

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**6-PARADOL MOLEKÜLÜNÜN AMİLOİD BETA ENJEKSİYONU İLE
OLUŞTURULMUŞ ALZHEİMER HASTALIĞI MODELİNDEKİ
NÖROİNFLAMATUVAR VE NÖROPROTEKTİF ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Beyza Kinsiz

Sinir Bilimleri Anabilim Dalı

Sinir Bilimleri Tezli Yüksek Lisans

Tez Danışmanı: Doç.Dr. Birsen Elibol

TEMMUZ 2022

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**6-PARADOL MOLEKÜLÜNÜN AMİLOİD BETA ENJEKSİYONU İLE
OLUŞTURULMUŞ ALZHEİMER HASTALIĞI MODELİNDEKİ
NÖROİNFLAMATUVAR VE NÖROPROTEKTİF ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Beyza Kinsiz

Sinir Bilimleri Anabilim Dalı

Sinir Bilimleri Tezli Yüksek Lisans

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Birsen Elibol

TEMMUZ 2022

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 205317004 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi Beyza KİNSİZ, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “6-PARADOL MOLEKÜLÜNÜN AMİLOİD BETA ENJEKSİYONU İLE OLUŞTURULMUŞ ALZHEİMER HASTALIĞI MODELİNDEKİ NÖROİNFLAMATUVAR VE NÖROPROTEKTİF ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Doç. Dr. Birsen ELİBOL**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Mukaddes EŞREFOĞLU**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Prof. Dr. Ülkan KILIÇ
Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Teslim Tarihi : 29 Temmuz 2022
Savunma Tarihi : 5 Temmuz 2022

Sevgili aileme ve kaybettiğim anneannem Ülker Kaşo'ya,

ÖNSÖZ

Tüm yüksek lisans eğitim hayatım boyunca hiçbir konuda benden desteğini, sevgisini ve tüm sıkıntılara rağmen ilgisini esirgemeyen geleceğim için daha iyi yerlere gelmemi sağlamak amacı ile bilgilerini ve tecrübelerini paylaşan danışman hocam sayın Doç. Dr. Birsen Elibol'a,

Tez sürecimde bana yardımını esirgemeyen ve bir abla gibi bana destek olan sayın Arş. Gör. Nur Damla Korkmaz'a, Fatma Bedia Karakaya Çimen'e ve histoloji teknikeri Yağmur Yeşilırmak'a,

Ayrıca tez jürimde zaman ayırıp görev alan ve kıymetli görüşlerini paylaşan Prof. Dr. Ülkan Kılıç hocaya,

Tez deneylerim boyunca her konuda yardımlarından dolayı sayın Prof. Dr. Mukaddes Eşrefoğlu'na ve Dr. Öğr. Üyesi Emine Rümeysa Hekimoğlu'na

Tezimi 20210616 numaralı proje ile destekleyen Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca her zaman desteklerini yanımda hissettiğim biricik aileme,

Bu süreç boyunca benden desteğini esirgemen sevgili erkek arkadaşım ve arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim.

Temmuz 2022

Beyza Kinsiz
(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.

Beyza Kinsiz

İmza

İÇİNDEKİLER

Sayfa

1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Alzheimer Hastalığı	4
2.1.1. Alzheimer hastalığının patolojisi	6
2.1.1.1. Amiloid beta plakları ve Amiloid prekürsör proteini.....	7
2.1.1.2. Nörofibriler yumaklar	9
2.1.1.3. Nöroinflamasyon.....	10
2.1.2. Genetik faktörler	12
2.1.3. Tedavi.....	13
2.2. Zencefil Bitkisi (<i>Zingiber officinale</i>)	15
2.2.1. 6-Paradol	16
2.2.2. 6-Paradol hakkında yapılan çalışmalar	18
3.MATERYAL VE METOD.....	19
3.1. Materyal	19
3.1.1. Kullanılan cihazlar	19
3.1.2. Kullanılan malzemeler	20
3.2. Metod	22
3.2.1. Hayvan çalışmaları.....	22
3.2.1.1. Amiloid beta enjeksiyonu	22
3.2.1.2. Gavaj yöntemi ile 6-Paradol ve Donepezil hidroklorür verilmesi	24
3.2.2. Davranış deneyleri	26
3.2.2.1. Pasif sakınma testi.....	26
3.2.2.2. Yükseltilmiş artı labirent testi :	28
3.2.2.3. Morris su labirenti (MWM):	28
3.2.3. Dokuların alınması	30
3.2.4. Histolojik çalışmalar	31
3.2.4.1. Hemotoksilen eozin boyaması	31
3.2.4.1.1. Dokunun hazırlanması	31
3.2.4.1.2. Kesitlerin boyanması.....	33
3.2.4.2. Nissl boyaması	34
3.2.4.2.1. Doku hazırlanması	34
3.2.4.2.2. Cresyl violet hazırlanışı	35
3.2.4.2.3. Cresyl violet boyaması	35
3.2.4.3. Kongo kırmızısı boyaması	36
3.2.4.3.1. Kongo kırmızısı hazırlanışı	36
3.2.4.3.2. Kongo kırmızısı boyaması	36
3.2.4.4. GFAP boyaması	37

3.2.5. Moleküler çalışmalar.....	37
3.2.5.1 Beyin dokusundan protein homojenizasyonu	37
3.2.5.2. Protein konsantrasyonunun ölçümü	38
3.2.5.3. Örnek hazırlama	39
3.2.5.4. Western blot	40
3.2.6. İstatiksel analizler.....	44
4.BULGULAR	45
4.1. Hayvan Ağırlıkları	45
4.2. Davranış Deneyleri.....	45
4.2.1. Yükseltilmiş artı labirent testi	45
4.2.2. Pasif sakınma testi.....	47
4.2.3. Morris su labirenti testi	47
4.3. Histolojik Çalışmalar	52
4.3.1. Hematoksilen-Eozin boyama	52
4.3.2. Nissl boyama.....	53
4.3.3. Kongo boyama	55
4.3.4. GFAP immün boyaması.....	56
4.4. Western Blot.....	58
4.4.1. Protein konsantrasyonları ölçümü.....	58
4.4.2. Protein elektroforezi ve Western blotlama.....	58
5.TARTIŞMA	63
6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	68
KAYNAKLAR	70

KISALTMALAR

AH	: Alzheimer hastalığı
AD	: Alzheimer disease
DSÖ	: Dünya sağlık örgütü
NFY	: Nörofibriler yumaklar
Aβ	: Amiloid beta
Aβ₁₋₄₂	: Amiloid beta 1-42 peptit
EBAH	: Erken başlangıçlı Alzheimer hastalığı
GBAH	: Geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı
APP	: Amiloid öncü proteini
BACE 1	: Amiloid öncü protein β -sekretaz 1
PSEN1-2	: Presilinin 1-2
APOE	: Apolipoprotein E
MAP	: Mikrotübül asosiye protein
KBB	: Kan beyin Bariyeri
NO	: Nitrik Oksit
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
FKN	: Fraktalkin
ACh	: Asetil kolin
IL-1β	: İnterlökün-1 β
ROS	: Reaktif oksijen türleri
FDA	: ABD Gıda ve İlaç İdaresi
dH₂O	: Distile su
EtOH	: Etil alkol
ROI	: Region of interest
LTP	: Long term potentiation

SEMBOLLER

°C	: Derece Santigrat
µl	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
mg	: Miligram
µg.	: Mikrogram



TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 4.1: Protein konsantrasyon ölçümleri	58
---	----



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1: Alois Alzheimer ve hastası Auguste D.	4
Şekil 2.2 : Alzheimer hastalığının beyinde ilerleyişi	7
Şekil 2.3: APP Proteinin Amiloidojenik ve Amiloidojenik Olmayan Yollarda Kesimi	9
Şekil 2.4: Nörofibriler yumaklar ve amiloid plakların normal ve AH'ına sahip beyinlerde karşılaştırılması	10
Şekil 2.5: William Roscoe.....	15
Şekil 2.6: Zencefil bitkisi	16
Şekil 3.1: Sıçanda Bregma noktası.....	23
Şekil 3.2: Stereotaksiye yerleştirilmiş sıçan.....	24
Şekil 3.3: Gavaj yöntemi ile maddelerin verilmesi.....	25
Şekil 3.4: Pozitif kontrol grubu için kullanılan ilaç	25
Şekil 3.5: Pasif sakınma düzeneği.....	27
Şekil 3.6: May Pasif Sakınma Programı	27
Şekil 3.7: Yükseltilmiş Artı Labirenti.....	28
Şekil 3.8: Su labirenti deneyinin başlangıç noktaları.....	29
Şekil 3.9: Morris Su Labirenti.....	30
Şekil 3.10: <i>Long Evans</i> türü sıçandan çıkartılan tam beyin.	31
Şekil 3.11: Takip aşamaları.....	31
Şekil 3.12: Gömme cihazı	32
Şekil 3.14: Mikrotom ile kesit alınma işlemi	32
Şekil 3.15: Etüv cihazı	33
Şekil 3.16: Hemotoksilen eozin boyama işlemi (işlem ok sırasına göre yapılmıştır) ..	34
Şekil 3.17: Kriyostat cihazı	34
Şekil 3.18: Kriyostat ile doku kesiti alınma işlemi	35
Şekil 3.19: Bead'li homejenizatör.....	38
Şekil 3.20: BCA protein konsantrasyon kiti ile standartların ve örneklerin protein ölçümleri	38
Şekil 3.21: Multiscan go cihazı.....	39
Şekil 3.22: Proteinlerin ısıtılarak denatüre edilmesinde kullanılan inkübasyon cihazı	40
Şekil 3.23: Elektroforezde bilinen protein ağırlıkları	41
Şekil 3.24: A) Dikey elektrophorez yürütmenin başı. B) Yürütmenin sonu	41
Şekil 3.25: A) Dikey elektrophorez. B) Transfer cihazı	42
Şekil 3.26: Membranların ikincil antikorlanması.....	43
Şekil 3.27: Görüntüleme cihazı.....	43
Şekil 4.1: Hayvanların Ağırlık Değişimleri	45

Şekil 4.2 Açık ve kapalı kolda grupların geçirdiği süre ve geçirilen sürelerin yüzde değerleri	46
Şekil 4.3 Açık ve kapalı kola giriş sayıları, # $p<0.05$ Sham kontrole göre.....	46
Şekil 4.4: Pasif sakınma testinde karanlık odaya geçiş süreleri. * $p<0.05$ kontrole göre ve # $p<0.05$ Sham kontrole göre.	47
Şekil 4.5: Morris su tankında platformu bulana kadar havuzda izlenen yolun günler bazında değişimi	48
Şekil 4.6: Morris su tankında platformu bulana kadar havuzda geçirilen süre ve yüzülen mesafe. * $p<0.05$ kontrole göre	48
Şekil 4.7: Morris su tankında yüzme hızı	49
Şekil 4.8: Morris su tankı platformsuz probe deneyinde izlenen yol.....	50
Şekil 4.9: Morris su tankı platformsuz probe deneyinde platform çeyreğinde geçirilen sürenin toplam süreye oranı	51
Şekil 4.10: Morris su tankı platformsuz probe deneyinde platform çeyreğinde geçirilen sürenin toplam süreye oranı. * $p<0.05$ kontrole göre	51
Şekil 4.11: Morris su tankı platformsuz probe deneyinde platform çeyreğine ve A40' giriş sayıları. # $p<0.05$ sham kontrole göre.....	52
Şekil 4.12: Hematoksilen- Eozin boyaması, A: Kontrol grubu, B: Sham kontrol grubu, C: Pozitif kontrol, D: Alzhemir grubu (A β) , E: 6-Paradol verilen grup(A β -6P)	53
Şekil 4.13: Nissl boyama sonucunda grupların hippocampus CA1 bölgelerinin görüntüsü.....	54
Şekil 4.14: Gruplardaki nissle boyama sonucu hippocampus CA1 bölgesinde hücre sayılarının oranını gösteren grafik. * $p<0.05$ kontrole göre, # $p<0.05$ sham kontrole göre	55
Şekil 4.15: Kongo boyaması sonucu amiloid plakların görünümü.....	55
Şekil 4.16: Kongo boyaması ile elde edilen amiloid plak sayısı	56
Şekil 4.17: GFAP pozitif hücreler (40X)	56
Şekil 4.18: GFAP pozitif hücrelerin gruplar arasındaki farklılıklarının belirlenmesi	57
Şekil 4.19: GFAP pozitif hücrelerin gruplar arasındaki farklılıklarının belirlenmesi. * $p<0.05$ kontrole göre, # $p<0.05$ sham kontrole göre.....	57
Şekil 4.20: BACE protein ekspresyonunun değişimi. * $p<0.05$ kontrole göre.	59
Şekil 4.21: PSEN1 protein ekspresyonunun değişimi. * $p<0.05$ kontrole göre, # $p<0.05$ sham kontrole göre.....	59
Şekil 4.22: Fosforile Tau protein ekspresyonunun değişimi. * $p<0.05$ kontrole göre,	60
Şekil 4.23: Reelin proteinin ekspresyonunun değişimi. * $p<0.05$ kontrole göre.	61
Şekil 4.24: Bax-BcL2 protein oarlarının değişimi. * $p<0.05$ kontrole göre.	61
Şekil 4.25: Farktalkin ve fraktalkin reseptörünün protein ekspresyonlarındaki değişim * $p<0.05$ kontrole göre, # $p<0.05$ sham kontrole göre.	62

6-PARADOL MOLEKÜLÜNÜN AMİLOİD BETA ENJEKSİYONU İLE OLUŞTURULMUŞ ALZHEİMER HASTALIĞI MODELİNDEKİ NÖROİNFLAMATUVAR VE NÖROPROTEKTİF ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Alzheimer hastalığı (AH) insanlarda yaşla birlikte görülen ilerleyici bir demans türüdür. Hastalığın ilerlemesinde mikrogliya aktivasyonuna bağlı oksidatif stresin artmasının etkili olabileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar zencefil metabolitlerinden olan 6-Paradol'un hafıza üzerinde olumlu etkilere sahip olduğu ve mikrogliya aktivasyonuna bağlı olarak artan nöroinflamasyonu azalttığı göstermiştir. Bu nedenle, bu çalışmada, amiloid beta ($A\beta_{1-42}$) enjekte edilerek oluşturulmuş AH modeli sıçanlarda 6-Paradol kullanımının nöroprotektif ve anti-nöroinflamatuvar etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmada 33 adet erişkin sıçan (12 aylık) 5 gruba ayrıldı; sağlıklı kontrol (n=6, hiçbir işleme tabi tutulmayan), Sham kontrol (n=6, beyin içi enjeksiyonla (i.c.v) $A\beta_{1-42}$ çözücüsü (5 μ L) verilen), $A\beta_{1-42}$ (n=9, hipokampüse i.c.v yolla 5 μ L $A\beta_{1-42}$ verilen), Pozitif kontrol (n=6, hipokampüse i.c.v yolla 5 μ L $A\beta_{1-42}$ verilen ve 21 gün donepezil (2mg/kg) tedavisi uygulanan), 6-Paradol (n=6, $A\beta_{1-42}$ verilen ve 2 hafta boyunca 6-Paradol (5 mg/kg) tedavisi uygulanan). İki haftalık tedavi sonrasında davranış testleri yapıldı. Daha sonra sıçanlar kurban edilerek histolojik ve moleküler çalışmalar gerçekleştirildi. Yapılan analizler sonucunda $A\beta_{1-42}$ ile AH modeli oluşturan grubun Morris su tankında ve pasif sakınma ile yapılan deneylerde kontrol grubuna göre geç öğrendiği ve uzun dönem belleğinde bozulmanın olduğu, 6-Paradol'un öğrenme ve bellek üzerinde etkili olmadığı gözlemlendi. Hematoksilen ve eozin ile yapılan çalışmalarda kontrol grupları ve pozitif tedavi grubuna (donepezil) ait beyin dokularının histolojik yapılarının birbirine benzer ve sağlıklı olduğu izlendi. Ancak Alzheimer oluşturulan $A\beta_{1-42}$ ile 6-Paradol grubuna ait kesitlerde bazı nöron hücrelerinin nükleuslarının düzensiz ve piknotik olduğu görüldü. Ayrıca 6-Paradol grubuna ait beyin dokusunda vakuolizasyon olduğu dikkati çekti. Nissl boyama ile yapılan hücre sayımlarında hipokampüsün CA1 bölgesinde $A\beta_{1-42}$ verilen grupta hücre sayısında anlamlı bir azalışın olduğu tespit edildi (p<0.05). Donepezil ve 6-Paradol verilen tedavi gruplarında hücre sayısında artış görüldü. Amiloid plakların varlığını gösteren Kongo-red boyamasında ise amiloid plakların sayısında tedavi ile birlikte bir değişim saptanmadı. Western blot ile yapılan protein ekspresyon çalışmalarında ise apoptozun $A\beta_{1-42}$ verilen grupta arttığı ve tedavi gruplarında ise anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi. Mikrogliya aktivasyonu ile ilişkili olan fraktalkin ve fraktalkin reseptörü ekspresyonlarına bakıldığında $A\beta_{1-42}$ verilen grupta fraktalkin miktarında herhangi bir değişim gözlenmezken fraktalkin reseptöründe anlamlı bir artışın olduğu (p<0.05) ve bu artışın 6-Paradol ile düzeldiği gösterildi. Alzheimer göstergesi olan fosforile Tau ve PSEN1 miktarı $A\beta_{1-42}$ ile artarken 6-Paradol kullanımı ile bu proteinlerin konsantrasyonları kontrol seviyelerine geriledi. BACE ve reelin proteinlerinde ise gruplar arasında anlamlı bir farklılık

gözenmedi. Sonuç olarak, 6-Paradol kullanımını mikrogia ile ilişkili proteinlerde bir düzelmeye sebep olduğundan anti-inflamatuvar etki göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer Hastalığı, 6-Paradol, Nöroprotektif, Nöroinflamasyon



INVESTIGATION OF NEUROINFLAMMATORY AND NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF 6-PARADOL IN AMYLOID BETA INFUSED ALZHEIMER DISEASE RAT MODEL

SUMMARY

Alzheimer's disease (AD) is a progressive type of age related dementia in humans. It is considered that increase in oxidative stress due to microglia activation may cause progression of the disease. Studies have shown that 6-Paradol, one of the ginger metabolites, has positive effects on memory and reduces microglia activated-neuroinflammation. Therefore, the aim of the present study is to investigate the neuroprotective and anti-neuroinflammatory effects of 6-Paradol in amyloid beta ($A\beta_{1-42}$)-injected AD model in rats. In this study, 33 adult rats (12-month-old) were divided into 5 groups; healthy control (n=6, no treatment), Sham control (n=6, $A\beta_{1-42}$ solvent (5 μ L) injected by intracerebral injection (i.c.v)), $A\beta_{1-42}$ (n=9, 5 μ L $A\beta_{1-42}$ (i.c.v.) to the hippocampus), Positive control (n=6, 5 μ L $A\beta_{1-42}$ (i.c.v.) and 21 days of donepezil (2mg/kg) treatment), 6-Paradol (n=6, 5 μ L $A\beta_{1-42}$ (i.c.v.) and 2 weeks of 6-Paradol (5 mg/kg) treatment). Behavioral tests were performed after two weeks of treatment. Then, the rats were sacrificed and histological and molecular studies were performed. As a result, compared to the control group, it was observed that the rats in the $A\beta_{1-42}$ -injected AD group had delay in learning and deficiency in memory performance which measured by Morris Water Maze and passive avoidance test. 6-Paradol had no effect on learning and memory performance of rats. According to the results obtained by hematoxylin and eosin, the histological structures of brain tissues of the control groups and positive drug group were similar each other which were healthy appearance. However, in sections belonging to $A\beta_{1-42}$ and 6-Paradol groups, it was observed that the nuclei of some neuronal cells were irregular and pycnotic. Also, there was vacuolization in brain tissue of the 6-Paradol group. According to Nissl staining, there was a significant decrease in the number of CA1 pyramidal cells in the $A\beta_{1-42}$ group of hippocampus ($p < 0.05$). An increase in cell count was observed in the treatment groups given Donepezil and 6-Paradol. In Congo-red staining, which shows the presence of amyloid plaques, there was no change in the groups with treatment. Protein expression studies performed with Western blotting showed that apoptosis increased in the $A\beta_{1-42}$ group and decreased significantly in the treatment groups. Also the expressions of fractalkine and fractalkine receptors, which are associated with microglia activation, were examined, and there was no significant change in the amount of fractalkine ligand among groups, there was a significant increase in its receptor in the $A\beta_{1-42}$ group and this increase was improved by 6-Paradol treatment. While the amount of AD indicator proteins (pTau and PSEN1) increased with $A\beta_{1-42}$, the concentrations of these proteins decreased to control levels by 6-Paradol treatment. No significant difference was observed among groups in the expression of BACE and Reelin proteins. In summary, the 6-Paradol treatment in AD model of rats shows an anti-inflammatory effect as it causes an improvement in microglia-related proteins.

Keywords: Alzheimer's Disease, 6-Paradol, Neuroprotective, Neuroinflammation



1.GİRİŞ VE AMAÇ

Teknolojinin gelişmesiyle hayatımıza giren ilaçlar, genetik bilimine ve tıbbı verilen önem ile insan ömrünün uzaması yeni hastalıkların ortaya çıkmasına sebep oldu. Eskiden ölümcül olarak görülen bir çıbanı ele alırsak yeni ilaç sanayisi sayesinde bu hastalık artık hastalık olmaktan çıkmış durumdadır. Bu gibi gelişmeler sayesinde ömrün uzamasına bağılı olarak tarihte daha önce tarif edilmemiş yeni hastalıkların tanısının konulmasına olanak sağlandı. Alzheimer hastalığı (AH) bu şekilde ortaya çıkmış yaşa bağılı progresif ve tehlikeli nörodejeneratif bir demans çeşididir (1). Demans (Latince de- “uzak” + mens “mantık” anlamındadır), popüler olarak bunama olarak kabul gören; öğrenme, bellek, dil, kişilik fonksiyonlarında ilerleyici bir bozulmanın gözlemlendiğı, kişinin yaşam koşullarını, sosyal hayatını etkileyen merkezi sinir sisteminde oluşan bozukluklara verilen addır (2). Dünya sağlık örgütünün (DSÖ) yaptığı araştırmalara göre dünya genelinde yaklaşık 55 milyondan fazla insan AH’ndan etkilenmiştir ve her yıl yaklaşık olarak 10 milyon insan yeni vaka olarak eklenmektedir (3). Bunamaların en tehlikelisi olduğuna inanılan AH, % 60-70 kadar bunama vakasının kökeninde bulunmaktadır (2). Günümüzde neredeyse 65 yaş ve üzeri insanların %10’undan fazlasında görülmesinden dolayı, AH son 5 yılın en hızlı yayılım gösteren ilerleyici hastalığı olmuştur (4). Gün geçtikçe bu sayıların hızlı bir şekilde artmaya devam edeceği tahmin edilmektedir. AH bir çok semptomu kendi içerisinde barındıran özellikle ilerleyici ve geri dönülemez hafıza kaybı, zihin karışıklığı ile oluşan bir hastalık türüdür. Bu hastalık özellikle yeni öğrenilmiş olay veya durumların önce unutulması şeklinde ilerler. AH son zamanlarda genetik faktörler, çevresel faktörler, beslenme şekilleri gibi kişinin yaşam tarzı göz önüne alınarak bir çok farklı etkene bağılı olarak ortaya çıkmaktadır. Yeni çalışmalara göre AH’nda görülen nörofibriler yumaklar ve amiloid plaklar hastalığın ortaya çıkmasının temel nedeni olarak kabul edilmemektedir. Bazı otopsi ve görüntüleme teknikleri kullanılarak elde edilen sonuçlar bu nedenlerin nöron hasarını tam açıklayamadığını göstermektedir. Diğer bir deyişle bu şekilde oluşan nöron hasarına aynı zamanda bir döngüde devam eden nöroinflamasyon süreci de neden olmaktadır. Bu döngünün mikrogliya aktivasyonundan sonra salınan proinflamatuvar faktörlerin nöronal hasara yol

açması şeklinde oluştuğu kabul edilmektedir. Amiloid birikimi ve nöroinflamatuvar oluşumlar arasında zamansal ve sistemik bir ilişki bulunmaktadır. Başlangıç olarak ortaya çıkan ve beyni koruma amacıyla herhangi bir hasarlı duruma cevap olarak ortaya çıkan nöroinflamasyon süreci bu tarz hastalıklarda, hastalığın ilerlemesinde rol oynamaktadır. Bu yüzden günümüzde sadece nörofibriler yumaklar ve amiloid plak birikimine değil aynı zamanda beyinde ortaya çıkan nöroinflamatuvar etkilere de önem verilmektedir (5). Yeni teknolojiler sayesinde AH deneysel modellerle taklit edilebilmektedir. Böylelikle bu modeller hastalığın patojenezi ve ilaçların terapötik potansiyelinin araştırılmasına olanak sağlamaktadır. Özellikle doğuştan amiloid plak birikimi veya fosforile tau oluşumu gözlemlenen transgenik olarak oluşturulan fare modelleri kullanılmaktadır (6). Kullanılan diğer modeller genellikle bir operasyon sonucunda oluşturulmuş sporadik modellerdir. Bu modellerden biri olan $A\beta_{(1-42)}$ ile oluşturulan geç başlangıçlı AH modelinde dışarıdan intraserebroventriküler (i.c.v) olarak amiloid beta verilmektedir.

Son zamanlarda yapılan yeni çalışmalar eski çağlardan beri kullanılan zencefil (*Zingiber officinalis*) metabolitlerinin nöroprotektif ve anti-inflamatuvar etkilere sahip olabileceğini göstermiştir (7). Bu metabolitlerden biri olan 6-Paradol'un aynı zamanda hafıza üzerinde olumlu etkilere sahip olduğu ve bazı nöronal hasarları düzeltebildiği sınırlı sayıda *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar ile gösterilmiştir (8). Bu çalışmalar genel olarak *in vitro* olarak yapılmış olup nöroprotektif olarak zencefil metabolitlerinin azımsanamayacak miktarda gelişme yarattığı gözlemlenmiştir. Sınırlı sayıdaki hayvan çalışmalarında ise 6-Paradol'un multiple skleroz hastalığında ve iskemide mikrogliya aktivasyonuna bağlı olarak artan nöroinflamasyonu azaltıcı etki gösterdiği ve böylelikle nöron sayısında anlamlı düzeltici etkilere sebep olduğu gözlemlenmiştir (9,10). Literatürde nöroinflamasyon ve mikrogliya aktivasyonu ile kuvvetli ilişkisi bulunan AH üzerinde 6-Paradol'un etkisine dair henüz bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasında amiloid beta ($A\beta_{(1-42)}$) ile AH oluşturulmuş *Long Evans* türü sıçanlarda, hafızaya yararının gösterildiği zencefil (*Zingiber officinalis*) metabolitlerinden biri olan 6-Paradol'un hastalık üzerindeki etkisini ve bu etkinin moleküler temellerinin araştırılmasını amaçlanmıştır. Böylece, geleneksel tıpta kullanılan ilaçlara farklı bir bakış açısı getirilmekle beraber 6-Paradol'un AH üzerindeki nöroprotektif ve anti-nöroinflamatuvar etkisinin olup olmadığının literatüre

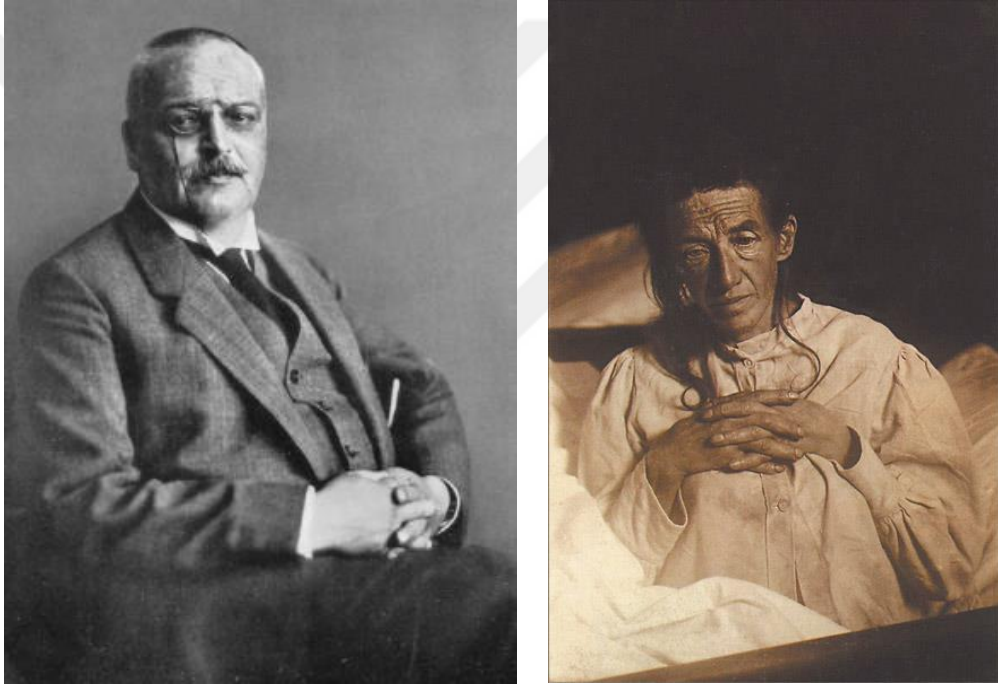
kazandırılmasını ve bu molekülün gelecekte AH adına tedavi edici aday molekül olup olamayacağını araştırmayı hedefledik.



2.GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı (AH) ilk defa bir psikiyatrist ve nöropatolog olan Alois Alzheimer tarafından, Frankfurt Psikiyatri Hastanesi'nde asistanlık yaptığı dönemde, 1904 yılının Kasım ayında tanımlandı. Bu döneminde Alois Alzheimer, gözlemlediği ve üzerine araştırmaya yaptığı 51 yaşındaki kadın hasta Auguste D.'nin uzun süreli semptomlarını Tübingen toplantısında bildirmesinin ardından hastalık ilk ismini aldı (11).



Şekil 2.1: Alois Alzheimer ve hastası Auguste D.

Alzheimer, Auguste D.'de görülen semptomları ve mental dejenerasyonun ilerleyişini ayrıntılı olarak belgeledi. Bu semptomlar arasında özellikle öne çıkanlar şiddetli bilişsel bozukluklar, oryantasyon bozukluğu, afazi, sanrılar ve öngörülemeyen davranışlar olarak sıralandı. Hasta bu tanımlamalardan 4,5 yıl sonra Nisan 1906'da hayatını kaybetti. Ölümünün ardından yapılan otopsi ile tüm beyinde yaygın bir atrofi ve hücresel olarak önemli değişikliklerin görüldüğüne dair sonuçlara ulaşıldı.

Alois Alzheimer, hastasının otopsisinden sonra mikroskopik olarak görüntü almak amacıyla yaptığı incelemelerde, o zamanlarda popüler olmayan ve yeni denenmeye

başlanan gümüş boyama tekniğini kullandı. Bu boyamalar ile özellikle kortikal hücre kümelerinde olmak üzere bazı mikroskopik değişiklikler saptadı. Bu değişiklikler halen günümüzde geçerli olan AH belirteçlerinden nörofibriler yumaklar (NFY) ve amiloid plaklar olarak tanımlandı (12).

1906'da Münih'te görev alan Alzheimer, daha sonra Kraepelin tarafından Alzheimer hastalığı olarak adlandırılan hastalığın seneler boyunca yaptığı histolojik ve klinik bulgularını ilk vakası olarak Tubigen'de sundu. Bu sunumundan sonra başlarda nispeten çok değer görmeyen bu vaka kısa süreli olsada bir ivme kazandırdı. Daha sonra Alzheimer 1911'de hastalık kavramını ayrıntılı olarak tartıştığı çok kapsamlı bir makale yayımladı. Bu yayın, Alzheimer hastalığından muzdarip ikinci bir hastanın raporuna, Johann F vakasına, odaklanmaktadır. Ayrıca 1910 yılında başka bir psikiyatrist olan Kraepelin yayınladığı kitabında bu hastalık için “Alzheimer Hastalığı” terimini kullanmıştır (11).

“Dünya Nüfus Beklentileri” raporunda 2019 revizyonu baz alınarak hazırlanmış olunan verilere göre, 2050 yılına kadar dünyadaki altı kişiden biri, 65 ve üzeri yaşa sahip birey olacaktır. Bu durum 2019 yılında 11’de 1 (%9) olarak kabul görmektedir. Yani oransal açıdan bakıldığında %9’luk olan dilim %11’lere yükselmektedir (13). Bu durum ise günümüzde neredeyse dünya çapında 47 milyon insanın muzdarip olduğu bu rahatsızlığı 2050 yılına kadar neredeyse üç kattan fazla bir artışa ulaşacağını göstermektedir. Alzheimer hastalığının prognozunda 4 faz bulunmaktadır. Bu fazlar pre-klinik, hafif seviye AH, orta seviye AH ve en sonda çok ciddi AH olarak ayrılmaktadır (4). Preklinik faz en hafif geçen faz olarak tanımlanmaktadır ve hastalığı gösteren önemli belirteçler yoktur. Çoğu kişide bu faz semptomsuz veya çok önem verilmeden geçmektedir. Hafif faz ise semptomların gün yüzüne çıktığı faz olarak tanımlanmakla beraber bu fazda hasta ile yakın ilişkide olan bireylerin hastada oluşan değişiklikleri fark etmesi mümkündür. Bu dönemde yeni öğrenilen bilgilerin unutulması ve işlenmesinde zorluklar başlamaktadır. Orta fazda ise semptomlar artış göstermektedir. Hafıza kaybının sonrasında davranışsal bozukluklar oluşmaya başlamakta ve bu durum sosyal becerileri ve problemleri gün yüzüne çıkarmaktadır. Çok ciddi faz ise hastalığın en ağır fazıdır. Hastaların genelde benliğini hatta bilinçlerini dahi kaybettiği gözlemlenmektedir. Bunun dışında bazı yaşamsal davranışlarda da (örneğin yemek yeme ve su içme) bozulmalar olmaktadır (4).

AH oluşumuna neden olabilecek etmenler kısaca yaş, cinsiyet beslenme şekli, tanımlanmış veya tanımlanmamış kronik hastalıklar, genetik veya epigenetik faktörler sayılabilir. Kadınlarda AH'na yakalanma oranı üçte iki iken erkeklerde bu oran üçte birdir (15).

AH'ındaki en temel etmen yaş faktörüdür. Yaş faktörü için 2 ayrı AH tanımlanmıştır. Bu iki faktör erken başlangıçlı AH (EBAH) ve geç başlangıçlı AH (GBAH) olarak adlandırılmaktadır. EBAH genellikle 65 yaşından önce 45 yaşından sonra başlangıç gösteren AH popülasyonunda az bir oranda bulunan çok daha ilerleyici Alzheimer türüdür (16). GBAH ise genellikle 65 yaş ve üzerinde başlangıcı görülen ve AH'ına sahip bireylerin büyük çoğunluğunu oluşturan AH türüdür (17). Görülme yüzdesi daha düşük olan EBAH genellikle genetik ve etiyolojik faktörlerden dolayı oluşum göstermektedir. Bundan dolayı daha saldırgan ve tedavisi daha az mümkün olan türdür. Bu şekilde oluşan AH'ına sahip bireylerin büyük çoğunluğunda kalıtsal olarak aktarım görülmektedir.

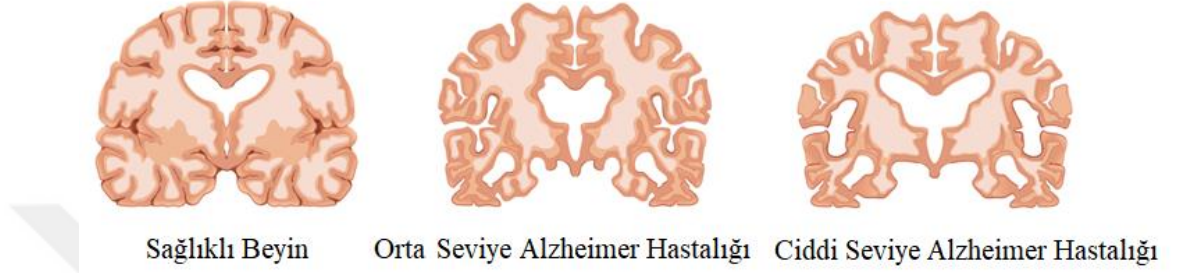
Alzheimer hastalığının belirlenmiş kesin bir tanı yöntemi bulunmamaktadır. Kesin tanısı ancak otopsi veya biyopsi yardımıyla hastalığa özgü patolojik lezyonların saptanmasıyla konulabilmektedir. Bazı laboratuvar teknikleri ve klinik kriterler ile birlikte bu tanılar kısmen de olsa konulabilmektedir. Patolojik değişikliklerin semptomlardan yıllar önce meydana geldiği kabul edilmektedir. β -amiloid ve tau patolojisinin biyobelirteçler ile belirlenmesi ayrıca, beyinde meydana gelen atrofının manyetik rezonans görüntülemesi ile ölçülebilmesi ile, tanı kriterleri hem daha erken tanı konmasına izin verecek hem de moleküler özgüllüğü artıracak şekilde gelişmiştir. Tanı konulabilmesi için moleküler değişikliklerin yanı sıra bellek bozukluğu ile beraber apraksi, afazi, agnozi veya yürütücü fonksiyonlarda bozulma gibi klinik semptomlarında elde edilmesi gerekmektedir (18,19).

2.1.1. Alzheimer hastalığının patolojisi

Patolojik olarak bakıldığında AH'nın temelini iki ayrı yapı oluşturmaktadır. Bu yapılar hücre dışında görülen amiloid beta plaklar ve hücre içi nörofibriler yumaklar olarak adlandırılmaktadır (2). Ayrıca, bu yapıların artması ile oluşan nöroinflamasyonun da diğer iki etmen kadar büyük önem taşıdığı kabul edilmektedir (3). Bu yapıların her biri kendi başına bu hastalığa neden olmakla birlikte çok az rastlansa da ikisinin de aynı anda bulunması mümkündür.

AH, bakıldığında çok temel bir nörodejenerasyondan başlamakla birlikte, beyindeki yayılımına ve klinik semptomlarının çıkışına bağlı olarak beynin büyük bir bölümüne yayılım göstermektedir. Bu yayılıma bağlı olarak hipokampus dışında özellikle entorinal korteks, limbik korteks ve assosiasyon korteks alanları da etkilenmektedir (20).

Alzheimer Hastalığı'nın İlerlemesi



Şekil 2.2 : Alzheimer hastalığının beyinde ilerleyişi

Şekil 2.2'de görüldüğü üzere AH bağlamında genellikle lateral ventriküllerin ön görülemeyen bir şekilde genişlemesine neden olabilecek kadar bir doku kaybı gözlemlenmektedir. Bunun dışında hipokampusün önemli derece atrofisi, sulkuslarda gelişen genişlemeler ve giruslarda oluşan daralmalarda gözlemlenir. Sonuç olarak kısaca beynin genel yapısında gözlemlenebilen değişimler oluşmaktadır (21).

2.1.1.1. Amiloid beta plakları ve Amiloid prekürsör proteini

AH patalojisiinde en çok bilinen ve çoğu araştırmacının ilk aklına gelen nedenlerden biri amiloid beta plaklarının ($A\beta$) oluşmasıdır. Bu plaklar genellikle sinir hücrelerinin aksonlarının etrafında bulunmaktadır ve böylelikle bulundukları bölgede dejenerasyona neden oluşturmaktadırlar. Amiloid öncü proteini (APP) ilk kez 1987'de insanda tanımlanmış olan bir proteindir, bu protein 21. kromozomda olduğu araştırmacılar tarafından onaylanmıştır. APP, normal şartlarda hücre için önemli olan transmembran bir proteindir (25,26). APP kendi içinde iki ayrı paralog içermektedir. Bu paraloglar APP-1 ve APP-2 olarak adlandırılmaktadır. Bu proteinler özellikle hücre adezyonunda, nöronların hayatta kalma oranlarında, nöron uzantılarının oluşumu ve büyümesinde ve hareketlerinde önemli rol oynamaktadır (27). APP-1 endoplazmik retikulumda sentezlenmekte ve daha sonra trans-Golgi ağı ile taşınarak, yüksek konsantrasyonlu olarak depolanmaktadır (24). APP gen ailesi 240 kilobaz

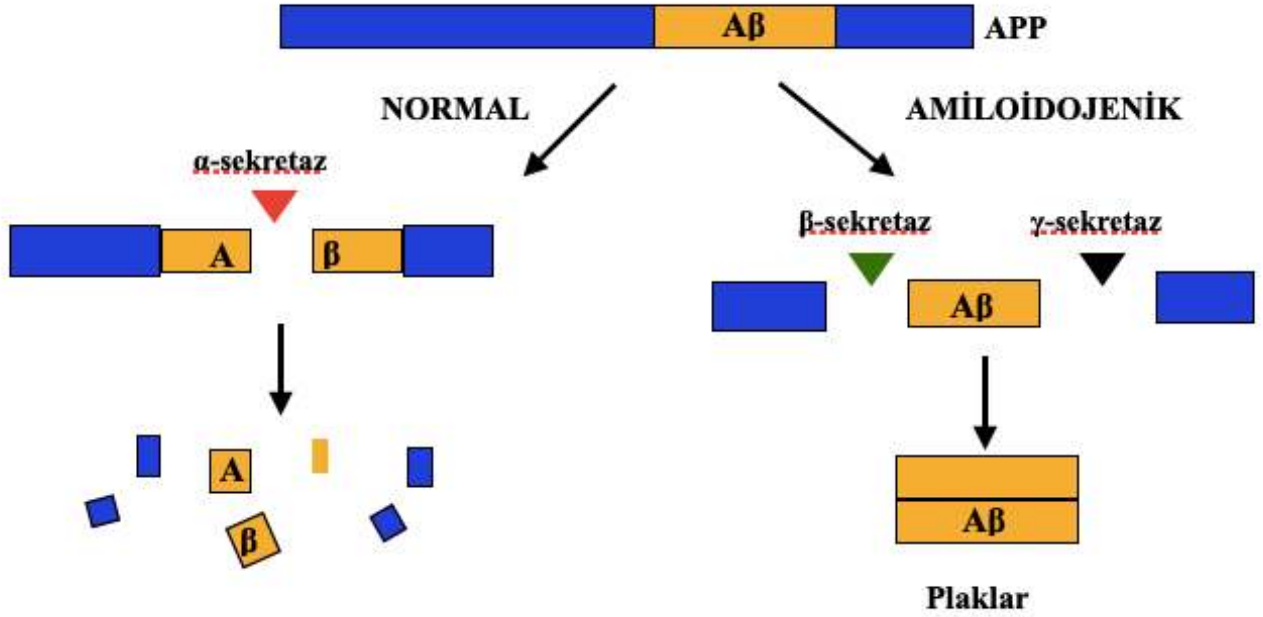
uzunluğunda DNA parçasının kodladığı 18 ekzon içermektedir. Bu bölünmeler sonucunda 8 izoform oluşturabilmektedir. Bu izoformlar uzunluklarına göre isimlendirilmektedir. Farklı dokularda oluşum gösteren ve yaygın olarak bilinen üç tane formu bulunmaktadır; merkezi sinir sisteminde bulunan APP 695, hem periferik sinir sisteminde hem de merkezi sinir sisteminde bulunan APP 751 ve APP 770 (22,28). APP protein ailesinde yaklaşık olarak 32'den fazla mutasyon tanımlanmıştır. Bu mutasyonların birçoğu 16. ve 17.'i ekzon bölgelerinde bulunmaktadır. Bu mutasyonların % 10-15'lik dilimi EBAH nedenleri içerisinde sayılmaktadır (28).

A β , geniş bir transmembran öncüsü olan amiloid öncü proteinin sekretazlar tarafından sayısız proteolitik bölünmesinden elde edilen bir peptit olarak tanımlanmıştır. Bu sekretazlar α -sekretaz, β -sekretaz ve γ -sekretaz olarak adlandırılan 3 temel yapıdan oluşmaktadır. α -sekretaz olarak adlandırılan sekretaz nörotoksik etkisi olmayan bir normal bölünme sağlayan APP'yi ilk parçalayan sekretazdır. Diğer bir sekretaz olan β -sekretaz ise potansiyel olarak bir nörotoksik etkiye sahip anormal bir parçalanmayla birlikte AH'ına neden olan sekretazdır. γ -sekretaz ise β -sekretaz tarafından kesilen APP'yi ikincil olarak kesen sekretazdır. İkincil parçalanma yapan γ -sekretaz ile parçalanma bölgesine bağlı olarak 40 veya 42 amino asit kalıntısından (A β ₄₀ veya A β ₄₂) oluşan 2 ana A β formu üretilmektedir. Bu iki form AH'na neden olan yapılar olmakla beraber A β ₄₂ formu A β ₄₀ formuna göre daha fazla fibril oluşturmaya yatkındır (29,30).

α -sekretaz, aktivitesine sahip protein ailesi ADAM 9, ADAM 10, ADAM 17 olarak adlandırılmaktadır. Bu aileden ADAM 10 yapıcı bir etkiye sahiptir ve aktivite olarak amiloidojenik olmayan yolağın oluşmasını sağlamaktadır. Bu aktivitenin bozulmasıyla çözünür bir formda üretilen amiloid betanın birikimine bağlı olarak AH oluşabilmektedir. APP'nin α -sekretaz yolağı ile AH'ına karşı koruyucu etki gösterdiği düşünülmektedir (31). β -sekretaz ise α -sekretaz aktivitesinin olmaması durumunda ortaya çıkan bir sekretaz türüdür ve amiloid öncü protein β -sekretaz 1 (BACE1) olarak 1999 yılında tanımlanmış bir sekretazdır. BACE1, C-terminaline yakın olarak karakterize olan aspartil bir proteazdır (32). Ayrıca BACE1 kromozom 11'de yer almaktadır (33). Bu yapının fazla eksprese olması sitotoksik bir etkiye neden olmaktadır. Bu fazla ekspresyon yaşla artış göstermektedir. Ayrıca oksidatif stres bu sekretazın ekspresyonunu etkileyen nedenlerdendir. β -sekretaz, ölüm reseptörü 6'nın

ligandı olarak bir işleve sahiptir ve bu sebeple aksonal bozulmalara ve nöronal ölümlere sebep olmaktadır. Bu durum AH'nın oluşumunda büyük bir etkiye sebep olmaktadır (34).

γ -sekretaz başlıca dört ayrı proteinden oluşan büyük kompleks bir yapıdır. Bu yapının en bilinen proteini presilinin 1 ve 2'dir (PSEN1-2). Bu homologlarda yaşanan mutasyonlar ise diğer bir AH nedeni olarak görülmektedir (31).

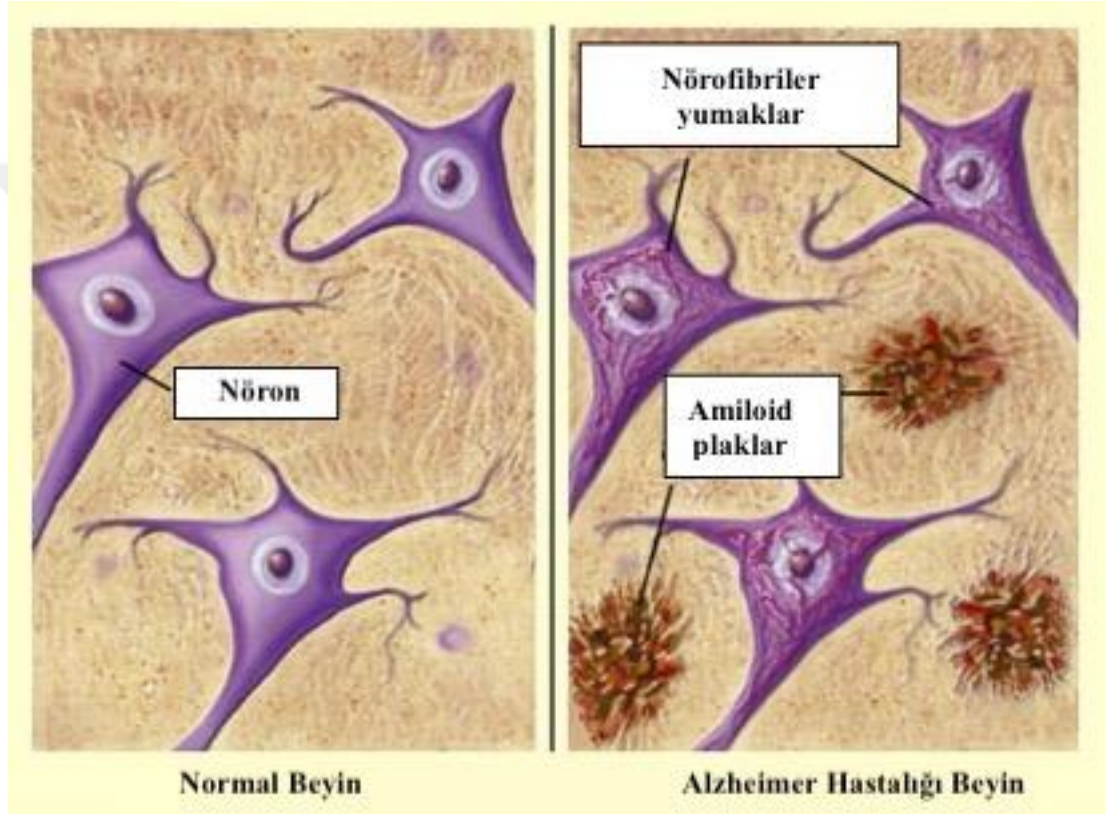


Şekil 2.3: APP Proteinin Amiloidojenik ve Amiloidojenik Olmayan Yollarda Kesimi

2.1.1.2. Nörofibriler yumaklar

Bir diğer AH oluşturabilecek neden ise Alois Alzheimer tarafından söylenen nörofibriler yumaklar (NFY) olarak kabul edilmektedir. NFY, nöronlarda mikrotübüllerin ve mikrotübüllere bağlı proteinlerin bozulmaları ile başlangıç gösteren bir AH nedenidir. Bu değişimler hücre iskeletinde yer alan değişimlerden kaynaklandığından nöronların dışardan bir etki ile değil kendi içlerinde yaşanan bozulmaları içermektedir. Asıl olarak hücre iskeletine ait mikrotübüllerin stabil olmaları için yarattığı etki mekanizması o hücrenin ömrü ve yaşama koşulları için çok önemlidir. Mikrotübüller nöron hücrelerinin uzantıları olan ve akson adını alan yapılarda hem yapıya destek sağlarken hem de hücrede üretilen tüm moleküllerin iletimine yardım etmelerinden dolayı çok büyük önem taşımaktadırlar. NFY'ların ana bileşeni Tau proteindir. Tau mikrotübüllere belirli sayıda fosfat molekülü ile bağlanarak mikrotübüllerin stabilizasyonunu sağlamaktadır. AH'nda Tau proteini

anormal bir şekilde fosforile (hiperfosforile) olmaktadır (4). Tau protein ailesi 17. kromozomun mikrotübül asosiye protein (MAP) adı verilen gen bölgesi üzerinden kodlanmaktadır. Yetişkin beyinlerde Tau 6 izoformu bulunmaktadır, bu izoformlar 353'ten 441 amino aside kadar tanımlanmaktadır. Bunların içinde en önemli formu 441 olan izoformdur (35). Tau hiperfosforilasyonuna neden olan protein kinazlar içerisinde en önemli olanı glikojen sentaz kinaz 3 beta (GSK-3 β) olarak adlandırılmaktadır. GSK-3 β gelişimsel olarak görev alan sinyal iletim kaskadı olan wntless/wnt yolu ile inhibe olmaktadır.



Şekil 2.4: Nörofibriler yumaklar ve amiloid plakların normal ve AH'ına sahip beyinlerde karşılaştırılması

Nöronlarda GSK-3 β ekspresyonu, aşırı Tau fosforilasyonuna ve mikrotübül stabilitesinin bozulmasına neden olmaktadır. Sonuç olarak hiperfosforile olan Tau, mikrotübül yapısını bozmakta ve hücre içerisinde birikmeler sonucu NFY'lar oluşmaktadır (36).

2.1.1.3. Nöroinflamasyon

Günümüze kadar AH'nın temel patolojik nedenleri amiloid beta plakları ve NFY'a dayanmaktaydı. Moleküler çalışmaların hız kazanmasıyla beyinde oluşan oksidatif

stres kaynaklı değişikliklere verilen önem artmıştır. Özellikle AH'nda ve diğer nörodejeneratif rahatsızlarda da artış gösterdiği kabul edilen oksidatif stres seviyelerinin neden olduğu nöroinflamasyonun AH nedenleri arasına kabul edilmektedir (37). Böylelikle AH'nda NFY ve amiloid beta plaklarının açıklayamadığı eksik kalan noktalar nöroinflamasyonla açıklanabilmektedir. Nöroinflamasyon genelde beyinde meydana gelen travma, enfeksiyon, iskemi veya bazı toksinlerin neden olduğu sinir sisteminin oluşturduğu inflamatuvar yanıt olarak kabul edilmektedir (38). Nöroinflamasyon doğuştan bireyde bulunan bağışıklık hücrelerinin oluşturduğu sisteme dahildir. Bu bağışıklık hücrelerinden en çok söz edilenler mikrogliya ve astrositlerdir. Ayrıca, endotel hücreleri veya beynin birincil koruyucusu olan kan beyin bariyeri (KBB) biyokimyasal veya mekanik olarak bir hasara maruz kaldığında da nöroinflamasyon gerçekleşmesine neden olabilmektedir (39).

Astrositler tüm merkezi sinir sisteminde bulunan ve merkezi sinir sisteminin ana yapısını oluşturan hücrelerdir. Bu hücreler KBB'nden endotel hücrelere kadar birçok yapının oluşumunda rol oynamaktadır. Ayrıca beynin gelişimsel düzeyinde çok büyük rolü bulunmaktadır (40). Bunların dışında astrositlerin dendritik yapıları destekleme, nöronların kurduğu sinapsların güçlenmesini sağlama ve sinaptik iletimde yararlı olma gibi işlevleri olduğu da tanımlanmıştır. Mikroglialar ise merkezi sinir sisteminde bulunan miyeloid soyundan gelen beynin bağışıklık hücreleridir. İmmün sistemdeki görevleri dışında mikrogliaların proteolitik ve fagositik görevleri de bulunmaktadır. Böylelikle akson ve dendritleri yenileyerek düzenlenme de rol oynamaktadırlar (39). Ayrıca mikrogliya kaynaklı makrofajların artışına bağlı olarak da AH şekillenebilir. Bazı araştırmacılar AH sırasında meydana gelen amiloid beta plaklarının çevresinde aşırı artmış mikrogliya ve reaktif astrosit varlığına ait kanıtlar bulmuştur. Bu artışlara bağlı olarak beyinde proinflamatuvar moleküllerin salınımı da başlamakta, böylelikle sinaptik fonksiyonlarda bozulmaya bağlı nöronal ölümlerin oluşumu gözlemlenmektedir. Pro-inflamatuvar olarak sayılabilecek moleküller arasında en göze çarpanı tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), interlökin 1 beta (IL-1 β) ve nükleer faktör kappa B (NF-kB) molekülleridir. Bu moleküller dışında nitrik oksit (NO) gibi serbest radikaller de AH'nın oluşumunda etkili olmaktadır (37). BACE1 ayrıca pro-inflamatuvar sitokinlerle daha fazla artmış sinyal yolları oluşturmakta ve tüm bu sebeplerden ötürü amiloid beta üretimi artmaktadır (37).

AH için patolojik sebeplerden bahsedilse de genetik sebeplerin de göz ardı edilmemesi gerekmektedir. Bu yüzden nöroinflamasyonda tanımlanmış gen dizileri bulunmaktadır. Bu gen dizilerinden en önemli olanları TREM2 ve Fraktalkin olarak adlandırılmaktadır. TREM2, miyeloid hücrelerde ve mikroglia da eksprese edilen bir reseptördür ve bir yandan fagositoz uyarıcısı, diğer yandan sitokin üretimi ve inflamasyonun baskılayıcısı olarak görev yapmaktadır (39). Fraktalkin (FKN), CX3C kemokin ailesinin üyesidir. FKN, nöronlarda ve periferik endotelde eksprese edilmekte ve reseptörü, miyeloid hücreler (mikroglia dahil), T hücreleri ve doğal öldürücü hücreler (natural killer cells) tarafından üretilmektedir. Fraktalkinin artışına bağlı olarak nörodejenerasyonun ortadan kalkması kaçınılmaz bir sonudur. Amiloid patolojisinin artmasına bağlı olarak FKN artışı gözlemlenebilmektedir. Diğer taraftan FKN miktarındaki artış bazı nörodejeneratif rahatsızlıklar için nöroprotektif etki göstermektedir (41).

Tüm bu yukarıdaki sebeplerden ötürü nöroinflamasyon artık AH patolojisinde öne çıkan bir özellik olarak kabul görmektedir ve bu hastalığın tedavisi ve önlenmesi için yapılan çalışmalar araştırmacılar tarafından ilgi gören potansiyel bir hedef durumuna gelmiştir.

2.1.2. Genetik faktörler

Düşünüldüğünde insan vücudunda oluşan çoğu hasarın bir genetik yatkınlığı bulunmaktadır. Dokuların temelinde protein bileşikleri yer almaktadır ve bilindiği üzere protein bileşiklerinin kodlanmasının temelinde insan genomu bulunmaktadır. Bu nedenle araştırmacılar tamamen genetik faktörler yüzünden olduğunu düşünmeseler de AH'nın temelinde genetik faktörlerinde rol aldığını kabul etmektedirler. AH genetik olarak aktarımı mümkün olan rahatsızlıklardandır. AH'nın genetik temelinde 2 ana faktörün olduğu düşünülmektedir. APP, PSEN1 ve PSEN2 AH için iyi bilinen otozomal dominant genlerdir (42). Bu genlerde oluşan mutasyonların AH'nı büyük oranda etkilediği çeşitli çalışmalarda gösterilmektedir. Kalıtsal olarak ilerleyici bir yaklaşım gösteren AH, EBAH'tır (42). Ayrıca APP ve PSEN1 genlerinde yaşanan mutasyonlar kalıtsal olarak aktarıldığında AH gelişme oranı kesinken, PSEN2 genindeki mutasyona sahip bireylerin hastalığı geliştirme oranı % 95 olarak kabul edilmiştir (4). PSEN1 ve PSEN2 birlikte endoplazmik retikulum ve Golgi aygıtında bulunur (42). PSEN1 geni γ -sekretaz kompleksinin kodlanmasında görev alır. Ayrıca

Notch ve Wnt sinyal yollarının aşağı regülasyonunun düzenlenmesinde büyük önemi bulunmaktadır. Bu sebeple embriyonik gelişmede beyin yapısı için büyük önem taşımaktadır. PSEN2 ise hücre içi sinyal yollarında ve gen ekspresyonunun doğru bir şekilde oluşmasında görevlidir (4). Böylelikle nörodejenerasyon, γ -sekretaz fonksiyonunun etkilenmesiyle, daha uzun A β peptidi oluşmasına neden olarak veya APP'nin kesilmesini etkileyerek ortaya çıkmaktadır (42).

Diğer bir genetik faktör ise en çok üzerinde durulan Apolipoprotein E (APOE) ailesine ait APOE4 genidir. APOE geni hem geç başlangıçlı AH'nda hem de erken başlangıçlı AH'nda etkisini gösteren bir gendir (25). APOE geni 19. kromozomda yer almaktadır ve 299 amino asitlik bir protein kodlayan 4 ekzondan oluşmaktadır. APOE lipid bağlayıcı bir protein olmakla birlikte insanlarda üç allele sahiptir, bunlar APOE ϵ 2, ϵ 3 ve ϵ 4 olarak tanımlanmaktadır. ϵ 4 izoformu, diğer izoformlara göre yapısal olarak daha kararsızdır, bu nedenle işlevlerinde bozulmalar meydana gelmektedir. Tek bir APOE ϵ 4 alleleline sahip olmak AH açısından 2 ila 3 kat risk artışına neden olurken iki kopyaya birden sahip olunması beş kattan fazla artışa neden olmaktadır (43). APOE ϵ 4 geninin ayrıca düşük bilişsel performansla, hafif bilişsel bozuklukla ve en önemlisi bellek problemleriyle alakalı olduğu düşünülmektedir (42). Beyin içinde APOE ϵ 4 geni toksisitesinin nasıl bir mekanizma ile yönetildiği daha tam olarak anlaşılamamıştır. Bazı önerilen mekanizmalar içinde izoformuna özgü bir toksisiteye sahip olduğu, APOE ϵ 4 geni ile kodlanan amiloid birikiminin yaşandığı veya APOE ϵ 4 geni ile oluşan tau hiperfosforilasyonu sayılabilmektedir (25). Bütün bu genler dışında ABCA7, SORL1, TREM2 genlerinin de AH üzerinde etkilerinin olabileceği araştırmacılar tarafından kabul görmektedir (43).

2.1.3. Tedavi

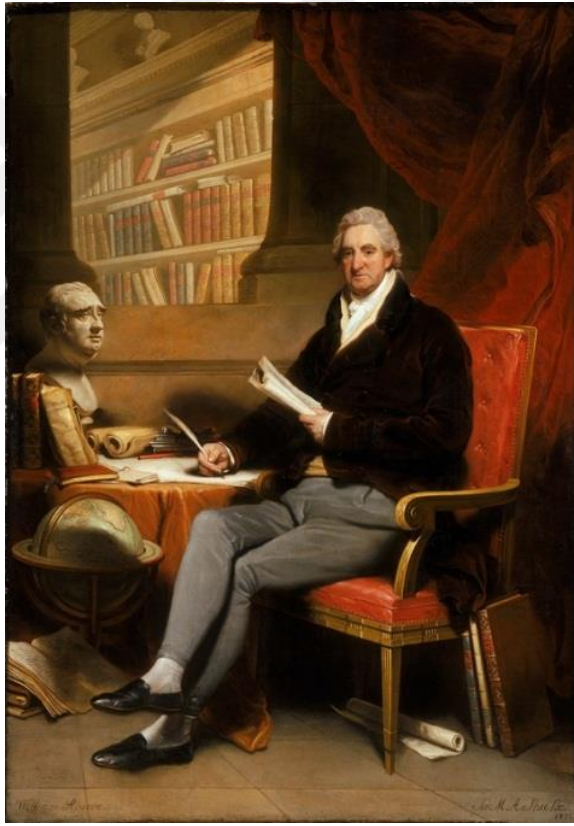
Hastalığın tanımlanmasından günümüze kadar gelen tedavi yöntemleri için bazı klinik çalışmalar yapılmış olsa da hastalığı yüzde yüz tedavi eden bir yöntem henüz bulunmamaktadır. Günümüze kadar gelen çalışmalar genelde ya gözlemlenebilir semptomları yok etmek amacı ile yapılan tedaviler olmakla yetinmektedir ya da hastalığın seyrini yavaşlatmaktadır. Tedavi genellikle kolinesteraz inhibitörleri kullanılması, nöroprotektif yöntemler, farmakolojik olmayan yöntemler (bitkisel), psikofarmakolojik ajanlar, genel sağlığı korumaya yönelik aktiviteler ile yapılmaktadır (14). AH dünya genelinde insidansı çok yüksek bir hastalık olmasına rağmen

tedavisinde Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan üç grup ilaç bulunmaktadır (44). Bunlar kolinesteraz inhibitörleri, memantin, kolinesteraz inhibitörleri ile memantinin karışımı olarak kabul edilmektedir (45). AH için temel sorunun kolinerjik sistemde var olan bir azalma olması nedeniyle kolinesteraz inhibitörleri kullanımı ve glutamat toksisitesine karşı tedavi edici molekül olarak memantin kullanımı tedavi seçeneklerindendir (45). Kolinesteraz inhibitörleri kolinesteraz enzimlerinin (asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirikolinesteraz (BchE) asetilkolini (ACh) parçalamasını bloke ederek etki etmekte ve bu da sinaptik aralıktaki ACh seviyelerinin artmasına neden olmaktadır (44). Kolinesteraz inhibitörlerinden olan ilk ilaç Tacrin'dir. Daha sonra bu ilacın yan etkilerinden ötürü donepezil hidroklorür başta olmak üzere rivastigmin ve galantaminde kullanılmaktadır (46).

N-metil-D-aspartik asit (NMDA) Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarının varlığı ile çalışma gösteren ve öğrenme-bellek için çok önemli bir reseptördür. NMDA reseptörü nöral plastisitenin temelini oluşturmaktadır. AH'na sahip kişilerde bu yolağın bozulmuş olduğu kabul görmektedir. Bu yolağın aşırı aktivasyonu sinaptik fonksiyonların bozulmasına ve hücre ölümüne neden olan Ca^{+2} artmasına sebep olmaktadır (28). Memantin tedavisi NMDA sinyal yolağının aşırı aktivasyonuna bağlı olarak oluşan sorunları ortadan kaldırmayı amaçlamaktadır. Bu tedavi sayesinde NMDA reseptörünün aşırı aktivasyonu ve dolayısı ile Ca^{+2} girişini önlenmekte böylelikle sistem normal aktivitesine geri dönmektedir. Bu nedenle nöron kayıplarını önleyerek nöroprotektif bir etki sağlayabilmektedir (45). Bu tedaviler dışında son yıllarda AH'na duyulan ilgi ve biliminin ilerlemesi hastalıklara olan bakış açılarını çok fazla değiştirmiş durumdadır. Bu sebepten ötürü bazı yeni potansiyel tedavilerde düşünülmektedir. Bunlar arasında anti-amiloid terapi, beta-sekretaz enzimi, gamma sekretaz enzimi ve monoklonal antikorların kullanımı sayılabilmektedir (45).

2.2. Zencefil Bitkisi (*Zingiber officinale*)

Zencefil bitkisi William Roscoe tarafından 1807 yılında tanımlanmıştır. *Zingiber officinale* adı ile günümüzde anılmaktadır. *Zingerber officianale*, Zimgerberaceae ailesine ait antik çağlardan beri insanların kullandığı bir bitkidir. Bu bitki bir kök bitkisidir ve hem taze hem de kuru olarak tüketimi mümkündür (Şekil 2.6). Zencefil köklerine rizom kökler denilmektedir. Ana vatanı Güney Asya olmakla beraber tam olarak orijinalinin nereye dayandığı bilinmemektedir. Geçmişten günümüze bu bitki hem yiyecek olarak hem de tıp alanında ilaç olarak kullanıma uygun görülmektedir. Bazı çalışmalar, karbonhidratlar, lipitler, terpenler ve fenolik bileşenler de dahil olmak üzere yaklaşık 400 çeşit zencefil bileşeninin tanımlandığını göstermektedir (46).



Şekil 2.5: William Roscoe

Zencefil kendi içinde biyoaktif olarak iki ana bileşene ayrılmaktadır. Bu bileşenler fenolik ve terpen bileşikler olarak adlandırılmaktadır. Fenolik olarak tanımlanan biyobileşikler özellikle gingeroller, shogaoller ve yeni eklenen paradoller olarak adlandırılmaktadır. Taze zencefil olarak baz alındığında, 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol gibi bileşiklerine ayrılan gingerol ailesi başlıca kabul gören zencefil bileşenidir. Gingerollerin ısıl işlem veya uzun süreli depolanmasına bağlı olarak

shogaoller bileşini oluşturmaktadır. Shogaoller ise hidrojenarasyonuna bağlı olarak paradollere dönüştürülebilmektedir. Bunların dışında zingerone ve gingerenon olarak adlandırılan birçok başka fenolik bileşeni de vardır. Zencefil uçucu yağlarının ana bileşenleri olarak kabul edilen β -bisabolen, α -curcumene, zingiberene, α -farnesen ve β -sesquiphellandrene gibi zencefilde birkaç terpen bileşeni de bulunmaktadır (47).

Zencefil son yıllarda araştırmacılar tarafından antioksidan, antiinflamatuvar, antimikrobiyal ve antikanser gibi sahip olduğu aktiviteler açısından araştırılmaktadır. Bazı yapılan çalışmalar, zencefilin oksidatif strese karşı korunmada etkin bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Mekanizmasında daha çok IL-1 β aracılığı ile oksidatif stresin azaltılmasına bağlı bir etki bulunmaktadır. Ayrıca birkaç enziminin ekspresyonu ile fazla üretimi sonucu birçok kronik hastalığın başlangıcını ve gelişimini etkilediği bilinen reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumunda azalmalar meydana getirmektedir (48). Zencefilin anti-inflamatuvar etkilerinin bir dizi çalışma sonucunda fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K), protein kinaz B (Akt) ve NF-KB ile ilgili olduğu gösterilmiştir (49).

Zencefil, beyin tümörleri, inme, nevroz, depresyon, uykusuzluk, psikiyatrik bozukluklar ve demans gibi sinir sistemini etkileyen hastalıklara karşı terapötik özelliklere sahiptir. Zencefil, FDA tarafından "genel olarak güvenli olarak kabul edilir" (GRAS) listesinde yer almaktadır (47).



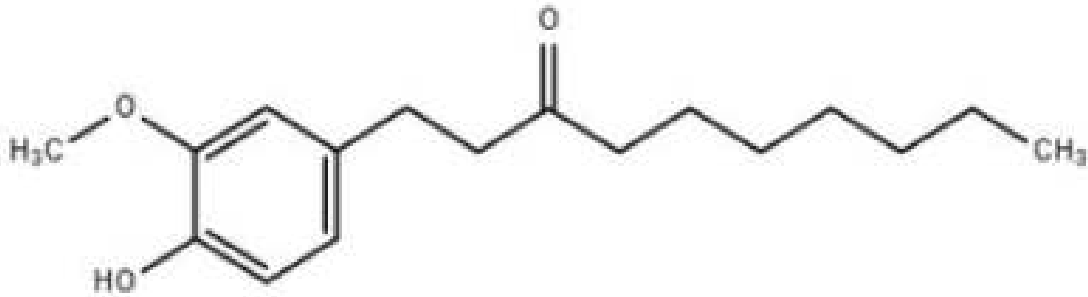
Şekil 2.6: Zencefil bitkisi

2.2.1. 6-Paradol

6-Paradol zencefil metabolitlerinden biri olan ve son zamanlarda araştırmacıların çok dikkatini çeken bir moleküldür. Özellikle, son yıllarda fitoteröpotik moleküler ile yapılan araştırmalarda hastalıkların tedavisinde 6-Paradolün aday molekül olabileceği kanısına varılmıştır. 6-Paradol molekülü mikrobiyal bir metabolizma kullanarak 6-

Shogaol'dan üretilmektedir (Şekil 2.7). Bu yüzden shogaol'ün sahip olduğu tüm aktiviteleri kendi bünyesinde toplamaktadır. 6-Gingerolün susuz bir formu olan 6-Shogaol, kurutulmuş zencefildeki bir başka önemli bileşendir. Bu bileşenin yapısındaki bazı stabil olmayan durumlar 6-Paradol'de daha kararlı yapıya gelmiştir (50).

Bu yüzden durumlar 6-Paradol zencefil metabolitlerinden çok güçlü tedavi edici özelliğe sahip aday bir molekül olmuştur. 6-Paradol'ün 6-Shogaole benzer bir şekilde antioksidatif ve antiinflamatuvar aktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle bu moleküller merkezi sinir sistemi hastalıklarının tedavisinde büyük bir aday molekül olarak görülmektedir (49). Ayrıca, 6-Paradol'ün nörolojik olarak oluşan bozuklukları, beyin hasarlanmalarına ve mikrogliya aktivasyonuna karşı etkili bir aday molekül olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu özelliklerinden dolayı nöral inflamasyonun etkili olduğu AH için de önemli bir aday molekül haline gelmiştir. Bu özelliklerinden dolayı, 6-Paradol'ün AH'nda oluşan mikrogliya aktivasyonuna ve özellikle beyinde önlenemez miktarda yaşanan hücre ölümüne karşı etkili olabileceği düşünülmektedir (50).



6-Paradol

Şekil 2.7: 6-Paradol molekülü

2.2.2. 6-Paradol hakkında yapılan çalışmalar

6-Paradol molekülü hakkında literatürde sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar ışığında 6-Paradol molekülünün nöroinflamasyona karşı olumlu etkiler gösterdiği aynı zamanda nöroprotektif bir etkiye de sahip olduğu kanıtlanmıştır. Bu çalışmadan biri olan Yamaguchi ve ark. tarafından yayımlanan araştırmada otoimmün ensefalomyelit (EAE) ile fareler üzerinde MS modeli oluşturulmuş ve bu model üzerinde 6-Paradol'un etkilerini ölçülmüşlerdir. Çalışma sonucunda model oluşturulan farelerin omuriliklerinde demiyelinizasyon ve astrogliosis dahil olmak üzere birçok histopatolojik durumun iyileşme gösterdiği ve klinik semptomlarda da belirli bir oranda azalma meydana getirdiği gözlemlenmiştir. Bunun dışında bu farelerde mikrogliya aktivasyonu ve TNF- α regülasyonunda bir zayıflama meydana getirdiği ile ilgili çok güçlü sonuçlar elde edilmiştir. Sonuç olarak 6-Paradol molekülünün nöroinflamatuvar yanıtları baskılayarak MS semptomlarını hafifletmede terapötik potansiyele sahip olduğu vurgulanmıştır (51).

Diğer bir çalışmada ise Gaire ve ark. düzenli olarak zencefil kullanımının kan dolaşımına olan etkileri nedeni ile inme riskini azalttığı ve iskemi sonrası düzelmeyi hızlandırdığını belirtmiştir. Bu çalışmada ilk olarak *in-vitro* olarak lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılan BV2 mikrogliya hücrelerinde 6-Paradol ile iNOS yukarı regülasyon sisteminin inhibe olmasıyla NO üretiminin azaldığı ve proinflamatuvar sitokinlerin (IL-6 ve TNF- α) salgılanmasında anlamlı bir düşüş olduğu, diğer bir deyişle nöroinflamatuvar yanıtların azaldığı gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada nöroinflamasyon ile karakterize olan orta serebral arter oklüzyonu (MCAO)/reperfüzyon (M/R) ile geçici fokal serebral iskemi oluşturulan farelerde 6-Paradol molekülünün beyin enfarktüsü, nörolojik bozukluklar ve nöronal hücre sağ kalımı ve ölümü gibi parametrelerle ölçülen beyin hasarını önemli ölçüde azalttığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca, 6-Paradol uygulamasının iskemik farelerde mikrogliyal aktivasyonu azaltarak ve iNOS ve TNF- α eksprese eden hücre sayısını azaltarak nöroinflamasyonu önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (8).

3.MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan cihazlar

- Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi tarafından sağlanan stereotaksi cihazı ile deneyde kullanılan sıçanlarda beyin içi enjeksiyon yapılırken, sıçanın kafasını sabit tutmak ve verilecek maddenin sıçan beyin atlasına göre belirlenen koordinatlarında doğru bir şekilde konumlandırılmasını sağlamak için kullanıldı.
- Sıçanları stereotaksiye yerleştirdikten sonra Beta amiloid ve çözücü maddesini vermek için Hamilton iğnesi kullanıldı.
- Davranış testleri için pasif sakinleşme sistemi (MAY-PA, Türkiye), Artı labirent ve Morris Su labirenti testi ve bunlardan elde edilen verilerin kaydedilmesi için bilgisayar destekli otomatik video izleme sistemi olan Ethovision XT (Noldus Information System, Amerika Birleşik Devletleri) kullanıldı.
- Bezmialem Vakıf Üniversitesi Fizyoloji laboratuvarında yeralan homojenizatör cihazı (Retsch, Almanya) ile alınan beyin dokularının (hippokampus) mekanik homojenizasyonu yapıldı.
- Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıbbi Biyoloji laboratuvarında bulunan Multiscan Go (Thermo Scientific, Amerika Birleşik Devletleri) cihazı ile homojene olan dokulardan sağlanan protein konsantrasyonları ölçüldü.
- Aynı zamanda Tıbbi Biyoloji laboratuvarında bulunan soğutmalı inkübatör cihazı (Nüve, Türkiye), çalkalayıcı (BioRocker 2d, Amerika Birleşik Devletleri), çalkalayıcı (Benchmark, orbi-shaker, Amerika Birleşik Devletleri), mini santrifüj (isolab, Almanya), soğutmalı santrifüj, pH metre (Hanna, Amerika Birleşik Devletleri) ve hassas terazi (Precisa XB ,) cihazları da proje boyunca kullanılan kimyasalların hazırlanması ve kullanılması ayrıca kullanıldıktan sonra ihtiyaç halinde inkübasyonlarının yapılmasında yardımcı oldu.

- Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıbbi Biyoloji laboratuvarında bulunan, elektroforez cihazı (Bio-Rad, Amerika Birleşik Devletleri) homojenize olmuş dokulardan elde edilen proteinlerin, elektroforez yöntemi ile ayrışmasına daha sonra transfer sistemi (Bio-Rad Trans-Blot Turbo, Amerika Birleşik Devletleri) ile elektroforez sonucu ile elde edilen proteinlerin PVDF membranına aktarılması için kullanıldı.
- Aynı laboratuvarında bulunan Fusion Fx7 ise membranlara yüklenen proteinlere bağlanan antikorların görüntülenmesi için kullanıldı.
- Bezmialem Vakıf Üniversitesi Histoloji laboratuvarında bulunan doku takip cihazı (Leica, asp300s, Almanya), otomatik lam boyama cihazı (Leica 5010), mikrotom cihazı (Leica Rm2245, Almanya), cihazın kullanımı için patho cutter marka bıçak kullanılarak takibi yapılan dokuların kesitleri alınıp analizi için boyandı ayrıca kriyostat (Leica cm 1510s, Almanya) kullanılarak dodurulan yapılan dokulardan kesitler alınıp boyama işlemine tabii tutuldu. Bu işlemler sonucunda gözlem yapabilmek için Nikon (Eclipse 920248, Amerika Birleşik Devletleri.) ışık mikroskopunda değerlendirildi ve görüntüler (Nikon Marka DS-Fi2-U3)
- GFAP immunoflorans boyaması sonucunda gözlem yapılması ve fotoğraf çekimi için konfokal (Leica Sp8, Almanya) mikroskop kullanıldı.

3.1.2. Kullanılan malzemeler

- Beta-Amiloid peptid (1-42) (insan, abcam120301, İngiltere) sıçanlarda AH modeli oluşturmak amacı ile kullanıldı.
- 6-Paradol (Cayman #27554, Amerika Birleşik Devletleri) tedavi amaçlı kullanıldı.
- Bezmialem Vakıf Üniversitesi hayvan laboratuvarı tarafından sağlanan ketamin (Ketasol %10), ve rompun (Rompun %2) aneljezik madde olarak işlem sırasında hayvanların anestezi altına alınmasının yanı sıra sakrifikasyon içinde kullanıldı. Ayrıca antiseptik çözelti olarak batikon (Baticonol,%10 povidon iyot) kullanıldı
- Hücre boyamaları içinse Kongo red (Sigma Aldrich c6277, Almanya) ve Cresyl violet (Nissl boyama) (Sigma Aldrich c5042, Almanya), ayrıca immunoflorans boyama için GFAP (Cell Signaling Technology #3656, Amerika Birleşik Devletleri) kullanıldı. Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Histoloji laboratuvarında bulunan Harris hematoksilen (Bio-optika 05-12011/L, İtalya) eozin (Bio-optika 05-10002E, İtalya) boyası da hücre morfolojilerindeki değişimleri belirlemek için kullanıldı.

- Boyama sonucunda lamalar entellan (Sigma aldrich 107961, Almanya) ile kapatıldı.
- Sıçanlardan alınan dokuların homejenizasyon için ise Lizis tamponu (RIPA Lysis Buffer sc-24948, Santa-Cruz), PMSF, sodyum ortovanadat, PIC kullanıldı (Amerika Birleşik Devletleri).
- Tıbbi biyoloji laboratuvarında bulunan protein ölçüm kiti (Thermo Pierce BCA Protein Assay, #23227, Amerika Birleşik Devletleri); protein konsantrasyonu ölçmek için kullanıldı.
- Protein elektroforezinde, elektroforez yürütme tamponu (Bio-Rad Tris-Glycine SDS #1610732 tampon, Almanya) proteinlerin jelde yürümesi için kullanıldı.
- Transfer tampon (Bio-Rad, Amerika Birleşik Devletleri) proteinlerin jelden membrana transferi esnasında kullanıldı.
- Transfer işleminde membranların yıkanması için triton içeren tris tamponu (TBST) kullanıldı.
- Ayrıca fraktalkin, pTau (Thermo, MN1040, Amerika Birleşik Devletleri) BACE, Bcl-2 (santa Cruz, sc7382, Amerika), BAX (Cell Signaling Technology, 2772, Amerika), Fraktalkin reseptörü (abbkine, ABP52843, Amerika Birleşik Devletleri), Reelin Sigma, MAB5366, Almanya), Fraktalkin(CX3CL) (Affinity biosciences DF12376, Amerika Birleşik Devletleri), PSEN1 (Sigma, MAB3252, Almanya) antikoları protein miktarlarındaki değişimi belirlemek amacı ile kullanıldı.
- Bu antikoları çözmek ve bloklamak amacı ile TBST içerisinde hazırlanan süt tozu (Santa cruz, sc-2325 Almanya) ve sığır serum albümini (BSA, Sigma Aldrich, Almanya) kullanıldı.
- Protein ölçüm antikoları dışında ölçüm için bir ikincil antikor (rabbit,Mouse) daha kullanıldı.
- Protein miktarlarının optimasyonu amacı ile tüm hücrelerde bulunan GAPDH ve Tubulin (Abclonal, AC008 Amerika Birleşik Devletleri) antikoru kullanıldı.

- Histoloji laboratuvarında ise takip için Etil alkol (TK200655, Tekkim, Türkiye), ksilen (TK 090270, Tekkim,Türkiye) gömme ve takip işlemi için parafin (TK 200661, Tekkim,Türkiye) kullanıldı.

3.2. Metod

3.2.1. Hayvan çalışmaları

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı tarafından sağlanan *Long Evans* erkek sıçanlarda Alzheimer modeli oluşturulması için Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Etik Kurul Komitesi'nde 24.05.2021 tarihli ve 2021/147 sayılı etik kurul onayı alındı.

33 adet erkek *Long Evans* sıçan (320-450 gram) (12 aylık) rastgele bir şekilde 5 gruba ayrıldı. Deney süresince Bezmialem Vakıf Üniversitesi hayvan laboratuvarında bulunan üniteye hayvanlar standart olarak 12 saat aydınlık – 12 saat karanlık sirkadiyen döngü içerisinde yem ve su alımları *ad-libitum* olacak şekilde, sıcaklığı sabit tutulan ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$) hayvan saklama odasında, her kafeste 4-5 sıçan olacak şekilde barındırıldı.

Hayvan grupları aşağıdaki şekilde belirlendi:

Grup 1 (Kontrol): Hiçbir girişim yapılmayan Kontrol grubu (K) (n=6),

Grup 2 (Sham kontrol): Sadece A β çözücüsünün (yapay BOS) beyin içi enjeksiyonunun yapıldığı Sham kontrol grubu (S) (n=6),

Grup 3 (A β): icv- A β enjeksiyonu uygulanan hastalık grubu (A β) (n=9),

Grup 4 (A β +6-Paradol): icv-A β enjeksiyonu uygulandıktan sonra 6-Paradol intübasyonu yapılan tedavi grubu (A β -6P) (n=6).

Grup 5 (Pozitif Kontrol): icv-A β enjeksiyonu uygulandıktan sonra donepezil alan Pozitif kontrol grubu (n=6).

3.2.1.1. Amiloid beta enjeksiyonu

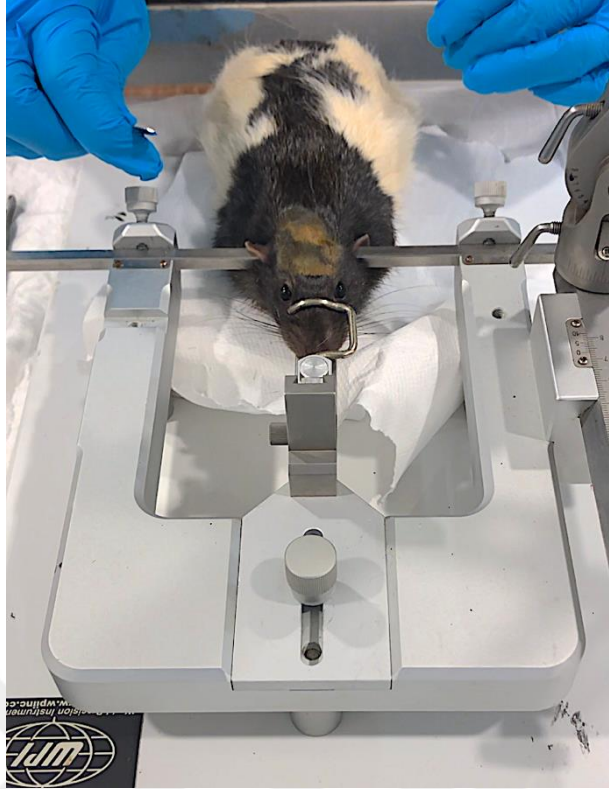
Deneyden 3 gün önce amiloid beta peptidi fibrilleştirildi. Bunun için amiloid beta peptidi 7,5 μl 1% NH_4OH (amonyak hidroksit) ve 92,5 μl distile su içeren çözücü ile karıştırılmıştır ve fibrilleşmesi için 3 gün 37 derecede çalkalayıcı üzerinde

inkübasyona bırakıldı. 3 günün sonunda yaşlı sıçanlara stereotaksi yardımı ile amiloid beta enjeksiyonu yapılarak AH modeli oluşturuldu.

Sıçanlar operasyon öncesi anesteziye alındı, anesteziye girdiklerinden emin olunduktan sonra kafalarında bulunan tüyler tıraşlandı ve stereotaksiye yerleştirilip sabitlendi. Sabitlendikten sonra işlem yapılacak alan önce batikon (Baticonol) yardımı ile dezenfekte edildikten sonra bir kesi açıldı. Öncelikle bregma bulundu ve işaretledi.



Şekil 3.1: Sıçanda Bregma noktası



Şekil 3.2: Stereotaksiye yerleştirilmiş sıçan

Bregma noktası sıfır olarak kabul edilerek AP: 3.5 mm L: 2.5 mm ve DV: 3 mm koordinatlarına yaklaşık olarak karşılık gelen hipokampusun CA1 bölgesine bilateral olarak 10 µg / 2 µL Aβ₍₁₋₄₂₎ enjeksiyonu yapıldı. Enjeksiyon tamamlandıktan sonra birkaç dakika beklenerek şırınga yavaşça çıkarıldı ve hayvanların kafasındaki kesiye dikiş atılıp subkutan 0.5 cc antibiyotik ve 0.03 cc ağrı kesici verildi. Bu işlem Aβ, Aβ-6P ve Pozitif kontrol gruplarında bulunan tüm sıçanlar için tekrarlandı. Sham kontrol grubu için ise amiloid beta'nın çözücüsü aynı şekilde i.c.v. olarak enjekte edildi.

3.2.1.2. Gavaj yöntemi ile 6-Paradol ve Donepezil hidroklorür verilmesi

Amiloid beta peptidinin i.c.v. enjeksiyonunu takiben 7 gün sonra gavaj yöntemi ile 6-Paradol ve ve pozitif kontrol amacı ile donepezil verilmeye başlandı (Şekil 3.3).



Şekil 3.3: Gavaj yöntemi ile maddelerin verilmesi

6-Paradol 90 ml saline, 10 ml Tween80, 5 ml etanol ve 100 mg paradol olarak hazırlandı. Bu madde sıçanlara literatürde belirlenen doz olan 5 mg/kg olacak şekilde hesaplanarak sıçan başına yaklaşık 2 ml olarak verildi (10). Pozitif kontrol grubuna donepezil hidroklorür (Dozyl, 5 mg, Abdi İbrahim, Türkiye) 0.6 mg/kg olacak şekilde verildi (52) (Şekil 3.4)



Şekil 3.4: Pozitif kontrol grubu için kullanılan ilaç

Sham kontrol grubuna ise 6-Paradol'ün çözülmesinde kullanılan çözücü madde gavaj yoluyla verildi. 6-Paradol ve Sham kontrol grubuna 12 gün pozitif kontrol grubuna ise 21 gün boyunca gavaj yapıldı. Deneyler süresince hayvanların kilo durumları ölçüldü.

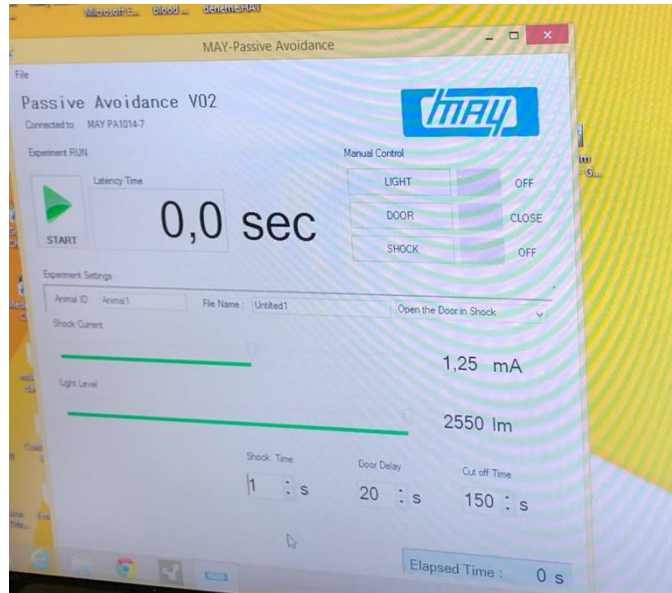
3.2.2. Davranış deneyleri

3.2.2.1. Pasif sakinme testi

Deney düzeneği 2 bölmeden oluşmaktadır. Bu iki bölmeden biri ızgara çelik tabanlı, elektrik şoku verilmeyen aydınlık alan (40x30x26cm ebatlarında ve 2550 lümen aydınlatmalı alan) ve hafif düzeyde elektrik şoku verilebilecek olan düzeneğin diğer bir odası olan karanlık alandır (40x30x26 cm ebatlarında). Bu iki oda arasında sürgülü bir geçiş kapısı (8x4,5) bulunmaktadır. Deney, hayvanların tek tek düzeneğe yerleştirilmesi ile gerçekleştirildi. İlk gün sıçanlar yüksek ışığa maruz kaldıkları aydınlık alana yerleştirildikten 20 sn sonra aradaki kapı açılarak sıçanların karanlık alana geçmesi beklendi. Sıçanlar karanlık alana geçtiklerinde 2 saniye boyunca 1 mA elektrik akımına maruz bırakıldı. Deneyin ikinci gününde ise sıçanlar aydınlık alana bırakıldı ve karanlık alana geçme süreleri hesaplandı. Maksimum bekleme süresi olarak 300 saniye seçildi. May Passive Avoidance programı ile verilen elektrik akımı, ışık miktarı ve geçirilen süreler hesaplandı. Test sonucunda hayvanların korkuya bağlı uzun süreli bellek durumları ve böylelikle amigdala hipokampus bağlantılarında oluşabilecek hasarlar tespit edildi.



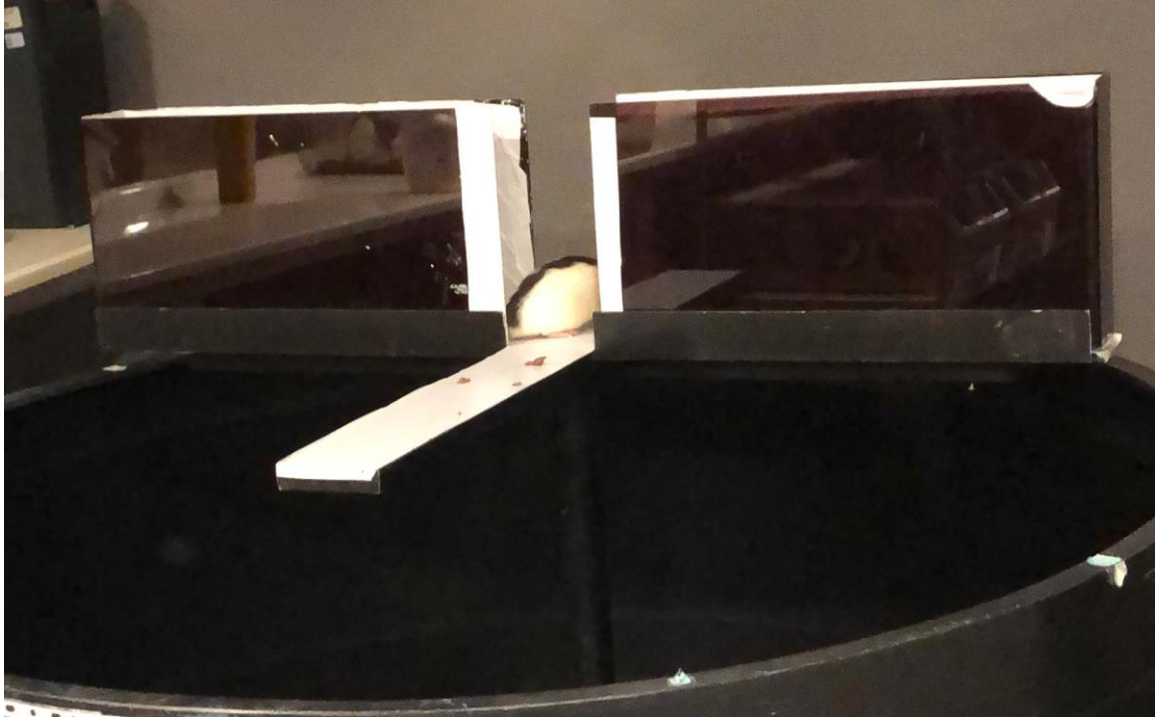
Şekil 3.5: Pasif sakınma düzeneği



Şekil 3.6: May Pasif Sakınma Programı

3.2.2.2. Yükseltilmiş artı labirent testi :

Deney düzeneği olarak iki açık kol (50x10 cm) ve iki kapalı koldan (50x10x40 cm) oluşan artı şekilde yerden 50 cm yükseklikte konumlanmış bir platform kullanıldı (Şekil 3.7). Deneyin başlangıcında teste başlayacak hayvan kapalı ve açık kollar arasında kalan bölgeden bırakıldı. Daha sonra 5 dakika boyunca hayvanın kollarda geçirdiği süre ve hareketleri video izlemi sistemi ile kaydedildi. Bu davranış ölçen test deney hayvanlarının çevre değişimine bağlı anksiyetesini değerlendirmek amacı ile yapıldı.



Şekil 3.7: Yükseltilmiş Artı Labirenti

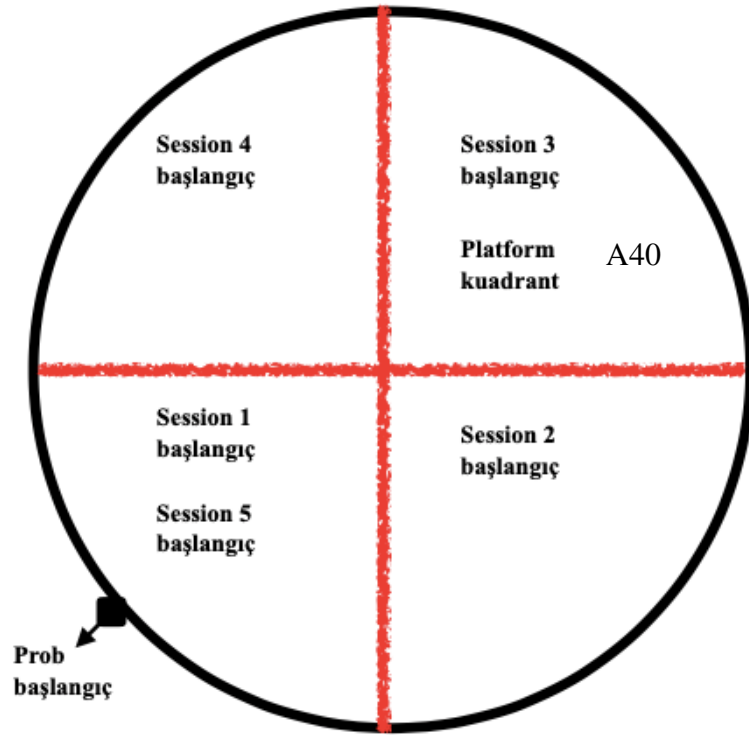
3.2.2.3. Morris su labirenti (MWM):

Morris su labirenti 210 cm çapında ve 51 cm yüksekliğinde bir tankın 45 cm yüksekliğine kadar oda sıcaklığında hayvanlarla kontrast oluşturacak gıda boyası ve süt tozu karıştırılmış su ile dolu olan bir düzendir. Bu düzener bir bilgisayar programı aracılığı ile kontrol edilmektedir.

Programın kontrolü ile havuz dört eşit parçaya ayrıldı (Şekil 3.8). Bu ayrılan dört eşit parçadan birinin tam ortasına da sıçanların üstünde durabileceği bir platform suyun tamamen altında kalacak ve görünmeyecek şekilde konuldu. Hayvanların ipuçlarından yararlanarak platformun yerini bulmaları için deney odasında çeşitli geometrik şekillerden oluşan ipuçları yerleştirildi. Sıçanlar önceden ayrılan dört ayrı kadrandan

tekrarlı olarak suya bırakılarak, suyun içinde gizlenen platformu bulmaları için 60 sn süre verildi (Şekil 3.9). Öğrenme deneyleri hergün 4 deneme olacak şekilde 5 gün boyunca tekrarlandı. Platformu bulan sıçanlara 5-10 sn boyunca etrafını gözlemlemesi için süre verildi ve platformun üzerinden alınarak kafeslerine yerleştirildi. Platformu 60 sn içerisinde bulamayan sıçanlar direk suyun içerisinden alındı ve bir dahaki denemeye kadar kafesine yerleştirildi. Gün içerisindeki her deneme arası her bir sıçan için 5 dk olarak belirlendi.

6. gün öğrenmenin gücü ve bellek fonksiyonlarının belirlenmesi amacı ile sıçanlara prob denemesi yapıldı. Su tankının içindeki platform prob denemesi için sudan çıkartıldı. Sıçanlar platform bölümünün tam karşısındaki bölümden suya bırakıldı ve 60 sn boyunca platformun önceden bulunduğu çeyrekte geçirdikleri süre hesaplandı. Bu deney hayvanların mekânsal öğrenmeleri ve hafızalarının ölçümünde önemlidir.



Şekil 3.8: Su labirenti deneyinin başlangıç noktaları



Şekil 3.9: Morris Su Labirenti

3.2.3. Dokuların alınması

Davranış deneylerinin sonuçlanmasından sonra intraperitoneal olarak sıçanlara anestezi madde verildi. Anestezi altında olan hayvanlar dekapitasyon yöntemi ile sakrifiye edildi. Sakrifiye olan hayvanlardan alınan dokuların bir kısmı kuru buz yardımıyla dondurularak -80 °C’de moleküler analizler yapılincaya kadar saklandı. Dokuların diğer bir kısmı histolojik çalışmalar için formaldehit içine alındı. Hayvanlardan alınan beyin dokusundan hipokampus disekte edilerek saklandı (Şekil 3.10).



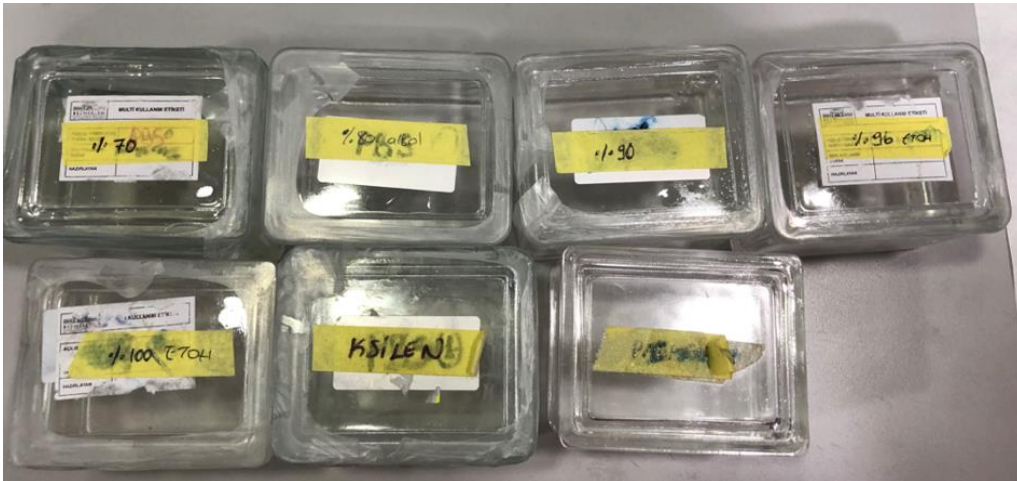
Şekil 3.10: *Long Evans* türü sıçandan çıkartılan tam beyin.

3.2.4. Histolojik çalışmalar

3.2.4.1. Hemotoksilen eozin boyaması

3.2.4.1.1. Dokunun hazırlanması

Sakrifiye edilen sıçanlardan alınan doku örnekleri Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında ışık mikroskopik inceleme yapılmak üzere takibe alındı. Alınan doku örnekleri fosfat tamponu (PBS) içinde hazırlanmış %10 tamponlu nötral formaldehitte 1 gün tespit edildi. Tespit edilen doku örnekleri rutin ışık mikroskop doku takip yöntemine göre dereceli alkollerden geçirilerek dehidrate edildi (Şekil 3.11) ve ksilolde şeffaflandırıldıktan sonra parafine gömüldü (Şekil 3.12).

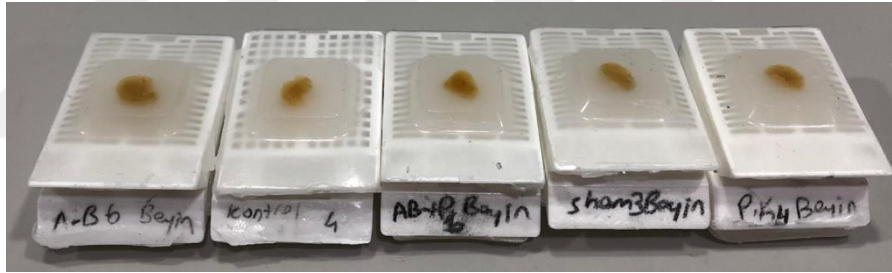


Şekil 3.11: Takip aşamaları



Şekil 3.12: Gömme cihazı

Doku takibi sırasında optimizasyonun sağlanabilmesi için sabit vakumlu bir doku takip cihazı kullanıldı (Leica, model TP 1020) (Şekil 3.13). Parafin bloklardan rotary mikrotom ile 3- 4 μ m kalınlığında kesitler krom alüm jelatin ile kaplı rodajlı lamlara alındı (Şekil 3.14).



Şekil 3.13: Gömme işlemi tamamlanmış dokular



Şekil 3.14: Mikrotom ile kesit alınma işlemi

3.2.4.1.2. Kesitlerin boyanması

Rodajlı lamlara alınan 3-4 μm kalınlığındaki paraffin kesitler 1 gece etüvde deparafinize edildikten sonra aşağıdaki sırayla boyama işlemi yapıldı (Şekil 3.24).

- 3 kere 15' er dakika ksilolde bekletildi.
- Sırasıyla %96, %96 ve %80' lik alkollerde 10 ar dakika bekletilerek rehidrate edildi.
- Akar suda 10 dakika yıkandı.
- Kullanılmadan önce süzülen Hematoksilende 15 dakika bekletildi.
- Akar suda 10 dakika yıkandı.
- 2 kere asit alkole batırılıp çıkartıldı.
- Akar suda 10 dakika yıkandı.
- 2 kere amonyaklı suya batırılıp çıkartıldı.
- 60 sn eozinde bekletildi.
- Sırasıyla %80, %96, %96' lık alkollerden geçirildi.
- Kurutulup, 45 dakika ksilolde bekletildikten sonra Kanada balsamı ile kapatıldı (Şekil 3.16).



Şekil 3.15: Etüv cihazı

Kapatılan örnekler Nikon (Eclipse 920248, Amerika Birleşik Devletleri) ışık mikroskopunda değerlendirildi ve görüntüler Nikon Marka DS-Fi2-U3 Model kamera ile tam uyumlu görüntüleme yazılımı ile bilgisayar ortamına aktarıldı



Şekil 3.16: Hemotoksilen eozin boyama işlemi (işlem ok sırasına göre yapılmıştır)

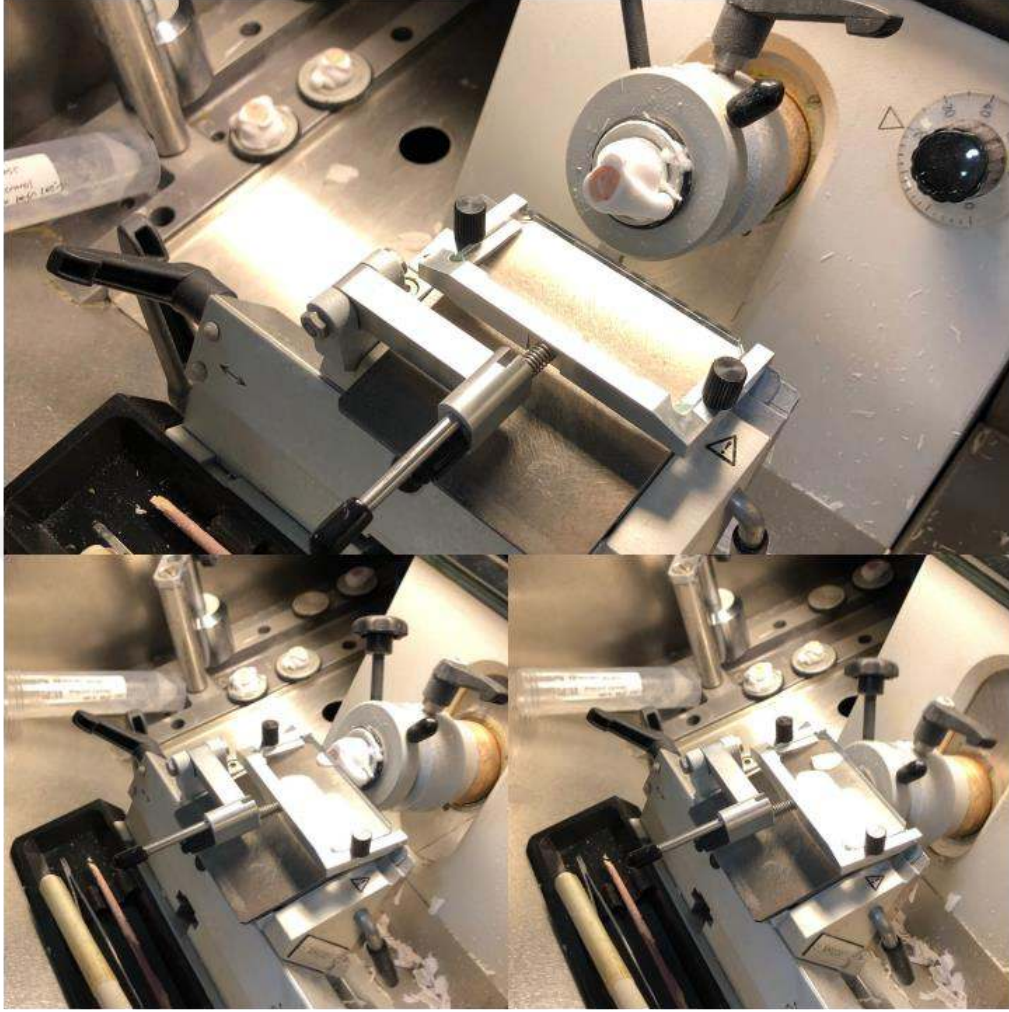
3.2.4.2. Nissl boyaması

3.2.4.2.1. Doku hazırlanması

-80°C'ye kaldırılan yarım beyin dokularının kriyostat cihazı ile 20 mikron kalınlığında pozitif yüklü lamaların üzerine hipokampal bölgeyi içeren kesitler alındı. Pozitif yüklü lamaların üzerine alınan kesitler lamlara yapışması için 37°C'de yaklaşık 20-30 dakika kurutuldu ve hazır hale getirildi. Kullanıma hazır hale gelen lamalar boyama işlemleri yapılmaya kadar -80°C'ye kaldırıldı.



Şekil 3.17: Kriyostat cihazı



Şekil 3.18: Kriyostat ile doku kesiti alınma işlemi

3.2.4.2.2. Cresyl violet hazırlanışı

1,63gr sodyum asetat (Na-asetat) ile 60 ml dH₂O karıştırıldı. Ayrı bir beherde 237,1 dH₂O içine 2,9 ml asetik asit eklendi. Bu iki ayrı karışım birbirine karıştırıldı ve pH ölçer yardımı ile pH'sı ayarlandı. pH'sı 3.8-4.0 arasında ayarlanan karışıma 1,5 gram Cresyl violet Asetat eklendi. Oluşan tüm karışım 1 gece boyunca karıştırılarak karanlıkta bekletildi. Daha sonra kullanmadan önce filitre edilerek kullanıldı.

3.2.4.2.3. Cresyl violet boyaması

-80°C'ye kaldırılan kesitler 37°C'de 20 dakika kurutuldu. Kurutulan lamalar PBS'te hazırlanmış olan soğuk %4'lük PFA içinde 7 dakika bekletildi. Sonra distile su ile çalkalayıcı üzerinde 5 dakika yıkandı. Bu aşamadan sonra dokular 2 dakikası sabit bir ortamda 13 dakikası çalkalayıcı üzerinde toplam 15 dakika cresyl violet ile boyandı.

Cresl viole boyama işleminden sonra ile %70, %80, %90, %95 ve 2 kere %100 alkolden oluşan alkol serisinden geçirilen lamalar ksilene alındı. Ksilende 2-3 dakika bekleyen lamalar entellan yardımıyla kapatıldı. Kapatılan lamalar ışık mikroskobu ile gözlemlendi ve her bir grup başına kesitlerden alınan 5 alandan 50 µm büyüklüğünde çekilen fotoğraflardan hücre sayımı yapıldı.

3.2.4.3. Kongo kırmızısı boyaması

Kongo kırmızısı amiloid beta plaklarının tespit edilmesinde kullanılan bir boyama türüdür. Bu boyama sonucunda amiloid plaklar sayılabilir hale gelmektedir.

3.2.4.3.1. Kongo kırmızısı hazırlanışı

Boyanın hazırlama aşamasında 2 ayrı karışım hazırlandı ve bu iki karışım karıştırılarak bir bütün karışım elde edildi. İlk olarak 4g NaCl (sodyum klorür) 40ml dH₂ O (distile su) içinde ısıtıcı üzerinde çözdürülerek hazırlandı. İkinci olarak 1g toz Kongo'nun 160 ml %100'lük etanol içinde çözüldü. Bu iki karışım birleştirildi ve ısıtıcı 60 dereceden fazla olmayacak şekilde ayarlandıktan sonra gece boyunca karıştırıldı. Ertesi gün boya süzülerek hazır hale getirildi.

3.2.4.3.2. Kongo kırmızısı boyaması

80°C'ye kaldırılan kryostatla kesilen 18 µm kalınlığındaki kesitler 37°C'de 20 dakika kurutuldu. Kurutulan lamalar PBS'te hazırlanmış olan soğuk %4'lük PFA içinde 7 dakika bekletildi. PFA'dan alınan lamalar PBS'de 5 dakika bekletildi. Daha sonra olan Kongo kırmızısı içinde 7 dakika bekletildi. Fazla boyayı almak için distile su ile yıkandı. Karşıt boyama için Cresyl violet içinde 5 dakika bekletildi. Tekrardan fazla boyayı temizlemek amacı ile distile su ile çalkalayıcı üzerinde 5'er dakika olmak üzere 2 kere yıkandı. En son ise alkolden 2'şer dakika geçirildi. Alkoller sırası ile %50, %70, %80'lik, 2'şer defa ayrı ayrı %95'lik, 2'şer defa ayrı ayrı %100'lük etanolden oluşmaktaydı. Kesitler daha sonra 2 dakika ksilende bekletildi ve lamalar entellan ile kapatıldı. Kapatılan lamlardan Nikon marka ışık mikroskobu ile her bir hayvan için 50 µm büyüklüğünde çekilen fotoğraflardan elde edilen tüm alanlarda amiloid beta plaklarının sayımları yapıldı.

3.2.4.4. GFAP boyaması

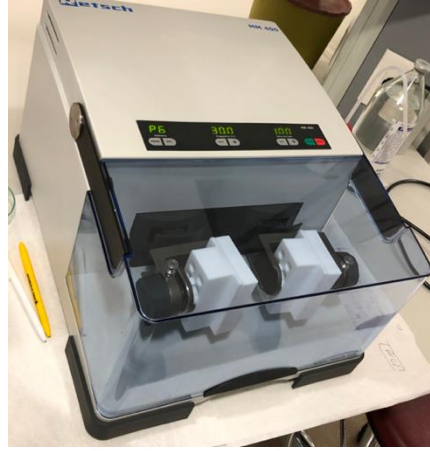
GFAP boyaması astrogliozisin tespit edilmesinde kullanılan bir boyama türüdür. Bu boyama sonucunda reaktif astrositler sayılabilir hale gelmektedir. -80°C'ye kaldırılan kryostatla kesilen 18 µm kalınlığındaki kesitler 37°C'de 30 dakika boyunca inkübe edilerek kurutuldu. Daha sonra kesitler 20 dakika boyunca % 4'lük paraformaldehid (PFA) solüsyonunda bekletilerek fikse edildi. PFA'dan alınan kesitler 3 kere 5'er dakika olacak şekilde fosfat-saline tamponu ile karıştırıcı üzerinde bekletilerek yıkandı. Antijenlerin serbestleşmesi için kesitler 15 dakika boyunca sitrat tamponunda kaynatıldı ve bunu takiben 15 dakika boyunca sitrat tampon içerisinde soğutuldu. Antijen serbestleştirilmesi yapılan kesitler yine 3 kere 5'er dakika olacak şekilde fosfat-saline tamponu ile yıkandı. % 0.3'lük Triton içeren fosfat salin tamponu içerisinde %10'luk normal keçi serumu ile hazırlanmış bloklama solüsyonu ile kesitler oda ısısında 1 saat boyunca inkübe edildi. Bloklamadan çıkan kesitler %2'lik normal keçi serumu içeren fosfat-salin tampon içerisinde hazırlanmış GFAP antikoru (1:100, GFAP conjugated Alexa 555, #3656, Cell signaling) eklenerek gece boyu 4°C'de inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün kesitler 4 kere 5'er dakika olacak şekilde fosfat-saline tamponu ile karıştırıcı üzerinde bekletilerek yıkandı. Çekirdek boyaması için kesitler üzerine içerisinde DAPI bulunan kapatma medyumunu ile kapatılarak kurumaya bırakıldı. Kuruyan kesitlerden konfokal mikroskopu (Leica mikroskop) altında GFAP pozitif hücreler görüntülendi ve her hayvan için 400 µm X 400 µm boyutlarında 5 ROI alanında sayıldı.

3.2.5. Moleküler çalışmalar

3.2.5.1 Beyin dokusundan protein homojenizasyonu

Hayvanların sakrifikasyonu sonrasında -80°C'de muhafaza edilen hipokampus dokuları dolaptan çıkartıldı. 250 µl RIPA lizis tamponu hazırlandı. Hazırlanan tampon içinde hipokampus dokuları bulunan eppendorf tüplerine konuldu ve üzerlerine yaklaşık 5-6 adet metal boncuk eklendi. Hazırlanan dokulu karışım tüpleri homojenizatör cihazına (Şekil 3.19) yerleştirildi ve bir dakika boyunca çalkalanarak dokuların parçalanması sağlandı. Parçalandığı düşünülen dokular 20 dakika boyunca buz üstünde inkübe edildi. Örnekler daha sonra 1400 rpm, 4 °C'de 15 dakika boyunca

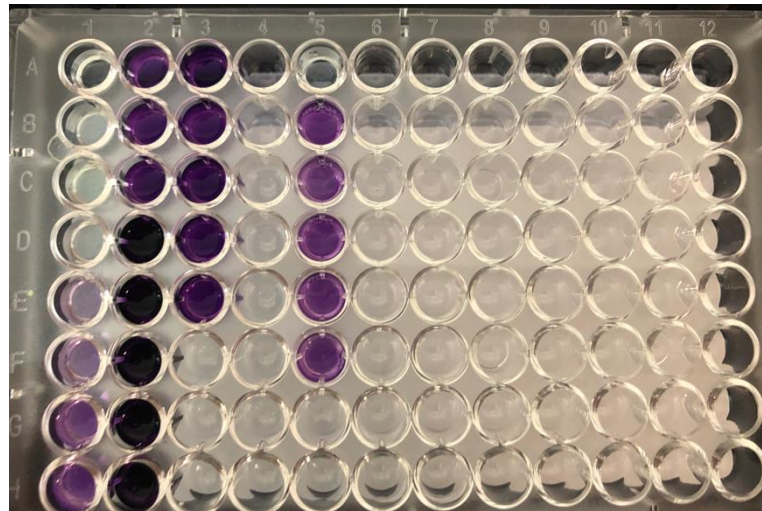
santrifüj edilip 3 tüpe ayrılarak (her biri yaklaşık 50 µl olacak şekilde) alıktlandı ve moleküler analizler yapıłncaya kadar -80 °C'ye kaldırıldı.



Şekil 3.19: Bead'li homejenizatör

3.2.5.2. Protein konsantrasyonunun ölçümü

Protein konsantrasyonu ölçümü için her bir gruptan belli miktarlarda alınan protein örnekleri ile protein havuzu oluşturuldu. Protein havuzu için elimizde olan her bir grupta bulunan tüm hayvanlardan 10µl örnek alındı. Protein ölçümü için bikinkoninik asit (BCA) kiti kullanıldı. Bu kit iuygun ortamı sağlayarak protein tarafından Cu^{2+} 'nın Cu^{+} 'ya indirgenmesi ile oluşan bir kimyasal deney zinciri sayesinde protein konsantrasyonunu belirlemektedir (Şekil 3.20)



Şekil 3.20: BCA protein konsantrasyon kiti ile standartların ve örneklerin protein ölçümleri

Konsantrasyon ölçümü deneyinde 96 kuyucuğu bulunan plaka ile çalışıldı. Her bir kuyucuğa 50:1 oranında hazırlanan BCA çalışma solüsyonundan 200 µl, lizis

tamponundan 9.5 µl ve örnekten ise 0.5 µl eklendi (böylelikle örnekler 20:1 oranında seyreltili), ilk kuyu ise blank (örnek olmayan sadece çalışma solüsyonu ve lizis tamponu içeren kuyucuk) olarak belirlendi. 9 adet kuyuya ise konsantrasyonu bilinen standart protein örnekleri konuldu (25 µg/mL, 50µg/mL, 75 µg/mL, 100 µg/mL, 125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 750 µg/mL, 1000 µg/mL). Daha sonra plaka hafifçe sallanıp önceden 37 °C'ye ayarlanmış olan etüvde 30 dakika boyunca inkübe edildi.

İnkübe olan plaka çıkartılıp “Multiscan go” adlı cihaza yerleştirildi (Şekil 3.21), bilgisayar programında örnekler, blank ve standart örnekler, tanımlandıktan ve standartların konsantrasyon miktarları girildikten sonra sistem çalıştırıldı ve örnekler 562 nm’de okundu. Okunan sonuçlar blank sabiti çıkartıldıktan sonra standart konsantrasyona göre uygun olan eğri kullanılarak elde edilen absorbanlarla her bir tüpte bulunan protein örneklerinin konsantrasyonu belirlendi.



Şekil 3.21: Multiscan go cihazı

3.2.5.3. Örnek hazırlama

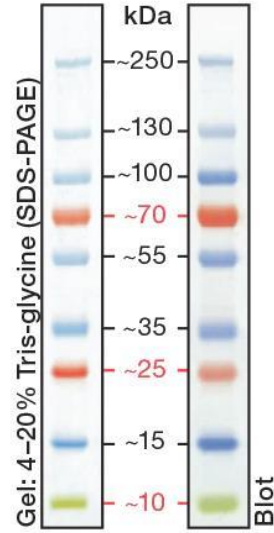
Protein konsantrasyonları belirlendikten sonra her grup içindeki örnekler birleştirilerek o grup için havuz oluşturuldu. Oluşturulan bu havuzdaki örneklerden konsantrasyonları oranında solüsyon içerisinde 40 µg/µl olacak şekilde örnek alınarak laemli tampon solüsyonu ve β-merkapttoethanol ile karıştırıldı. Örnekler daha sonra 95 °C’de 5 dakika kaynatılarak proteinler denatüre edildi (Şekil 3.22). Denatüre edilen ve böylelikle üç boyutlu şekillerine göre değil de büyüklüklerine göre ayrılacak olan protein örnekleri Western blot çalışmaları yapıncaya kadar -20 °C’ye kaldırıldı.



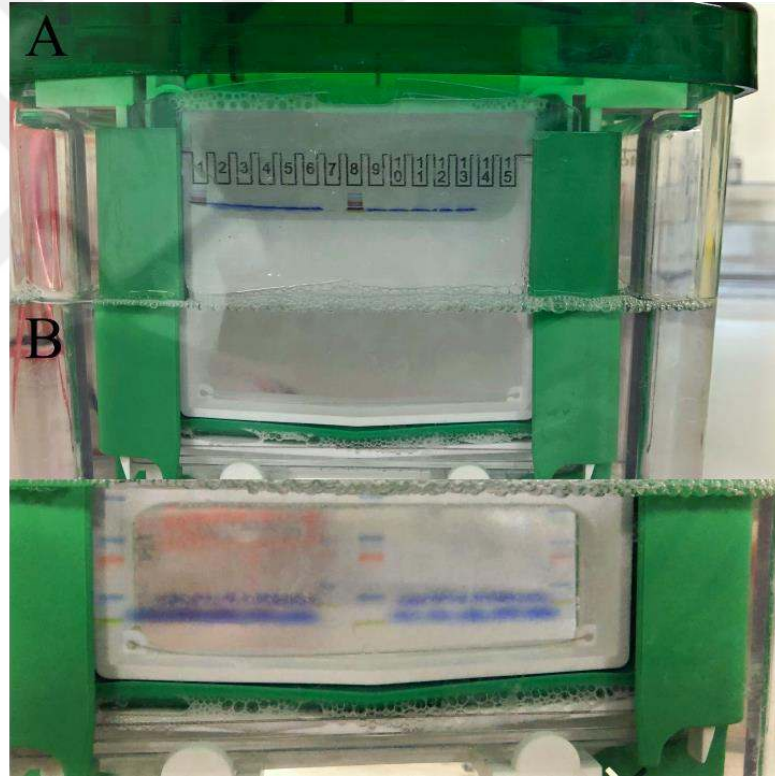
Şekil 3.22: Proteinlerin ısıtılarak denatüre edilmesinde kullanılan inkübasyon cihazı

3.2.5.4. Western blot

Protein elektroforezi, proteinleri fonksiyonel ve karakteristik olarak tanımlamada, ayrıca hastalıkların tanısında ve teşhisinde çoğunlukla kullanılan yöntemlerin başında gelmektedir. Protein elektroforezi geçirgen bir tampon yardımı ile ideal miktarda protein örneğinin kuyucuklara yüklenmesinin ardından proteinlerin elektrik akımı yardımıyla yürütülmesi şeklinde gerçekleşir. Bahsedilen yürütme olayı, dış ortamda bulunan elektriksel akımın proteinlerin elektrik yüklerine uyguladıkları çekim gücü ile gerçekleşir. Sodyum dedoksil sülfat (SDS) ile tamamen negatif yüklerle kaplanan ve sıcaklıkla denatüre edilen proteinler yüklerinden ve 3 boyutlu yapılarından ziyade western blot ile sadece boyutlarına göre ayrılmaktadırlar. Dikey elektroforez deneyi için %4-20 Bio-Rad mini-Protean TGX jeller kasetlerinden dikkatlice çıkartılıp dH₂O ile yıkandı, daha sonra altlarında bulunan koruyucu bantlar çıkarıldı ve böylelikle kullanıma hazır hale getirildi. Bunun dışında yürütmenin yapılabilmesi için yürütme tamponu hazırlandı. Bio-Rad jel tankına hazırlanan jeller yerleştirildi ve kuyucuklarından taraklar çıkartıldı. Daha sonra hazırlanan yürütme tamponu tanka konuldu ve kuyuların bu tampon ile yıkanması sağlandı. Jelde bulunan ilk kuyucucuğa moleküler ağırlıklarını belirleyebilmek için belirteç (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Fischer, Amerika Birleşik Devletleri) yüklendi ve böylelikle proteinlerin ağırlıkları bu belirtece göre belirlendi (Şekil 3.23). Diğer kuyucuklara ise protein örnekleri yüklendi. Tankın kapağı kapatıldı ve elektrik kabloları doğru şekilde bağlandı. Elektroforez yürütmesi 120 voltta 1 saat olacak şekilde ayarlandı ve proteinler yürütüldü (Şekil 3.24)



Şekil 3.23: Elektroforezde bilinen protein ağırlıkları



Şekil 3.24: A) Dikey elektroforez yürütmenin başı. B) Yürütmenin sonu

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel tanktan çıkartıldı. Çıkartılan jelde bulunan proteinler deneyin devamı olarak Bio-Rad transfer cihazı ile yarı-kuru olarak membrana transfer işlemine tabi tutuldu. Transfer işleminde jeldeki proteinler, protein bağlama özelliğine sahip olan PVDF membrana aktarıldı. Transfer işlemi için bu çalışmada Bio-Rad midi transfer kiti ve Bio-Rad transfer tamponunu kullanıldı. PVDF

membranının aktifleşmesi için 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 herhangi bir sekteye uğramaması amacıyla oluşan hava kabarcıkları giderildi. Bu işlemlerin sonunda transfer cihazının kapağı kapatıldı ve 25 voltta, 2.5 amperlik akımda 7 dakika boyunca transfer işlemi gerçekleştirildi (Şekil 3.25).



Şekil 3.25: A) Dikey elektroforez. B) Transfer cihazı

Transfer işlemi tamamlandıktan sonra membranlar 5 dakika Tween 20 içeren Tris tamponu ile yıkandı. Daha sonra membranlar bloklama için Tween 20 içeren Tris tamponu içerisinde hazırlanmış %5'lik süt tozu 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından %5'lik süt tozu içerisinde çözünen birincil antikorlar (BACE1, Bcl-2, pTau, GAPDH, Tubulin, Reelin, β -amyloid, Bax, fraktalkin reseptörü, PSEN1) (1:1000) ve %5'lik sığır serum albümini (BSA) içerisinde çözünen birincil antikor (CX3CL, 1:2000) ile gece boyunca 4 °C'de inkübe edildi. Ertesi gün kullanılan antikorlar toplandı ve membranlar 3 kez 5'er dakikalık tekrarlarla Tween 20 içeren 0.1M Tris tamponu ile yıkandı. Yıkanan membranlar %5'lik süt tozu veya BSA içerisinde hazırlanmış ikincil antikorlar (Anti-rabbit antikor ve anti-mouse antikor 1:5000) ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi (Şekil 3.26).



Şekil 3.26: Membranların ikincil antikorlanması

İkincil antikorlar toplandıktan sonra membranlar tekrardan 3 kez 5'er dakika Tween 20 içeren Tris tamponu ile yıkandı ve son aşama olan görüntüleme aşamasına geçildi. Membrandaki proteinlerin cihaz tarafından görüntülenebilmesi amacıyla Abbkine ECL solüsyonu kullanıldı. ECL solüsyonu ile PVDF membranı 3 dakika inkübe edildi. Proteinlerden elde edilen sinyaller Fusion FX7 (Vilber Lourmat) sisteminde CCD kamera altında gerçekleşti ve bilgisayara görüntüler alındı (Şekil 3.27).



Şekil 3.27: Görüntüleme cihazı

3.2.6. İstatiksel analizler

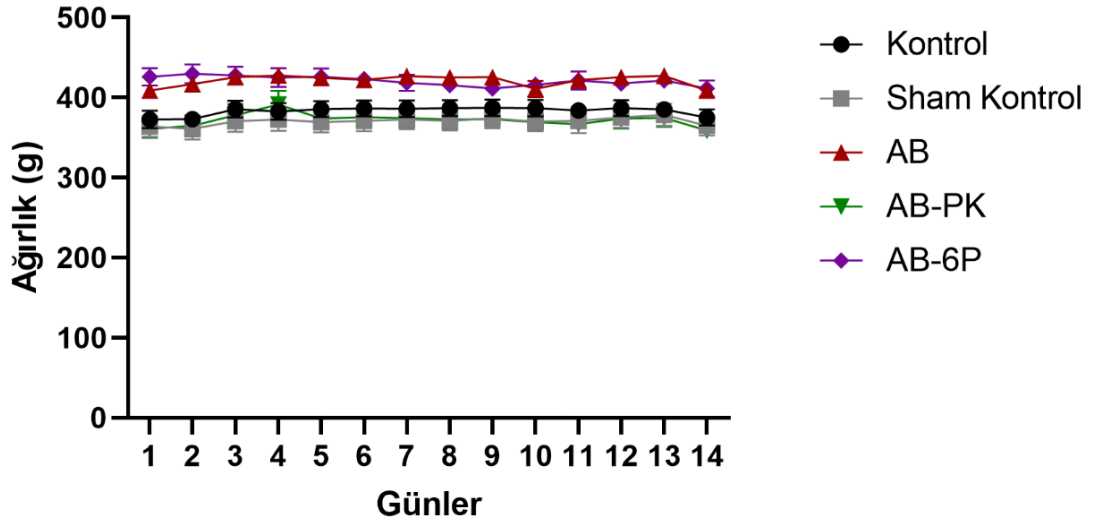
Davranış deneylerinden ve moleküler deneylerden elde edilen verilerden grupların ortalaması ve standart sapması hesaplandı. Verilerin normal dağılımları Kolmogorov-Smirnov testi ile kontrol edildi ve normal dağılım gösteren örneklere gruplar arası ve günler arası farklılıkları hesaplamak için tek yönlü ANOVA testi yapıldı. Morris su labirentinde öğrenme testi ve kilo verileri 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. Bütün istatistiksel analizler için GraphPad Prism 9 kullanıldı.



4.BULGULAR

4.1. Hayvan Ağırlıkları

Hayvan ağırlıkları A β ₁₋₄₂ enjeksiyonundan önce ve enjeksiyondan sonra kaydedildi (Şekil 4.1). Buna göre tekrarlı ölçüm ANOVA analizi sonucunda gruplar arasında zamana bağlı anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

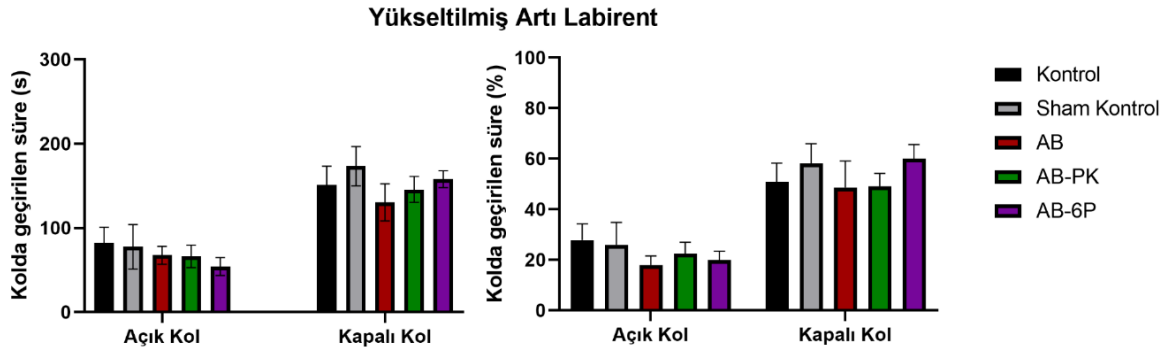


Şekil 4.1: Hayvanların Ağırlık Değişimleri

4.2. Davranış Deneyleri

4.2.1. Yükseltilmiş artı labirent testi

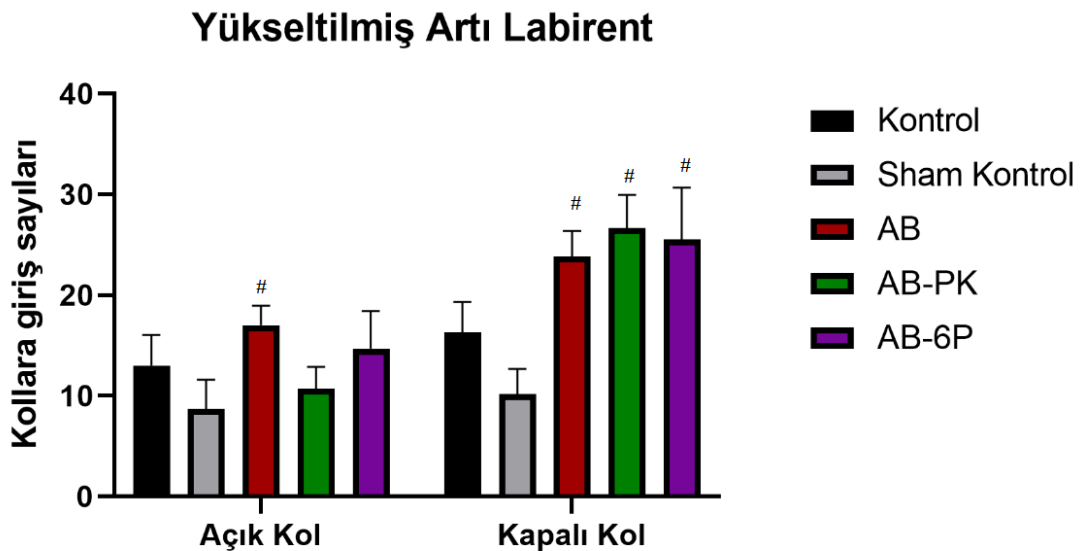
Yükseltilmiş artı labirent testi şartlanma olmaksızın anksiyete ölçümü yapan bir testtir. Artan anksiyeteye göre kapalı kolda geçirilen süre artmaktadır.



Şekil 4.2 Açık ve kapalı kolda grupların geçirdiği süre ve geçirilen sürelerin yüzde değerleri

Tek yönlü ANOVA analizi yapıldığında gruplar arasında ne açık kolda geçirilen süre ne de kapalı kolda geçirilen sürelerde anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($F_{(4,28)}=0.408$, $p=0.801$ ve $F_{(4,28)}=0.657$, $p=0.627$, sırasıyla) (Şekil 4.2). Aynı şekilde toplam geçirilen sürelerin yüzdelere bakıldığında da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p>0.05$).

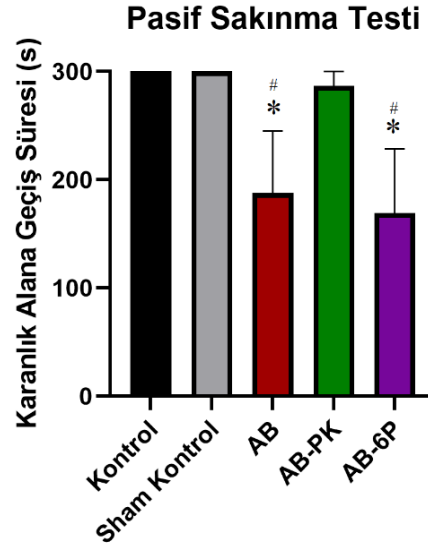
Diğer taraftan sıçanların açık ve kapalı kollara giriş sayılarının analizi yapıldığında A β ($p=0.017$), A β -PK ($p=0.009$), ve A β -6P ($p=0.015$) gruplarında sham kontrol grubuna oranla kapalı kola giriş sayısında anlamlı bir artış kaydedildi ($F_{(4,27)}=2.957$, $p=0.038$) (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 Açık ve kapalı kola giriş sayıları, # $p<0.05$ Sham kontrole göre.

4.2.2. Pasif sakınma testi

Pasif sakınma testi, hayvanların davranışsal olarak korkuya bağlı bellek ölçümünü ve bu ölçümlere bağlı olarak hipokampus-amigdala ilişkisini gösteren bir testtir.

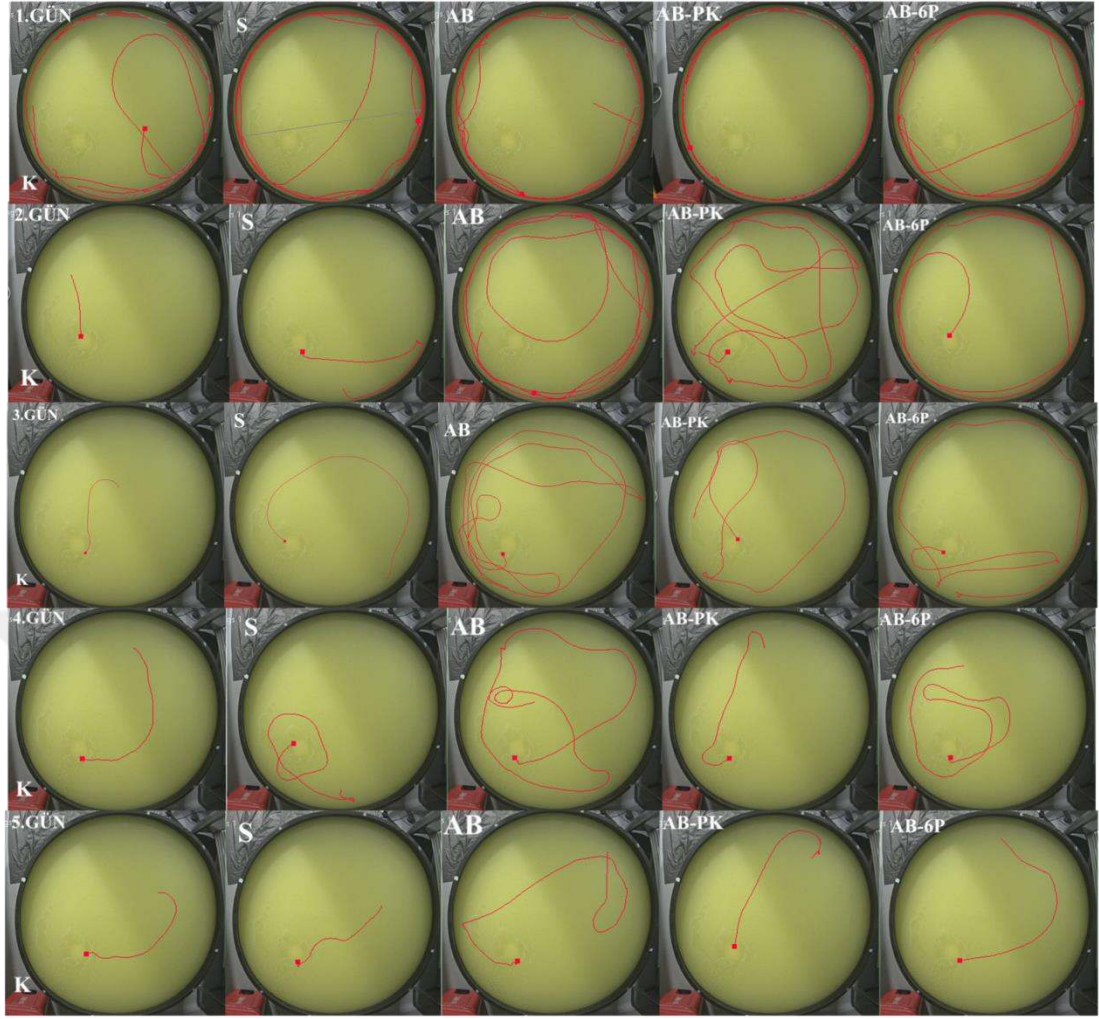


Şekil 4.4: Pasif sakınma testinde karanlık odaya geçiş süreleri. * $p<0.05$ kontrole göre ve # $p<0.05$ Sham kontrole göre.

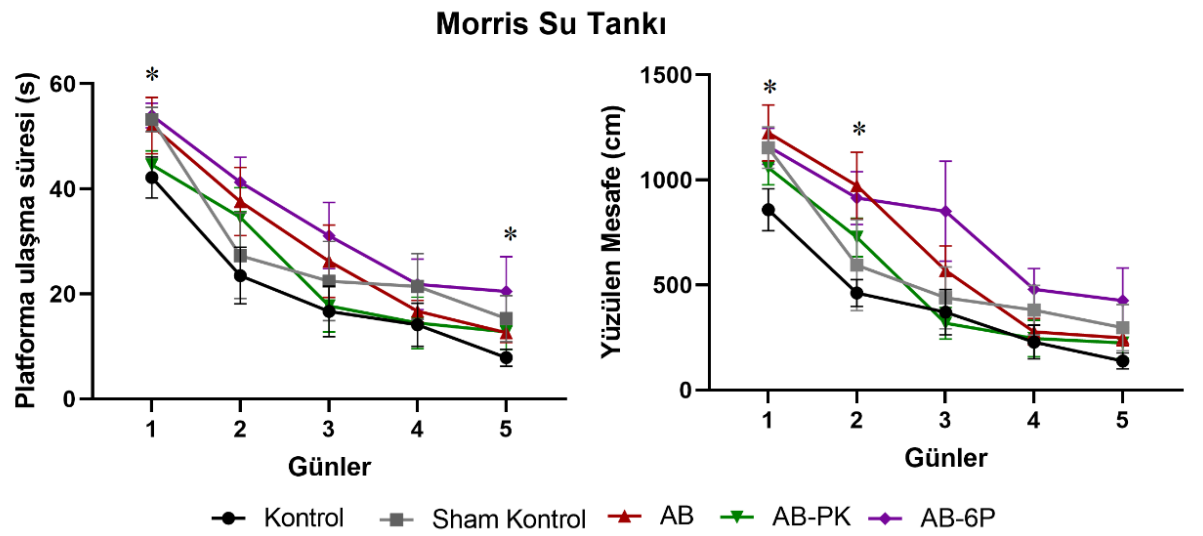
Tek yönlü ANOVA testine bakıldığında hayvanların karanlık alana geçme sürelerinde gruplar arasında anlamlı bir değişim gözlemlendi ($F_{(4,25)}=2.995$, $p=0.038$). Post hoc Tukey LSD testine göre amiloid beta grubundaki sıçanların karanlık alana geçme süreleri kontrol ve sham kontrol gruplarına oranla anlamlı derece daha kısa idi ($p=0.044$). Diğer taraftan Pozitif kontrol grubunda ise bu süre kontrol grupları ile aynı düzeydeydi. 6-Paradol tedavisi uygulanan AH grubundaki sıçanlarında karanlık alana geçme süreleri kontrol gruplarına oranla anlamlı derecede düştü ($p=0.021$).

4.2.3. Morris su labirenti testi

Hipokampüse bağlı öğrenme ve bellek parametrelerini ölçümünde önemli olan Morris su labirenti deneyi özellikle uzun süreli hafıza için önemli sonuçlar elde edilmektedir. Şekil 4.5'te görüldüğü üzere gruplardaki hayvanların her gün yüzme hızlarında ve mesafelerinde belirgin bir azalma gözlemlendi.

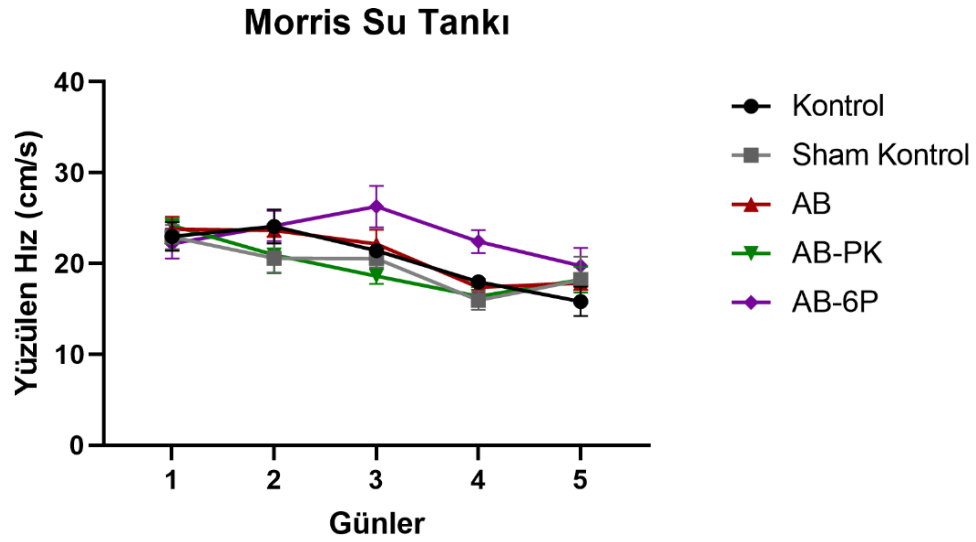


Şekil 4.5: Morris su tankında platformu bulana kadar havuzda izlenen yolun günler bazında değişimi



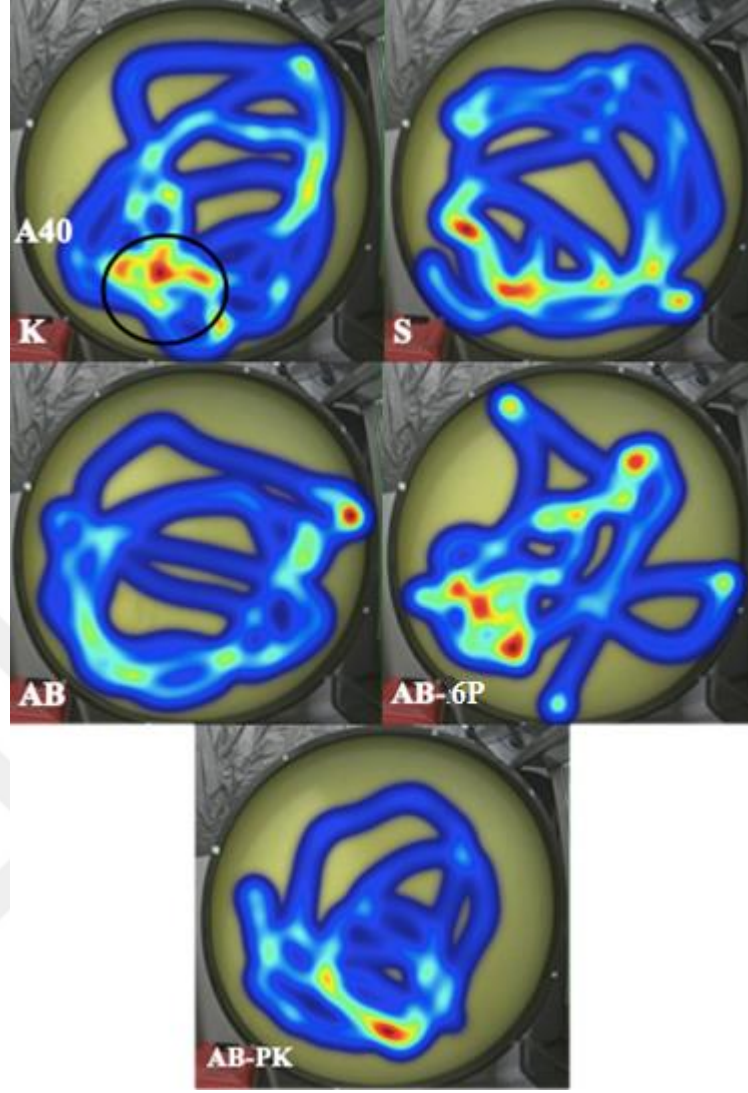
Şekil 4.6: Morris su tankında platformu bulana kadar havuzda geçirilen süre ve yüzülen mesafe. * $p < 0.05$ kontrole göre

Şekil 4.6’da görüldüğü üzere ve tekrarlı ölçüm ANOVA verilerine göre günler arasında hem platforma yüzülen sürede ($F_{(4,112)}=69,950$ $p<0.001$) hem de yüzülen mesafede ($F_{(4,112)}=66,508$ $p<0.001$) anlamlı bir değişiklik bulundu. 5 günlük yer öğrenme deneylerinde yüzülen süre açısından gruplar arasında ($F_{(4,28)}=2,203$ $p=0.094$) anlamlı bir fark bulunmazken yüzülen mesafe açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($F_{(4,28)}=3,461$ $p=0.020$). Buna göre, ilk gün yüzülen mesafe ve süre açısından A β grubundaki sıçanlar kontrol grubu sıçanlara oranla daha kötü performans sergilediler ($p=0.021$ ve $p=0.0089$, sırasıyla). Yüzülen mesafe açısından A β grubundaki öğrenmede gecikme 2. günde de devam etti ($p=0.010$).



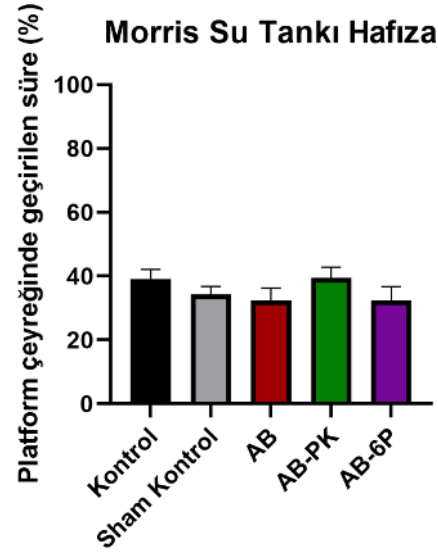
Şekil 4.7: Morris su tankında yüzme hızı

Yüzülen mesafe ve süredeki değişimlerin hayvanların hızlarından mı kaynaklandığını tespit etmek için grupların hızları kıyaslandı. Buna göre yüzme hızlarında gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi ($F_{(4,28)}=1,383$ $p=0.265$) (Şekil 4.7).



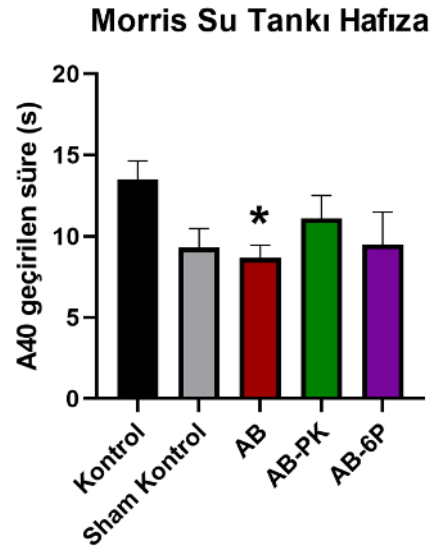
Şekil 4.8: Morris su tankı platformsuz probe deneyinde izlenen yol

Şekil 4.8’de görüldüğü üzere gruplardaki hayvanların platformsuz denemelerinde hafızlarındaki değişim platformun daha önce yer aldığı alanda geçirdikleri zamanla doğru orantılı bir şekilde gözlenmiştir.



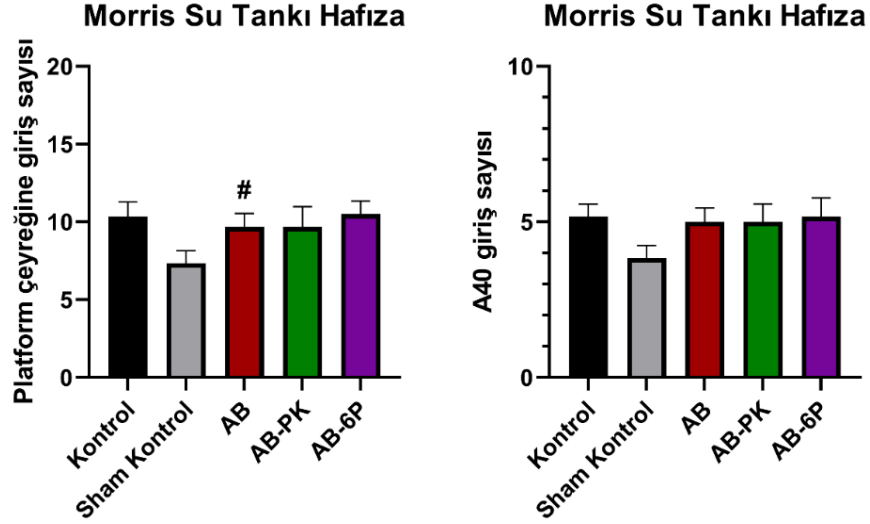
Şekil 4.9: Morris su tankı platformsuz probe deneyinde platform çeyreğinde geçirilen sürenin toplam süreye oranı

Öğrenme deneyleri sonrası yapılan platformsuz hafıza ölçümleri deneylerinde platform çeyreğinde geçirilen sürenin toplam geçirilen süreye oranları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı ($F_{(4,27)}=0,961p=0.448$) (Şekil 4.9). Fakat daha önce platformun bulunduğu 40 cm'lik alanda geçirilen süreler kıyaslandığında A β grubunun burada daha az vakit geçirdiği ($p=0.022$) buna karşı hem pozitif ilaç grubunun hem de 6-Paradol verilen grubun A40 alanında kontrol grubu ile arasında fark bulunmadığı tespit edildi (Şekil 4.10).



Şekil 4.10: Morris su tankı platformsuz probe deneyinde platform çeyreğinde geçirilen sürenin toplam süreye oranı. * $p<0.05$ kontrole göre

Son olarak hayvanların platform alanına giriş sayıları ölçülerek hafızalarının ne kadar kuvvetli olduğu belirlenmeye çalışıldı. Buna göre A40'a giriş sayısında gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmezken ($F_{(4,29)}=1,313p=0.292$) (Şekil 4.11), platform çeyreğine giriş sayısında sham grubunda A β grubuna oranla daha kötü bir performans kaydedildi ($p=0.033$).

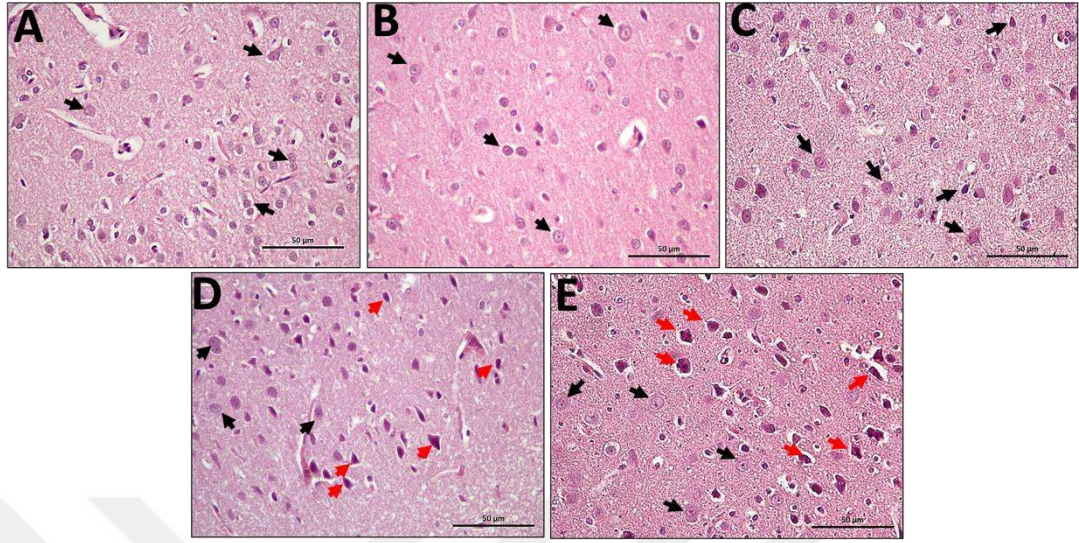


Şekil 4.11: Morris su tankı platformsuz probe deneyinde platform çeyreğine ve A40' giriş sayıları. # $p<0.05$ sham kontrole göre

4.3. Histolojik Çalışmalar

4.3.1. Hematoksilen-Eozin boyama

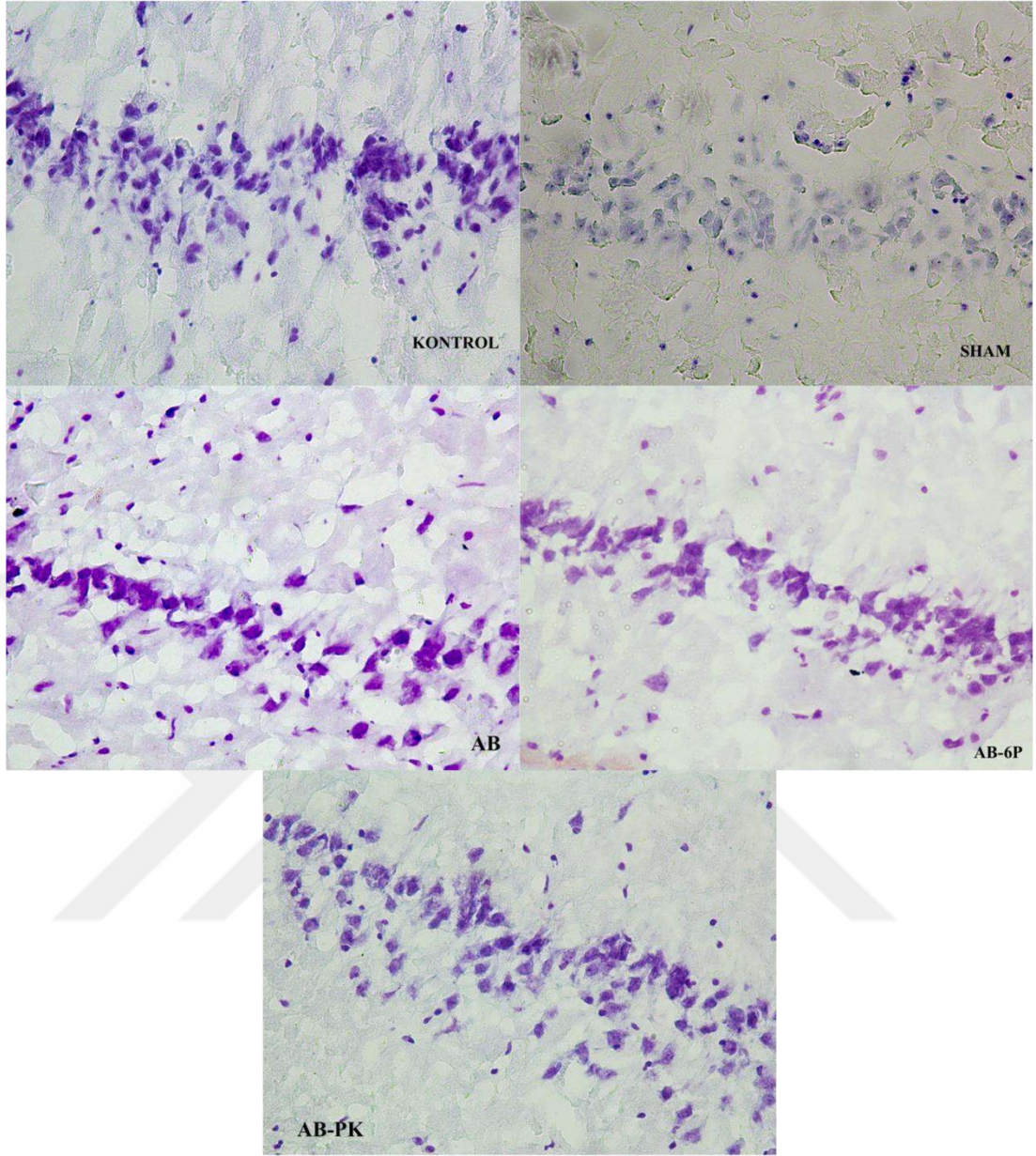
A β -PK, S ve K gruplarına ait beyin dokularının histolojik yapılarının birbirine benzer ve sağlıklı olduğu izlendi. Ancak Alzheimer oluşturulan grup ile (A β) ile paradol verilen (A β -6P) grubuna ait kesitlerde bazı nöron hücrelerinin nükleuslarının düzensiz ve piknotik olduğu görüldü. Ayrıca A β -6P grubuna ait beyin dokusunda vakuolizasyon olduğu dikkati çekti. Siyah oklar sağlıklı nöron hücrelerini göstermektedir. Kırmızı oklar ise nöronların çekirdeklerinde düzensizlik ve piknozisleri göstermektedir (Şekil 4.12).



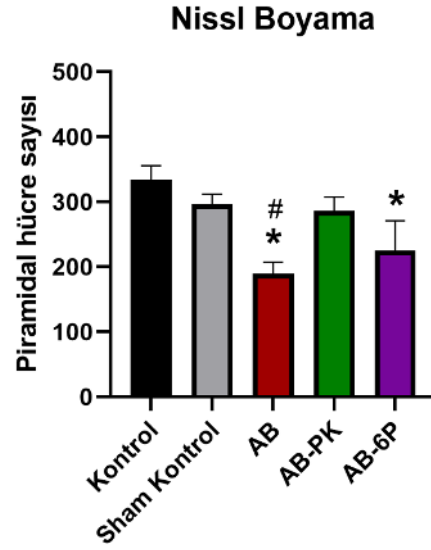
Şekil 4.12: Hematoksilen- Eozin boyaması, A: Kontrol grubu, B: Sham kontrol grubu, C: Pozitif kontrol, D: Alzhemir grubu ($A\beta$) , E: 6-Paradol verilen grup($A\beta$ -6P)

4.3.2. Nissl boyama

Nissl boyama sonucunda yapılan hücre sayımlarında hipokampusün CA1 bölgesinde $A\beta_{1-42}$ verilen gruptaki hücre sayısının kontrol ve sham kontrol gruplarına göre anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi ($p=0.003$ ve $p=0.013$, sırasıyla) (Şekil 4.13). Donepezil ve 6-Paradol verilen tedavi gruplarında ise sadece $A\beta_{1-42}$ verilen gruba oranla hücre sayısında bir artış yaşandığı ve kontrole yaklaştığı tespit edildi. Fakat 6-Paradol grubunda hücre sayısı kontrole oranla hala daha az sayıda idi ($p=0.022$) (Şekil 4.14).



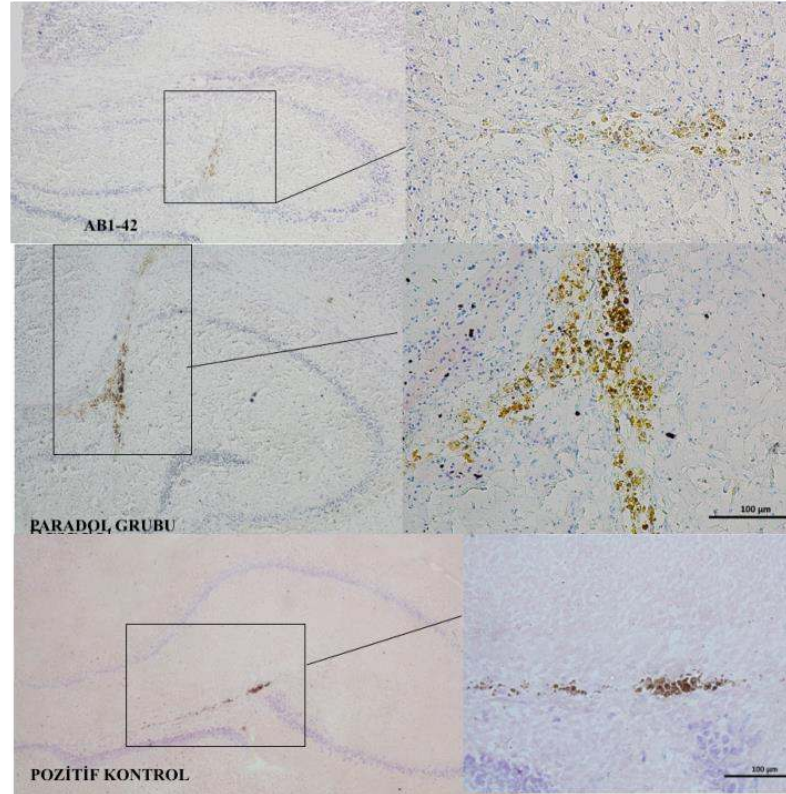
Şekil 4.13: Nissl boyama sonucunda grupların hippocampus CA1 bölgelerinin görüntüsü



Şekil 4.14: Gruplardaki nissle boyama sonucu hippocampus CA1 bölgesinde hücre sayılarının oranını gösteren grafik. * $p < 0.05$ kontrole göre, # $p < 0.05$ sham kontrole göre

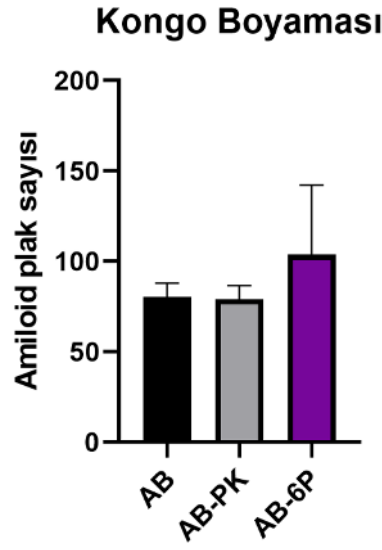
4.3.3. Kongo boyama

Kongo boyaması sonucunda amiloid plakların AH modeli oluşturulan gruplardaki varlığı tespit edildi (Şekil 4.15).



Şekil 4.15: Kongo boyaması sonucu amiloid plakların görünümü

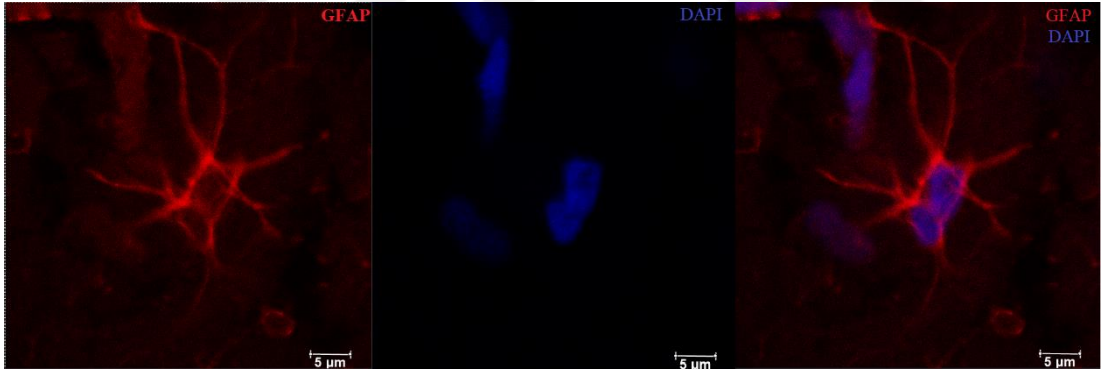
Amiloid plakların sayısında gruplar arasında anlamlı bir farklılığın olmadığı gözlemlendi ($F_{(2,10)}=0.180$ $p=0.839$) (Şekil 4.16).



Şekil 4.16: Kongo boyaması ile elde edilen amiloid plak sayısı

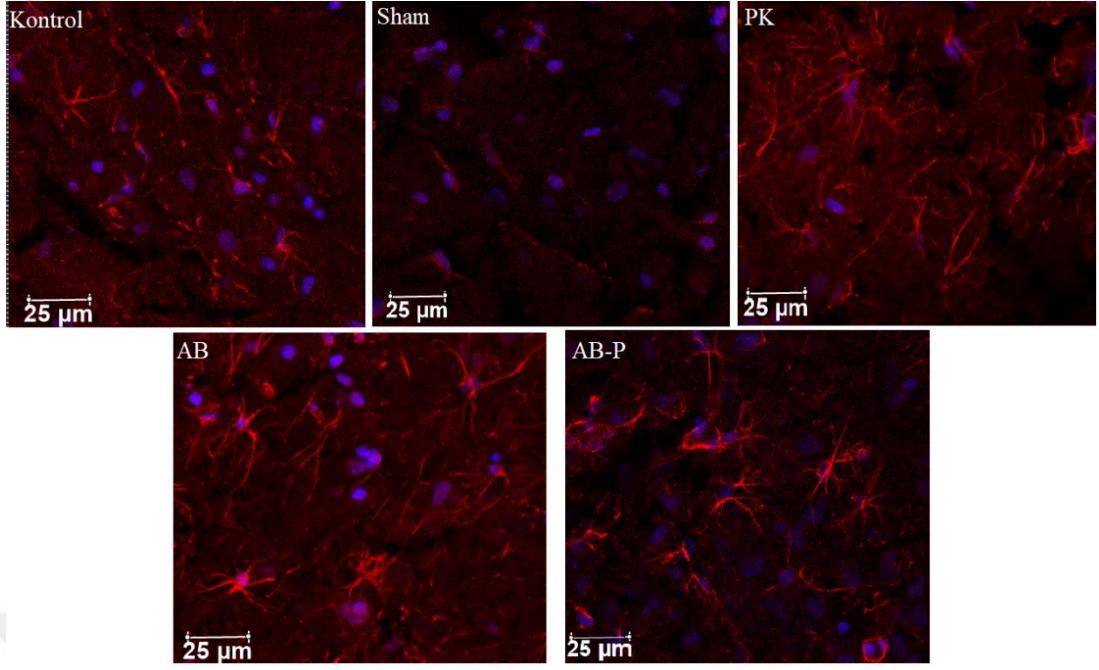
4.3.4. GFAP immün boyaması

GFAP boyaması sonucunda hipokampal dokuda yer alan reaktif astrositler görüntülendi (Şekil 4.17).



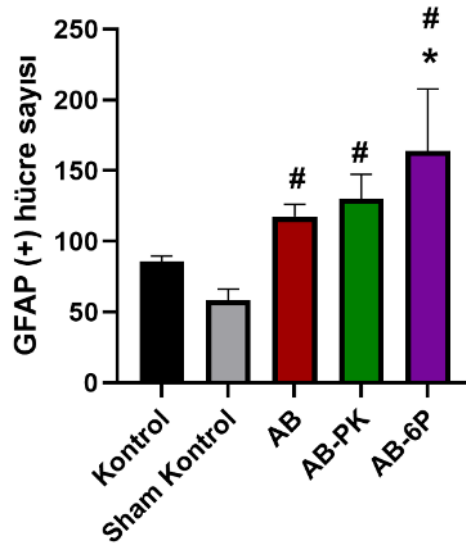
Şekil 4.17: GFAP pozitif hücreler (40X)

GFAP immüno Floresan boyama sonucunda gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edildi ($F_{(4,19)}=3.929$ $p=0.022$) (Şekil 4.18).



Şekil 4.18: GFAP pozitif hücrelerin gruplar arasındaki farklılıklarının belirlenmesi

Gruplar arasında reaktif astrositlerin sayılarına bakıldığında sham kontrole ve kontrole oranla A β verilen gruplarda GFAP pozitif hücre sayısında anlamlı bir artış gözlemlendiği ($p=0.048$, $p=0.018$, ve $p=0.003$) bu artışın en dramatik olduğu grubun ise 6-Paradol verilen grup olduğu tespit edildi (Şekil 4.19).



Şekil 4.19: GFAP pozitif hücrelerin gruplar arasındaki farklılıklarının belirlenmesi. *

$p<0.05$ kontrole göre, # $p<0.05$ sham kontrole göre

4.4. Western Blot

Yapılan western blot çalışması için öncelikle protein konsantrasyonu ölçüldü buna bağlı olarak örnekler hazırlandı ve protein elektroforezinden sonra antikorlarla müdahale edildi.

4.4.1. Protein konsantrasyonları ölçümü

Aşağıda (Tablo 4.1) protein konsantrasyonlarının ölçümü bulunmaktadır. Ölçülen protein konsantrasyonlarının 10 ile çarpılmış halleri, µg/ml halleri bulunmaktadır.

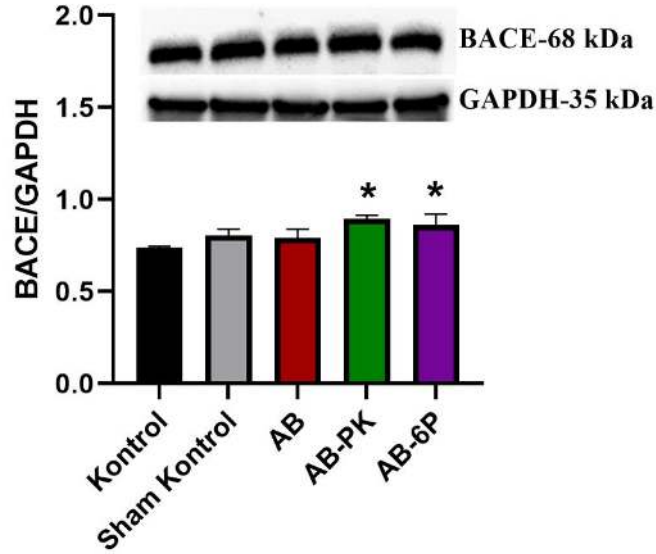
HAYVAN	KONSANTRASYON
KONTROL GRUBU	35010
SHAM GRUBU	18074
AMİLOİD BETA	24404
POZİTİF KONTROL	24508
PARADOL	31846

Tablo 4.1: Protein konsantrasyon ölçümleri

4.4.2. Protein elektroforezi ve Western blotlama

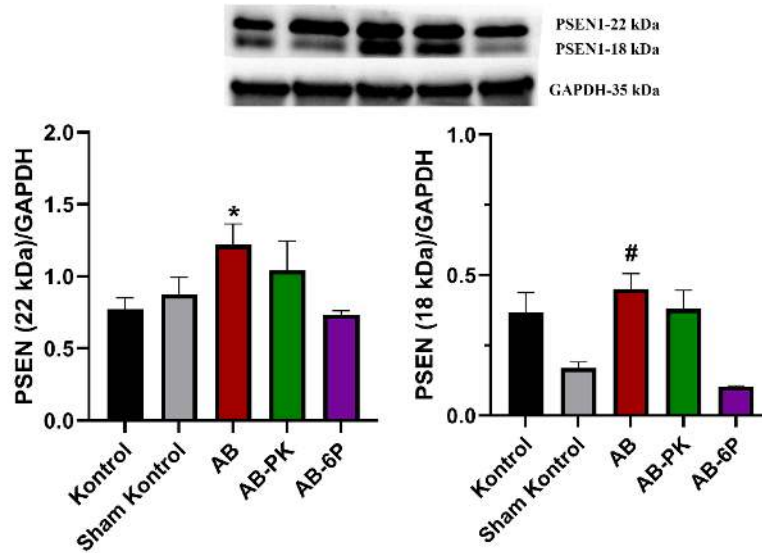
Protein konsantrasyon ölçümlerinden sonra, konsantrasyon eşitlemesi ile yapılan western blot ölçümünde ilk olarak AH belirteçleri olan proteinler (BACE, PSEN ve pTau) bakılarak 6-Paradol'un AH parametrelerini düzenlemesi açısından değişimler incelenmiştir.

Amilodojenik yolaktaki beta sekretazın miktarı hakkında bilgi veren BACE protein ekspresyonuna bakıldığında tek yönlü varyans analizine göre gruplar arasında anlamlı bir farklılığın olmadığı tespit edildi ($F_{(4,14)}=2.575$ $p=0.103$) (Şekil 4.20). Gruplar arasında yapılan post hoc testine göre tedavi grupları olan pozitif ilaç grubu ve 6-Paradol grubunda kontrole oranlan BACE ekspresyonunda anlamlı bir artış gözlemlendi ($p=0.015$ ve $P=0.049$, sırasıyla).



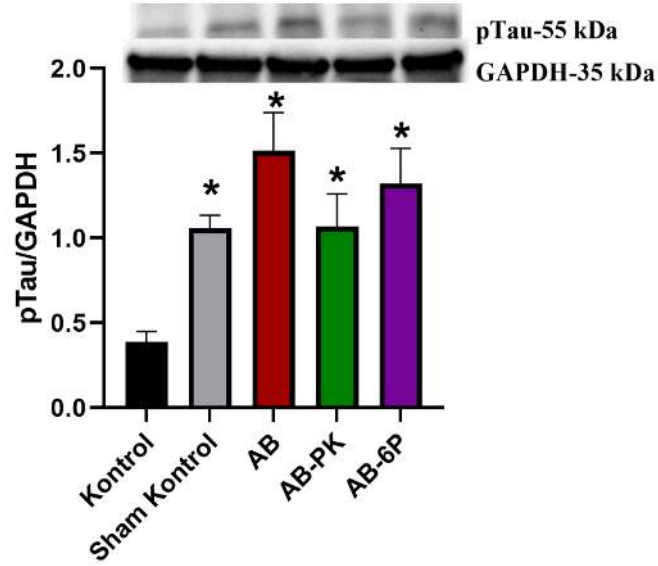
Şekil 4.20: BACE protein ekspresyonunun değişimi. * $p<0.05$ kontrole göre.

AH'nda genetik olarak yer aldığı düşünülen PSEN proteinin değişimine bakıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılığın olduğu tespit edildi ($F_{(4,14)}=8.562$ $p=0.003$) (Şekil 4.21). PSEN proteininin AH modelinin yapıldığı A β grubunda anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi ($p=0.033$). 6-Paradol tedavisinin bu ekspresyonel farklılığı A β grubuna oranla anlamlı bir şekilde düşürdüğü ve böylelikle kontrol seviyelerine taşıdığı tespit edildi ($p=0.001$).



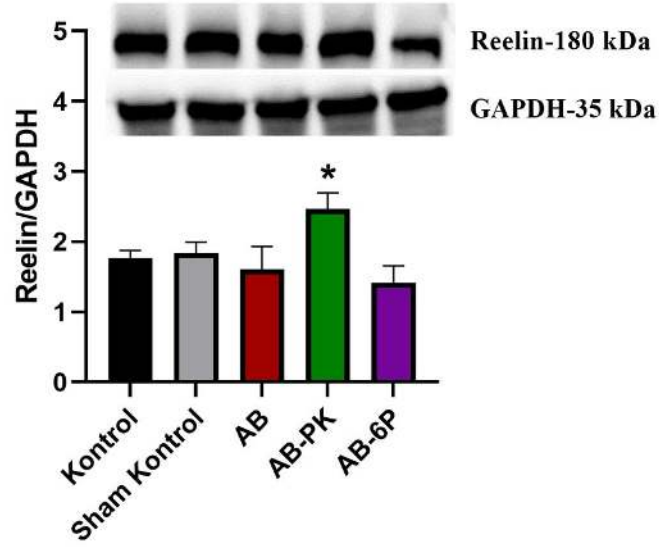
Şekil 4.21: PSEN1 protein ekspresyonunun değişimi. * $p<0.05$ kontrole göre, # $p<0.05$ sham kontrole göre

AH patolojisinde yer alan hücre iskeleti proteinlerinden olan taunun fosforilasyonunu gösteren pTau miktarındaki değişime bakıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılığın olduğu göze çarpan ($F_{(4,14)}=6.530$ $p=0.008$) (Şekil 4.22). Fosforile Tau miktarı bütün gruplarda kontrole oranla artış gösterdi. Donepezil kullanımı ile pTau miktarı A β grubuna oranla azalmış olsa da istenilen anlamlılık seviyesine ulaşmadı ($p=0.086$). 6-Paradol kullanımının fosforile tau miktarı üzerinde herhangi bir etkisi gözlenmedi.



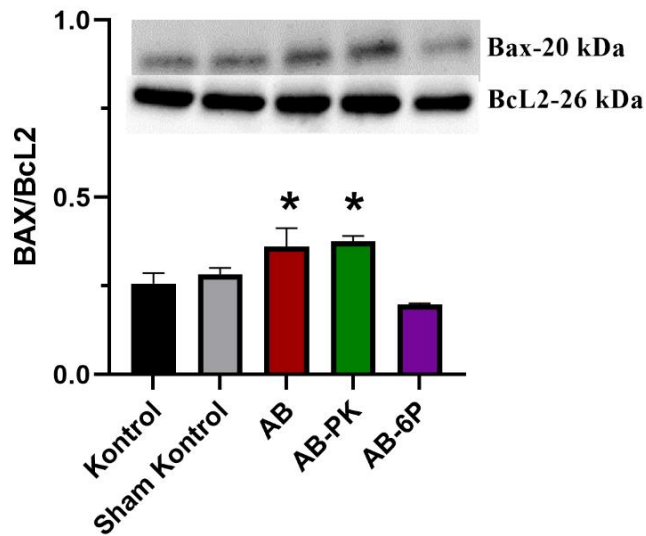
Şekil 4.22: Fosforile Tau protein ekspresyonunun değişimi. * $p<0.05$ kontrole göre,

Birçok nörolojik hastalığın patogeneğinde yer aldığı düşünülen matriks proteinlerinden Reelin proteininin ekspresyonuna bakıldığında gruplar arasında marjinal bir farklılığın olduğu tespit edildi ($F_{(4,14)}=3,106$ $p=0.066$) (Şekil 4.23). Pozitif ilaç grubunun hem kontrole hem de A β grubuna oranla reelin proteinin ekspresyonunu anlamlı derecede arttırdığı tespit edildi ($p=0.054$ ve $p=0.022$, sırasıyla)



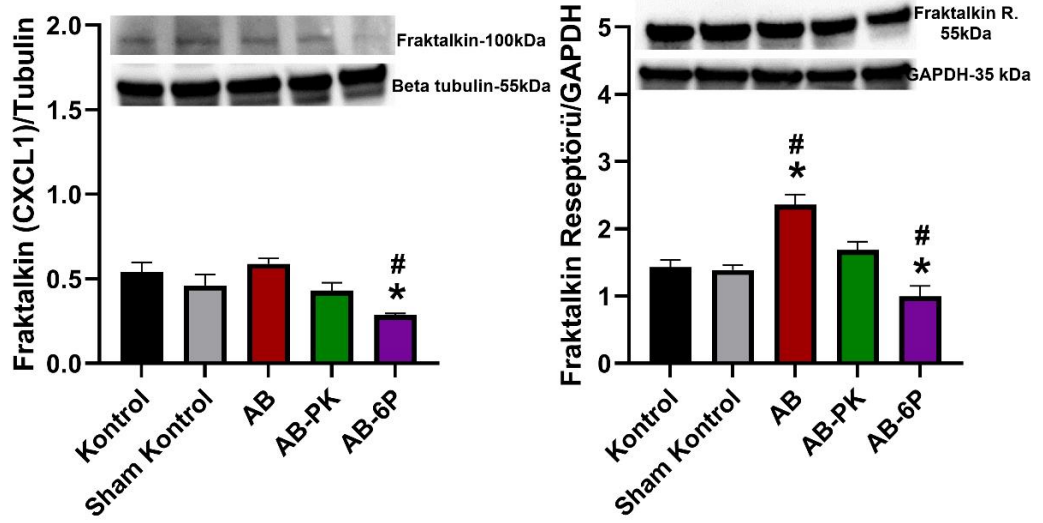
Şekil 4.23: Reelin proteinin ekspresyonunun değişimi. * p<0.05 kontrole göre.

AH patolojisindeki nöron kaybının apoptoz ilişkisini belirlemek amacıyla yapılan Bax/Bcl-2 oranının gruplar arasındaki değişimine bakıldığında anlamlı farklılıkların olduğu tespit edildi ($F_{(4,14)}=6,580$ p=0.007) (Şekil 4.24). Buna göre A β grubunda kontrole oranla apoptoz miktarında belirgin bir artış tespit edildi (p=0.031). Bunun yanı sıra pozitif ilaç grubunda da kontrole ve sham kontrole oranla apoptoz miktarında bir artış söz konusu idi (p=0.015 ve p=0.046, sırasıyla). Diğer taraftan 6-Paradol kullanımının apoptoz miktarını A β grubuna oranla anlamlı bir şekilde azalttığı gözlemlendi (p=0.003).



Şekil 4.24: Bax-Bcl2 protein oranlarının değişimi. * p<0.05 kontrole göre.

Mikroglia aktivasyonuna bağı olarak değişiklik gösteren fraktalkin ve fraktalkin reseptörü ekspresyonlarına bakıldığında ise gruplar arasında her iki proteinin ekspresyonları açısından anlamlı bir farklılığın olduğu tespit edildi. ($F_{(4,14)}=6,271$ $p=0.009$ ve $F_{(4,14)}=15,870$ $p<0.001$, sırasıyla) (Şekil 4.25). A β enjeksiyonunun fraktalkin reseptörünün ekspresyonunu hem kontrol grubuna hem de sham kontrol grubuna oranla anlamlı derecede arttırdığı ($p<0.001$), 6-Paradol tedavisinin ise hem fraktalkini hem de fraktalkin reseptör miktarını kontrole oranla anlamlı derecede azalttığı ($p=0.003$ ve $p=0.036$, sırasıyla) gözlemlendi. Aynı zamanda A β grubunda artan mikroglia aktivasyonunu paradolün anlamlı derecede azalttığı da tespit edildi ($p<0.001$).



Şekil 4.25: Fraktalkin ve fraktalkin reseptörünün protein ekspresyonlarındaki değişim * $p<0.05$ kontrole göre, # $p<0.05$ sham kontrole göre.

5.TARTIŞMA

AH'ı ön görülemez bir şekilde beynin sosyal ve yaşamsal işlevlerinin bozulması ile sonuçlanan çok ilerleyici bir inflamatuvar rahatsızlıktır. Bu hastalığın patolojik olarak değişimini veya ilerleyişini tamamen durdurmasını sağlayan kanıtlanmış bir ilaç bulunmamaktadır (2). Günümüzde AH tedavisinde genellikle gözlemlenebilir semptomları yok etmek amacı ile yapılan tedavilerle yetinilmiştir. Diğer bir deyişle günümüzde AH'nın yol açtığı inflamasyonu ve nöral hasarı ortadan kaldıracabilecek herhangi bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Bu nedenle araştırmacılar AH'ı adına hem hastalığa yol açan hem de oluşan hasarı önleyebilecek nöroprotektif çalışmalara ağırlık vermektedir (45). Bu nedenle, bu çalışmada zencefilden elde edilen 6-Paradol molekülünün sahip olduğu antiinflamatuvar ve oksidatif stres üzerindeki etkileri literatürde yapılan diğer çalışmalarda belirtildiğinden bu molekülün AH tedavisinde yeni bir aday molekül olup olamayacağının araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla A β ₁₋₄₂ beyiniçi enjeksiyonla *Long-Evans* türü sıçanlara verildikten ve AH modeli oluşturulduktan sonra 6-Paradol'un mikrogial aktivasyon üzerinden gösterdiği antiinflamatuvar etkileri araştırıldı.

İlk olarak AH modeli gerçekleştirilen sıçanlardaki davranışsal parametreler incelendi. Buna göre AH modeli oluşturduğumuz grupta hem pasif sakınmada hem de Morris su tankı öğrenme ve hafıza deneylerinde uzun süreli bellekte azalma tespit edildi. Literatüre bakıldığında hem Morris su testi hem de pasif sakınma testleri ile AH ile ilişkili başlangıç semptomlarında en çok etkilenen bilişsel süreçlerden olan hafıza kaybının tespit edildiği görülmektedir (53). Morris su labirenti deneyinde hayvanların yüzme mesafeleri ve platformu bulma süreleri göz önünde bulundurularak hipokampuse bağlı mekansal öğrenme ve hafızanın kontrol edilmesi sağlanmıştır. Sonuçlara bakıldığında A β enjeksiyonu ile yapılan Alzheimer modelindeki hayvanlarda özellikle ilk iki günde hem yüzülen mesafede hem de platforma ulaşma sürelerinde kontrole oranla bir gecikme söz konusu idi.

Pasif sakınma deneyi, hayvanların korkuya bağı öğrenme ve bellek mekanizmasını yani amigdala hipokampus arasındaki iletişimin ve bu ağın gücünü ölçmektedir. Ayrıca bu test ortaya çıkan hasarlanmaların göz ardı edilemeyecek büyüklükte nöral bozulmaları göstermektedir. Morris su tankı deneylerinde elde edilen sonuçlara benzer şekilde korkuya bağı bellek ölçümünün yapıldığı pasif sakınma testinde de Aβ grubundaki sıçanların karanlık bölmeye geçiş sürelerinin kısaldığı ve böylelikle hafızalarında bir bozulmanın tespit edildiği gözlemlendi. Öğrenme deneylerinde olduğu gibi hafıza ölçümleri için kullanılan platformsuz probe deneylerinde de platformun bulunduğu 40 cmlik alanda geçirilen sürenin Aβ grubunda kısa olduğu tespit edildi. Davranışsal düzeydeki bu bozulmalar aktif olarak kullanılan Donepezil ile düzelirken 6-Paradol kullanımının öğrenme üzerinde pozitif bir etkisinin olmadığı hafıza üzerinde ise sınırlı sayıda bir düzelme gösterdiği kaydedildi. Daha önce farelerle yapılan bir deneyde de 6-Paradol'un kısa süreli hafızanın gelişmesinde olumlu etkiler gösterdiği morris su tankı ile yapılan uzun süreli bellek testinde ise anlamlı bir etkinin olmadığı belirtilmiştir (51). Bunun yanı sıra anksiyetenin ölçüldüğü yükseltilmiş artı labirent testinde de AH modeli yapılan tüm grupların kontrol grubuna oranla anksiyetelerinde anlamlı bir artışın gözlemlendiği ve tedavinin daha önce yapılan çalışmalara paralel bir şekilde hiçbir etkisinin olmadığı tespit edildi (51).

Davranış parametrelerine paralel olarak hipokampal dokudaki hasarı incelemek amacıyla histopatolojik değerlendirmeler yapıldı. Buna göre AH'nın hücre yapısında bir takım değişiklikler yaptığı ama 6-Paradol'un histolojik olarak bir düzelmeyi sağlayamadığı tespit edildi. Tüm bunlara paralel olarak hücre sayısı incelendiğinde AH modelindeki sıçanların CA1 bölgelerindeki piramidal hücre sayılarında beklenildiği gibi anlamlı bir azalmanın gözlemlendiği tespit edildi. Hafıza üzerindeki olumlu etkisine ek olarak Donepezil verilen sıçanların hücre sayılarında Aβ verilen gruba oranla anlamlı bir artışın kaydedildiği, 6-Paradol kullanımının ise hücre sayısında artışa sebep olduğu fakat bunun tam bir iyileşme sağlayamadığı tespit edildi. Daha önce literatürde yapılan bir çalışmada 3 farklı dozda gavaj yolu ile zencefil tedavisi uygulanan AH modeli sıçanlarda hücre sayısında ve nöron organizasyonunda düzelmenin sadece yüksek doz zencefil grubunda görüldüğü orta düzey ve düşük dozda zencefil tedavisi uygulanan gruplarda ise anlamlı bir iyileşmenin görülmediği kaydedildi (55). Bu çalışmada yüksek doz zencefil kullanımının antioksidantları arttırarak ve inflamasyonu azaltarak koruyucu etkiyi sağladığı vurgulandı.

Böylelikle 6-Paradol'un hücre yaşama oranını literatürde yapılan diğer çalışmalara paralel bir şekilde arttırdığını gösterilmiştir (49).

Bunlara ek olarak mikrogial aktivasyonun gözlenmesi için GFAP boyaması yapıldı ve böylelikle reaktif astrositler ile AH'ına bağlı astrogliazis belirlenmeye çalışıldı. Amiloid beta verilen grupta GFAP pozitif hücre sayısının arttığı hatta tedavi ile birlikte bu sayıdaki artışın daha fazla olduğu kaydedildi. Bizim çalışmamızın aksine, yapılan bir çalışmada 6-Shagol'un (6-Paradol'un bir üst maddesi) AH modelinde GFAP pozitif hücre sayısını düşürerek mikrogial aktivasyonu inhibe ettiği ve böylelikle astrositlerde nöroinflamasyonu baskıladığı gösterilmiştir (55). 6-Paradol'un ile ilgili sayılı çalışmalardan biri olan Gaire ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada fare beyni üzerinde modellenen iskemide 6-Paradol molekülünün mikrogia aktivasyonunu azalttığı gösterilmiştir. Ancak histolojik analizler 6-Paradolün nöroprotektif etkilerini kanıtlar düzeydedir. Fakat bazı çalışmalarda hasardan sonra ortaya çıkan reaktif gliozisin nörorejenerasyonu sağladığına dair sonuçlar da elde edilmiştir (56,57). Bu nedenle bizim çalışmamızda da artan GFAP'ya hasarın tamir edilememesinden ya da verilen maddelerle birlikte nöronal rejenerasyonun tetiklenmesinden kaynaklanmış olabilir.

6-Paradol tedavisi ile mikrogial aktivasyonun ve aynı zamanda fraktalkin ve fraktalkin reseptöründeki azalmanın arasında bağlantının olduğu düşünülmektedir. Fraktalkin mikrogiallarda bulunan ve mikrogial hücre göçünde görevli bir kemokindir. Tek bir reseptöre bağlanır ve fraktalkin reseptörü de sadece fraktalkinin bağlanmasına izin verir (58). 6-Paradol ile birlikte artan mikrogial aktivasyonu fraktalkin ve fraktalkin reseptöründeki anlamlı azalış ile birlikte görülmektedir. Literatürde yapılan bazı çalışmalar fraktalkin ve fraktalkin reseptöründeki değişimlerin AH'nın farklı aşamalarına bağlı olarak nöroinflamasyonu, nörotoksiteyi veya sinaptik plastisiteyi farklı yollardan etkilediğini göstermektedir. Örneğin AH'nın erken evrelerinde düşen fraktalkin ve fraktalkin reseptörü seviyelerinin mikrogia aktivasyonunu tetikleyerek amiloid beta temizliğine sebep olduğu ama ilerleyen AH evrelerinde düşen fraktalkin ve fraktalkin reseptörü seviyelerinin mikrogia deregülasyonuna ve anormal nöronal eksitasyonuna bağlı nöron ölümlerine sebep olduğu gösterilmiştir (59).

Bizim çalışmamızda artan nöron ölümlerinin görülmemesi fraktalkin ve fraktalkin reseptöründeki azalışın daha çok nöronları korumak amacıyla olabileceğini düşündürmektedir. 6-Paradol'un antiapoptotik etkisini belirlemek amacıyla Bax/Bcl-2 protein miktarındaki değişim incelendiğinde, amiloid beta enjeksiyonu ile artan apoptozun 6-Paradol verilmesi ile tekrar kontrol seviyelerine gerilediği görülmüştür. Daha önce yapılan çalışmalarda da zencefilin diğer bir etken maddesi olan 6-Gingerol'un amiloid beta ile indüklenmiş nöronal hücre ölümüne karşı koruyucu etki gösterdiği kaydedilmiştir (60). Bu etkinin de daha çok zencefilin antioksidan etkisi üzerinden gerçekleştiğini öne sürülmüştür. Diğer taraftan pozitif ilaç kullanımı ile artan reelin miktarı üzerinde 6-Paradol'un herhangi bir etkisinin olmadığı görülmektedir. Reelin protein sinaptik plastisitede önemli görevleri olan bir matriks proteindir ve uzun süreli hafızanın oluşumunda görevli olan LTP'nin oluşması ve sürdürülmesi açısından önem arz etmektedir (61). Bu görevi sayesinde AH ile bozulan hafızanın semptomatik tedavisi açısından hedef bir molekül olma özelliğindedir. Fakat çalışmamızda biz 6-Paradol'un sinaptik plastisiteyi artırmak amacı ile reelin üzerinden herhangi bir etki göstermediğini gözlemledik.

Son olarak 6-Paradol'un AH belirteçleri açısından etkileri incelendiğinde ise, amiloid plak temizlenmesinde anlamlı bir etkinin görülmediği ayrıca AH'ında artan fosforile tau miktarında 6-Paradol kullanımı ile iyileşmediği kaydedildi. Bu parametrelerdeki iyileşme literatürde sadece zencefilin farklı bileşenlerinden olan Shogaol-huprine hibridlerinin kullanımı ile gözlenmiştir (62). Diğer taraftan 6-Paradol kullanımıyla birlikte pozitif kontrol grubunda da literatürde yapılan diğer zencefil ürünleri ile yapılan çalışmaların aksine BACE protein ekspresyonunda anlamlı bir artış gözlemlendi. Yapılan bir çalışmada normal düzeylerde BACE ekspresyonunun amiloid birikmesini arttırırken, yüksek düzeylerde BACE ekspresyonunun APP proteinin beta sekretaz ile kesimini arttırmasına rağmen amiloid beta oluşumunu engellediği gösterilmiştir. Bunun nedeninin APP protein kesimini farklı bir hücre alt birimine kaydırması sonucu olduğunu öne sürmüşlerdir (63). Bu durum bazı ilaçlar için tedavi stratejisi oluşturmaktadır. Diğer taraftan 6-Paradol AH tedavisindeki potansiyel ilaç etkisini amiloid beta ile artan PSEN1 miktarını azaltıp tekrar kontrol seviyelerine çekmesi ile göstermektedir. PSEN1 proteini APP'nin kesilmesinde görev alan gamma sekretaz proteindir ve amiloid beta oluşumunda yer almaktadır. PSEN genindeki mutasyonların yanı sıra PSEN ekspresyonundaki değişimlerin de AH'ına yol

açabileceğine dair çalışmalar bulunmaktadır (64). PSEN1 ekspresyonunun artmasının özellikle nöroinflamasyon üzerinden AH'ına sebep olduğuna dair yayınlar bulunmaktadır (65). Bu sonuçlar ışığında 6-Paradol'ün antiinflamatuvar etkisi üzerinden AH'ına karşı tedavi edici etki gösterebileceği düşünülmektedir.



6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada antik zamanlardan beri kullanılan zencefil bitkisinin önemli metabolitlerinden antioksidatif ve antiinflamatuvar etkiye sahip olan 6-Paradol'ün AH'ı tedavisindeki etkileri incelendi. Yapılan literatür çalışmalarında 6-Paradol molekülünün AH üzerine olan etkilerine dair in-vivo bir çalışma bulunmadığından, bu çalışmada, bu molekülün tek doz A β enjeksiyonu ile oluşturulan AH modeli üzerindeki anti-inflamatuvar ve mikrogial aktivasyon üzerindeki etkilerini incelemeyi amaçladık.

Bu bağlamda davranış deneyleri, histopatolojik incelemeler ve moleküler deneyler yapıldı. Pasif sakınma ve Morris su tankı ile yapılan davranış deneylerinde AH grubunda bulunan sıçanların öğrenme ve uzun süreli belleklerinde gerileme olduğu hatta mekânsal bellekte önemli kayıpların yaşandığı gözlemlenmiştir. Tedavi gruplarından Donepezil kullanılan grupta bir düzelme meydana gelirken, 6-Paradol kullanımının, belleğe ve öğrenmeye herhangi anlamlı bir etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca artı labirenti ile yapılan anksiyete ölçümlerinde A β grubundaki sıçanların anksiyetelerinin anlamlı bir şekilde yükseldiği ve kullandığımız tedavinin anksiyolitik bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır. Bunun dışında histopatolojik değerlendirmeler AH oluşturulan grupların nöron sayılarında anlamlı miktarda azalışın olduğuna, amiloid plakların birikmesinin yaşandığına ve hücre yapılarında anlamlı miktarda bozulmalar yaşandığına işaret etmektedir. 6-Paradol ile yapılan tedavinin herhangi bir histopatolojik düzelme sağlayamadığı ve amiloid plak birikmesi üzerinde olumlu bir etkiye sahip olmadığı gözlenmiştir. Diğer taraftan 6-Paradol'ün nöron sayılarında telafi edici bir etkisinin olduğu da kaydedilmiştir. Ayrıca AH grubunda artan reaktif astrosit seviyelerinde 6-Paradol kullanımı ile artışın daha da yükseldiği gözlemlenmiştir. Bunlar dışında yapılan protein analizlerinde AH ile birlikte artan mikrogial aktivasyonun ve apoptozun 6-Paradol kullanımı ile anlamlı olarak azaldığı kaydedilmiştir. AH'nın moleküler temellerinde bulunan PSEN protein konsantrasyon değişimine bakıldığında ise A β grubuna oranla 6-Paradol kullanımının

PSEN protein ekspresyonunu düşürdüğü fakat BACE ekspresyonunda anlamlı bir artış gösterdiği kaydedilmiştir. 6-Paradol molekülünün reelin üzerinde ise herhangi bir etkisinin bulunmadığı sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak, davranışsal olarak herhangi bir etki kaydedilmemesine rağmen moleküler ve histolojik düzeyde 6-Paradol kullanımının AH'ı üzerinde umut verici etkileri gösterilmiştir.

Gelecekte yapılacak çalışmalarda daha farklı bir dozajda ve sürede verilen 6-Paradol molekülünün AH'nın tedavisindeki etkisinin moleküler ve davranışsal sonuçları güçlendirilerek moleküler temelini daha fazla aydınlatılması planlanmaktadır. Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular bize 6-Paradol molekülünün AH için uygun bir aday molekül olabileceğini göstermektedir ancak halen ileri multidisipliner çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] **Cummings JL, Cole G.** Alzheimer Disease. *JAMA*. 2002;287(18):2335–2338. doi:10.1001/jama.287.18.2335
- [2] **Cum 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.
- [3] **Organization, W. H. Dementia.** (2019). World Health Organization; <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
- [4] **Calabrò, M., Rinaldi, C., Santoro, G., & Crisafulli, C.** (2020). The biological pathways of Alzheimer disease: a review. *AIMS neuroscience*, 8(1), 86–132. <https://doi.org/10.3934/Neuroscience.2021005>
- [5] **Calsolaro V, Edison P.** Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. *Alzheimers Dement*. 2016 Jun;12(6):719-32. doi: 10.1016/j.jalz.2016.02.010. Epub 2016 May 11. PMID: 27179961.
- [6] **Drummond E, Wisniewski T.** Alzheimer's disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*. 2017 Feb;133(2):155-175. doi: 10.1007/s00401-016-1662-x. Epub 2016 Dec 26. PMID: 28025715; PMCID: PMC5253109.
- [7] **Halawany, A.M.E., Sayed, N.S.E., Abdallah, H.M. et al.** Protective effects of gingerol on streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's disease: emphasis on inhibition of β -amyloid, COX-2, alpha-, beta - secretases and A β 1a. *Sci Rep* 7, 2902 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02961-0>
- [8] **Gaire BP, Kwon OW, Park SH, Chun KH, Kim SY, Shin DY, Choi JW.** Neuroprotective effect of 6-paradol in focal cerebral ischemia involves the attenuation of neuroinflammatory responses in activated microglia. *PLoS One*. 2015 Mar 19;10(3):e0120203. doi: 10.1371/journal.pone.0120203.
- [9] **Subedi L, Gaire BP.** Phytochemicals as regulators of microglia/macrophages activation in cerebral ischemia. *Pharmacol Res*. 2021 Mar;165:105419. doi: 10.1016/j.phrs.2021.105419

- [10] **Sapkota A, Park SJ, Choi JW.** Neuroprotective Effects of 6-Shogaol and Its Metabolite, 6-Paradol, in a Mouse Model of Multiple Sclerosis. *Biomol Ther (Seoul)*. 2019 Mar 1;27(2):152-159. doi: 10.4062/biomolther.2018.089. PMID: 30001610;
- [11] **Möller HJ, Graeber MB.** The case described by Alois Alzheimer in 1911. Historical and conceptual perspectives based on the clinical record and neurohistological sections. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 1998;248(3):111-22. doi: 10.1007/s004060050027. PMID: 9728729.
- [12] **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.
- [13] **United Nations. (n.d.). Ageing.** United Nations. Retrieved May 24, 2022, from <https://www.un.org/en/global-issues/ageing>
- [14] **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.
- [15] **Alzheimer's A,** 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*, 2016 12(4): p. 459–509. [PubMed: 27570871]
- [16] **Fox PJ, Phil C.** Alzheimer's disease: An historical overview. *Am J Alzheimers Care Related Disord*. 1986;1:18–24.
- [17] **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.
- [18] **Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, et al.** Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers. Dement*. 2011;7:280–92.
- [19] **Dubois B, Hampel H, Feldman HH, et al.** Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria. *Alzheimer's Dement*. 2016;12:292–32347.
- [20] **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.
- [21] **Perl DP.** Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med*. 2010 Jan-Feb;77(1):32-42. doi: 10.1002/msj.20157. PMID: 20101720; PMCID: PMC2918894.

- [22] **Goldgaber D, Lerman MI, McBride OW, Saffiotti U, Gajdusek DC.** Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science*. 1987 Feb 20;235(4791):877-80. doi: 10.1126/science.3810169. PMID: 3810169.
- [23] **Stockley JH, O'Neill C.** Understanding BACE1: essential protease for amyloid-beta production in Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci*. 2008 Oct;65(20):3265-89. doi: 10.1007/s00018-008-8271-3. PMID: 18695942.
- [24] **Tan J, Evin G.** B-site APP-cleaving enzyme 1 trafficking and Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurochem*. 2012 Mar;120(6):869-80. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07623.x. Epub 2012 Jan 23. PMID: 22171895.
- [25] **Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW.** Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 2010 Dec;23(4):213-27. doi: 10.1177/0891988710383571. PMID: 21045163; PMCID: PMC3044597.
- [26] **Oh ES, Savonenko AV, King JF, Fangmark Tucker SM, Rudow GL, Xu G, Borchelt DR, Troncoso JC.** Amyloid precursor protein increases cortical neuron size in transgenic mice. *Neurobiol Aging*. 2009 Aug;30(8):1238-44. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2007.12.024. Epub 2008 Mar 4. PMID: 18304698; PMCID: PMC2796369.
- [27] **Soria Lopez JA, González HM, Léger GC.** Alzheimer's disease. *Handb Clin Neurol*. 2019;167:231-255. doi: 10.1016/B978-0-12-804766-8.00013-3. PMID: 31753135.
- [28] **Yoshikai S, Sasaki H, Doh-ura K, Furuya H, Sakaki Y.** Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene. *Gene* 1990;87(2):257–263. [PubMed: 2110105]
- [29] **Goedert M, Spillantini MG.** A century of Alzheimer's disease. *Science* 2006;314(5800):777–781. [PubMed: 17082447]
- [30] **Irvine GB, El-Agnaf OM, Shankar GM, Walsh DM.** Protein aggregation in the brain: the molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Mol Med* 2008;14(7–8):451–464. [PubMed: 18368143]
- [31] **Kuhn PH, Wang H, Dislich B, Colombo A, Zeitschel U, Ellwart JW, Kremmer E, Rossner S, Lichtenthaler SF.** ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J* 2010; 29: 3020-3032.

- [32] **Yan R, Bienkowski MJ, Shuck ME, Miao H, Tory MC, Pauley AM, Brashier JR, Stratman NC, Mathews WR, Buhl AE, Carter DB, Tomaselli AG, Parodi LA, Henrikson RL, Gurney ME.** Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* 1999; 402: 533-537.
- [33] **Stockley JH, O'Neill C.** Understanding BACE1: essential protease for amyloid-beta production in Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65: 3265-3289.
- [34] **Guglielmotto M, Aragno M, Autelli R, Giliberto L, Novo E, Colom-batto S, Danni O, Parola M, Smith MA, Perry G, Tamagno E, Tabaton M.** The up-regulation of BACE1 mediated by hypoxia and ischemic injury: role of oxidative stress and HIF1alpha. *J Neurochem* 2009; 108: 1045-1056.
- [35] **Metaxas A, Kempf SJ.** Neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease: elucidation of the molecular mechanism by immunohistochemistry and tau protein phospho-proteomics. *Neural Regen Res.* 2016 Oct;11(10):1579-1581. doi: 10.4103/1673-5374.193234. PMID: 27904486; PMCID: PMC5116834.
- [36] **Brion JP.** Neurofibrillary tangles and Alzheimer's disease. *Eur Neurol.* 1998 Oct;40(3):130-40. doi: 10.1159/000007969. PMID: 9748670.
- [37] **Cai Z, Hussain MD, Yan LJ.** Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *Int J Neurosci.* 2014 May;124(5):307-21. doi: 10.3109/00207454.2013.833510. Epub 2013 Sep 12. PMID: 23930978.
- [38] **Leng F, Edison P.** Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nat Rev Neurol.* 2021 Mar;17(3):157-172. doi: 10.1038/s41582-020-00435-y. Epub 2020 Dec 14. PMID: 33318676.
- [39] **DiSabato, D. J., Quan, N. & Godbout, J. P.** Neuroinflammation: the devil is in the details. *J. Neurochem.* **139** (Suppl. 2), 136–153 (2016).
- [40] **Attwell, D. et al.** Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* 468, 232–243 (2010).
- [41] **Finneran DJ, Nash KR.** Neuroinflammation and fractalkine signaling in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation.* 2019 Feb 11;16(1):30. doi: 10.1186/s12974-019-1412-9. PMID: 30744705; PMCID: PMC6371521.

- [42] **Reitz C.** Genetic diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease: challenges and opportunities. *Expert Rev Mol Diagn.* 2015 Mar;15(3):339-48. doi: 10.1586/14737159.2015.1002469. Epub 2015 Jan 29. PMID: 25634383; PMCID: PMC4677675.
- [43] **Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H.** Alzheimer's disease. *Lancet.* 2006 Jul 29;368(9533):387-403. doi: 10.1016/S0140-6736(06)69113-7. PMID: 16876668.
- [44] **Breijyeh Z, Karaman R.** Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules.* 2020 Dec 8;25(24):5789. doi: 10.3390/molecules25245789. PMID: 33302541; PMCID: PMC7764106.
- [45] **Briggs R, Kennelly SP, O'Neill D.** Drug treatments in Alzheimer's disease. *Clin Med (Lond).* 2016 Jun;16(3):247-53. doi: 10.7861/clinmedicine.16-3-247. PMID: 27251914; PMCID: PMC5922703.
- [46] **Talebi M, İlğün S, Ebrahimi V, Talebi M, Farkhondeh T, Ebrahimi H, Samarghandian S.** Zingiber officinale ameliorates Alzheimer's disease and Cognitive Impairments: Lessons from preclinical studies. *Biomed Pharmacother.* 2021 Jan;133:111088. doi: 10.1016/j.biopha.2020.111088. Epub 2020 Dec 15. PMID: 33378982.
- [47] **K. Mahdy, N. Gouda, A. El-Fattah, N. Yassin, S. El-Shenawy, A.R. Farrag, B. Mm,** Protective effect of ginger (Zingiber officinale) on Alzheimer's disease induced in rats, *J. Neuroinfect. Dis.* 5 (2014).
- [48] **Li, S.; Li, S.; Gan, R.; Song, F.; Kuang, L.; Li, H.** Antioxidant capacities and total phenolic contents of infusions from 223 medicinal plants. *Ind. Crop. Prod.* **2013**, *51*, 289–298. [[CrossRef](#)]
- [49] **Luettig, J.; Rosenthal, R.; Lee, I.M.; Krug, S.M.; Schulzke, J.D.** The ginger component 6-shogaol prevents TNF-alpha-induced barrier loss via inhibition of PI3K/Akt and NF-kappa B signaling. *Mol. Nutr. Food Res.* **2016**, *60*, 2576–2586. [[CrossRef](#)]
- [50] **Nagendra chari KL, Manasa D, Srinivas P, Sowbhagya HB.** Enzyme-assisted extraction of bioactive compounds from ginger (Zingiber officinale Roscoe). *Food Chem.* 2013 Aug 15;139(1-4):509-14. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.01.099. Epub 2013 Feb 11. PMID: 23561138.

- [51] **Yamaguchi K , Mitsunaga T , Yamauchi K .** 6-Paradol and its glucoside improve memory disorder in mice. *Food Funct.* 2020 Nov 18;11(11):9892-9902. doi: 10.1039/d0fo01975e. PMID: 33094793.
- [52] **Lianzi He, Yuanyuan Deng, Jianmei Gao, Lingrong Zeng, Qihai Gong,** Icariside II ameliorates ibotenic acid-induced cognitive impairment and apoptotic response via modulation of MAPK pathway in rats, *Phytomedicine*, Volume 41, 2018, Pages 74-81
- [53] **Tran, T.T., M. Srivareerat, and K.A. Alkadhi,** *Chronic psychosocial stress accelerates impairment of long-term memory and late-phase long potentiation in an at-risk model of Alzheimer's disease.* *Hippocampus*, 2011. 21(7): p. 724-32.
- [54] **Zeng GF, Zhang ZY, Lu L, Xiao DQ, Zong SH, He JM.** Protective effects of ginger root extract on Alzheimer disease-induced behavioral dysfunction in rats. *Rejuvenation Res.* 2013 Apr;16(2):124-33. doi: 10.1089/rej.2012.1389
- [55] **Moon M, Kim HG, Choi JG, Oh H, Lee PK, Ha SK, Kim SY, Park Y, Huh Y, Oh MS.** 6-Shogaol, an active constituent of ginger, attenuates neuroinflammation and cognitive deficits in animal models of dementia. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Jun 20;449(1):8-13. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.04.121.
- [56] **Yang Z, Wang KK.** Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends Neurosci.* 2015 Jun;38(6):364-74. doi: 10.1016/j.tins.2015.04.003
- [57] **Triolo D, et al.** Loss of glial fibrillary acidic protein (GFAP) impairs Schwann cell proliferation and delays nerve regeneration after damage. *Journal of Cell Science.* 2006;119:3981–3993.
- [58] **Verge, G. M., Milligan, E. D., Maier, S. F., Watkins, L. R., Naeve, G. S., & Foster, A. C. (2004).** Fractalkine (CX3CL1) and fractalkine receptor (CX3CR1) distribution in spinal cord and dorsal root ganglia under basal and neuropathic pain conditions. *European Journal of Neuroscience*, 20(5), 1150–1160. doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03593.
- [59] **Chen P, Zhao W, Guo Y, Xu J, Yin M.** CX3CL1/CX3CR1 in Alzheimer's Disease: A Target for Neuroprotection. *Biomed Res Int.* 2016;2016:8090918. doi: 10.1155/2016/8090918.

- [60] **Lee C, Park GH, Kim CY, Jang JH.** [6]-Gingerol attenuates β -amyloid-induced oxidative cell death via fortifying cellular antioxidant defense system. *Food Chem Toxicol.* 2011 Jun;49(6):1261-9. doi: 10.1016/j.fct.2011.03.005.
- [61] **Weeber EJ, Beffert U, Jones C, Christian JM, Forster E, Sweatt JD, Herz J** (October 2002). "Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning". *The Journal of Biological Chemistry.* 277 (42): 39944–52. doi:10.1074/jbc.M205147200.
- [62] **F.J. Pérez-Areales, O. Di Pietro, A. Espargaró, A. Vallverdú-Queralt, C. Galdeano, I.M. Ragusa, et al.** Shogaol-huprine hybrids: Dual antioxidant and anticholinesterase agents with β -amyloid and tau anti-aggregating properties *Bioorg. Med. Chem.,* 22 (19) (2014), pp. 5298-5307, 10.1016/j.bmc.2014.07.053.
- [63] **Lee EB, Zhang B, Liu K, Greenbaum EA, Doms RW, Trojanowski JQ, Lee VM.** BACE overexpression alters the subcellular processing of APP and inhibits A β deposition in vivo. *J Cell Biol.* 2005 Jan 17;168(2):291-302. doi: 10.1083/jcb.200407070.
- [64] **Jessie Theuns, Christine Van Broeckhoven,** Transcriptional regulation of Alzheimer's disease genes: implications for susceptibility, *Human Molecular Genetics,* Volume 9, Issue 16, 1 October 2000, Pages 2383–2394, <https://doi.org/10.1093/hmg/9.16.2383>.
- [65] **Tanaka Y, Sabharwal L, Ota M, Nakagawa I, Jiang JJ, Arima Y, Ogura H, Okochi M, Ishii M, Kamimura D, Murakami M.** Presenilin 1 Regulates NF- κ B Activation via Association with Breakpoint Cluster Region and Casein Kinase II. *J Immunol.* 2018 Oct 15;201(8):2256-2263. doi: 10.4049/jimmunol.1701446.

EKLER

EK A: Etik kurul onay

EK A

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Beyza Kinsiz

Doğum Tarihi ve Yeri :

E-posta :

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans:** 2019, Üsküdar Üniversitesi, Mühendislik ve Doğabilimleri Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik
- **Yüksek Lisans:** 2022, Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlıkbilimleri Enstitüsü, Sinirbilimleri Anabilim Dalı, Sinirbilimleri Programı

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- **2017** - Üsküdar üniversitesi, Deney Hayvanları Sertifika Programı
(Başarı ile tamamlandı)
- **2018** - Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi (REMER), Staj, (Doç. Dr. Muhammed İkbal Alp hoca ile)

YÜKSEK LİSANS TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Kinsiz B., Hekimoğlu E. R., Elibol B.,** “Investigation of Neuroinflammation and Neuroprotective Effects of 6-Paradol in Amyloid Beta Infused Alzheimer’s D,sease Rat Model”, 8th International Mardin Artuklu Scientific Researches Conferance , Mardin, Türkiye, 04-06 Haziran 2022, ss 323-325