

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ALZHEİMER MODELİ SIÇANLARDA KAEMPFEROL TEDAVİSİNİN
NÖROPROTEKTİF VE İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Melike UYSAL

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Programı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Birsen ELİBOL

TEMMUZ 2020

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ALZHEİMER MODELİ SIÇANLARDA KAEMPFEROL TEDAVİSİNİN
NÖROPROTEKTİF VE İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Melike UYSAL

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Programı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Birsen ELİBOL

TEMMUZ 2020

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 185309005 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Melike UYSAL, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “ALZHEİMER MODELİ SIÇANLARDA KAEMPFEROL TEDAVİSİNİN NÖROPROTEKTİF VE İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Dr. Öğr. Üyesi Birsen ELİBOL**

Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Doç. Dr. Fahri AKBAŞ**

Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Merve BEKER

Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Teslim Tarihi : **17.09.2020**

Savunma Tarihi : **17.07.2020**



Aileme ve sevdiklerime,

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca hiçbir konuda benden sevgi, destek ve ilgisini esirgemeyen bilgilerini ve tecrübelerini paylaşan danışman hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi Birsen Elibol'a,

Bana bu zorlu süreçte elinden gelen yardımı esirgememiş bir abla gibi olmuş sayın Dr. Öğr. Üyesi Merve Beker ve Dr. Öğr. Üyesi Şule Terzioğlu Uşak'a,

Tüm hayatım boyunca benim hep arkamda duran benden sevgilerini esirgemeyen biricik aileme sonsuz teşekkür ederim.

Haziran 2020

Melike UYSAL
(Moleküler Biyolog)

BEYAN

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

Melike UYSAL

İmza

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	v
BEYAN	vi
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	viii
TABLO LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	x
ÖZET	xi
SUMMARY	xii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.Alzheimer Hastalığı	3
2.1.1Alzheimer hastalığının genetiği.....	4
2.1.2 Alzheimer hastalığının patolojisi.....	6
2.1.2.1 Amiloid prekürsör proteini ve amiloid beta plaklar.	6
2.1.2.2 Nörofibriler Yumaklar.	9
2.1.2.3 Nöroinflamasyon	11
2.1.3 AH için kullanılan tedavi yöntemleri	12
2.1.4 Kaempferol.	15
3.MATERYAL VE METOD	17
3.1 Materyal	17
3.1.1 Kullanılan cihazlar	17
3.1.2 Kullanılan malzemeler.....	17
3.2 Metod.....	18
3.2.1 Hayvan çalışmaları	18
3.2.1.1 İntraserebroventriküler streptozotosin enjeksiyonu	18
3.2.1.2 İntraperitoneal kaempferol enjeksiyonu	21
3.2.2 Davranış deneyleri.....	22

3.2.2.1 Pasif sakınma testi.....	22
3.2.2.2 Morris su labirenti.....	23
3.2.3 Dokuların alınması.	24
3.2.4 Moleküler çalışmalar.	24
3.2.4.1 Beyin dokusundan protein homojenizasyonu.....	24
3.2.4.2 Protein konsantrasyonunun ölçümü	25
3.2.4.3 Protein elektroforezi.....	26
3.2.4.4 İstatiksel analiz.....	31
4. BULGULAR.....	32
4.1 Hayvan ağırlıkları	32
4.2 Morris Su Labirenti.....	32
4.3 Pasif Sakınma Testi	37
4.4 Protein Konsantrasyonları Ölçümü.....	38
4.5 Protein Elektroforezi.....	39
5.TARTIŞMA.....	43
6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	46
KAYNAKÇA.....	47
ÖZGEÇMİŞ	53

KISALTMALAR

Aβ	: Amiloid Beta
AH	: Alzheimer Hastalığı
APOE	: Apolipoprotein E
APP	: Amiloid Prekürsör Protein
APPPL1	: Amiloid Prekürsör Protein Benzeri Protein 1
APPPL2	: Amiloid Prekürsör Protein Benzeri Protein 1
BACE1	: Beta Bölgesi Amiloid Öncü Proteini Yarma Enzimi 1
CuBD	: Bakır bağlama domeni
EBAH	: Erken Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı
GBAH	: Geç Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı
GFD	: Büyüme Faktörü Alanı
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
ICV	: İntraserebroventriküler
KBB	: Kan Beyin Bariyeri
KMP	: Kaempferol
MAP	: Mikrotübül Asosiye Protein
MAP kinaz	: Mitojenle Aktifleştirilmiş Protein kinaz
NO	: Nitrik Oksit
NFY	: Nörofibriler Yumaklar
PI-3 kinaz	: Fosfotinoit 3 Kinaz
PKC	: Protein Kinaz C
PSEN1	: Presenilin 1
PSEN2	: Presenilin 2
p-TAU	: Fosforile TAU
STZ	: Streptozotosin
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 3.1 : Solüsyon A.....	19
Tablo 3.2 : Solüsyon B.....	19
Tablo 4.2 : Protein Konsantrasyonları (10 ile çarpılmış halleri, µg/ml).	38



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1	: Alois Alzheimer ve hastası Auguste D.	3
Şekil 2.2	: Alzheimer Hastası bireyde beyin küçülmesini gösteren temsili resim... 6	6
Şekil 2.3	: APP proteinin amiloidojenik ve amiloidojenik olmayan yollardakesimi.	8
Şekil 2.4	: Nöron içinde oluşan nörofibriler yumaklar ve hücre dışı AB'nin temsili gösterimi.....	11
Şekil 2.5	: Alzheimer hastalığında kullanılan tedavi yöntemleri.....	13
Şekil 2.6	: Antioksidanların sınıflandırılması.....	14
Şekil 2.7	: Kaempferolün top-çubuk modeli ile gösterilmesi.....	15
Şekil 3.1	: Stereotaksiye Sıçanın Yerleştirilmesi.....	20
Şekil 3.2	: Mikro Pump Cihazı.....	21
Şekil 3.3	: İntraperitoneal enjeksiyon.....	22
Şekil 3.4	: Pasif sakınma testi aparatı.....	22
Şekil 3.5	: May Passive Avoidance programı.....	23
Şekil 3.6	: Long Evans türü sıçandan çıkartılan tam beyni.....	24
Şekil 3.7	: Homojenizatör.....	25
Şekil 3.8	: BCA protein konsantrasyon kiti ile örneklerdeki proteinlerin belirlenmesi.....	26
Şekil 3.9	: Proteinlerin elektroforez için hazırlanması.....	27
Şekil 3.10	: Proteinlerin elektroforezinde kullanılan bilinen protein ağırlıkları.....	28
Şekil 3.11	: Dikey elektroforez.....	28
Şekil 3.12	: Membranların ikincil antikorla inkübasyonu.....	30
Şekil 3.13	: Görüntüleme cihazı.....	30
Şekil 4.1	: Hayvanların günlere göre ağırlık değişimi.....	31
Şekil 4.2	: STZ enjeksiyonu ile yapılan Alzheimer modelinde Morris su labirenti öğrenme deneyi (yüzülen mesafe).....	32
Şekil 4.3	: STZ enjeksiyonu ile yapılan Alzheimer modelinde Morris su labirenti	

öğrenme deneyi (platforma ulaşma süresi).	33
Şekil 4.4 : STZ enjeksiyonu ile yapılan Alzheimer modelinde Morris su labirenti .. öğrenme deneyi 1. gün ve 5. gün.	34
Şekil 4.5 : Morris su labirenti deneyi prob gününde platformun yerini öğrenmiş ve öğrenememiş hayvanın izlediği yol.	35
Şekil 4.6 : STZ enjeksiyonu ile yapılan Alzheimer modelinde Morris su labirenti deneyinde bellek ölçümü(platform kadranı).	36
Şekil 4.7 : STZ enjeksiyonu ile yapılan Alzheimer modelinde Morris su labirenti deneyinde bellek ölçümü(Annulus 40).	37
Şekil 4.8 : STZ enjeksiyonu ile yapılan Alzheimer modelinde sıçanların pasif sakinmada gösterdikleri korku hafızası performansı sonuçları.	38
Şekil 4.9 : Elektroforez yapılan proteinlerin membran görüntüsü.	39
Şekil 4.10 : Hayvan gruplarındaki BACE/GAPDH miktarını gösteren grafik.	41
Şekil 4.11 : Hayvan gruplarındaki PSEN/GAPDH miktarını gösteren grafik.	41
Şekil 4.12 : Hayvan gruplarındaki pTAU/GAPDH miktarını gösteren grafik GAPDH miktarını gösteren grafik.	42

ALZHEİMER MODELİ SIÇANLARDA KAEMPFEROL TEDAVİSİNİN NÖROPROTEKTİF VE İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Alzheimer hastalığı dünya genelinde en sık görülen demans çeşididir. Her yıl prevalansı artmaya devam eden bu nörodejeneratif hastalığın bilinen bir tedavisi bulunmamaktadır. Alzheimer hastalığının patolojisini oluşturan ana etmenler senil plaklar, nörofibriler yumaklar ve nöroinflamasyon olarak sıralanabilir. Oksidatif stres bu patolojilerin oluşum ve ilerleme sürecinde yer alan en önemli temel etkenlerden birisidir. Birçok tedavi girişimi hastalığın nöropatojenezini hafifletip kognitif fonksiyonu arttırmayı hedeflemektedir. Bu amaçla birçok bitkisel ürün ve bunların etken maddeleri araştırmacılar tarafından kullanılmaktadır. Kaempferol birçok bitkide sekonder metabolit olarak üretilen anti-inflammatuvar ve antioksidant özelliklere sahip bir flavonoiddir. Kaempferolün oksidatif stresi azaltma yeteneği bu molekülü Alzheimer hastalığı çalışmalarında önemli bir hale getirmektedir. Bu tez çalışmasında öncelikle Alzheimer hastalığını modellemek için Long-Evans cinsi erkek sıçanlara intraserebroventriküler olarak streptozotosin (STZ) enjekte edildi. Oluşturulan bu modele tedavi edici madde olarak bir antinöroenflamatuvar ajan olan kaempferol molekülü intraperitoneal olarak verildi. Tedavi bitiminde davranış deneyleri ve moleküler deneyler yapılarak kaempferolün nöroprotektif etkisini incelendi. Kaempferol morris su labirentinde yapılan öğrenme ve bellek testinde anlamlı bir farklılık göstermezken korkuya bağlı hafızayı ölçen pasif sakınma testinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık oluşturmuştur. Bununla birlikte STZ enjeksiyonu PSEN seviyesinde anlamlı bir değişim göstermezken BACE ve fosforile TAU seviyesinde artışa sebep olmuştur. İlginç bir şekilde Kaempferolün moleküler düzeyde anlamlı bir iyileştirici etkisi olmamıştır. Bu sonuçlar kaempferol tedavisinin Alzheimer hastalığının fenotipik özelliklerinden olan hafıza kaybı üzerinde olumlu etkilerinin olduğunu göstermektedir. Bu nedenle bu çalışma kaempferolün Alzheimer hastalığı tedavisinde aday molekül olabilmesi için iyileştirici etkisinin moleküler temellerinin detaylı olarak incelenmesi açısından ilerleyen çalışmalara yol göstericidir.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer Hastalığı, kaempferol, STZ, BACE1, p-TAU, PSEN

INVESTIGATION OF THE NEUROPROTECTIVE AND HEALING EFFECT OF KAEMPFEROL TREATMENT IN RATS WITH ALZHEIMER DISEASE MODEL

SUMMARY

Alzheimer's disease is the most common type of dementia worldwide. There is no known cure for this neurodegenerative disease whose prevalence continues to increase every year. The main factors that form the pathology of Alzheimer's disease can be listed as senile plaques, neurofibrillary tangles and neuroinflammation. Oxidative stress is one of the main factors involved in the formation and progression of these pathologies. Many treatment initiatives aim to alleviate the neuropathogenesis of the disease and increase cognitive function. For this purpose, many herbal products and their active ingredients are used by researchers. Kaempferol is a flavonoid with anti-inflammatory and antioxidant properties produced as a secondary metabolite in many plants. Kaempferol's ability to reduce oxidative stress makes this molecule important in Alzheimer's disease studies.

In this thesis study, firstly, streptozotocin (STZ) was injected intracerebroventricularly to Long-Evans male rats for modelling Alzheimer's disease. Kaempferol, an anti-neuroinflammatory agent, was administered intraperitoneally to the rats. At the end of the treatment, the neuroprotective effect of kaempferol was examined by conducting behavioral and molecular experiments. While kaempferol did not show a significant difference in the learning and memory test performed in the morris water maze, it made a significant difference between the groups in the passive avoidance test measuring fear-conditioned memory. However, while STZ injection did not show a significant change in PSEN level, it caused an increase in BACE and phosphorylated TAU levels. Interestingly, Kaempferol had no significant curative effect at the molecular level. These results show that kaempferol treatment has positive effects on memory loss which is one of the phenotypic features of Alzheimer's disease. For this reason, this study guides the future studies in terms of examining in detail the molecular bases of the healing effect of kaempferol in order to be a candidate molecule in the treatment of Alzheimer's disease.

Keywords: Alzheimer's Disease, kaempferol, STZ, BACE1, p-TAU, PSEN

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Demans (Latince de- "uzak" + mens "mantık"), kelimelerinin bir araya gelmesi ile oluşan halk arasında bunama olarak da bilinen; öğrenme, bellek, oryantasyon, dil fonksiyonları ve kişilik gibi mental fonksiyonların bozulması ile karakterize, sosyal ve iş hayatını etkileyen, merkezi sinir sisteminde meydana gelen bozukluklara verilen genel bir addır [1]. Demansın Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2019 raporuna göre dünya genelinde 50 milyon kadar insanı etkilediği ve en yaygın formu olan Alzheimer Hastalığının (AH) demans olgularının %60-70'ini oluşturduğu bildirilmiştir [2].

Günümüzde AH, DSÖ tarafından tanınan küresel bir halk sağlığı problemi olarak kabul edilmektedir. Bununla beraber hastalığın patojenitesinde rol oynayan ana etmenler bilinmekte ancak hastalığın kesin bir tedavisi bulunmamaktadır [3]. AH'nın birçok semptomu olmakla birlikte özellikle ilerleyici hafıza kaybı ve zihin karışıklığı ile karakterize olduğu bilinmektedir. AH'nda meydana gelen unutkanlık durumu daha çok son zamanlarda olan yeni öğrenilmiş olay ve olguların unutulması şeklinde seyreder. AH'nın bireyde ortaya çıkmasına genetik faktörler, çevresel faktörler, ve hatta bireyin yaşam şeklide dahil olmak üzere birçok etken sebep olur.

AH gibi bazı nörodejeneratif hastalıklarda sürekli olarak devam eden nöroinflamasyon süreci normal şartlarda beyinde oluşan hasarlara cevap olarak ortaya çıkan yararlı bir süreç olmasına rağmen hastalık durumunda hastalığın patojenitesine katkıda bulunmaktadır [4]. Günümüzde bu nöroinflamasyon sürecinin senil plaklar ve nörofibriler yumaklar kadar önemli olduğu ortaya konulmuştur [5].

Geçtiğimiz otuz yılda, bilim insanlarının sahip olduğu AH hakkındaki biyolojik bilgi, özellikle hastalığın mekanizması ve patolojisi hakkındaki veriler, deney hayvanlarının da kullanımıyla artmıştır. AH'nın deneysel hayvan modelleri, hastalığın patojenezini daha iyi anlamak ve yeni terapötik stratejilerin verimliliğini değerlendirmek için kullanılmaktadır [6]. Kullanılan deney hayvanları modellerinden özellikle yaygın görülen geç başlangıçlı AH belirtilerinden olantau fosforilasyonunun ve amiloid beta formasyon değişiminin temelinde yatan oksidatif stres ve kronik inflamasyon süreçlerini kapsayan nöroinflamasyonun oluşturulması amaçlanmıştır olduğunu

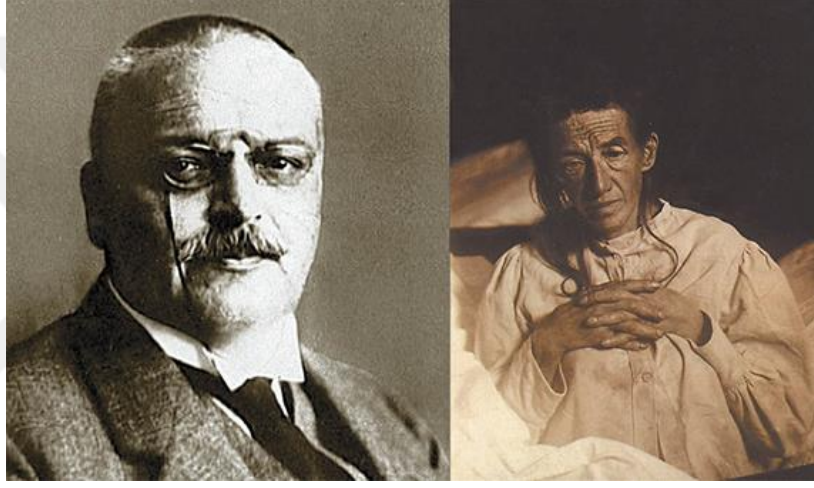
göstermiştir [7] . Bu sebepleen uygun model olarak mutajenik olmayıp aynı zamanda nöroinflamasyona sebep olan intraserebroventriküler streptozotosin (ICV-STZ) enjeksiyonu modeli birçok araştırmacı tarafından yaygın olarak kullanılmaktadır [8]. Son zamanlarda yapılan *in vivo* çalışmalar yaşlılıkta dahil olmak üzere nörodejenerasyon süreçlerinde antioksidan özellikleri olan flavonoidlerin nöroprotektif etkilerini nöroinflamasyon üzerinden sürdürdüklerini göstermiştir. Flavonoidlerin ve bunların *in vivo* metabolitlerinin, beyindeki enflamatuvar süreçlerin kontrolünde de görevli olan tirozin kinaz, fosfoinositid 3-kinaz (PI3 kinaz), protein kinaz C (PKC) ve mitojenle aktifleştirilmiş protein kinaz (MAP kinaz) yollarını modüle ettiği gösterilmiştir. Bu bağlamda flavonoidler nöroprotektif ajan olarak kullanılabilir potansiyel terapötikler olarak değerlendirilmektedir [9].

Flavonoidlerin bir üyesi olan kaempferol (KMP), çay, brokoli, elma, çilek ve fasulye gibi bitki içeriklerinde bulunup çeşitli özellikleri ile geleneksel tıpta ilgi çekici flavonoidlerden biri haline gelmiştir. KMP'nin etkinliği kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok patolojide incelenmiştir [10]. *In vitro* ortamda KMP tedavisi uygulanan PC12 hücrelerinde yapılan çalışmalar KMP'nin antioksidan özelliğini ortaya koymuştur [11]. Yeon ve arkadaşları, mide kansinoması ile ilişkili yaptıkları çalışmada KMP'nin proinflamatuvar sitokinlerin regülasyonuna yol açarak anti-enflamatuvar bir etki gösterdiğini bildirmişlerdir [12]. Bu örnekte olduğu gibi birçok kanser çeşidinde KMP'nin anti-oksidatif anti-enflamatuvar etkinliği tespit edilmiştir [13]. Bir başka çalışmada Darbandi ve arkadaşları, STZ ile indükleyerek spontan AH modeli oluşturdukları Wistar cinsi ratlara intraperitoneal olarak KMP enjeksiyonu yapmışlar ve sonuç olarak KMP'nin hipokampal bölgedeki CA1 nöronlarındaki yoğunluğunu ve hafızayı desteklediğini göstermişlerdir [14]. Biz bu tez çalışmasında ise STZ modeli ile sporadik AH oluşturulmuş *Long Evans* türü sıçanlarda KMP'nin hafıza üzerindeki etkisini ve bu etkinin moleküler temellerini araştırmayı amaçladık. Böylelikle KMP molekülünün AH üzerindeki nöroprotektif bir etkiye sahip olup olmadığının literatüre kazandırılması ve bu molekülün AH açısından tedavi edici aday molekül olup olmayacağını göstermeyi hedefledik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı ilk defa Alois Alzheimer adlı bir psikiyatrik ve nöropatolog tarafından, 1901 yılının Kasım ayında Frankfurt Psikiyatri Hastanesinde asistanlık yaptığı süreçte gözlemlendiği ve araştırdığı kadın hasta Auguste D.'nin hastalığına dair uzun süreli bulgularını Tübingen toplantısında anlatmasıyla bildirilmiştir [15].



Şekil 2.1: Alois Alzheimer ve hastası Auguste D.

1901 yılının Mart ayında, 50 yaşındaki kadının kocası, eşinde sonradan gelişen ve hızlı bir şekilde ilerleyen ve artan bir yoğunlukla - uyku bozuklukları, hafıza rahatsızlıkları, saldırganlık, ağlama ve ilerleyici karmaşa gibi - tedavi edilemeyen bir paranoid semptomatoloji farketmiş ve eşini Frankfurt'daki Toplum Psikiyatri Hastahanesi'ne götürmüştür. Bu süreçten sonra, kadının hastalığı zamanla şiddetlenerek artmıştır. Alois Alzheimer'ın gözetiminde olan Auguste D. 8 Nisan 1906'da hayatını kaybetmiştir (Şekil 2.1). Otopsi sonrası Alzheimer, Auguste D.'nin beynini morfolojik ve histolojik olarak inceleyebilmiştir [15].

Alzheimer, hastasının beynini mikroskopik olarak incelemek için o zamanlar yeni yeni denemeye başlanan gümüş boyama tekniğini kullanmıştır. Boyamaların sonucunda, bugün halen patolojik bulguların iki ana kolunu oluşturan hastalığın belirteçleri haline gelecek olan nöritik plakları, nörofibriler yumakları ve amiloid anjiyopatını gözlemlemiştir [16]. Münih'te görev yapan Alzheimer, yaptığı histolojik incelemenin

sonucunda elde ettiği bulguların 4 yıldan uzun bir sürede kaydedilen klinik bulgular ile ilişkisine dair verdiği Tubigen’de 1906 yılında bir sunum yapmıştır. O sıralarda çok değer görmeyen çalışması çok geçmeden hakettiği yere gelip hastalık Alois Alzheimer’ın adıyla anılmaya başlanmıştır [15].

AH, 65 yaş ve üzeri bireylerde en sık görülen primer demans hastalığı olarak literatüre geçmiştir [17]. S. Tiwari ve arkadaşlarının 2019 yılında yayınladıkları derleme çalışmasına göre AH dünya genelinde 41 milyon kadar insanı etkilemektedir. Bilim insanları tarafından bu sayının 2050 yılında 3 kattan daha fazla artacağı öngörülmektedir [18]. Kadınlarda AH’na yakalanma riski yaklaşık üçte iki iken erkeklerde ise bu oran üçte bir civarındadır [19]. AH başlangıçta yeni öğrenilerin bilgileri hatırlamadaki zorluk problemleri ile başlar. Bu problemleri takiben çeşitli dikkat problemleri, yeni bilgileri işlemedeki zorluklar, iş hayatı ve sosyal hayatta meydana gelen problemler hastalığın ciddiyetini artırır [20]. AH kısaca davranış, konuşma, görsel-uzamsal yönelim ve motor sistemini etkileyebilen hafıza bozukluğu ve bilişsel gerileme ile karakterize progresif nörodejeneratif bir hastalıktır [21]. AH’ye sebep olan ana etmenler yaş, diyet, çeşitli kronik hastalıklar, genetik ve epigenetik faktörler olarak kısaca sıralanabilir [22]. Yaş faktörü, AH için birincil risk faktörü olarak değerlendirilir. Erken başlangıçlı AH (EBAH) kavramı genellikle 65 yaşından önce 45 yaşından sonra başlarken, geç başlangıçlı AH (GBAH) ise genellikle 65 yaş ve sonrasında başlar [5].

Prevalansı daha düşük olan ancak kalıtsallık ve etiyoloji bakımından daha iyi bir tanımlanmaya sahip olan EBAH daha çok genetik faktörlere dayandırılmaktadır. EBAH’na sahip olan hastaların çoğunda otozomal dominant bir kalıtımın hakim olduğu bilinmektedir.

AH'nin klinik tedavisi için günümüzde ilaç olarak kolinesteraz inhibitörleri (ChEI'ler) ve N-Metil-D-Aspartat (NMDA) reseptör antagonistleri kullanılmaktadır. Bu gruptaki ilaçların başlıcaları donapezil, rivastigmin, galantamin ve memantin olarak sıralanabilir. Bu ilaçlar hastalığın seyrini hafifletmekle beraber hasta yakınlarını ve araştırmacıları tatmin edici sonuçlar veremedikleri için bilim insanları daha efektif ilaçların bulunması için çabalamaktadırlar [23].

2.1.1 Alzheimer hastalığının genetiği

AH, yaşlı popülasyonda sık görülen bir demans hastalığıdır. EBAH otozomal dominant kalıtım göstermektedir. Amiloid prekürsör protein (APP), presenilin-1 (PSEN1), ve presenilin-2 (PSEN2) AH için iyi bilinen otozomal dominant genlerdir

ve EBAH bulunan ailelerin yaklaşık %70'inde bulunur. Ayrıca ABCA7, SORL1, TREM2 genlerinin de otozomal dominant AH'ye neden olabileceği araştırmacılar tarafından gösterilmiştir [24].

EBAH için APP, PSEN1 ve PSEN2 genlerinin birçok varyantı tanımlanmıştır. APP, bir transmembran proteini olup beta ve gamma sekretaz enzimleri ile kesildiğinde beyin hücresel ortamında toksik bir etkiye sahip olan A β formuna dönüşür [25]. APP proteini yine aynı isimle anılan APP geni tarafından kodlanır. APP geni 21. kromozomun uzun kolunda bulunur. APP geninde görülen mutasyonlar A β 'nin yanlış uzunlukta kesimine neden olup damar duvarlarında birikmelere neden olur. Bu durum hastalığın seyrine katkıda bulunabilir [22]. Gamma sekretaz enzimi kompleks bir yapıya sahip olup PSEN, PSEN ilerletici, defektif anterior farenks ve nikastrin olmak üzere dört alt üniteye sahiptir. Gamma sekretaz yapısında bulunan PSEN alt ünitesi AH'nın patolojisinde görev alan PSEN1 ve PSEN2 adlı iki önemli izoforma sahiptir [25]. Bu PSEN proteinlerini kodlayan PSEN geninde özellikle EBAH'nın patolojisine katkıda bulunan 179 adet mutasyon bilinmektedir. Bu mutasyonlar A β 'nin toksik olan 40 ve 42 aminoasit uzunluğundaki peptitlerin oluşmasına neden olurlar [18].

GBAH'nin kesin sebebi bilinmemektedir. Bununla birlikte hastalığın patojenitesine katkıda bulunan genetik faktörler, kafa travması, oksidatif stres ve çevresel etmenler gibi çeşitli unsurlar hastalığın etiyojisini aydınlatmamıza olanak sağlamaktadır. GBAH için tanımlanan genetik faktörlerin başında APOE geni varyantları gelir[26]. Bunun yanı sıra araştırmacıların yaptığı çalışmalar bizlere enflamatuvar, kolesterol metabolizması ve endozomal vezikül geri dönüşüm yolları ile ilişkili AH patojenezinde anahtar rol oynayan 20'den fazla genetik risk faktörünü sunmuştur. Bu risk genleri tek başlarına çok büyük bir risk oluşturmazlarken hep birlikte polijenik bir etki gösterdiklerinde hastalığa yakalanma riskini yaklaşık olarak iki katına çıkartabilirler [3].

APOE, lipitlerin taşınması ve metabolizmasında önemli olan apolipoprotein E proteinini kodlayan , üç ana aleli ϵ 2, ϵ 3 ve ϵ 4 bulunan bir genidir. Bu varyantlar arasında araştırmalarda en büyük öneme sahip olan AH'nın progresyonunu arttıran APOE geninin ϵ 4 alelidir [27]. Heterozigot durumda (APOE ϵ 4 / ϵ 4) veya homozigot durumda (APOE ϵ 4 / ϵ 4) APOE ϵ 4 alelinin bulunması, EBAH ve GBAH riskini arttırdığı belirlenmiştir. Yaklaşık olarak AH olan bireylerin çeyreğinin APOE ϵ 4 allelini homozigot veya heterozigot olarak taşıdığı bulunmuştur. APOE ϵ 4 alleli

bakımından homozigot (APOE $\epsilon 4 / \epsilon 4$) olan bireylerin heterozigot olan bireylere göre 5 kat daha fazla riskte olduğu tahmin edilmektedir [28].

2.1.2 Alzheimer hastalığının patolojisi

DSÖ'nün 19 Eylül 2019'da yayınlanan verilerine göre dünya genelinde 50 milyondan fazla demans olgusu bulunup her yıl 10 milyon yeni olgu bu rakama eklenmekte ve bunların yaklaşık %60-70'ini AH vakaları oluşturmaktadır. En karakterize problemi unutkanlık olan AH'nın patolojisine baktığımızda bu hastalık hücre dışında görülen senil plaklar, hücre içi nörofibriler yumaklar ve nöroinflamasyon bulguları ile karşımıza çıkar[2]. AH olan bireyler ile diğer demans çeşitlerine sahip olan bireyleri karşılaştığımızda AH'na sahip bireylerin özellikle entorinal korteks, limbik korteks ve assosiasyon korteks alanlarının etkilenmektedir [17]. Lateral ventriküllerin simetrik genişlemesi, hipokampal atrofi, sulkuslarda genişleme ve giruslarda daralma ile birlikte beyin dokusunun kaybı yapılan incelemelerle rahatlıkla gözlenebilmektedir (Şekil 2.2). Orta derecede görülen serebral kortikal atrofi ile birlikte birincil motor, duyuşsal ve görsel alanlar zarar görmektedir [29].



Şekil 2.2: Alzheimer hastası bireyde beyin küçülmesini gösteren temsili resim.

2.1.2.1 Amiloid prekürsör proteini ve amiloid beta plaklar

AH'nın patolojisinde yer alan en önemli belirteçlerden biri amiloid beta ($A\beta$) patolojisidir. Glenner ve Wong adlı araştırmacılar Alzheimer'la ilişkili amiloid plaklardan 4.2 kilodalton ağırlığındaki bir integral membran protein olan amiloid

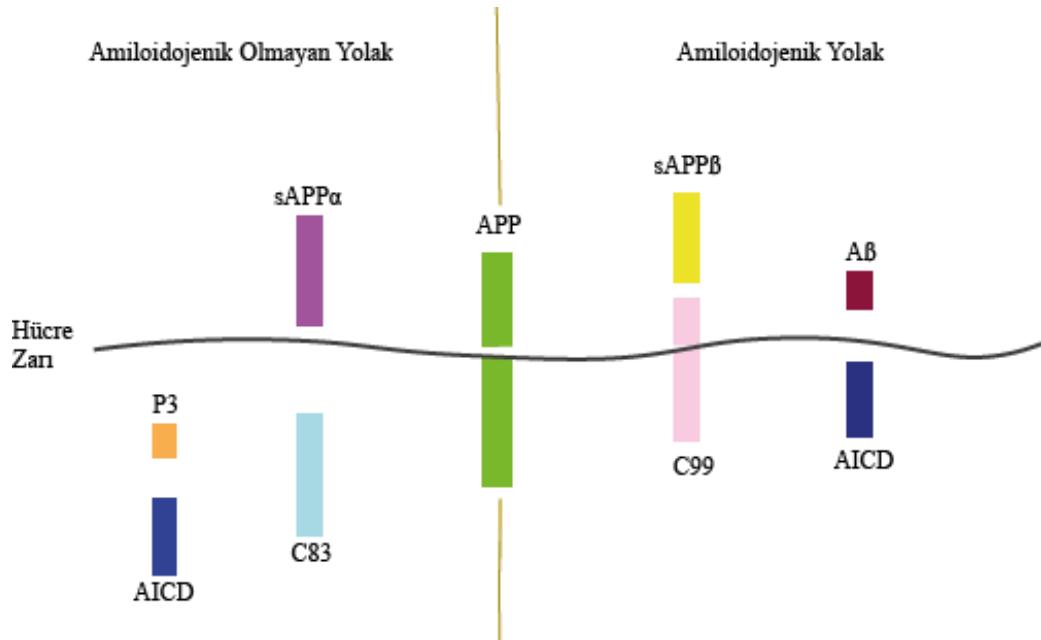
prekürsör proteinini (APP) izole etmişler ve bu proteinin hastalık patolojisinde yer aldığını göstermişlerdir [30].

İlk olarak insan beyin dokusunun cDNA kütüphanesinden klonlanan APP proteini evrimsel ve yapısal olarak korunmuş olan bir protein olma özelliği taşır [31]. Birçok organizmada çeşitli APP gen aileleri tanımlanmıştır. Bunlardan memelilerde bulunanlar başlıca APP, APP benzeri protein 1 (APPLP1) ve APP benzeri protein 2 (APPLP2) olarak sınıflandırılabilir. İnsanlarda bulunan formu APP geni ailesi olup 240 kilobaz uzunluğunda DNA parçasının kodladığı 18 ekzon içeren kısımdır [32].

Normal şartlar altında APP'nin hücre sağlığı, büyümesi ve sağkalımı üzerine olumlu etkileri olduğu *in vivo* çalışmalarda gösterilmiştir. APP, A β proteininin öncüsü olup alternatif kırılma ile 8 izoform oluşturabilir. Bunlardan en yaygın olan üç tanesi 695, 751 ve 770 aminoasitlik formlarıdır. Bunlardan 695 aminoasitlik rezidüye sahip olan APP izoformu, beyin dokusunda fazlaca eksprese edilen tek geçişli bir transmembran proteindir [33]. APP büyük bir hücre dışı alana sahip olup, yapılan kristalografi çalışmaları N terminal bölgesinde sistein açısından zengin bir bakır bağlama domeni (CuBD) ve ayrıca heparini bağlayabilen ve nörit büyümesini uyaran bir büyüme faktörü alanı bulunduğunu göstermiştir. Bunları takiben yine hücre dışı alanda Kunitz tipi proteaz inhibitörü ve OX-2 bulunur. Kunitz tipi proteaz inhibitörü ve OX2'nin yaptıkları kesimlerle daha önce bahsedilen üç ana APP izoformunu oluşturdukları bilinmektedir. İkinci bir heparin bağlanma alanı transmembran bölgeden hemen önce yer alırken APP'nin hücre içinde bulunan bölgesi hücre içi proteinlerle etkileşime girerek hücre içi fonksiyonlarda rol alır [34]. Yapılan çalışmalarda APP'nin hücre dışında bulunan alanlarından heparin bağlanma bölgelerinin hücre dışında biyolojik fonksiyonu sağlayan asıl alanlar olduğu belirtilmiştir [35]. Birçok terapötik çalışma A β 'yi vücuttan atmak gibi temellere dayandırılmaya kalksa da birçok organda yaygın olarak bulunan APP proteinin beyinde de sinaptik fonksiyonun modülasyonu dahil çeşitli fizyolojik görevleri olduğu bulunmuştur [36].

Beyinde oluşan 695 aminoasitlik APP izoformu alfa, beta ve gama sekretaz enzimleri tarafından bölünmelere uğrar [37]. APP bu sekretazların aktivitesi ile amiloidojenik veya amiloidojenik olmayan yolağa girer. α -sekretaz aktivitesini sağlayan ADAM ailesinin üyesi olan enzimler ADAM9, ADAM10 ve ADAM17 olarak adlandırılan membrana bağlı hücre yüzeyi glikoproteinleridir [38]. BACE1 1999'da keşfedilen (beta-kısmı amiloid öncü proteini APP yarma enzimi 1) pepsin ailesinin bir aspartil proteazı olup beyin dokusunda ekspresyonu yüksek bir tip 1 transmembran proteindir

[39]. γ -sekretaz enzimi ise tip 1 transmembran proteinlerini hidrolize eden aspartil proteaz ailesinin bir üyesidir [40]. Patojenik olmayan çözünebilir $A\beta$ üretimi α - ve γ -sekretaz enzimleri tarafından yapılan kesim işlemleri sonucunda oluşur. Yaşlılarda $A\beta$ birikimi α -sekretaz geninin yaşla ilişkili aşırı asetilasyonu, APP'nin amiloidojenik olmayan işlenmesini azaltır ve erken AH beyin dokusunda bildirilen BACE1 aktivitesindeki artış ise amiloidojenik işlenmeyi artırır. Araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalar büyüme faktörünün eksikliği durumunda APP'nin BACE1 tarafından bölünmesini tetiklediği ve sonuçta serbest hale geçen APP hücre dışı alanının “Ölüm Reseptörü 6” için ligand olarak görev gördüğünü göstermiştir. Bu reseptör ligand bağlanması kaspaz 6 ve kaspaz 3'ü aktive etmekte bu da aksonal bölge ve hücre gövdesinin apoptotik dejenerasyonuna neden olmaktadır [41]. APP'den, BACE1 olarak bilinen β -sekretaz ve γ -sekretaz enzimlerinin sırasıyla proteoliz işlemi sonucunda, 40-43 amino asit uzunluğunda toksik olan $A\beta$ üretilmektedir (Şekil 2.3). BACE1 geni 11. Kromozomun q kolu üzerinde bulunup 9 ekzon içermektedir ve insan nöral hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilmektedir. Sporadik AH'na sahip olan bireylerin beyin korteksinde BACE1 aktivitesi artmaktadır. Bu nedenle, $A\beta$ 'yi azaltmak için kullanılan terapötik hedeflerden biri de BACE1 aktivitesinin kontrol edilmesidir.



Şekil 2.3: APP Proteininin Amiloidojenik ve Amiloidojenik Olmayan Yollarda Kesimi.

$A\beta$ normal şartlarda her insanda bulunabilen toksik olmayan genellikle 40 aminoasitlik bir formda ancak bazen 42 veya 28 aminoasit uzunluğunda da bulunabilen

serebrospinal sıvı ve vasküler sistemin de yardımıyla çözünebilir bir proteindir [42]. Yapılan çalışmalar normal insanlardaki serebrospinal sıvıdaki A β ₄₂ formunun yaklaşık olarak mililitre başına 2-3 ng olduğunu ve diğer yaygın olan A β ₄₀ formunun ise mililitre başına yaklaşık diğerinin çeyreği kadar bir oranla 0.75 olduğunu göstermiştir. Çözünebilir A β , beyinden daha yavaş temizlenen veya çözünmeyen ve toksik olan A β plaklarını oluşturmak üzere diğer A β moleküllerine bağlanabilmektedir [43].

A β 'nin toksik formunun AH'nın patojenezindeki önemini vurgulayıp hastalığı bu patolojiye dayandıran Hardy ve Higgins adlı araştırmacılar 1992 yılında A β kaskatını anlatan makalelerini yayınlamışlardır [44]. Bu problemlili birikme şekli ailesel olan EBAH'de GBAH'na kıyasla daha çok genetik etmenlere bağlıdır. A β 'nin öncü proteini olan APP veya gama sekretazın katalitik altbirimi olabilen PSEN1 ve PSEN2'de meydana gelen mutasyonlar A β proteinin yapısal olarak yanlış bir formda oluşmasına sebep olup patolojiye katkıda bulunmaktadır [45].

A β patojenezine sebep olan otozomal dominant özellik gösteren mutasyonlar 21. kromozomun uzun kolunda bulunur APP'ye etki eden mutasyonun bulunduğu nükleotit bölgesine göre Hollanda, İsveç, İzlanda gibi ilk görüldükleri ülkeye ait isimleri alırlar. 21. kromozomun duplikasyonu ile karakterize olan Down sendromu hastalığı olan bireylerde EBAH riskinin yüksek olduğu ve ayrıca 40'lı yaşlarda AH patojenezinde görülen belirteçlere rastlanıldığı bulunmuştur [46].

AH'de A β konformasyonel değişime uğrayıp birikmektedir. Bu birikim genellikle beyin özellikle hafızayı etkileyen bölgelerinde ekstrasellüler alanda agregatlaşma şeklinde olup nöronların birbirleriyle bağlantısının kopmasına ve nörodejenerasyona neden olur [42]. En yeni çalışmalar, reaktif oksijen türlerinin (ROS) AH da dahil olmak üzere farklı birçok hastalığın ilerlemesine neden olduğunu doğrulamaktadır. Oksidatif stres olarak tanımlanan bu patolojiyi arttıran süreç direkt olarak oksijen temizleme yeteneği olan glutatyon adı verilen molekülün azalmasına neden olmaktadır [47]. Günümüze kadar olan süreçte A β halen hastalığın en önemli sebeplerinden birini oluşturmaktadır.

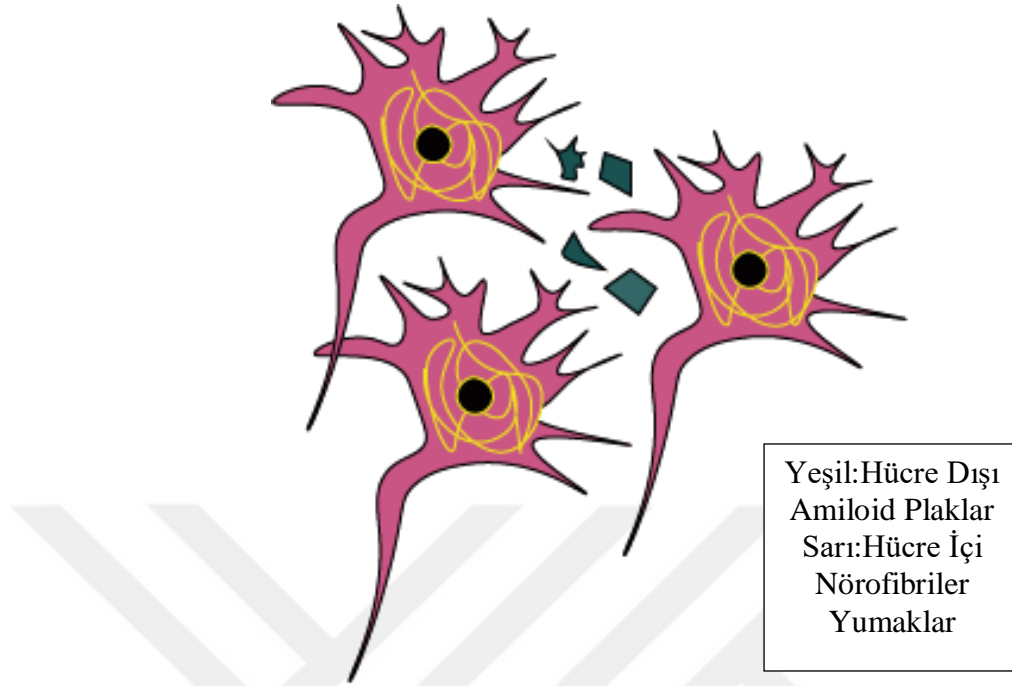
2.1.2.2 Nörofibriler yumaklar

Alois Alzheimer, AH'nı açıklayan ilk yazısında anormal fibröz inklüzyonlarının varlığına işaret etmekte ve bu yapıları nörofibriler yumaklar (NFY) olarak adlandırmaktadır. NFY', AH'da nöronlarda sitoskeletal mikrotübüllerin ve tübülüne bağlı proteinlerin kaybı ile karakterize hücre içinde görülen temel nöropatolojik

belirteçlerden biridir (Şekil 2.4) [48]. NFY normalde nöron aksonlarında fosforile halde bulunan TAU proteinin hiperfosforile olarak çift sarmal halinde filamentlere dönüşmesi sonucu oluşmaktadır [49].

TAU proteini 17. kromozom üzerinde bulunan mapt adı verilen tek bir gen tarafından kodlanmaktadır. Mikrotübül asosiyasyon protein (MAP) ailesinin bir üyesidir. TAU proteini birincil yapıları farklılık gösteren nöronların intrasellüler alanında bulunan bir proteindir. TAU proteininin temelde beyin hücrelerinde 6 izoformu bulunmaktadır. 441 rezidüye sahip olan en uzun izoform TAU birincil yapısı için temel alınmaktadır [50]. Nöronlarda madde iletiminin sağlanmasında görevli olan mikrotübül filamentlerinin stabilitesini fosforile ve defosforile olarak sağlayan TAU proteindir. sağlıklı bireylerde fosforile olan TAU proteini AH olan bireylerde hiperfosforile olarak mikrotübül yapısının bozulmasına neden olmaktadır [51]. Hücresel düzeyde görülen bu hiperfosforilasyon durumu, mikrotübül ağının normal organizasyonun değişmesiyle sonuçlanmaktadır [52]. TAU proteinleri sadece hiperfosforile olarak mikrotübül yapısının bozulmasına neden olmakla kalmayıp aynı zamanda biraraya gelerek hücre içinde NFY adı verilen yapıları oluşturmaktadırlar. Oluşan NFY akson dejenerasyonuna sebep olmaktadır. TAU proteininin hiperfosforile olmasına sebep olarak çeşitli protein kinaz ve fosfatazlar gösterilmektedir. Bir protein kinaz olan GSK-3 β bu gruptaki en önemli ajanlardan biridir. GSK-3 β gelişim paternlemede sinyal transdüksiyonunda görevli olup wingless/wnt yolağı ile inhibe olmaktadır. Araştırmacılar tarafından nöronlarda GSK-3 β ekspresyonunun TAU fosforilasyonuna

ve mikrotübül deformasyonuna sebep olan ana etmenlerden biri olduğu bulunmuştur [19].



Şekil 2. 4:Nöron içinde oluşan nörofibriler yumaklar ve hücre dışında oluşan $A\beta$ 'nin temsili gösterimi.

2.1.2.3 Nöroinflamasyon

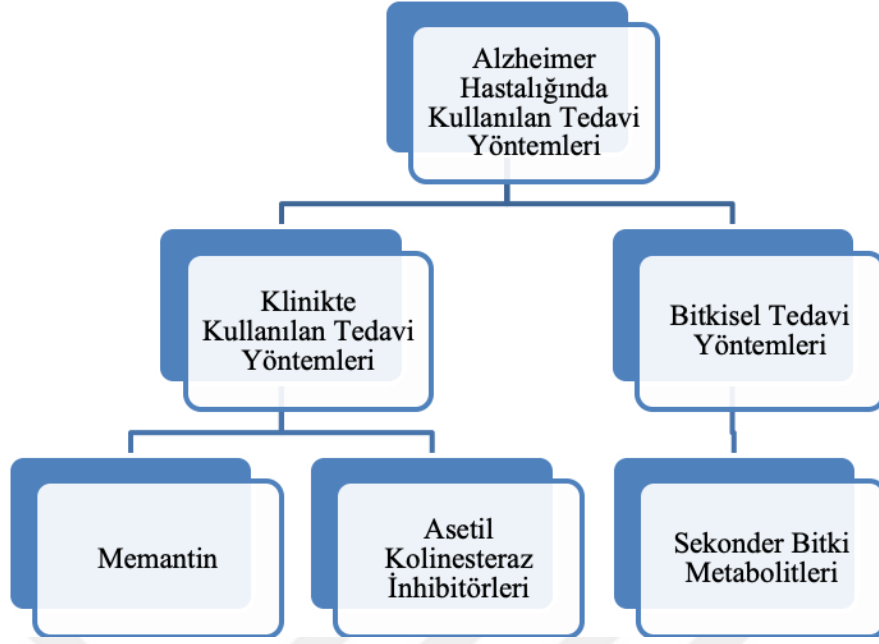
Oksidatif stresin her geçen gün hastalıkların patojenitesini anlamadaki önemi artmaktadır ve bu önemi artan hastalıkların içinde AH da yer almaktadır. Günümüze kadar AH'nın patojenezinin temelinde $A\beta$ plakları ve NFY olmak üzere iki ana patojenik etmenin olduğu bilinmekteydi. Son yıllarda yapılan çalışmalar ise AH açısından üçüncü bir patojenik etmenin olduğunu ve nöroinflamasyon olarak belirlenen bu etmenin $A\beta$ ve NFY konusunda eksik kalan noktaları tamamladığını göstermektedir [53]. AH'da nöroinflamasyon, ortaya çıkan senil plaklar ve nörofibriler düğümler tarafından aktive edilen basit bir sistem değildir. Araştırmacılar nöroinflamasyon sürecinin en az $A\beta$ ve NFY kadar patojenezin oluşumuna katkı sağladığını belirtmişlerdir [5]. Nöroinflamasyon süreci ilk zamanlarda kan beyin bariyeri (KBB) varlığı nedeniyle her ne kadar tartışmalı olsa da günümüzde yapılan çalışmalarda nörodejeneratif hastalıklarda KBB'nin bozulduğu ve nöroinflamasyon sürecinin hastalarda görüldüğü ortaya çıkartılmıştır. Oksidatif stres bu sürecin başlamasında ve devam etmesinde etkin rol oynamaktadır. Kısaca oksidatif stres özellikle hidrojen peroksit (H_2O_2) ve nitrik oksit (NO) gibi bileşenlerin hücre ortamına

reaktif oksijen ve nitrojen salmasıyla başlayan bir süreçtir [54]. AH'nın ilerleme sürecinde mikroglia, mikroglial enflamasyon ve astrositler aktif bir rol oynamaktadır. Sinapslar, mikroglial hücreler ve astrositik hücrelerle iletişime geçmektedirler. Astrositler ve mikroglia hücrelerinin en dikkate değer özelliklerinden biri nöronal gelişimde rol oynamalarıdır. Ayrıca astrositler, dendritik ağı destekleme, sinapsları sağlamlaştırma ve sinaptik iletimde görev almaktadırlar. Mikroglial hücreler ise immünolojik görevlerinin yanı sıra proteolitik ve fagositik işlemleri yapabilme kabiliyetleri sayesinde aksonal ve dendritik uçlarda kesme işlemleri yaparak nöronal yeniden düzenleme süreçlerinde rol oynamaktadırlar [55]. Mikroglial enflamasyondaki en önemli başlıklar sitokin sekresyonunu sağlamaları ve fagositoz yapmalarıdır. Bu süreçte görevli genler yeni yeni tanımlanmakta olup en önemlileri arasında CD22 ve TREM2 gelmektedir. Bunlardan CD22 yaşlanan beyinlerde mikroglial fagositozu etkilerken, TREM2 ise AH'nda koruyucu bir role sahip olan Wnt yolağını harekete geçirmektedir [56].

Nörodejeneratif hastalıklarda ve merkezi sinir sistemi bozukluklarında nöroinflamasyonun hedeflenmesinin terapötik potansiyele sahip olma derecesini ve mikroglial metabolizmayı değiştirmenin nöropatofizyolojinin olumsuz etkisini azaltması ihtimalini belirlemek için daha çok *in vivo* çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır [57].

2.1.3 Alzheimer hastalığında kullanılan tedavi yöntemleri

Hastalığın keşfinden günümüze kadar geçen süreçte AH olan bireylerdeki ana patolojileri hedef alan umut verici çalışmalar yapılmıştır ancak maalesef faz deneylerinde birçoğu olumsuz olarak sonuçlanmıştır. Günümüzde tedavi için hastalığın seyrini yavaşlatan ilaçlar kullanılmaktadır[58]. Araştırmacılar tarafından güvenilirliği doğrulanmış bu ilaçların bir kısmı klinikte etkin olarak kullanılmakta ve bir diğer kısmı ise bitkisel kaynaklı olup piyasada serbest olarak satılabilmektedir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: AH’nda kullanılan tedavi yöntemleri

AH tedavisinde Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi’nin (FDA) onayladığı ilaçlar kolinesteraz inhibitörleri, memantin, kolinesteraz inhibitörleri ile memantinin karışımı olarak üç gruba ayrılmaktadır. Bu ilaçlar farklı yollar ile hastalığın seyrinin hafiflemesine yardımcı olmaktadır [59]. Kolin asetiltransferaz adlı enzimin AH’na sahip bireylerin beyninde eksik olduğu ve asetilkolinin ise hafızada etkili bir molekül olduğunu bilinmektedir. Bu nedenle nörodejeneratif hastalıklarda kolinesteraz enziminin inhibe edilmesine dayanan kolinesteraz inhibitörleri başlığı altında donepezil, galantamin ve rivastigmin adlı ilaçlar kullanılmaya başlanmıştır [60]. NMDA sinyal yolağı Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarının işlevine bağlı olarak çalışmaktadır. AH olan bireyler NMDA sinyal yolağı bozukluğuna sahiptirler. Memantin adlı bileşik araştırmacılar tarafından voltaja bağımlı bir NMDA reseptör antagonisti olarak tanımlanmış ve AH’nın tedavisinde etkin olarak kullanılan bir ilaç haline gelmiştir [61].

AH’nda araştırılan terapötikler, katlanan proteinlerin üretimini, agregasyonunu ve anormal proteinlerin neden olduğu toksisiteyi sınırlamak ve yayılmasını inhibe etmek amacıyla faz deneylerine tabii tutulmaktadır. Günümüzde klinikte kullanılan ilaçlar kesin bir tedavi yöntemi sunmayıp sadece süreci yavaşlatma eğilimindedirler [18]. Bu durum araştırmacıları yeni ilaç denemelerine ve geleneksel tedavide kullanılan fitoterapötiklerin etkinliklerini araştırmaya itmektedir. Oksidatif stres süreci ROS üretimindeki fazlalık ve bu radikallerin ortadan kaldırılmasına yardım eden antioksidatif savunma sistemi ile karakterize edilmektedir. Her iki sistemin de yaşa

bağlı nörodejenerasyon ve demans süreçlerinde önemli rolleri olduğu düşünülmektedir. ROS, reaktif nitrojen türleri (RNS), süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$), H_2O_2 , hidroksil radikali ($\cdot OH$), alkoksil radikalleri ($RO\cdot$), peroksil radikalleri ($ROO\cdot$) ve peroksinitritler ($ONOO^-$) başlıcaları olmak üzere oksidatif stres etkenleri çok sayıda nörodejeneratif hastalığın patojenezine katkıda bulunmaktadır [62]. Geleneksel tedavi yöntemlerinde bu sebeplere dayanılarak oksidatif stresi engelleyen daha çok nonenzimatik grubundaki çeşitli antioksidanlar bitki ekstraktlarından elde edilerek kullanılmaktadır (Şekil 2.6). Bu alanda araştırma yapan Işık ve arkadaşları, ICV streptozotosin uygulayarak oluşturdukları sporadik AH modeli sıçanlarda zerdeçalden elde edilen kürkümün adlı bitki içeriğinin hafızayı iyileştirdiğini yaptıkları moleküler ve davranış deneylerinde göstermişlerdir [63]. Bir başka çalışmada Dalli ve arkadaşları, çörekotundan elde edilen timokinon adlı bitkisel içeriğin yine sporadik olarak oluşturulan AH modelinde STZ molekülü ile meydana getirilen bilişsel gerilemeyi ve moleküler değişiklikleri tersine çevirdiğini göstermişlerdir [64]. Tüm bunların yanı sıra polifenollerin bir alt grubu olan flavonoid ailesindeki üyeler sıklıkla nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için kullanılmaktadırlar. Yapılan bir çalışmada overleri çıkartılarak STZ ile oluşturulmuş AH modeli sıçanlara flavonoid ailesinin bir üyesi olan KMP molekülü intraperitoneal olarak 10 mg/kg olacak şekilde 21 gün boyunca uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda araştırmacılar KMP molekülünün nöroinflamasyonu azaltarak sıçanlarda bilişsel ilerlemeyi sağladığını göstermişlerdir [11].

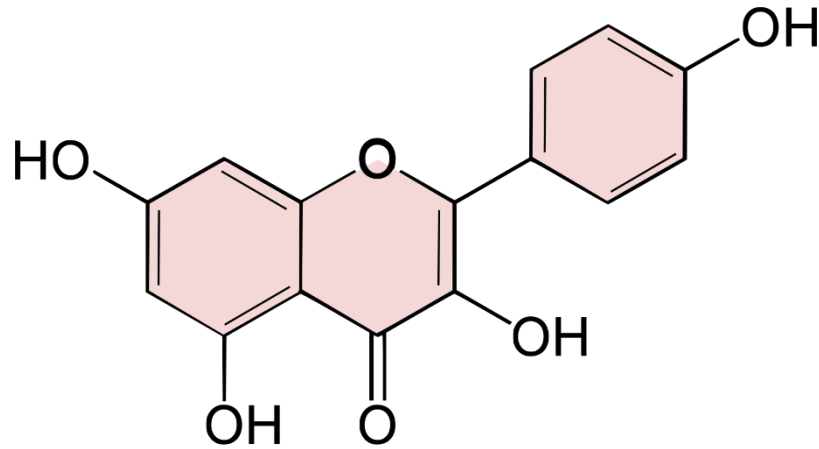


Şekil 2.6: Antioksidanların Sınıflandırılması

2.1.4 Kaempferol

Diyet polifenollerinin çeşitli hastalıkların önlenmesindeki önemli rolü uzun yıllardır bilinmektedir. Bir diyet polifenolü olan flavonoidler, birçok bitkisel gıdada sekonder bitki metaboliti olarak üretilen antioksidan olarak görev yapan moleküllerdir. Antioksidanlar, serbest radikalleri temizleme özelliğindedirler [65]. Flavonoidlerden özellikle quersetin ve kaempferol, yaygın olarak birçok gıdanın içeriğinde bulunmaktadır. Yapılan hücre deneyleri bu iki flavonoidin antioksidan ve antienflamatuar etkileri olduğunu göstermiştir [66].

KMP, dört hidroksi grubuna sahip oksidatif stresi azaltan bir antioksidan flavonoiddir [67]. Şekil 2.5'te top-çubuk modeli ile moleküler yapısı gösterilen KMP (3,5,7-trihidroksi-2-(4-hidroksifenil)kromen-4-ir) molekülünün moleküler ağırlığı 286.23 g/mol, erime noktası ise 276-278 °C olup hidrofobik özelliklere sahiptir. KMP, kronik ve akut inflammatuar hastalıklarda yararlı etkileri sahip olması ve antikanser özellikleri sayesinde alternatif tıpta yıllardır kullanılmaktadır [68]. 2010'da Filomeni ve arkadaşları, rotenon ile indükleyerek oluşturdukları Parkinson hastalığının akut toksisite modeli insan nöroblastoma SH-SY5Y hücrelerinde toksisiteyi azaltmak amacıyla çeşitli polifenol moleküllerini tedavi amaçlı kullanmışlardır. Sonuç olarak yapılan moleküler ve mikroskopik çalışmalarda KMP'ün rotenon kaynaklı oksidatif strese ve apoptoza karşı koyduğu ortaya konulmuştur [69]. H460 hücre hattıyla modellenen insan akciğer karsinomasında yapılan bir başka çalışmada KMP'ün apoptotik belirteçlerin ekspresyonunu baskılayarak kanserli hücrelerde apoptozu indüklediği gösterilmiştir[70].



Şekil 2.7: Kaempferolün moleküler yapısı

Oksidatif stres süreci lipit peroksidasyonuna ve hatta hücre ölümlerine yol açmaktadır. AH'nın bilinen bir tedavisi yoktur ve oksidatif strese karşı oluşturulan antioksidan moleküller hastalığın tedavisi için umut vaad etmektedir. KMP ile yapılan *in vivo* çalışmalar bizlere bu polifenol bileşiğinin A β fibrillerinin oluşumunu ve A β kaynaklı toksisiteyi önleyebileceğini göstermiştir [71]. A β 'nin 42 aminoasitlik toksik izoformu H₂O₂ ve ROS kaynağı olarak işlev görmektedir [72].

Bu nedenle, bu çalışmada Long evans türü sıçanlarda intraserebroventriküler yolla STZ enjekte ederek oluşturduğumuz sporadik AH modelinde antioksidan ve antienflamatuvar etkinlikleri bilinen KMP molekülününün *in vivo* ortamda AH patojenitesi üzerindeki tedavi edici özelliklerini incelenmesi amaçlandı.



3. MATERYAL VE METOD

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan cihazlar

Bezmialem Vakıf Üniversitesi hayvan laboratuvarında bulunan stereotaksi adlı cihaz sıçanlarda beyiniçi enjeksiyon yapılırken kafayı sabit tutmak ve sıçan beyin atlasına göre oluşturulan koordinatları belirlemek için kullanıldı. Stereotaksiye yerleştirilen sıçanlara STZ ve çözücü madde enjeksiyonunu belirlenen koordinatlara uygun hızda ve istenilen sürede verebilmek için mikroosmotik pompa cihazı kullanıldı. Bezmialem Vakıf Üniversitesi hayvan laboratuvarında bulunan MAY-PA pasif kaçınma sistemi ve bilgisayara yüklü olan aynı sistemin programı aracılığıyla sıçanlarda davranış deneylerinde korku hafızası ile bellek kazancı ve kaybı ölçüldü. Ayrıca burada bulunan Morris su labirenti ve buna bağlı olan bilgisayar programı sistemi (Ethovision XT) ile sıçanlarda davranış deneylerinde bellek kazancı ve kaybı ölçüldü. Bezmialem Vakıf Üniversitesi, fizyoloji laboratuvarında bulunan homojenizatör cihazı ile hayvan beyin dokularının mekanik homojenizasyonu sağlandı. Bezmialem Vakıf Üniversitesi, tıbbi biyoloji laboratuvarında bulunan Multiscan Go (Thermo Scientific) cihazı homojenizasyondan sonra protein konsantrasyonunu ölçmek için kullanıldı. Bu laboratuvarda bulunan etüv cihazı, çalkalayıcı, su banyosu, mini santrifüj, soğutmalı santrifüj, pH metre ve hassas terazi deney boyunca örneklerin ve gerekli solüsyonların hazırlanması ve ihtiyaç duyulan inkübasyonların yapılması için kullanıldı. Bezmialem Vakıf Üniversitesi, tıbbi biyoloji laboratuvarında bulunan, Bio-Rad elektroforez cihazı hayvanlardan elde edilen proteinlerin elektroforez ile ayrıştırılması için kullanıldı. Yine burada bulunan Bio-Rad Trans-Blot Turbo transfer sistemi elektroforez sonucu elde edilen proteinlerin jelden PVDF membrana aktarımı için kullanıldı.

3.1.2 Kullanılan malzemeler

Streptozosin (STZ, SIGMAS0130) adlı toksik molekül, sporadik AH modeli oluşturmak için kullanıldı. Kaempferol (Sigma 60010) adlı flavonoid molekül terapötik amaçlı kullanıldı. Lizis tamponu (RIPA Lysis Buffer sc-24948 (Santa-Cruz),

PMSF, sodyum ortovanadat, PIC) kimyasalları protein homojenizasyonu için kullanıldı. Protein konsantrasyon ölçüm kiti (Thermo Pierce BCA Protein Assay, (#23227)) protein konsantrasyonunu ölçmek için kullanıldı. Elektroforez yürütme tamponu (Bio-Rad Tris-Glycine SDS #1610732 tampon) protein elektroforezinde jellerde proteinin yürümesi için kullanıldı. Bio-Rad transfer tampon proteinlerin jelden membrana transferi esnasında kullanıldı. Membranların yıkanması için triton içeren tris tambonu kullanıldı. Ayrıca PSEN, pTau ve BACE (Cell Signaling, Danvers, ABD) proteinlerinin miktarını belirlemek için bu proteinlere karşı antikorlar ve bunları çözmek için tris tampon içerisinde süt tozu ile hazırlanmış bloklama solüsyonu kullanıldı. Protein miktarlarının optimizasyonu için iç kontrol olarak GAPDH antikorunu kullanıldı.

3.2 Metod

3.2.1 Hayvan çalışmaları

Long evans erkek sıçanlarda sporadik Alzheimer modeli oluşturularak yapılacak olan deney için Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Etik Kurul Komitesi'nden 30.05.2019 tarihinde 2019/26 sayılı etik kurul onayı alındı. Deneyler yapılırken deney hayvanlarının bakım ve kullanımı ile ilgili rehber (NIH publication No. 85-23, revised 1996) takip edilerek uygulamalar yapıldı.

18 adet erkek Long Evans sıçan (350-450) rastgele bir şekilde 3 deney grubuna ayrıldı. Sıçanlar Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deneysel Hayvanları Ünitesi'ndeki sıcaklık ve ışık kontrollü bir odada (21 ± 2 °C ve 12 saat aydınlık/ 12 saat karanlık döngüsü) sıçan yemi ve musluk suyu ile serbest olarak beslendi. Hayvan grupları aşağıdaki şekilde belirlenmiştir:

Grup 1 (Sham): İntraserebroventriküler olarak STZ çözücüsü ve intraperitoneal olarak KMP çözücüsü verilen grup (5 hayvan)

Grup2 (STZ): Sporadik Alzheimer modeli oluşturulmuş rat grubu (6 hayvan)

Grup3 (STZ+KMP): Sporadik Alzheimer modeli oluşturulmuş ve intraperitoneal enjeksiyon ile KMP verilen grup (7 hayvan),

3.2.1.1 İntraserebroventriküler STZ enjeksiyonu

İntraserebroventriküler STZ enjeksiyonu için STZ'yi çözdürmede kullanılacak olan yapay serebrospinal sıvısı (aCSF) önceden hazırlandı. aCSF'nin bozulmaması için solüsyon A ve solüsyon B (Tablo 3.1 ve Tablo 3.2) olmak üzere iki ayrı falkonda hazırlanıp 4 °C derecede saklandı. STZ hayvanlara 3 mg/kg olacak şekilde 20 µl aCSF içerisinde bir gün arayla iki doz şeklinde i.c.v. olarak verildi.

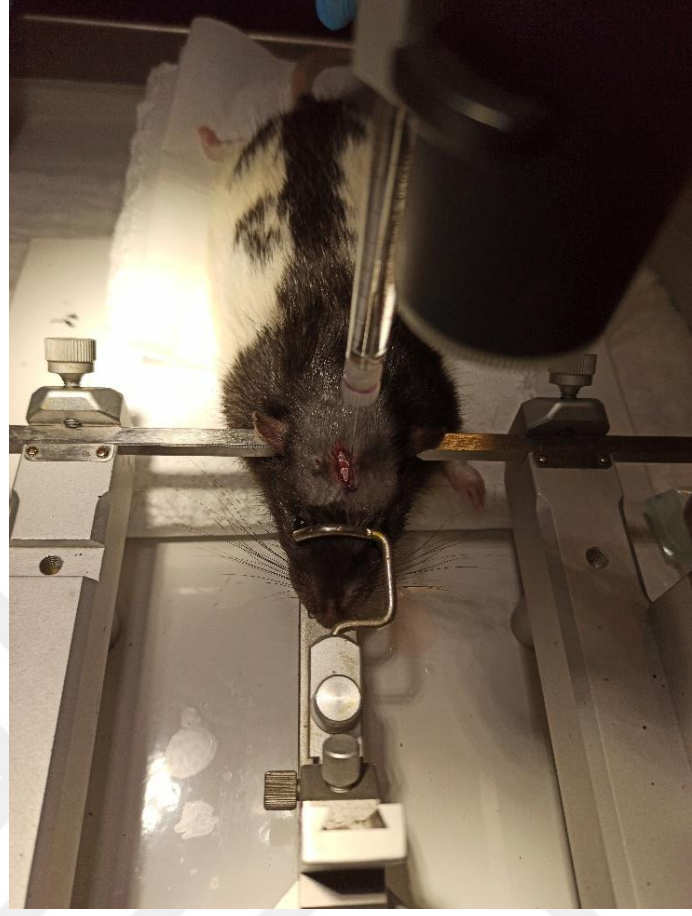
Tablo 3.1: Solüsyon A.

Bileşen	Miktar
3 mM KCl (mW=74.56 g/mol)	22 mg
140 mM NaCl (mW=58.4 g/mol)	820 mg
1.2 mM CaCl ₂ => mW=110.98 g/mol)	0.009 g=9 mg

Tablo 3.2: Solüsyon B

Bileşen	Miktar
0,3 mM NaH ₂ PO ₄ (mW=119.98 g/mol)	4 mg
0,1 mM Na ₂ HPO ₄ (mW=141.96 g/mol)	12 mg
3 mM D-Glukoz (mW=180.156 g/mol)	54 mg

ICV-STZ'nin enjekte edileceği gün solüsyon A ve solüsyon B 1:1 oranında karıştırıldı. STZ'ler ise çeker ocak altında hassas tartı ile tartılıp hazırlanan aCSF ile çözdürüldü. Hayvanlar operasyon sırasına göre anestezi altına alındı. Hayvanların anesteziye girdiğinden emin olunduktan sonra kafa derileri traş edildi. Hayvanlar stereotaksiye yerleştirilip sabitlendi. Yaklaşık 1 cm kadar bistüri yardımıyla kafalarında kesi açıldı. (Şekil 3.1) .



Şekil 3.1: Stereotaksiye Sıçanın Yerleştirilmesi.

Hamilton şırıngası yardımıyla bregma hedef alındı ve rat beyin atlasına göre lateralventriküller 0.8 anterioposterior ve 1.5 mediallyateral olarak işaretlenip kemik matkabı yardımıyla iki delik açıldı. STZ ve STZ+KMP gruplarına 5 dakikada 5 μ l salınım olacak şekilde ayarlanan mikroozmotik pompa aracılığıyla (Şekil 3.2) STZ, Sham grubuna ise sadece aCSF sağ ve sol ventriküllere verildi.



Şekil 3.2: Mikro Pump Cihazı.

Enjeksiyon tamamlandıktan sonra birkaç dakika beklenerek şırınga yavaşça çıkarıldı ve hayvanların kafası dikilip subkutan olarak 0.5 cc antibiyotik ve 0.03 cc ağız kesici verilip kafeslerine bırakıldı. STZ enjeksiyonu birinci gün kabul edilen ilk enjeksiyonun ardından bir gün ara verilerek üçüncü günde aynı prosedür uygulanarak tekrar edildi.

3.2.1.2 İntraperitoneal kaempferol enjeksiyonu

STZ molekülünün ICV olarak son enjeksiyon gününü takiben 28 gün sonra intraperitoneal olarak KMP enjeksiyonuna başlandı. 100 mg KMP 10 ml salin içindeki 400µl DMSO ile çözdürülerek 10 mg/kg/gün olacak şekilde 12 gün boyunca KMP+STZ grubuna enjekte edildi. STZ ve Sham grubuna ise aynı süreçte sadece çözücü madde enjekte edildi. İntraperitoneal enjeksiyon işlemleri deney hayvanlarında uygulanan standart ameliyat prosedürlerine göre yapıldı (Şekil 3.3).



Şekil 3.3: İntraperitoneal enjeksiyon.

3.2.2 Davranış deneyleri

3.2.2.1. Pasif sakınma testi

Deney düzeneği paslanmaz ızgara çelik tabanlı elektrik şoku verilmeyen aydınlık oda (40x30x26 cm ebatlarında ve 2000 lümen aydınlatmalı) ve hafif düzeyde elektrik şoku verilebilecek düzenekte hazırlanmış karanlık oda (40x30x26 cm) olmak üzere iki bölümden oluşmakta olan bir sistemde yapıldı (Şekil 3.4).



Şekil 3.4: Pasif sakınma testi aparatı.

İki oda arasında bir geçiş kapısının (8x4,5 cm) belirli süre aralıklarıyla açılıp kapanması yardımıyla deney gerçekleştirildi. Gruplardaki hayvanlar tek tek deney düzeneğine yerleştirildi. Başlangıçta sıçan aydınlık odaya yerleştirildi ve ortamı keşfetmeleri sağlandı. 20 saniye aydınlık ortamda kalmasına izin verilen sıçan bu

sürenin ardından aradaki kapının açılması yardımıyla karanlık ortama geçmesine izin verildi. Sıçan karanlık ortamda 2 saniye boyunca elektrik akımına maruz bırakıldı. Sistemle koordine çalışan bilgisayar programı (May Passive Avoidance programı, Şekil 3.5) yardımıyla elektrikten etkilenip tekrar aydınlık odaya geçen sıçanların deneyleri otomatik olarak sonlandırıldı. Uzun süreli bellek testi yapılan hayvanlar ertesi gün aynı işleme elektrik şoku olmadan tabii tutulup karanlık odaya geçip geçmedikleri değerlendirildi. Maksimum bekleme süresi olarak 300 saniye belirlendi [50].



Şekil 3.5: May Passive Avoidance programı.

3.2.2.2. Morris su labirenti

Morris su labirenti (MWM) testi kaempferol tedavisinin 15. gününde yapıldı. MWM, 210 cm çapında ve 51 cm yüksekliğinde bir tankın 45 cm yüksekliğine kadar oda sıcaklığında hayvanlarla contrast oluşturacak zararsız bir boya katılmış su ile dolduruldu. Bilgisayarda görüntünün izlenmesi ve kayıt yapılabilmesi için “Ethovision XT11 Noldus Bilgi Teknolojisi” adlı Hollanda menşeli program kullanıldı. Program yardımıyla havuz dört eşit parçaya ayrıldı. bu parçalardan birinin tam ortasına platform suyun 2 cm altında olacak ve görünmeyecek şekilde yerleştirildi. Hayvanların ipuçlarından yararlanabilmeleri için deney odasında çeşitli geometrik şekillerden oluşan ipuçları yerleştirildi [64].

Sıçanlara her gün dört deneme ile havuzun farklı kutuplarından daha önceden ayrılan dört ayrı kadrandan suya bırakılarak suyun içinde gizlenmiş olan platformu bulmaları

için 60 sn verildi. İlk gün 60 sn içinde platforma ulaşamayan sıçanlara platformun yeri hayvanlar platforma yözürölerek ve etraflarına 5-10 saniye bakmaları sağlanılarak öğretildi. Bu işlem daha sonra 4 gün boyunca platformun yeri gösterilmeden kendilerinin platformu bulmaları için maksimum 60 sn beklenilerek tekrar edildi. Hayvanların platformu bulması durumunda hayvan süre bitmeden sudan kafese alındı, bulamaması durumunda ise sürenin bitmesi ile kafese alındı. 6. gün prob denemesi yapıldı. MWM su tankındaki platform prob denemesinde sudan çıkartıldı. Sıçanlar platform kadranının tam karşısındanki kadrandan suya bırakıldı ve bir dakika boyunca kaçış platformunun önceden bulunduğu çeyrek bölgede geçirdikleri süre hesaplandı.

3.2.3 Dokuların alınması

Davranış deneylerinin tamamlanmasının ardından intraperitoneal olarak verilen anestezi altındaki hayvanlar dekapitasyon yöntemi ile sakrifiye edildi. Sakrifiye olan hayvanlardan alınan beyin dokuları ve çıkartılan hipokampüsler petri kabı yardımıyla kuru buz üzerinde dondurularak -80 °C’de saklanmak üzere dondurucuya kaldırıldı (Şekil 3.6).



Şekil 3.6: Long Evans türü sıçandan çıkartılan tam beyin.

3.2.4 Moleküler çalışmalar

3.2.4.1 Beyin dokusundan protein homojenizasyonu

Hayvanlardan sakrifikasyon sonrasında -80 °C’de muhafaza edilen hipokampüs dokuları dolaptan çıkarıldı. 3 ml lizis tamponu için 30 µl PMSF, 30 µl sodyum ortovabadat, 50 µl PIC ve 3 ml 1x RIPA tamponu kullanıldı. İçerisinde doku bulunan ependorf tüplerine 190 µl lizis tamponu ve 3-4 adet metal boncuk eklendi. Bead’li homojenizatör cihazına (Şekil 3.7) tüpler yerleştirildi ve bir dakika boyunca çalkalanarak dokular parçalandı. Parçalanmış dokular 20 dakika boyunca buz üstünde

inkübe edildi. 14000 rpm, 4°C’de 15 dakika santrifüjün ardından örnekler 3 tüpe ayrılıp -80°C’ye kaldırıldılar.

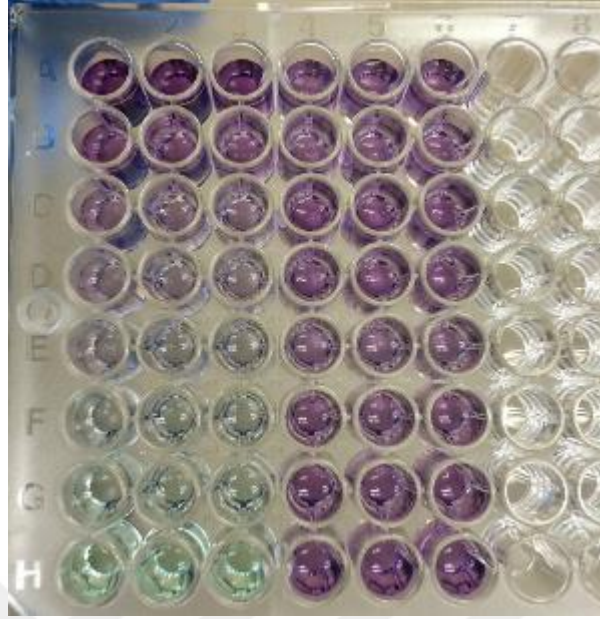


Şekil 3. 7: Homojenizatör.

3.2.4.2 Protein konsantrasyonunun ölçümü

Protein konsantrasyon ölçümü daha sonra proteinlerle yapılacak olan elektroforetik ve kromatografik deneylerin öncesinde yeteri kadar örneğin elimizde olduğunu anlamamız için gereken bir ön adımdır. Bu test 20 ile 2000 µg/L protein konsantrasyonunu ölçebilen ve tepkimeler ile birlikte gözle görülür bir renk değişiminin de algılanabildiği pratik ve duyarlı bir protein miktar tayini metodudur.

Deneyimizde bikinkoninik asit (BCA) ile uygun ortamı sağlayarak protein tarafından Cu^{2+} 'nın Cu^+ 'ya indirgenmesi ile protein konsantrasyonlarını belirlendi (Şekil 3.8).



Şekil 3.8: BCA protein konsantrasyon kiti ile örneklerdeki proteinlerin belirlenmesi. Deneyde 96 kuyucuklu tabaka ile çalışıldı. Her bir kuyucuğa 50:1 oranında hazırlanan BCA çalışma solüsyonundan 200 μl , lizis tamponundan 9 μl ve örnekten ise 1 μl eklendi. Bir kuyucuğa blank dediğimiz örnek olmayan sadece 200 μl çalışma solüsyonu ve 10 μl lizis tamponu eklendi. Hafifçe sallayıp daha önceden 37 °C'ye ayarlanmış olan etüvde 30 dakika boyunca inkübe edildi.

“Multiscan go” adlı cihaza yerleştirilip bilgisayar programında örnekler tanımlandıktan ve uygun standartlarla standard konsantrasyonuna uygun olan eğri çizildikten sonra cihazdan elde edilen absornabslarla her örnekte bulunan protein konsantrasyonları belirlendi.

3.2.4.3 Protein elektroforezi

Proteinlerin fonksiyonel karakteristiklerini anlama, hastalıkların tanı ve teşhisinde sıklıkla kullanılan yöntemlerden biri protein elektroforezidir. Protein elektroforezi, uygun miktardaki örneğin elektroforez sistemindeki kuyucuklara yüklenip iyon dengesini sağlayacak tampon içerisinde elektrik akımı yardımıyla yürütülmesi ile gerçekleşir. Bu yürütme işlemi proteinlerin elektrik yüklerinden faydalanarak elektriksel alanın oluşturulması ile sağlanır. Elektroforez sonucunda örnek içindeki

proteinler jeldeki farklı büyüklükteki por yapıları sayesinde moleküler ağırlıklarına göre ayrılırlar[73].

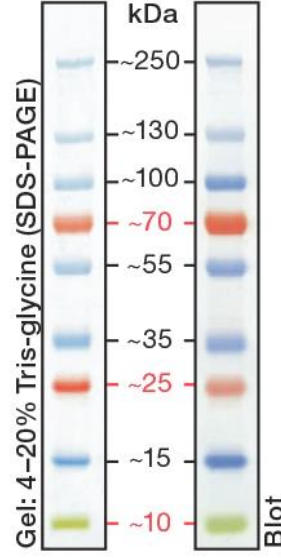
Protein elektroforezi için daha önceden izole edilmiş ve protein konsantrasyonları hesaplanmış örnekler, her örnekle aynı oranda olacak şekilde yükleme tamponu ve tüm örneklerin miktarını eşitlemek için tamamlayıcı olarak distile su kullanıldı. Daha sonra ise proteinler sıcaklıkla denatüre edilip santrifüjle karıştırıldı (Şekil 3.9).



Şekil 3.9: Proteinlerin elektroforez için hazırlanması.

Dikey elektroforez işlemi için hazır olarak alınan jeller dikkatlice çıkartılıp dH₂O ile yıkanıp altındaki bantlarında çıkartılması ile kullanıma hazır hale getirildi. Bio-Rad jel tankının yuvalarına jeller yerleştirildi. Jeller yerleştirildikten sonra tanka önceden hazırlanan elektroforez yürütme tamponu dolduruldu. Jeldeki kuyucuklar tampon ile

yıkandı. İlk kuyucuğa moleküler ağırlıkları belirleyebilmek için bilinen protein ağırlıklarında bantlar oluşturan bir belirteç yüklendi (Şekil 3.10).



Şekil 3.10: Proteinlerin elektroforezinde kullanılan bilinen protein ağırlıkları. Kalan kuyucuklara ise örnekler yüklendi. Tankın kapağı kapatıldı ve 120 voltta 1 saat örneklerin yürütme işlemi yapıldı (Şekil 3.11).



Şekil 3.11: Dikey elektroforez

Örnekler jelde ayrıldıktan sonra jeldeki proteinler membrana transfer işlemine tabii tutuldu. Bunu yapmadaki amaç hedeflediğimiz proteini özgün olarak belirlemeyi

sağlamaktır. İlk aşamada jeldeki proteinler membrana aktararak bloklama yapılır ikinci aşamada ise çeşitli yöntemlerle spesifik belirleme sağlanır. Bizim çalışmamızda spesifik belirleme için sıklıkla kullanılan immün emdirim yapıldı. Transfer işleminde jeldeki proteinler, protein bağlama özelliğine sahip olan nitroselüloz veya PVDF membrana aktarıldı.

Transfer işlemi için çalışmamızda Bio-Rad midi transfer stok ve PVDF membran kullanıldı. Bio-Rad transfer tamponundan 200 ml hazırlandı. Jeller çıkartılıp distile suyun içerisine yerleştirildi. Sonrasında PVDF membranın aktifleşmesi için membran 3 dk metanolde bekletildi. Stoklar ve metanolden çıkartılan PVDF membran 3 dakika transfer tamponunda bekletildi. Bio-Rad transfer cihazının içerisine sırasıyla filtre kağıdı, membran, jel ve tekrar filtre kağıdı yerleştirildi bu esnada elektrik akımının önlenmemesi için hava kabarcıklarının giderilmesi sağlandı. Transfer cihazının kapağı kapatılıp 25 voltta 2,5 amperlik akımla 7 dakika boyunca transfer işlemi gerçekleştirildi.

Transfer işleminin ardından ikinci basamak olan spesifik antikörlerle membrandaki proteinleri belirleme işlemine geçildi. İlk olarak membran bloklama işlemine tabii tutuldu. Bloklama ile membranda oluşan spesifik olmayan bağların giderilmesi ve kirli bir görüntünün oluşmasının engellenmesi amaçlandı. Bu amaçla en çok süt tozu, kazein veya BSA kullanılır. Membranlar öncelikle 5 dakika TBST 'de yıkandı. %5'lik süt tozu TBST içinde hazırlandı ve bir saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından birincil antikör (PSEN, BACE, pTau ve GAPDH) ile gece boyunca inkübasyon gerçekleştirildi. Ertesi gün 3 kez beşer dakikalık periyotlarla TBST ile

tekrar yıkanan membranlar ikincil antikor ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi (Şekil 3.12).



Şekil 3.12: Membranların ikincil antikorla inkübasyonu.

Tüm bu işlemlerin ardından mebrandaki proteinlerin görüntüleme aşamasına geçildi. Membrandaki proteinleri cihazda görüntülenebilir hale getirmek için Abbkine substrat kiti, 2 ml su, 0.5 ml A solüsyonu ve 0.5 ml B solüsyonu ile PVDF membran 3 dk

inkübe edildi. Proteinlerden elde edilen sinyaller Fusion FX7 (Vilber Lourmat) sisteminde CCD kamera altında işlendi ve bilgisayara görüntüler alındı (Şekil 3.13).



Şekil 3.13: Görüntüleme cihazı.

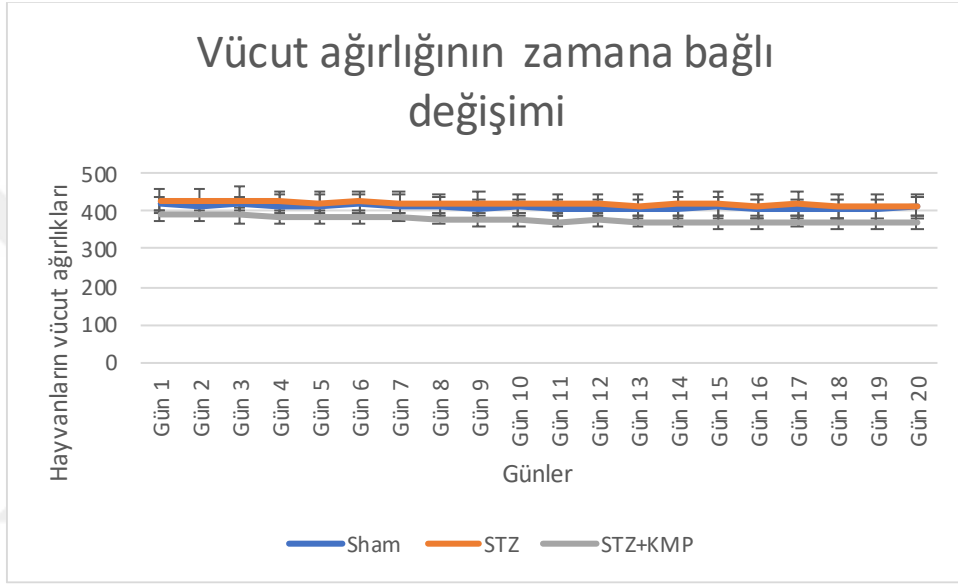
3.2.4.4 İstatiksel Analizler

Davranış deneylerinden ve moleküler deneylerden elde edilen verilerden grupların ortalaması ve standart sapması hesaplandı. Gruplar arası ve günler arası farklılıkları hesaplamak için tek yönlü ANOVA testi yapıldı. Morris su labirentinde öğrenme testi tekrarlı varyans analizi ile belirlendi. Basit etkilerin post hoc karşılaştırmaları Fisher's Least Significant Difference (LSD) testi kullanılarak yapıldı. Elde edilen verilerde istatistiksel anlamlılık değeri $p \leq 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 Hayvan ağırlıkları

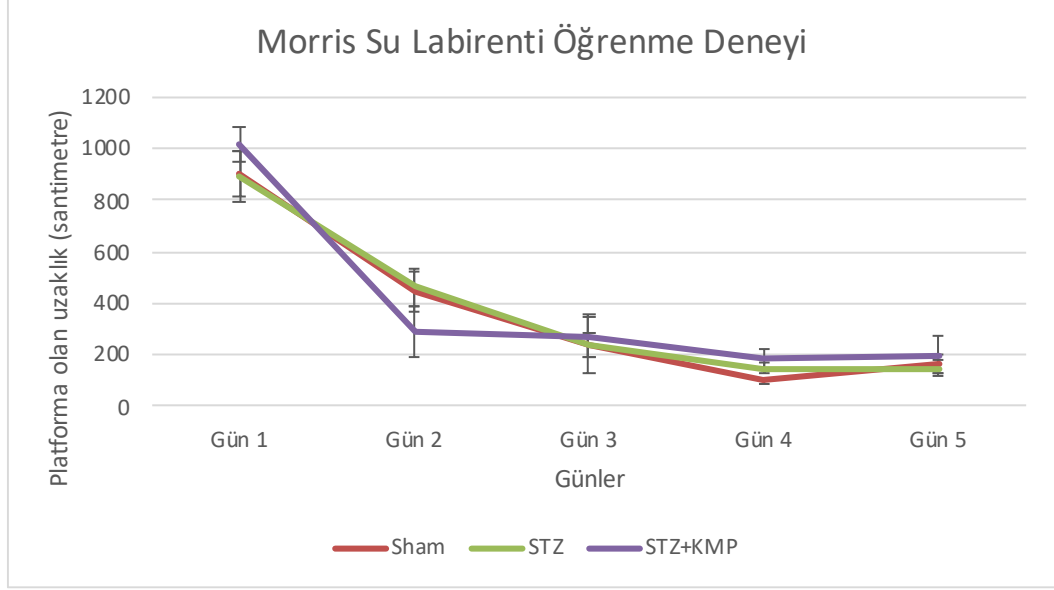
Hayvanlar STZ enjeksiyonundan önce ve sonra genel durumlarının kontrolü için tartıldı. (Şekil 4.1). Hayvan ağırlıkları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi.



Şekil 4.1: Hayvanların günlere göre ağırlık değişimi.

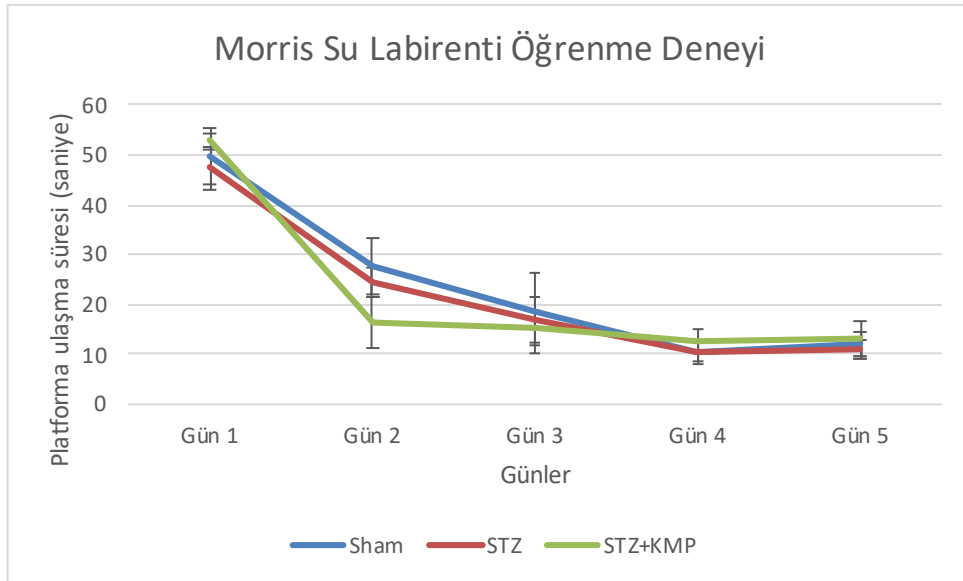
4.2 Morris Su Labirenti

Hipokampüse bağlı öğrenme ve bellek parametrelerini ölçen Morris su labirenti deneyi, her bir hayvanın günde dörder kez su tankının farklı kadrantlarından suya bırakılmasıyla ardarda 5 gün boyunca tekrar edildi. 6. gün ise probe adı verilen deney gününde platform su tankından çıkartılıp hayvanların platformun olduğu bölgede ne kadar vakit geçirdikleri hesaplanarak hafızaları test edildi. Şekil 4.2'de görüldüğü üzere ve tekrarlı ölçüm ANOVA verilerine göre günler arasında platforma yüzülen mesafe uzunluğunda her grup için anlamlı bir fark var iken ($p=0,000$ $F=182,367$) için gruplar arasında morris su labirenti öğrenme testinde yüzülen mesafe açısından ($F=0.118$; $p=0.890$) anlamlı bir fark bulunmamaktadır.



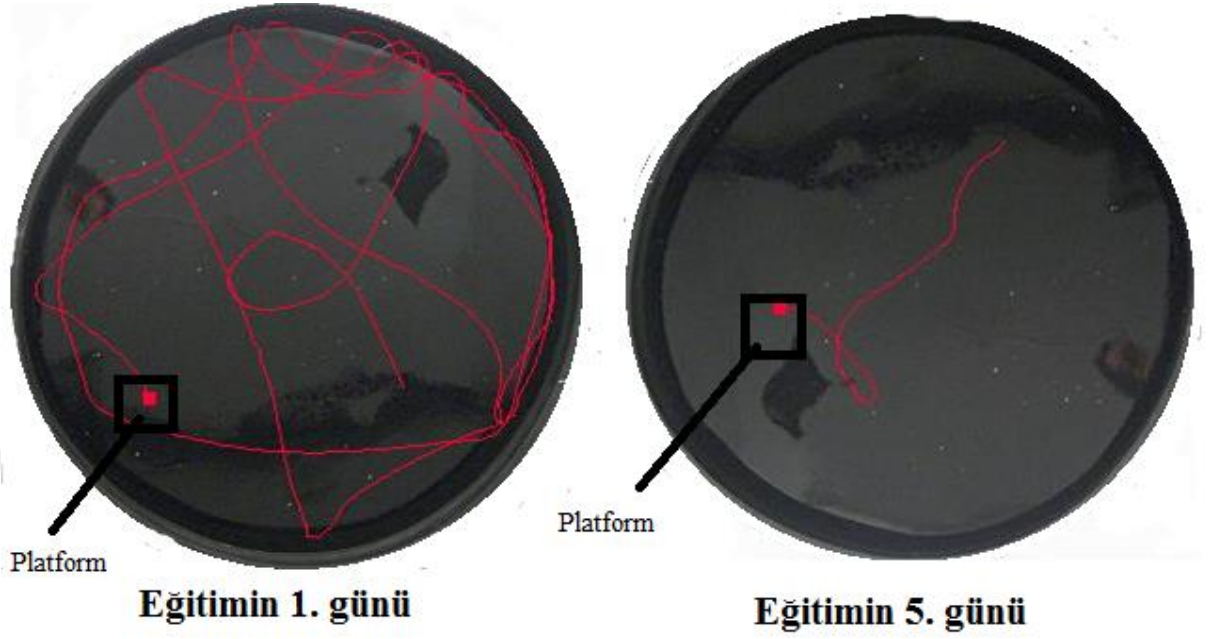
Şekil 4.2: STZ enjeksiyonu ile yapılan Alzheimer modelinde Morris su labirenti öğrenme deneyinde yüzülen mesafenin uzunluğunun günlere göre dağılımı.

Şekil 4.3'de gösterildiği gibi ve tekrarlı ölçüm ANOVA testine göre davranış deneylerinde yüzülen süreye bakıldığı zaman gruplar arasında ($F=0.891$; $p=0.431$) anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Günler arasında karşılaştırma yapıldığında ise sham grubu için gün 1 ve gün 2 arasında anlamlı farklılık ($p<0.05$) gözlenirken diğer günler arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir. STZ grubunda yine aynı şekilde ilk gün ile ikinci arasında anlamlı farklılık ($p<0.05$) gözlenirken diğer günler arasında anlamlılık gözlenmemiştir. STZ+KMP grubunda ise ikinci gün ve üçüncü gün arasında anlamlı farklılık varken ($p<0.05$) diğer günler arasında anlamlı farklılığa rastlanmamıştır.



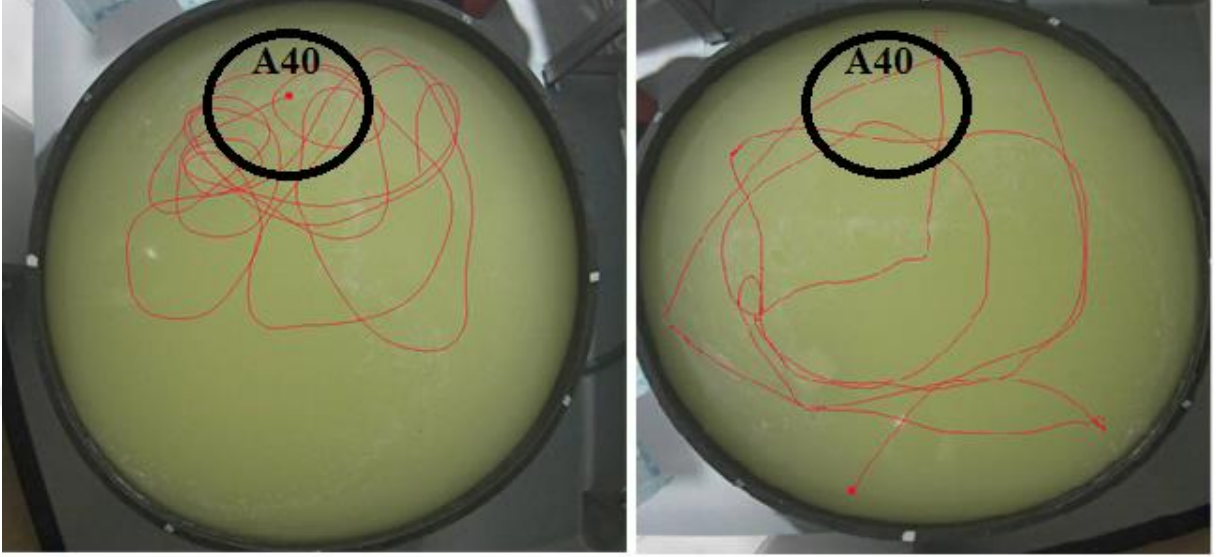
Şekil 4.3: STZ enjeksiyonu ile yapılan Alzheimer modelinde Morris su labirenti öğrenme deneyi (platforma ulaşma süresi).

Genel olarak bakıldığında tüm gruplarda gün 5 ile gün 1 arasında öğrenme gerçekleştikçe hayvanların platforma ulaşma sürelerinde ve mesafelerinde anlamlı bir farklılık ($p<0,05$) gözlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: STZ enjeksiyonu ile yapılan Alzheimer modelinde Morris su labirenti öğrenme deneyi 1. gün ve 5. gün.

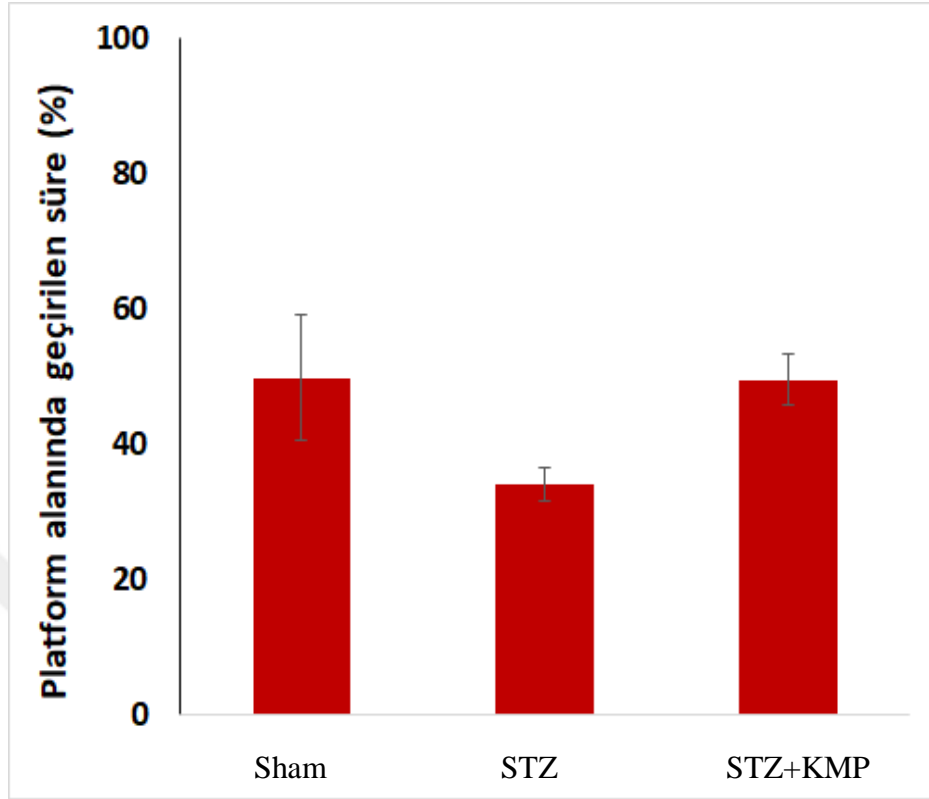
Morris su tankından platform çıkartılarak yapılan prob deneylerinde hayvanların platform kadranında ve platform alanında geçirdikleri süre bilgisayar yardımıyla hesaplanır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: Morris su labirenti deneyi prob gününde platformun yerini öğrenmiş ve öğrenememiş hayvanın izlediği yol.

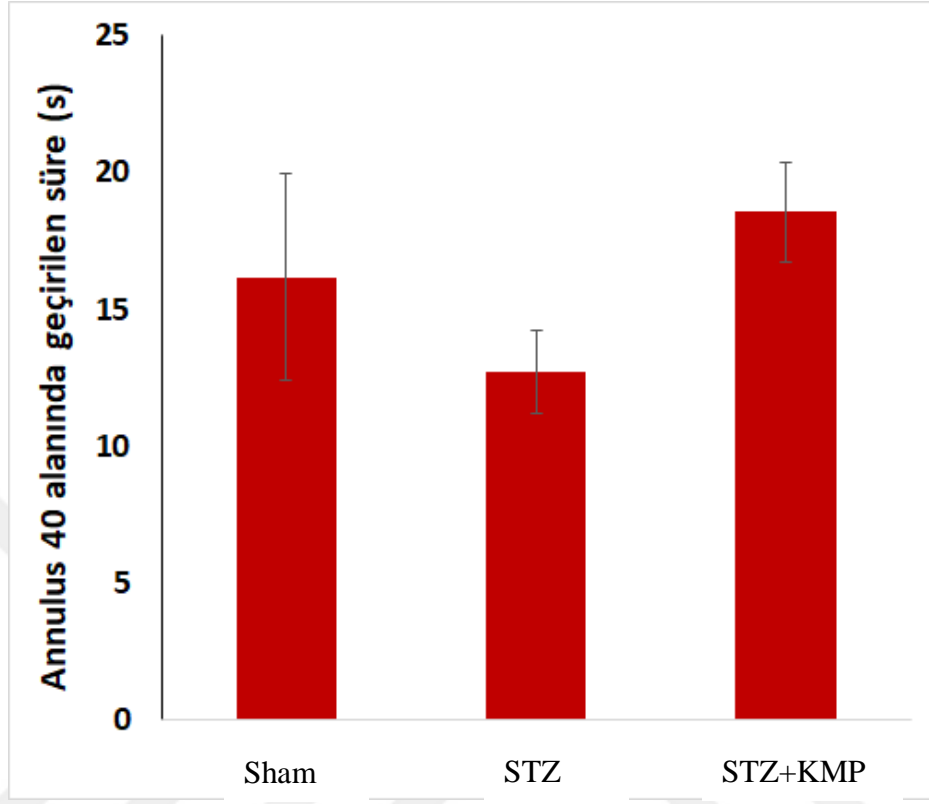
Gruplar arasındaki anlamlılığı değerlendirmek için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testleri yapılmıştır. Sonuç olarak Morris su labirenti prob gününde hayvanların platform kadranında geçirdikleri süreye bakılarak yapılan tek yönlü ANOVA testinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($F=2.118$; $p=0.163$)(Şekil 4.6). Post hoc testlerine baktığımız zaman STZ verilen hayvanların platformun bulunduğu kadranda geçirdikleri sürenin sham kontrol grubuna oranla daha az olduğu fakat beklenen anlamlılık düzeyine ulaşmadığı tespit edilmiştir ($p=0.110$). Diğer taraftan

KMP tedavisi bu düşen oranı STZ grubuna oranla yükseltip ($p=0.082$) kontrol seviyelerine ulaştırmıştır ($p=0.964$).



Şekil 4.6: STZ enjeksiyonu ile yapılan Alzheimer modelinde Morris su labirenti deneyinde bellek ölçümü.

Morris su labirenti prob gününde hayvanların platformun bulunduğu bölgede (Annulus 40 (A40)) geçirdikleri süreye bakılarak yapılan tek yönlü ANOVA testinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($F=1.440$; $p=0.270$) (Şekil 4.7).

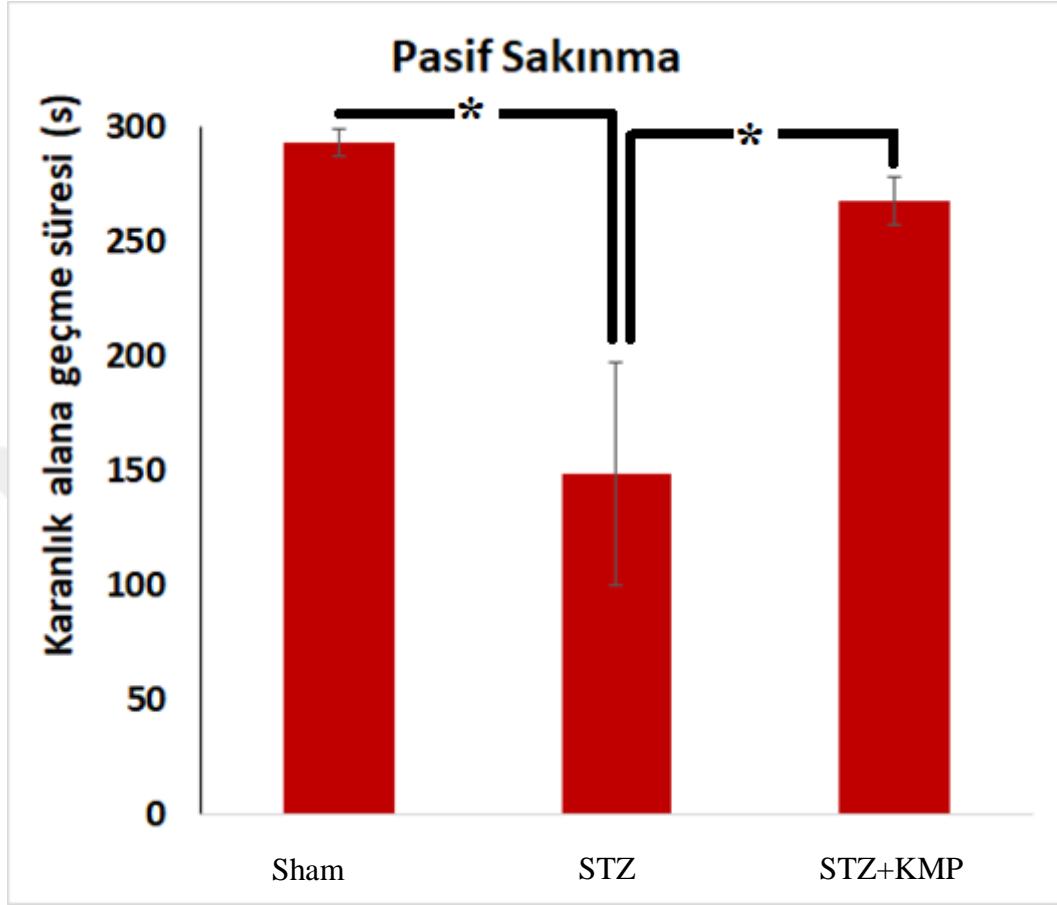


Şekil 4.7: STZ enjeksiyonu ile yapılan Alzheimer modelinde Morris su labirenti deneyinde bellek ölçümü

4.3 Pasif Sakınma Testi

Korkuya bağlı bellek ölçümünü ve buna bağlı olarak hipokampus ve amigdala ilişkisini gösteren pasif sakınma testinde tek yönlü ANOVA testine göre gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmiştir ($F=4.418$; $p=0.034$) (Şekil 4.6). Pasif sakınma davranış deneyinde gruplar arasındaki post hoc testleri ile yapılan ikili

karşılaştırmalarda ise STZ grubu ile Sham grubu arasında ($p=0.029$) ve STZ grubu ile STZ+KMP grubu arasında ($p=0.023$) anlamlı bir farklılık gözlenmiştir.



Şekil 4.8: STZ enjeksiyonu ile yapılan Alzheimer modelinde sıçanların pasif sakınmada gösterdikleri korku hafızası performansı sonuçları.

4.4 Protein Konsantrasyonları Ölçümü

Tablo 4.2’de yapılan protein konsantrasyonları ölçümlerinin sonuçları verilmiştir.

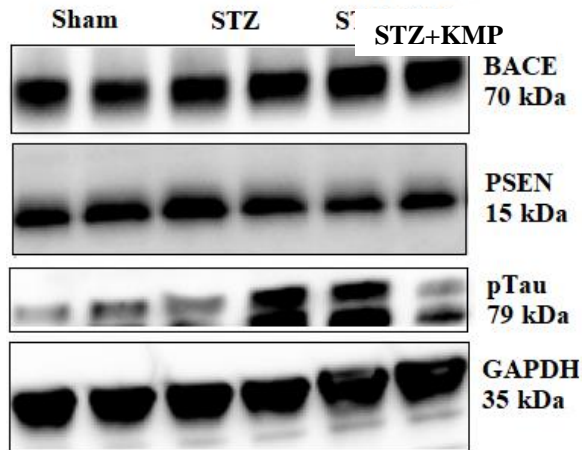
Tablo 4.2: Protein Konsantrasyonları (10 ile çarpılmış halleri, $\mu\text{g/ml}$)

Hayvan	Konsantrasyon	Hayvan	Konsantrasyon
Sham Grubu1.Hayvan	12200	STZ Grubu 5. Hayvan	10700
Sham Grubu2.Hayvan	12200	STZ Grubu 6. Hayvan	8240
Sham Grubu3.Hayvan	8760	STZ+ KMP Grubu 1. Hayvan	7430

Sham Grubu4.Hayvan	14700	STZ+KMP Grubu 2.	6310
		Hayvan	
Sham Grubu5.Hayvan	8520	STZ+KMP Grubu 3.	8910
		Hayvan	
STZ Grubu 1. Hayvan	10500	STZ+KMP Grubu 4.	8250
		Hayvan	
STZ Grubu 2. Hayvan	8310	STZ+KMP Grubu 5.	8120
		Hayvan	
STZ Grubu 3. Hayvan	7650	STZ+KMP Grubu 6.	8790
		Hayvan	
STZ Grubu 4. Hayvan	9020	STZ+KMP Grubu 7.	9160
		Hayvan	

4.5 Protein Elektroforezi

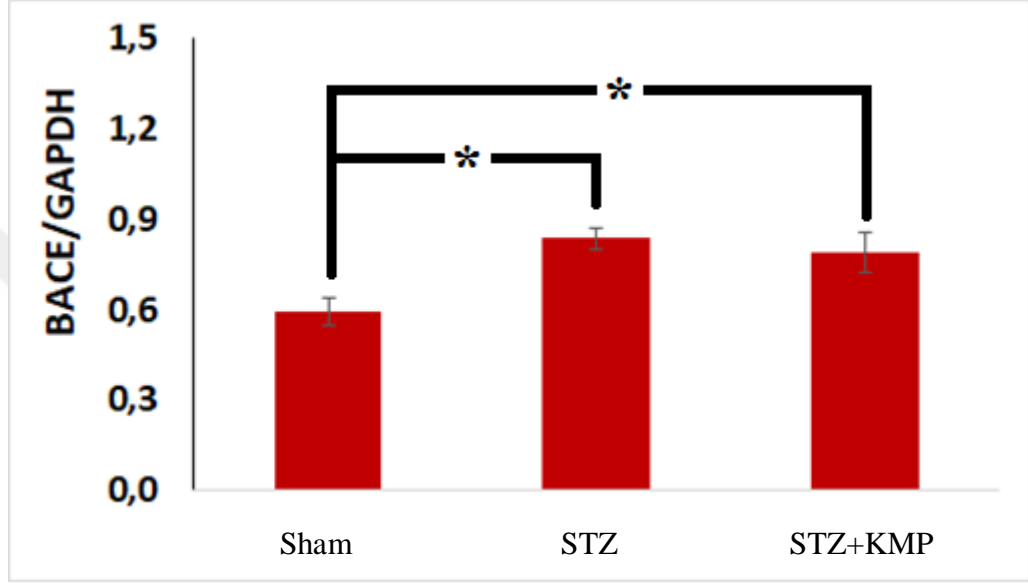
Total protein konsantrasyonlarının eşitlenmesi ile yapılan western blot görüntülemesinde STZ enjeksiyonu ile BACE, PSEN ve pTAU (TAU) miktarında sham grubuna oranla bir artış gözlenmiştir. KMP tedavisi uygulandığında ise BACE miktarında STZ grubuna oranla herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Diğer taraftan, KMP tedavisi sonrasında STZ grubuna oranla PSEN ve pTAU miktarlarında azalmaya sebep olmuştur (Şekil 4.9).



Şekil 4. 9:Elektroforez yapılan proteinlerin membran görüntüsü.

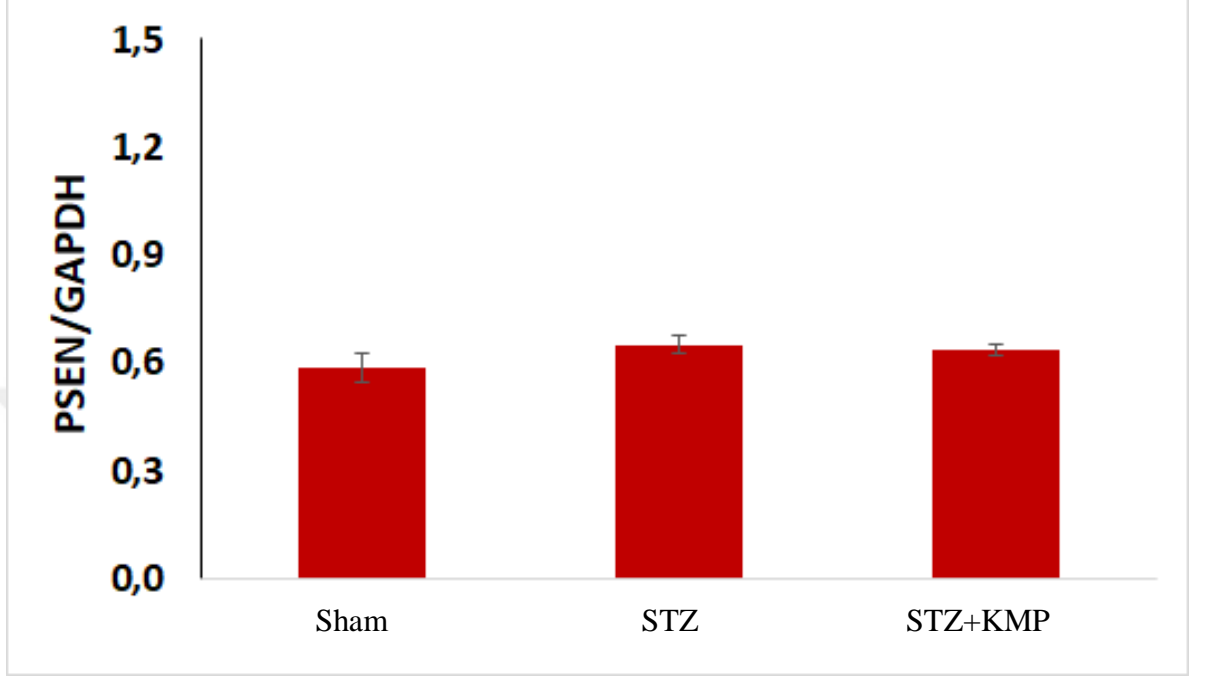
Yapılan western blot deneyleri sonucunda elde edilen protein bantları Image J programı ile densitometrik olarak değerlendirilmiş ve bu değerlendirme sonucunda yapılan tek yönlü ANOVA testine göre BACE proteininde anlamlı bir farklılık kaydedilmiştir

($F=6.510$ $p=0.018$) (Şekil 4.10). ANOVA testinin ardından gruplar arasında çoklu karşılaştırmaya olanak veren Post-Hoc testlerinde ise STZ enjeksiyonu yapılan grubun Sham grubuna oranla BACE miktarında anlamlı bir artış kaydedilmiştir ($p=0.008$). Diğer taraftan ise KMP tedavisi BACE oranını istatistiksel olarak anlamlı olmasa da STZ grubuna oranla bir miktar düşürmüştür ($p=0,518$) fakat Sham ile STZ+KMP grubu arasındaki anlamlı farklılığı ($p=0,023$) değiştirememiştir.



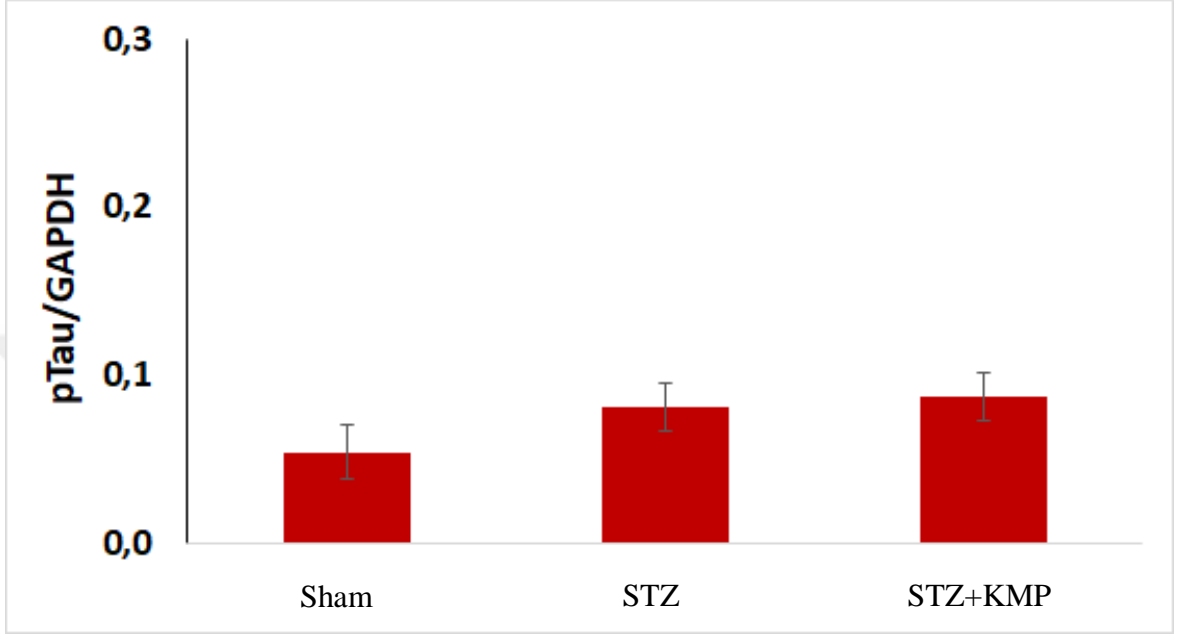
Şekil 4.10: Hayvan gruplarındaki BACE/GAPDH miktarını gösteren grafik.

Yapılan western blot deneyleri sonucunda elde edilen protein bantları ile yapılan tek yönlü ANOVA testi sonucunda PSEN proteini miktarlarında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($F=1.548$; $p=0.260$) (Şekil 4.11).



Şekil 4.11: Hayvan gruplarındaki PSEN/GAPDH miktarını gösteren grafik.

Yapılan western blot deneyleri sonucunda elde edilen protein bantları ile yapılan tek yönlü ANOVA testi sonucunda pTAU proteini miktarında da gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($F=1.228$; $p=0.343$) (Şekil 4.12).



Şekil 4.12: Hayvan gruplarındaki pTAU/GAPDH miktarını gösteren grafik.

5. TARTIŞMA

AH'nın nöropatolojisini ve hastalığın ilerleyişini kesin olarak değiştiren kanıtlanmış bir tedavi bulunmamaktadır[3]. AH için öngörülen yeni tedavi araştırmaları kognitif gerilemeyi durdurmayı, kognitif fonksiyonu güçlendirmeyi ve ayrıca patolojiye sebep olan etmenleri ortadan kaldırmayı hedef almaktadır[74]. . Mevcut ilaçların yalnızca semptomatik iyileşme sağladığı bilinmektedir. Bu nedenle günümüzde AH'na yol açan nöronal hasarı önleyebilecek nöroprotektif maddelerin araştırılması hız kazanmış ve bu amaçla. bu hastalığı taklit eden birçok hayvan modeli geliştirilmiştir[75]. Geliştirilen her model hastalığın farklı bir alanına hitap etmekte ve dedenen her ilacın etkisini farklı alanlarda göstermektedir. AH için sporadik deneysel modellerden biri olan ICV olarak STZ enjeksiyonunun kemirgenlerde nöroinflamasyon ve bilişsel bozukluklar geliştirdiği ve böylelikle AH patolojisini benzer semptomlar gösterdiği bulunmuştur[7]. Bu çalışmada kullanılan KMP molekülünün de özellikle oksidatif stres ve buna bağlı olarak gelişen nöroinflamasyon üzerinde etkili olabileceği belirtildiğinden bu flavonoidin Alzheimer tedavisinde bir fitoterapötik aday molekül olabileceğine dair öngörüler bulunmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada ICV-STZ enjeksiyonu ile sporadik AH modeli oluşturulmuş Long-Evans sıçanlarına tedavi edici bileşen olarak bir flavonoid olan KMP'ün AH üzerindeki tedavi edici potansiyelinin belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla, çalışmamızda STZ muamelesiyle indüklenen nöroinflamasyonu ve bunun neden olduğu davranışsal gerilemeyi incelemek ve KMP tedavisinin etkinliğini ölçmek için davranış deneyleri ve moleküler analizler yapıldı. Yapılan davranış deneylerinden Morris su labirenti deneyi, Morris adlı araştırmacı tarafından bulunan koku izini minimize eden özellikle mekansal hafızayı test eden ve böylelikle öğrenme ve bellek mekanizmasında görevli olan hipokampus bölgesindeki hasarı ölçmeyi sağlayan önemli bir davranış deneyidir[76]. Bu çalışmada da hem AH'de meydana gelen bilişsel bozulmayı göstermek için hem de KMP'ün semptomatik tedavisinin fizyolojik etkisini değerlendirmek için Morris su labirentinde öğrenme ve bellek testleri uygulandı. STZ enjeksiyonu ile yapılan bu çalışmada hipokampüse bağlı öğrenme mekanizmasında sham kontrole oranla anlamlı bir bozulmanın gözlemlenmediği görüldü. Bunun aksine platformuz yapılan bellek

deneyinde STZ verilen grupta anlamlı olmasa da bir azalmanın olduğu ayrıca korkuya bağlı öğrenme ve bellek mekanizması diğer bir değişle amigdala hipokampus arasındaki iletişimi ölçen pasif sakinme testinde de STZ verilen grupta anlamlı bir bozulmanın görüldüğü tespit edilmiştir. Literatürde yapılan benzer bir çalışmada STZ modeli oluşturulan sıçanların Morris su tankı deneylerinin 5. gününün sonunda mekansal öğrenme kabiliyetlerini kayb ettikleri gösterilmiştir [77]. Yine bir başka çalışmada STZ verilen sıçanların mekansal hafızası Morris su labirenti deneyiyle test edilmiş uzun süreli hafızada oluşan bozukluk başarılı bir şekilde gösterilmiştir [78]. Pasif sakinme testinde bozulma genellikle ciddi nöronal hasarların olduğunun bir göstergesidir çünkü ceza olarak verilen elektrik şoku güçlü bir uyarandır ve sağlıklı hayvanın iki bölmeden oluşan düzeneğin ilk olarak bırakıldığı aydınlık bölmede kalıp, elektrik şoku aldığı karanlık bölmeye geçmemesi beklenir[79]. Yapılan analizin sonucunda STZ ile oluşturulan AH'na sahip hayvanların Sham grubu hayvanlarına oranla elektrik şokunu hatırlamayıp karanlık alana geçtikleri ve hastalığın belirtisi olan hafıza kaybını yaşadıkları diğer çalışmalarda olduğu gibi bizim çalışmamızda da kaydedilmiştir [80]. Diğer taraftan KMP tedavisi STZ ile bozulan bellek parametrelerinin tedavi grubundaki sıçanlarda iyileşmesini sağlamıştır. . KMP gibi flavonoidlerin nörodejeneratif hastalıklardan kaynaklanan kognitif bozuklukların oluşumunu engellediğine dair çalışmalar bulunmaktadır [81]. 921 kişinin katıldığı bir kohort çalışmasında tüketilen yiyeceklerden oluşan bir anketten sonra yapılan nörolojik değerlendirme sonucunda flavanoid tüketenlerin AH'na bağlı gelişen unutkanlık riskinin düştüğü gösterilmiştir [82]. Bu çalışmalar bir flavonoid olma KMP'ni AH tedavisinde kullanılabilmesine dair güçlü kanıtlar sunmaktadır.

Yapılan bu çalışmalar KMP'ün davranışsal iyileştirici etkisinin görülmesinin moleküler temellerinin araştırılması ve etki mekanizmalarının çözülmesi konusunda araştırmaların artmasına sebep olmaktadır. Özellikle KMP'ün oksidatif strese ve nöroinflamasyona etkisi ve AH patolojisinin moleküler mekanizmasında da benzer parametrelerin bulunması bu molekülün tedavide güçlü bir aday olmasına işaret etmektedir. Bu nedenle davranışsal iyileşmeye ek olarak çalışmamızda moleküler deneylerle KMP'ün etki mekanizmasını çözmeyi ve detaylandırmayı hedefledik [83]. Bu amaçla AH patolojisinin en önemli belirteçlerinden olan BACE, pTAU ve PSEN miktarlarında KMP tedavisi ile ne şekilde bir değişim görüldüğü hakkında sonuçlar elde etmeye çalıştık. pTAU giriş bölümünde de bahsedildiği üzere AH'in temel patojenik belirteçlerinden olan nörofibriler yumakların oluşumuna yol açar. PSEN ise

erken dönem AH'de bozukluğa uğrayan genlerin ürettiği AH'nin otozomal dominant paterni için temel sayılabilen patojenik proteinlerden biridir. Çalışmamızda STZ enjeksiyonun özellikle BACE proteininde anlamlı artışlara sebep olduğu görülmektedir. Bu protein özellikle AH patogenezinde yer alan önemli proteinlerden biridir. pTau ve PSEN proteinlerinde bir artışın olmaması bu modelin özellikle beta sekretaz miktarını arttırarak AH patolojisini oluşturduğuna dair kanıtlar sunmaktadır. KMP'ün ise artan bu BACE miktarı üzerinde anlamlı bir azalmaya sebep olmadığı gözlenmiştir. Ancak Kyoto Üniversitesi'ndeki araştırmacılar yaptıkları hücre deneylerinde KMP'nin BACE-1 inhibitörü olarak davrandığını göstermişlerdir [84]. Bununla birlikte KMP ile aynı flavonoid grubunda olan quersetin adlı molekülün A β ile indüklenen alzheimer modeli sıçanlarda BACE, pTAU ve PSEN genlerinin ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir [85]. Bu sonuçlar KMP'ün kognitif bozulmaları düzeltirken farklı bir strateji izlediğine işaret etmektedir. Yapılan bir çalışmada KMP'ün nöroprotektif etkisini oksidatif stresi azaltarak ve özellikle BDNF/CREB sinyal yolağının etkisini arttırarak gösterdiği belirtilmiştir [86]. Bu nedenle KMP'ün tedavi edici özelliğinin belirlenmesi için ilerleyen çalışmalarda farklı sinyal yolaklarının araştırılması gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Alzheimer hastalığı 65 yaş ve üzeri bireylerde tehdit niteliği taşıyan ve yaş ilerledikçe insidansı da artan bir bunama hastalığıdır. AH için henüz kesin bir tedavi bulunmayıp araştırmacılar günümüzde oksidatif stresi azaltmaya yönelik çalışmalara gün geçtikçe daha çok önem vermeye başlamışlardır. Bu süreçte, AH'nin nöropatolojisinin sadece A β plaklarına ve NFY'a bağlamayıp aynı zamanda nöroinflamasyonunda diğer bulgular kadar önemli bir yer tuttuğunun çeşitli araştırmacılar tarafından kabul edilmektedir.

Biz çalışmamızda birçok bitkinin içeriğinde bulunan KMP adlı nöroprotektif etkileri bilinen ancak AH konusunda ayrıntılı in-vivo çalışmaları henüz yapılmamış olan bir flavonoid molekülünü sporadik alzheimer modeli oluşturduğumuz sıçanlarda inceledik. Sonuç olarak davranış deneylerinde STZ ile bozulmalar ve aynı zamanda KMP'ün bu bozulmalara karşı olumlu etkileri olduğunu gözlemledik. Fakat bu etkilerin moleküler temelleri hakkında detaylı bilgiye ulaşamadık. Bunun nedenleri arasında KMP'ün kısa süre verilmesi gösterilebilir. Gelecekte yapılacak olan çalışmalarımızda daha farklı parametrelerle KMP'nin AH'nin tedavisindeki etkisinin moleküler temelini aydınlatılması planlanmaktadır. Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular bize KMP adlı molekülün AH için uygun bir aday molekül olabileceğini göstermektedir ancak halen ileri multidisipliner çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- [1] **Corriveau, R. A., Koroshetz, W. J., Gladman, J. T., Jeon, S., Babcock, D., Bennett, D. A., ve ark.** (2017). Alzheimer's Disease–Related Dementias Summit 2016: National research priorities. *89*(23), 2381-2391.
- [2] **Organization, W. H.** Dementia. (2019). World Health Organization; <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
- [3] **Schott, C. A. L. J. H. J. M.** (2018). Alzheimer's disease. *EurJNeurol*, 59-70.
- [4] **Rajendran, P., Rengarajan, T., Nandakumar, N., Palaniswami, R., Nishigaki, Y. ve Nishigaki, I. J. E. j. o. m. c.** (2014). Kaempferol, a potential cytostatic and cure for inflammatory disorders. *86*, 103-112.
- [5] **Heneka, M. T., Carson, M. J., El Khoury, J., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., ve ark.** (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *14*(4), 388-405.
- [6] **Drummond, E. ve Wisniewski, T. J. A. n.** (2017). Alzheimer's disease: experimental models and reality. *133*(2), 155-175.
- [7] **Nazem, A., Sankowski, R., Bacher, M. ve Al-Abed, Y. J. J. o. n.** (2015). Rodent models of neuroinflammation for Alzheimer's disease. *12*(1), 74.
- [8] **Haschek, W. M., Rousseaux, C. G. ve Wallig, M. A.** (2013). *Haschek and Rousseaux's handbook of toxicologic pathology*. Academic Press.
- [9] **de Andrade Teles, R. B., Diniz, T. C., Costa Pinto, T. C., de Oliveira Júnior, R. G., Gama e Silva, M., de Lavor, É. M., ve ark.** (2018). Flavonoids as therapeutic agents in Alzheimer's and Parkinson's diseases: a systematic review of preclinical evidences. *2018*.
- [10] **Chen, A. Y. ve Chen, Y. C. J. F. c.** (2013). A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *138*(4), 2099-2107.
- [11] **Kouhestani, S., Jafari, A. ve Babaei, P. J. N. r. r.** (2018). Kaempferol attenuates cognitive deficit via regulating oxidative stress and neuroinflammation in an ovariectomized rat model of sporadic dementia. *13*(10), 1827.
- [12] **Yeon, M. J., Lee, M. H., Kim, D. H., Yang, J. Y., Woo, H. J., Kwon, H. J., ve ark.** (2019). Anti-inflammatory effects of Kaempferol on Helicobacter pylori-induced inflammation. *83*(1), 166-173.
- [13] **Kim, J. K. ve Park, S. U. J. E. j.** (2020). Recent studies on kaempferol and its biological and pharmacological activities. *19*, 627.
- [14] **Darbandi, N., Ramezani, M., Khodaghali, F. ve Noori, M. J. B.** (2016). Kaempferol promotes memory retention and density of hippocampal CA1 neurons in intra-cerebroventricular STZ-induced experimental AD model in Wistar rats. *62*(3).

- [15] Neundörfer., H. H. v. G. (2003). The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci*.
- [16] Bondi, M. W., Edmonds, E. C. ve Salmon, D. P. J. J. o. t. I. N. S. J. (2017). Alzheimer's disease: past, present, and future. *23(9-10)*, 818.
- [17] HANAĞASI, H. A. ve EMRE, M. J. T. K. N.-Ö. K. (2009). Demans kavramı ve hastaya yaklaşım. *2(1)*, 1-4.
- [18] Tiwari, S., Atluri, V., Kaushik, A., Yndart, A. ve Nair, M. J. I. J. o. N. (2019). Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *14*, 5541.
- [19] J. A. Soria Lopez, H. M. G., ve G. C. Léger. (2019). *Handbook of Clinical Neurology* ss. 231-255):
- [20] Pivac, M. N. P. v. N. (2019). *Genetic Markers of Alzheimer's Disease*. 27-52 s.
- [21] DeTure, M. A. ve Dickson, D. W. J. M. n. (2019). The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *14(1)*, 1-18.
- [22] Armstrong, R. A. J. F. N. (2019). Risk factors for Alzheimer's disease. *57(2)*, 87-105.
- [23] Salvator, H., Grassin-Delyle, S., Naline, E., Brollo, M., Fournier, C., Couderc, L.-J., ve ark. (2020). Contrasting effects of adipokines on the cytokine production by primary human bronchial epithelial cells: inhibitory effects of adiponectin. *11*, 56.
- [24] Kim, J. H. J. D. ve disorders, n. (2018). Genetics of Alzheimer's disease. *17(4)*, 131-136.
- [25] Long, J. M. ve Holtzman, D. M. J. C. (2019). Alzheimer disease: an update on pathobiology and treatment strategies. *179(2)*, 312-339.
- [26] Cacace, R., Sleegers, K., Van Broeckhoven, C. J. A. s. ve Dementia. (2016). Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. *12(6)*, 733-748.
- [27] Berkowitz, C., Mosconi, L., Rahman, A., Scheyer, O., Hristov, H. ve Isaacson, R. S. J. T. j. o. p. o. A. s. d. (2018). Clinical application of APOE in Alzheimer's prevention: a precision medicine approach. *5(4)*, 245-252.
- [28] Bird, T. D. (2018). Alzheimer disease overview. *GeneReviews®[Internet]*: University of Washington, Seattle.
- [29] Perl, D. P. J. M. S. J. o. M. A. J. o. T., Translational, P. M. A. J. o. ve Medicine, P. (2010). Neuropathology of Alzheimer's disease. *77(1)*, 32-42.
- [30] Glenner, G. G., Wong, C. W. J. B. ve communications, b. r. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *120(3)*, 885-890.
- [31] Kang, J., Lemaire, H.-G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K.-H., ve ark. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *325(6106)*, 733-736.
- [32] Dawkins, E. ve Small, D. H. J. J. o. n. (2014). Insights into the physiological function of the β -amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease. *129(5)*, 756-769.
- [33] Oh, E. S., Savonenko, A. V., King, J. F., Tucker, S. M. F., Rudow, G. L., Xu, G., ve ark. (2009). Amyloid precursor protein increases cortical neuron size in transgenic mice. *30(8)*, 1238-1244.

- [34] Kong, G. K.-W., Miles, L. A., Crespi, G. A., Morton, C. J., Ng, H. L., Barnham, K. J., ve ark. (2008). Copper binding to the Alzheimer's disease amyloid precursor protein. *37*(3), 269-279.
- [35] Clarris, H. J., Cappai, R., Heffernan, D., Beyreuther, K., Masters, C. L. ve Small, D. H. J. J. o. n. (1997). Identification of heparin-binding domains in the amyloid precursor protein of Alzheimer's disease by deletion mutagenesis and peptide mapping. *68*(3), 1164-1172.
- [36] Bishop, G. M., Robinson, S. R. J. D. ve aging. (2004). Physiological roles of amyloid- β and implications for its removal in Alzheimer's disease. *21*(10), 621-630.
- [37] MacLeod, R., Hillert, E.-K., Cameron, R. T. ve Baillie, G. S. J. F. s. O. (2015). The role and therapeutic targeting of α -, β -and γ -secretase in Alzheimer's disease. *1*(3).
- [38] Uddin, M., Kabir, M., Jeandet, P., Mathew, B., Ashraf, G. M., Perveen, A., ve ark. (2020). Novel ANTI-Alzheimer's therapeutic molecules targeting amyloid precursor protein processing. *2020*.
- [39] Hampel, H., Vassar, R., De Strooper, B., Hardy, J., Willem, M., Singh, N. The β -secretase BACE1 in Alzheimer's disease. *Biological psychiatry*.
- [40] Hitzengerger, M., Götz, A., Menig, S., Brunschweiler, B., Zacharias, M., & Scharnagl, C. . (2020). The dynamics of γ -secretase and its substrates. In *Seminars in Cell & Developmental Biology*. Academic Press. *Academic Press*
- [41] O'Brien, R. J. ve Wong, P. C. J. A. r. o. n. (2011). Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *34*, 185-204.
- [42] Halliday, G., Robinson, S. R., Shepherd, C., Kril, J. J. C., Pharmacology, E. ve Physiology. (2000). Alzheimer's disease and inflammation: a review of cellular and therapeutic mechanisms. *27*(1-2), 1-8.
- [43] Brothers, H. M., Gosztyla, M. L. ve Robinson, S. R. J. F. i. a. n. (2018). The physiological roles of amyloid- β peptide hint at new ways to treat Alzheimer's disease. *10*, 118.
- [44] Hardy, J. ve Higgins, G. J. S. N. S. (1992). Disease: Alzheimer's cascade hypothesis amyloid. *256*, 184-185.
- [45] Murphy Jr, P. R. J. L. C. (2015). *AM* (2015).
- [46] Chávez-Gutiérrez, L. S., Maria. (2020). Mechanisms of neurodegeneration—Insights from familial Alzheimer's disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology*.
- [47] Pocernich, C. B. ve Butterfield, D. A. J. B. e. B. A.-M. B. o. D. (2012). Elevation of glutathione as a therapeutic strategy in Alzheimer disease. *1822*(5), 625-630.
- [48] Metaxas, A. ve Kempf, S. J. J. N. r. r. (2016). Neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease: elucidation of the molecular mechanism by immunohistochemistry and tau protein phospho-proteomics. *11*(10), 1579.
- [49] Härtig, W., Stieler, J., Boerema, A. S., Wolf, J., Schmidt, U., Weißfuß, J., ve ark. (2007). Hibernation model of tau phosphorylation in hamsters: selective vulnerability of cholinergic basal forebrain neurons—implications for Alzheimer's disease. *25*(1), 69-80.
- [50] Avila, J., Jiménez, J. S., Sayas, C. L., Bolós, M., Zabala, J. C., Rivas, G., ve ark. (2016). Tau structures. *8*, 262.

- [51] **Brickwood, B.** (2020). Alzheimer's disease: amyloid plaques and neurofibrillary tangles.
- [52] **Kolarova, M., García-Sierra, F., Bartos, A., Ricny, J. ve Ripova, D. J. I. j. o. A. s. d.** (2012). Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease. *2012*.
- [53] **Kinney, J. W., Bemiller, S. M., Murtishaw, A. S., Leisgang, A. M., Salazar, A. M., Lamb, B. T. J. A. s., ve ark.** (2018). Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *4*, 575-590.
- [54] **Hensley, K. J. J. o. A. s. d.** (2010). Neuroinflammation in Alzheimer's disease: mechanisms, pathologic consequences, and potential for therapeutic manipulation. *21*(1), 1-14.
- [55] **Hampel, H., Caraci, F., Cuello, A. C., Caruso, G., Nisticò, R., Corbo, M., ve ark.** (2020). A Path Toward Precision Medicine for Neuroinflammatory Mechanisms in Alzheimer's Disease. *11*, 456.
- [56] **Yang, Y. ve Zhang, Z. J. F. i. A. N.** (2020). Microglia and Wnt Pathways: Prospects for Inflammation in Alzheimer's Disease. *12*, 110.
- [57] **Devanney, N. A., Stewart, A. N. ve Gensel, J. C. J. E. N.** (2020). Microglia and macrophage metabolism in CNS injury and disease: The role of immunometabolism in neurodegeneration and neurotrauma. 113310.
- [58] **Hane, F. T., Robinson, M., Lee, B. Y., Bai, O., Leonenko, Z. ve Albert, M. S. J. J. o. A. s. D.** (2017). Recent progress in Alzheimer's disease research, part 3: diagnosis and treatment. *57*(3), 645-665.
- [59] **Assosiation, A. s.** (2019). FDA-approved treatments for Alzheimer's.
- [60] **Briggs, R., Kennelly, S. P. ve O'Neill, D. J. C. m.** (2016). Drug treatments in Alzheimer's disease. *16*(3), 247.
- [61] **Parsons, C. G., Danysz, W., Dekundy, A. ve Pulte, I. J. N. r.** (2013). Memantine and cholinesterase inhibitors: complementary mechanisms in the treatment of Alzheimer's disease. *24*(3), 358-369.
- [62] **FENG, Y. J. A. t. f. A. s.** (2012). WANG X c.
- [63] **Isik, A. T., Celik, T., Ulusoy, G., Ongoru, O., Elibol, B., Doruk, H., ve ark.** (2009). Curcumin ameliorates impaired insulin/IGF signalling and memory deficit in a streptozotocin-treated rat model. *31*(1), 39-49.
- [64] **Dalli, T., Beker, M., Terzioglu-Usak, S., Akbas, F., Elibol, B. J. B. ve Pharmacotherapy.** (2018). Thymoquinone activates MAPK pathway in hippocampus of streptozotocin-treated rat model. *99*, 391-401.
- [65] **Murota, K., Nakamura, Y., Uehara, M. J. B., biotechnology, ve biochemistry.** (2018). Flavonoid metabolism: The interaction of metabolites and gut microbiota. *82*(4), 600-610.
- [66] **Dabeek, W. M. ve Marra, M. V. J. N.** (2019). Dietary quercetin and kaempferol: Bioavailability and potential cardiovascular-related bioactivity in humans. *11*(10), 2288.
- [67] **PubChem.** Kaempferol. 2020, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280863>
- [68] **Ren, J., Lu, Y., Qian, Y., Chen, B., Wu, T., Ji, G. J. E., ve ark.** (2019). Recent progress regarding kaempferol for the treatment of various diseases. *18*(4), 2759-2776.
- [69] **Filomeni, G., Graziani, I., De Zio, D., Dini, L., Centonze, D., Rotilio, G., ve ark.** (2012). Neuroprotection of kaempferol by autophagy in models of rotenone-mediated acute toxicity: possible implications for Parkinson's disease. *33*(4), 767-785.

- [70] Leung, H. W.-C., Lin, C.-J., Hour, M.-J., Yang, W.-H., Wang, M.-Y., Lee, H.-Z. J. F., ve ark. (2007). Kaempferol induces apoptosis in human lung non-small carcinoma cells accompanied by an induction of antioxidant enzymes. *45*(10), 2005-2013.
- [71] Ayoobi, F., Shamsizadeh, A., Fatemi, I., Vakilian, A., Allahtavakoli, M., Hassanshahi, G., ve ark. (2017). Bio-effectiveness of the main flavonoids of *Achillea millefolium* in the pathophysiology of neurodegenerative disorders-a review. *20*(6), 604.
- [72] Simunkova, M., Alwasel, S. H., Alhazza, I. M., Jomova, K., Kollar, V., Rusko, M., ve ark. (2019). Management of oxidative stress and other pathologies in Alzheimer's disease. 1-23.
- [73] Srinivas, P. R. Introduction to Protein Electrophoresis. (2019). https://experiments.springernature.com/articles/10.1007/978-1-4939-8793-1_2
- [74] Weller, J. B., A. 2018. Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. .
- [75] Esquerda-Canals, G., Montoliu-Gaya, L., Güell-Bosch, J. ve Villegas, S. J. J. o. A. s. D. (2017). Mouse models of Alzheimer's disease. *57*(4), 1171-1183.
- [76] Bromley-Brits, K., Deng, Y. ve Song, W. J. J. (2011). Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice. *(53)*, e2920.
- [77] Wang, H., Wang, H., Cheng, H. ve Che, Z. J. M. m. r. (2016). Ameliorating effect of luteolin on memory impairment in an Alzheimer's disease model. *13*(5), 4215-4220.
- [78] de Oliveira Santos, T., Mazucanti, C. H. Y., Xavier, G. F., da Silva Torrrão, A. J. P. ve behavior. (2012). Early and late neurodegeneration and memory disruption after intracerebroventricular streptozotocin. *107*(3), 401-413.
- [79] Jänicke, B. ve Coper, H. (1996). Tests in rodents for assessing sensorimotor performance during aging. *Advances in Psychology* Cilt 114, ss. 201-233): Elsevier.
- [80] Alluri, R., Ambati, S. R., Routhu, K., Kopalli, S. R. ve Koppula, S. J. E. j. (2020). Phosphoinositide 3-kinase inhibitor AS605240 ameliorates streptozotocin-induced Alzheimer's disease like sporadic dementia in experimental rats. *19*, 71.
- [81] de Araújo, F. F., de Paulo Farias, D., Neri-Numa, I. A. ve Pastore, G. M. J. F. C. (2020). Polyphenols and their applications: An approach in food chemistry and innovation potential. 127535.
- [82] Holland, T. M., Agarwal, P., Wang, Y., Leurgans, S. E., Bennett, D. A., Booth, S. L., ve ark. (2020). Dietary flavonols and risk of Alzheimer dementia. *94*(16), e1749-e1756.
- [83] Cray, C., Tatum, L. M. J. J. o. A. M. ve Surgery. (1998). Applications of protein electrophoresis in avian diagnostics. 4-10.
- [84] Shimmyo, Y., Kihara, T., Akaike, A., Niidome, T. ve Sugimoto, H. J. B. e. B. A.-G. S. (2008). Flavonols and flavones as BACE-1 inhibitors: structure–activity relationship in cell-free, cell-based and in silico studies reveal novel pharmacophore features. *1780*(5), 819-825.
- [85] Mohebbali, N., Shahzadeh Fazeli, S. A., Ghafouri, H., Farahmand, Z., MohammadKhani, E., Vakhshiteh, F., ve ark. (2018). Effect of

flavonoids rich extract of Capparis spinosa on inflammatory involved genes in amyloid-beta peptide injected rat model of Alzheimer's disease. *21*(2), 143-150.

- [86] Yan, T., He, B., Xu, M., Wu, B., Xiao, F., Bi, K., ve ark. (2019). Kaempferide prevents cognitive decline via attenuation of oxidative stress and enhancement of brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin receptor kinase B/cAMP response element-binding signaling pathway. *33*(4), 1065-1073.



ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad :Melike UYSAL
Doğum Tarihi ve Yeri : 20.06.1995/Karaman
E-posta : melike.uyosal.1995@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU:

- Lisans : 2018, İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2015 – İstanbul Üniversitesi, İç hastalıkları anabilim dalı, Moleküler Genetik Laboratuvarı Stajı (Doç. Dr. Ender Coşkunpınar ve grubu ile birlikte)
- 2016 – Bilkent Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji Laboratuvarı Stajı ((Doç. Dr. Ebru Elbay ve grubu ile birlikte)
- 2017 – Medipol Üniversitesi, Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası Kursu (Başarı ile tamamlandı).
- 2018 – Medipol Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Nöroloji anabilim dalı stajı (Lütfü Hanoğlu ile birlikte)
- 2019 – Leiden Üniversitesi, İlaç Araştırmaları Merkezi, Erasmus + Stajı (Doç. Dr. Alireza Mashaghi Tabari ve grubu ile birlikte)

YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

Farmanli O., Uysal M., Ayhan Y. E., Gokdemir C., Donmez O. F., Bastug S., Parlak Mu., Uckun I., Jafarov A., Pamuk I., Farmanli K., Karatas I. (2020), Hypothes advanced biotechnological treatment approaches against sars-cov2 covid19. International Journal of Innovative Science and Research Technology (Cilt 5-2020, Sayı 4 – Nisan)