1 β standart hazırlanması	42
Şekil 4.1.	Kontrol grubu: Serebral korteksin normal histolojik görünümü ve lamina molekular tabakası (yıldız) H-E; X10	44
Şekil 4.2.	Kontrol grubu: Kortekste nöronların arasında üçgen şeklindeki büyük gövdeleriyle tanınan piramidal nöronlar (oklar). H-E; X40	45
Şekil 4.3.	Kontrol grubu: Hipokampusun normal histolojik görünümü H-E; X40.....	45
Şekil 4.4.	Kontrol grubu: Kortekste pozitif hücreye rastlanmadı. Kaspaz-3; X40	46
Şekil 4.5.	Kontrol grubu: Hipokampusde pozitif hücreye rastlanmadı. Kaspaz-3; X40.....	46
Şekil 4.6.	Sham grubu: Kortekste nöronların arasında üçgen şeklindeki büyük gövdeleriyle tanınan piramidal nöronlar (oklar). H-E; X40	47
Şekil 4.7.	Sham grubu: hipokampusun normal histolojik görünümü (oklar). H-E; X40.....	48

Şekil 4.8. Sham grubu: Korteksde pozitif hücreye rastlanmadı kaspaz-3; X40.....	48
Şekil 4.9. Sham grubu: Hipokampüsde pozitif hücreye rastlanmadı Kaspaz-3; X40.....	49
Şekil 4.10. ACA grubu: Korteksde nöronların arasında üçgen şeklindeki büyük gövdeleriyle tanınan piramidal nöronlar (oklar). H-E; X40	50
Şekil 4.11. ACA grubu: hipokampusun normal histolojik görünümü (oklar). H-E; X40.....	50
Şekil 4.12. ACA grubu: Korteksde pozitif hücreye rastlanmadı Kaspaz-3; X40.	51
Şekil 4.13. ACA grubu: Hipokampusda pozitif hücreye rastlanmadı Kaspaz-3; X40.....	51
Şekil 4.14. OKA grubu. Korteksde sınırları düzensiz, sitoplazması asidofil, nükleusu heterokromatik ve büzüşmüş dejenere nöronların görünümü (oklar). H-E; X40.....	52
Şekil 4.15. OKA grubu. Hipokampüsde sınırları düzensiz, sitoplazması asidofil, nükleusu heterokromatik ve büzüşmüş dejenere nöronların görünümü (oklar). H-E; X40.	53
Şekil 4.16. OKA grubu. Korteksde kaspaz 3 (+) hücreler izleniyor (oklar). Kaspaz 3; X40.....	53
Şekil 4.17. OKA grubu. Hipokampusda kaspaz 3 (+) hücreler izleniyor (oklar). Kaspaz 3; X40.....	54
Şekil 4.18. OKA+ACA grubu. Korteksde sağlam nöronların arasında (kalın oklar) sınırları düzensiz, sitoplazması asidofil, nükleusu heterokromatik ve büzüşmüş dejenere nöronların görünümü (oklar). H-E; X40.	55
Şekil 4.19. OKA+ACA grubu. Hipokampusda sınırları düzensiz, sitoplazması asidofil, nükleusu heterokromatik ve büzüşmüş dejenere nöronların görünümü (oklar). H-E; X40.....	56
Şekil 4.20. OKA+ACA grubu. Korteksde kaspaz 3 (+) hücreler izleniyor (oklar). Kaspaz 3; X40.....	56
Şekil 4.21. OKA+ACA grubu. Hipokampusda kaspaz 3 (+) hücreler izleniyor (oklar). Kaspaz-3; X40.....	57
Şekil 4.22. Grupların platformu bulma süresinin 1. Güne göre diğer günlerinkarşılaştırması	59
Şekil 4.23. Grupların platformu bulma mesafesinin 1. Güne göre diğer günlerin karşılaştırması	60

Şekil 4.24. Tüm grupların günlere göre platformu bulma sürelerinin karşılaştırılması.	61
Şekil 4.25. Tüm grupların platformu bulma mesafelerinin günlere göre karşılaştırılması.	62
Şekil 4.26. Korteks dokusu MDA seviyeleri.	64
Şekil 4.27. Hipokampus dokusu MDA seviyeleri.....	65
Şekil 4.28. Korteks dokusu GSH seviyeleri.....	66
Şekil 4.29. Hipokampus dokusu GSH seviyeleri.....	67
Şekil 4.30. Korteks dokusu GSH-PX enzim aktiviteleri.....	67
Şekil 4.31. Hipokampus dokusu GSH-PX enzim aktiviteleri.....	68
Şekil 4.32. Korteks dokusu SOD enzim aktiviteleri.	69
Şekil 4.33. Hipokampus dokusu SOD enzim aktiviteleri.	70
Şekil 4.34. Korteks dokusu TNF- α seviyeleri. a, b ve c birbirinden farklı.	72
Şekil 4.35. Hipokampus dokusu TNF- α seviyeleri	73
Şekil 4.36. Korteks dokusu IL-1 β seviyeleri.....	73
Şekil 4.37. Hipokampus dokusu IL-1 β seviyeleri.....	74

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 2.1. Alzheimer tipi demans için DSM IV tanı kriterleri	17
Tablo 3.1. Yapay beyin omurilik sıvısının içeriği.....	31
Tablo 4.1. Deney gruplarının 1. Gün, 7. Gün ve 13. Gün vucüt ağırlıklarının karşılaştırması	43
Tablo 4.2. Tüm grupların korteks ve hipokampus dejenere nöron sayıları ve kaspaz (+) hücre sayıları.	57
Tablo 4.3. Morris su labirenti testinde platformu bulma sürelerinin 1. güne göre diğer günlerin karşılaştırılması.	58
Tablo 4.4. Morris su labirenti testinde platformu bulma mesafelerinin 1. güne göre diğer günlerin karşılaştırılması.	59
Tablo 4.5. Morris su labirenti testinde grupların günlere platformu bulma sürelerinin karşılaştırılması.	62
Tablo 4.6. Morris su labirenti testinde grupların günlere göre platformu bulma mesafelerinin karşılaştırılması.	63
Tablo 4.7. Tüm grupların korteks MDA, GSH seviyeleri ve GSH-PX, SOD enzim aktiviteleri.	70
Tablo 4.8. Tüm grupların Hipokampus MDA, GSH seviyeleri ve GSH-PX, SOD enzim aktiviteleri.	71
Tablo 4.9. Tüm grupların korteks ve hipokampus dokuları TNF- α ve IL-1 β seviyeleri.	74

1. GİRİŞ

Yaşam kalitesinin artması ve sağlık alanında görülen gelişmeler sayesinde tüm Dünya' da olduğu gibi ülkemizde de yaşlı nüfusu gittikçe artmaktadır. Yaşlı nüfusun artması nörodejeneratif hastalıkların görülme sıklığındaki artışı beraberinde getirmektedir. Özellikle 65 yaş üstü bireylerde daha sık görülen Alzheimer hastalığı (AH) demansın en sık görülen nedenidir. Günümüzde Alzheimerlı hasta sayısı yaklaşık 26 milyon iken bu sayının 2050 yılında 100 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir. İlerleyici ve geriye dönüşsüz olarak bilişsel fonksiyonlarda kayıpla karakterize olan bu hastalık; hastaların özbakımlarını, günlük yaşamlarını etkilemesi ve yapılan sağlık harcamalarıyla önemli bir toplumsal sorundur (1, 2). NMDA (N-methyl- D-aspartate) reseptör antagonistleri, kolinesteraz inhibitörleri gibi AH' nın tedavisine yönelik çeşitli uygulamalar olsa da, bu tedavi girişimleri AH'da ilerleyici nöron kayıplarını önleyemez ve daha çok semptomatik etki sağlar (3).

Hastalığın patofizyolojisinde bilişsel fonksiyonlardaki kayba; nörofibriler yumak (NFY) ve amiloid beta ($A\beta$) plak oluşumu, nöroinflamasyon, oksidatif stres ve kolinerjik nöron kaybı eşlik etmektedir (4). Yapılan çalışmalarda AH'da bilişsel bozuklukla NFY miktarı arasında korelasyon bulunurken, $A\beta$ plak miktarı ile korelasyon bulunmamaktadır. AH olanların beyinlerinde NFY oluşumunun temel nedeni anormal tau hiperfosforilizasyonudur.

Tau mikrotübüllerle ilişkili bir proteindir ve majör biyolojik fonksiyonu mikrotübüllerin stabilitesinin korunmasıdır. Tau' nun biyolojik aktivitesi fosforillenme derecesi ile düzenlenir. Normalde tau 2-3 tane molekül ile fosforillenir. Hiperfosforillendiğinde mikrotübül düzeneği olumsuz olarak değişir. İn vivo yapılan çalışmalarla tau'nun nörodejenerasyonda önemli rolü olduğunu ortaya konmuştur. Tau patolojisi ve bunun sonucunda oluşan nörofibriler dejenerasyon AH oluşumunda önde gelen mekanizmadır (5).

Okadaik asit (OKA) selektif ve potent serine/treonin protein fosfataz 1 (PP1) ve protein fosfataz 2A (PP2A) inhibitörüdür. İn vivo ve in vitro tau hiperfosforilizasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (6). Birçok deneysel çalışmada okadaik asidin intraserebroventriküler (icv) uygulaması ile AH'a benzer şekilde tau hiperfosforilizasyonunun gerçekleştiği gösterilmiştir (7). İcv OKA uygulanan sıçanlarda bellek oluşumunda bozulma ve beyinde nöroinflamasyon, oksidatif stres geliştiği ve APP oluşumunda artma olduğu gösterilmiştir (8-10).

N-(p-amylcinnamoyl) anthranilik asitin (ACA), transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) kanallarını ve fosfolipaz A2' yi (PLA2) inhibe ettiği gösterilmiştir (11). Yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda PLA₂ inhibisyonunun total ve fosforile tau proteini seviyesini azalttığı ortaya konmuştur (12). PLA₂ aktivasyonu nöroinflamasyonun altında yatan yolaktır. Birçok nörodejeneratif hastalığın patolojisinde de bu yolak yatmaktadır (13). PLA₂ inhibitörlerinin A β ile oluşan ROS üretimini azalttığı gösterilmiştir. Astrositlerin inflamatuvar sitokin salınımıyla birlikte prostaglandin E2 (PGE2) üretimine, siklooksijenaz-2 (COX₂) artışına neden olduğu ve bu sürecin PLA₂ sinyal yolağıyla gerçekleştiği anlaşılmıştır. Çeşitli nöroinflamatuvar süreçlerde de PLA₂ gen ekspresyonunu arttığı gösterilmiş ve AH' da hipokampusda PLA₂ gen ekspresyonunu artığı bildirilmiştir (14).

Serbest oksijen radikalleri (SOR), TRPM2 kanallarını aktive eder. SOR üretiminin de oksidatif stres, inflamasyon ve hücre ölümüyle doğrudan ilişkisi vardır. En çok beyinde eksprese edilen TRPM2 kanalı; inme, iskemi ve nörodejenerasyon gibi durumların patofizyolojisinde olduğu gibi çeşitli mekanizmalarla inflamasyon, sitokin salınımını ve nöron ölümü gibi süreçlerde de rol oynar (15).

PLA₂ ve TRPM2 kanallarının nörodejeneratif süreçlerle olan ilişkisi AH' nın patogenezinde rolü olabileceğini düşündürmektedir. Bu düşünceden hareketle bu tez çalışmamızda AH' nın patogeneziyle benzerlik gösteren icv OKA uygulamasıyla oluşan nörodejenerasyonda PLA₂ ve TRPM2 inhibitörü ACA' nın koruyucu etkisi varmı sorusunu cevaplamaya çalıştık.

2. GENEL BİLGİLER

'Demans' kelimesi köken olarak Latince zihin anlamına gelen "mens" kelimesinden türemiş olan zihnin yitilmesi anlamındaki "demens" sözcüğüyle ifade edilir. Dilimizde yaygın şekliyle "demans" olarak isimlendirilir. Latince'deki kullanım biçimiyle "yerleşmiş, varolan, edinilmiş olan zihnin, sonradan yitilmesi" anlamını taşımaktadır (16).

Demans yaşla birlikte prevalansı artan bir hastalıktır. 65 yaşından sonra her 5 yılda hastalığın görülme sıklığı ikiye katlanır. 75 yaşındaki bireylerde görülme sıklığı % 2-3 iken 85 üstü bireylerde % 20-25' tir. Dünya sağlık örgütünün tahminlerine göre 2025 yılında 60 yaş üzeri bireylerde demans sıklığı % 3,25 olacağı düşünülürken, Başka tahminlere göre 2020 yılında dünyadaki vaka sayısı 42 milyon, 2040 yılında iki katına çıkarak 81 milyon olması beklenmektedir. Batı ülkelerinde toplam demansın % 60' nı AH oluşturmaktadır. Vasküler demans ise % 20' sini oluşturmaktadır. 2001 yılında tüm demans hastalarının % 60,1' i gelişmiş ülkelerde bulunurken bu rakamın 2040 yılında % 70,2' ye çıkacağı tahmin edilmektedir (17). Günümüzde her 7 saniyede bir AH vakası kayıt altına alınmaktadır.

2.1. Alzheimer Hastalığı

AH' nin patofizyolojik bulguları olarak kabul edilen A β plakları ve NFY ilk defa 1906 yılında alman hekim Alois Alzheimer tarafından postmortem beyinde gözlemlenmiştir. Öldüğünde 51 yaşında olan ve bir psikiyatri kliniğinde yatan Auguste D. isimli hastada 5 yıl boyunca ilerleyici hafıza kaybı, halüsinasyon, delüzyon, konuşma ve davranış bozuklukları gözlemlenmiştir. Öldükten sonra hastanın beyin dokusunun mikroskopik incelemesinde görülen NFY ve senil plaklar hastalığın kesin tanı koydurucu patolojik belirleyicileri olarak kabul edilmiştir. Hastalık o günlerden bu yana Auguste D.'yi izleyen ekipte yer alan Alois Alzheimer'ın adıyla anılmaya başlanmıştır. AH o yıllarda çok nadir görülen bir hastalık olduğu ve sadece presenil yaş grubunda görüldüğü düşünülmüştür (18).

Hastalığın nedenini ve patolojisini açıklamaya yönelik elde edilen bilgiler ışığında çeşitli hipotezler ileri sürülmüştür. Tıp alanında tüm gelişmelere rağmen AH hastalığının kesin tedavisi bulunamamıştır. Uygulanan tedaviler daha çok hastalığın semptomlarına ve ilerlemesini yavaşlatmaya yönelik tedavilerdir. Hasta yaşarken AH'

nın kesin tanısını koymayı mümkün kılacak yöntem bulunamamıştır. Kesin tanı için beyin dokusunun patolojik olarak incelenmesi gerekmektedir (19).

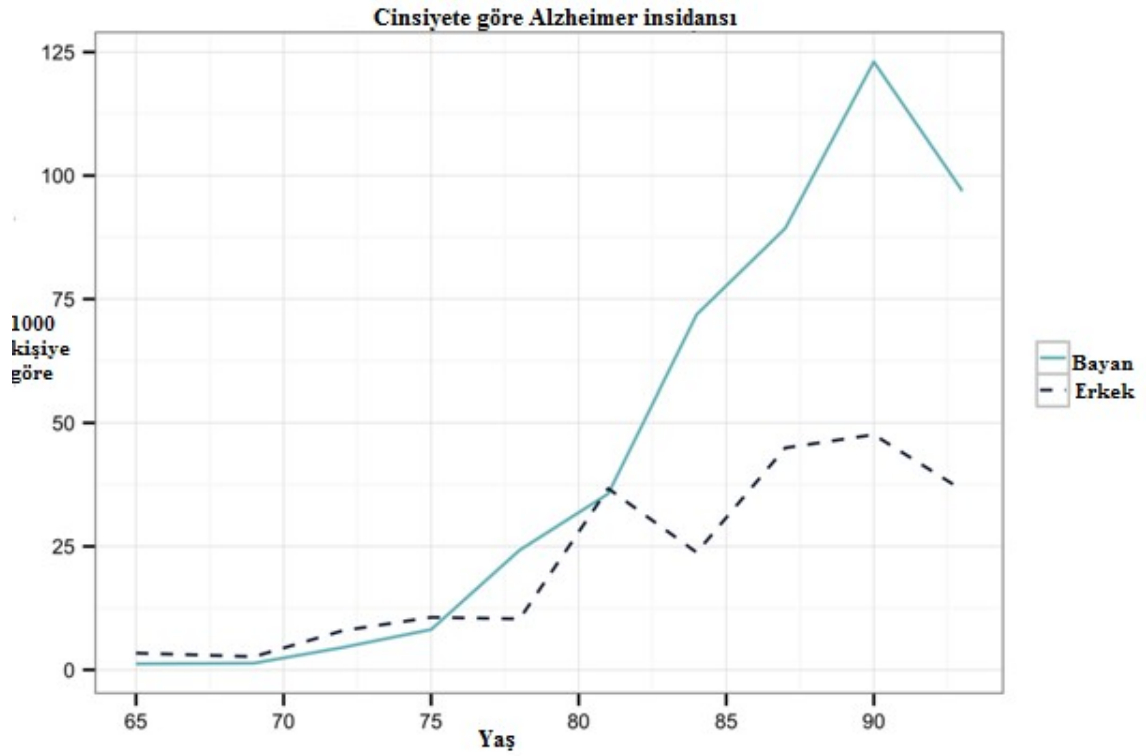
2.1.1. Risk Faktörleri

2.1.1.1. Yaş

Yaş AH için en büyük risk faktörüdür. Yirminci yüzyıl ile yirmibirinci yüzyıl arasında dünyada ortalama yaşam süresi ve yaşlı nüfus oranı önemli şekilde artış göstermiştir. 2050 yılında yaşlı nüfusun genç nüfusu geçmesi beklenmektedir. Dünya’da 2015 ve 2030 yılları arasında 60 yaş üzeri kişi sayısının % 56 oranında artması beklenirken 2050 yılında her 5 kişiden birinin 60 yaş ve üzeri bireylerden oluşacağı tahmin edilmektedir. Günümüzde Kuzey Amerika ve Avrupa’da 80 yaş ve üzeri kişilerin oranı % 3’ tür. Yaşlanma sürecinde beyinde AH oluşumunu destekleyen bir takım değişiklikler meydana gelir. Bunlar arasında glikoz metabolizmasının azalması, mitokondriyal disfonksiyon, inflamatuvar reaksiyonlar, A β oluşumu, kolesterol homeostasisinin bozulması, beyinde beyaz madde dejenerasyonu ve tamir mekanizmalarının azalması sayılabilir (20).

2.1.1.2. Cinsiyet

Cinsiyet farklılığı ile AH arasındaki ilişki konusunda farklı görüşler var olsa da her iki cinsiyetin AH’ dan farklı şekilde etkilendiğine dair veriler mevcuttur. Kadınlarda AH’ nın görülme sıklığı erkeklerden fazladır (Şekil 2.1). Ortalama hayatta kalım sürelerinin kadınlarda daha yüksek olduğu dikkate alınırsa, AH görülme sıklığının kadınlarda fazla olmasının bununla ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Dünyada ortalama olarak kadınların ortalama yaşam süreleri erkeklerden 4,5 yaş daha fazladır (21). Aynı zamanda östrojenin nöroprotektif etkisi olduğu birçok çalışmada ortaya konmuştur. Östrojen hormonunu kolinerjik nöronlar üzerinde koruyucu etkisi olduğu ve kolinerjik aktiviteyi artırdığı farklı çalışmalarda ortaya konmuştur. Östrogen ile birlikte progesteron hormonu replasmanının sözel hafıza üzerinde pozitif etkisi bulunmuştur (22).

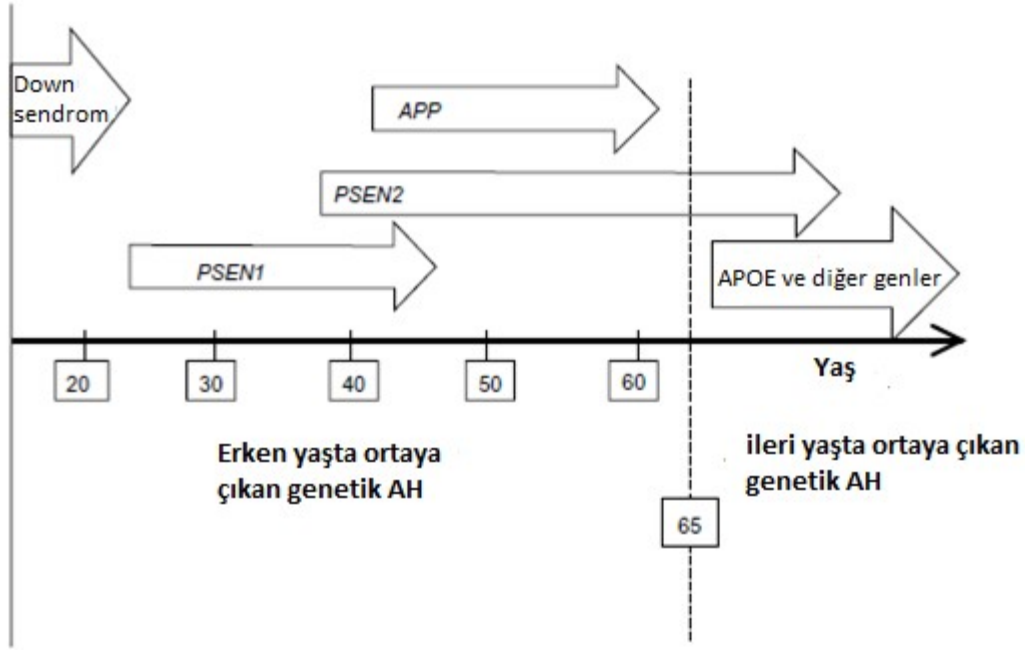


Şekil 2.1. Cinsiyete göre görülen AH insidansı (Janicki ve ark. Değiştirilerek) (22).

2.1.1.3. Genetik Faktörler

Ailesel AH tüm AH vakalarının % 5-10' nunu kapsar. 65 yaş altında görülen 3 genetik Alzheimer tipi mevcuttur (Şekil 2.2). Amiloid prekürsör protein (APP), presenilin 1 (PSEN 1) ve presenilin 2 (PSEN 2) genlerindeki mutasyonlar A β -40 ve A β -42 üretiminde değişiklik, nöronlarda apoptoz ve demansla sonuçlanabilir. APP geni 21. kromozomda bulunmaktadır. Bununla ilişkili olarak da Down sendromunda AH' da görülen patolojiler (amiloid plaklar, nörofibriler yumak) görülebilir. PSEN 1 ve PSEN 2 % 67 homoloji gösteren transmembran proteinlerdir. PSEN 1 mutasyonları en çok görülen erken yaşta ortaya çıkan genetik Alzheimer tipidir (yaklaşık % 30-70). PSEN 1 mutasyonu olanlarda 40-50 yaşlarında, PSEN 2 mutasyonu olanlarda 40-75 yaşlarda AH belirtileri ortaya çıkar.

Geç yaşta ortaya çıkan genetik AH apolipoprotein E (ApoE) genindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkar. ApoE beyinde major kolesterol taşıyıcısıdır. Hücre yüzeyindeki çeşitli reseptörlere (lipid transportu, nöronal sinyal, glikoz metabolizması, mitokondriyal fonksiyon ile ilgili) bağlanır. ApoE, A β ' ya bağlanır ve A β klirensinde rol oynar. Mutasyonlarında nörodejenerasyon ve nöronal ölüm görülür (23).



Şekil 2.2. Genetik olarak görülen AH tipleri (Bagyinszky ve ark değiştirilerek) (23).

2.1.1.4. Kafa Travması

Farklı derecelerdeki kafa içi travmalar beyinde aylar veya yıllarca devam edebilen beyinde ilerleyici beyaz ve gri madde atrofisi yapabilmektedir. İnsan ve hayvan çalışmalarından elde edilen delillerle kafa travması sonrası beyinde hücre dışı senil plakların kümeleşmesinde ve hücre içi NFY oluşumunda artma olduğu gösterilmiştir. Kafa travması sonrası nöroinflamatuvar yanıt artar. Glial aktivasyon; APP üretiminde ve inflamatuvar mediatörlerin salınımında artışla sonuçlanır. Kafa travmasına bağlı beyin hasarlarında hipoksi de nörodejenerasyona neden olmaktadır. Bütün bunlara ek olarak kronik travmatik ensefalopati olarak isimlendirilen uzun süre küçük çaplı tekrarlayıcı beyin hasarlarına maruz kalan Amerikan futbolu ve buz hokeyi sporu yapanlar ile askeri hizmetlerde çalışan kişilerde çeşitli derecelerde nörodejenerasyon geliştiği ortaya konmuştur (24).

2.1.1.5. Kardiyovasküler ve Metabolik Hastalıklar

Klinik olarak inme demansla ilişkilendirilir ve inme sonrası demans veya vasküler demans olarak isimlendirilir. İnme; amiloid ve tau patolojisinin sonucu olarak nöronal dokuda dejenerasyona neden olur. Hipertansiyonun AH beyinde atrofî, beyaz

madde lezyonları, NFY oluşumu ile ilişkisine dair bilgiler mevcuttur. Tip 2 diyabet birçok organda olduğu gibi beyinde de mikrovasküler bozukluğa neden olur. Tip 2 diabetin beyinde atrofi ve infarkt ile ilişkisi olduğuna dair çalışmalar mevcuttur. Glikozun nöronlar üzerine toksik etkisi vardır. Yüksek glikoz, proteinlerde glikozilizasyona ve oksidatif strese neden olur. Yüksek kolesterol seviyesiyle AH arasında ilişki olduğuna dair çalışmalar mevcuttur. Epidemiyolojik çalışmalarda yüksek kolesterol seviyesinin orta yaş AH riskini artırırken ileri yaş AH riskini artırmadığı bildirilmiştir. Kolesterol taşınmasında rolü olan ApoE genindeki mutasyonların genetik AH için risk oluşturduğu bilinmektedir. Atriyal fibrilasyon ve kalp yetmezliğinin bilişsel fonksiyonlarda azalma ve nörodejenerasyona neden olduğuna dair deliller mevcuttur. Fiziksel egzersizin kardiyovasküler hastalıkları önlediği gibi nöron tamiri, bilişsel fonksiyonlar ve AH oluşumunda koruyucu etkisi vardır (25).

2.1.2. Alzheimer Hastalığının Patolojisi

2.1.2.1. Alzheimer Hastalığı ve Tau Hiperfosforilizasyonu

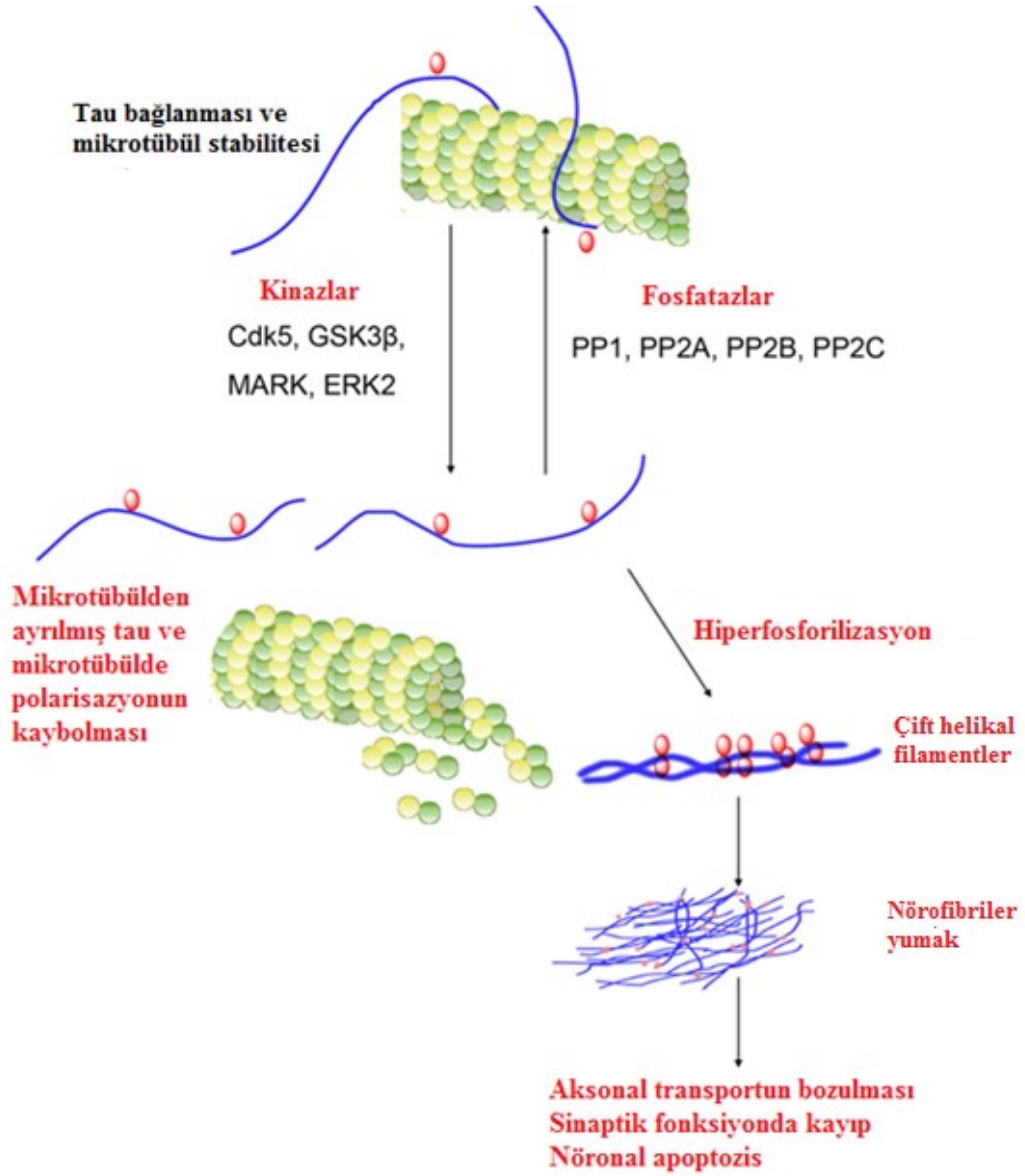
Tau mikrotübül ilişkili bir proteindir. Taunun temel fonksiyonu nöronlarda aksonların stabilesini sağlamaktır. Bu da nöronların normal yapısının korunması ve sinir büyümesi için gereklidir (26). Taunun amino asit sayısı 352 ile 441 arasında değişen 6 farklı izoformu mevcuttur. Taunun mikrotübül bağlayan bölgesi mikrotübüllere bağlanmada zayıf afinite gösterir; buna rağmen onların bir arada tutulması için önemli rolü vardır. Taunun mikrotübüllere bağlanması fosforillenme seviyesine göre belirlenir (27). Cyclin-dependent kinase 5 (CDK5), glikojen sentez kinaz 3 (GSK3), microtubule-affinity-regulating kinase (MARK) ve extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2) gibi kinazlar tarafından gerçekleşen fosforillenme, taunun mikrotübülden ayrılmasına neden olur. Bunun sonucunda mikrotübül polimerizasyonu kaybolarak mikrotübüller birbirinden ayrılır (28). Bu sürecin zıttı olarak fosfatazlar protein fosfataz 1 (PP1), protein fosfotaz 2A (PP2A), protein fosfataz 2B (PP2B) ve protein fosfotaz 2C (PP2C) taunun fosforillenme seviyesini azaltırlar. Böylelikle taunun mikrotübüllere bağlanması yeniden gerçekleşir. Embriyonik gelişim sırasında tau fosforilizasyonu döngüsü daha hızlıdır. Fetal beyin gelişimi sırasında artarken yetişkinlikte yavaş yavaş azalır. Tau aksonal transportta, nöronların uzamasında, canlılığının ve fonksiyonunun devam etmesinde önemli etkiye sahiptir. Taunun 30' dan fazla serin/treonin fosforillenme

bölgesi vardır (27). Patolojik şartlar altında kinazlar ve fosfatazlar arasındaki denge bozularak kinaz aktivitesinde artma veya fosfataz aktivitesinde azalma neticesinde hiperfosforile tau meydana gelir. Hiperfosforile olan taunun ana yapısını oluşturarak çift eşleşen sarmal filamentler (PHF) şeklinde kümeleşmesiyle NFY meydana gelir (Şekil 2.3). Son yıllarda yapılan birçok araştırmadan yola çıkılarak oluşan ortak görüş AH ve diğer nörodejeneratif hastalıkların patogenezinin altında yatan neden NFY oluşumudur (5).

A β toksisitesi, oksidatif stres, inflamasyon gibi farklı patolojik olaylar taunun mikrotübülden anormal şekilde ayrılmasını tetikleyebilir. Cdk5, GSK3 β , MARK ve ERK2 inhibisyonu taupatilere bağlı gelişen patogenezin tedavisi için hedeflerdir. CDK5, GSK3 inhibisyonunu üzerindeki düzenleyici rolüyle tau hiperfosforilasyonunu etkiler. GSK'ın GSK3 α ve GSK3 β olmak üzere iki farklı izoformu bulunur. GSK3 β ekspresyonu artmış olan transgenik farelerde uzamsal hafızada bozulma ve tau fosforilasyonunda artma görülmüştür. Yapılan çalışmalarda GSK3 β 'nin NFY oluşumunu düzenleyici etki gösterdiği bildirilmiştir. ERK2 tau fonksiyonunu ve fosforillenmesini düzenler, nöronlarda ekspresyonu yüksektir (27).

Protein fosfatazlar; PP1, PP2A, PP2B and PP2C olarak isimlendirilir. Fosforile olan taunun defosforile olmasını sağlarlar. Memeli hücrelerinde serine/threonine fosfotaz aktivitesinin % 80'ni PP1 ve PP2A tarafından gerçekleştirilir. Alzheimer hastalığı olanların %20-30'nunun beyinlerinde bu protein fosfatazların aktivitesinin azaldığı rapor edilmiştir. PP2A memeli beyinde en önemli serin/treonin fosfatazdır.

PP2A mikrotübüllerde tauyla birlikte lokalize olmuştur. Tauyu defosforile eden en aktif protein fosfatazdır. Alzheimer hastalığı olanlarda ekspresyonu ve aktivitesi düşük bulunmuştur. PP2A inaktivitesi hiperfosforile tau oluşumuna ve bunun sonucu olarak NFY oluşumuna neden olur (29).



Şekil 2.3. Nörofibriler yumak oluşumunun mekanizması (Liu ve ark. değiştirilerek) (29).

2.1.2.2. Alzheimer Hastalığı ve Oksidatif Stres

Oksidatif stres beyinde yaşla birlikte artan antioksidan savunma sisteminin yetersiz kalışı ve aşırı serbest radikal oluşumu gibi nedenlerle ortaya çıkan bir süreçtir. Alzheimer hastalarının beyinlerinde NFY birikimi ve A β kümeleşmesi ile oksidatif hasar arasında ilişki vardır. A β ' nın N-terminalinde bakır ve çinkonun yüksek afinite gösterdiği metal bağlanma bölgesi vardır. Alzheimer hastalarının beyinlerinde bakırın önemli ölçüde hidroksil ve diğer serbest oksijen radikallerinin üretilmesi ile oksidatif

hasara neden olduğu gösterilmiştir. Nöroinflamasyonun da A β oluşumuna ve kontrolsüz çinko salınımına neden olarak oksidatif strese neden olduğu bildirilmiştir.

Beyin membran fosfolipitleri poliansature yağ asitlerinden olduğundan dolayı serbest radikallerin saldırısına daha açık bir organdır (30). Alzheimer hastalarının beyinlerinde en önemli dejeneratif değişikliklerden birisi lipit peroksidasyondur. SOR, proteinlerin oksidasyonuna neden olarak beyin proteinlerini etkilemektedir. Proteinlerin oksidasyonu glikozillenmeye neden olarak post-translasyonel değişiklik meydana getirir. Bu da enzimlerin yapılarının bozulmasına, beyin metabolizmasında değişmeye neden olarak nöron ve glial fonksiyonların bozulmasına neden olmaktadır. Aynı zamanda SOR, DNA' yı etkileyerek yapısının bozulmasına neden olabilmektedir (31).

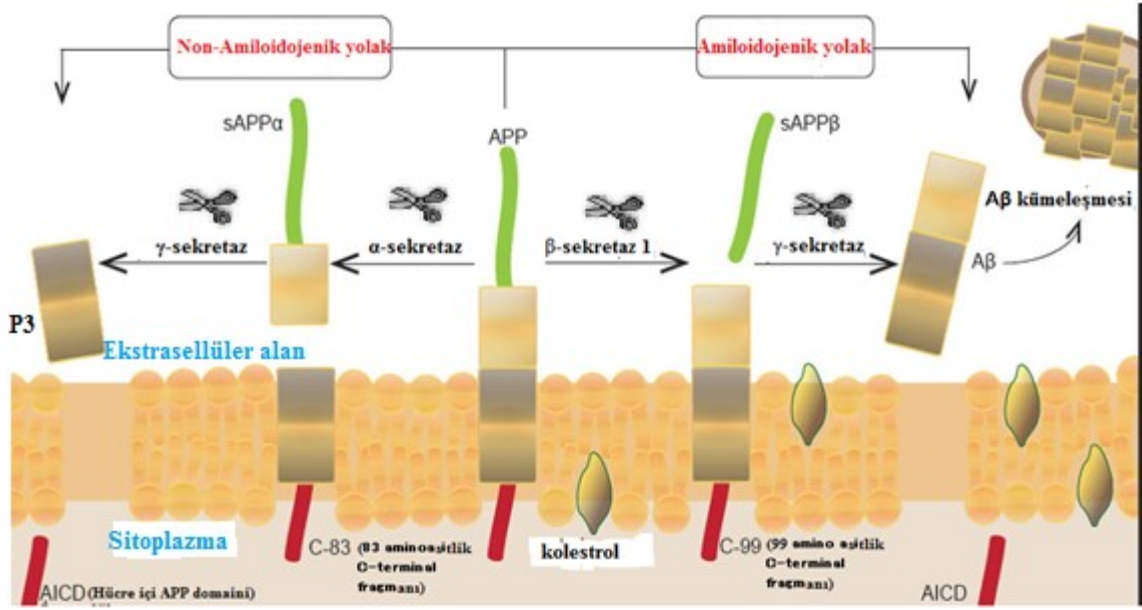
2.1.2.3. Alzheimer Hastalığı ve Nöroinflamasyon

Nöroinflamasyon AH, multiple skleroz, Parkinson hastalığı, amyotrofik lateral skleroz gibi nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilidir. Yapılan klinik ve deneysel çalışmalarda tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α), interferon gamma (IFN- γ), interlökin 1 beta (IL-1 β), interlökin 6 (IL-6), interlökin 18 (IL-18) gibi sitokinler AH' nın beyinlerinde sentezinin arttığı görülmüştür. AH' nın patogenezinde nöroinflamasyon kaskadını artıran primer faktör mikrogliaların aktivasyonudur. IL-1, IL-6, TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinler mikroglialar ve astrositler tarafından salınan sitokinlerdir. Mikrogliaların AH' nın ilerlemesinde iki farklı etkisi vardır. Mikroglialar bir yandan fagositoz yoluyla A β kümeleşmesini azaltırken, diğer yandan uzamış mikrogliya aktivasyonu proinflamatuvar sitokin salınımına neden olarak inflamatuvar kaskadı başlatır. Mikroglialar gibi astrositler de proinflamatuvar sitokin salınımı gerçekleştiren hücrelerdir. Bu süreç nöronal hasarı daha çok artırır. A β oluşumu inflamatuvar süreci tetiklediği gibi nöroinflamasyon da tau hiperfosforilasyonuna neden olabilmektedir (32). AH' da nöroinflamasyon sürecinde ortaya çıkan diğer bir patolojik durum kan beyin bariyerinin bozulmasıdır. A β endotel toksisitesi ve artmış monosit adezyonu kan beyin bariyerinin bozulmasına neden olabilir. İnflamatuvar sitokinler de bu duruma neden olabilir. TNF- α , IL-1 β , IL-17A kan beyin bariyerinin bozulmasına neden olabilir. Epidemiyolojik çalışmalarda uzun süre non-steroidal antiinflamatuvar ilaç kullananlarda AH görülme sıklığının daha az olduğu görülmüştür. Bu da nöroinflamasyonun AH patogenezindeki önemini göstermektedir (33).

2.1.2.4. Amiloid Beta Oluşumu

A β hayat boyunca üretilen normal bir protein olmasına rağmen Amiloid plaklar AH' nin ayırıcı nöropatolojik özelliğidir. amiloid prekürsör proteinden (APP) fonksiyonu tam olarak bilinmezken, A β ' nin üretimi ve salınımı sinaptik aktiviteyi uyarır. Küçük olan A β peptidi toksik özellik göstermez ve fizyolojik fonksiyonlar için gereklidir. Amiloid plaklar ise filamentöz veya non-filamentöz ekstraselüler protein birikimleridir. Bir araya toplanan amiloid fibrillerden oluşur. Amiloid plaklar nöronlar arası sinapslarda bozulma, nöroinflamasyon, serbest radikallerin oluşumu, kan beyin bariyerinde bozulma, bilişsel fonksiyonlarda gerilemeye neden olur. Amiloid plaklar AH' ların beyinde neokorteks, hipokampusda daha yaygın görülsede hipotalamus, pons, bazal ganglionlarda da bulunabilir (34, 35).

AH' da senil plaklarda APP' den meydana gelen A β ' nin ekstraselüler birikimi söz konusudur. APP transmembran bir proteindir. APP iki yol ile metabolize olmaktadır (Şekil 2.4). Bunlardan ilki olan non-amiloidojenik yol: APP' yi parçalayan alfa-sekretaz ve gama sekretaz enzimlerinin yer aldığı, oluşan ürünlerin toksik olmadığı metabolik yola sahiptir. α -sekretaz enzimi APP'yi transmembran bölgesinden 12 aminoasit uzaklıktaki noktadan keser. Bu kesim sonrasında, uzun, çözünebilir α -APPs fragmanı oluşur ve fragman ekstraselüler aralığa salınır. Amiloidojenik yolda ise beta sekretaz ve gama sekretaz enzimleri aracılığıyla APP' den A β 1-40 ve A β 1-42 meydana gelmektedir. A β ' nin yaklaşık olarak %90' ı A β 1-40 olmasına rağmen, amiloid birikiminin ana bileşeni A β 1-42' dir. Hücresel kompartmanlarda biriken nörotoksik A β mitokondriyal ve sinaptik hasara ve tau proteinin hiperfosforilasyonuna yol açarak hücresel fonksiyonlara zarar vermektedir (36, 37).



Şekil 2.4. Non-amiloidojenik ve amiloidojenik yolak (Read ve ark. değiştirilerek) (38).

2.1.2.5. Yaşlanma Hipotezi

Yaşla birlikte beyin hacmi ve ağırlığı azalır. Ventriküller genişler, beynin belli bölgelerinde dendirit ve sinapslarda kayıp görülür. Bunlara AH' nın patolojisinde var olan senil plaklar ve NFY eşlik eder. AH' dan daha az olsa da normal yaşlı bireylerin % 60' ının beyinde senil plaklar gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmada 60 hasta olmayan normal yaşlı bireylerin 30' unda hipokampusda, 12' sinde temporal kortekste senil plaklara rastlanmıştır. Bu yüzden erken dönem AH ile normal yaşlı bireylerin post-mortem beyin incelemesinde hastalığı ayırt etmek mümkün değildir (39).

Aβ birikimi 60 yaşından küçük normal bireylerde nadir görülürken, 60 yaşından büyük normal bireylerde Aβ birikimi gözlenebilir. AH' da görülen glikoz metabolizmasında bozulma, mitokondriyal fonksiyon bozuklukları, inflamatuvar reaksiyonlar, AH olmayan normal sağlıklı yaşlı bireylerde görülen sorunlardır. Tüm bu bilgiler göz önüne alınarak AH' ığı için yaşlılıkta birlikte görülen nörolojik sorunların yoğunlaşmış hali veya daha çabuk ortaya çıkan yaşlılık tablosu gibi bir değerlendirme yapmak yanlış olmaz (40).

2.1.2.6. Kolinerjik Hipotez

Bilişsel süreçlerde önemli yeri olan kolinerjik sistem, kortikal sinir devrelerinin yapısında ve fonksiyonunda anahtar rol oynar. Üç major kolinerjik sistem merkezi sinir sisteminde beyin çeşitli bölgelerine projeksiyon yapar. Birincisi nukleus bazalis Meynert, serebral korteks ve hipokampusu projeksiyon yapar. İkincisi pedunkulo pontin nukleus pars kompakta; ön beyin, talamus gibi subkortikal bölgelere projeksiyon yapar. Üçüncüsü striatumdaki intrinsek kolinerjik sinirlerdir. Kolinerjik hipotez AH hastalığının sebebini açıklamaya yönelik ilk ve en eski hipotezdir. 1980 yılında yapılan çalışmalarda AH beyinlerinde asetilkolin kaybı olduğu gösterilmiştir. Devam eden başka çalışmalarla birlikte, serebral kortekste asetilkolin transferaz azalmasını ve hastalığın ileri dönemlerinde sağlıklı bireylere göre serebral kortekste % 30-50 oranında asetilkolinesteraz azalması olduğu gösterilmiştir. AH' da Meynert nükleus, kortekse ve hipokampusu uzanan kolinerjik nöronların hasara uğradığı rapor edilmiştir. AH' da daha çok nikotinik kolinerjik nöronların hasara uğradığı gösterilmiştir (4, 41).

2.1.2.7. Glutamaterjik Nöronlar

Glutamat; sinaptik iletişim, nöronal büyüme ve farklılaşma, sinaptik plastisite, öğrenme ve bellek oluşumu gibi fonksiyonları olan merkezi sinir sisteminin major eksitatör nörotransmitteridir. Sinapslardaki glutamat konsantrasyonu ile kimyasal uyarı sinir impulslarına dönüşür. Presinaptik nöronlarda glutamat veziküllere depo edilir ve sinir depolarizasyonu ile birlikte postsinaptik nöronları uyarır (42). Eksitotoksiste, yüksek glutamat salınımı nedeniyle aşırı uyarı oluşarak nöronları ölüme götüren süreçtir. Glutamatın reseptörünün iyonotropik ve metabotropik olmak üzere iki ailesi vardır. İyonotropik olanlar N-methyl-D-aspartate (NMDA), α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA) ve kainat (KA) reseptörleri olmak üzere 3 farklı reseptörü vardır. Bu reseptörlerin aşırı uyarılması hücre içi kalsiyum seviyesini artırarak serbest radikal salınımına, mitokondriyal disfonksiyona, intraselüler sinyal kaskadına, kalsiyum bağımlı enzim aktivasyonuna neden olarak hücre ölümüne götüren süreci tetikler (43).

2.1.2.8. Prion hipotezi

Prion hastalıklarının insanlarda iyatrojenik bulaşma şekli tıbbi ve cerrahi işlemler sonucunda gerçekleşir. İlk belirlenen iyatrojenik bulaşma kısa boyluları tedavi etmek amacıyla kadavraların hipofiz bezinden elde edilen büyüme hormonunun kullanılmasıyla ortaya çıkan Creutzfeldt–Jakob Hastalığıdır. Bu hastalığı olan 36-51 yaşındaki kişilerde yapılan otopsi sonucunda beyinde gri madde ve damarlarda A β birikimi görülmüştür. Bu kişilerde AH' na genetik yatkınlıkta görülmemiştir (44). A β proteininin de prion gibi davrandığı, kendini çoğaltabildiği gösterilmiştir. Farklı sterilizasyon yöntemlerine bile dirençli olduğu ve bulaşıcı olabileceği rapor edilmiştir (45).

2.1.3. Alzheimer Hastalığının Tanısı

Alzheimer hastalığının klinik tanısı için belirlenen ve yaygın olarak kullanılan iki tanı ölçütü bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi, Ulusal Nörolojik ve İletişim Hastalıkları Enstitüsü ve İnme-Alzheimer Hastalığı ve İlişkili Hastalıklar Derneği (NINCDS-ADRDA) tarafından geliştirilen tanı ölçütü, diğeri ise Tanısal ve Sayımsal El Kitabı (DSM) ölçütüdür (Tablo 2.1). Bu ölçütlerden faydalanarak hastada öğrenme ve bellek bozukluğunun olup olmadığı, afazi, apraksi, agnozi, yönetsel işlevlerde (planlama, organize etme, sıralama, soyutlama gibi) bozukluğun görülüp görülmediği ve merkezi sinir sistemi (MSS) ile ilişkili başka bir patoloji bulunup bulunmadığı gibi değerlendirmeler yapılmakta ve AH tanısı konulabilmektedir. Başka olası nedenleri eleyebilmek ve Alzheimer tipi demansı diğer beyin patolojilerinden ayırabilmek amacıyla bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans görüntüleme, pozitron emisyon tomografi ya da tek foton emisyon tomografi gibi çeşitli görüntüleme yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Bilişsel değişikliklerin etyolojisini araştırmada yardımcı nöropsikolojik testler, olası mutasyonlar için genetik testler ve biyo-işaretleyicilerle yapılan çalışmalar teşhise yönelik diğer yaklaşımlar arasında yer almaktadır. Buna rağmen, AH' nın kesin tanısı, ileri derecede demans bulguları olan hastalara yapılan biyopsi ya da otopsi sonucunda AH' na özgü patolojik bulguların görülmesi ile konulabilmektedir. Kullanılan tanı ölçütleri ve laboratuvar analizleri kesin tanı koyamamakta, ancak olası AH' nın tanısının konulmasına yardımcı olmaktadır (14). AH kesin tanısı patolojik incelemeler sonucunda konulsa da klinik tanı ölçütlerinin

kullanımı ile konulan olası AH tanısı patolojik tanılarla %80-90 korelasyon göstermektedir (37, 46).

2.1.4. Alzheimer Hastalığının Belirtileri

2.1.4.1. Bilişsel bozukluk

Epizodik bellek yeri ve zamanı belli olan yaşanmış olayları kapsar. AH' da en erken nörofibriler değişiklikler, beynin epizodik bellek için önemli nöronal bağlantıların bulunduğu temporal lobta (hipokampus, entorhinal korteks gibi) gerçekleşir. Yeni bilginin öğrenilmesi ve hatırlanmasıyla ilgili bozulma bu bölgelerdeki nöronal kayıplarla ilgilidir. Orta şiddette demans gelişen Alzheimer hastalarında cisimleri tanımada zorluk (agnozi), kaydedilen kelimenin anlamını bilme ve kazanılmış bilgiyi kelimelere dökme konusunda zorluk çekerler. İpucu verildiğinde hatırlayabilirler. Konuşmada akıcılık, problem çözme yetenekleri bozulur (47). Hastalar yer ve zaman kavramları ile ilişkili olarak zihinsel karmaşıklık yaşamaya başlamışlardır. Adresleri, telefon numaraları, mezun oldukları okulların isimleri gibi önemli ayrıntıları hatırlamakta sıkıntı yaşamaktadırlar. Sonradan öğrenilen ve motor beceri gerektiren hareketleri yapma yeteneklerinin bozulması anlamına gelen apraksi gelişmiştir. Bu evredeki hastalar banyo yapma, giyinme, tuvalete gitme, beslenme gibi günlük aktiviteler için yardıma ihtiyaç duymaktadırlar. Şiddetli bilişsel zayıflık gösteren dönemde spontan konuşmada, kelime bulmada zorluklar ve konuşma becerilerinde kayıplar gözlenmektedir (afazi). Hastalar günlük aktiviteler için daha fazla yardıma ihtiyaç duymaya başlarlar. İdrar ve dışkı tutmada sıkıntı yaşamaya başlamışlardır. Çok şiddetli bilişsel zayıflık gösteren dönemde (geç dönem demans) hastaların konuşma yetenekleri azalmış ya da kaybolur ve yutmada zorluk yaşarlar. Bu evredeki hastalar tüm gün bakıma ihtiyaç duyarlar (37).

2.1.4.2. Depresyon

Depresyon AH' nın yaygın belirtilerindendir. Yaygınlığı çeşitli çalışmalarda % 24 ile 74.9 arasında değişmektedir. Alzheimer hastalarının % 40' ı 5 yıl içerisinde depresyon belirtisi göstermektedir. Yapılan çalışmalara göre AH ile depresyonun birlikte görülmesi hastalığın klinik seyri için olumsuz bir göstergedir. Depresyon

belirtisi gösteren Alzheimer hastaların prefrontal korteks, temporal korteks ve pariyatal loblardaki atrofinin depresyon belirtisi göstermeyen Alzheimer hastalarından daha fazla olduğu ortaya konmuştur. Özellikle AH' da frontal ve temporal bölgelerde beyaz madde atrofi gözlenmiştir (48, 49).

2.1.4.3. Ajitasyon ve Agresyon

Ajitasyon ve agresyon hastalar ve onlara bakım verenler için tehlikeli bir belirtidir. Erkek hastalarda bu belirtiyeye daha çok rastlanır. Alzheimer hastalarında Ajitasyon ve agresyon ile bilişsel fonksiyonlarda azalma ve kendi başına hareket etmede azalma arasında korelasyon vardır. Saldırganlık davranışı ile psikoz arasında da korelasyon vardır (48, 49).

2.1.4.4. Psikoz

AH' nın erken döneminde en az görülen semptomdur. Depresyon gibi hastalıkta daha fazla bilişsel azalma ve kötüleşmenin habercisi olabilir. Yapılan çalışmalarda AH' da görülme sıklığı % 7-8' dir. Hastalık ilerledikçe bu oran artmaktadır (48, 49).

Tablo 2.1. Alzheimer tipi demans için DSM IV tanı kriterleri (46, 50).

- A **Bellek bozukluğu**
Yeni bilgiler öğrenmede ve daha önceden öğrenilmiş bilgileri anımsama yeteneğinde bozulma
Aşağıdaki bilişsel bozukluklardan biri ya da daha fazlasının bulunması
- B **a-Afazi** (Dil bozukluğu)
b-Apraksi (Motor işlevlerde bozukluk olmamasına rağmen motor aktiviteleri yerine getirmede bozukluk)
c-Agnozi (Duyu işlevlerinde bozukluk olmamasına karşın nesnelere tanıyamama ya da tanımlayamama)
d-Yönelimsel işlevlerde bozukluk (Organize etme, sıraya koyma, tasarlama, soyutlama)
- C Kognitif bozuklukların kişinin toplumsal, sosyal ve günlük işlevselliğinde bozulmaya ya da önceki işlevsellik seviyesinde azalmaya sebep olması
- D Yavaş, sinsi ve sürekli bir ilerleyici kognitif azalma
- E Hasta deliryum tablosunda olmamalı
- F Hastanın klinik durumu başka merkezi sinir sistemi hastalıkları (inme, Parkinson vs.) açıklamamalı

2.1.5. Alzheimer Hastalığının Tedavisi

AH' nin patofizyolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Hastalığın kesin tedavisi yoktur. İlaç uygulamaları daha çok semptomları hafifletmeye yöneliktir. Bu amaçla NMDA antagonisti memantin ve Asetilkolinesteraz inhibitörleri kullanılmaktadır (3).

2.1.5.1. Memantin

Glutamaterjik sistemi etkileyen N-metil-D- aspartat (NMDA) reseptör antagonistidir. NMDA reseptörlerinin blokajı öğrenme sürecinde bozulmaya neden olurken, aşırı aktivitesi öğrenmede bozulmaya, bir sonraki adımda ise nörotoksositeye neden olmaktadır. Bundan dolayı glutamaterjik sistem homeostasisi çok önemlidir. AH' da NMDA reseptörleri aşırı aktivite gösterir. Klinik denemelerde memantin dışındaki diğer NMDA antagonistlerinin daha fazla yan etkisi olduğu görülmüştür. Memantine NMDA reseptörlerine karşı yarışmasız olarak bağlandığından ve afinitesi daha düşük olduğundan yan etkisinin de daha az olduğu gözlenmiştir (51).

2002 yılında AH tedavisi için kullanımı onaylanmıştır. AH' da uzun süreli bellek oluşumundaki bozulmanın NMDA sinyalindeki bozulmayla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Glutamat uyarısını bloklayarak hücre içi patolojik kalsiyum yükselmesini önler. Yapılan çalışmalarda hafif ve orta bilişsel bozulma gösteren AH' da memantin bilişsel bozulmadaki kötüye gidişi yavaşlattığı görülmüştür. Ayrıca bellek ve dil bozuklukları üzerinede etkili olduğu gözlenmiştir. Yarı ömrü 60-100 saattir. Baş dönmesi en yaygın yan etkisi olmakla birlikte baş ağrısı, uykusuzluk, kabızlık, hipertansiyon gibi yan etkileri de vardır (52).

2.1.5.2. Asetilkolinesteraz İnhibitörleri

Donepezil, galantamine ve rivastigmine kolinesteraz inhibisyonu ile sinapslardaki asetilkolin yıkımını azaltır. İnsanda iki major kolinesteraz formu bulunmaktadır. Bunlardan birisi Asetilkolinesteraz (AChE) diğeri bitürilkolinesteraz (BuChE)' dir. Periferde BuChE aktivitesi fazla iken, MSS' de AChE' nin aktivitesi fazladır. AChE 'nın başlıca fonksiyonu asetilkolini asetat ve koline parçalamaktır. AChE asetilkolin için yüksek seçicilik gösterirken, BuChE farklı nöroaktif peptitler bitürilkolin, suksinilkolin, organofosfatlar ve kokain gibi ekzojen maddeleri metabolize edebilir. AH' da AChE aktivitesi azalırken, BuChE aktitesi değişmez hatta artabilir. Günümüzde 3 farklı farmakolojik özelliği bulunan kolinesteraz inhibitörü kullanılmaktadır (53). Donepezil yarışmasız olarak, hızlı, reversible AChE' ı BuChE' den 300 kat fazla seçici olarak inhibe etmektedir. Galantamine de reversible ve yarışmalı olarak AChE' yi BuChE' den 50 kat daha seçici olarak inhibe etmektedir. Ek olarak galantamine nikotinic asetilkolin reseptörlerini modüle ederek kolinerjik aktiviteyi artırır. Rivastigmine AChE ve BuChE' yi 3,5 saatten 8,5 saate kadar inhibe eder. Bu özelliğinden dolayı yarılanma ömrü bitene kadar inhibitör etkisi devam eder. AChE ve BuChE inhibisyonunu benzer oranlarda gerçekleştirir. AH' da AChE aktivitesi azaldığından ek BuChE inhibisyonu faydalı olabilir. Rivastigminin diğeri bir avantajı AH' dan daha çok etkilenen korteks ve hipokampus için daha fazla bölgesel AChE inhibisyonu sağlar. Bunlardan başka rivastigminin diğeri kolinesterazlara göre daha az kas krampı yaptığı gözlenmiştir. Bu 3 asetilkolin esteraz inhibitörleri yan etki bakımından kıyaslandığında donepezilin yan etkisinin diğeri ikisinden daha az olduğu gözlenmiştir. Yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda asetilkolinesteraz inhibitörleri

sadece sinapslarda asetilkolin konsantrasyonunu artırmakla kalmayıp A β birikimini azalttığı ve bilişsel fonksiyonlardaki bozulmayı geciktirdiği gösterilmiştir (52).

Donepezil 1997 yılında AH tedavisi için onay almıştır. Hafif ve orta şiddetli bilişsel bozulmayı düzenlemek için kullanımı tavsiye edilmiştir. 12-24 haftalık kullanımı sonucunda hafif ve orta şiddetli bilişsel bozulmayı düzelttiği bildirilmiştir. Yarılanma ömrü 70 saat olup oral olarak alınır. Yorgunluk, bulantı, kusma, diare ve kas krampları gibi yan etkileri vardır.

Rivastigmine 1998 yılında AH tedavisi için onay almıştır. Yarı ömrü 1-2 saat olup AChE inhibisyonunu 10 saat boyunca gerçekleştirir. Bu yüzden günde 2 defa alınması gerekir. Bulantı, kusma, karın ağrısı, baş dönmesi, baş ağrısı gibi yan etkileri vardır.

Galantamine 2000 yılında AH tedavisi için onay almıştır. Yarı ömrü 7-8 saattir. En yaygın yan etkileri; bulantı, kusma, diare olup daha az görülen yan etkileri ise; titreme, anoreksiya, baş dönmesi, kilo kaybı, karın ağrısıdır (54).

2.1.6. Alzheimer Hastalığı Deney modelleri

AH' nın tedavisine yönelik yeni ilaçlar geliştirmek, hastalığın fizyopatolojisine yönelik genlerin ve proteinlerin araştırılması; bilişsel, nörokimyasal, nöropatolojik değişikliklerin anlaşılması için çeşitli deney modelleri oluşturulmuştur. Bu deney modelleri AH' nı genetik, biyokimyasal, nörolojik olarak taklit etmeye yönelik uygulamalardır (55).

2.1.6.1. Yaşlı Hayvan Modelleri

Yaşlı hayvan modeli kemirgenler, köpek, primat gibi hayvanlarda uygulanan yöntemdir. Dopaminerjik ve glutamaterjik sinirler bu modelde etkilenebilir. Yaşlı rhesus maymunların parahippokampal girus, hippocampus, inferior temporal korteks, ventromedial prefrontal korteks, medial talamus ve bazal ön beyin kolinerjik sistemlerinde oluşan hasarlara bağlı olarak ciddi bellek problemleri olduğu görülmüştür. Yaşlı maymunlar senil plaklar, difüz A β -40 ve 42 birikimleri, NFY ve nöron kayıplarını AH' na benzer şekilde sergilerler (56, 57).

2.1.6.2. Kolinerjik Fonksiyon Bozukluğu Esasına Dayanan Modeller

AH' da kolinerjik nöronlarda harabiyet olduğu bilinmektedir. Bilişsel fonksiyonlardaki kayıplarla kolinerjik nöron harabiyeti arasında ilişki vardır. Hayvan beyinlerinde kolinerjik hasar yapan çeşitli girişimlerle bilişsel fonksiyonlardaki bozulma taklit etmeye çalışılmıştır. Elektrik akımı ile yapılan nöron harabiyeti, beyinin belli bölgelerine kesi yapılması, lateral ventriküle klonik asit verilmesi, Scopolamine beyin içine uygulanması kolinerjik nöronlarda hasara neden olmaktadır. Bu deney modelleri her ne kadar kolinerjik nöron hasarı yapsa da AH' nın patogenezinde meydana gelen NFY ve A β oluşumunu taklit etmemektedir (56, 57).

2.1.6.3. Beyin İçi Amiloid Beta Uygulanması

A β plaklar AH' nın karakteristiğidir ve beyin içine A β enjeksiyonu veya infüzyonu şeklinde yapılan bu uygulama bellek oluşumunda bozulma ve nörodejenerasyona neden olur. 14 gün boyunca 3. Ventriküle A β uygulanması hipokampus ve korteks gibi beyinin çeşitli bölgelerinde A β kümeleşmesine neden olmaktadır. AH'da beyinde oluşan mikroglial aktivasyon, inflamatuvar cevap bu deney modelinde de meydana gelmektedir. Aynı zamanda hipokampusda asetilkolintransferaz (ChAT) aktivasyonunun belirgin şekilde azaldığı gözlenmiştir. İnfüzyon kesildikten iki hafta sonra bilişsel fonksiyonlar normale dönerken, mikroglial bozukluk ve ChAT aktivitesinde azalma devam etmektedir (56, 57).

2.1.6.4. İntraserebroventriküler Streptozotocin Uygulanması

48 saat arayla iki doz icv 3 mg/kg streptozotocin (STZ) uygulamasının AH' na benzer olarak bellek bozukluğuna neden olduğu bildirilmiştir. STZ' nin bu etkisi hiperglisemiye neden olmasına bağlı olarak gelişir. İcv STZ uygulaması; nöronal hasara, tau hiperfosforilasyonuna, A β kümeleşmesine, reaktif oksijen türlerinin üretilmesine, malondialdehit (MDA) artışına, insulin benzeri büyüme faktörü bir (IGF-1) reseptörü gibi insulin sinyaliyle ilişkili gen ifadelerinin azalmasına neden olur. Bu modelin avantajı sporadik insan AH' nın bazı patolojileriyle yakın benzerlik göstermesidir. Yapılan çalışmalarda icv STZ uygulaması hücrel enerji kaynakları olan ATP ve kreatin fosfat seviyesini azaltarak korteks ve hipokampusda glikolitik enzim

aktivitesini azaltırlar. Sonuç olarak beyin enerji metabolizması ve asetil koenzim A sentezi azalır. Hipokampusda ChAT aktivitesi azalır ve beyinde AChE aktivitesi artar. Dolayısıyla asetilkolin seviyesi azalır. Ek olarak beyinde atrofi, mitokondriyal disfonksiyon, nöroinflamasyon, apoptoza neden olur. Bu modelin dezavantajı STZ uygulama sonrası hayvanlarda ölüm oranının yüksek olmasıdır (58).

2.1.6.5. Kolsişin ile Oluşturulan Model

Kolsişinin kolinerjik nöronlarda kayıp, bellek defisiti, nörotoksik etkisi vardır. Korteks, hipokampus, kaudat nükleusda; serotonin, dopamin, norepinefrin seviyesinde azalmaya neden olur. Aynı zamanda oksidatif strese ve lipid peroksidasyonuna neden olur. Kolsişinin kortekste glutamat seviyesini yükselterek Ca^{++} bağlı enzim aktivasyonuna neden olur. Bu modelin yüksek mortaliteye neden olması, kilo kaybı, diare dezavantajıdır (56, 57).

2.1.6.6. Ağır metallerin uygulanması ile oluşturulan model

Farklı çalışmalarda demir, bakır, krom, çinko reaktif oksijen türleri (ROS) üretimine neden olduğu gösterilmiştir. Çinko uygulaması A β dimerizasyonuna neden olur. İçme suyuna alüminyum katılmasıyla oluşturulan modelin tau kümeleşmesine, nöronal fonksiyon kaybına, A β metabolizmasında bozulmaya neden olduğu gösterilmiştir (56, 57).

2.1.6.7. Transgenik Modeller

PDAPP model: AH için geliştirilen ilk transgenik model farelerde geliştirilmiştir. Bu modelde kalıtsal AH ile ilişkili APP V717F mutasyonu şifreleyen bir insan APP mini geni taşıyan fareler (PDAPP fareler) oluşturulmuştur. PDAPP farelerin beyinlerinde AH' da gözlenen ekstrasellüler nitelikli tiyoflavin S-pozitif A β birikimi, nörotik plaklar, sinapslarda, astrositlerde ve mikroglialardaki kayıplar meydana gelmektedir. A β plak gelişimi 6-9 aylıkken gelişir (59).

Tg2576 model: Tg2576 model fareler çift mutasyon geçirmiş insan APP695 ekspresyonu yapılmış bir diğer transgenik Alzheimer modelidir. Bu genetik yapı özellikle erken başlayan bir AH tipinde görülür. TG2576 transgenik farelerde

hipokampus CA1 bölgesinde nöronal kayıp, öğrenme bozukluğu, A β ve APP ekspresyonunda artma meydana gelir (59).

ApoE modeli: A β kümeleşmesi ve klirensinde önemli rol oynayan ApoE AH' nın patogeneğinde önemli rol oynar. ApoE' nin $\epsilon 4$ aleli AH' nın gelişimi için önemli bir risk faktörüdür. Birden fazla ApoE modeli vardır. Bunlardan biri Tg2576 \times ApoE fare modeli, diğeri Pdapp \times ApoE fare modeli olan modellerin her ikisinde de beynin çeşitli bölgelerinde A β plaklar oluşumu görülür (57, 60).

Presenilin transgenik model: 4. kromomda PSEN1 mutasyonu ailesel AH' nın en sık sebebidir. Bu transgenik fare modelinde AH' nın karakteristiğı olan plak üretimi, sinaptik fonksiyon kaybı, bellek bozukluğu meydana gelir. PSEN 1 mutasyonu A β 1-42 üretiminin artmasına neden olur (60).

2.1.6.8. Okadaik Asit ve Okadaik Asit ile Oluşturulan Alzheimer Modeli

OKA köken olarak Halichondria okadai ve Halichondria melanodocia' dan izole edilen lipofilik doğal bileşiktir (61). OKA ilk olarak epitel hücrelerde hasar, barsaklarda sıvı birikimi ve hatta yüksek dozlarda ölüme neden olan bir enterotoksin olarak tanımlandı. Oral alınmasının farelerde immünotoksik etkiye yol açtığı görülmüştür (62). İn vivo çalışmalarda oral alımdan sonra çeşitli organlarda şekil ve fonksiyonel değişiklikler gözlenmiştir. İntravenöz uygulandığında karaciğer üzerinde yüksek toksik etki ve hücre iskeletinde bozulma meydana gelmektedir. Farelerde deriye uygulandığında irritasyon meydana gelmiştir. Yapılan çalışmalarda antimitotik etkisinin olduğu, deri, mide, karaciğer gibi çeşitli organlarda tümör oluşumunu teşvik ettiği rapor edilmiştir. Yaklaşık 25 yıl önce OKA' nın potent bir protein fosfataz inhibitörü olduğu anlaşılmıştır. Memelilerde PP2A ve PP1olarak iki major ser/Thr protein fosfataz vardır. OKA PP1 ve PP2A' yı güçlü şekilde inhibe eder. OKA hücre zarından kolaylıkla geçebilir ve geri dönüşümlü olarak protein defosforilasyonunu bloklar (63).

Aminoasit zincirine geridönüşümlü olarak fosfat grupları eklenmesi olan fosforilasyon hücre içi sinyal, protein sentezi ve azalması, apoptoz gibi hücreyel olaylar için gereklidir. OKA, PP2A/PP1 inhibisyonunu gerçekleştirdiğı için bu hücreyel süreçlerin araştırılması açısından uygun bir bileşiktir.

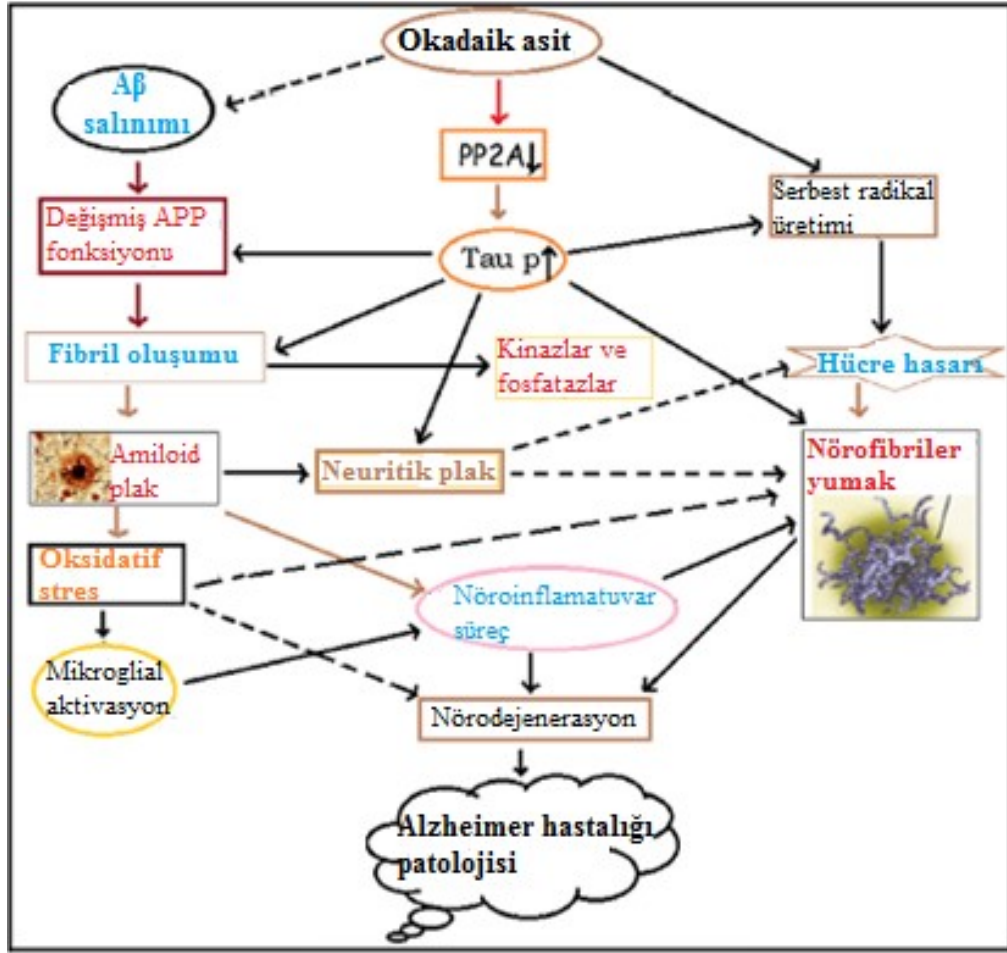
Alzheimer hastalığı olanların %20-30'nunun beyinlerinde bu protein fosfatazların aktivitesinin azaldığı rapor edilmiştir. PP2A memeli beyinde en önemli serin/treonin fosfotazdır. PP2A mikrotübüllerde tauyla birlikte lokalize olur. Tauyu

defosforile eden en aktif protein fosfotazdır. AH' da ekspresyonu ve aktivitesi düşük bulunmuştur. PP2A inaktivitesi hiperfosforile tau oluşumuna ve bunun sonucu olarak NFY oluşumuna neden olur (29).

2.1.6.9. Okadaik Asitin Nörodejeneratif Etkisi

OKA' nın hücre kültürü çalışmalarında doz bağımlı olarak apoptotik etkisi olduğu gösterilmiştir (64). İnsan nöroblastoma SH-SY5Y hücrelerine uygulanması L-tipi voltaj duyarlı kalsiyum kanallarını aktive ederek tau fosforilasyonuna neden olduğu rapor edilmiştir (65). Tau mikrotübül ilişkili proteindir. Mikrotübül stabilizasyonunda, aksonal transportta ve nöronal büyümede önemli rol oynar. AH' nın en önemli karakteristik özelliği olan NFY yapısı bozulmuş hiperfosforile olan tau proteinlerinden meydana gelir. OKA uygulaması PP2A inhibisyonu yoluyla tau hiperfosforilasyonuna ve yine aynı yolla GSK-3 β inhibisyonuna neden olur. OKA' nın intra-hipokampal enjeksiyonunun bellek bozulmasına, tau fosforilasyonuna ve A β plaklara benzer yapıların oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir (66). İcv OKA uygulamasının AH' nın patolojisinde var olan asetilkolin azalmasına, nikotinic asetilkolin reseptör ekspresyonunun bozulmasına, kolinerjik fonksiyon bozukluğuna neden olduğu bildirilmiştir (67). Sıçanlara İcv olarak OKA uygulanması bilişsel fonksiyonlarda bozulma, beynin çeşitli bölgelerinde oksidatif hasara neden olarak MDA seviyesinde artış, glutasyon seviyesinde azalma, antioksidan enzim aktivitesinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (9). Başka çalışmalarda da sıçanlara İcv uygulanmasının beyin dokusunda TNF- α , IL-1 β artışına neden olarak nöroinflamasyona neden olduğu gösterilmiştir (68).

Tüm bu etkileri dikkate alındığında OKA uygulaması tau fosforilasyonu, NFY oluşumu, A β oluşumu, kolinerjik sistemde bozukluk, GSK-3 β inhibisyonu, serbest radikal üretiminde artış ve oksidatif stres, mikroglial aktivasyon ve nöroinflamasyon, mitokondriyal disfonksiyon, bilişsel fonksiyonlarda bozukluk gibi AH' nın karakteristiği olan birçok patolojiyi taklit ettiği görülmektedir (Şekil 2.5). İcv olarak bilateral 200 ng OKA uygulamasından 14 gün sonra bilişsel bozuklukla birlikte diğer tüm patolojiler ortaya çıkmaktadır (69).

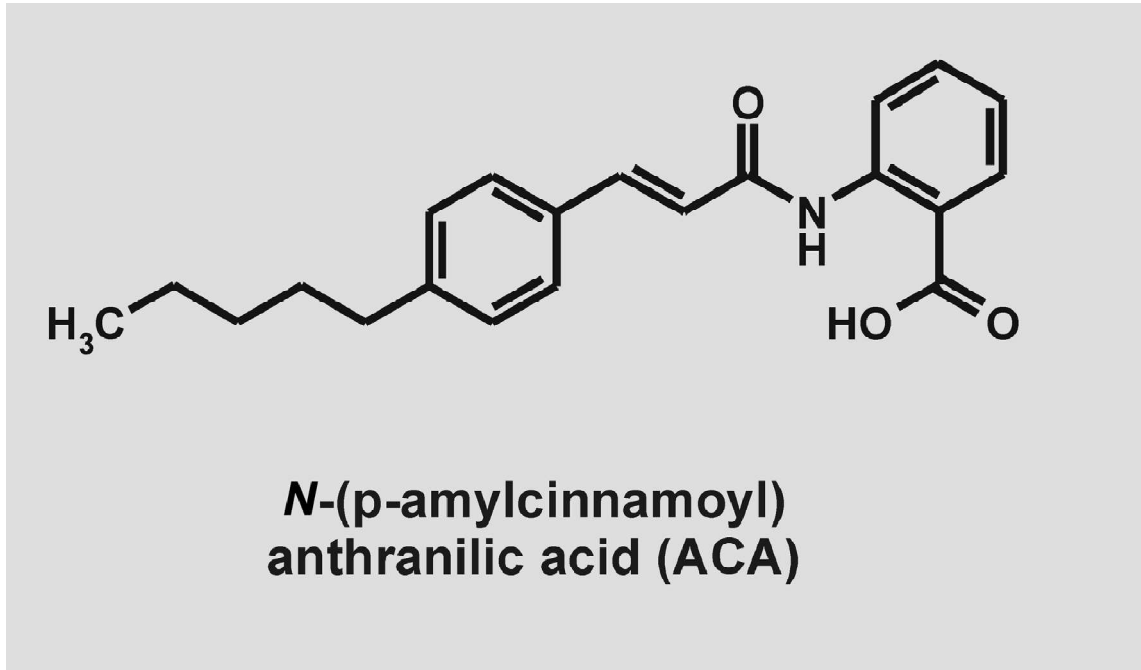


Şekil 2.5. İcv okadaik asit uygulamasıyla AH patogenezi arasındaki benzerlik (Kamat ve ark. Değiştirilerek) (69).

2.2. N-(p-amylcinnamoyl) Anthranilik Asit

Katı, beyaz görümlü, molekül ağırlığı 337.40 kilodalton olan N-(p-amylcinnamoyl) anthranilik asit (ACA), kimyasal olarak 1974' de tanımlanmıştır. Kimyasal ismi 2-[3-(4-Pentylphenyl)prop-2-enoylamino] benzoic acid ve moleküler formülü (Şekil 2.6) $C_{21}H_{23}NO_3$ olan ACA; Dimetil sülfoksit (DMSO) ve etanolde çözünebilen ve oda sıcaklığında uzun süre saklanabilen bir bileşiktir (70). ACA ilk olarak lökotrien C4 and D4 antagonisti olarak bronkokonstriksiyon etkisiyle tanımlandı (71). PLA₂ inhibisyonu gerçekleştirdiği anlaşılan ACA'nın; PLA₂ inhibitör aktivitesi yanında daha sonra pankreas adacıklarında glikoz ile gerçekleşen insülin salgısını antagonize ettiği rapor edilmiştir (72). Sonraki yıllarda ACA' nın TRPM2 kanalını inhibe ettiği gösterilmiştir.

TRPM2 kanala bağlı olarak hücre içi enzim domaini olması nedeniyle farklı bir iyon kanalıdır. TRPM2 kanallarının biyolojik fonksiyonunu anlamak için potansiyel blokerler keşfedildi. İmidazole ajanlar clotrimazole ve econazole (73) ve antranilik asitten köken alan flufenamik asit (FFA) ve ACA TRPM2 inhibitörleri olarak tanımlandı (74). ACA aynı zamanda TRPC6 ve TRPM2 kanalıyla yakın ilişkili olan TRPM8 kanalını inhibe ettiği gösterilmiştir; ancak TRPC6 kanalı üzerindeki inhibitör etkisinin daha zayıf olduğu bildirilmiştir (11).



Şekil 2.6. N-(p-amylocinnamoyl) anthranilik asit'in molekül yapısı (75).

TRPC6 kanalı nonselektif Ca^{++} kation kanalıdır. Ca^{++} geçirgenliği, Na^{+} geçirgenliğinden 16 kat fazladır. Diaçilgliserol (DAG) ikinci habercisi tarafından aktive edilir. Akcięer, plasenta, dalak, overlerde yüksek ekspresyon oranına sahipken beyinde ekspresyonu düşüktür. Ayrıca özafagus, myometrium, akciğer, kolon mide gibi organların düz kaslarında da bulunur. Fizyolojik rolü bilinmeyen bu kanalla ilgili çalışmalar daha çok düz kas, akciğer, immün sistem ve kardiyovasküler sistem üzerine yoğunlaşmıştır (76).

Transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) ekspresyonu en yüksek prostat dokusunda olmak üzere testis, vasküler doku, akciğer, uterus, plasenta, karaciğer, deri ve gözde bulunur. Periferik sinir sinir sisteminde deri ve mukozada inerve olan ısıya duyarlı sinir sonlanmalarında, dorsal kök ve trigeminal ganglion

primer duysal sinirlerdevarlığı gösterilmiştir. TRPM8' in fizyolojik rolünün, duysal sinir sonlanmalarında ağrı ve soğuk duyusu ilgili olduğuna dair bilgiler mevcuttur. Bu kanal soğuk duyusuna bağlı olarak ve aynı zamanda mentol tarafından aktive edilir. Non-selektif katyon kanalıdır. Na⁺ geçirgenliği, Ca⁺⁺ geçirgenliğinden fazladır (77).

2.3. Fosfolipaz A₂ ve Nörodejenerasyon

PLA₂ membran fosfolipitlerini serbest yağ asitlerine ve lizofosfolipitlere dönüşümünü katalizler. PLA₂' nin 3 farklı alt tipi vardır. Bunlardan ilki ekstraselüler Ca⁺⁺ salınımını sağlayan sPLA₂, ikincisi sitozolik Ca⁺⁺ konsantrasyonunu düzenleyen cPLA₂, üçüncüsü ise intraselüler Ca⁺⁺ konsantrasyonunu düzenleyen iPLA₂' dir. İn vitro çalışmalarda PLA₂ inhibisyonunun APP salınımını azaltırken, PLA₂ aktivasyonunun APP salınımını artırdığı görülmüştür (78). Beyin iskemisinde PLA₂ inhibisyonunun nöronal ölümü azalttığı bildirilmiştir. Omurilik yaralanmalarında ise PLA₂ aktivasyonu gerçekleşirken; PLA₂ inhibisyonunun nöron ölümünü azalttığı ortaya konmuştur (79).

PLA₂ inhibitörlerinin Aβ ile oluşan ROS üretimini azalttığı rapor edilmiştir. Astrositlerin inflamatuvar sitokin salınımıyla birlikte PGE2 üretimine, COX₂ artışına neden olduğu ve bu sürecin PLA₂ sinyal yolağıyla gerçekleştiği anlaşılmıştır. Çeşitli nöroinflamatuvar süreçlerde de PLA₂ gen ekspresyonunu arttığı gözlemlendiği gibi AH' da hipokampusda PLA₂ gen ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (14). Yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda PLA₂ inhibisyonunun total ve fosforile tau proteini seviyesini azalttığı ortaya konmuştur (12). PLA₂ aktivasyonu nöroinflamasyonun altında yatan yoldur. Birçok nörodejeneratif hastalığın patolojisinde de bu yatmaktadır (13).

2.4. TRPM2 Kanalları ve Nörodejenarasyon

Transient receptor potential (TRP) kanalları ilk olarak 1998 yılında Drosophila türü sirke sineklerinin göz hücrelerinde bulunmuştur. TRP kanalları görme, işitme, tat, dokunma, sıcaklık, ozmolarite gibi duyular ile ilgili fonksiyonları vardır. TRP kanalları hücrelerin lokal çevresel değişikliklerine duyarlıdır.

Yapılan araştırmalar neticesinde TRP kanallarının memelilerde 6 alt aileden oluştuğu bulunmuştur. Bunlar; TRP cononcial (TRPC), TRP vanilloid (TRPV), TRP melastatin (TRPM), TRP mukolipin (TRPML), TRP polisistin (TRPP), TRP ankirin

(TRPA)' dir. TRPM, 8 farklı alt kanal gruba, TRPC 7 farklı alt gruba, TRPV 6 farklı alt gruba, TRPML 3 farklı alt gruba, TRPP 3 farklı alt gruba, TRPA ise 1 farklı alt gruba sahiptir.

Bu kanalların birçoğu tek bir iyon kanalına geçirgen olmayan non-selektif kanallardır. İstisnai durumlar olmakla beraber Na^+ ve Ca^{+2} 'a aynı anda geçirgen olan bu kanallardan özellikle, TRPM4 ve TRPM5 tek değerlikli katyonlara, TRPM6 ve TRPM7 Mg^{+2} 'a, TRPV5 ve TRPV6 Ca^{+2} 'a, TRPV1, TRPML6 ve TRPP3 ise H^+ 'e geçirgendir (80, 81).

Kanalın N-terminal ve C-terminal olmak üzere iki ucu bulunmaktadır. Bu iki uç ile beraber transmembran segmental geçiş bölgesi kanalın temel yapısını oluşturmaktadır. TRPM2, TRPM6 ve TRPM7 kanalları hem iyon kanalı hem de aynı proteinde enzimatik aktivite içermektedir.

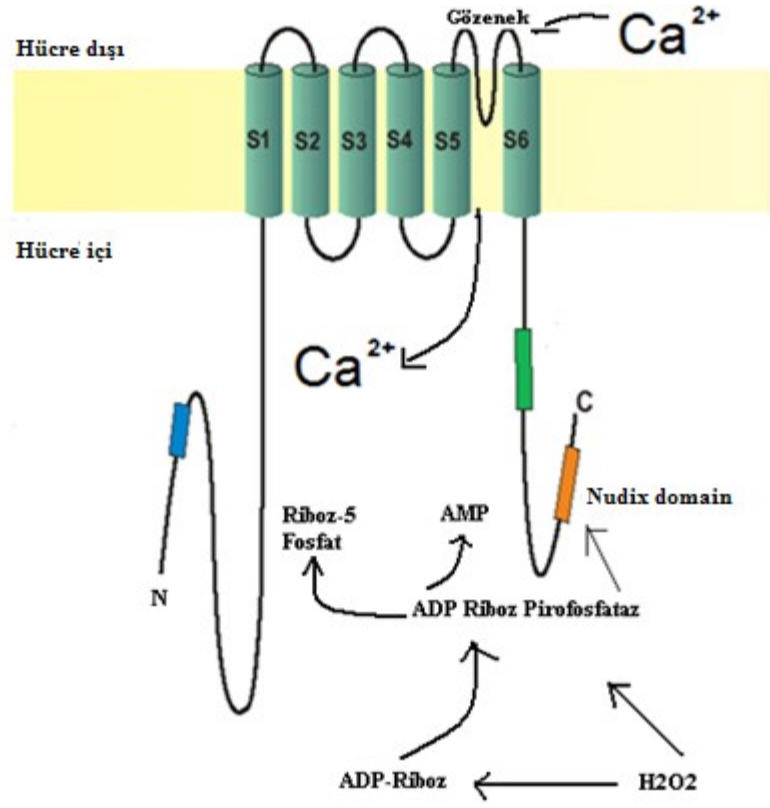
TRPM2 kanallarının en önemli özelliği C-terminal üzerinde bulunan nudix bölgesidir (Şekil 2.7). Bu bölgede, ADP ribozdan AMP ve Riboz 5-fosfat oluşumunu katalizleyen ADPR pirofosfataz enzimi bulunmaktadır (82). TRPM2 Ca^{++} ve Na^+ geçirgen nonselektif katyon kanalıdır. TRPM2; ADPR, hidrojen peroksit (H_2O_2) tarafından aktive edilir ADP-ribozun kaynağı hücre zarından nikodinamid adenin dinükleotid (NAD^+)' i substrat olarak kullanan CD38' dir (83). ADPR bağlanmasıyla TRPM2 kanalı açılır. ADPR TRPM2 sinyali yoluyla hücre içi Ca^{++} miktarını düzenler (84). TRPM2 katyon kanalı kemik iliği, dalak, kalp, lökosit, karaciğer ve akciğeri kapsayan birçok dokuda geniş dağılım gösterirken; merkezi sinir sisteminde ise özellikle hipokampus, serebral korteks, talamus, orta beyinde geniş dağılım göstermektedir (85).

TRPM2 metabolik ve oksidatif stres sensörüdür. Yapılan çalışmalarda oksidatif stresin ADPR düzeyini artırarak doğrudan veya dolaylı olarak TRPM2 kanallarını uyardıkları bildirilmiştir (86, 87). Ca^{++} homeostazını düzenleyen çeşitli modülatörler Alzheimer, Parkinson, huntington hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda Ca^{++} seviyesindeki düzensizliklerde potansiyel faktörlerdir. TRPM2 kanalları aracılığıyla Na^+ ve Ca^{++} 'nın hücre içine girişi böylelikle depolarizasyon oluşumunu teşvik etmesi, sitozoldeki Ca^{++} seviyesini artırması ve merkezi sinir sisteminde geniş dağılım göstermesi; nörodejenaratif hastalıkların tedavisi için TRPM2 kanallarını hedef yapmaktadır (88). Aynı zamanda H_2O_2 'in L- tipi Ca^{++} kanallarını da aktive ettiği bildirilmiştir (89). Bari ve ark. yaptığı in vitro çalışmada H_2O_2 ile TRPM2 kanallarının aktivitesinin artarak hücre içi kalsiyum Ca^{++} seviyesinin arttığı ve ACA uygulamasıyla

TRPM2 kanallarının inhibe olarak hücre içi Ca^{++} seviyesi azaldığı bildirilmiştir (90). Başka bir in vitro çalışmada kardiyomyosit hücrelerinin TNF- α ile inkübe edilmesiyle TRPM2 kanallarının aktive olduğu ve mitokondriyal ROS artışı görüldüğü bildirilmiştir. ACA uygulamasının ise TNF- α ' ya bağlı TRPM2 kanal aktivasyonunu inhibe ettiği ve aynı zamanda mitokondriyal ROS üretimini azalttığı rapor edilmiştir (91).

Fonfria ve ark. yaptığı in vitro çalışmada A β ve H₂O₂ uygulanan primer striatal hücre kültüründe TRPM2 kanallarının inhibe edilmesi hücre içi Ca^{++} miktarını azalttığı aynı zamanda A β ve H₂O₂ bağlı hücre ölümünü de azalttığı görülmüştür (92). İsaev ve ark. Yaptığı çalışmada TRPM2 antagonisti olan clotrimazole uygulanmasının hipokampal hücrelerde oksijen eksikliğinin ve glutamatın oluşturduğu eksitoksititeye bağlı nöronal ölümü azalttığı bildirilmiştir (93).

Park ve ark. yaptığı çalışmada A β_{1-40} uygulanan beyin endotel hücrelerindeki TRPM2 kanallarının aktivitesinin ve hücre içi Ca^{++} seviyesinin arttığı gözlenmiştir. ACA uygulamanın A β_{1-40} ' a bağlı olarak gerçekleşen hücre içi Ca^{++} seviyesindeki artışı ve TRPM2 kanal aktivitesini engellediği gözlenmiştir. Aynı zamanda in vivo A β_{1-40} uygulanmasına bağlı olarak azalan serabral kan akımı ACA uygulaması ile yükselmiştir. Aynı çalışmada A β_{1-40} bağlı gelişen nörovasküler disfonksiyonun TRPM2 null hayvanlarda görülmediği rapor edilmiştir (94). Bai ve ark. yaptığı in vitro çalışmada H₂O₂ uygulamasıyla oksidatif hasar oluşturulan piramidal ve hipokampal nöronlarda ACA uygulamasının bu hücrelerdeki hasarı önlediği bildirilmiştir (95).



Şekil 2.7. TRPM2 kanalının moleküler yapısı (Clapham ve ark. değiştirilerek) (96).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmada İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden alınan ortalama ağırlıkları 250-350 gram ağırlığında 8 aylık olan *Sprague-Dawley* cinsi toplam 50 adet erkek sıçan kullanıldı. Bu çalışmada yapılan bütün uygulamalar İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanı Araştırmaları Etik Kurulunun (2015-A38 nolu) izni ile deney protokolüne uygun olarak yapılmıştır. Hayvanlar 12 saat aydınlık/karanlık periyodu olacak şekilde, 20-22 C° sıcaklık aralığında, havalandırılmalı ortamda tutuldu. Hayvanların istedikleri kadar yem ve su alabilecekleri şekilde *ad-libutum* olarak bakımları yapıldı. Su olarak şehir musluk suyu, yem olarak standart pellet sıçan yemi kullanıldı. Deneyde kullanılacak sıçanlar, randomize olarak herbirinde 10 sıçan olmak üzere 5 gruba ayrıldı. Deneyden 3 gün önce tüm gruptaki hayvanlar kafes stresine alışmaları için tekli kafeslere alındı ve deney sonuna kadar tekli kafeslerde barındırıldı.

3.2. Deney Grupları

Grupların oluşturulması ve uygulamalar aşağıda belirtildiği şekilde yapıldı.

Grup 1: “Kontrol grubu” olup herhangi madde ve cerrahi işlem uygulaması yapılmadı. Öğrenme deneyi sonunda hayvanlar sakrifiye edildi.

Grup 2: “Sham grubu” olup lateral ventrüküle çift taraflı icv olarak 10 µl yapay beyin omurilik sıvısı (yBOS) enjeksiyonu yapıldı. İntraperitoneal (ip) olarak 13 gün boyunca 12 saat aralıklarla ACA çözücüsü dimetil sülfoksit (DMSO) enjeksiyonu yapıldı. 14. gün hayvanlar öğrenme deneyine alındı.

Grup 3: “ACA grubuna” İcv olarak herhangi bir uygulama yapılmadı. İp olarak 13 gün boyunca 12 saat aralıklarla 25 mg / kg /gün ACA (Enzo Life Sciences, New York, USA katalog no: BML-EI178-0250) enjeksiyonu yapıldı. ACA DMSO'da çözülerek fosfat tamponu (PBS) solüsyonunda dilüe edildi. 14. gün hayvanlar öğrenme deneyine alındı.

Grup 4: “OKA grubuna” lateral ventrüküle çift taraflı icv olarak 10 µl hacimde yBOS'da çözünen 200 ng okadaik asit (Santa Cruz Biotechnology, California, ABD katalog no: sc 3513) enjeksiyonu yapıldı. İcv enjeksiyondan 14. gün sonra hayvanlar öğrenme deneyine alındı.

Grup 5: “OKA+ACA” grubunda lateral ventrüküle çift taraflı icv olarak 10 µl hacimde yBOS’da çözünen 200 ng OKA enjeksiyonu yapıldı. İcv OKA uygulamasından sonra 13 gün boyunca 12 saat aralıklarla ip olarak 25 mg /gün/kg ACA enjeksiyonu yapıldı. 14. gün hayvanlar öğrenme deneyine alındı.

3.3. Deneyin uygulanması

3.3.1. Yapay Beyin Omurilik Sıvısının Hazırlanması

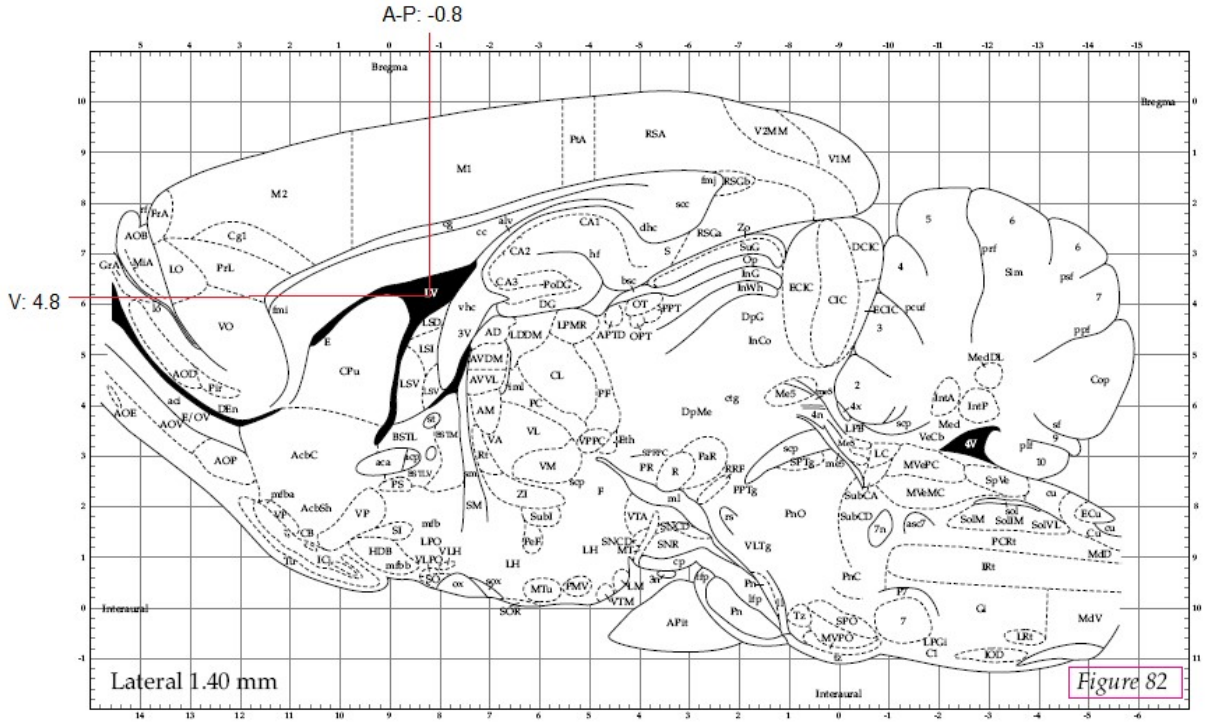
yBOS hazırlamak amacıyla içeriği Tablo 3.1’de belirtilen bileşikler tartıldı ve 500 ml steril distile su içerisinde iki farklı solüsyon (A ve B solüsyonu) hazırlandı. A ve B solüsyonları 1:1 (v/v) oranında karıştırılarak yBOS elde edildi (97).

Tablo 3.1.Yapay beyin omurilik sıvısının içeriği (97).

A solüsyonu		B solüsyonu	
Bileşik	Miktar (g)	Bileşik	Miktar (g)
NaCl	8.66	Na ₂ HPO ₄ . 7H ₂ O	0.214
KCl	0.224	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0.027
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0.206	-	-
MgCl ₂ . 6H ₂ O	0.163	-	-

3.3.2. Ventrikül Koordinatlarının Belirlenmesi

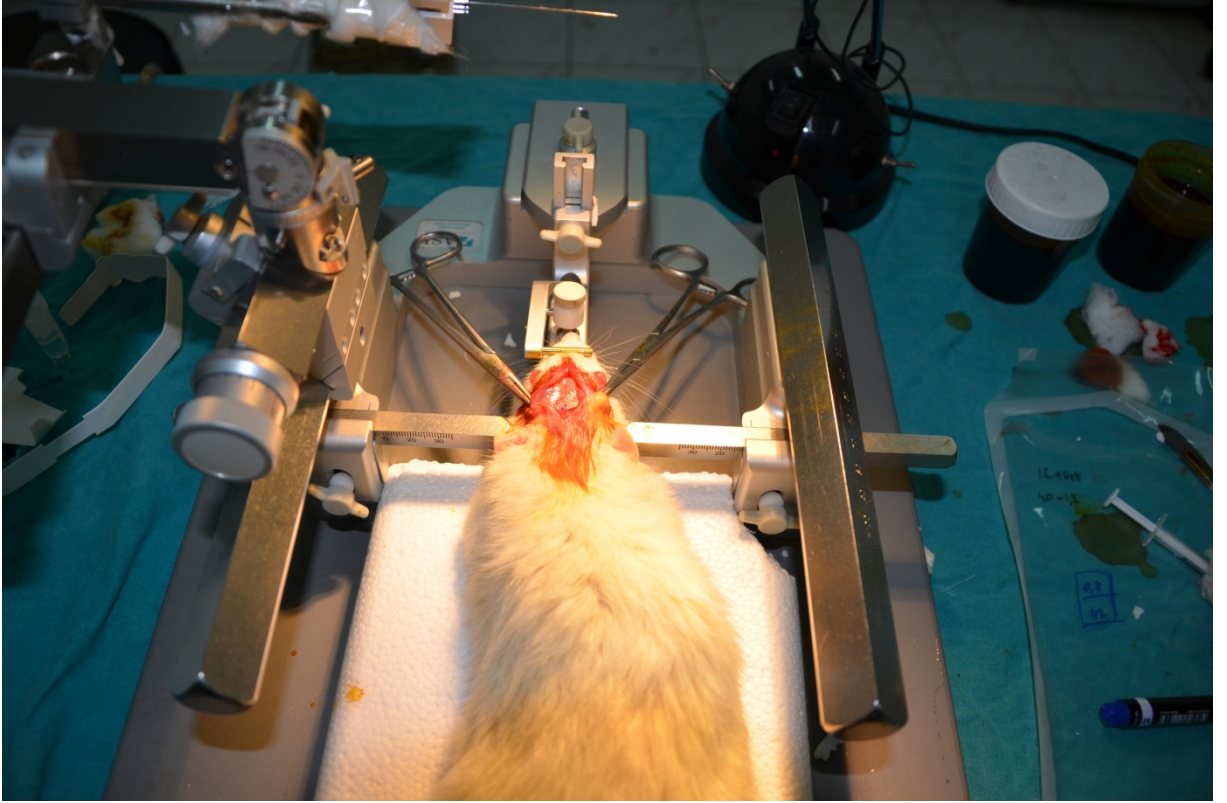
Lateral ventrikülün stereotaksik koordinatları Paxinos & Watson sıçan beyin atlasına göre belirlendi (98). Lateral ventrikül giriş noktası, referans noktası olarak seçilen bregmadan (Şekil 3.1) 1.40 mm mediyal ve 0.8 mm posteriyör (kaudal) gidilerek tespit edildi.



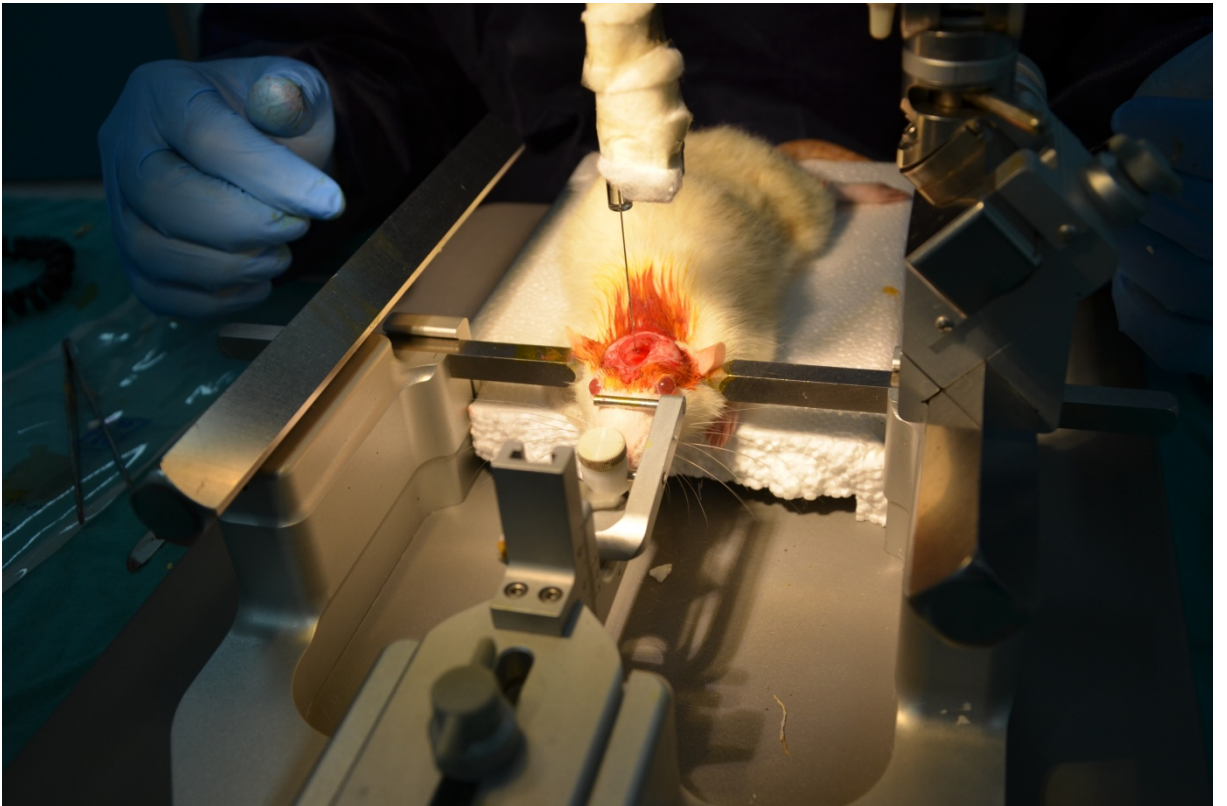
Şekil 3.1. Sıçan beyin atlasına göre lateral ventrikül koordinatları (98).



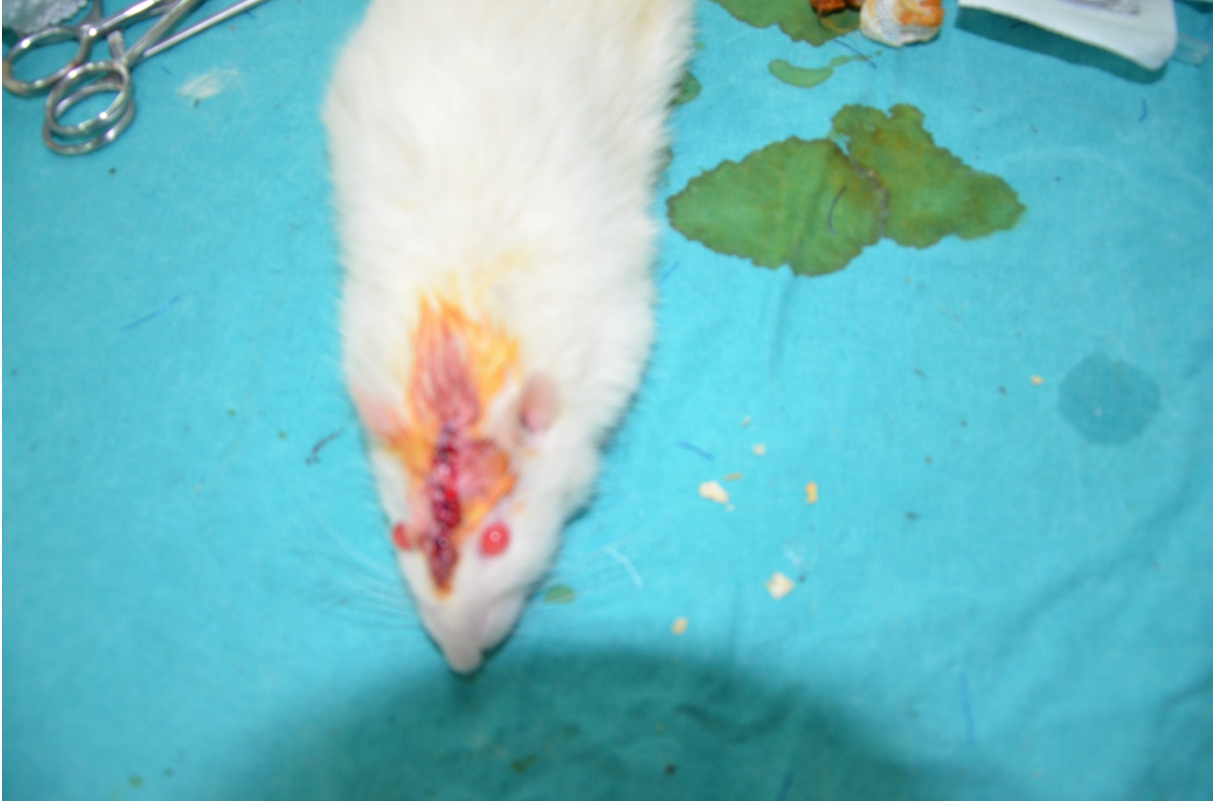
Şekil3.2. Denedeyde kullanılan stereotaksik alet, matkap ve soğuk ışık kaynağı.



Şekil3.3. Kafa derisinin göz hizasından orta hattan kesilmesi.



Şekil 3.4. Hamilton enjektörü ile icv enjeksiyon işlemi.



Şekil 3.5. Kafa derisinin dikilmesi.

3.3.3. Hayvanların Stereotaksik Alete Yerleştirilmesi

Kontrol grubu ve ACA grubu dışındaki sıçanlar intraperitoneal olarak 70 mg/kg ketamin ve 8 mg/kg xylazine ile anestezi altına alındı. Anestezi altına alınan sıçanların kafa derileri tıraş edildi. Hayvanlar stereotaksik cihaza (Şekil 3.3) kulaklarından ve ağız kısmından kafasının yüzeyi yere paralel olacak şekilde sabitlendiler (Rodent Stereotaxic Instruments, Harvard Apparatus, ABD). Kafatası derisi orta hattan, göz hizasından bistüri ile kemik yapı görülecek şekilde kesildi (Şekil 3.3). Kemik yüzeyindeki periost tabakası temizlenerek ve bregma noktasının açık bir şekilde görülmesi sağlandı. Referans noktası olarak belirlenen Bregma noktasından itibaren önceden belirlenen koordinatlara göre bregmadan 0.8mm posterior, sagittal sutturdan 1.4 mm lateral ve kafatası yüzeyinden 4.8 mm olacak şekilde sağ ve sol lateral ventrikülün yeri tespit edilerek işaretlendi. İşaretlenen nokta matkap ile duraya zarar vermedendelindi. Sham Grubuna hamilton enjektörü (Hamilton Company Nevada USA) ile 10 µl hacimde ventrikül içine çift taraflı olarak yBOS enjeksiyonu gerçekleştirildi. OKA ve OKA+ACA gruplarına 10 µl hacimde ventrikül içine çift taraflı olarak yBOS' da çözünen 200 ng okadaik asit enjeksiyonu gerçekleştirildi (Şekil 3.4). İcv enjeksiyondan

sonra İnsizyon bölgesi 3,0 cerrahi ipek iplikle dikildi ve insizyon bölgesine %10 povidon iyodin sürülerek temizlendi (Şekil 3.5). Bütün bu cerrahi işlemler sonrası hayvanlar tekli kafeslere alındı. Cerrahi işlemlerden sonra Sham grubuna 13 gün boyunca ACA çözücüsü DMSO (Corlo-Erba Milano, Italy) 12 saat arayla ip olarak uygulandı. Tedavi gruplarına uygulanacak olan 250 mg' lik flakonlarda bulunan ACA, 1 ml DMSO' da çözüldü. PBS tablet ile (Sigma Chemical Company, St Louis, Missouri, USA) hazırlanan solüsyonla 20 kat dilüe edildi. ACA ve OKA+ACA gruplarına 13 gün boyunca 25 mg /gün/kg ACA ip olarak 12 saat arayla uygulandı. 14. Gün sıçanlar öğrenme deneyine alındı.

3.3.4. Morris Su Tankı Testi

Morris su tankı, Richard G. Morris tarafından 1984 yılında geliştirilmiş olan, fare ve sıçanlarda uzamsal öğrenmenin değerlendirilebilmesi amacıyla oluşturulan bir düzenektir (99). Testte kullanılan deney hayvanına 4 gün boyunca hergün 4 farklı yönden (Kuzeydoğu-NE, kuzeybatı-NW, güneydoğu-SE ve güneybatı-SW) suya bırakılarak havuz içinde görünmez haldeki platformun yeri öğretilir. Görünmez durumdaki platformun yerini öğrenmek, kognitif stratejiyi kullanmayı gerektirir (100). Bunun için denek, havuz dışındaki ip uçlarını kullanır. 4 gün boyunca deneklerin gösterdikleri performans, çalışma belleğinin (working memory) değerlendirilmesini sağlar (101).

Tankın çapı 150 cm, yüksekliği 60 cm ve su yüksekliği 40 cm'dir. Tanka su doldurma işlemi yapıldıktan sonra, tankın alt kısmında bulunan ısıtıcı çalıştırılarak, havuzdaki suyun sıcaklığının $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ olması sağlandı. Tank yüzey alanı sanal olarak 4 eşit kadrana bölündü (Kuzeydoğu-NE, kuzeybatı-NW, güneydoğu-SE ve güneybatı-SW). Kadranlardan gelişi güzel birine (hedef kadrana kuzeybatı-NW olarak belirlendi) , su yüzeyinin 2 cm altına, çapı 10 cm ve havuz kenarından uzaklığı 30 cm olacak şekilde bir platform yerleştirildi. Sıçanların suya bırakıldıklarında platformu görmemesi amacıyla, havuzun içine toksik olmayan siyah boya (Mixol, Almanya) eklendi ve su opak hale getirildi. Platform, sıçanlar üzerine çıktığında kendini güvende hissetmesi ve pençeleriyle tutunması için lifli bir kumaşla kaplandı. Platformun bulunduğu yer 4 gün boyunca sabit tutuldu.

Şekil 3.6' da gösterdiği gibi su tankının bulunduğu test odasında tankın çevresine, sıçanların mekânsal konumu saptamada görsel ipucu olarak kullanabileceği,

her yön için farklı renklerde geometrik şekiller yapıştırıldı. Ayrıca sıçanların dış ortamı görmemesi için tankın etrafına paravanlar yerleştirildi. Ortamdaki ışık ayarları kontrol edildi. Öğrenme deneyi boyunca kullanılan ipuçları ve onların buldukları yerler sabit tutuldu. Testin yapıldığı tüm günler boyunca, dış görünüme, ortamdaki konuma ve kullanılan parfüm vb. kokulu kozmetik ürünlerinin hep aynı olmasına özen gösterildi (100).



Şekil 3.6. Morris su tankı ve test odası.

3.3.5. Morris Su Tankı Platformuna Sıçanların Alıştırılma Süreci

Morris su tankındaki uzamsal öğrenme testi, 4 gün öğrenme periyodu şeklinde yapıldı. Her bir sıçana öğrenme periyodundaki her gün 20 dakika aralıklarla 4 yüzdürme denemesi yaptırıldı. Her yüzdürme denemesinde sıçanlar, dört farklı yönden suya bırakıldılar. Sıçanların tankta 90 saniye yüzmelerine izin verildi. Bu süre içinde platformu bulamadıkları takdirde, yardımla platformun üzerine çıkartıldılar. Çevre ipuçlarını tanıyıp öğrenmeleri için 10 saniye platformda beklemeleri sağlandı. 10 saniyelik bekleme süresi sonunda sıçanlar tanktan çıkartılıp kurutma kağıdı ve kurutma makinesi ile kurutulularak kafeslerine alındılar. 4 günlük alıştırma süresi boyunca sıçanların platformu bulma süreleri, platformu bulana kadar katettiği mesafeleri ölçüldü.

Sıçanın tank içindeki hareketlerini izlemek, kaydetmek ve analiz etmek için bilgisayarlı video kamera sistemi (Ethovision, Noldus) kullanıldı.

3.3.6. Dokuların Alınması

Öğrenme deneyi sonunda sıçanlar intraperitoneal olarak 70 mg/kg ketamin ve 8 mg/kg xylazine ile anestezi altına alındı. Anestezi altına alınan sıçanlar kalplerinden kan alınarak sakrifiye edildi. Kemiği kesebilen uygun makasla hayvanların kafa kemikleri kesilerek beyin dokusuna ulaşıldı. Sıçanların beyinleri çıkarıldıktan sonra 2 ayrı hemisfere ayrıldılar. Bu işlemin hızlı olarak gerçekleşmesine özen gösterildi. Hemisferlerden bir tanesi histolojik analizlerde kullanmak amacıyla %10'luk formaldehit solüsyon içerisine konuldu. Diğer hemisfer ise biyokimyasal işlemlerde kullanılmak üzere kortekse ve hipokampuslarına ayrıldı. Korteks ve hipokampus dokuları daha sonra incelenmek amacıyla - 80C° derin dondurucuya konuldu.

3.4. Histolojik Analiz

Histopatolojik değerlendirme için sıçanların beyin dokuları 3-4 mm' lik küçük parçalara ayrıldı. Daha sonra plastik doku takip kasetlerine konularak %10' luk formaldehit içerisinde 24 saat süre ile fikse edildi. Fiksasyon işleminin ardından dokular 24 saat boyunca akan çeşme suyunda yıkandılar. Dereceli alkollerde dehidrate edilerek, ksilende şeffaflaştırılıp parafine gömüldüler. Parafin bloklardan Leica RM2145 marka mikrotom yardımıyla 5'er mikron'luk kesitler alındı. Kesitlere genel histolojik yapıyı gözlemek amacıyla Hematoksilen ve eozin ve apoptoza giden hücreleri gözlemek amacıyla kaspaz-3 boyama yöntemleri uygulandı. Serebral kortekste ve hipokampüste 10 farklı alanda X40 objektif kullanılarak dejenere nöron (sitoplazması asidofil, nükleusu heterokromatik ve büzüşmüş nöronlar dejenere olarak tanımlandı) ve kaspaz 3 (+) hücre sayısı hesaplandı. Preparatlar Leica DFC280 ışık mikroskobu ve Leica Q (Leica Micros Imaging solution Ltd, Cambridge, UK) görüntü analiz sistemi ile incelenerek fotoğrafları çekildi.

3.5. Dokuların Biyokimyasal Analizlere Hazırlanması

-80 C° derin dondurucuya konulan korteks ve hipokampus dokuları biyokimyasal analiz işlemlerinin yapılması için derin dondurucudan çıkarıldı. Korteks ve hipokampus dokuları çözüldükten sonra dokuların ağırlıkları tek tek belirlendi. Homojenizasyon işleminin yapılacağı cam tüplere konan dokulara 2 ml Tris-HCl (pH=7.4) tamponu eklendi. Homojenizasyon işlemi esnasında dokuların bozulmaması için cam tüpler, içerisinde buz olan kaba konuldu. Homojenizasyon işlemi (IKA, Germany)16.000 devir/dk hızla 3 dk boyunca yapıldı. Homojenizasyon işlemi sırasında dokuların ısınmaması için 30 sn aralıklarla işlem durdurup 10 sn bekletildikten sonra tekrar işleme devam edildi. Homojenata 8 ml Tris-HCl eklenerek 10 ml' ye tamamlandı. Elde edilen homojenatın bir bölümü MDA; GSH ölçümü için ependorf tüplere alınırken, kalan homojenat SOD, GHPX enzim aktivasyonun ve TNF- α , IL1- β ölçümü için 3220 rpm'de 4 C° sıcaklıkta 30 dk. Santrifüj edildi. Santrifüjle süpernatantlar elde edildi.

3.5.1. SOD Enzim Aktivitesi Ölçümü

SOD işlevi, biyolojik sistemlerde süperoksit radikalinin (O⁻) zararlı etkilerinden hücreleri korumaktır. Bunu gerçekleştirirken iki O⁻ nin iki H₂ ile tepkimeye girmesini sağlayarak bir H₂O₂ ve bir O₂ molekülü meydana gelir. Böylelikle O⁻ zararlı etkisi önlenmiş olur (102).

SOD enzim aktivitesi Sun ve arkadaşlarının geliştirdikleri metoda göre ölçüldü (103). Bu metodun prensibi SOD aktivitesi, ksantin/ksantin oksidaz etkisiyle üretilen süperoksidin nitrobluetetrazolium'u (NBT) indirgemesiyle bakılmaktadır. Süperoksit radikali NBT'yi redükte ederek renk değişimi yapar. Renk değişimi 560 nm'de maksimum absorbans verir. SOD enziminin bulunmadığı indirgeme olmadan mavi-mor renk oluşur. SOD enzimi bulunduğunda enzim aktivite seviyesine göre NBT indirgemesi olmayıp enzim aktivitesi oranına göre açık renk oluşur.

Ölçülen absorbanslar aşağıdaki formülle numunelerdeki % inhibisyon değeri bulundu.

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{A_k - A_n}{A_k} \cdot 100$$

A_k = Absorbans kör

A_n = Absorbans numune

1 Ü SOD, NBT indirgemesi % 50 inhibe eden enzim aktivitesidir. Sonuçlar U/mg protein olarak ifade edilir.

3.5.2. Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivitesi Ölçümü

GSH-PX H_2O_2 ' in suya yıkılmasını katalizleyerek etkisiz hale getirir (104). GSH-PX aktivitesi ölçümü paglia ve arkadaşlarının yöntemine göre yapıldı (105). Ölçümün prensibi NADPH'in enzim etkisiyle ortamdan uzaklaştırılmasıyla oluşan 340 nm dalga boyunda absorbanın azalması şeklinde yapılmaktadır. H_2O_2 ortamda mevcutsa GSH-PX enzimi tarafından redükte glutasyon (GSH), okside glutatona (GSSG) dönüşür. Bu reaksiyonla oluşan GSSG, Glutasyon redüktaz enzimi (GR) tarafından GSH indirgenirken NADPH'da $NADP^{+}$ 'a yükseltgenir. Deney ortamına GSH, sodyum azid (NaN_3), GR, NADPH, H_2O_2 eklenir. Enzimin etkisiyle uzaklaştırılan H_2O_2 sayısı NADPH'in $NADP^{+}$ dönüşüm sayısına eşittir ve bu döngüyle oluşan $NADP^{+}$ absorbanın azalmasına neden olur.

Ölçüm: $U/L = [(A_{ilk} - A_{son} / t)] \times \text{sulandırma} \times 24115 / \text{protein L}$

GSH-Px enzimi aktivitesi U/mg protein şeklinde ifade edilir.

3.5.3. Glutasyon ölçümü

Glutasyon ölçümü işlemi homojenatlarda yapıldı. Homojenatlar eşit miktarda % 10' luk trikloroasetik asit solüsyonuyla karıştırılıp 4000 rpm' de 10 dk santrifüj edildi. Böylece proteinlerden ayrıştırılmış ekstrakt elde edilmiş oldu. Proteinsiz ekstrakta 0.3 molarlık disodyum fosfat solüsyonu eklendi. Sonrasında ise hazırlanan % 1' lik sodyum sitrat solüsyonda çözülen 5.5 - dithiobis-2-nitrobenzoik asitle hazırlanan solüsyon eklendi. Spektrofotometrede 410 nm dalga boyunda okunarak kaydedildi (106). GSH ölçümü için oluşturulan standart grafiğine göre hesaplandı. Bunun için 31 g GSH alınıp 1000 ml' de çözüldü. 100 μmol ' lük 1. Standart için, hazırlanan bu stok solüsyondan 2 ml alınıp 2 ml distile su eklendi. 100 μmol ' lük 2. Standart için hazırlanan stok solüsyondan 1 ml alıp 4 ml distile su eklendi. 50 μmol ' lük 3. standart için 2. Standarttan 2 ml alınıp 2 ml distile su eklendi. 25 μmol ' lük 4. Standart için 3. Standarttan 1 ml alınıp 1 ml distile su eklendi.

3.5.4. Malondialdehit Ölçümü

Lipid peroksidasyonun son ürünü olan malondialdehit (MDA) ölçümü Uchiyama ve arkadaşlarının metoduna göre yapıldı (107). Metod MDA' nın aerobik şartlarda 95 C°'de tiyobarbitürik asitle (TBA) tepkimeye girmesiyle oluşan pembe ürünün N-butanol fazında ekstrakte edilen süpernatanın spektrofotometrede 535 ve 520 nm'de ölçülmesi prensibine dayanır. Hazırlanan fosforik asit çözeltisine TBA solüsyonu eklendi. Sonrasında bunlara 0.5 ml homojenat eklenip. Sıcak su banyosunda 98 C°' de 45 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra soğutulan solüsyona N-butanol eklenip vortekslendi. 4000 rpm' de 10 dk santripüj edildikten sonra üstte kalan pembe ekstaktın absorbansı spektrofotometrede ölçüldü. 1.1.3.3. Tetrametoksiopropan ile hazırlanan farklı yoğunluklardaki standartlar ve bunlardan çizilen standart grafiği ile sonuçlar değerlendirildi. Sonuçlar nmol/g olarak ifade edildi.

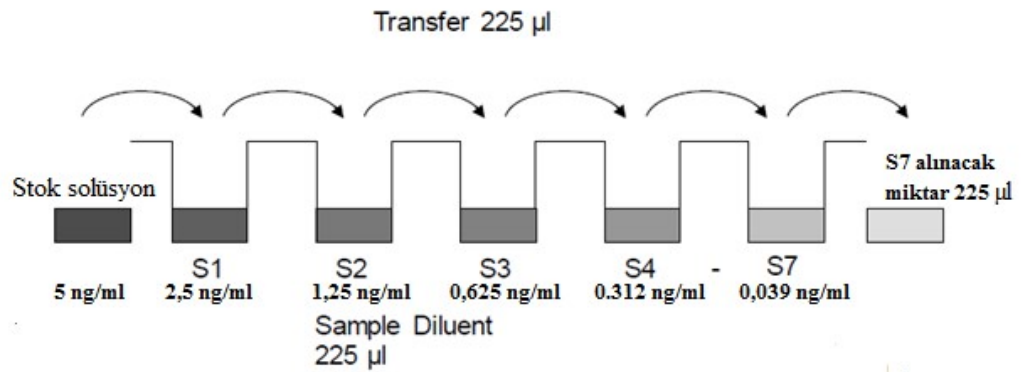
3.5.5. Protein Ölçümü

Süpernatanttan protein tayini Lowry yöntemiyle yapıldı (108, 109). Bu yöntemin prensibi alkali ortamda bakır-protein kompleksi oluşarak Folin-ciocalteu-phenol reaktifini redükte etmesi ve mavi renk meydana gelmesidir. Protein yoğunluğu yükseğe oluşan mavi renk daha koyu olur. Aynı miktarda distile suyla karıştırılan folin reaktif, alkali bakır-protein çözeltisine eklenip vortekslendi. Böylece folin reaktif parçalanmadan indirgenme gerçekleştirildi. 750 nm dalga boyunda spektrofotometrede numuneler ve standartlar ölçüldü. Standart grafiğine göre sonuçlar hesaplandı ve µg/ml olarak ifade edildi.

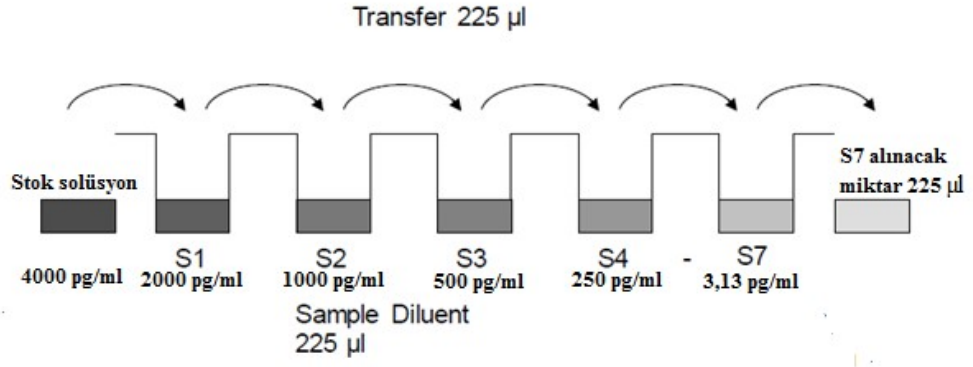
3.5.6. Tümör Nekroz Faktör Alfa ve İnterlökin Bir Beta Ölçümü

TNF- α ve IL1- β ölçümü süpernatantta Ebioscience marka sıçan kitleriyle ELISA yöntemine göre yapıldı. 50 ml yıkama solüsyonuna 950 ml distile su eklendi. Ölçüm işleminin yapılacağı kuyucuklar 3 defa bu solüsyonla yıkandı ve sonrasında kuruması sağlandı. Standartlar için kullanılacak TNF- α antikoru 390 µl distile suda, IL1- β antikoru 520 µl distile suda sulandırıldı. Standart oluşturmak için her tüpe 225 µl sample dilüent solüsyon kondu ve sonrasında 1. Standartın oluşturulacağı tüpe 225 µl antikor olan stok standart eklendi. Bundan sonra 1. Standartın oluşturulacağı tüpten 225

μl alınarak 2. standart oluşturulacağı tüpe eklendi ve sonrasında 2. Standartın olduğu tüpten 225 μl alınarak 3. standart oluşturulacağı tüpe eklendi. Bu işlem 7. standarta kadar aynı şekilde devam etti. Sonuç olarak TNF- α için 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, 0.156, 0.076, 0.038 ng'lık 7 ayrı standart oluşturuldu (şekil 3.7). IL1- β için 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 pg'lık 7 ayrı standart oluşturuldu (şekil 3.8). 8. standartta hiç antikor olmadığı için herhangi bir ekleme yapılmadı. Standartı sulandırmak için örnek seyreltme solüsyonu kullanıldı. Standart hazırlamak için 225 μl analiz tampon solüsyon hazırlamak için kit içerisinde bulunan 5 ml analiz tamponuna 95 ml distile su eklendi. Biotinden 60 μl alınıp analiz tampon solüsyonuyla 6 ml'ye tamamlandı. TNF- α için streptavidin (HRP) 120 μl alınıp analiz tampon solüsyonu ile 12 ml'ye tamamlandı. IL1- β için streptavidin (HRP) 60 μl alınıp analiz tamponu ile 12 ml'ye tamamlandı. Standartların çalışılacağı kuyucuklara hazırlanan standartlardan 100 μl kondu. Numunelerin çalışılacağı kuyucuklara 50 μl numune ve 50 μl örnek seyreltme solüsyonu kondu. Bu işlem sonrası biotinli solüsyondan 50 μl kuyucuklara kondu. Kuyucuklara yapılan bu eklemeler sonrası mikropate oda ısısında 2 saat inkübasyon için bekletildi. İnkübasyon süresi dolduktan sonra kuyucuklar 4 defa yıkandı. Hazırlanan streptavidin (HRP) solüsyondan 100 μl alınıp tüm kuyucuklara pipetlendi ve 1 saat inkübasyon için bekletildi. İnkübasyondan sonra kuyucuklar yıkama solüsyonuyla 4 defa yıkandı ve kurutuldu. Bu işlem sonrası kuyucukların hepsine 100 μl substrat solüsyon pipetlendi ve 10 dk karanlık ortamda bekletildi. Karanlık ortamda 10 dk bekletilen kuyucuklara 100 μl stop solüsyon eklendi ve ELISA okuyucuda 450 nm' de ölçüm işlemi gerçekleştirildi.



Şekil 3.7. TNF- α standart hazırlanması.



Şekil 3.8. IL-1 β standart hazırlanması.

3.6. İstatistiksel Analiz

Araştırma verilerinin istatistiksel değerlendirilmesinde SPSS for Windows Version 17.0 yazılım kullanıldı. Nicel değişkenlere ilişkin verilerin tanımlanmasında aritmetik ortalama \pm standart sapma (ort \pm SD) kullanıldı. Shapiro Wilk normallik testi sonucu nicel değişken verilerin normal dağılım göstermediği saptandı ($p < 0.05$). Bu nedenle grupların karşılaştırılması Kruskal Wallis Varyans Analizi, Conover testi ve Mann-Whitney U testi ile yapıldı. Grup içi değişimlerin incelenmesi Wilcoxon testi ile test edildi. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Deney Gruplarının Vücut Ağırlıkları

Deney gruplarının deney süresi boyunca vücut ağırlıkları 1. gün, 7 gün ve 13. günde ölçüldü (Tablo 4.7). Kontrol grubunun vücut ağırlıkları 1., 7., ve 13. günler arasında vücut ağırlıkları istatistiksel olarak anlamlı değişim göstermedi. Sham grubunun vücut ağırlıkları 1. güne göre 13. günde istatistiksel olarak anlamlı artma gösterdi ($p<0.028$). ACA grubunda vücut ağırlıkları ise 1. güne göre hem 7. günde ($p<0.005$) hem de 13. Günde ($p<0.005$) istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi. OKA grubu vücut ağırlıkları 1. güne göre 7. günde ($p<0.008$) ve 13. günde ($p<0.005$) istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi. OKA+ACA grubu vücut ağırlıkları ise 1. Güne göre 7. ve 13. günde istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermedi.

Tablo 4.1. Deney gruplarının 1. Gün, 7. Gün ve 13. Gün vucüt ağırlıklarının karşılaştırması.

Gruplar	1. gün ort±SD	7. gün ort±SD	13. gün ort±SD
Kontrol	353.6 ± 27 ^a	353.1 ± 26 ^a	353.8 ± 25 ^a
Sham	352.9 ± 29 ^a	358.4 ± 28 ^a	359.2 ± 28 ^b
ACA	334.5 ± 23 ^a	319.2 ± 25 ^b	315.7 ± 27 ^b
OKA	321.5 ± 29 ^a	333.3 ± 28 ^b	343.3 ± 26 ^b
OKA+ACA	347.2 ± 42 ^a	346.5 ± 44 ^a	353.4 ± 43 ^a

(a ve b birbirinden farklı, ^{a,b} $p<0.05$).

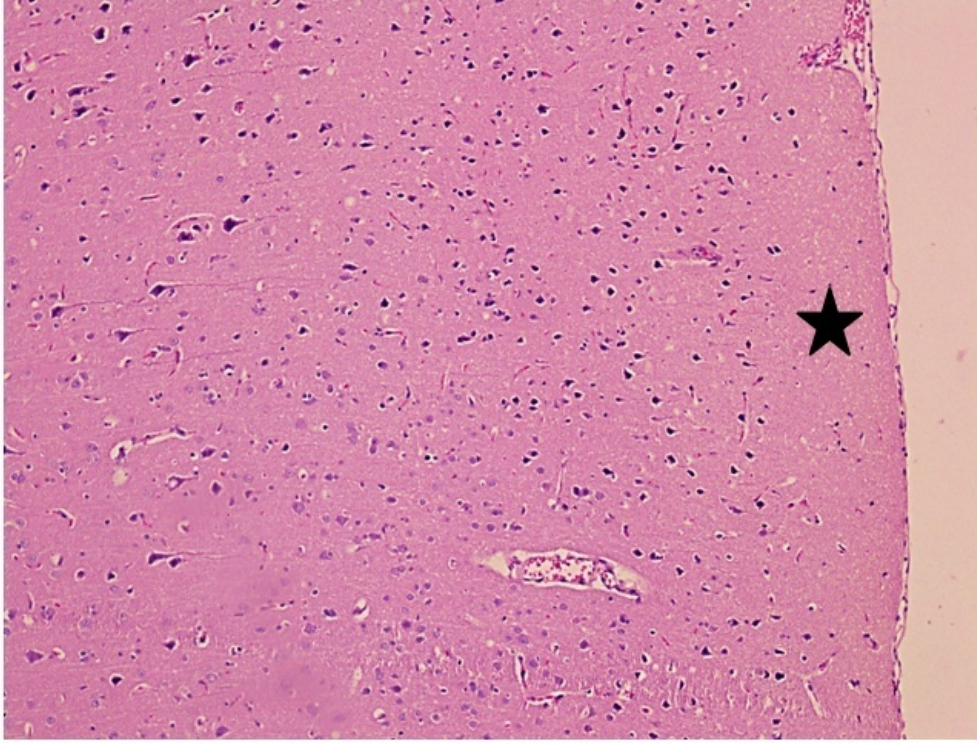
4.2. Histopatolojik Değerlendirme

4.2.1. Kontrol Grubu Histolojik Değerlendirme

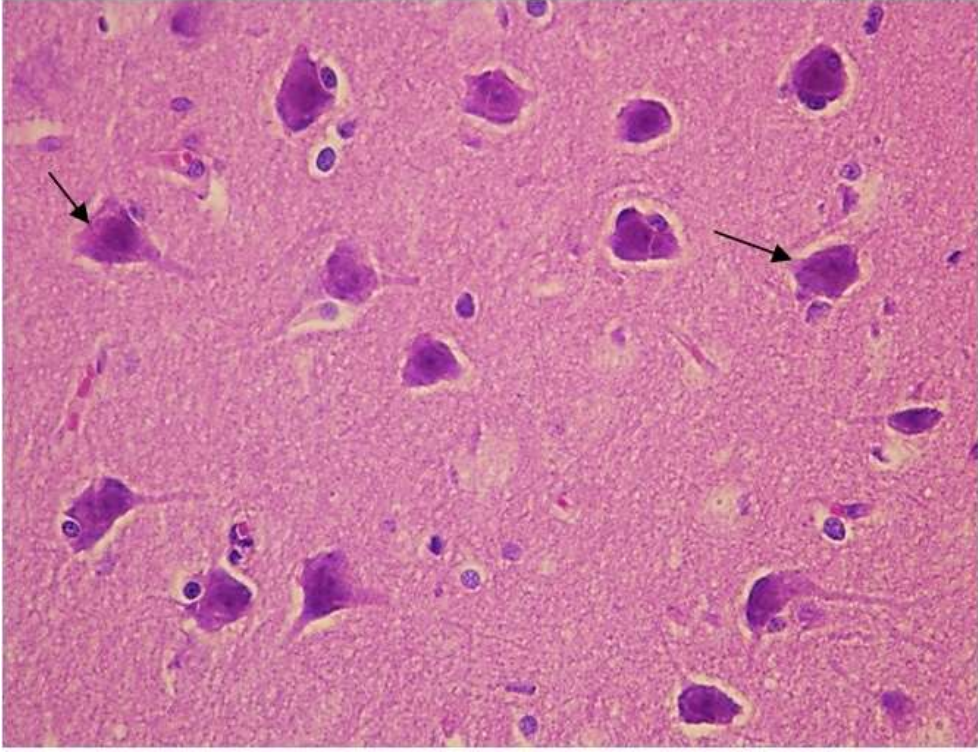
Hematoksilen-eozin boyama metodu uygulanmış kesitlerde beyin dokusunun korteksinin normal histolojik yapıda olduğu gözlemlendi. Nöronlar lamina moleküllere tabakasında seyrek olarak izlendi. Bu tabakanın dışındaki serebral korteks tabakalarında ise nöronlar daha yoğun ve homojen olarak dağılmıştı (Şekil 4.1). Nöronların arasında

üçgen şeklindeki büyük gövdeleriyle tanınan piramidal nöronlara rastlandı (Şekil 4.2). Bu grupta hipokampus bölgesi de normal histolojik yapıda izlendi (Şekil 4.3).

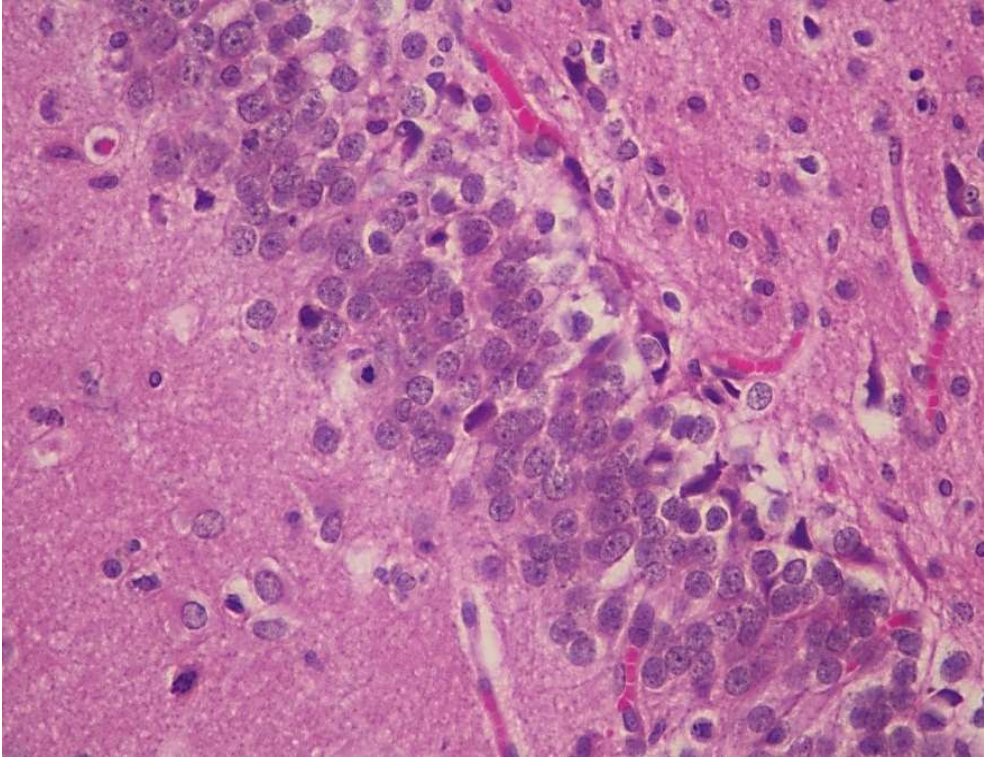
Kaspaz-3 boyama metodu uygulanmış kesitlerde korteks (Şekil 4.4) ve hipokampus (Şekil 4.5) bölgelerinde kaspaz-3 (+) hücreye rastlanmadı.



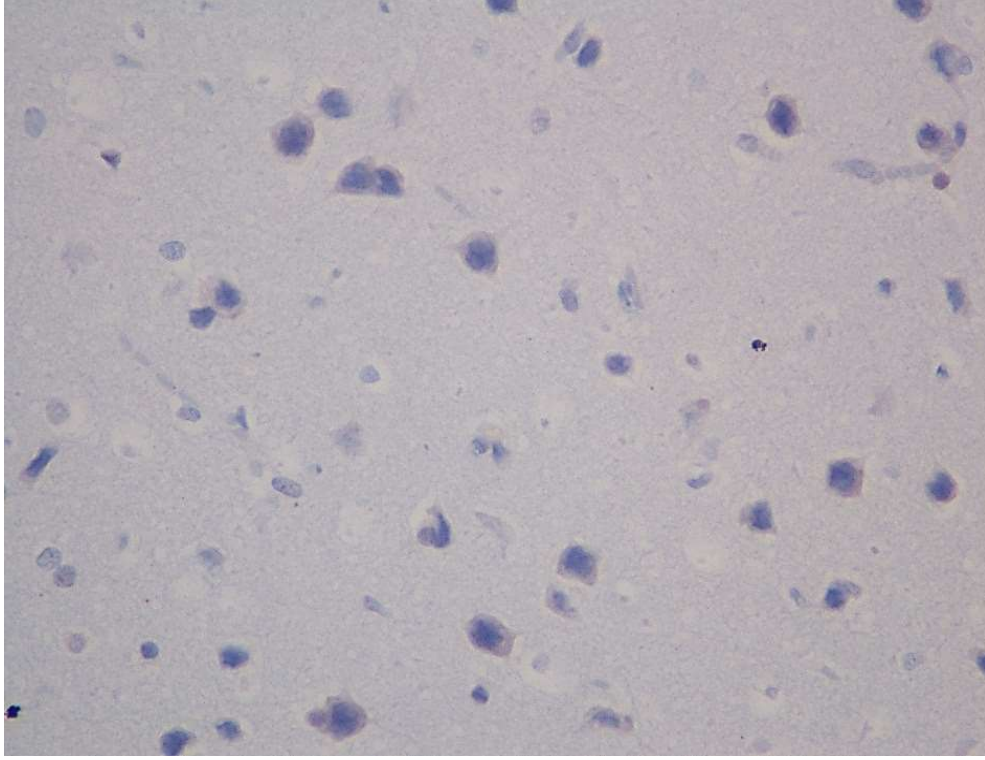
Şekil 4.1. Kontrol grubu:Serebral korteksin normal histolojik görünümü ve lamina molekulare tabakası (yıldız) H-E; X10.



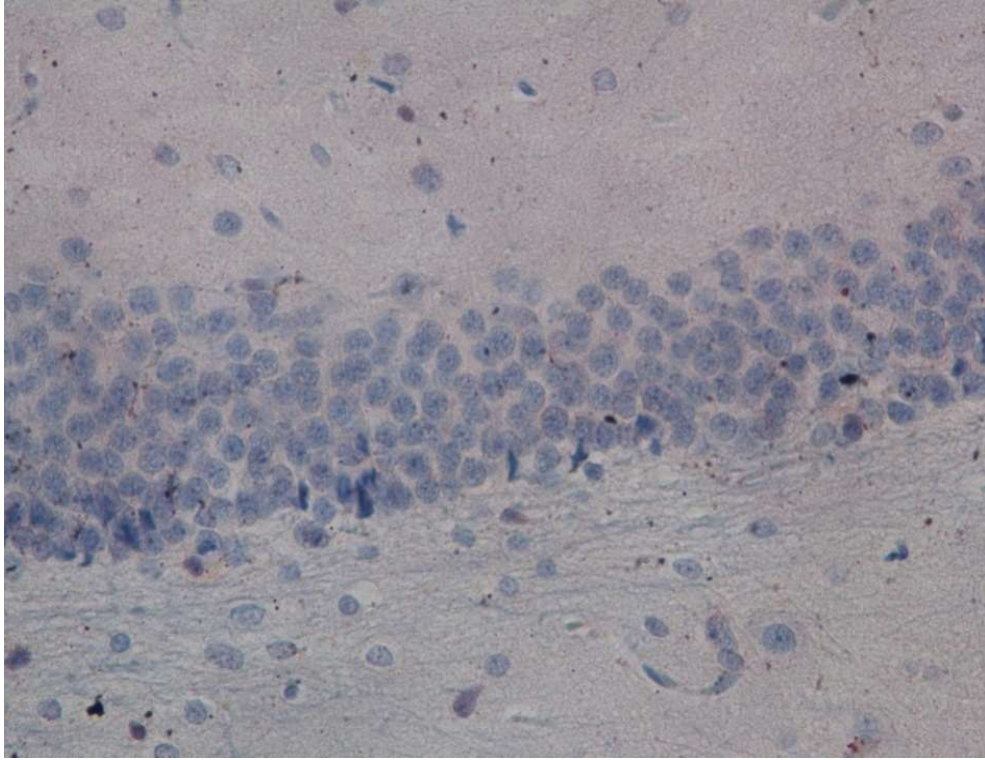
Şekil 4.2. Kontrol grubu: kortekste nöronların arasında üçgen şeklindeki büyük gövdeleriyle tanınan piramidal nöronlar (oklar). H-E; X40.



Şekil 4.3. Kontrol grubu: Hipokampusun normal histolojik görünümü H-E;X40.



Şekil 4.4. Kontrol grubu: Korteksde pozitif hücreye rastlanmadı. Kaspaz-3; X40.

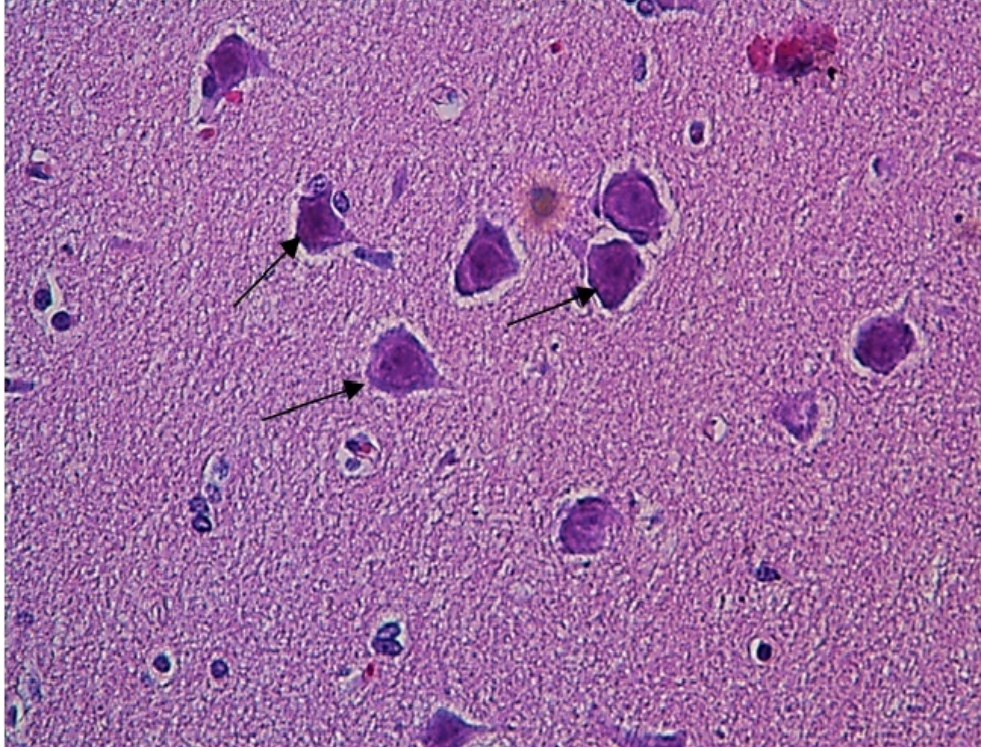


Şekil 4.5. Kontrol grubu: Hipokampusde pozitif hücreye rastlanmadı. Kaspaz-3; X40.

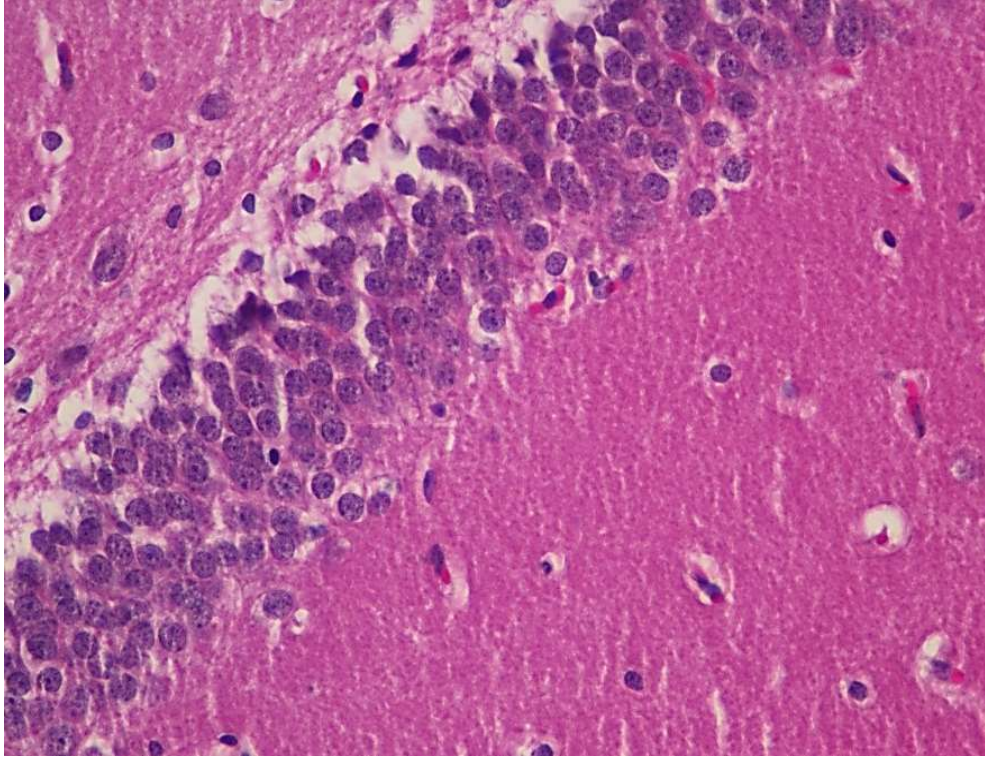
4.2.2. Sham Grubu Histolojik Değerlendirme

Hematoksilen-eozin boyama metodu uygulanmış kesitlerde beyin dokusunun korteksi (Şekil 4.6) ve hipokampüsü (Şekil 4.7) kontrol grubuna benzer görünümdeydi.

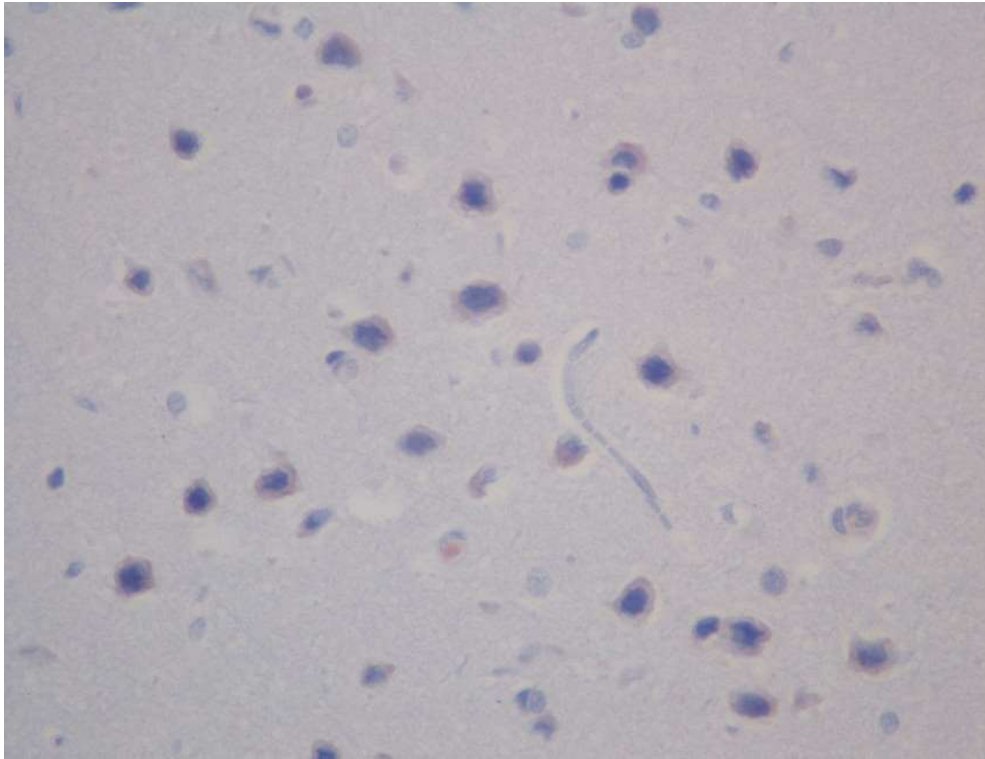
Kaspaz-3 boyama metodu uygulanmış kesitlerde korteks (Şekil 4.8) ve hipokampüs (Şekil 4.9) bölgelerinde kaspaz-3 (+) hücreye rastlanmadı.



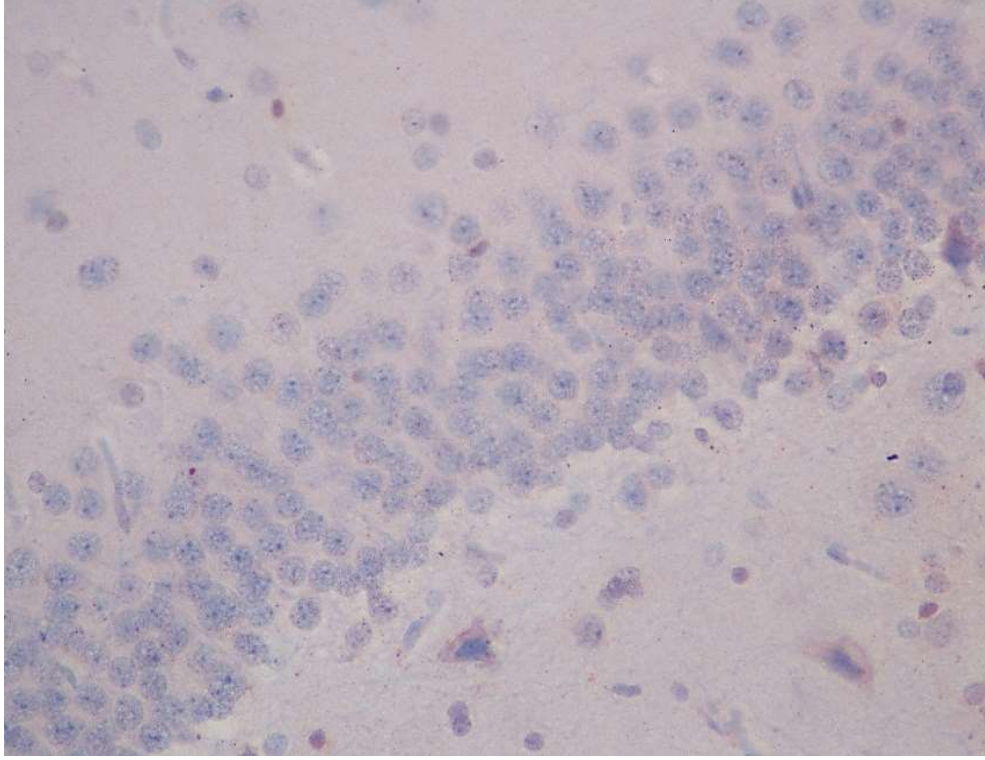
Şekil 4.6. Sham grubu: kortekste nöronların arasında üçgen şeklindeki büyük gövdeleriyle tanınan piramidal nöronlar (oklar). H-E; X40.



Şekil 4.7. Sham grubu: hipokampusun normal histolojik görünümü (oklar). H-E; X40.



Şekil 4.8. Sham grubu: Korteksde pozitif hücreye rastlanmadı kaspaz-3; X40.

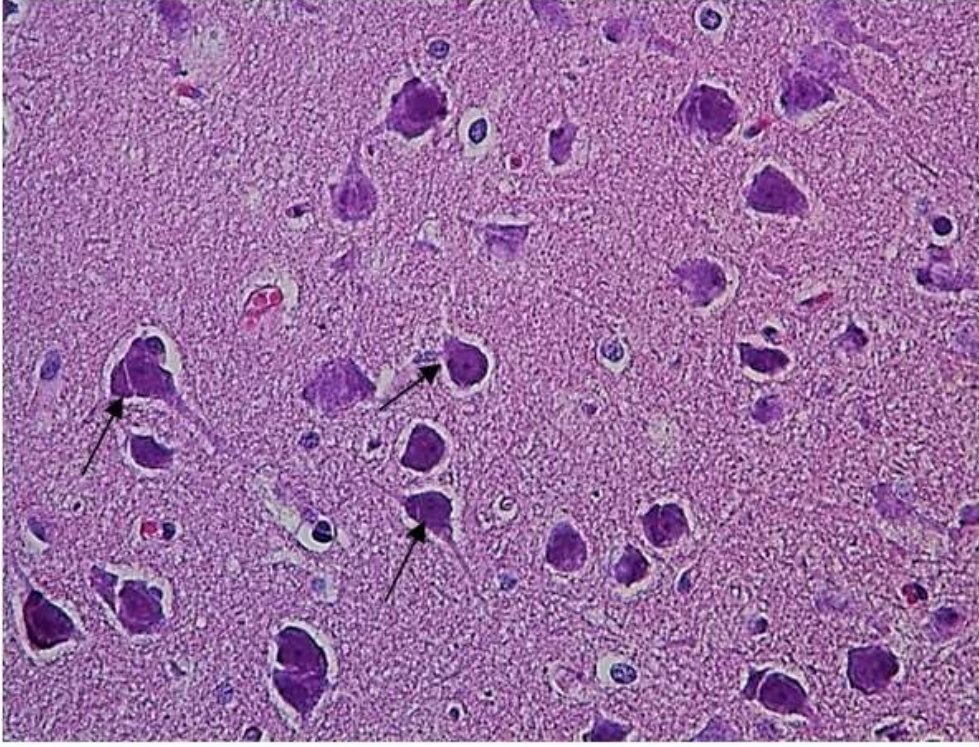


Şekil 4.9. Sham grubu: Hipokampüste pozitif hücreye rastlanmadı Kaspaz-3; X40.

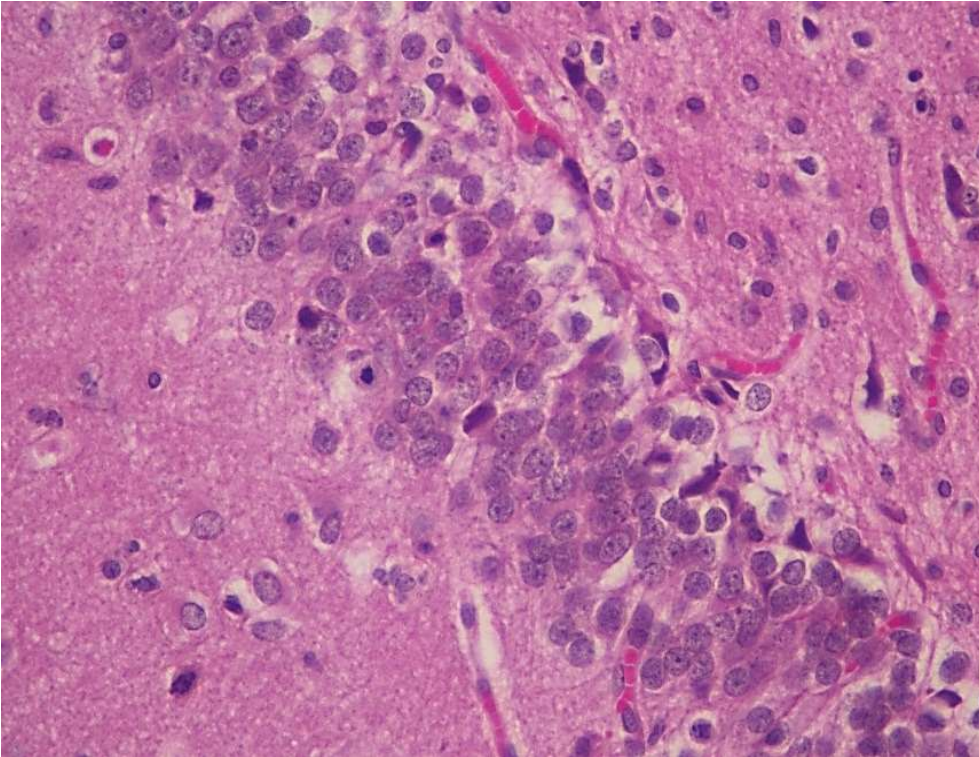
4.2.3. ACA Grubu Histolojik Değerlendirme

Hematoksilen-eozin boyama metodu uygulanmış kesitlerde beyin dokusunun korteksi (Şekil 4.10) ve hipokampüsü (Şekil 4.11) kontrol grubuna benzer görünümdeydi.

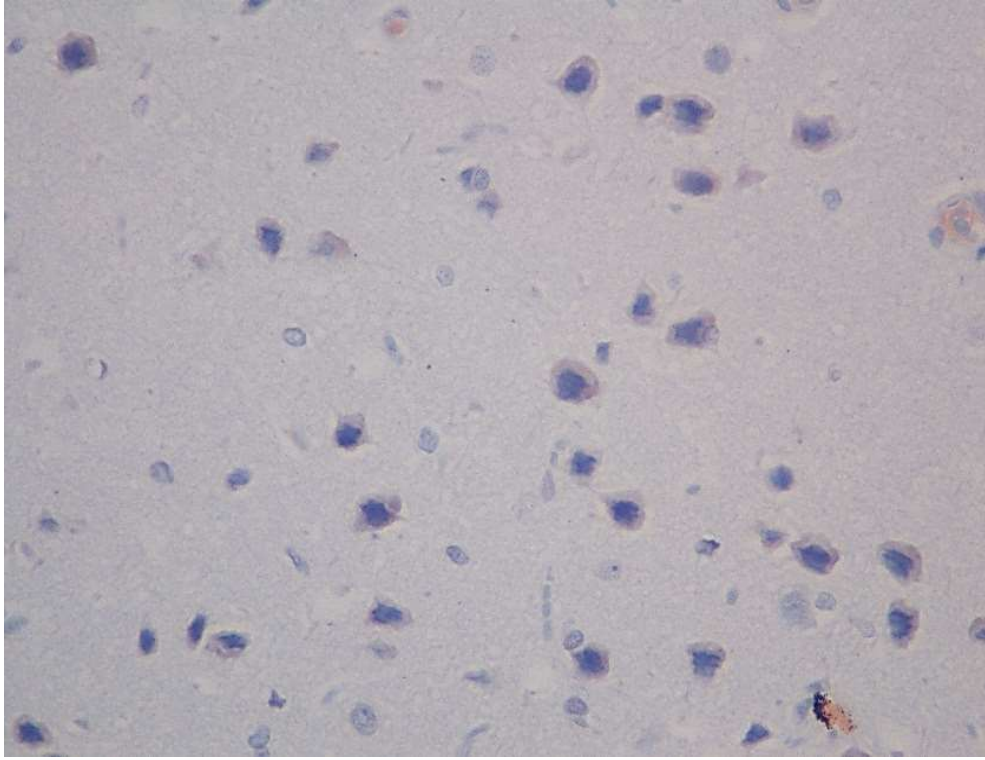
Kaspaz-3 boyama metodu uygulanmış kesitlerde korteks (Şekil 4.12) ve hipokampüs (Şekil 4.13) bölgelerinde kaspaz-3 (+) hücreye rastlanmadı.



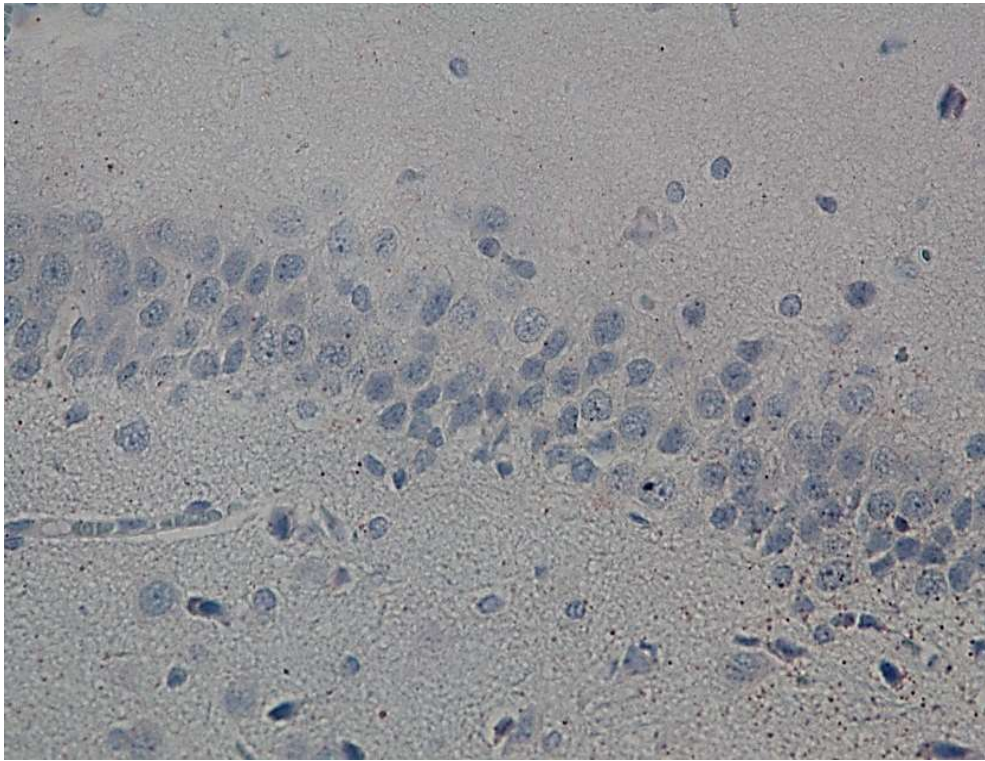
Şekil 4.10. ACA grubu: kortekste nöronların arasında üçgen şeklindeki büyük gövdeleriyle tanınan piramidal nöronlar (oklar). H-E; X40.



Şekil 4.11. ACA grubu: hipokampusun normal histolojik görünümü (oklar). H-E; X40.



Şekil 4.12. ACA grubu: Korteksde pozitif hücreye rastlanmadı. Kaspaz-3; X40.

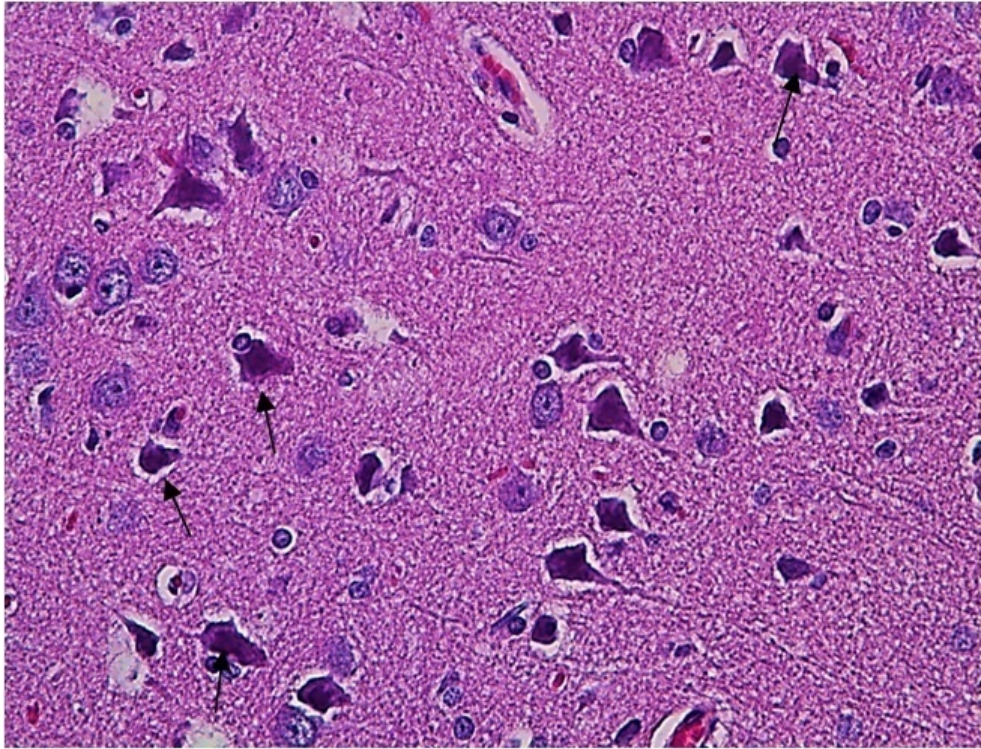


Şekil 4.13. ACA grubu: Hipokampusda pozitif hücreye rastlanmadı. Kaspaz-3; X40.

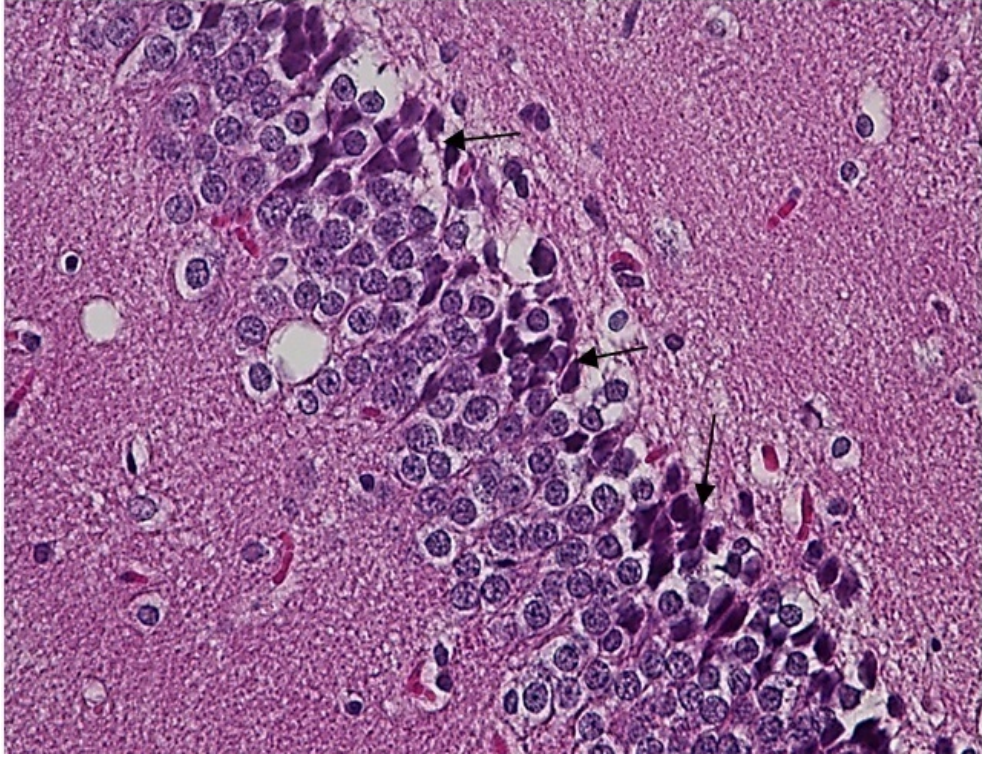
4.2.4. OKA Grubu Histolojik Değerlendirme

Hematoksilen-eozin boyama metodu uygulanmış kesitlerde serebral kortekste ve hipokampusda düzensiz sınırlı ve nükleus yoğunluğu artmış dejenere nöronlar görüldü (Şekil 4.14, Şekil 4.15). Dejenere nöronların sayısı bu grupta kortekste 7.48 ± 0.20 , hipokampusda 8.93 ± 0.34 olarak tespit edildi (Tablo 4.2). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında korteks ve hipokampus bölgelerinde dejenere nöron sayısının istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı görüldü ($p < 0.0001$).

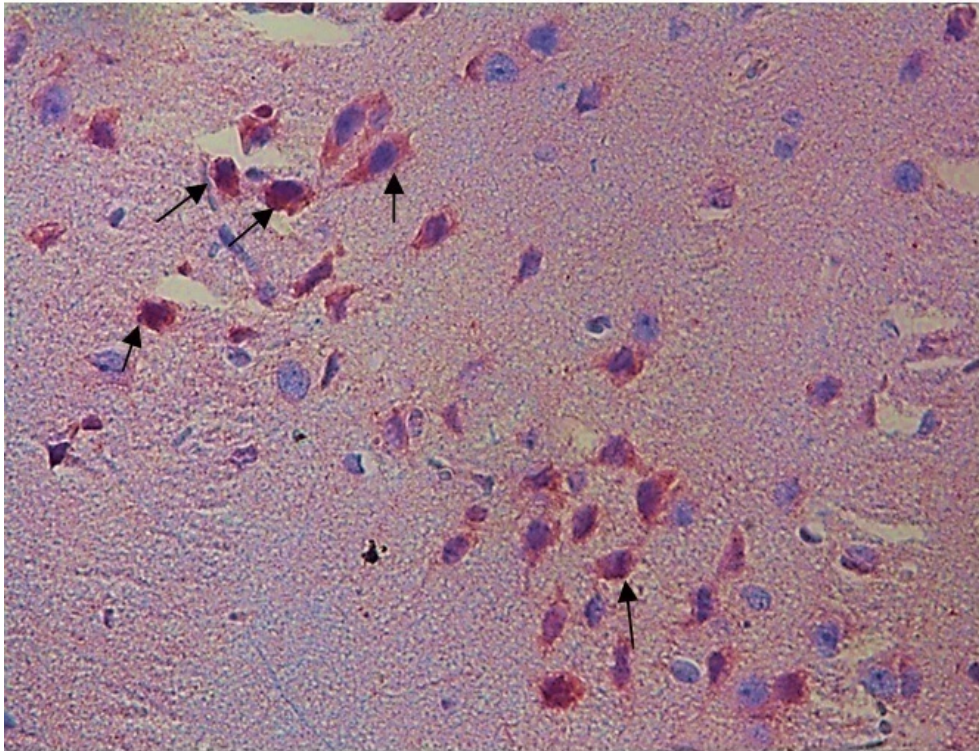
Kaspaz-3 boyama metodu uygulanan kesitlerde kaspaz-3 (+) (Şekil 4.16, Şekil 4.17) hücre sayısı korteks 6.27 ± 0.34 ve hipokampusda 5.06 ± 0.18 olarak tespit edildi (Tablo 4.2). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta kaspaz-3 (+) hücre sayısının istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı gözlemlendi ($p < 0.0001$).



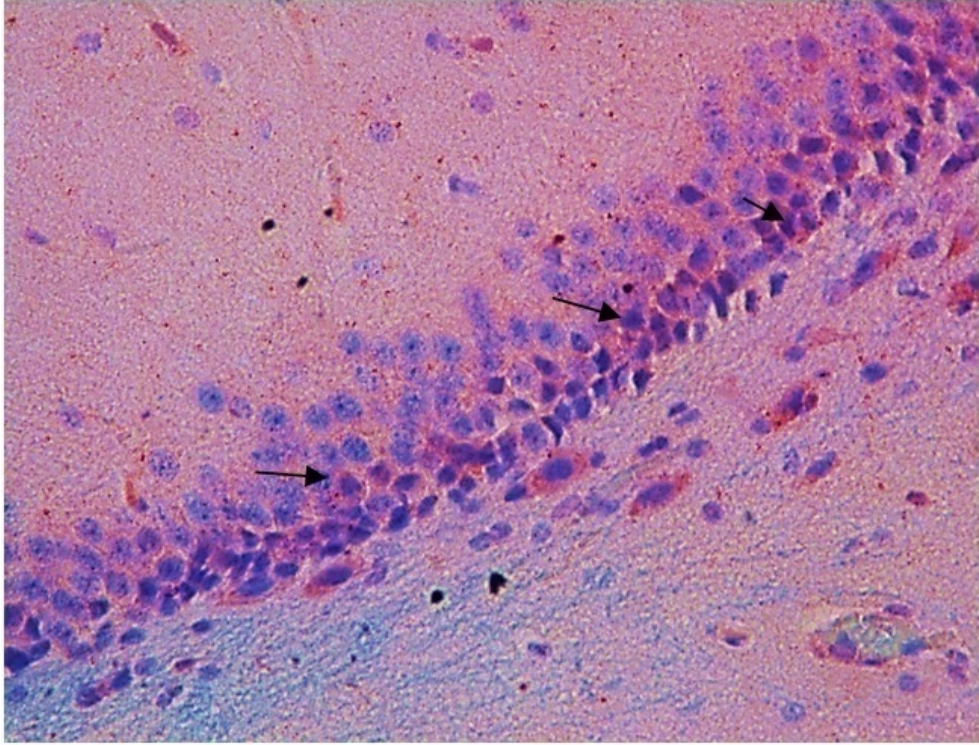
Şekil 4.14. OKA grubu. Kortekste sınırları düzensiz, sitoplazması asidofil, nükleusu heterokromatik ve büzüşmüş dejenere nöronların görünümü (oklar). H-E; X40.



Şekil 4.15. OKA grubu. Hipokampüste sınırları düzensiz, sitoplazması asidofil, nükleusu heterokromatik ve büzüşmüş dejenere nöronların görünümü (oklar). H-E; X40.



Şekil 4.16. OKA grubu. Korteksde kaspaz 3 (+) hücreler izleniyor (oklar). Kaspaz 3; X40.

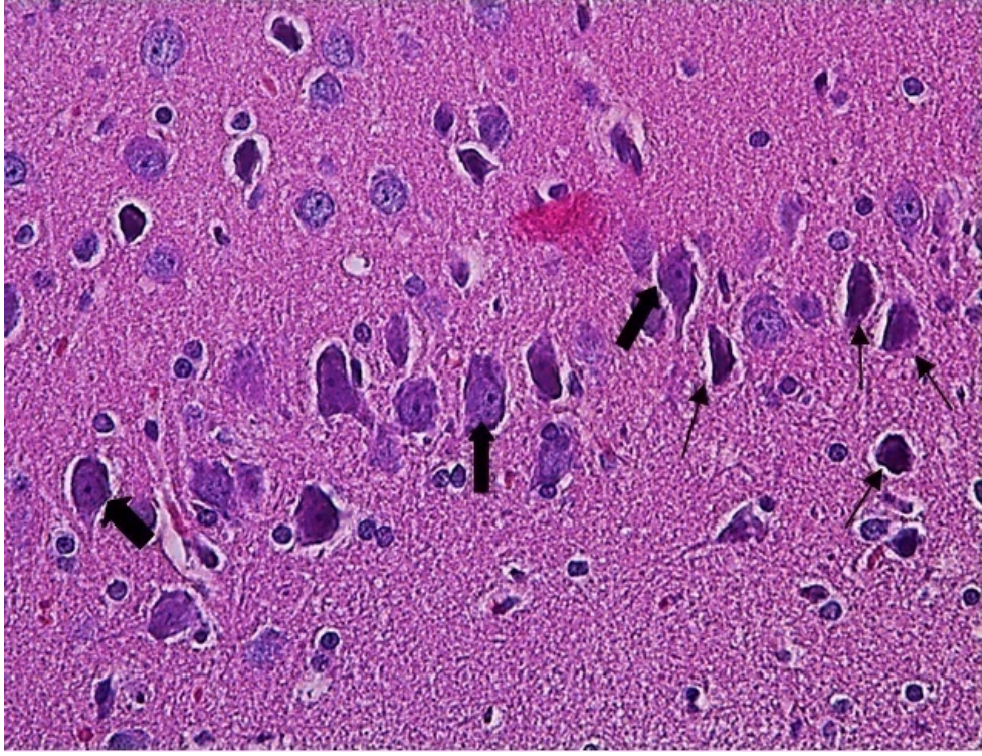


Şekil 4.17. OKA grubu. Hipokampusda kaspaz 3 (+) hücreler izleniyor (oklar). Kaspaz 3; X40.

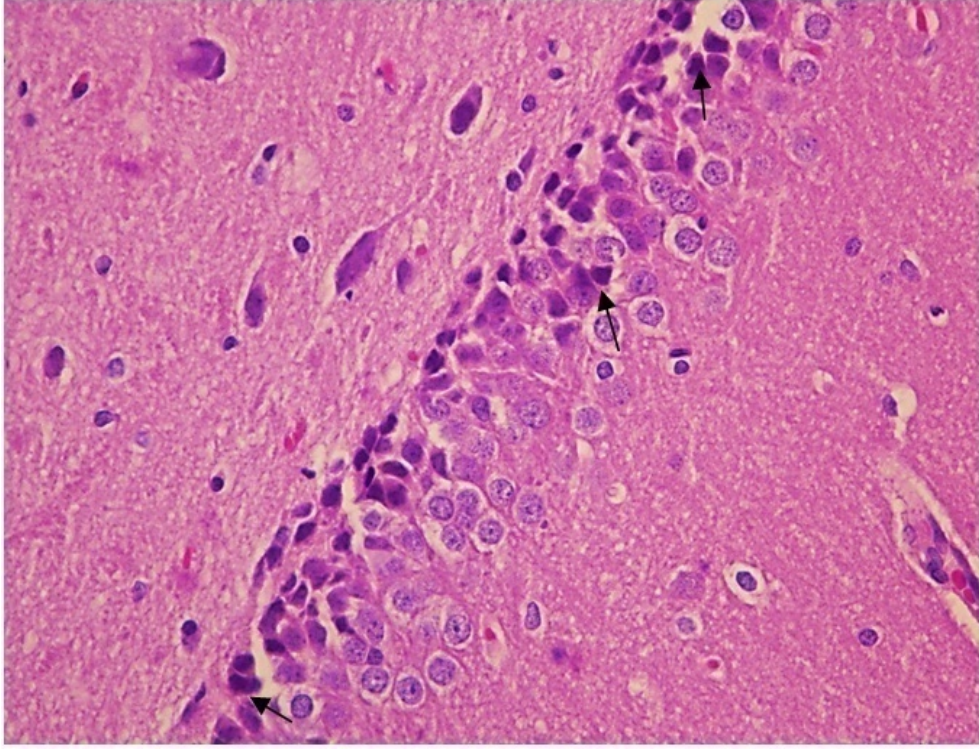
4.2.5. OCA+ACA Grubu Histolojik Değerlendirme

Hematoksilen-eozin boyama metodu uygulanmış kesitlerde dejenere nöronların (Şekil 4.18, Şekil 4.19) sayısı bu grupta korteksde 5.48 ± 1.35 , hipokampusda 5.18 ± 0.16 olarak tespit edildi (Tablo 4.2). OKA grubu ile karşılaştırıldığında korteks ve hipokampus bölgelerinde dejenere nöron sayısının istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı tespit edildi ($p < 0.0001$).

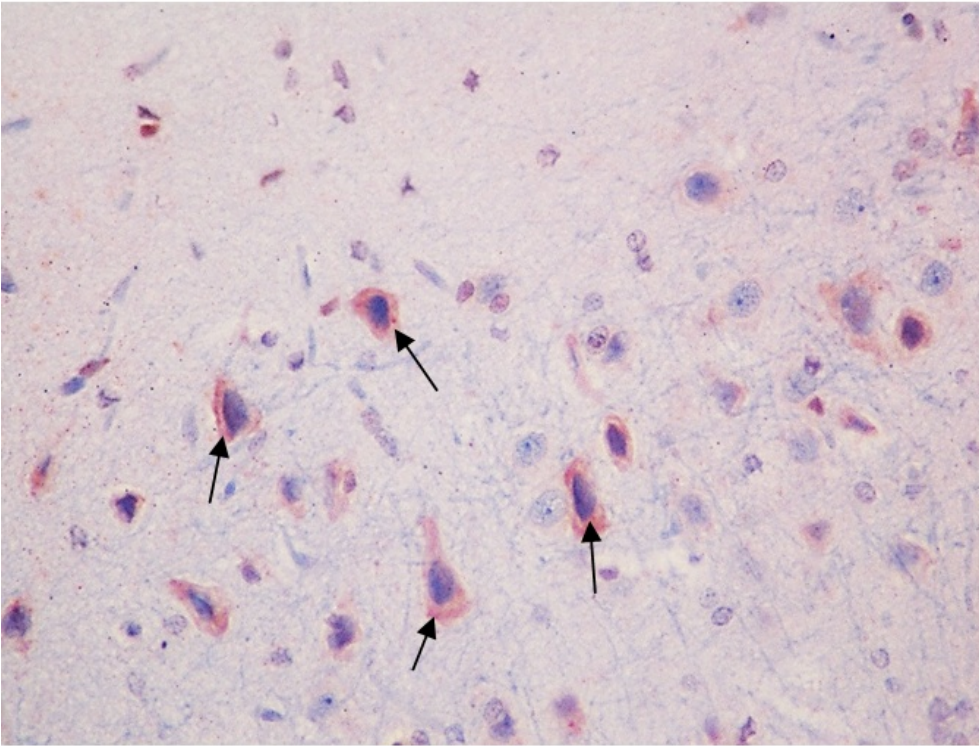
Kaspaz-3 boyama metodu uygulanan kesitlerde kaspaz-3 (+) hücre (Şekil 4.20, Şekil 4.21). Sayısı korteks 2.90 ± 0.28 ve hipokampusda 2.66 ± 0.23 olarak tespit edildi (Tablo 4.2). OKA grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta pozitif hücre sayısının istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi ($p < 0.0001$).



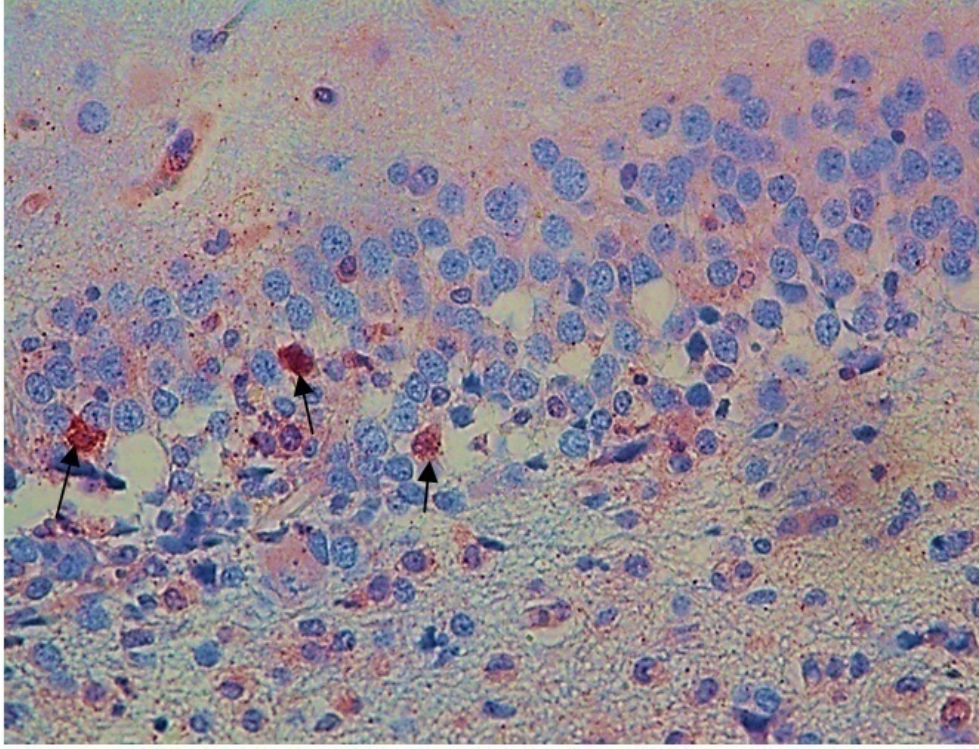
Şekil 4.18. OKA+ACA grubu. Kortekste sağlam nöronların arasında (kalın oklar) sınırları düzensiz, sitoplazması asidofil, nükleusu heterokromatik ve büzüşmüş dejenere nöronların görünümü (oklar). H-E; X40.



Şekil 4.19. OKA+ACA grubu. Hipokampusda sınırları düzensiz, sitoplazması asidofil, nükleusu heterokromatik ve büzüşmüş dejenere nöronların görünümü (oklar). H-E; X40.



Şekil 4.20. OKA+ACA grubu. Kortekste kaspaz 3 (+) hücreler izleniyor (oklar). Kaspaz 3; X40.



Şekil 4.21. OKA+ACA grubu. Hipokampusda kaspaz 3 (+) hücreler izleniyor (oklar). Kaspaz-3; X40.

Tablo 4.2. Tüm grupların korteks ve hipokampus dejenere nöron sayıları ve kaspaz (+) hücre sayıları.

Parametreler	Kontrol ort±SD	Sham ort±SD	ACA ort±SD	OKA ort±SD	OKA+ACA ort±SD
Dejenere nöron sayısı (korteks)	0.48±0.10 ^a	0.30±0.75 ^a	0.31±0.67 ^a	7.48±0.20 ^b	5.48±1.35 ^c
Dejenere nöron sayısı (hipokampus)	0.21±0.62 ^a	0.30±0.78 ^a	0.25±0.62 ^a	8.93±0.34 ^b	5.18±0.16 ^c
Kaspaz 3 (+) hücre sayısı (korteks)	0.30±0.01 ^a	0.20±0.01 ^a	0.40±0.01 ^a	6.27±0.34 ^b	2.90±0.28 ^c
Kaspaz 3 (+) hücre sayısı (hipokampus)	0.20±0.01 ^a	0.30±0.01 ^a	0.30±0.01 ^a	5.06±0.18 ^b	2.66±0.23 ^c

(a, b ve c birbirinden farklı, ^{a,b,c}p<0.0001).

4.3. Morris Su Labirenti Deneyi Sonuçları

4.3.1. Morris Su Labirenti Testinde 1. Güne Göre Diğer Günlerin Karşılaştırması

Morris su labirenti testinde grupların günlere göre platformu bulma sürelerinin ve mesafelerinin karşılaştırılması Tablo 4.3, ve Tablo 4.4' te gösterilmiştir.

Kontrol grubunda platformu bulma süresinin günlere göre karşılaştırılmasında (Şekil 4.22); birinci güne göre ikinci ($p<0.008$), üçüncü ($p<0.005$) ve dördüncü günde ($p<0.005$) anlamlı olarak platformu bulma süresinin kısaldığı görüldü. Kontrol grubunun platformu bulma mesafesini günlere göre karşılaştırdığımızda (Şekil 4.23) birinci güne göre ikinci ($p<0.007$), üçüncü ($p<0.005$) ve dördüncü ($p<0.005$) günde platformu bulma mesafesinin anlamlı olarak kısaldığını gözlemledik.

Tablo 4.3. Morris su labirenti testinde platformu bulma sürelerinin 1. güne göre diğer günlerin karşılaştırılması.

Gruplar	1.gün (sn) ort±SD	2.gün (sn) ort±SD	3.gün (sn) ort±SD	4.gün (sn) ort±SD
Kontrol	73.2±16.41 ^a	47.6±14.56 ^b	37.8±16.85 ^b	29.2±13.33 ^b
Sham	58.8±24.47 ^a	36.8±13.34 ^b	30±14.52 ^b	15.2±7.89 ^b
ACA	60.8±22.91 ^a	41.5±18.32 ^b	32.4±15.92 ^b	19.8±12.62 ^b
OKA	75.66±14.93 ^a	66.22±13.23 ^a	57,77±15.62 ^a	45.88±19.05 ^b
OKA+ACA	71.3±19.06 ^a	58.6±14.15 ^b	32.5±13.50 ^b	27±11.67 ^b

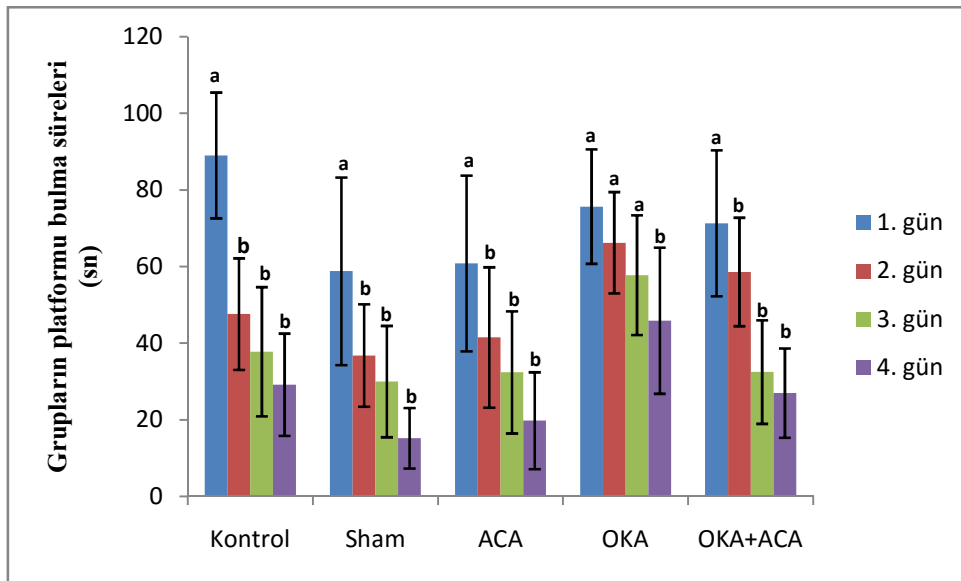
(a ve b birbirinden farklı, ^{a,b} $p<0.05$).

Tablo 4.4. Morris su labirenti testinde platformu bulma mesafelerinin 1. güne göre diğer günlerin karşılaştırılması.

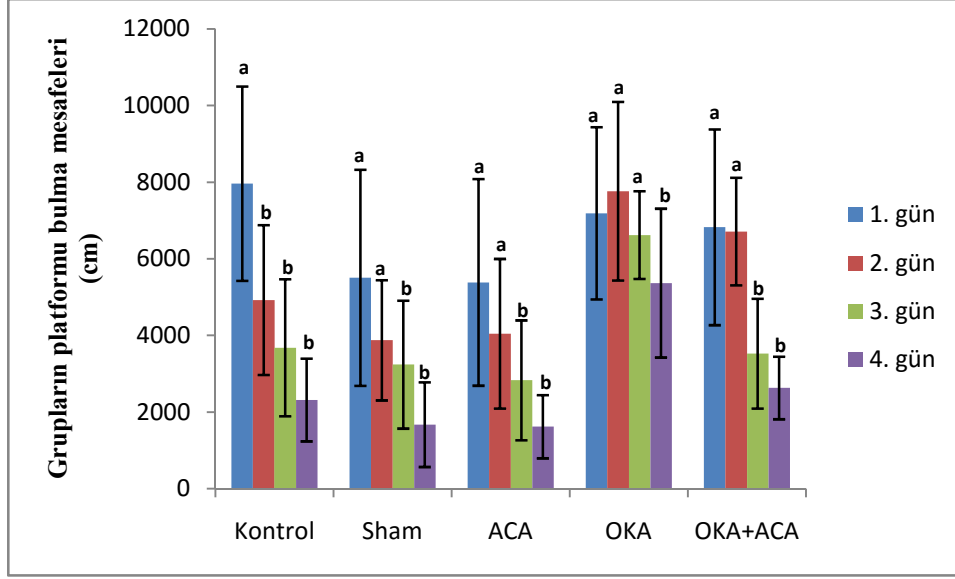
Gruplar

	1.gün (cm) ort±SD	2.gün (cm) ort±SD	3.gün (cm) ort±SD	4.gün (cm) ort±SD
Kontrol	7961±2535 ^a	4926±1954 ^b	3677±1787 ^b	2317±1081 ^b
Sham	5505±28174 ^a	3874±1568 ^a	3239±1669 ^b	1672±1104 ^b
ACA	5384±2694 ^a	4044±1952 ^a	2831±1562 ^b	1618±824 ^b
OKA	7188±2247 ^a	7763± 2331 ^a	6619±1146 ^a	5366±1941 ^b
OKA+ACA	6823±2553 ^a	6712±1403 ^a	3525±1432 ^b	2630±817 ^b

(a ve b birbirinden farklı, ^{a,b}p<0.05).



Şekil 4.22. Grupların platformu bulma süresinin 1. Güne göre diğer günlerin karşılaştırması.(a ve b birbirinden farklı, ^{a,b}p<0.05).



Şekil 4.23. Grupların platformu bulma mesafesinin 1. Güne göre diğer günlerin karşılaştırması.(a ve b birbirinden farklı, ^{a,b} p<0.05).

Sham grubunun platformu bulma süresini günlere göre karşılaştırıldığında (Şekil 4.22) birinci güne göre ikinci ($p<0.022$), üçüncü ($p<0.012$) ve dördüncü günde ($p<0.005$) platformu bulma süresi anlamlı olarak kısaldığı görüldü. Sham grubu platformu bulma mesafesi, günlere göre karşılaştırıldığında (Şekil 4.23) birinci güne göre üçüncü ($p<0.022$) ve dördüncü günde ($p<0.005$) platformu bulma mesafesi anlamlı olarak kısaldığı gözlemlendi. Birinci günde göre ikinci gün platformu bulma mesafesinin istatistiksel olarak anlamlı kısalmama göstermemesinin nedeni sham grubunun birinci günde de platformu bulma mesafesinin kısa olmasıydı.

ACA grubunun platformu bulma süresi günlere göre karşılaştırıldığında (Şekil 4.22) birinci güne göre ikinci ($p<0.047$), üçüncü ($p<0.011$) ve dördüncü günde ($p<0.007$) platformu bulma süresinin anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi. ACA grubu platformu bulma mesafesini günlere göre kıyasladığımızda (Şekil 4.23) birinci güne göre üçüncü ($p<0.017$) ve dördüncü günde ($p<0.009$) platformu bulma mesafesinin anlamlı olarak kısaldığı gözlemlendi. ACA grubunda platformu bulma mesafesinin birinci güne göre ikinci günde anlamlı olarak kısalmamasının nedeni sham grubunda olduğu gibi birinci günün platformu bulma mesafesinin de kısa olmasıydı.

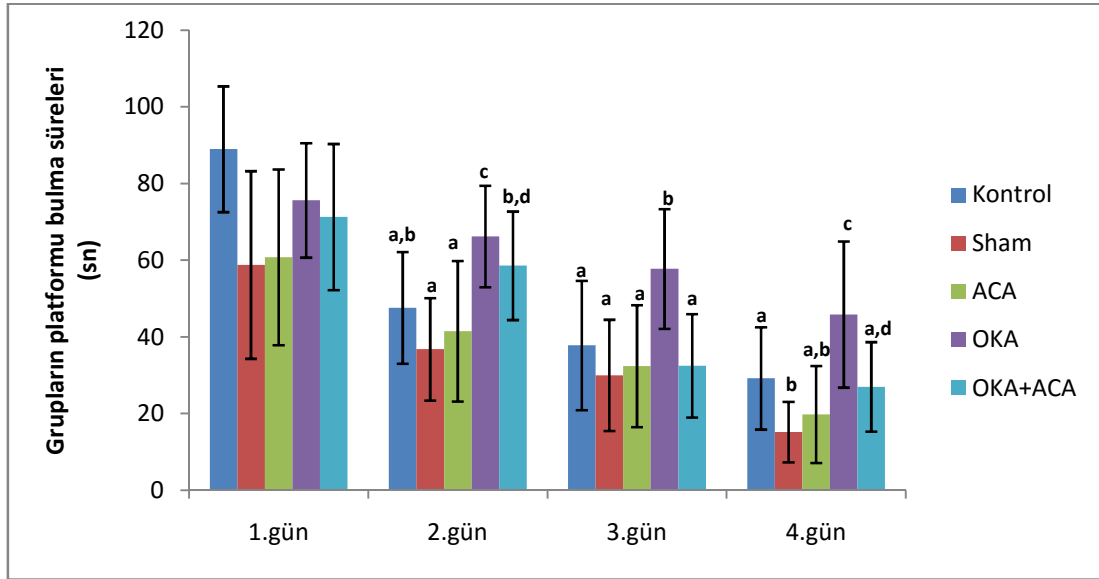
OKA grubunun platformu süresini günlere göre kıyasladığımızda (Şekil 4.22) birinci güne göre sadece dördüncü günde platformu bulma süresinin anlamlı olarak kısaldığını gözlemledik ($p<0.008$). OKA grubunun platformu bulma mesafesini günlere

göre kıyasladığımızda (Şekil 4.23) birinci güne göre sadece dördüncü günde platformu bulma mesafesinin anlamlı olarak azaldığını gözlemledik ($p<0.028$).

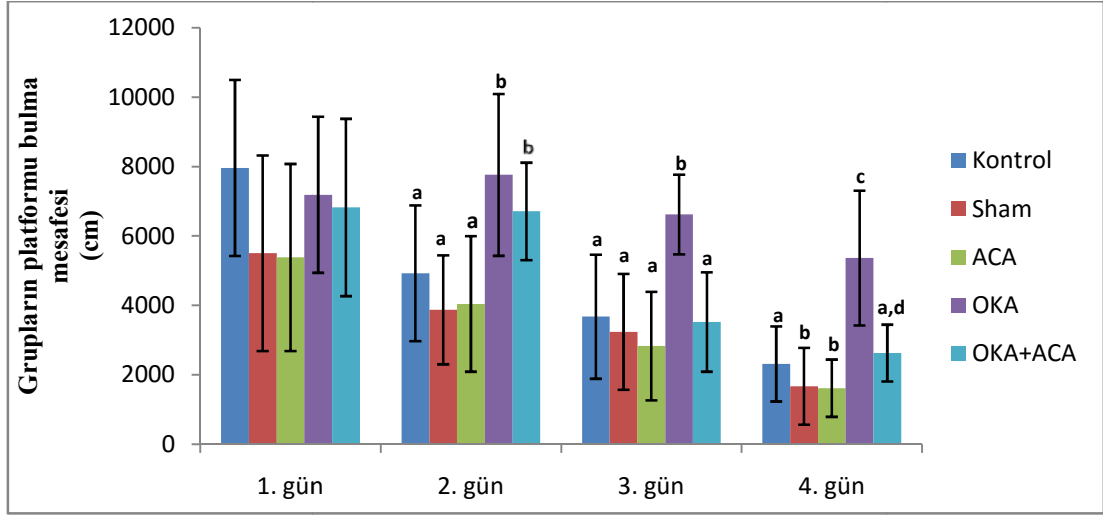
OKA+ACA grubunun platformu bulma süresini günlere göre karşılaştırdığımızda (Şekil 4.22) birinci güne göre ikinci ($p<0.021$), üçüncü ($p<0.007$) ve dördüncü günde ($p<0.005$) platformu bulma süresinin istatistiksel olarak anlamlı azaldığı gözlemlendi. OKA+ACA grubunun platformu bulma mesafesinin günlere göre karşılaştırılmasında (Şekil 4.23) ise birinci güne göre, üçüncü ($p<0.017$) ve dördüncü günde ($p<0.005$) platformu bulma mesafesi istatistiksel olarak anlamlı azaldığı gözlemlendi.

4.3.2. Morris Su Labirenti Testi Sonuçlarının Gruplar Arası Karşılaştırılması

Morris su labirenti testinde grupların günlere platformu bulma sürelerinin karşılaştırılması Şekil 4.24 ve Şekil 4.25’ de, Tablo 4.5 ve Tablo 4.6’ te gösterilmiştir.



Şekil 4.24. Tüm grupların günlere göre platformu bulma sürelerinin karşılaştırılması. (a, b, c ve d birbirinden farklı, $a,b,c,d p<0.05$).



Şekil 4.25. Tüm grupların platformu bulma mesafelerinin günlere göre karşılaştırılması. (a, b ve c birbirinden farklı, $a,b,c p < 0.05$).

Tablo 4.5. Morris su labirenti testinde grupların günlere platformu bulma sürelerinin karşılaştırılması.

Gruplar	1.gün (sn) ort±SD	2.gün (sn) ort±SD	3.gün (sn) ort±SD	4.gün (sn) ort±SD
Kontrol	73.2±16.41	47.6±14.56 ^{a,b}	37.8±16.85 ^a	29.2±13.33 ^a
Sham	58.8±24.47	36.8±13.34 ^a	30 ±14.52 ^a	15.2±7.89 ^b
ACA	60.8 ±22.91	41.5±18.32 ^a	32.4 ±15.92 ^a	19.8 ±12.62 ^{a,b}
OKA	75.66±14.93	66.22±13.23 ^c	57,77±15.62 ^b	45.88±19.05 ^c
OKA+ACA	71.3 ±19.06	58.6±14.15 ^{b,d}	32.5 ±13.50 ^a	27 ±11.67 ^{a,d}

(a, b, c ve d birbirinden farklı, $a,b,c,d p < 0.05$).

Tablo 4.6. Morris su labirenti testinde grupların günlere göre platformu bulma mesafelerinin karşılaştırılması.

Gruplar	1.gün	2.gün	3.gün	4.gün
	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)
	ort±SD	ort±SD	ort±SD	ort±SD
Kontrol	7961±2535	4926±1954 ^a	3677±1787 ^a	2317±1081 ^a
Sham	5505±28174	3874±1568 ^a	3239±1669 ^a	1672±1104 ^b
ACA	5384±2694	4044±1952 ^a	2831±1562 ^a	1618±824 ^b
OKA	7188±2247	7763± 2331 ^b	6619±1146 ^b	5366±1941 ^c
OKA+ACA	6823±2553	6712±1403 ^b	3525±1432 ^a	2630±817 ^{a,d}

(a, b, c ve d birbirinden farklı, ^{a,b,c,d} p<0.05).

Morris su labirenti testinde platformu bulma sürelerinin gruplar arası karşılaştırmasında birinci gün testin ilk günü olduğu için karşılaştırma yapılmadı. İkinci günün platformu bulma süresinin gruplar arası karşılaştırmasında, kontrol grubuna göre OKA grubunda platformu bulma süresinin anlamlı olarak uzadığını bulduk (p<0.05). Sham grubuna göre OKA ve OKA+ACA gruplarında, ikinci günde platformu bulma süresi anlamlı olarak uzadığı gözlemlendi (p<0.05). ACA grubuna göre ikinci günün platformu bulma süresi, OKA ve OKA+ACA gruplarında anlamlı olarak arttığı görüldü (p<0.05).

Grupların ikinci gün platformu bulma mesafesi karşılaştırıldığında; kontrol grubuna göre mesafenin OKA ve OKA+ACA gruplarında anlamlı olarak arttığı gözlemlendi (p<0.05). Sham grubunun ikinci gün platformu bulma mesafesi karşılaştırıldığında, OKA ve OKA+ACA gruplarında mesafenin anlamlı olarak arttığı görüldü (p<0.05). ACA grubunun ikinci gün platformu bulma mesafesi kıyaslandığında ise OKA ve OKA+ACA gruplarında mesafenin anlamlı olarak uzadığı gözlemlendi (p<0.05).

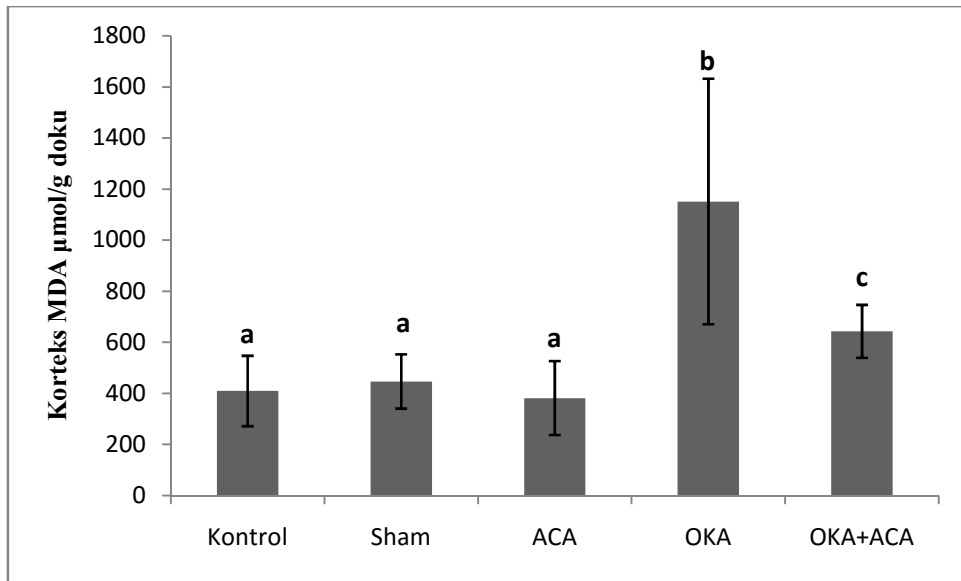
Morris su labirenti testinin üçüncü günü platformu bulma süresi karşılaştırıldığında; Kontrol, Sham ve ACA ve OKA+ACA gruplarına göre OKA grubunda bu sürenin anlamlı olarak uzama gösterdiği anlaşıldı (p<0.05). Üçüncü gün platformu bulma mesafesi karşılaştırıldığında ise Kontrol, Sham, ACA, OKA+ACA gruplarına göre OKA grubunda anlamlı olarak mesafenin uzadığı gözlemlendi (p<0.05).

Testin dördüncü günü değerlendirildiğinde: Sham grubuna göre Kontrol, OKA ve OKA+ACA gruplarında anlamlı olarak platformu bulma süresinin arttığı gözlemlendi ($p<0.05$). ACA grubuna göre ise OKA grubunda platformu bulma süresinin anlamlı olarak uzadığı görüldü. OKA+ACA grubunda platformu bulma süresi OKA grubuna göre anlamlı olarak azaldı ($p<0.05$). Dördüncü gün platformu bulma mesafesi gruplar arası karşılaştırmasında; Kontrol grubuna göre OKA grubunda platformu bulma mesafesinin anlamlı olarak arttığı belirlendi ($p<0.05$). Sham grubuna göre OKA ve OKA+ACA grubunda platformu bulma mesafesi anlamlı olarak arttı ($p<0.05$). ACA grubuna göre OKA ve OKA+ACA grubunda platformu bulma mesafesi anlamlı olarak arttı ($p<0.05$). OKA+ACA grubuna göre ise OKA grubunda platformu bulma mesafesinin anlamlı olarak arttığı gözlemlendi ($p<0.05$).

4.4. Oksidatif Stres Analizi Sonuçları

4.4.1. Grupların Korteks Dokusu MDA Seviyelerinin Karşılaştırması

Gruplardaki korteks dokusu MDA seviyeleri Tablo 4.7 ve Şekil 4.26' de gösterilmiştir. Korteks dokusu MDA seviyeleri; Kontrol, Sham, ACA gruplarına göre OKA ve OKA+ACA gruplarında anlamlı olarak artış gösterirken, OKA grubuna göre OKA+ACA grubunda anlamlı olarak azalma görüldü ($p<0.05$).



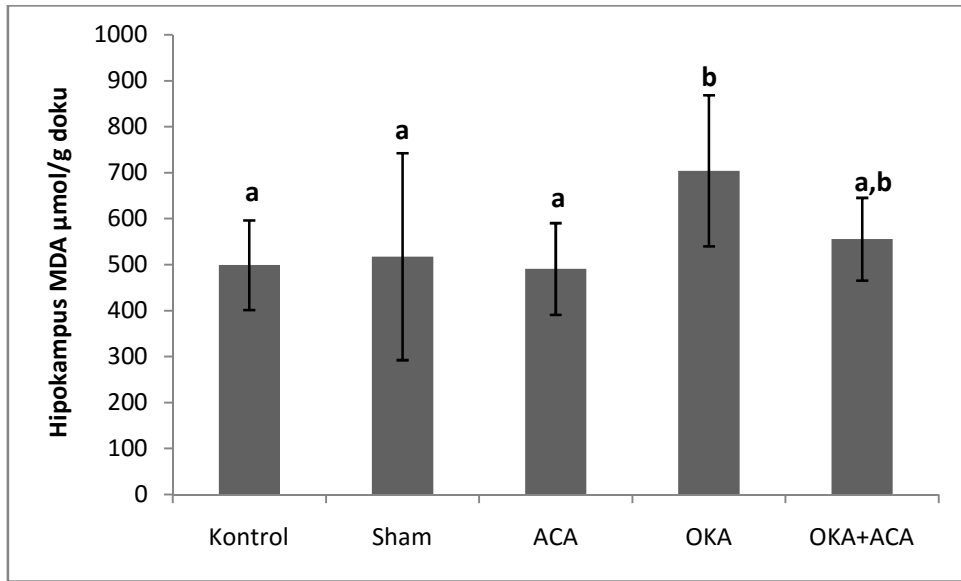
Şekil 4.26. Korteks dokusu MDA seviyeleri.

(a, b ve c birbirinden farklı, $a,b,c p<0.05$).

4.4.2. Grupların Hipokampus Dokusu MDA Seviyelerinin Karşılaştırılması

Gruplardaki hipokampus dokusu MDA seviyeleri Tablo 4.8 ve Şekil 4.27’da gösterilmiştir.

Kontrol, Sham, ACA gruplarına göre OKA grubunda hipokampus dokusu MDA seviyesi anlamlı artış gösterdi ($p<0.05$). OKA+ACA grubunda hipokampus dokusu MDA seviyesi OKA grubuna göre azalsa da bu değişim anlamlı değildi ($p>0.05$).



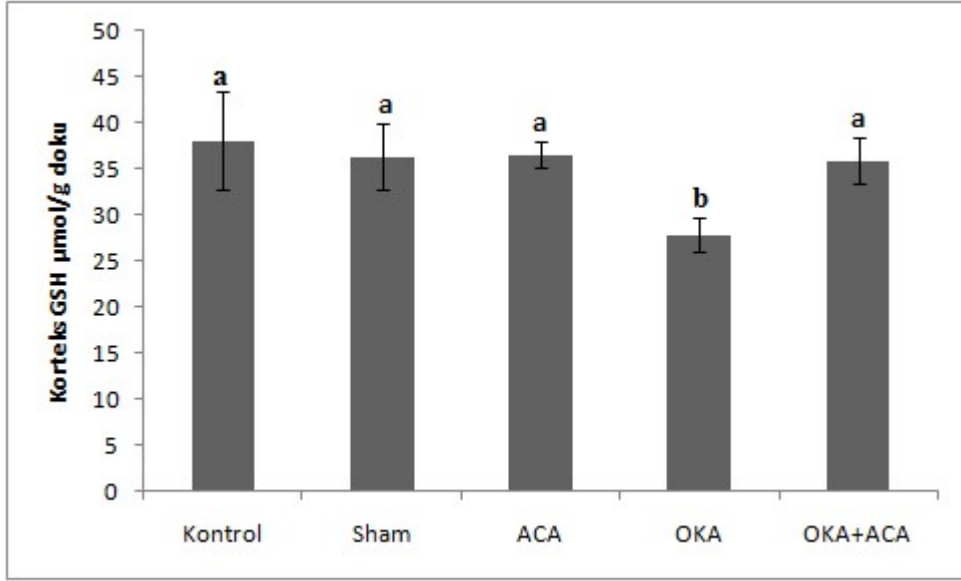
Şekil 4.27. Hipokampus dokusu MDA seviyeleri.

(a ve b birbirinden farklı, $a,b p<0.05$).

4.4.3. Grupların Korteks Dokusu GSH Seviyelerinin Karşılaştırması

Gruplardaki korteks dokusu GSH seviyeleri Tablo 4.7 ve Şekil 4.28’ de gösterilmiştir.

Kontrol, Sham, ACA, OKA+ACA gruplarına göre OKA grubunda korteks dokusu GSH seviyesinde anlamlı olarak azalma görüldü ($p<0.05$).



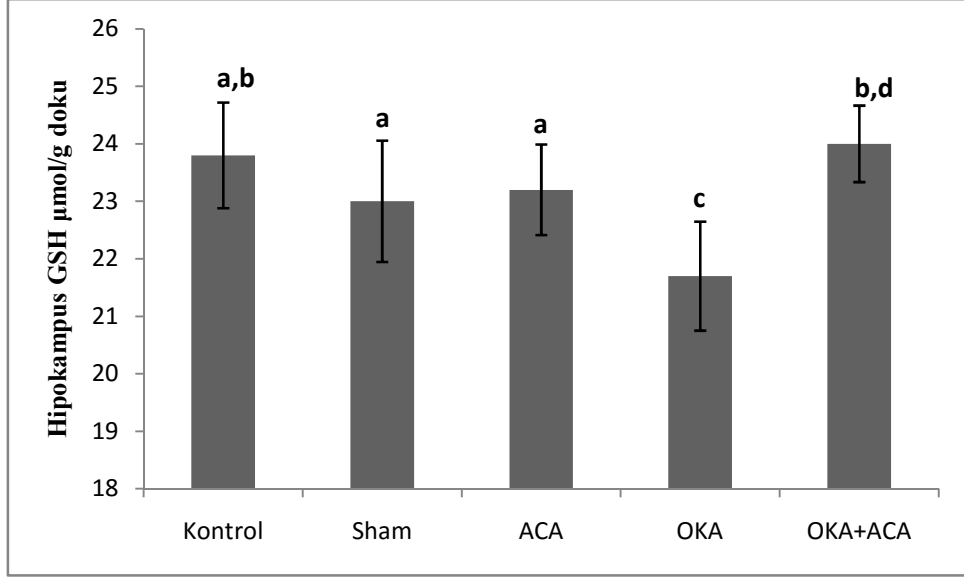
Şekil 4.28. Korteks dokusu GSH seviyeleri.

(a ve b birbirinden farklı, $^{a,b}p<0.05$).

4.4.4. Grupların Hipokampus Dokusu GSH Seviyelerinin Karşılaştırması

Gruplardaki hipokampus dokusu GSH seviyeleri Tablo 4.8 ve Şekil 4.29' de gösterilmiştir.

Kontrol, Sham, ACA ve OKA+ACA gruplarına göre OKA grubunda hipokampus dokusu GSH seviyelerinde anlamlı olarak azalma görülürken, Sham ve ACA gruplarına göre OKA+ACA grubunda anlamlı olarak artış görüldü ($p<0.05$).



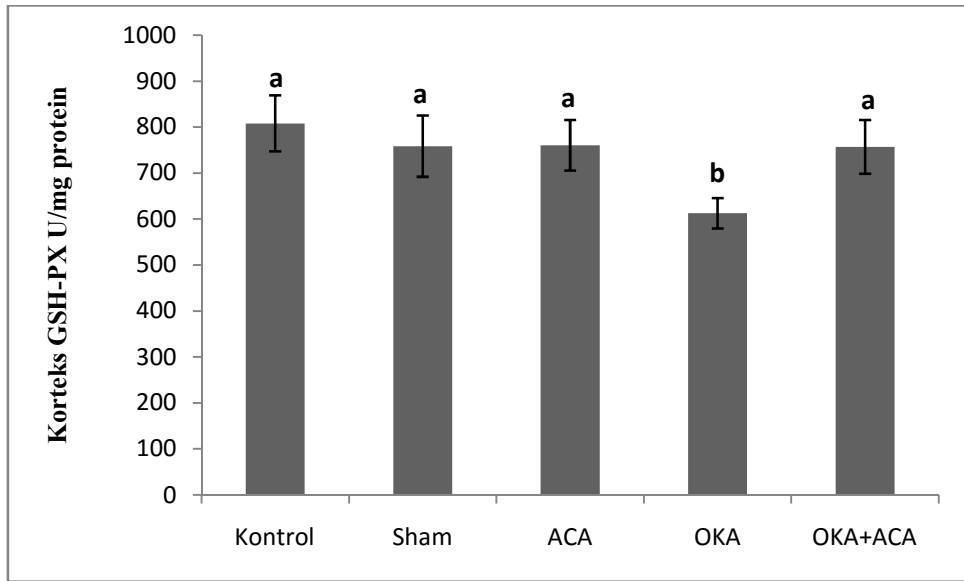
Şekil 4.29. Hippokampus dokusu GSH seviyeleri.

(a, b, c ve d birbirinden farklı, ^{a,b,c,d} $p < 0.05$).

4.4.5. Grupların Korteks Dokusu GSH-PX Enzim Aktivasyonu Seviyelerinin Karşılaştırması

Gruplardaki korteks dokusu GSH-PX enzim aktiviteleri Tablo 4.7 ve Şekil 4.30' de gösterilmiştir.

OKA grubunda GSH-PX enzim aktivitesi Kontrol, Sham, ACA, OKA+ACA gruplarına göre anlamlı olarak azaldı ($p < 0.05$).

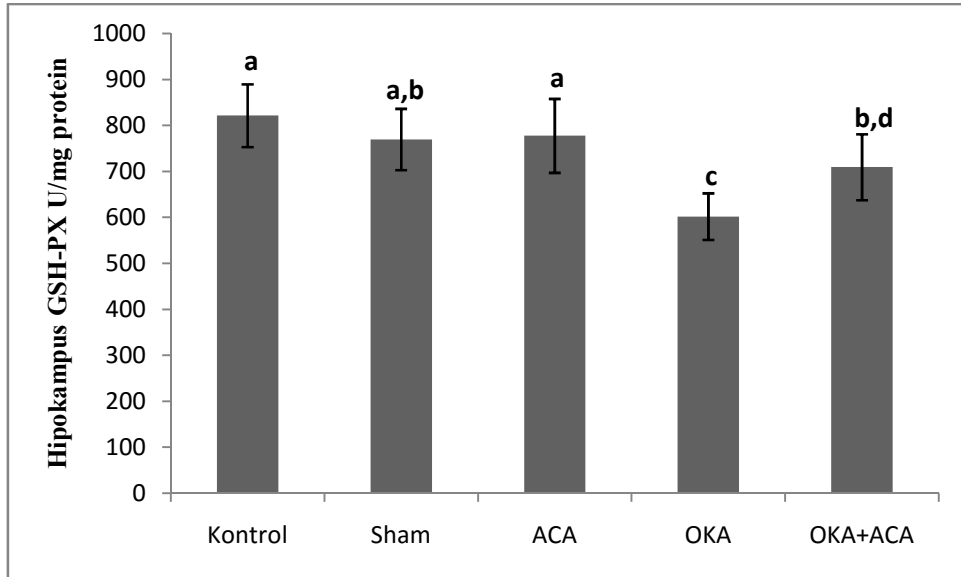


Şekil 4.30. Korteks dokusu GSH-PX enzim aktiviteleri.

(a ve b birbirinden farklı, ^{a,b} $p < 0.05$).

4.4.6. Grupların Hipokampus Dokusu GSH-PX Enzim Aktivasyonu Seviyelerinin Karşılaştırması

Gruplardaki hipokampus dokusu GSH-PX enzim aktiviteleri Tablo 4.8 ve Şekil 4.31’ de gösterilmiştir. Gruplar karşılaştırıldığında, kontrol grubuna göre OKA ve OKA+ACA gruplarında hipokampus dokusu GSH-PX enzim aktivitesinde azalma görüldü ($p<0.05$). Sham grubuna göre OKA grubunda hipokampus dokusu GSH-PX enzim aktivitesi azaldı ($p<0.05$). ACA grubuna göre OKA ve OKA+ACA gruplarında hipokampus dokusu GSH-PX enzim aktiviteleri anlamlı olarak azalırken ($p<0.05$), OKA+ACA grubunda enzim aktivitelerinin OKA grubuna göre anlamlı olarak arttığı görüldü ($p<0.05$).



Şekil 4.31. Hipokampus dokusu GSH-PX enzim aktiviteleri.

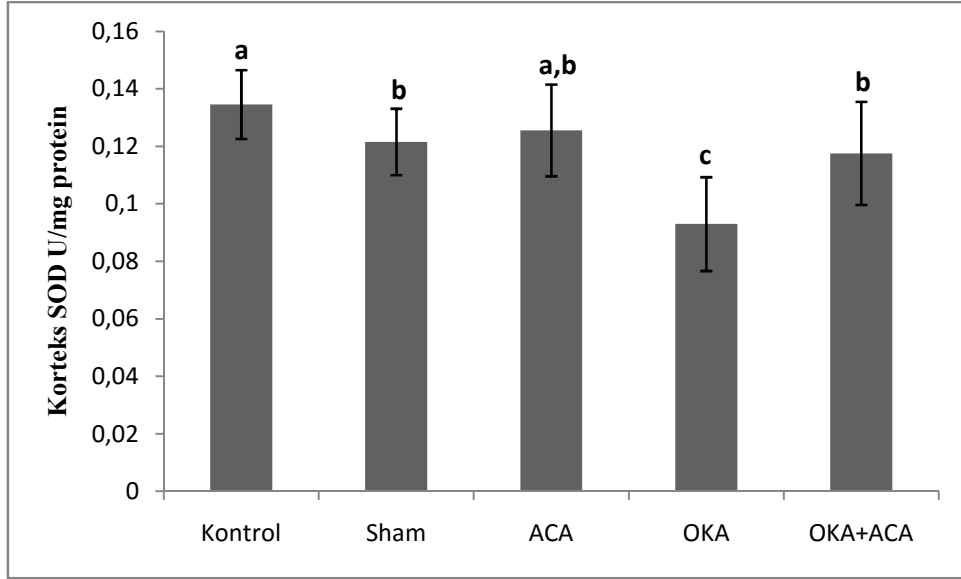
(a, b, c ve d birbirinden farklı, a,b,c,d $p<0.05$).

4.4.7. Grupların Korteks Dokusu SOD Enzim Aktivasyonu Seviyelerinin Karşılaştırması

Gruplardaki korteks dokusu SOD enzim aktiviteleri Tablo 4.7 ve Şekil 4.32’ de gösterilmiştir.

Kontrol grubuna göre Sham, OKA ve OKA+ACA gruplarında korteks dokusu SOD enzim aktivitesi azalma gösterirken, Sham ve ACA gruplarına göre OKA grubunda korteks dokusu SOD enzim aktivitesi anlamlı olarak azalma gösterdi

($p < 0.05$). OKA+ACA grubunda ise OKA grubuna göre korteks dokusu SOD enzim aktivitesi anlamlı olarak artış gösterdi ($p < 0.05$).



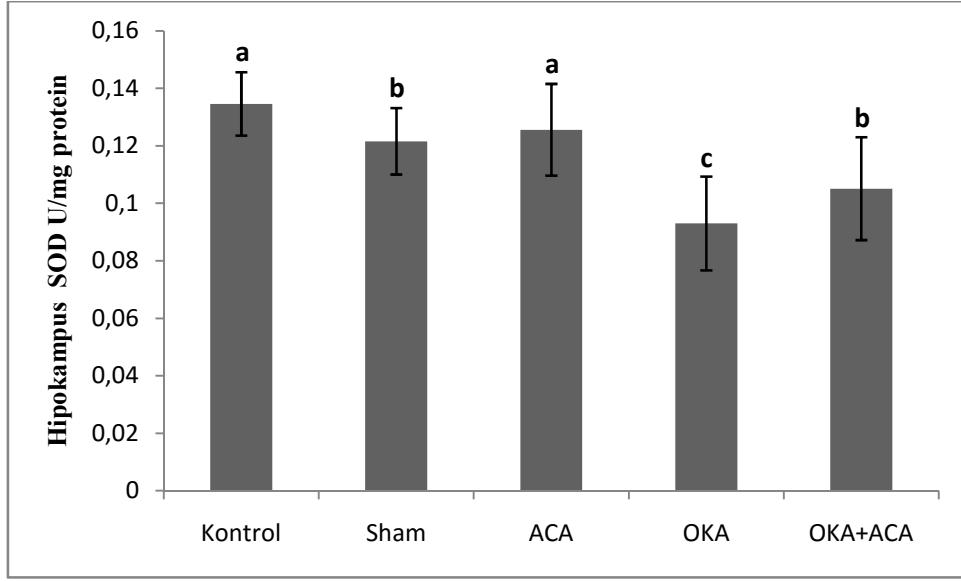
Şekil 4.32. Korteks dokusu SOD enzim aktiviteleri.

(a, b ve c birbirinden farklı, $a,b,c p < 0.05$).

4.4.8. Grupların Hipokampus Dokusu SOD Enzim Aktivasyonu Seviyelerinin Karşılaştırması

Gruplardaki Hipokampus dokusu SOD enzim aktiviteleri Tablo 4.8 ve Şekil 4.33' te gösterilmiştir.

Kontrol ve ACA grubuna göre Sham, OKA ve OKA+ACA gruplarında hipokampus dokusu SOD enzim aktivitesi azalma gösterirken, OKA grubundaki SOD enzim aktivitesi Sham ve OKA+ACA gruplarına göre azalma gösterdi ($p < 0.05$).



Şekil 4.33. Hipokampus dokusu SOD enzim aktiviteleri.

(a, b, c ve d birbirinden farklı, ^{a,b,c,d}p<0.05).

Tablo 4.7. Tüm grupların korteks MDA, GSH seviyeleri ve GSH-PX, SOD enzim aktiviteleri.

Gruplar	Korteks MDA µmol/g doku ort±SD	Korteks GSH µmol/g doku ort±SD	Korteks GSH-PX U/mg protein ort±SD	Korteks SOD U/mg protein ort±SD
Kontrol	409.28 ^a ±137.84	38.1 ^a ± 5,38	807.99 ^a ±60.82	0.1346 ^a ±0.0119
Sham	446.56 ^a ±106.03	36.4 ^a ± 3,59	758.57 ^a ± 66.65	0.1216 ^b ±0.01155
ACA	381.60 ^a ±144.72	36.6 ^a ± 1.34	760.44 ^a ±55.161	0,1256 ^{a,b} ±0.01596
OKA	1151.16 ^b ±480.71	27.9 ^b ± 1,85	612.54 ^b ±33.06	0.0930 ^c ±0.01632
OKA+ACA	642.60 ^c ±103.76	35.9 ^a ± 2.51	756.85 ^a ±58.34	0.1176 ^b ±0.01790

(a, b, c ve d birbirinden farklı, ^{a,b,c,d}p<0.05).

Tablo 4.8. Tüm grupların Hipokampus MDA, GSH seviyeleri ve GSH-PX, SOD enzim aktiviteleri.

Gruplar	Hipokampus MDA µmol/g doku ort±SD	Hipokampus GSH µmol/g doku ort±SD	Hipokampus GSH-PX U/mg protein ort±SD	Hipokampus SOD U/mg protein ort±SD
Kontrol	499.042 ^a ±97.41	238 ^{a,b} ±0.91	821,549 ^a ±68,182	0,1346 ^a ±0.011
Sham	517.53 ^a ±224.99	23 ^a ±1.05	769,771 ^{a,b} ±66,65	0.1216 ^b ±0.0115
ACA	490.74 ^a ±99.82	23.2 ^a ±0.78	777,541 ^a ±80,416	0.125 ^a ±0.0159
OKA	704.32 ^b ±164.09	21.7 ^c ±0.94	602,014 ^c ±50,724	0.0930 ^c ±0.0163
OKA+ACA	555.48 ^{a,b} ±89.95	24 ^{b,d} ±0.66	709,31 ^{b,d} ±71,84	0.1051 ^b ±0.017

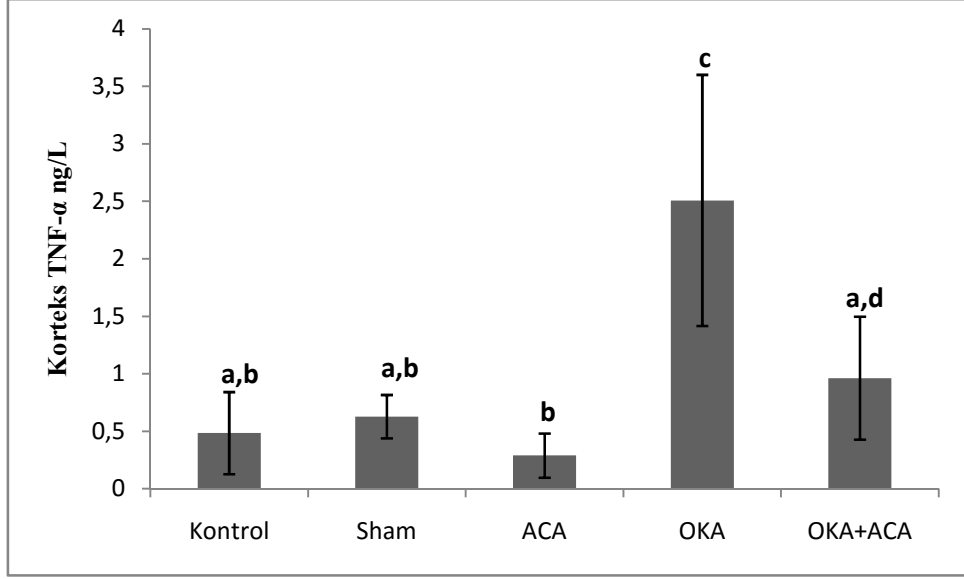
(a, b, c ve d birbirinden farklı, ^{a,b,c,d}p<0.05).

4.5. Korteks ve Hipokampus Dokusu TNF-α ve IL-1β Seviyeleri

4.5.1. Grupların Korteks Dokusu TNF-α Seviyelerinin Karşılaştırması

Gruplardaki korteks dokusu TNF-α seviyeleri Tablo 4.9 ve Şekil 4.34’de gösterilmiştir.

Kontrol, Sham, ACA ve OKA+ACA gruplarına göre OKA grubunda korteks dokusu TNF-α seviyesinde artma görülürken, ACA grubuna göre OKA+ACA grubunda TNF-α seviyesi artış gösterdi (p<0.05).

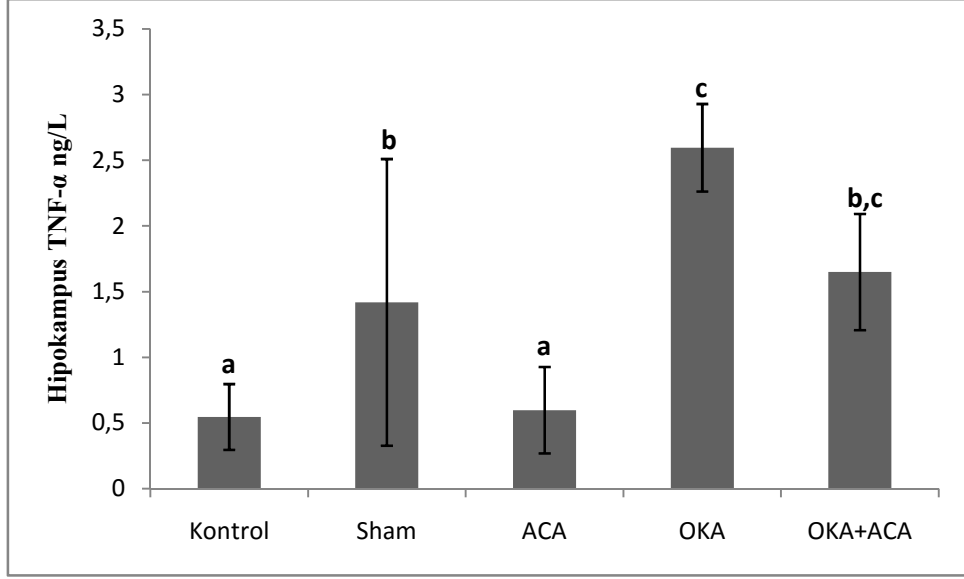


Şekil 4.34. Korteks dokusu TNF- α seviyeleri. a, b ve c birbirinden farklı. (a, b, c ve d birbirinden farklı, ^{a,b,c,d}p<0.05).

4.5.2. Grupların Hipokampus Dokusu TNF- α Seviyelerinin Karşılaştırması

Gruplardaki hipokampus dokusu TNF- α seviyeleri Tablo 4.9 ve Şekil 4.35’ de gösterilmiştir.

Kontrol ve ACA gruplarına göre Sham, OKA, OKA+ACA gruplarında hipokampus dokusu TNF- α seviyeleri anlamlı olarak arttı (p<0.05). Sham grubunda ise OKA grubuna göre hipokampus dokusu TNF- α seviyesi anlamlı olarak azalma gösterdi (p<0.05).

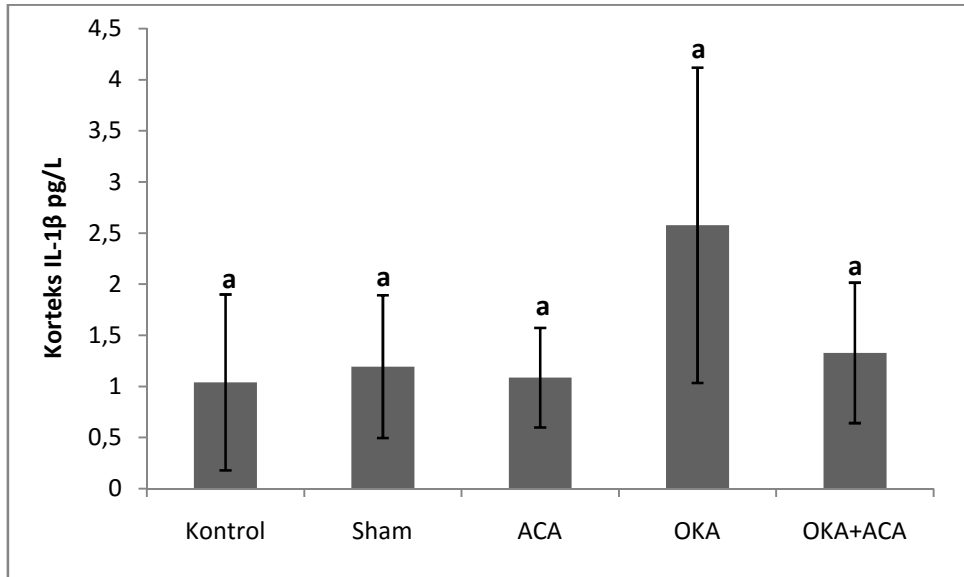


Şekil 4.35. Hipokampus dokusu TNF- α seviyeleri.
(a, b ve c birbirinden farklı, ^{a,b,c}p<0.05).

4.5.3. Grupların Korteks Dokusu IL-1 β Seviyelerinin Karşılaştırması

Gruplardaki korteks dokusu IL-1 β seviyeleri Tablo 4.9 ve Şekil 4.36’ da gösterilmiştir.

Gruplar arası korteks dokusu IL-1 β seviyelerini karşılaştırmada herhangi bir anlamlı değişiklik gözlenmedi (p>0.05).

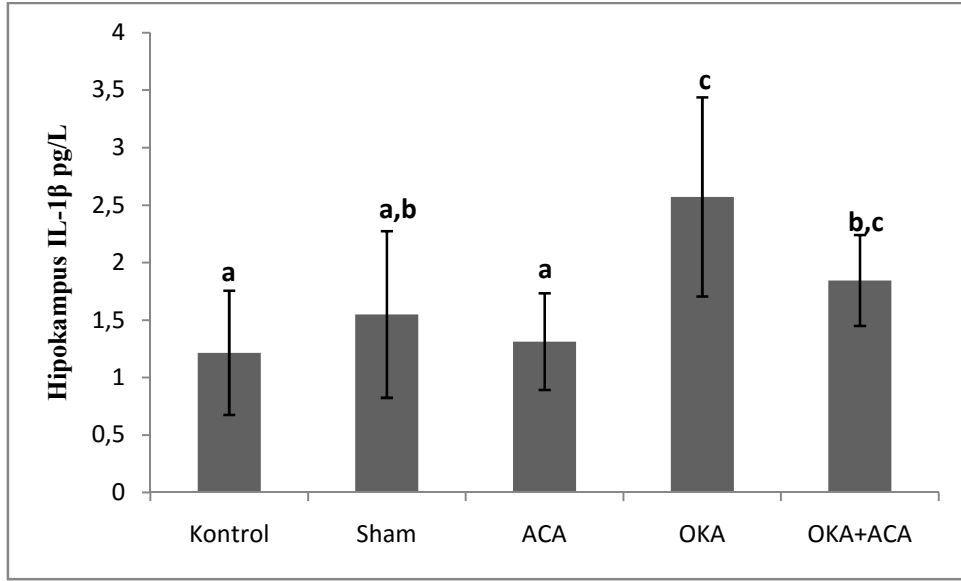


Şekil 4.36. Korteks dokusu IL-1 β seviyeleri.
(^ap>0.05)

4.5.4.2. Grupların Hipokampus Dokusu IL-1 β Seviyelerinin Karşılaştırması

Gruplardaki hipokampus dokusu IL-1 β seviyeleri Tablo 4.9 ve Şekil 4.37' de gösterilmiştir.

Kontrol ve ACA gruplarına göre OKA ve OKA+ACA gruplarında hipokampus dokusu IL-1 β seviyesi anlamlı olarak artma gösterirken, OKA grubunda hipokampus dokusu IL-1 β seviyesi Sham grubuna göre artış gösterdi ($p<0.05$).



Şekil 4.37. Hipokampus dokusu IL-1 β seviyeleri.

(a, b ve c birbirinden farklı, $a,b,c p<0.05$).

Tablo 4.9. Tüm grupların korteks ve hipokampus dokuları TNF- α ve IL-1 β seviyeleri.

Gruplar	Korteks	Korteks	Hipokampus	Hipokampus
	TNF- α	IL-1 β	TNF- α	IL-1 β
	ng/ L ort \pm SD	pg/L ort \pm SD	ng/ L ort \pm SD	pg/L ort \pm SD
Kontrol	0.4840 ^{a,b} \pm 0.757	1.0398 ^a \pm 0.86041	0,5469 ^a \pm 0.2501	1.2154 ^a \pm 0.5400
Sham	0.6278 ^{a,b} \pm 0.38823	1.1943 ^a \pm 0.69881	1,4185 ^b \pm 1.2911	1.5481 ^{a,b} \pm 0.7241
ACA	0.28884 ^b \pm 0.3916	1.0867 ^a \pm 0.48664	0,5982 ^a \pm 0.3284	1.3127 ^a \pm 0.4200
OKA	2.5080 ^c \pm 1.3923	2.5765 ^a \pm 1.54209	2,5948 ^c \pm 0.3334	2.5712 ^c \pm 0.8653
OKA+ACA	0.9622 ^{a,d} \pm 0.93524	1.3288 ^a \pm 0.68767	1,6489 ^{b,c} \pm 0.4421	1.8449 ^{b,c} \pm 0.3949

(a, b, c ve d birbirinden farklı, $a,b,c,d p<0.05$).

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında icv OKA uygulaması; bilişsel fonksiyonlarda bozulma, korteks ve hipokampus dokusunda oksidatif hasar, antioksidan enzim aktivitesinde azalma, inflamatuvar sitokin seviyesinde artışa neden oldu. Histopatolojik incelemede ise bu bulgularla uyumlu olarak korteks ve hipokampusde belirgin nörodejenerasyon ve apoptotik hücreler görüldü. OKA ile oluşturulan nörodejenerasyon modelinde ACA uygulaması, bellekteki bozulmayı, oksidatif hasarı, nöroinflamasyonu azalttı. Buna ek olarak histopatolojik iyileşme sağlayarak apoptotik hücre sayısını azalttı.

OKA, PP1 ve PP2A' nın selektif inhibitörüdür. Hücre zarını kolaylıkla geçebilir. PP1 ve PP2A enzim seviyesinin veya aktivitesinin düşük olması mikrotübül stabilitesini sağlayan tau proteininin hiperfosforile olmasına yol açar. Taunun hiperfosforile olması ise mikrotübül yapısının bozulmasına ve bunun sonucunda NFY oluşumuna götüren sürecin başlamasına neden olur. AH' da beyinde bu enzimlerin seviyesi ve aktivitesinin düşük olduğu bulunmuştur (29).

Tau proteini 1975' te keşfedilen insanda 6 farklı izoformu bulunan proteindir. Mikotübüllerin normal yapısının korunmasını sağlayan tauproteininin yapısında daha çok serine/threonine gibi fosforillenme özelliği yüksek olan aminoasitler bulunur. Fosforile olan tau proteini fosfotazlar tarafından defosforile edilir. Beyinde defosforilizasyon olayı çok büyük oranda PP1 ve PP2A tarafından gerçekleştirilir (110). Hiperfosforile olan tau sitozolde eşleşmiş helikal filamentler şeklinde birikir ve sonrasında bunlar bir araya gelerek NFY oluşur. Yapılan birçok çalışmada AH' da bilişsel fonksiyonlardaki bozulmayla NFY oluşumu arasında korelasyon bulunurken; plak oluşumuyla aynı korelasyon bulunmamıştır (111).

OKA' nın icv veya hipokampusa lokal enjeksiyonu tau hiperfosforilizasyonuna neden olur (66, 112). Aynı zamanda bilişsel fonksiyonlarda azalma, beyinde oksidatif hasar, kolinerjik aktivitede azalma, mikrogliyal aktivasyonda artma ve nöroinflamasyona neden olarak AH' da görülen patolojileri taklit ettiği anlaşılmıştır (9, 113, 114). İcv olarak 1 ve 2 haftalık OKA infüzyonunun bilişsel fonksiyonlarda azalmaya neden olduğu görülmüştür (115). Kamat ve ark. yaptığı çalışmada ise tek dozluk bilateral 200 ng icv OKA enjeksiyondan 14 gün sonra nörodejenerasyon tablosunun meydana gelerek, bilişsel fonksiyonlardaki bozulmaya diğer patolojik bulguların eşlik ettiği rapor edilmiştir (69).

Morris su labirenti testi rodentlerde yaklaşık 25 yıldır spasyal bellek ölçümü için en çok kullanılan testir. Görsel spasyal navigasyonda denen öğrenme sürecinde, rodentler sudan kaçarak saklı platformu bulmaya çalışır. Bu test nörojeneratif ve nöropsikiyatrik hastalık modellerini (AH, parkinson, şizofreni) test etmek için kullanılan bir yöntemdir. Bu testte hayvanların gösterdiği iyi performans beyindeki kolinerjik sistem, korteks ve hipokampal projeksiyonların fonksiyonunun düzgün işlediğinin göstergesidir. AH' da da bu fonksiyonlarda bozulma olduğu da bilinen bir gerçektir (116).

Bizim çalışmamızda OKA grubunda platformu bulma süresi ve platformu bulma mesafesi 1. güne göre 2. Günde, 3. günde anlamlı olarak azalma göstermezken; sadece 4. günde anlamlı olarak azalma görüldü. Platformu bulma süresi diğer gruplarda 1. güne göre diğer günlerin hepsinde diğer gruplara göre anlamlı olarak kısaldı. OKA+ACA grubunda 3. ve 4. günde platformu bulma mesafesi anlamlı kısalma gösterirken; Kontrol grubunda 2. günden itibaren mesafe anlamlı kısalma gösterdi. Günlere göre grupları kendi arasında kıyasladığımızda platformu bulma süresi ve mesafesi 2. günden itibaren OKA grubunda Kontrol, Sham, ACA gruplarına göre daha uzundu. Morris su labirenti testinde ACA uygulaması OKA ile oluşan bilişsel fonksiyonlardaki bozulmayı düzeltti. 1. güne göre diğer günleri kıyasladığımızda kontrol, sham gruplarında olduğu gibi ACA uygulaması platformu bulma süresinin 2. günden itibaren istatistiksel olarak anlamlı kısalma gösterdiğini bulduk. Oysa sadece OKA uygulanan grupta 1. güne göre sadece 4. günde platformu bulma süresi anlamlı olarak kısaldı. 1. güne göre platformu bulma mesafesi OKA+ACA grubunda 3. ve 4. günde anlamlı azalma gösterdi. OKA grubunda ise sadece 4. günde anlamlı azalma gösterdi. OKA+ACA grubunda platformu bulma süresi ve platformu bulma mesafesi kontrol grubuna yakın sonuçlar gösterdi. Sadece ACA uygulanan gruptaki sıçanlar morris su labirenti testinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa bile kontrol grubundaki hayvanlardan daha iyi performans gösterdi.

Yapılan çalışmalarda ACA' nın TRPM2 kanalı ve PLA₂ inhibisyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Diğer PLA₂ inhibitörleri TRPM2 kanalını inhibe etmezken ACA' nın hem TRPM2 kanalını hem de PLA₂'yi inhibe ettiği gösterilmiştir (11). ACA' nın TRPC6 ve TRPM8 kanalını inhibe ettiği gösterilse de bu iki kanalın beyindeki ekspresyonu azdır. Aynı zamanda TRPM2 ile TRPM8 kanalının amino asit dizisi büyük oranda benzerlik göstermektedir (76, 77). TRPM2 kanalı hücre içi ADPR ile ve H₂O₂ ile uyarılan Ca⁺⁺ geçirgen katyon kanalıdır. Kanalın oksidatif stresle uyarılması ve hücre içi Ca⁺⁺ düzeyini regüle etmesi hücre hasarıyla ilişkili olabileceği düşüncesini akla

getirmektedir. Bunların yanında beynin çeşitli bölgelerinde geniş dağılım göstermesi nörodejeneratif hastalıklarla bağlantılı olabileğini düşündürmektedir (88). Nitekim yapılan birçok çalışmada bu düşünceyi doğrular niteliktedir. Bir in vitro çalışmada A β ve H₂O₂ uygulanan primer striatal hücrelerde TRPM2 kanalının inhibisyonunun hücre içi Ca⁺⁺ seviyesini ve hücre ölümünü azalttığı rapor edilmiştir (92). Başka bir in vitro çalışmada hipokampal hücrelerde oksijen eksikliğine ve glutamat ile oluşturulan eksitotoksositeye bağlı hücre ölümünün TRPM2 inhibitörü clotrimazole ile azaldığı bildirilmiştir (93). Farelerde yapılan çalışmada; vahşi tip farelere ve TRPM2 kanalından yoksun transgenik farelere beyin iskemisi uygulanmış, TRPM2 knockout (KO) farelerin beyin iskemisine daha dayanıklı olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada TRPM2 KO farelerde CA1 piramidal nöron ölümünün, sitozolik Zn⁺⁺ kümeleşmesinin, post-iskemik bellek oluşumundaki bozulmanın azaldığı gösterilmiştir (117). Gelderblom ve ark. yaptığı çalışmada hem vahşi tip fareler hem de TRPM2 KO fareler beyin iskemisine maruz bırakılmış. Beyin iskemisi yapılan vahşi tip fareler iki gruba ayrılmış ve bir gruba ACA tedavisi uygulanmıştır. ACA uygulaması bizim çalışmamızda olduğu gibi ip 25 mg/kg olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın sonucunda ACA uygulanan ve TRPM2 KO farelerin beyindeki infarkt alanının vahşi tip farelere göre önemli ölçüde azalma gösterdiği rapor edilmiştir. Aynı zamanda TRPM2 KO ve ACA uygulanan farelerde beyinde immün hücre invazyonunun azaldığı gözlenmiştir (118). 2015 yılında APP/PS1 transgenik Alzheimer modelinde yapılan bir çalışmada A β oligomerlerinin TRPM2 kanal aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. TRPM2 geninin geninin susturulması endoplazmik retikulum stresinin azaltmış. Sinaps kaybını ve sinaptik protein seviyesindeki azalmayı engellemiş ve mikrogial aktiviteyi azalttığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada morris su labirenti testiyle bilişsel fonksiyonlar değerlendirilmiş ve TRPM2 geninin susturulması bilişsel fonksiyonlardaki bozulmayı önlemiştir (119).

Fetal dönemde PLA₂ aktivasyonunun sinir yenilenmesi ile ilgili rolü olduğu bilinmektedir. Post-mortem yapılan çalışmalarda AH'da beyinde PLA₂ aktivitesinin azaldığı bildirilmiştir. Transgenik AH modelinde yapılan çalışmada PLA₂ inhibisyonunun bilişsel bozulmayı önlediği rapor edilmiştir (120). İn vitro çalışmalarda PLA₂ inhibisyonunun APP ve A β proteini oluşumunu azaltırken, PLA₂ aktivasyonunun bu proteinlerin oluşumunu artırdığı bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda hem TRPM2 hem de PLA₂ inhibisyonu yapan ACA literatürle uyumlu olarak OKA ile oluşan bilişsel fonksiyonlardaki bozulmada iyileştirici etki gösterdi.

İmmün sistemin beyinde artan aktivasyonu anlamına gelen nöroinflamasyon AH patolojisinde önemli rol oynar. Nöroinflamasyon çeşitli hücrel ve moleküler cevap, intraselüler sinyal yollarının indüksiyonu ve inflamatuvar araçların salınımını kapsayan kompleks bir cevaptır. Bu cevap AH' da nöronal disfonksiyonu ve ölümü artırır (121). Merkezi sinir sisteminde kan beyin bariyerinin olması nedeniyle immün hücreler beyine kolaylıkla geçemez. Bundan dolayı beyinde yerleşik olan mikroglia adı verilen makrofajlar vardır. Bu hücreler yetişkin beynindeki hücre sayısının % 5-10' unu oluşturur. Temel fonksiyonu beyni patojenlerden ve zararlı maddelerden korumak, doku tamiri ve homeostasisine yardım etmektir. Merkezi sinir sisteminde major glial hücre tipleri astrositler ve mikroglia hücreleridir. Bu hücreler sitokin, kemokin, SOR, cyclooxygenase (COX)2 gibi inflamatuvar faktörler üretirler (33). AH' da nöroinflamasyonun en önemli belirteci beyinde artan inflamatuvar sitokin seviyesidir. TNF- α ve IL-1 β AH' da beyinde seviyesi artan sitokinlerdendir. TNF- α AH' nın hem erken döneminde hem de geç döneminde beyinde seviyesi artmaktadır (122). TNF- α sentez inhibitörü uygulamasının A β ile oluşan mikroglial aktivasyonu, inflamatuvar göstergeleri, nöronal dejenerasyonu, bellekteki bozulmayı hafiflettiği bildirilmiştir (123). IL-1 β AH' nın patolojisinde önemli rol oynayan sitokindir. IL-1 β salınımı AH' da hem A β hem de NFY ile ilişkilidir. IL-1 β seviyesinin yükselmesi veya beyin içi enjeksiyonunun bilişsel fonksiyonlarda bozulmaya neden olduğu bildirilmiştir (124, 125).

Bizim çalışmamızda OKA grubunda nöroinflamasyon göstergelerinde olan TNF- α seviyesi korteks ve hipokampus dokusunda arttı. IL-1 β seviyesi ise sadece hipokampus dokusunda artma gösterdi. OKA+ACA grubunda kortekste TNF- α seviyesi OKA grubuna göre anlamlı olarak azalma gösterirken, hipokampus dokusu TNF- α ve IL-1 β seviyesi OKA grubuna göre azalsa da bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi.

PLA₂ sadece hücre homeostasisini değil oksidatif ve inflamatuvar süreçleri de düzenler. PLA₂' nin, COX-2 ve iNOS ile bağlantılı inflamatuvar olayları düzenlediği bilinmektedir. Araştonik asit (AA) PLA₂' nin major metabolitidir. AA iyon kanallarının aktivitesini, nörotransmitter salınımını düzenler. AA yolağı aynı zamanda lökotrienler, prostaglandinler, tromboksan, 5-lipooksijenaz, siklooksijenaz gibi çok sayıda inflamatuvar araçları üretir. PLA₂ inhibisyonunun inflamasyonu ve inflamatuvar mediatörlerin oluşumunu önlemenin yanısıra A β ' ya bağlı nöron ölümünü de önlediği bildirilmiştir (13).

Yapılan çalışmalarda nöronal hasara bağlı gelişen mikroglial aktivasyonun, glial kemokin salınımının ve AH patolojisinde çok önemli yeri olan GSK3 β fosforilasyonunun TRPM2 KO hayvanlarda azaldığı gösterilmiştir (126, 127). A β ₁₋₄₀ uygulamasına bağlı gelişen hücre içi Ca⁺⁺ artışının, TRPM2 aktivitesinin ve serebral kan akımındaki azalmanın ACA ile engellediği rapor edilmiştir. Aynı çalışmada aynı zamanda A β ₁₋₄₀ uygulamasıyla meydana gelen nörovasküler fonksiyon bozukluğunun TRPM2 KO hayvanlarda ortaya çıkmadığı gösterilmiştir (94).

Reaktif oksijen türlerinin sensörü olan TRPM2 kanalı sinaptik plastisite, inflamasyon, nöropatik ağrı, oksidatif stres ve nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili sinyal yollarını düzenleyen bir kanaldır. TRPM2 kanalı mikroglia hücrelerinde oldukça yüksek oranda eksprese edilmiştir. Bir çalışmada mikroglialarda artan IL-1 β ile birlikte TRPM2 mRNA seviyesi de arttığı bildirilmiştir (128). Başka bir çalışmada oksidatif stresin astrositlerde TRPM2 mRNA ekspresyonunu artırdığı rapor edilmiştir (129).

Hem TRPM2 kanalının hemde PLA₂ inhibisyonunun inflamatuvar süreçte rolü olduğuna dair birçok çalışma mevcuttur (13, 128). Bizim çalışmamızda da ACA uygulaması inflamatuvar sitokin seviyesini azaltarak antiinflamatuvar etki gösterdi.

ACA' nın antiinflamatuvar özelliğiyle ilgili mevcut literatür değerlendirildiğinde; Melzer ve ark. yaptığı çalışmada ACA' nın T hücre proliferasyonunda rol oynadığı ve inflamatuvar sitokin seviyesini azalttığı gösterilmiştir (130). Gelderblom ve ark. yaptığı çalışmada beyin iskemi reperfüzyonu yapılan farelerde, ACA uygulamasının beyinde immün hücre invazyonunun azaldığı gösterilmiştir (118). Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular literatürdeki çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Epidemiyolojik çalışmalarda non-steroid antiinflamatuvar (NSAID) ilaç kullananlarda AH' nın görülme sıklığının daha düşük olduğu birçok çalışmayla ortaya konmuştur (78). NSAID ilaçların inflamasyonu engellediği, PLA₂'nin inflamatuvar süreçle doğrudan ilişkili olduğu ve AH' nın patolojisinde nöroinflamasyonun önemli rolü olduğu düşünülürse bu beklenebilir bir sonuçtur.

ROS biyolojik sistemlere zarar veren moleküllerdir. Vücutta O₂ molekülünden üretilen O₂⁻ radikalinin yaklaşık % 98' i mitokondirilerde üretilir. Oluşan O₂⁻ SOD enzimi tarafından H₂O₂' ye dönüştürülür. GSH-PX ve katalaz enzimi ise H₂O₂' i O₂ ve suya dönüştürür. Normal şartlarda ROS üretimi ile antioksidan savunma sistemi arasında denge bir vardır. Yaşlanma ve AH gibi çeşitli hastalıklarda ROS' un aşırı üretimi veya antioksidan savunma sisteminin yetersiz kalışıyla oksidatif stres ortaya

çıkır. Beyin membran fosfolipitleri, poliansatüre yağ asitlerinden oluştuğu için ROS saldırısına daha çok maruz kalır (30). Lipit peroksidasyonunun ve oksidatif hasarın AH' patolojisinde önemli rolü olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Lipit peroksidasyonu hücre membranının yapısını bozar. Proteinlerdeki oksidatif hasar nöronlar için önemli olan enzimlerin yapısını ve glial fonksiyonların bozulmasına neden olur. Bütün bu etkiler nöronu ölüme kadar götüren sürecin tetiklenmesine neden olur. Aβ plaklar ve NFY ROS üretimine neden olmakta, ROS ise nükleer faktör-κB aktivasyonu ile inflamatuvar süreci tetikleyebilmektedir. Oksidatif hasar sadece AH' da değil iskemik beyin hasarı, omurilik yaralanması, parkinson hastalığı, multiple sclerosis gibi başka nörodejeneratif hastalıklarda da görülür. PLA₂ bu nörodejeneratif hastalıklarda görülen oksidatif hasarı etkilediği ve PLA₂ inhibitörlerinin oksidatif hasarı ve lipit peroksidasyonunu azalttığı gösterilmiştir (131).

TRPM2; ADPR, hidrojen peroksit (H₂O₂), nikotinamid adenine dinükleotid (NAD⁺) tarafından aktive edilir (83). TRPM2 metabolik ve oksidatif stres sensörüdür. Yapılan çalışmalarda oksidatif stresin ADPR düzeyini artırarak doğrudan veya dolaylı olarak TRPM2 kanallarını uyardıkları gösterilmiştir (86, 87).

Bizim çalışmamızda korteks ve hipokampusda lipit peroksidasyonun göstergesi olan MDA seviyesi OKA grubunda diğer gruplara göre artma gösterdi. Antioksidan enzim olan SOD ve GSH-PX aktivasyonu azaldı. GSH-PX ile birlikte H₂O₂' in yıkımında rol oynayan antioksidan protein olan GSH seviyesi azaldı. Litetatürde ACA' nın oksidatif stresle aktive olan TRPM2 kanalını inhibe ettiğine (90) dair çalışma mevcuttur; ancak mevcut literatürde antioksidan enzim aktivitesine ve lipid peroksidasyonuna etkisine dair çalışmaya rastlanmamıştır. İlk defa biz bu tez çalışmasında ACA uygulamasının antioksidan enzim aktivitesi, GSH seviyesi, lipid peroksidasyonuna olan etkisini inceledik. Çalışmamızda ACA uygulamasının korteks ve hipokampus dokusunda OKA ile oluşan SOD, GSH-PX enzim aktivite ve GSH seviyesindeki azalmayı önlediğini bulduk. Aynı zamanda OKA ile korteks ve hipokampus dokularında meydana gelen lipid peroksidasyonu ACA uygulamasıyla birlikte azalma gösterdi.

Çalışmamızda histopatolojik incelemede OKA grubunda korteks ve hipokampusda nörodejenerasyon ve kaspaz-3 pozitif nöronlar görüldü. ACA uygulaması, korteks ve hipokampus bölgelerindeki OKA ile oluşan dejenerenöron sayısını azalttı. İmmünohistokimyasal incelemede ise ACA uygulamasıyla kaspaz-3 pozitif hücre sayısı azaldı.

Böbrek tübül hücrelerine ACA uygulamasının önemli ölçüde hücre ölümünü azalttığı gösterilmiştir (132). Demirdaş ve ark. yaptığı çalışmada ACA uygulamasının kaspaz-3 ve kaspaz-9 seviyesini azaltıp; apoptotik hücre sayısı ile birlikte ROS üretimini de azalttığı bildirilmiştir (133).

Kaspazlar programlanmış hücre ölümü olan apoptozun düzenlemesinde görev alan proteazlardır. Kaspaz-3 nöronal apoptozda anahtar rol alan mediatördür. Beyin iskemisi, Huntington hastalığı, amyotrofik lateral skleroz (ALS), parkinson hastalığı, AH gibi birçok nörodejenaratif hastalıkta kaspaz-3 aktivitesinin neden olduğu sinyal kaskadının nöronal hasarla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda nöronlarda sinaptik dejenerasyonla ve yaşlanmayla birlikte artan nöron hasarıyla da bağlantılı olduğu anlaşılmıştır (134, 135). Jiannng ve ark. yaptığı in vitro çalışmada OKA uygulamasının tau hiperfosforilasyonu ve oksidatif stres ile birlikte kaspaz-3 artışına neden olduğu gösterilmiştir (136). Kamat ve ark. yaptığı çalışmada icv OKA uygulanan sıçanlarda histopatolojik incelemede korteks ve hipokampusda nörodejenerasyon olduğu ve kaspaz-3 mRNA seviyesinin arttığı rapor edilmiştir (68).

TRPM2 kanalının aktivitesinin apoptotik yolağın aktive olmasına neden olduğu gösterilmiştir (137). Sun ve ark. yaptığı in vitro çalışmada TRPM2 kanalını inhibe eden antikör uygulaması ile TNF- α ve H₂O₂' e bağlı oluşan apoptotik hücre sayısını azaldığı, TRPM2 kanalının uyarılmasının ise kaspaz-8, kaspaz-9 ve kaspaz-3 aktivitesinin artmasına neden olduğu rapor edilmiştir (138).

PLA₂ aktivitesi apoptotik hücre ölümünün sinyal kaskadında önemli rol oynar. PLA₂ inhibisyonunun kortikal nöronlarda A β toksisitesine bağlı kaspaz-3 aktivitesini azalttığı bildirilmiştir (139). Başka çalışmalarda da PLA₂ inhibisyonunun hücre ölümünü azalttığı rapor edilmiştir (140, 141). Yapılan in vivo çalışmalarda PLA₂ aktivasyonunun nörodejenerasyonu artırırken, PLA₂ inhibitörü uygulamanın nöronal hasarını azalttığı rapor edilmiştir (2, 142, 143).

Literatürde ACA ile yapılmış çalışma sayısı kısıtlıdır. Çalışmamızdaki bulgular mevcut literatür bilgileriyle uyumludur. Tüm bulguları bir arada değerlendirdiğimizde ACA' nın nöroprotektif etkisi göze çarpmaktadır.

7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda elde ettiğimiz sonuçları ve önerileri aşağıdaki gibi gruplandırmak mümkündür.

1. OKA ile oluşturulan nörodejenerasyon modelinde; OKA uygulaması korteks ve hipokampus dokusunda antioksidan enzim aktivitesini azalttı. Lipit peroksidasyonuna neden olarak MDA seviyesini artırdı ve antioksidan protein olan GSH seviyesini azalttı. İnflamatuvar sitokinlerden TNF- α ve IL1- β seviyesini artırdı. Histopatolojik incelemede ise hem kortekste hem de hipokampus dokusunda dejenere nöronlar ve kaspaz pozitif hücreler görülmesine neden oldu. Morris su labirenti testinde; platformu bulma süresi ve platformu bulma mesafesi uzadı. Bütün bu bulgular oluşturmaya çalıştığımız nörodejenerasyon modelinin gerçekleştiğini göstermektedir.

2. Oluşturduğumuz bu nörodejenerasyon modelinde, TRPM2 ve PLA₂inhibitörü olan ACA uygulaması antioksidan etki göstererek; korteks ve hipokampus dokusunda antioksidan enzim aktivitesini (SOD, GSH-PX) artırdı ve MDA seviyesini azaltırken GSH seviyesini artırdı. Oksidatif stres ile aktive olduğu bilinen TRPM2 kanallarının SOR ile doğrudan ilişkisi vardır. PLA₂ inhibisyonunun da oksidatif hasarı azalttığı mevcut literatürlerde ortaya konmuştur. Bizim çalışmamızda mevcut literatürle uyumlu olarak ACA uygulamasıyla oksidatif hasar azaldı.

3. İcv OKA uygulaması ile artan inflamatuvar sitokin (TNF- α ve IL1- β) seviyesi, ACA uygulamasıyla azaldı. Bu etkisiyle ACA antiinflamatuvar etki göstermektedir. PLA₂'nin inflamatuvar yolakla doğrudan ilişkisi vardır. PLA₂ inhibisyonunun lökotrienler, prostaglandinler, tromboksan, lipooksijenaz, siklooksijenaz gibi inflamatuvar aracılardan oluşumunu önlediği bilinmektedir. TRPM2 kanallarının inhibisyonunun nöroinflamasyonu engellediğine dair çalışmalar vardır. Bizim çalışmamız da mevcut literatürle benzerlik gösterdi ve ACA uygulaması ile nöroinflamasyonun belirteçlerinden olan korteks dokusu TNF- α seviyesi azalma gösterdi.

4. Uzamsal belleği değerlendirmek için kullanılan morris su labirenti testinde, icv OKA uygulaması ile uzayan platformu bulma süresi ve platformu bulma mesafesi; ACA tedavisi ile kısalma gösterdi. Çeşitli deney modellerinde TRPM2 KO hayvanların ve PLA₂ inhibisyonunun bilişsel fonksiyonlarda iyileşme sağladığına dair çalışmalar mevcuttur. Bizim çalışmamız da daha önceki çalışmaları tamamlayıcı niteliktedir.

5. Yaptığımız OKA ile oluşturulan nörodejenerasyon modelinde histopatolojik incelemede korteks ve hipokampus dokularında dejenere ve apoptotik nöron sayısı ACA tedavisiyle birlikte azalma gösterdi.

6. TRPM2 kanalı ile nörodejenaratif hastalıkların ilişkisini anlamaya yönelik çalışmalar daha çok TRPM2 geni susturulmuş hayvanlar üzerinde yapılmıştır. Yapılan birçok çalışmada TRPM2 kanalının nörodejenaratif birçok süreç ile ilişkili olduğu ve TRPM2 KO hayvanların nörodejenereyasyona daha dirençli olduğu görülmüştür. Yaptığımız literatür taramasına göre; Alzheimer modelinde TRPM2 inhibitörü kullanılan ilk çalışma bizim çalışmamızdır. Bu yönüyle bizim çalışma özgün bir nitelik taşımaktadır. Epidemiyolojik çalışmalarda NSAID kullananlarda AH görülme sıklığının düşük olduğu ortaya konmuştu. Bu bilgiye dayanarak inflamatuvar süreçte rol oynayan PLA₂ inhibitörü ACA' nın nörodejenereasyonda koruyucu özellik göstermesi beklenebilir bir sonuçtur.

7. Hem TRPM2 hem de PLA₂ inhibisyonunun olası nöroprotektif özelliklerini araştırdığımız bu çalışmada elde ettiğimiz bulguların, ileriki çalışmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz. ACA' nın oksidatif hasar, nöroinflamasyon ve tau fosforilasyonu ile ilişkili birçok nörodejenaratif hastalıkta, tedavi edici bir ajan olarak kullanılması için daha kapsamlı araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, Arrighi HM. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2007, 3(3): 186-91.
2. Wang Q, Sun AY, Pardeike J, Muller RH, Simonyi A, Sun GY. Neuroprotective effects of a nanocrystal formulation of sPLA(2) inhibitor PX-18 in cerebral ischemia/reperfusion in gerbils. *Brain Res* 2009, 1285: 188-95.
3. Godyn J, Jonczyk J, Panek D, Malawska B. Therapeutic strategies for Alzheimer's disease in clinical trials. *Pharmacol Rep* 2016, 68(1): 127-38.
4. Armstrong RA. What causes Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol* 2013, 51(3): 169-88.
5. Gong CX, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Targeting tau protein in Alzheimer's disease. *Drugs Aging* 2010, 27(5): 351-65.
6. Kamat PK, Tota S, Shukla R, Ali S, Najmi AK, Nath C. Mitochondrial dysfunction: A crucial event in okadaic acid (ICV) induced memory impairment and apoptotic cell death in rat brain. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2011, 100(2): 311-9.
7. Arendt T, Holzer M, Brückner M, Janke C, Gärtner U. The use of okadaic acid in vivo and the induction of molecular changes typical for Alzheimer's disease. *Neuroscience* 1998, 85(4): 1337-40.
8. Kamat PK, Tota S, Rai S, Swarnkar S, Shukla R, Nath C. A study on neuroinflammatory marker in brain areas of okadaic acid (ICV) induced memory impaired rats. *Life Sci* 2012, 90(19-20): 713-20.
9. Kamat PK, Tota S, Saxena G, Shukla R, Nath C. Okadaic acid (ICV) induced memory impairment in rats: a suitable experimental model to test anti-dementia activity. *Brain Res* 2010, 1309: 66-74.
10. Yoon SY, Choi JE, Yoon JH, Huh JW, Kim DH. BACE inhibitor reduces APP-beta-C-terminal fragment accumulation in axonal swellings of okadaic acid-induced neurodegeneration. *Neurobiol Dis* 2006, 22(2): 435-44.
11. Kraft R, Grimm C, Frenzel H, Harteneck C. Inhibition of TRPM2 cation channels by N-(p-amylcinnamoyl)anthranilic acid. *Br J Pharmacol* 2006, 148(3): 264-73.

12. Schaeffer EL, De-Paula VJ, da Silva ER, de ANB, Skaf HD, Forlenza OV, Gattaz WF. Inhibition of phospholipase A2 in rat brain decreases the levels of total Tau protein. *J Neural Transm (Vienna)* 2011, 118(9): 1273-9.
13. Sun GY, Shelat PB, Jensen MB, He Y, Sun AY, Simonyi A. Phospholipases A2 and inflammatory responses in the central nervous system. *Neuromolecular Med* 2010, 12(2): 133-48.
14. Sun GY, Xu J, Jensen MD, Simonyi A. Phospholipase A2 in the central nervous system: implications for neurodegenerative diseases. *J Lipid Res* 2004, 45(2): 205-13.
15. Faouzi M, Penner R. Trpm2. Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels: Springer, 2014, 403-26.
16. Işık AT. Streptozotosinle oluşturulan deneysel alzheimer modelinde curcumin tedavisinin etkinliği. Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Ankara, 2007.
17. Rizzi L, Rosset I, Roriz-Cruz M. Global epidemiology of dementia: Alzheimer's and vascular types. *Biomed Res Int* 2014, 2014.
18. Small DH, Cappai R. Alois Alzheimer and Alzheimer's disease: a centennial perspective. *Journal of neurochemistry* 2006, 99(3): 708-10.
19. Reitz C, Mayeux R. Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochemical pharmacology* 2014, 88(4): 640-51.
20. Riedel BC, Thompson PM, Brinton RD. Age, APOE and sex: Triad of risk of Alzheimer's disease. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2016, 160: 134-47.
21. Laws KR, Irvine K, Gale TM. Sex differences in cognitive impairment in Alzheimer's disease. *World journal of psychiatry* 2016, 6(1): 54.
22. Janicki SC, Schupf N. Hormonal influences on cognition and risk for Alzheimer's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2010, 10(5): 359-66.
23. Bagyinszky E, Youn YC, An SS, Kim S. The genetics of Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging* 2014, 9: 535-51.
24. Gupta R, Sen N. Traumatic brain injury: a risk factor for neurodegenerative diseases. *Rev Neurosci* 2016, 27(1): 93-100.
25. de Bruijn RF, Ikram MA. Cardiovascular risk factors and future risk of Alzheimer's disease. *BMC Med* 2014, 12: 130.
26. Kumar A, Singh A, Ekavali. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacol Rep* 2015, 67(2): 195-203.

27. Duan Y, Dong S, Gu F, Hu Y, Zhao Z. Advances in the pathogenesis of Alzheimer's disease: focusing on tau-mediated neurodegeneration. *Transl Neurodegener* 2012, 1(1): 24.
28. Liao D, Miller EC, Teravskis PJ. Tau acts as a mediator for Alzheimer's disease-related synaptic deficits. *Eur J Neurosci* 2014, 39(7): 1202-13.
29. Liu R, Wang JZ. Protein phosphatase 2A in Alzheimer's disease. *Pathophysiology* 2009, 16(4): 273-7.
30. Huang WJ, Zhang X, Chen WW. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomed Rep* 2016, 4(5): 519-22.
31. Cetin F. Role of Oxidative Stress in A β Animal Model of Alzheimer's Disease: Vicious Circle of Apoptosis, Nitric Oxide and Age. In Kishore U (Ed.), *Neurodegenerative Diseases, InTech*, 2013, DOI: 10.5772/54718.
32. Wang WY, Tan MS, Yu JT, Tan L. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. *Ann Transl Med* 2015, 3(10): 136.
33. Zhang F, Jiang L. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2015, 11: 243-56.
34. Sezer C, Memiş L. Alzheimer hastalığı histopatolojisi. *Demans Dergisi* 2001, 1: 42-9.
35. Gouras GK, Olsson TT, Hansson O. beta-Amyloid peptides and amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* 2015, 12(1): 3-11.
36. Butterfield DA, Swomley AM, Sultana R. Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress in Alzheimer disease: importance in disease pathogenesis and progression. *Antioxid Redox Signal* 2013, 19(8): 823-35.
37. Özkay ÜD, Öztürk Y, Can ÖD. Yaşlanan Dünyanın Hastalığı: Alzheimer Hastalığı. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 2011, 18(1).
38. Read J, Suphioglu C. Dropping the BACE: beta secretase (BACE1) as an Alzheimer's disease intervention target. In Kishore U (Ed.). *Neurodegenerative diseases. Croatia: InTech*, 2013, DOI: 10.5772/53603
39. Mann DM, Tucker CM, Yates PO. The topographic distribution of senile plaques and neurofibrillary tangles in the brains of non-demented persons of different ages. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1987, 13(2): 123-39.
40. Riedel BC, Thompson PM, Brinton RD. Age, APOE and sex: Triad of risk of Alzheimer's disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2016, 160: 134-47.

41. Roy R, Niccolini F, Pagano G, Politis M. Cholinergic imaging in dementia spectrum disorders. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2016, 43(7): 1376-86.
42. Revett TJ, Baker GB, Jhamandas J, Kar S. Glutamate system, amyloid ss peptides and tau protein: functional interrelationships and relevance to Alzheimer disease pathology. *J Psychiatry Neurosci* 2013, 38(1): 6-23.
43. Ong WY, Tanaka K, Dawe GS, Ittner LM, Farooqui AA. Slow excitotoxicity in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2013, 35(4): 643-68.
44. Jaunmuktane Z, Mead S, Ellis M, Wadsworth JD, Nicoll AJ, Kenny J, Launchbury F, Linehan J, Richard-Loendt A, Walker AS, Rudge P, Collinge J, Brandner S. Evidence for human transmission of amyloid-beta pathology and cerebral amyloid angiopathy. *Nature* 2015, 525(7568): 247-50.
45. Fritsch SK, Cintron A, Ye L, Mahler J, Buhler A, Baumann F, Neumann M, Nilsson KP, Hammarstrom P, Walker LC, Jucker M. Abeta seeds resist inactivation by formaldehyde. *Acta Neuropathol* 2014, 128(4): 477-84.
46. Kelley BJ, Petersen RC. Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurologic clinics* 2007, 25(3): 577-609.
47. Weintraub S, Wicklund AH, Salmon DP. The neuropsychological profile of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012, 2(4): a006171.
48. Garcia-Alberca JM, Lara Munoz JP, Berthier Torres M. [Neuropsychiatric and behavioral symptomatology in Alzheimer disease]. *Actas Esp Psiquiatr* 2010, 38(4): 212-22.
49. Li XL, Hu N, Tan MS, Yu JT, Tan L. Behavioral and psychological symptoms in Alzheimer's disease. *Biomed Res Int* 2014, 2014: 927804.
50. Reisberg B, Borenstein J, Salob SP, Ferris SH, Franssen E, Georgotas A. Behavioral symptoms in Alzheimer's disease: phenomenology and treatment. *J Clin Psychiatry* 1987, 48 Suppl: 9-15.
51. Noetzli M, Eap CB. Pharmacodynamic, pharmacokinetic and pharmacogenetic aspects of drugs used in the treatment of Alzheimer's disease. *Clinical pharmacokinetics* 2013, 52(4): 225-41.
52. Campos C, Rocha NB, Vieira RT, Rocha SA, Telles-Correia D, Paes F, Yuan T, Nardi AE, Arias-Carrion O, Machado S, Caixeta L. Treatment of Cognitive Deficits in Alzheimer's disease: A psychopharmacological review. *Psychiatr Danub* 2016, 28(1): 2-12.

53. Parsons CG, Danysz W, Dekundy A, Pulte I. Memantine and cholinesterase inhibitors: complementary mechanisms in the treatment of Alzheimer's disease. *Neurotox Res* 2013, 24(3): 358-69.
54. Noetzli M, Eap CB. Pharmacodynamic, pharmacokinetic and pharmacogenetic aspects of drugs used in the treatment of Alzheimer's disease. *Clin Pharmacokinet* 2013, 52(4): 225-41.
55. Cavanaugh SE, Pippin JJ, Barnard ND. Animal models of Alzheimer disease: historical pitfalls and a path forward. *ALTEX* 2014, 31(3): 279-302.
56. Uzbay T. Alzheimer Hastalığına Yönelik Çalışmalarda Kullanılan Deneysel Hayvan Modelleri. *Demans Dergisi* 2003, 1: 5-14.
57. Neha, Sodhi RK, Jaggi AS, Singh N. Animal models of dementia and cognitive dysfunction. *Life Sci* 2014, 109(2): 73-86.
58. Correia SC, Santos RX, Perry G, Zhu X, Moreira PI, Smith MA. Insulin-resistant brain state: the culprit in sporadic Alzheimer's disease? *Ageing Res Rev* 2011, 10(2): 264-73.
59. Hall AM, Roberson ED. Mouse models of Alzheimer's disease. *Brain Res Bull* 2012, 88(1): 3-12.
60. Gotz J, Ittner LM. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurosci* 2008, 9(7): 532-44.
61. Nagao M, Shima H, Nakayasu M, Sugimura T. Protein serine/threonine phosphatases as binding proteins for okadaic acid. *Mutat Res* 1995, 333(1-2): 173-9.
62. Valdiglesias V, Prego-Faraldo MV, Pasaro E, Mendez J, Laffon B. Okadaic acid: more than a diarrheic toxin. *Mar Drugs* 2013, 11(11): 4328-49.
63. Munday R. Is protein phosphatase inhibition responsible for the toxic effects of okadaic Acid in animals? *Toxins (Basel)* 2013, 5(2): 267-85.
64. Leira F, Alvarez C, Vieites JM, Vieytes MR, Botana LM. Characterization of distinct apoptotic changes induced by okadaic acid and yessotoxin in the BE(2)-M17 neuroblastoma cell line. *Toxicol In Vitro* 2002, 16(1): 23-31.
65. Ekinici FJ, Ortiz D, Shea TB. Okadaic acid mediates tau phosphorylation via sustained activation of the L-voltage-sensitive calcium channel. *Brain Res Mol Brain Res* 2003, 117(2): 145-51.
66. Costa AP, Tramontina AC, Biasibetti R, Batassini C, Lopes MW, Wartchow KM, Bernardi C, Tortorelli LS, Leal RB, Goncalves CA. Neuroglial alterations in rats

submitted to the okadaic acid-induced model of dementia. *Behav Brain Res* 2012, 226(2): 420-7.

67. Kamat PK, Tota S, Rai S, Shukla R, Ali S, Najmi AK, Nath C. Okadaic acid induced neurotoxicity leads to central cholinergic dysfunction in rats. *Eur J Pharmacol* 2012, 690(1-3): 90-8.

68. Kamat PK, Tota S, Shukla R, Ali S, Najmi AK, Nath C. Mitochondrial dysfunction: a crucial event in okadaic acid (ICV) induced memory impairment and apoptotic cell death in rat brain. *Pharmacol Biochem Behav* 2011, 100(2): 311-9.

69. Kamat PK, Rai S, Nath C. Okadaic acid induced neurotoxicity: an emerging tool to study Alzheimer's disease pathology. *Neurotoxicology* 2013, 37: 163-72.

70. <http://www.abcam.com/n-p-amylcinnamoylanthranilic-acid-ab141555.html>
updated 2 Temmuz 2016.

71. Nakai H, Konno M, Kosuge S, Sakuyama S, Toda M, Arai Y, Obata T, Katsube N, Miyamoto T. New potent antagonists of leukotrienes C4 and D4. 1. Synthesis and structure-activity relationships. *Journal of medicinal chemistry* 1988, 31(1): 84-91.

72. Konrad RJ, Jolly YC, Major C, Wolf BA. Inhibition of phospholipase A2 and insulin secretion in pancreatic islets. *Biochim Biophys Acta* 1992, 1135(2): 215-20.

73. Hill K, McNulty S, Randall AD. Inhibition of TRPM2 channels by the antifungal agents clotrimazole and econazole. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004, 370(4): 227-37.

74. Hill K, Benham CD, McNulty S, Randall AD. Flufenamic acid is a pH-dependent antagonist of TRPM2 channels. *Neuropharmacology* 2004, 47(3): 450-60.

75. Harteneck C, Frenzel H, Kraft R. N-(p-amylcinnamoyl)anthranilic acid (ACA): a phospholipase A(2) inhibitor and TRP channel blocker. *Cardiovasc Drug Rev* 2007, 25(1): 61-75.

76. Dietrich A, Gudermann T. TRPC6: physiological function and pathophysiological relevance. *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels*: Springer, 2014. 157-88.

77. Almaraz L, Manenschijn J-A, de la Peña E, Viana F. Trpm8. *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels*: Springer, 2014. 547-79.

78. Forlenza OV, Schaeffer EL, Gattaz WF. The role of phospholipase A2 in neuronal homeostasis and memory formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna)* 2007, 114(2): 231-8.

79. Muralikrishna Adibhatla R, Hatcher JF. Phospholipase A2, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med* 2006, 40(3): 376-87.
80. Miller BA. The role of TRP channels in oxidative stress-induced cell death. *J Membr Biol* 2006, 209(1): 31-41.
81. Nilius B, Flockerzi V. Mammalian transient receptor potential (TRP) cation channels. Preface. *Handb Exp Pharmacol* 2014, 223: v - vi.
82. Watanabe H, Murakami M, Ohba T, Takahashi Y, Ito H. TRP channel and cardiovascular disease. *Pharmacol Ther* 2008, 118(3): 337-51.
83. Venkatachalam K, Montell C. TRP channels. *Annual review of biochemistry* 2007, 76: 387.
84. Knowles H, Li Y, Perraud AL. The TRPM2 ion channel, an oxidative stress and metabolic sensor regulating innate immunity and inflammation. *Immunol Res* 2013, 55(1-3): 241-8.
85. Perraud AL, Fleig A, Dunn CA, Bagley LA, Launay P, Schmitz C, Stokes AJ, Zhu Q, Bessman MJ, Penner R, Kinet JP, Scharenberg AM. ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature* 2001, 411(6837): 595-9.
86. Perraud AL, Takanishi CL, Shen B, Kang S, Smith MK, Schmitz C, Knowles HM, Ferraris D, Li W, Zhang J, Stoddard BL, Scharenberg AM. Accumulation of free ADP-ribose from mitochondria mediates oxidative stress-induced gating of TRPM2 cation channels. *J Biol Chem* 2005, 280(7): 6138-48.
87. Wehage E, Eisfeld J, Heiner I, Jungling E, Zitt C, Luckhoff A. Activation of the cation channel long transient receptor potential channel 2 (LTRPC2) by hydrogen peroxide. A splice variant reveals a mode of activation independent of ADP-ribose. *J Biol Chem* 2002, 277(26): 23150-6.
88. Xie YF, Macdonald JF, Jackson MF. TRPM2, calcium and neurodegenerative diseases. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 2010, 2(2): 95-103.
89. Kim HR, Rho HW, Park BH, Park JW, Kim JS, Kim UH, Chung MY. Role of Ca²⁺ in alloxan-induced pancreatic beta-cell damage. *Biochim Biophys Acta* 1994, 1227(1-2): 87-91.
90. Bari MR, Akbar S, Eweida M, Kuhn FJ, Gustafsson AJ, Luckhoff A, Islam MS. H₂O₂-induced Ca²⁺ influx and its inhibition by N-(p-amylocinnamoyl) anthranilic acid

in the beta-cells: involvement of TRPM2 channels. *J Cell Mol Med* 2009, 13(9B): 3260-7.

91. Roberge S, Roussel J, Andersson DC, Meli AC, Vidal B, Blandel F, Lanner JT, Le Guennec JY, Katz A, Westerblad H, Lacampagne A, Fauconnier J. TNF-alpha-mediated caspase-8 activation induces ROS production and TRPM2 activation in adult ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 2014, 103(1): 90-9.

92. Fonfria E, Marshall IC, Boyfield I, Skaper SD, Hughes JP, Owen DE, Zhang W, Miller BA, Benham CD, McNulty S. Amyloid beta-peptide(1-42) and hydrogen peroxide-induced toxicity are mediated by TRPM2 in rat primary striatal cultures. *J Neurochem* 2005, 95(3): 715-23.

93. Isaev NK, Stelmashook EV, Dirnagl U, Andreeva NA, Manuhova L, Vorobjev VS, Sharonova IN, Skrebitsky VG, Victorov IV, Katchanov J, Weih M, Zorov DB. Neuroprotective effects of the antifungal drug clotrimazole. *Neuroscience* 2002, 113(1): 47-53.

94. Park L, Wang G, Moore J, Girouard H, Zhou P, Anrather J, Iadecola C. The key role of transient receptor potential melastatin-2 channels in amyloid-beta-induced neurovascular dysfunction. *Nat Commun* 2014, 5: 5318.

95. Bai JZ, Lipski J. Differential expression of TRPM2 and TRPV4 channels and their potential role in oxidative stress-induced cell death in organotypic hippocampal culture. *Neurotoxicology* 2010, 31(2): 204-14.

96. Clapham DE. SnapShot: mammalian TRP channels. *Cell* 2007; 129(1): 220.

97. http://www.alzet.com/products/guide_to_use/cfs_preparation.html 10 Temmuz 2016.

98. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 7th Edition. London, UK, Academic Press, 2013.

99. Bayer SA. Development of the hippocampal region in the rat. II. Morphogenesis during embryonic and early postnatal life. *J Comp Neurol* 1980, 190(1): 115-34.

100. Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc* 2006, 1(2): 848-58.

101. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 1984, 11(1): 47-60.

102. Buonocore G, Perrone S, Tataranno ML. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin Fetal Neonatal Med* 2010, 15(4): 186-90.

103. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988, 34(3): 497-500.
104. Cemeli E, Baumgartner A, Anderson D. Antioxidants and the Comet assay. *Mutat Res* 2009, 681(1): 51-67.
105. Paglia DE, Valentine WN, Dahlgren JG. Effects of low-level lead exposure on pyrimidine 5'-nucleotidase and other erythrocyte enzymes. Possible role of pyrimidine 5'-nucleotidase in the pathogenesis of lead-induced anemia. *J Clin Invest* 1975, 56(5): 1164-9.
106. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959, 82(1):70-7.
107. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 1978, 86(1): 271-8.
108. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951, 193(1): 265-75.
109. Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 1977, 83(2): 346-56.
110. Liu F, Liang Z, Gong CX. Hyperphosphorylation of tau and protein phosphatases in Alzheimer disease. *Panminerva Med* 2006, 48(2): 97-108.
111. Iqbal K, Liu F, Gong CX, Alonso Adel C, Grundke-Iqbal I. Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. *Acta Neuropathol* 2009, 118(1): 53-69.
112. Maidana M, Carlis V, Galhardi FG, Yunes JS, Geracitano LA, Monserrat JM, Barros DM. Effects of microcystins over short- and long-term memory and oxidative stress generation in hippocampus of rats. *Chem Biol Interact* 2006, 159(3): 223-34.
113. Tian Q, Lin ZQ, Wang XC, Chen J, Wang Q, Gong CX, Wang JZ. Injection of okadaic acid into the meynert nucleus basalis of rat brain induces decreased acetylcholine level and spatial memory deficit. *Neuroscience* 2004, 126(2): 277-84.
114. Yin YY, Liu H, Cong XB, Liu Z, Wang Q, Wang JZ, Zhu LQ. Acetyl-L-carnitine attenuates okadaic acid induced tau hyperphosphorylation and spatial memory impairment in rats. *J Alzheimers Dis* 2010, 19(2): 735-46.
115. Arendt T, Holzer M, Fruth R, Bruckner MK, Gartner U. Paired helical filament-like phosphorylation of tau, deposition of beta/A4-amyloid and memory impairment in rat induced by chronic inhibition of phosphatase 1 and 2A. *Neuroscience* 1995, 69(3): 691-8.

116. Terry AV, Jr. Spatial Navigation (Water Maze) Tasks Methods of Behavior Analysis in Neuroscience. Buccafusco JJ, editor. Boca Raton FL, Taylor & Francis Group, LLC., 2009.
117. Ye M, Yang W, Ainscough JF, Hu XP, Li X, Sedo A, Zhang XH, Zhang X, Chen Z, Li XM, Beech DJ, Sivaprasadarao A, Luo JH, Jiang LH. TRPM2 channel deficiency prevents delayed cytosolic Zn²⁺ accumulation and CA1 pyramidal neuronal death after transient global ischemia. *Cell Death Dis* 2014, 5: e1541.
118. Gelderblom M, Melzer N, Schattling B, Gob E, Hicking G, Arunachalam P, Bittner S, Ufer F, Herrmann AM, Bernreuther C, Glatzel M, Gerloff C, Kleinschnitz C, Meuth SG, Friese MA, Magnus T. Transient receptor potential melastatin subfamily member 2 cation channel regulates detrimental immune cell invasion in ischemic stroke. *Stroke* 2014, 45(11): 3395-402.
119. Ostapchenko VG, Chen M, Guzman MS, Xie YF, Lavine N, Fan J, Beraldo FH, Martyn AC, Belrose JC, Mori Y, MacDonald JF, Prado VF, Prado MA, Jackson MF. The Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) Channel Contributes to beta-Amyloid Oligomer-Related Neurotoxicity and Memory Impairment. *J Neurosci* 2015, 35(45): 15157-69.
120. Sanchez-Mejia RO, Newman JW, Toh S, Yu GQ, Zhou Y, Halabisky B, Cisse M, Scearce-Levie K, Cheng IH, Gan L, Palop JJ, Bonventre JV, Mucke L. Phospholipase A2 reduction ameliorates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 2008, 11(11): 1311-8.
121. Lian H, Zheng H. Signaling pathways regulating neuron-glia interaction and their implications in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2016, 136(3): 475-91.
122. Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, Jacobs AH, Wyss-Coray T, Vitorica J, Ransohoff RM, Herrup K, Frautschy SA, Finsen B, Brown GC, Verkhratsky A, Yamanaka K, Koistinaho J, Latz E, Halle A, Petzold GC, Town T, Morgan D, Shinohara ML, Perry VH, Holmes C, Bazan NG, Brooks DJ, Hunot S, Joseph B, Deigendesch N, Garaschuk O, Boddeke E, Dinarello CA, Breitner JC, Cole GM, Golenbock DT, Kummer MP. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 2015, 14(4): 388-405.
123. Tweedie D, Ferguson RA, Fishman K, Frankola KA, Van Praag H, Holloway HW, Luo W, Li Y, Caracciolo L, Russo I, Barlati S, Ray B, Lahiri DK, Bosetti F, Greig NH, Rosi S. Tumor necrosis factor-alpha synthesis inhibitor 3,6'-dithiothalidomide attenuates markers of inflammation, Alzheimer pathology and behavioral deficits in

animal models of neuroinflammation and Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 2012, 9: 106.

124. Hein AM, Stasko MR, Matousek SB, Scott-McKean JJ, Maier SF, Olschowka JA, Costa AC, O'Banion MK. Sustained hippocampal IL-1beta overexpression impairs contextual and spatial memory in transgenic mice. *Brain Behav Immun* 2010, 24(2): 243-53.

125. Hein AM, Stutzman DL, Bland ST, Barrientos RM, Watkins LR, Rudy JW, Maier SF. Prostaglandins are necessary and sufficient to induce contextual fear learning impairments after interleukin-1 beta injections into the dorsal hippocampus. *Neuroscience* 2007, 150(4): 754-63.

126. Haraguchi K, Kawamoto A, Isami K, Maeda S, Kusano A, Asakura K, Shirakawa H, Mori Y, Nakagawa T, Kaneko S. TRPM2 contributes to inflammatory and neuropathic pain through the aggravation of pronociceptive inflammatory responses in mice. *J Neurosci* 2012, 32(11): 3931-41.

127. Xie YF, Belrose JC, Lei G, Tymianski M, Mori Y, Macdonald JF, Jackson MF. Dependence of NMDA/GSK-3beta mediated metaplasticity on TRPM2 channels at hippocampal CA3-CA1 synapses. *Mol Brain* 2011, 4: 44.

128. Fonfria E, Mattei C, Hill K, Brown JT, Randall A, Benham CD, Skaper SD, Campbell CA, Crook B, Murdock PR, Wilson JM, Maurio FP, Owen DE, Tilling PL, McNulty S. TRPM2 is elevated in the tMCAO stroke model, transcriptionally regulated, and functionally expressed in C13 microglia. *J Recept Signal Transduct Res* 2006, 26(3): 179-98.

129. Kraft R, Grimm C, Grosse K, Hoffmann A, Sauerbruch S, Kettenmann H, Schultz G, Harteneck C. Hydrogen peroxide and ADP-ribose induce TRPM2-mediated calcium influx and cation currents in microglia. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004, 286(1): C129-37.

130. Melzer N, Hicking G, Gobel K, Wiendl H. TRPM2 cation channels modulate T cell effector functions and contribute to autoimmune CNS inflammation. *PLoS One* 2012, 7(10): e47617.

131. Adibhatla RM, Hatcher JF. Phospholipase A(2), reactive oxygen species, and lipid peroxidation in CNS pathologies. *BMB Rep* 2008, 41(8): 560-7.

132. Landry GM, Martin S, McMartin KE. Diglycolic acid is the nephrotoxic metabolite in diethylene glycol poisoning inducing necrosis in human proximal tubule cells in vitro. *Toxicol Sci* 2011, 124(1): 35-44.

133. Demirdaş A, Nazıroğlu M, Övey İS. Duloxetine Reduces Oxidative Stress, Apoptosis, and Ca²⁺ Entry Through Modulation of TRPM2 and TRPV1 Channels in the Hippocampus and Dorsal Root Ganglion of Rats. *Mol Neurobiol* 2016, 1-13.
134. D'Amelio M, Cavallucci V, Cecconi F. Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death Differ* 2010, 17(7): 1104-14.
135. Snigdha S, Smith ED, Prieto GA, Cotman CW. Caspase-3 activation as a bifurcation point between plasticity and cell death. *Neurosci Bull* 2012, 28(1): 14-24.
136. Jiang W, Luo T, Li S, Zhou Y, Shen XY, He F, Xu J, Wang HQ. Quercetin Protects against Okadaic Acid-Induced Injury via MAPK and PI3K/Akt/GSK3beta Signaling Pathways in HT22 Hippocampal Neurons. *PLoS One* 2016, 11(4): e0152371.
137. Hecquet CM, Zhang M, Mittal M, Vogel SM, Di A, Gao X, Bonini MG, Malik AB. Cooperative interaction of trp melastatin channel transient receptor potential (TRPM2) with its splice variant TRPM2 short variant is essential for endothelial cell apoptosis. *Circ Res* 2014, 114(3): 469-79.
138. Sun L, Yau HY, Wong WY, Li RA, Huang Y, Yao X. Role of TRPM2 in H₂O₂-induced cell apoptosis in endothelial cells. *PLoS One* 2012; 7(8): e43186.
139. Sagy-Bross C, Hadad N, Levy R. Cytosolic phospholipase A₂alpha upregulation mediates apoptotic neuronal death induced by aggregated amyloid-beta peptide1-42. *Neurochem Int* 2013, 63(6): 541-50.
140. Engelbrecht AM, Ellis B. Apoptosis is mediated by cytosolic phospholipase A₂ during simulated ischaemia/reperfusion-induced injury in neonatal cardiac myocytes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2007, 77(1): 37-43.
141. van Dijk A, Krijnen PA, Vermond RA, Pronk A, Spreuwenberg M, Visser FC, Berney R, Paulus WJ, Hack CE, van Milligen FJ, Niessen HW. Inhibition of type 2A secretory phospholipase A₂ reduces death of cardiomyocytes in acute myocardial infarction. *Apoptosis* 2009, 14(6): 753-63.
142. Farooqui AA, Ong WY, Horrocks LA. Neuroprotection abilities of cytosolic phospholipase A₂ inhibitors in kainic acid-induced neurodegeneration. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2004, 4(1): 85-96.
143. Farooqui AA, Ong WY, Horrocks LA. Inhibitors of brain phospholipase A₂ activity: their neuropharmacological effects and therapeutic importance for the treatment of neurologic disorders. *Pharmacol Rev* 2006, 58(3): 591-620.

EK.1. Özgeçmiş

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Murat ÇAKIR
Adres : İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji A.D. 44280/Malatya
murathann78@gmail.com

Eğitim Durumu

Lisans : İnönü Üniversitesi Sağlık Yüksek Okulu Sağlık Memurluğu
Bölümü (2000-2005)

Y.Lisans : İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji A.D. (2009-2012)

Doktora : İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji A.D. (2012-2016)

Y.Lisans Tezi : Sıçanlarda Böbrek İskemi Reperfüzyonu ile oluşturulan oksidatif
Hasara Karşı Deksmetomidinin Etkisi

Y.L. Tez Danışmanı : Doç. Dr. Alaadin POLAT

Doktora Tezi : Sıçanlarda Okadaik Asit ile Oluşturulan Nörodejenerasyona Aca'nın
Etkisi (2012- 2016).

D. Tez Danışmanı : Doç. Dr. Halil DÜZÖVA

Yabancı Dil : İngilizce

İlgi Alanları

Alzheimer hastalığı, Oksidatif stres, İskemi/reperfüzyon, Nörofizyoloji, Böbrek fizyolojisi

Eserler Listesi

SCI ve SCI Expanded Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1. **Cakir M.**, Polat A., Tekin S., Vardi N., Taslidere E., Duran Z.R., Tanbeg K. "The Effect of Dexmedetomidine against Oxidative and Tubular Damage Induced by Renal Ischemia Reperfusion in Rats" Renal Failure, 2015; 37 (4),704-708.
2. Bircan B., **Çakır M.**, Kırbağ S., Gül HF. Effect of apelin hormone on renal ischemia/reperfusion induced oxidative damage in rats. Ren Fail. 2016; 38 (7): 1122-8.

SCI Kapsamındaki ve Uluslar Arası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Özet

Türünden Yayınlar

1. **Çakır M**, Düzova H, Orhan G, Çetin A, Özyalın F (2015). Effects of Salusin- α on Various Cytokines and Lipid Peroxidations in Rats Subjected to an Experimental Renal Ischemia / Reperfusion of Rats. *Acta Physiologica*, Volume 27, Supplement s704, Pages 25, DOI: 10.1111/apha.12590
2. **Çakır M**, Düzova H, Orhan G, Çetin A, Özyalın F (2015). Salusin- α and β Levels in Acute Renal Failure Induced by Renal Ischemia / Reperfusion of Rats. *Acta Physiologica*, Volume 215, Supplement s704, Pages55, DOI: 10.1111/apha.12591.
3. Bircan B., **Çakır M.**, Kırbağ S. Effect of Apelin-13 on Liver Damage Following the Renal Ischemia/Reperfusion (2015). *Acta Physiologica*, Volume 215, Supplement s704, Pages55, DOI: 10.1111/apha.12591.
4. Bircan B., **Çakır M.**, Kırbağ S (2015). Antioxidant Effect of Apelin on Renal ischemia/Reperfusion Damage. *Acta Physiologica*, Volume 215, Supplement s704, Pages36, DOI: 10.1111/apha.12591.
5. **Çakır M**, Duzova H, Tekin S, Çiğremiş Y (2016). TRPM2 antagonist ACA ameliorates okadaic acidinduced cognitive impairment in rats. *Anatomy*. Volume 10 / Suppl 1 / May 2016.

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabına Basılan Bildiriler

1. **Çakır M**, Düzova H, Taşlıdere E, Tekin S (2016). Effect of TRPM2 antagonist ACA on the okadaic acid induced neurodegeneration. 6th World Congress of Oxidative Stress, Calcium Signaling and TRP Channels. 24 – 27 May 2016 Isparta, Turkey. P475.

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan Bildiriler ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

1. **Çakır M.**, Polat A., Vardı N., Taşlıdere E., Tekin S., Duran Z. R., Tanbek K. (2013). “Sıçanlarda Böbrek İskemi/İskemi Reperfüzyon Hasarına Deksmetomidinin Etkisi” 39. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 10-14 Eylül Ankara, P080.

2. **Çakır M**, Düzova H, Orhan G, Çetin A. (2014). “Sıçanlarda Böbrek İskemi/Reperfüzyonu ile Oluşturulan Oksidatif Hasara Karşı Salusin-β’ nın Etkisi” 40. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2-6 Eylül Kayseri, P072.
3. Bircan B., **Çakır M.**, Kırbağ S. (2014). “Sıçanlarda Deneysel Böbrek İskemi/Reperfüzyon Modelinde Apelin-13’ ün Koruyucu Rolü” 40. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2-6 Eylül Kayseri, P074.

BAP Destekli Araştırma Projeleri

1. Polat A, **Çakır M.** Sıçanlarda Böbrek İskemi Reperfüzyonu İle Oluşturulan Oksidatif Hasara karşı Deksmetomidinin Etkisi". İÜBAP 2011/59, Araştırmacı, (2011-2012).
2. Kırbağ S., Bircan B., **Çakır M.** "Sıçanlarda Böbrek İskemi Reperfüzyonu ile Oluşturulan Oksidatif Hasarda Apelin Hormonunun Etkisi". FÜBAP FF13.20, Araştırmacı, (2013-2015).
3. Eraslan E, **Çakır M.** "Böbrek İskemi Reperfüzyon Hasarında TRPM2 İyon Kanalının Rolü". Atatürk ÜBAP 2014/146, Araştırmacı, (2014-2015)
4. Düzova H, **Çakır M.** "Sıçanlarda Böbrek İskemi/Reperfüzyon Hasarına Salusin-alfa ve salusin-beta'nın Etkisi". İÜBAP 2013/206, Araştırmacı, (2013-2015).
5. Düzova H, **Çakır M.** "Sıçanlarda Okadaik Asit ile Oluşturulan Nörodejenerasyona Aca’ nın etkisi". İÜBAP 2015/105, Araştırmacı, (2015-2017).
6. Düzova H, **Çakır M.** "Sıçanlarda böbrek iskemi/reperfüzyon hasarına hypericum perforatum’un etkisi". İÜBAP 2016/40 güdümlü, Araştırmacı, (2016-2017).

Katıldığı Bilimsel Etkinlikler & Kurslar

1. İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu. “Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası” Kurisyer, Malatya-2010.
2. Ulusal Sinirbilimleri Kongresi (Uluslar Arası Katılımlı), Katılımcı, Ankara- 2016.
3. Hacettepe Üniversitesi 39. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Katılımcı, Ankara-2013.
4. Hacettepe Üniversitesi Elektroforez Yöntemleri ve Western Blot Uygulaması, Kursiyer, Ankara-2013.
5. Erciyes Üniversitesi 40. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Katılımcı, Kayseri-2014.
6. Çanakkale 18 Mart Üniversitesi 41. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Katılımcı, Çanakkale-2015.

EK 2. Etik Kurul Onayı



İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 22-01-2016
Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya
Araştırma Protokol no.su : 2015/A-38
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Türü : *Siçan*
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Soyü : *Wistar albino veya Sprague-dawley*
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : E D Farketmez
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 50 Adet
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı : Genç Ortalama 250-350 g

Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Doç. Dr. Halil DÜZÖVA'nın yürütücüsü olduğu "Siçanlarda Okadaik Asit İle Oluşturulan Nörodejenerasyona ACA'nın Etkisi" isimli 2015/A-38 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmalara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verildi.

Doç.Dr. M.Arif ALADAĞ
Başkan

Prof. Dr. Nigar VARDI
Üye

Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ
Üye

Vet.Hek.M.Zafer BOZDAĞ
Üye

Yrd.Doç.Dr.Mehmet KARATAŞ
Üye

Yrd.Doç.Dr. Mustafa KARAKAPLAN
Üye

Salih AVCI
Sivil Üye

Ahmet GÖNÜLLÜOĞLU
Sivil Üye