

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**ALÜMİNYUM KLORÜR (ALCL₃) İLE ALZHEİMER MODELİ
OLUŞTURULAN FARELERDE DAVRANIŞ DEĞİŞİKLİKLERİ VE
BEYİNDEKİ HİSTOPATOLOJİK DEĞİŞİKLİKLERİN
ARAŞTIRILMASI**

Derya Deniz KANAN

TIBBİ FARMAKOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI
Prof. Dr. Eda KUMCU

ADANA-2022

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**ALÜMİNYUM Klorür ($AlCl_3$) İLE ALZHEİMER MODELİ
OLUŞTURULAN FARELERDE Davranış Değişiklikleri ve
BEYİNDEKİ HİSTOPATOLOJİK DEĞİŞİKLİKLERİN
ARAŞTIRILMASI**

Derya Deniz KANAN

TIBBİ FARMAKOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI
Prof. Dr. Eda KUMCU

Bu tez Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TYL-2021-13480
nolu proje ile desteklenmiştir.

ADANA-2022

T.C. ÇUKUROVA
ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI
ETİK BEYANI

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesini okuduğumu ve anladığımı ve Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tez olarak sunduğum bu çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda bu konuda hakkımda yapılacak tüm yasal işlemleri ve aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. 28/09/2022

Derya Deniz KANAN

Kayıtlı olunan Program : Tıbbi Farmakoloji
Tezin Konusu : Alüminyum klorür ($AlCl_3$) ile Alzheimer modeli oluşturulan farelerde davranış değişiklikleri ve beyindeki histopatolojik değişikliklerin araştırılması

Tezin Türü : Yüksek Lisans : ☐ Doktora: ☐

Danışmanın Adı-Soyadı
Danışmanın İletişim Bilgileri :
Telefon
E-Posta
Öğrencinin İletişim Bilgileri
Telefon
E-Posta
Adresi

**Bu belgenin Lisansüstü eğitim tezleri savunmaya alınmadan önce öğrenci tarafından doldurulup imzalanarak Enstitü Müdürlüğüne teslim edilmesi gerekmektedir.*

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince, tüm bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, her koşulda emeğini ve sonsuz desteğini esirgemeyen sevgili danışman hocalarım Prof. Dr. Fazilet AKSU ve Prof. Dr. Eda KUMCU' ya, bu süreçte çok değerli bilgi ve tecrübelerini paylaşan tüm Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı hocalarına ve araştırma görevlilerine, doktora ve yüksek lisans öğrencilerine, Tıbbi Fizyoloji öğretim üyesi Doç. Dr. Kübra AKILLIOĞLU' na, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr. Öğr. Üyesi Ares ALİZADE' ye, her koşulda desteğini esirgemeyen arkadaşım Doç. Dr. Işıl AYDEMİR' e, SABİDAM Müdürü Arş. Gör. Çağrı AVCI başta olmak üzere tüm SABİDAM çalışanlarına, tüm eğitim hayatım boyunca desteklerini esirgemeyen sevgili aileme, annem, babam ve kardeşime, her durumda yanımda olan, desteğini eksik etmeyen hayat arkadaşım Erkan KANAN' a ve bana bu hayatta annelik gibi özel bir duyguyu yaşatan üç güzel evladına sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÖZET	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Alzheimer Hastalığı	2
2.2. Alzheimer Hastalığının Tarihçesi	3
2.3. Alzheimer Hastalığının Epidemiyolojisi	3
2.4. AH'nın Etiyolojisi.....	5
2.5. AH'nın risk faktörleri	7
2.6. AH'nın Evreleri	8
2.7. Alzheimer Hastalığının Patofizyolojisi	9
2.8. Amiloid Beta Peptid ve Amiloid Prekürsör Protein (APP)	11
2.9. Nörofibriler Yumaklar (NFY).....	12
2.10. Amiloid Beta Kaskad Hipotezi	14
2.11. Tau Hipotezi	15
2.12. Kolinerjik Hipotez	15
2.13. Alzheimer Hastalığı Deney Hayvan Modelleri.....	18
2.13.1. Alüminyum Klorür İle Geliştirilen AH Modeli	22
2.14. Davranış Testleri.....	22
2.14.1. Rota Rot Testi.....	22
2.14.2. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi	23
2.14.3. Pasif Sakınma Testi.....	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1. Gereç	25

3.1.1. Deney Hayvanları	25
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar	25
3.1.3. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	25
3.2. Yöntem	26
3.2.1. Çalışma Yeri ve Şartları	26
3.2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Yapılışı	26
3.2.3. Alzheimer Deney Hayvan Modeli	27
3.2.4. Rota Rot Testi	27
3.2.5. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi	28
3.2.6. Pasif Sakınma Düzenegi	29
3.3. Histolojik Analizler	29
3.3.1. Doku Örneklerinin Alınması ve Parafin Doku Takibi.....	29
3.3.2. Histokimyasal Boyama.....	30
3.4. İstatistiksel Analizler.....	31
4. BULGULAR.....	33
4.1. $AlCl_3$ İle Oluşturulan Alzheimer Modelinde Gözlenen Özellikler.....	33
4.2. Rota Rot Testi İle Motor Hareketlerin Değerlendirilmesi	33
4.3. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi Değerlendirilmesi	34
4.4. Pasif Sakınma Testinin Değerlendirilmesi	36
4.5. Histopatolojik Bulgular.....	38
4.5.1. Serebral Korteks Histopatolojisi	38
4.5.2. Hipokampus Histopatolojisi	40
5. TARTIŞMA	43
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	49
KAYNAKLAR	50
ÖZGEÇMİŞ	69

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 3.1. Parafin Takip Protokolü	30
Çizelge 3.2. Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü	31
Çizelge 4.1. Rota Rot Testinde deney ve kontrol grubunun Rota Rot düzeneğinde geçirdiği sürelerin (sn) karşılaştırılması	34
Çizelge 4.2. Rota Rot Testinde cinsiyetlerin karşılaştırılması	34
Çizelge 4.3. Yükseltilmiş Artı Labirent Testinde deney ve kontrol grubunun aydınlık ve karanlık kolları geçirdikleri sürenin (sn) iki günlük karşılaştırılması.....	35
Çizelge 4.4. Yükseltilmiş Artı Labirent Testinde erkek ve dişi farelerin geçirdikleri süre bakımından (sn) iki günlük karşılaştırılması	36
Çizelge 4.5. Pasif Sakınma Test Düzeneğinde deney ve kontrol grubunun geçirdiği sürelerin (sn) karşılaştırılması	37
Çizelge 4.6. Pasif Sakınma Test Düzeneğinde erkek ve dişi farelerin geçirdikleri süre bakımından (sn) karşılaştırılması	37
Çizelge 4.7. Pasif sakınma test düzeneğinde değerlendirilen diğer davranış parametrelerinin sayı olarak karşılaştırılması.....	38

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. AH ile ilgili hipotezler	10
Şekil 3.1. Rota Rot Test Düzenegi	27
Şekil 3.2. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi.....	28
Şekil 3.3. Pasif Sakınma Düzenegi.....	29
Şekil 4.1. Kontrol grubu dişi farelerin beyin dokusuna ait histolojik görüntüleri.....	39
Şekil 4.2. Kontrol grubu erkek farelerin beyin dokusuna ait histolojik görüntüleri.....	39
Şekil 4.3. Alzheimer grubu dişi farelerin beyin dokusuna ait histolojik görüntüleri	40
Şekil 4.4. Alzheimer grubu erkek farelerin beyin dokusuna ait histolojik görüntüleri. .	40
Şekil 4.5. Kontrol grubu dişi farelerin beyinde hippocampus bölgesine ait histolojik görüntüleri	41
Şekil 4.6. Kontrol grubu erkek farelerin beyinde hippocampus bölgesine ait histolojik görüntüleri	41
Şekil 4.7. Alzheimer grubu dişi farelerin beyinde hippocampus bölgesine ait histolojik görüntüleri	42
Şekil 4.8. Alzheimer grubu erkek farelerin beyinde hippocampus bölgesine ait histolojik görüntüleri	42

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AH	Alzheimer Hastalığı
AlCl ₃	Alüminyum klorür, Alimunyum klorid
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amiloid prekürsör protein
A β	Amiloid Beta
BDNF	Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
CaMKII	Kalmodulin-bağımlı protein kinaz II
ChAT	Kolin asetil transferaz
ϵ 4	ApoE epsilon 4
GSH	Glutasyon
IFN- γ	İnterferon gama
NFY	Nörofibriler Yumak
NGF	Sinir büyüme faktörü
PKA	Protein kinaz A
PP-2A	Protein fosfataz 2A
PS1	Presenilin 1
PS2	Presenilin 2
STZ	Streptozotosin

ÖZET

Alüminyum Klorür ($AlCl_3$) İle Alzheimer Modeli Oluşturulan Farelerde Davranış Değişiklikleri Ve Beyindeki Histopatolojik Değişikliklerin Araştırılması

Alzheimer hastalığı (AH) ilerleyici nörodejeneratif bir hastalık olup demansın en sık görülen nedenidir. Beta amiloid plak ve nörofibriler yumakların birikimi ile karakterize olan hastalığın patofizyolojisinin aydınlatılması, hastalığın önlenmesi ve tedavisi için oldukça önemlidir. Bu amaçla uzun süreli alüminyum klorür alımı ile oluşturulan deneysel Alzheimer modelinde, davranış değişiklikleri ve beyinde oluşan histopatolojik değişiklikler araştırılmıştır.

Çalışmada alüminyum klorür alan erkek ve dişi fareler deney grubunu, sadece musluk suyunu alan erkek ve dişi fareler kontrol grubunu oluşturmuştur. Doksan günlük alüminyum klorür alımı sonrası, farelere motor koordinasyonlarını değerlendirebilmek için rota rot; keşif, anksiyete, uzamsal öğrenme ve belleği değerlendirebilmek için yükseltilmiş artı labirent; emosyonel öğrenme ve bellek tayini için pasif sakınma testleri gerçekleştirilmiştir. Testler bittikten sonra fareler, kurban edildikleri beyinleri hızlı bir şekilde formaldehite konulmuştur.

Deney sonuçlarında rota rot testinde hem gruplar arası hem de cinsiyetler arası fark bulunamamıştır. Yükseltilmiş artı labirent testinde açık kolda geçirilen sürenin azalması ve kapalı kolda geçirilen sürenin artması istatistik açısından kontrol grubunda anlamlı bulunmuştur. Bu sonuç deney grubunda kaygı düzeylerinin düştüğünü, aynı zamanda öğrenme ve hafızasının bozulduğunu göstermektedir. Cinsiyetler arası farka bakıldığında dişi farelerin kaygı düzeylerinin erkek farelerden daha fazla olduğu bulunmuştur. Pasif sakınma testinde deney grubunda uzun süreli belleğin bozulmadığı görülmüştür. Bunun sebebinin verilen alüminyum miktarının uzun süreli belleği bozabilecek kadar toksik düzeye ulaşmadığı düşünülmüştür. Yapılan beyin histopatolojik incelemelerde deney grubunda hem serebral korteks hem de hipokampus CA1 bölgesinde nöron kaybı gözlenirken, piknotik çekirdekli hücrelerde artış saptanmıştır. Ayrıca hipokampusta bazofilik çekirdekli nöronlar belirgin olarak nörofibriler yumaklar görülmüştür. Sonuç olarak bu çalışmada alüminyum klorürlü su içirilerek deneysel Alzheimer modeli oluşturulmuştur ve beyin histopatolojik incelemelerinde bu durum ortaya konulmuştur. Bu model sonucunda motor koordinasyon bozulmamış, davranış değişiklikleri olmuş, kaygı düzeyleri azalmış, öğrenme ve kısa süreli hafızaları bozulmuştur. Uzun süreli hafızalarının bozulmadığı gözlenmesine rağmen, ilerleyen süreçlerde nasıl değişeceği konusunda yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Alzheimer Hastalığı; Alüminyum klorür; Öğrenme; Bellek; Davranış

ABSTRACT

Investigation of Behavioral Changes and Histopathological Changes in the Brain in Alzheimer's Modeled Mice with Aluminum Chloride (AlCl₃)

Alzheimer's Disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease and is the most common cause of dementia. Clarifying the pathophysiology of the disease, which is characterized by the accumulation of beta amyloid plaque and neurofibrillary tangles, is very important for the prevention and treatment of the disease. For this purpose, behavioral changes and histopathological changes in the brain were investigated in the experimental Alzheimer's model created with long-term aluminum chloride intake.

In the study, male and female mice receiving aluminum chloride formed the experimental group, and male and female mice receiving only tap water formed the control group. After ninety days of aluminum chloride intake, rota rot was used to evaluate the motor coordination of the mice; elevated plus maze to assess exploration, anxiety, spatial learning, and memory; passive avoidance tests were performed for emotional learning and memory determination. After the tests were finished, the mice were sacrificed and their brains were quickly placed in formaldehyde.

In the experiment results, no difference was found between the groups and the genders in the rota-rot test. In the elevated plus maze test, the decrease in the time spent in the open arm and the increase in the time spent in the closed arm were statistically significant in the control group. This result shows that the anxiety levels in the experimental group decreased, and learning and memory were impaired at the same time. Looking at the difference between the sexes, it was found that the anxiety levels of female mice were higher than male mice. In the passive avoidance test, long-term memory was not impaired in the experimental group. It was thought that the reason for this was that the amount of aluminum given did not reach such a toxic level that it could impair long-term memory. In the histopathological examinations of the brain, neuron loss was observed in both the cerebral cortex and hippocampus CA1 regions in the experimental group, while an increase in pycnotic nucleated cells was observed. Neurofibrillary tangles were also observed in the hippocampus, with neurons with basophilic nuclei prominently. As a result, in this study, an experimental Alzheimer's model was created by drinking aluminum chloride water and this situation was revealed in the histopathological examinations of the brain. As a result of this model, motor coordination remained intact, behavioral changes occurred, anxiety levels decreased, learning and short-term memory were impaired. Although it is observed that their long-term memory is not impaired, new studies are needed on how it will change in the future.

Key words: Alzheimer's Disease; Aluminum chloride; Learning; Memory; Behaviour

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Demans, yaşlı nüfusun hızla arttığı ülkelerde önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Nörodejeneratif bir hastalık olan Alzheimer en yaygın demans nedenidir. Dünya Alzheimer Raporu verilerine göre günümüzde dünyada Alzheimer hastalığına sahip kişi sayısı 35,6 milyon iken, bu sayının 2030'da 65,7 milyon ve 2050'de ise 115,4 milyon olması beklenmektedir [Alzheimer's Disease International World Alzheimer Report (1)]. Alzheimer hastalığı geleceğin en büyük halk sağlığı sorunu olacaktır.

İlerleyici ve geri dönüşümü olmayan Alzheimer Hastalığına; bellek kaybı, kognitif işlevlerde azalma, günlük yaşamsal aktivitelerinde, konuşma ve uzaysal algılamada bozukluklar eşlik eder [Sonkusare et al. (2)]. Hastalığın en önemli patolojik bulguları, nörofibriler yumak (NFY) ve Amiloid beta (A β) plak oluşumudur [Haass and Selkoe (3)]. Buna ek olarak oksidatif stres [Chong et al. (4), Pratico (5)], inflamasyon [Salminen et al. (6)] ve glutamat eksitotoksitesi [Hynd et al. (7)] gibi faktörlerin de bu nörodejenerasyonu geliştirdiği düşünülmektedir. Her ne kadar ortaya çeşitli teoriler atılsa da hastalığın patofizyolojisi halen tamamen aydınlatılamamıştır ve yeni tedavi arayışları devam etmektedir.

Kronik hastalıkların sağlık sistemi ve topluma yükü oldukça büyüktür. Hızla yaşlanan nüfus özelliği sebebi ile ülkemizin, dünyada en fazla Alzheimer hastalığının görüldüğü ülkeler arasına katılacağı düşünülmektedir. Alzheimer hastalığının yaşam kalitesi, kişinin kendisi ve ailesi, sağlık sistemi açısından getirdiği yük değerlendirildiğinde, bu hastalığın patofizyolojisinin aydınlatılması bu nedenle çok önemlidir.

Bu çalışmada Alzheimer deneysel modeli oluşturularak, davranış değişikliklerinin ve beyindeki histopatolojik değişimlerin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı (AH), demansın en yaygın nedenidir ve demans olgularının % 75'ini oluşturmaktadır [Qiu et al. (8)]. Hastalık ilk olarak 1910 yılında Emil Kraepelin tarafından, 1906'da 51 yaşındaki bir kadında demansın klinik özelliklerini ve patolojik belirtilerini tanımlayan Alman psikiyatr Alois Alzheimer'dan sonra adlandırılmıştır. AH, 65 yaşından önce başlayan, semptomları olan bireyleri etkileyen, bunamanın bir presenil formu olarak kabul edilmiştir. Ancak 20. yüzyılın ortaları, presenil AH'nın aynı klinik, patolojik, ultrastrüktürel ve biyokimyasal özelliklerinin daha yaygın "senil" demansı olanlar tarafından da paylaşıldığı anlayışını getirmiştir. Hastalık duyarlılığı her ne kadar çeşitli genetik risk faktörleriyle ilgili olsa da, sporadiktir. AH, nadiren özellikle genç kişilerde otozomal dominant kalıtım modeline sahiptir. Geçmişe bakıldığında, değerlendirmesinden yaklaşık 100 yıl sonra Alois Alzheimer'ın ilk tanımlanan vakasının DNA'sının analizi, durumunun bu otozomal dominant genlerden biri olan presenil 1'in altıncı ekzonundaki bir mutasyondan (F176L) kaynaklandığını ortaya çıkarmıştır [Louis et al. (9)].

Alzheimer hastalığı, vasküler ve nöronal disfonksiyon ve bilişsel gerileme ile karakterize nörodejeneratif bir hastalıktır [Matura et al. (10), Tramutola et al. (11)]. Genellikle entellektüel ve sosyal fonksiyonların ilerleyici kötüleşmeleri, hafıza kaybı ve bilişsel bozulmalarla karakterize AH, amiloid beta oligomerlerinin nörotoksik etkisiyle kendini gösterir. Alzheimer Hastalığının kesin tedavisi ve hatta önlenmesi için patofizyolojisinin aydınlatılması önemlidir. AH'nin patofizyolojisi genetik mutasyonlar, amiloid β yükü, tau hiperfosforilasyonu, artmış oksidatif stres, nöroinflamasyon, nöroplastisite yetmezliği, nöronal kayıp ve sinaptik dejenerasyon gibi farklı mekanizmalarla ilişkilidir [Matura et al. (10), Tramutola et al. (11), Heneka et al. (12), Mesulam (13)].

AH'nı ilk aşamalarda teşhis etmek genellikle zordur çünkü hastalık genellikle yavaş ve aşamalı olarak ilerler [Çınar (14)]. AH, bireyin günlük yaşamsal aktivitelerini olumsuz yönde etkiler, bilişsel ve davranışsal bozukluklar ortaya çıkar. AH, hastalığın başladığı dönem baz alınarak 4 evreye ayrılabilir; çok erken (başlangıç), erken (1-2 yıl),

orta (2-5 yıl) ve ileri (5 yıl ve daha fazla) evre [Lazariciu (15), Acosta and Wortmann (16)].

Beyin boyutunda ve ağırlığında bir dereceye kadar küçülme yani atrofi, ilerleyen yaşın kaçınılmaz bir eşlikçisi olup, bu değişiklikler tek başına nispeten hafif klinik öneme sahiptir. Buna karşılık, birkaç yıl içinde gelişen ciddi derecelerde yaygın serebral atrofi demans ile ilişkilidir ve bu vakalarda altta yatan patolojik değişikliklerin çoğu zaman Alzheimer hastalığına ait olduğu kanıtlanmıştır. Özellikle hipokampus ve temporal lobların medial kısımlarındaki serebral atrofi oranı, AH'nin erken evrelerinde hızlanır. Bununla birlikte, AH'nin patolojik belirteçleri olan plak ve yumakların birikiminde yaşla birlikte sürekli bir artış yoktur.

2.2. Alzheimer Hastalığının Tarihçesi

Frankfurt'ta doktorluk yapan Alois Alzheimer, 51 yaşındaki kadın hastasında sanrılar, paranoya, işitsel halüsinasyonlar, konuşma ve kavramada bozukluk ve agresif davranışlar gözlemiştir. Hastasının vefatı sonrasında otopsi yapmış ve beyinde aterosklerotik değişiklikler, senil plaklar ve nörofibriler yumaklar bulunduğunu görmüş ve bunu 1907 yılında yayına dökmüştür. İlk bulguların yayınlanmasından sonra klinik şefi Dr. Emil Kraepelin hastalığa "Alzheimer" adını vermiştir.

AH'nin, ölümcül önemli bir hastalık olduğunun anlaşılması yaklaşık olarak 70 sene sürmüştür [Alzheimer's Association (17), Katzman (18)]. AH'nin sınıflandırılması belirli genlerin bulunmasına göre ailesel ve sporadik olarak veya hastalığın başladığı yaşa göre erken ve geç başlangıçlı olarak yapılabilir. Günümüzde AH'na sahip bireylerin büyük kısmı sporadik ve geç başlangıçlıdır [Talwar et al. (19)].

2.3. Alzheimer Hastalığının Epidemiyolojisi

AH, yaşlanmanın kronik bir hastalığıdır ve yaşla birlikte hastalığın hem görülme sıklığı hem de prevalansı artmaktadır [Alzheimer's Disease International World Alzheimer Report (1)]. Prevalans tahminleri, 65 yaşından küçük kişilerin %1'den azının klinik olarak etkilendiğini, ancak yaklaşık %5'inin 65-75 yaşlarında, yaklaşık %20'sinin 75-85 yaşlarında ve muhtemelen %50'den fazlasının 85 yaş ve üstünde etkilendiğini

ortaya koymaktadır. Yaşla birlikte artan prevalans, yaşa özgü insidansın veya belirli bir zaman diliminde ortaya çıkan yeni vakaların sayısının, 65 yaşından önce yılda %1'den daha azken, 85 yaş ve üstü yaşlı bireylerde yılda yaklaşık % 6'ya yükselmesinden kaynaklanmaktadır. Semptomların ilk fark edilmesinden ölüme kadar ortalama süresi tipik olarak 10-20 yıl veya daha fazladır [Alzheimer's Disease International World Alzheimer Report (1)].

Son dönemlerde yapılan çalışmalara göre Dünyada 2010 yılında yaklaşık 35,6 milyon demans hastası saptandığı, 2030 yılında bu sayının 65,7 milyona, 2050 yılında ise 115,4 milyona çıkacağı düşünülmektedir [Eroymak ve Yiğit (20)]. Yine 2018 yılında yapılan başka bir çalışmada, dünya genelinde yaklaşık 50 milyon insanın demanslı olduğu ve her 3 saniyede yeni demanslı vakaların raporlandığı bildirilmiştir [Çelebi (21)]. Ayrıca düşük ve orta gelirli ülkelerde hastalığın görülme oranının %58 olduğu ve 2050 yılında bu oranın %71'e yükselmesinin öngörüldüğü bildirilmiştir [Acosta and Wortmann (16)]. Bunun sonucunda AH'nin de 2050 yılına kadar 100 milyon insanı doğrudan etkileyeceği ve dünya çapında bir halk sağlığı sorunu haline geleceği tahmin edilmektedir [Eroymak ve Yiğit (20)]. Hastalığın dünyaca bu denli yaygınlaşması dünya nüfusunun yaşlanmasına paraleldir. Dünyadaki yaşlı nüfus artışına paralel olarak Türkiye'de de yaşlı nüfusun oranı artmaktadır. Türkiye'de 2015 yılında yapılan bir araştırmaya göre Alzheimer hastalığının prevalansı % 6,4 olarak bulunmuştur [Ertekin ve ark. (22)]. Prevalans hızla artarken dünyada birçok ülke hastalığın ilerlemesini durdurmak, hastalıkla mücadele etmek, hastalığa yakalanma riskini azaltmak, hastalara yeterli bakım ve tedavi sağlamak için kendi kültürlerine uygun olarak ulusal planlar önermeye başlamıştır [Rosow et al. (23)].

AH'nin ekonomik maliyetinin sağlık sistemi içindeki payının büyük olmasının sebepleri, hastalığın önlenmesi, tanı konulması, tedavi edilmesi ve hastalığın yönetilmesi için kullanılan kaynakların fazla olmasıdır [Castro et al. (24)]. Öyle ki, 2010 yılı itibarıyla hastalığın maliyeti 604 milyar dolar olduğu tahmin edilirken, ilerleyen yıllarda bu maliyetin daha hızlı artacağı düşünülmektedir [World Alzheimer Report (25)]. Öte yandan hastalık ilerledikçe bakım masrafları artmakta ve hastalıkla ilgili mali zorluklar beraberinde gelmektedir [Wimo et al. (26), Alzheimer's Association (27)]. Bunun sonucunda sağlık hizmetlerinde kaynak kullanımı artmaktadır [Winblad et

al. (28)]. Bu nedenle AH ile ilgili sağlık hizmeti kullanımının maliyetlerinin değerlendirilmesinin çok önemli olduğu belirtilmektedir [Winblad and Wimo (29)].

Çevresel ve genetik faktörlerin, hastalığın oluşmasında rol oynadığı tahmin edilmektedir. İlerleyen yaşlarda görülen depresyon AH ile ilişkilidir, depresif semptomların genellikle bu demans bozukluğunun erken belirtileri olması muhtemeldir. Travmatik kafa travması, artan demans riski ile ilişkilendirilmiştir ancak travmanın diğer demanslara kıyasla AH'nın kendisi için bir risk olduğu açık değildir. Benzer şekilde, diyabet ve kardiyovasküler ve serebrovasküler bozukluklar, artan risk ile ilişkilendirilmiştir ancak bunlar AH'da gerçek bir artıştan ziyade beyindeki ek iskemik hasara bağlı olabilir.

Düşük eğitim düzeyinin AH'nın gelişimi için bir risk faktörü olup olmadığı veya bilişsel olarak zorlayıcı mesleklerin veya yüksek zeknın bunamaya karşı koruma sağlayıp sağlamadığı hala tartışılmaktadır. Bununla birlikte kalışsal entelektüel donanımın önemli olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur.

Son yıllarda AH risk faktörlerinin ortaya konması üzerinde yapılan çalışmalar artmıştır. Bu risk faktörlerinden birisi de alüminyum nrotoksitesidir. Alüminyum gibi bazı metallerin AH ile ilişkili olduğuna dair bulgular vardır [Karaman (30), Terry et al. (31), Yamada (32), Launer (33)]. Deney hayvanlarına alüminyum uygulanması Alzheimer hastalığında görülen belirtilere yol açmaktadır [Struys-Ponsar et al. (34), Obulesu and Rao (35)].

2.4. AH'nın Etiyolojisi

AH'nin en yaygın şeklinin sporadik olduğu bilinmesine rağmen, AH'nın ailesel oluşumu da iyi bilinmektedir. Bu tür vakaların % 1'inden daha azında, yüksek derecede penetrasyon ve hastalığın daha genç yaşta ortaya çıkması ile baskın bir kalıtım paterni vardır [Nee et al. (36), Goudsmit et al. (37)]. Spesifik bir kalıtım modeli olmaksızın önemli ailesel demans kümelenmelerinin raporları da birden fazla genetik faktörün alıřtđđını düşündürmektedir. Birçok alışma, bu bozukluğu olan hastaların birinci derece akrabaları arasında görünüşte sporadik AH riskinde bir artış olduğunu bildirmiştir. Bu risk kadınlarda orantısız olarak daha fazladır ve bu da genel olarak

kadınların AH için biraz daha yüksek risk altında olduğunu göstermektedir [Silverman et al. (38)].

AH'nin meydana gelmesinde yaşı önemli bir risk faktörü olduğu ve özellikle 65 yaşından sonra hastalığın görülme sıklığının her beş yılda bir iki katına çıktığını bildiren çalışmalar mevcuttur [Goudsmit et al. (37), Silverman et al. (38), Gao et al. (39)]. Yaş dışında, AH'nin oluşmasında bir başka önemli faktör genetik yatkınlıktır. Birinci derece AH'li akrabaları olan bireylerde hastalık riskinin arttığı gözlenmiştir [Wang and Ding (40), Williamson et al. (41)].

AH ile ilişkisi olduğu düşünülen genler şunlardır: Amiloid prekürsör protein (APP), Presenilin 1 (PS1), Presenilin 2 (PS2), Apolipoprotein E (ApoE). APP, PS1 ve PS2 genlerinde meydana gelen mutasyonların, AH'li olguların % 5'ni oluşturan erken başlangıçlı Alzheimer oluşumuna neden olduğu, ApoE epsilon 4 (ε4) alelinin ise AH riskini artırdığı bildirilmiştir [Wang and Ding (40)].

AH' de, birinci kromozomda yer alan PS2 ve 21. kromozomda yer alan APP genleri mutasyona uğradığında amiloid beta (Aβ) peptid seviyeleri artmaktadır, ek olarak 14. kromozomda yer alan PS1 geninde mutasyon meydana geldiğinde AH ortaya çıkmaktadır [Ertekin (42)]. PS1 geninde oluşan mutasyonlar, APP'nin kusurlu bölünmesine neden olur ve sonuçta toksik Aβ üretilir. Aynı zamanda PS1 geninde oluşan mutasyonlar tau proteinlerinin hiperfosforilasyonlarına neden olur ve nörofibril yumak (NFY) oluşumu tetiklenir [Maccioni et al. (43)]. Erken başlangıçlı ailesel AH'nin % 70-80'inin PS1 geni mutasyonuna, % 20'sinin PS2 geni mutasyonuna ve % 2-3'ünün de APP geni mutasyonuna bağlı olarak ortaya çıktığı bildirilmiştir [Gilman (44), Edelberg and Wei (45)]. PS1 ve PS2 genlerinde 160'tan fazla mutasyon tanımlanmıştır.

On dokuzuncu kromozomda bulunan ApoE geninin geç başlangıçlı AH'nin oluşumunda rol oynadığı bildirilmiştir [Ertekin (42)]. Yapılan çalışmalar geç başlangıçlı AH'nin yaklaşık % 50-80'inin ApoE geninde oluşan mutasyonlardan dolayı meydana geldiğini göstermiştir [Edelberg and Wei (45)]. ApoE geninin ε2 alelinin AH riskini azalttığı, ε4 alelinin AH riskini artırdığı bildirilmiştir. ApoE ε4 alelinin amiloid plak ve NFY oluşumuna sebep olduğu gösterilmiştir [Kok et al. (46)]. ApoE ε4'ün nöronlarda aşırı üretimi, normal potasyum kanallarının aktivitesini baskıladı ve böylece AH'nin

patogeneziyle ilişkili nöronal hasarlardan sorumlu olduğu düşünülmektedir [Turkseven (47)].

Transgenik hayvan modelleriyle yapılan çalışmalarda, γ -sekretaz aktivitesinde azalmanın, tau hiperfosforilasyonuna yol açtığı bildirilmiştir [Doglio et al. (48)]. Yapılan çalışmalarda, ailesel AH olgularının temelinde amiloid kaskadı hipotezinin yer aldığı, amiloid β 42'deki artışın NFY oluşumu ve nöron dejenerasyonu, dolayısıyla tüm Alzheimer olgularından sorumlu olduğu düşünülmüştür [Turkseven (47)].

2.5. AH'nın risk faktörleri

AH'nı başlatan etiyolojik neden/ nedenler konusunda, çeşitli görüşler öne sürülmesine rağmen en önemli risk faktörleri yaş, ailede AH öyküsü ve genetik faktörler olduğu bilinmektedir. Etiyolojide, enfeksiyonlar, genetik bozukluklar, toksik ve otoimmün nedenler ile nöronal transmisyonunda gözlenen biyokimyasal bozukluklar sorumlu tutulmaktadır [Mozar et al. (49), Amaducci et al. (50), Haupt et al. (51)]. Ancak hastalıkta rol oynayan çevresel risk faktörleri arasında en güçlü kanıtlar ilerlemiş yaş için mevcuttur. AH'nin 60 yaş öncesi görülme sıklığı nadirken, 85 ve üzeri yaşlarda bu oran %50'ye yükselir. AH riski her beş yılda bir 65 yaş öncesi beş kat, 75 yaş öncesi üç kat ve 85 yaş öncesi 1,5 kat artar [Gao et al. (52)]. Özellikle birinci derece akrabalarda AH'lığına sahip bireylerin olması AH riskini önemli derecede artırmaktadır. AH vakalarının anamnezlerinde yarısından fazlasında aile öyküsüne rastlanmaktadır ve yine vakaların yarısında otozomal dominant geçişin olduğu gözlenmiştir [Winblad et al. (28), Winblad and Wimo (29)]. Haupt ve arkadaşları yaptıkları araştırmada otozomal geçişin % 10 olduğunu bildirmişlerdir [Haupt et al. (53)].

AH'ye erkeklere nazaran kadınlarda daha fazla rastlanmaktadır. Eğitim durumları ile AH arasındaki ilişkiye bakıldığında, düşük eğitim seviyesine sahip olan bireylerde AH görülme insidansı, daha yüksek eğitim seviyesine sahip olanlara kıyasla 1,5 kat fazla bulunmuştur [Ganguli et al. (54)].

Ayrıca yaşlılık, uzun süreli alkol kullanımı [Tyas (55)], posterior kortikal atrofi [Carrasquillo et al. (56)], kanda yüksek homosistein düzeyi [Nazef et al. (57)], hipertansiyon ve inflamasyon [Nelson et al. (58)], Down sendromu [Mok et al. (59)],

Wilcock and Griffin (60), Cárdenas et al. (61)], östrojen eksikliği ve menapoz [Jamshed et al. (62), Kunzler et al. (63), Xing et al. (64)], diyabet [El Khoury et al. (65)], serumda pestisit düzeyinin yükselmesi [Richardson et al. (66)], arteroskleroz, felç, geçici iskemik ataklar, kalp hastalığı, hiperlipidemi, metabolik sendrom, obezite ve diyabet [Grammas (67)], gibi çok sayıda minör risk faktörü de genetik etkenlerle birlikte hem vasküler demans ve hem de AH'na yakalanma oranına katkıda bulunmaktadır.

AH patofizyolojisinin anlaşılması için yapılan patolojik analizlerde senil plaklar ve bunların ortasında alüminyum birikimlerine rastlanması en önemli bulgu olarak değerlendirilmektedir. Alüminyumun etiyojideki rolü kanıtlanamasa da patogeneizde melaminin de önemli rol oynadığı düşünülmektedir [Wisniewski et al. (68), Shoji et al. (69)]. Hastalığın patogenezinin aydınlatmak için yapılan çalışmalarda, AH'na bir virüs ya da prion benzeri etkenlerin yol açabileceği de düşünülmüştür. Ancak genetik geçişin daha sık olduğu ve bu hastalarda 14. kromozomun bir bölgesinde mutasyon gerçekleştiği gözlenmiştir. İleri yaşlarda başlayan AH olgularında Beta amiloidi bağlayan apolipoprotein E'nin genotipik varyasyonunun rol oynadığı düşünülmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar ağırlıklı olarak otoimmün sebepler üzerinde durmaktadır. AH olgularında immün sistem yanıtları, serum oto-antikorları ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır [Fillit et al. (70), Mullan (71)].

Szekely ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmanın sonucuna göre; sebze, meyve, balık ve doymamış yağ içeren Akdeniz diyeti, C ve E vitamini, selenyum, nonsteroidal antiinflatuar ilaç kullanımı, östrojen kullanımı, egzersiz ve bilişsel aktivitelerin AH riskini azalttığı bildirilmiştir [Szekely et al. (72)].

2.6. AH'nın Evreleri

AH'nda en önemli bulgu bellek bozukluğu yani unutkanlıktır. Hastalığın klinik seyri üç evrede incelenmektedir. Başlangıçta hastanın unutkanlığı isim ve adresleri unutma şeklindedir. Kognitif bozukluğu tespit edebilmek için ayrıntılı nöropsikolojik testler yapılır [Daksat (73), Özeren ve ark. (74)]. İkinci dönem konfüzyonel evre olup, geçmişe yönelik bellek korunurken yakın bellek yitimi belirgindir. Bu dönemde topografik bellek bozukluğu sebebiyle hastanın günlük aktivitesini gerçekleştiremediği görülür. Üçüncü dönem demansif dönem olup, kognitif bozukluk jeneralize hal alır.

Bellek yıkımı, oryantasyon bozukluğu ve üst kortikal işlevlerde önemli eksiklikler (afazi, apraksi, agnozi, akalkuli, aleksi, vb) görülür. Hastanın sosyal ve günlük yaşamıyla ilgili tüm işlevlerinde kayıplar ortaya çıkar. Hastalığın ilerleyen dönemlerinde hezeyanlar, halüsinasyonlar ve agresif davranışlar ortaya çıkar. Olguların yaklaşık yarısında psikiyatrik bulgular görülür. Hastalığın erken dönemlerinde depresyon sıklıkla görülür [Özeren ve ark. (74), Mc. Khann et al. (75), Kukull et al. (76)].

Hastalığın erken dönemlerinde anksiyete ve depresyona bağlı kognitif bozukluk ile demansa bağlı kognitif bozukluk karıştırılabilir. Ancak burada ayırt edici faktör demanslı hastaların kognitif alandaki yetersizliklerinin farkında olmamasıdır.

AH her ne kadar yaşlılıkta ortaya çıkmakta ise de, kırklı yaşlarda da başlayabilir. Çoğu zaman erken olgularda tanı gecikir. Erken başlangıç gösteren olgularda çoğunlukla konuşma ve dil fonksiyonları ile vizüo-spasyal yetenekler bozulur.

2.7. Alzheimer Hastalığının Patofizyolojisi

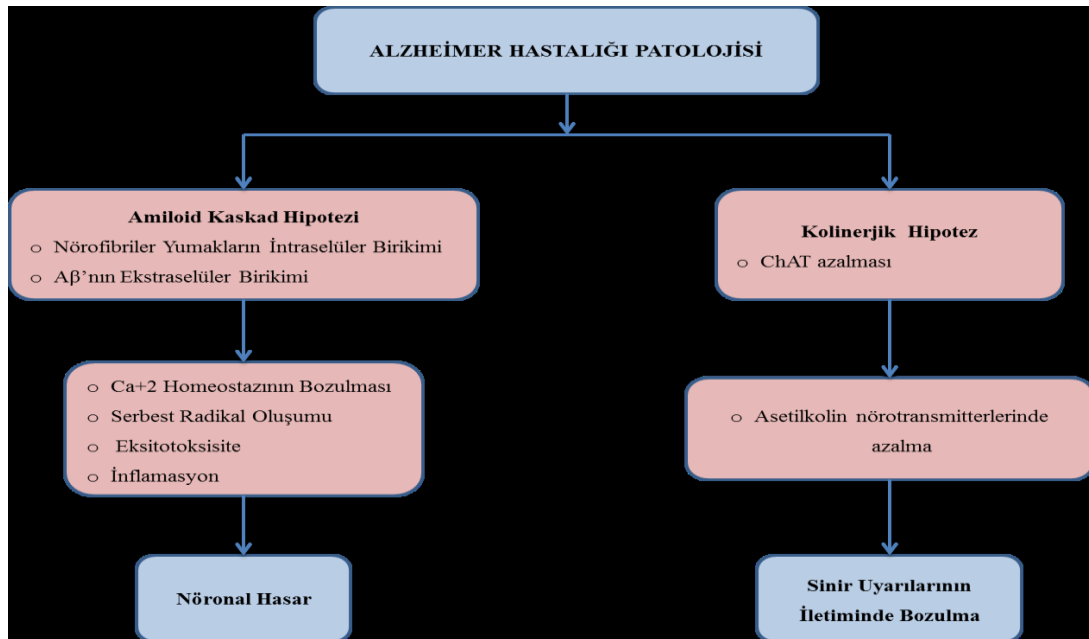
AH'nın en önemli patolojik özellikleri ekstraselüler beta amiloid plaklar, tau proteininin aşırı fosforillenmesiyle meydana gelen hücre içi nörofibriler yumaklar (NFY) ve bazal ön beyinde kolinerjik nöronların kaybıdır.

AH, beta amiloid plaklar ve nörofibriler yumaklarla (NFY) karakterize bir hastalıktır. Nörofibriler yumaklar, tau proteinin hiperfosforilasyonu ile oluşan çift filament sarmallarıdır. Hiperfosforile tau, taunun birikimini kolaylaştıran faktör olarak bilinir, mikrotübüllerin dengesini bozar, dejenerasyon ve nöronal hasara sebep olur [Calsolaro and Edison (77)]. Beta amiloid ise, amiloid beta peptidinin birikmiş şeklidir.

AH'nda subkortikal nükleuslarda oluşan dejenerasyon ve biyokimyasal bozukluk, kortikal nörotransmisyonun bozulmasına yol açar. Mynert'in nükleus bazalisi (kolinerjik), substansia nigra'nın A4 subgrup çekirdekleri (dopaminerjik), lokus seruleus (noradrenerjik) ve median rafe (serotonerjik) çekirdeği en çok etkilenen bölgelerdir. AH'da oluşan kortikal ve subkortikal dejenerasyon, nöronal transmisyonda bozulmaya sebep olur. Burada en fazla etkilenen sistem kolinerjik ileti sistemidir. Bu sebeple de AH tedavisinde kolinerjik ilaçlar tercih edilir [Murpy (78), Sarıca ve Özeren (79), Davidson and Stern (80), Stem et al. (81)]. Asetilkolinerjik nöronal yıkım özellikle

hipokampusta, neokorteksin piramidal hücrelerinde ve Mynert' in bazal nukleusunda, ikincil olarak kortikal difuz projeksiyon yollarında gerçekleşir. Kortekste başlıca M2-kolinerjik reseptör yoğunluğu azalır [Fillit et al. (70), Navaratnam and Priddle (82)]. Lokus seruleusta da benzer değişimlere rastlanır, noradrenerjik sistemde biyosentez azalması kortekse yansır ve difuz nöronal iletimde defektler oluşur. Dopaminerjik ve serotonerjik sistemlere ek olarak, GABA, glutamat, aspartat reseptörlerinin yoğunluğunda da azalmalar gerçekleşir [Wisniewski et al. (68), Özeren ve ark. (74), Navaratnam and Priddle (82)].

AH ile ilgili olarak *amiloid kaskad hipotezi* ve *kolinerjik hipotez* olmak üzere 2 önemli hipotez bulunmaktadır [Parihar and Hemnani (83)] (Şekil 2.1). Amiloid kaskad hipotezine göre, Alzheimer patogenezinin ekstraselüler ortamda A β peptidinin, intraselüler ortamda nörofibriler yumağın fazlaca birikimi sorumludur. Bu birikim, nöronlarda Ca⁺² homeostazının bozulmasına yol açar. Sonuç olarak eksitotoksitesite, serbest radikal üretimi ve inflamasyon gibi çok sayıda nörotoksik yollar harekete geçer. Kolinerjik hipoteze göre ise, kolin asetil transferazın (ChAT) kaybı sonucunda asetilkolin azalır sonuçta bilişsel ve hafıza ile ilgili fonksiyonlar bozulmaya başlar [Francis et al. (84)].



Şekil 2.1. AH ile ilgili hipotezler [Parihar and Hemnani (83)]

2.8. Amiloid Beta Peptid ve Amiloid Prekürsör Protein (APP)

A β peptid; nöronlar, astrositler, glial hücreler ve beyin endotelyumu üzerinde toksik etkiye sahiptir [Askarova et al. (85)]. Yirmi birinci kromozomda kodlanan APP' den proteolitik yolla oluşan A β peptidi, 40-42 aminoasitten oluşan bir proteindir. APP, nöron hücrelerinin normal biyolojik fonksiyonları üzerindeki rolü ile ilgili yapılan çalışmalar, APP'nin nöron gelişimi ve nöronal aktivitenin düzenlenmesinde rolü olduğunu göstermiştir [Turner et al. (86)].

APP'nin kaybı, kültüre edilmiş hipokampal nöronlarda sinaps oluşumunu ve iletimini engellemiştir [Priller et al. (87)]. AH'nda APP, enzimatik reaksiyonlarla daha küçük fragmentlere dönüştürülmektedir [Hooper (88)]. Bu fragmentler, nöronların dışında beta amiloid fibriller olarak birikir ve senil plakları oluşturur [Ohnishi and Takano (89)]. Amiloid oluşumunu başlatan ilk basamak öncül proteinin birikimidir. Amiloid fibrilleri aynı amiloid öncül proteinlerin bir araya gelmesiyle oluşur. Bundan dolayı fibrillerin büyük bölümü APP'den oluşur. AH' da amiloid peptid birikiminin, patojenik kaskadın başlangıcını oluşturduğu düşünülmüştür [Hardy and Selkoe (90)].

Hastalığın en önemli histopatolojik belirtisi senil plaklardır. Ancak AH kesin tanısı için nörofibriler yumak ve senil plakların saptanması yeterli değildir. Bu yumak ve plakların dağılımı ve miktarları önemlidir. Tipik nöritik, klasik veya kompakt plaklar, ortalama çapları 30 μ m olan küresel ekstraselüler lezyonlardır. Diffüz senil plaklar büyüklük bakımından daha heterojen olma eğilimindedir ve bunların büyük bir kısmı 20 μ m'den daha küçük ortalama çapa sahiptir. En fazla serebral korteks olmak üzere çeşitli neokortikal alanlarda dağılmış halde bulunurlar [Braak and Braak (91)].

APP, hücre içinde bir karboksi uca, membran içinde seyreden 28 aminoasitlik bölüme ve hücre dışında bir amino uca sahiptir. A β , APP'nin membran içi 28 aminoasitlik bölgesini içerir. APP; α , β ve γ sekretaz adı verilen bir dizi proteolitik enzimle kesilerek metabolize edilir. β -sekretaz, amiloid beta peptidin amino ucunu oluşturur ve γ -sekretaz, uzunluğunu belirler. APP' nin yıkımı hücrede iki farklı şekilde gerçekleşir: APP eğer γ -sekretaz ve/veya α -sekretaz enzimleriyle kesilirse oluşan peptidler yıkılabileceğinden amiloid plak oluşturacak özellikte değilken [Morgan et al. (92)], γ - sekretaz ve β -sekretaz ile kesilirse 40-42 aminoasitlik bir peptid (A β) amiloid oluşturacak özelliktedir [Taşkiran ve Yılmaz (93)]. Amiloid beta peptid 40 daha yaygındır ve amiloid beta peptid 42 daha fibrilogenik ve nörotoksik türlerdir. γ -sekretaz

aktivitesi dört moleküle bağlıdır: presenilin, nicastrin, APH1, PEN2 [Edbauer et al. (94)].

α -sekretaz' ın APP'yi ortadan kesmesi ile α -APPs ya da sAPP- α adı verilen ekstraselüler yeni bir protein oluşur. Buna karşılık β ve γ -sekretazlar, APP'yi β -sekretaz ile amino ucundan ve/veya γ -sekretaz ile karboksi ucundan böler ve sonuçta 40-42 aa uzunluğunda A β oluşur [Selkoe (95)]. Bu A β ' lardan daha amiloidojenik olanı 42 aa' lik formudur ve ilk çöken de bunlardır [Iwatsubo et al. (96), Di Carlo et al. (97)]. Ardından A β diffüz plaklar halinde agregre olur ve bunlar yoğun nöritik plaklara dönüşür [Cummings (98)]. Yapılan çalışmalarda A β 'nın 40 ve 42 rezidülerinin Alzheimer'da görülen nöronal dejenerasyonda çok önemli rol oynadıkları ve plak oluşumunun majör komponentleri olduğu gösterilmiştir [Wong et al. (99), Verdier et al. (100)].

2.9. Nörofibriler Yumaklar (NFY)

Temel bileşenleri hiperfosforile tau proteinidir. Hiperfosforile tau proteinleri diğer tau proteinleri ile dimerler yaparak nöronda nörofibriler yumakları (NFY) oluşturur [Goedert et al. (101)]. Nörofibriler yumaklar meydana geldiğinde mikrotübüllerin yapı bütünlüğü bozulur ve nöronların transport sistemi dağılır [Iqbal (102)]. Bunun sonucu olarak nöronlar arasındaki biyokimyasal etkileşim ortadan kalkarak hücre ölümüne neden olabilir.

Tau, başlıca fonksiyonu nöronal mikrotübüllerin stabilizasyonu olan ve 17. kromozom tarafından kodlanan mikrotübül asosiye proteinler (MAP) ailesinden bir proteindir [Mandelkow and Mandelkow (103), Chun and Johnson (104)]. Mikrotübüllerin stabilizasyonu, hücre iskeletinin bütünlüğü ve aksonal transportta önemli rol alır. Tau aynı zamanda nöronların nükleus ve plazma membranlarında da lokalizedir ve DNA tamiri ve sinyal iletiminde rol alır [Hanger et al. (105)].

Tau proteininin ana fonksiyonu, mikrotübüllere bağlanmak ve onları stabilize etmektir. Nörofibriler yumak oluşumu, tau bu fonksiyonunu gerçekleştiremediği zaman yani mikrotübüllere bağlanamadığında gerçekleşir [Duff and Planel (106)].

Alzheimer patogeneğinde hiperaktif kinazlar ve/veya hipoaktif fosfatazlar tau proteininin hiperfosforilizasyonuna yol açarak mikrotübüllere bağlanma yeteneğini bozarlar. Bağlanmamış fosforile tau çözilemeyen çift sarmallı filamentlere (PHF-

paired helical filaments) polimerize olur [Iqbal (102)]. Bunlar zaman içinde intranöronal NFY'lar haline gelirler. Anormal hiperfosforile tau proteini, Alzheimer'lı beyinlerde; düz filamentlerle çift sarmal filamentlerin birleşerek oluşturduğu nörofibriler yumaklara polimerize formda ve sitozolde non-fibrilize formda olmak üzere 2 subselüler durumda bulunur [Kopke et al. (107)]. Tau proteini, nörofibriler yumak haline enzimatik defosforilasyon yoluyla dönüşebilir.

NFY'lar, hücre iskeletinin bütünlüğünü ve aksonal transportu bozarak hücre ölümüne neden olur. Transgenik farelerde yapılan çalışmalar primer nörotoksik oluşumun NFY'lardan daha çok mutant tau proteini olduğunu düşündürmektedir [Tanzi (108)]. Ancak ailesel AH'ndaki mutasyonların tau proteininden çok A β üretimini artırmaları ve AH'na benzemeyen bazı nörodejeneratif hastalıklarda da tau proteininin bulunması, Alzheimer patolojisinde tau proteininin önemini tartışmaya açmaktadır [Goedert et al. (101)]. Bununla birlikte beyinde tau proteini olduğu zaman, doğrudan nörodejenerasyona sebep olduğu gösterilmiştir. Alzheimer hastalarının beyinlerinde anormal hiperfosforile tau protein seviyesi kontrol bireylerine göre 4-8 kat artmış olarak bulunmuştur [Khatoon et al. (109)]. Sitozolik anormal hiperfosforile tau proteini Alzheimer beyinlerindeki total anormal tau proteininin yaklaşık %40'ını oluşturur ve tübülün/mikrotübüllerle interaksiyona girmeden mitojen aktiviteli proteinler (MAP1A, MAP1B ve MAP2) normal tau proteinlerini ayırarak mikrotübüllerin çözülmesi ve inhibisyonuna yol açar [Iqbal (101), Alonso et al. (110), Alonso et al. (111)].

Sağlıklı beyinler, tau proteininin optimum aktivitesi için 2-3 molekül fosfat gerekir. Tau proteininin hiperfosforilasyonu normal biyolojik aktivitesini baskılar. AH ve diğer tau ile ilişkili patolojilerde, tau anormal şekilde hiperfosforillenir. Bu olaya birden fazla mekanizma katılır. Normal tau proteininin aksine Alzheimer'da bu protein N-glikozillenir ve bu glikolizasyon tau proteinini fosforilasyon için daha uygun hale getirir. PP-2A (Protein fosfataz 2A) tarafından yapılacak defosforilasyon için ise daha az uygun halde bir tau proteini oluşur. Fakat sadece defosforilasyon aktivitesinin azalması değil aynı zamanda CaMKII (kalmodulin-bağımlı protein kinaz II), PKA (protein kinaz A) ve MAP kinaz enzimlerinin aktivitesinin artması da anormal tau proteini hiperfosforilasyona yol açar. Anormal hiperfosforile tau proteini, sadece mikrotübüllerin oluşumunu uyarmakta başarısız olmakla kalmaz aynı zamanda o mikrotübüllere bağlanır. Ayrıca normal tau proteinlerini, MAP1A/MAP1B ve MAP2'yi

ayırarak mikrotübül çözülmesine ve inhibisyonuna yol açar. Etkilenmiş nöronlarda mikrotübül ağının yıkılması, aksonal transportu engelleyerek nöron dejenerasyonunun artmasına ve en nihayetinde de demansa neden olur.

Alzheimer'da anormal fosforile tau ve normal tau arasındaki ilişki glikosilasyon varlığında gerçekleşir ve nörofibriler yumak oluşumuyla sonuçlanır. Yumaklar, non-lizozomal ubiquitin yolağı tarafından parçalanmak üzere ubiquinasyona uğrar. Fakat bu parçalanma çok minimal düzeyde gerçekleşebilir. Non-polimerize anormal hiperfosforile tau'nun aksine nörofibriler yumaklar daha etkisizdir. Fakat hastalık ilerledikçe bu lezyonlar da büyüyerek hücre ölümelerini arttırarak demansı kuvvetlendirir [Iqbal (102)].

2.10. Amiloid Beta Kaskad Hipotezi

Doksanlı yılların başında öne sürülen bu hipoteze göre sinaptik iletimde bozulma ve nörodejenerasyona yol açarak AH'nin gelişmesine neden olan temel faktör amiloid plakların/ oligomerlerin oluşmasıdır [Hardy and Higgins (112), Selkoe (113)]. Bu hipotezin temeli, beyinde aşırı miktarda A β peptidinin (özellikle A β 1-42'nin), amiloid plakların, nörofibriler yumakların birikimi, sinaps kaybı ve sonuçta nöronal hücre ölümünü içeren patolojiye dayanır [Kocahan and Dogan (114)]. AH'de en belirgin nöropatolojik bulgulardan birisi, hücre dışında görülen amiloid plaklardır. APP normalde α -sekretaz ile işlenirken, normalin dışında β ve γ -sekretazlar tarafından işlenmesi sonucu 39-43 aminoasitlik 4 kDa ağırlığında A β peptidleri oluşur. Sağlıklı bireylerde α -sekretaz etkinliği baskındır. AH'li bireylerde β -sekretaz aktivitesi artar, A β üretim ve klirensi arasındaki bir dengesizlik oluşur. A β peptidlerinin fazla üretilmesi sonucu fibril ve plak oluşur [Kumar et al. (115), Glenner and Wong (116)]. A β peptidleri önce çözünebilir oligomerler halinde, daha sonra çözünemeyen fibriller oluşturarak kümelenir ve birleşerek diffüz senil plaklarda depolanır [Hardy (117)]. Amiloid plaklar, A β 'nin yanı sıra proteoglikanları, apolipoproteinleri, akut faz proteinleri, kemokinler, sitokinler gibi inflamatuvar molekülleri, seruloplazmin, ferritin gibi antioksidan proteinleri, proteaz ve klirens ile ilişkili proteinleri, kolinesterazlar ve metal iyonlarını (çinko, bakır ve demir) ve başka birçok bileşeni içerir [Atwood et al. (118)]. Plakların temel bileşeni olan A β 1-42 oligomerleri, oksidatif hasarı indükler, tau

hiperfosforilasyonunu artırır ve bunun sonucunda sinaps ve mitokondriler üzerinde toksik etkiler oluşturur [Manczak et al. (119)]. Mikroglial aktivasyon, proinflamatuvar sitokinlerin (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ) üretimi ve salınımını uyarır. Bu sitokinler daha fazla A β 1-42 oligomeri üretmek için yakındaki astrosit-nöronu uyarır, böylece daha fazla A β 1-42 üretimi ve yayılımı gerçekleşir [Prokop et al. (120), Prà et al. (121)]. A β oligomerleri, aynı zamanda nöron-astrocit kompleksi ile ilişkili oligodendrogliaların yıkımına da sebep olur. İşte bu oligomer agregatlarının Alzheimer hastalarının beyinlerinde nöronal ve vasküler dejenerasyona yol açtığı düşünülmektedir. Bu agregasyon, oligodendroglialara karşı oksidatif stres ile sonuçlanır [Kumar et al. (115)].

2.11. Tau Hipotezi

Alzheimer hastalarının beyinlerinde Tau proteininin birikimi ilk kez 1986'da tanımlanmıştır [Pollock et al. (122)]. Tau fosforilasyonunun Alzheimer patogenezinde NFY oluşumuna katkısı olduğu ileri sürülmüştür. AH'li hastalarda, tau proteinlerindeki bazı aminoasitlerin hiperfosforilasyonu, proteinlerin mikrotübüllerden ayrılması ile transport yapısının bozulmasına ve sonuçta hücre ölümüne sebep olur. Bu sebeple hiperfosforile tau, hücre içi nörofibriller değişiklikler ve AH' ye yol açması bakımından önemlidir [Kocahan and Dogan (114)]. Hücre içinde oluşan NFY' ler, hiperfosforile tau proteinleri tarafından oluşturulmuş eşleştirilmiş sarmal filamentlerdir. Eşleştirilmiş sarmal filamentlerin hiperfosforilasyonu tau agregasyonunu kolaylaştırır, bu da mikrotübüllerin stabilliğinin bozulmasına, membran dejenerasyonuna ve nöronal hasara yol açar. AH'da NFY' ler; amigdala, hipokampus, parahipokampal girus ve temporal asosiyasyon korteksinde bulunurken, senil plaklar striatumda görülür [Calsolaro and Edison (123)].

2.12. Kolinerjik Hipotez

Kolinerjik hipotez, Alzheimer patolojisini açıklamaya çalışan ilk hipotezdir. Bu hipoteze göre, beynin çeşitli bölgelerinde kolinerjik faaliyetin bozulması sonucu AH gelişir. Yapılan biyokimyasal analizlerde, AH hastalarının serebral korteks ve beynin diğer bölümlerinde kolin asetiltransferaz ve asetilkolinesteraz aktivitesinin normal

bireylere göre düşük olduğu bulunmuştur. Ayrıca, A β 'nın kolinerjik sinir iletimini engellediği de in vitro olarak gösterilmiştir [Kar et al. (124)]. Presinaptik kolinerjik uçlarda yer alan asetilkolin reseptörlerinin (nikotinik ve muskarinik) sayısında azalma olduğu ve bu azalmanın sonucunda bilişsel işlevlerin de azaldığını gösteren çalışmalar mevcuttur [Whitehouse et al. (125), Nordberg et al. (126)]. Alzheimerlı hastaların post-mortem beyin dokularının biyokimyasal olarak incelendiği çalışmalarda, kolin asetiltransferaz aktivitesi [Wilcock et al. (127)], asetilkolin sentezi [Sims et al. (128)], kolin alımı [Rylett et al. (129)] ve asetilkolin salınımında azalma [Nilsson et al. (130)] olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda serebral korteks ve diğer alanlardaki kolinerjik sinir iletimindeki kaybın, AH'de görülen bilişsel işlev bozulmalarına ciddi anlamda katkıda bulunduğu düşünülmüştür [Barage and Sonawane (131), Bartus et al. (132)].

Yapılan araştırmalarda, nörotrofik hormon eksikliğinin de kolinerjik işlev kaybına yol açtığı öne sürülmektedir. Bilindiği üzere nörotrofinler, nöronal faaliyetin düzenlenmesinden sorumludur. Nörotrofin ailesinin üyeleri (sinir büyüme faktörü (NGF), beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), NT-3, NT-4, NT-5 ve NT-6) duyuşsal ve sempatik sinir sisteminin gelişimi ve sürdürülmesinde, merkezi sinir sisteminin kolinerjik ve bilişsel işlevleri ve bellek oluşumunda önemli rol oynar. Alzheimer hastalarının beyinlerinde NGF, TrkA (NGF reseptörü) ve BDNF düzeylerinin düştüğünü gösteren çalışmalar bu hipotezi destekler niteliktedir [Barage and Sonawane (131)].

AH beyinlerinde histopatolojik belirteçler yanında, merkezi nörotransmisyonunda bozukluklar, atrofi ve sinaptik kayıplar da gözlenmektedir. Özellikle bazal ön beyin nöronlarında genel bozukluk görülür. Hastalığın erken evrelerinde bazal çekirdekte ve entorinal kortekste kolinerjik nöronlarda kayıplar gözlenir. Burada yer alan kolinerjik nöronlar sağlıklı bireylerde fizyolojik durumlarda dikkati artırmayı sağlarken aynı zamanda öğrenme ve bellek olaylarında rol oynar. Hastalığın ilerleyen evrelerinde bazal çekirdekteki bu kolinerjik nöronların %90' ının kaybı söz konusudur [Racchi et al. (133), Lunardi et al. (134)]. Bazal Meynert çekirdeğinde kolinerjik nöron kaybından dolayı hipokampus ve kortekste asetilkolin sentezinden sorumlu kolin asetiltransferaz enziminde azalma görülmesi, kolin alımının azalması, nöronal ve aksonal anormallikler, nikotinik reseptörlerin depleksiyonuna bağılı olarak asetilkolin sentezinin azalması ile

oluşan kolinerjik hipoaktiviteler kolinerjik hipotezi destekleyen diğer kanıtlardır [Birks (135), Bartus (136), Geula et al. (137)].

Yapılan hayvan deneylerinde, kolinerjik sistemin bozulmasının AH'a benzer bilişsel bozukluklara yol açtığı gösterilmiştir [Bartus and Emerich (138)]. Merkezi kolinerjik disfonksiyonun bilişsel bozukluklarla beraber ajitasyon, depresyon, halüsinasyon, anksiyete gibi davranışsal ve psikolojik bozukluklarla da ilişkili olduğu bildirilmiştir. Kolinerjik kaybın NFY ve plak sayılarıyla paralel olduğu gösterilmiştir [Grossberg (139)]. Tüm bu belirtilerin oluşmasında kolinerjik bozukluğun yanı sıra serotonerjik, dopaminerjik, noradrenerjik nöron kayıpları ve işlev bozukluklarının da etkili olduğu düşünülmektedir [Gurvitt (140)].

AH'ndaki patolojilerden bir diğeri beyindeki kolinerjik sistemin, özellikle de öğrenme ve bellek ile ilgili bölgelerde hasarlanmadır. Hastalığın en önemli patolojik bulgusu olarak düşünülen senil plaklar ve NFY dışında, AH beyinlerinde başta asetilkolin olmak üzere çok sayıda nörotransmitter sistem etkilenmektedir ancak AH'nda en fazla azalma gösteren nörotransmitter asetilkolindir [Pillay et al. (141)]. Öyle ki, sinaptik bozukluğun en erken belirtilerinden birisi olarak asetilkolin miktarındaki azalma sorumlu tutulmaktadır [Kopke et al. (106)].

Asetilkolin, kolinerjik nöronların gövdesinde, kolinin asetil CoA ile, kolin asetil transferaz (ChAT) enzimiyle katalize edilmesi yoluyla oluşur [James (142)]. Asetil CoA glikoliz reaksiyonlarının bir ürünüdür. Kolin; besinlerden, hücre membranındaki fosfolipidlerden ve asetilkolinin hidrolizi sonucu açığa çıkar ve yeniden asetilkolin sentezinde kullanılır. Asetilkolinin sinaptaki varlığı, asetilkolini sentezleyen ChAT ve asetilkolini parçalayan asetilkolin esterase (AChE) enzimlerinin etkinliğine bağlıdır. ChAT enziminin seviyesi AH'nın hipokampus ile neokorteksinde azalmıştır [James (142), Wenk (143)].

ACh sentezlendikten sonra, presinaptik nöronlardaki veziküllerde depolanır ve bu veziküller, nörona sinir uyarısı geldiğinde içeriğini sinaptik aralığa döker. Sinaptik aralığa salınan ACh moleküllerinin çoğu postsinaptik reseptörlere bağlanır. Reseptörlere bağlanmayan ACh molekülleri AChE tarafından yıkılır. Postsinaptik nörona bağlanan ACh molekülleri, sinir uyarısının diğer nörona iletilmesinin ardından reseptörden ayrılır, AChE tarafından yıkılır ve açığa çıkan kolin yeniden kullanılmak üzere presinaptik nörona gönderilir.

Asetilkolin, merkezi sinir sisteminde yer alan bir kimyasal iletici olmasının yanı sıra insan da dahil birçok organizmanın parasempatik sinir sisteminde yer alır. İskelet kası liflerindeki asetilkolin reseptörlerine bağlanarak, lifin kasılmasına neden olur. Asetilkolinin öğrenme ve hafıza ile de derin bir ilişkisi bulunur [Morrison and Lyketsos (144)]. Presinaptik nöronlardaki veziküllerden salınır ve postsinaptik reseptörlere bağlanır. Sinaptik aralıkta difüzyonla ilerleyen asetilkolin postsinaptik membranda nikotinik reseptörlere bağlanarak doğrudan, muskarinik reseptörlere bağlanarak G-proteini ilişkili ikincil mesajcılar üzerinden etkisini gösterir. Nikotinik etkilerin hücrenin uyarılabilirliğini artırarak dikkat tonusunun sağlanmasında rol oynadığı, muskarinik etkilerin ise kalıcı sinaptik değişikliklerle yeni bilginin depolanması şeklindeki nöroplastisite mekanizmalarının unsuru olduğu bilinmektedir. Hem nikotinik, hem de muskarinik stimülasyon kaybının A β oluşumunu ve nörotoksitesini artırdığı in vitro olarak gösterilmiş, A β 'nin asetilkolin sentezini, salınımını ve postsinaptik etkinliğini azaltabileceği de ortaya konmuştur. Sinaptik boşluğa salınarak görevini tamamladıktan sonra asetilkolin, AChE yardımıyla kolin ve asetata çevrilerek yıkılır. Farklı alt ünite ve hidrodinamik özellikleri nedeniyle farklı moleküler formlarda asetilkolin estera z enzimleri vardır. Memeli beyinlerinde tetramerik formda (G4 formunda), daha az miktarlarda da monomerik formda (G1) bulunurlar [Morrison and Lyketsos (144), Wang and Tang (145)].

AH'nın başlaması ile birlikte gerçekleşen nöron ve akson kaybı daha düşük düzeylerde asetilkolin salınımına neden olur. Düşük konsantrasyondaki nörotransmitter düzeylerinde sinir iletilerinin devamlılığını sağlamak daha güç bir hal alır. ACh düzeylerini arttırmayı sağlayacak mekanizma ise ACh'i yıkan AChE enziminin baskılanmasıdır. Çalışmalar, AChE inhibisyonuna bağlı ACh düzey artışlarının, AH'nın erken evrelerindeki kognitif yetmezliği iyileştirebileceğini göstermiştir [Chaudiere and Ferrari (146)].

2.13. Alzheimer Hastalığı Deney Hayvan Modelleri

Son yıllarda deneysel Alzheimer hayvan modelleri üzerine yapılan çalışmalar patogene z mekanizmalarının aydınlatılması ve patogeneze yönelik yeni tedavi yöntemleri geliştirilmesi konusunda önem kazanmıştır. AH'nın tedavisine yönelik daha

özgün ilaçlar geliştirmek, hastalığın fizyopatolojisi ile ilişkili genlerin daha kapsamlı araştırılması ve AH esnasında ortaya çıkan davranışsal değişiklikler ile beyindeki nörokimyasal veya nöropatolojik değişiklikler arasındaki ilişkiyi daha yakından incelemek amacıyla hastalığın bazı nörolojik, genetik ve biyokimyasal özelliklerini taklit eden hayvan modelleri üzerinde çok fazla durulmuştur.

Buna yönelik olarak geliştirilen hayvan modellerinde başlıca 3 noktaya odaklanılmıştır [Uzbay (147)]:

- 1) Beynin korteks, hipokampus ve ön beyin bazal nükleus bölgesi gibi bölgelerinde stereotaksik cerrahi yöntemlerle lezyon oluşturmak
- 2) Nörotoksik ajanlarla Alzheimer hastalarındakine benzer nitelikte nöron harabiyeti oluşturmak
- 3) AH'nda yer alan genlerin transfer edildiği transgenik modeller elde edilerek hastalığı taklit etmek

Alzheimer deney hayvan modelleri kabaca Transgenik olan ve Transgenik olmayan modeller olarak ikiye ayrılır. Transgenik AH modelleri, A β ve Tau üretimini uyaranlar olmak üzere iki gruptur. Transgenik olmayan modellerde AH'de izlenen kortikal kolinerjik nöral kaybı uyarmak için;

- a. Kimyasal bileşik uygulamaları (**skopalamın, kolşisin, alüminyum ve p75NTR**) veya
- b. İatrojenik lezyon oluşturma (**beyin travması, bilateral hipokampal fimbrio-fariks kesilmesi, adrenalektomi, ooferektomi ve iskemi sonrası hipertermi**) gibi uygulamalar kullanılmaktadır. Kullanılan uyarıcı bileşiklerden skopalamın, kolşisin ve alüminyum nonspesifik iken, p75NTR kolinerjik sinirler için spesifiktir.
- c. A β antikolları uygulanarak oluşturulan **immün yanıt modeli**,
- d. İnsülin/fosfoinazitid- 3-kinaz (PI3-K) yolağı üzerinden oluşturulan **hiperinsülinemik model**
- e. **Streptozotosin (STZ) ile indüklenmiş AH modeli** gibi modeller de kullanılmaktadır.

(Stereotaksik cerrahi yöntemi: Sağ ve sol ventriküle, intraserebroventriküler (icv) yolla STZ enjeksiyonu)

- f. Yüksek kolesterolle besleme,
- g. D-galaktoz uygulaması ile birlikte ya da tek başına overektomidir.

Ailesel Alzheimer'da rol oynadığı belirlenen 3 genin (PSEN-1, PSEN-2, APOE) mutasyonlarını içeren genlerin sıçanlara transfeksiyonu ile oluşturulan transgenik sıçan modelleri yaygın olarak kullanılmaktadır [Götz and Ittner (148)]. Transgenik hayvanlar kendi genomunda başka bir organizmaya ait rekombinant bir geni taşıyan hayvanlardır. Aktarılan rekombinant genin (transgenin) ekspresyonu, promotor gibi gen ekspresyonunu kontrol edici dizilerin yardımıyla transgenik hayvanın belirli dokularına yönlendirilmesi ile olur. Transgenik hayvan üretiminde çeşitli teknikler geliştirilmiş olmasına rağmen pratikte en yaygın kullanılanı tek hücreli embriyonun (zigot) bir pronukleusuna rekombinant DNA'nın doğrudan mikroenjeksiyon ile verilmesi en etkili yol olarak bilinmektedir. Embriyo transferi sonrası doğan yavrular 21 günlük yaşa eriştikleri zaman kuyruk dokularından 1'er cm kesilerek alınır ve bunlardan genomik DNA izolasyonları yapılır. Bu DNA'larda aktarılan transgenin varlığı için Shouthern blot, Slot blot veya PCR gibi moleküler teknikler kullanılır. Transgenin varlığı tespit edilen yavrulara founder (anaç) ismi verilir ve F0 olarak değerlendirilir. Ancak doğan her anaç rodentten ayrı ayrı üretim hatları oluşturulur. Çünkü her anacın (F0) taşıdığı transgen kromozomların farklı yerlerinde olabilir. Her F0 anaç rodent normal rodentler ile çiftleştirilir ve bunlardan elde edilen F1 rodentler kendi aralarında çiftleştirilir. Bunlardan (%25 homozigot, %75 hemizigot ve %25 boş) elde edilecek erkek ve dişi homozigot rodentler kendi aralarında çiftleştirilerek hattın devamlılığı sağlanır.

Transgenik rodentlerde farklı hastalık modelleri oluşturulmuştur. Bunların başında Alzheimer gelmektedir. AH'na benzer belirgin bir nöropatoloji sergileyen transgenik model ilk olarak rodentlerde yaratılmıştır. Bu modelde kalıtsal AH ile ilişkili kromozom 21'deki amiloid prekürsör protein (APP) V717F mutasyonu şifreleyen bir insan APP mini geni taşıyan rodentler (PDAPP rodentler) oluşturulmuştur [Bales et al. (149)]. Aβ tabakalarının oluşumunda APOE geninin rolünü incelemek için APOE geni ortadan kaldırılmış (APOE knockout) fareler oluşturulmuştur. APOE geni yokluğunda Aβ

tabakaları anlamlı ölçüde azalırken, APP ekspresyonu veya A β oluşumu değişmemiştir [Hsiao et al. (150)].

Tg2576 fareler çift mutasyon geçirmiş insan APP695 ekspresyonu yapılmış bir transgenik Alzheimer modelidir [Richardson and Burns (151)]. Tg2576 transgenik fareler su labirent testinde uzaysal öğrenmede bozulma ve Y labirent testinde başarısızlık sergilerler. Bu belirtilerin yanı sıra Tg2576 farelerin beyinlerinde amiloid plaklar da gözlenmiştir. Tg2576'da olduğu gibi APP proteinin geninde çift mutasyon oluşturulan İsveç kökenli diğer bir transgenik model APP23'dür. Bu fareler normal APP içeren farelerden 7 kat daha fazla APP protein ekspresyonu yaparlar. Amiloid plaklar erken dönemde (6 ayda) özellikle kortekste gelişirler. Tg2576'dan farklı olarak bu sıçan modelinde, hipokampustaki CA1 primidial nöronlarda %14 kayıp görülür. Neokortekse nöronal kayıp yoktur. Nörofibriler yumak oluşumu yoktur. Yaşla doğru orantılı bilişsel kayıplar vardır.

Her iki model de Alzhemir patolojisinde önemli yeri olan amiloid plakları yoğun olarak göstermesine rağmen, Tg2576'da nöronal kayıp olmaması [Bales et al. (149)] ve de APP23'ü temin etmekteki zorluklar bu iki transgenik modelle ilgili handikaplar olarak karşımıza çıkmaktadır. Genel anlamda tüm transgenik Alzheimer modellerinin temini yurt dışından sağlanma zorunlulukları nedeniyle kısıtlıdır.

AH'nın patolojik gelişimiyle ilişkisi olduğu bilinen oksidatif stres ve östrojen kaybını temel alarak geliştirilen hayvan modellerinden birisi de, overektomi yapılarak östrojen metabolizması zarar görmüş hayvanlara D-galaktoz uygulaması yapılmasıdır [Holden et al. (151)]. Uzun süreli D-galaktoz uygulamasının metabolik anomalilere yol açtığı, reaktif oksijen türevi (ROS) üretimini arttırdığı ve nöronal hasara yol açtığı bilinmektedir [Holden et al. (152), Xu and Zhao (153)]. Bu iki uygulamanın birlikte yapıldığı hayvanlarda, 6 haftanın sonunda ileri derecede bilişsel fonksiyonlarda ve hafızada kayıplar, ön beyinde nöronal hasar, hipokampusta sinaptik dejenerasyon ve A β oluşumu histolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle gösterilmiştir [Hua et al. (154), Hua et al. (155)].

Alüminyum klorür, oksidatif stresi artıran ve kemirgenlerin beyinlerinde inflamatuvar yanıtı harekete geçiren nörotoksik bir ajandır [Yang et al. (156)]. Ayrıca AlCl₃'ün kronik uygulaması NFY oluşumuna, AB aşırı üretimine ve kolinerjik işlev bozukluğuna yol açar [Vucetic-Arsic et al. (157)].

2.13.1. Alüminyum Klorür İle Geliştirilen AH Modeli

Alüminyumun insan ve hayvan biyokimyasında herhangi bir rolü bilinmese de, günlük hayatta yiyeceklerin korunmasında ve renk verici madde olarak kullanılır. Alüminyum toprakta, kayalarda, su ve yiyeceklerde bulunur. İnsanlar yaşadığı ortam, mesleği ve aldığı ilaçlar sebebiyle alüminyuma maruz kalırlar. Yenilen yiyeceklerin bileşimine bağlı olarak kişinin günlük alüminyum alımı değişir. Vücuda alınan alüminyumun emilimi sınırlı da olsa beyin, kalp, akciğer ve kemiklerde birikerek toksik etki gösterir. Yapılan çalışmalar alüminyum toksisitesinin nörolojik hastalıklara yol açabileceğini göstermiştir [Alfrey (158), Anthony et al (159)]. Sağlıklı insanlarda gastrointestinal sistem ve solunum yolu ile organizmaya giren alüminyum, yine gastrointestinal sistem ve böbrekler ile atılır. Alınan besinlerde alüminyum miktarının artması özellikle beyin ve omurilikte alüminyum birikmesine yol açar [Blundell et al. (160)].

2.14. Davranış Testleri

2.14.1. Rota Rot Testi

Deney hayvanlarında davranışsal değişimlerin ölçülmesinde kullanılan testlerden biri olan "Rota-Rod Yürüme" testinden fare ve sıçanlarda "lokomotor aktivitenin" ölçümünde yaygın olarak yararlanılmaktadır. Bu test ile aslında denge, motor aktivite ve kas gücü fonksiyonlarının koordinasyonu ve bu koordinasyon üzerine ilaçlar ile çeşitli fizyolojik faktörlerin etkileri ölçülebilmektedir. Ayrıca, yeni ilaç geliştirme çalışmaları [Belcheva et al. (161), Singh et al. (162), Skoldinov et al. (163), Tongia et al. (164)] ve bazı maddelerin nörotoksitelerinin ölçülmesinde [Morato et al. (165), Nedev et al. (166), Paul et al. (167), Rolka et al. (168), Wong and Tan (169)] test olarak kullanılmaktadır. Yeni ilaç geliştirme çalışmalarında istenen terapötik etkilerin yanı sıra, istenmeyen yan etkilerin araştırılması açısından da "Rota-Rod" testi önem kazanmaktadır.

Bu testte hayvanlar belli bir hızda dönmekte olan bir mil üzerinde yürümeye bırakılmaktadırlar. Hayvan, yorulduğu, motor sinirlerde iletimin yavaşladığı, çizgili

kaslarında gevşeme olduğu, dengesinin bozulduğu ve sedasyon olduğu durumda bu dönen milden aşağıya düşmektedir.

2.14.2. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi

Yükseltilmiş Artı Labirent Testi (Elevated Plus Maze Test) ve türevleri 1985 yılında File ve arkadaşları [Pellow et al. (170)] tarafından tanımlanan, yeni çevre değişikliğine bağlı olarak gelişen anksiyeteyi ölçmek için kullanılan keşifsel bir modeldir. Emosyonel aktiviteyi test ederek ilaçların davranışsal, fizyolojik ve farmakolojik etkilerini araştırmak için kullanılır [Li et al. (171), Arendash et al. (172), Thorsell et al. (173), Moragrega et al. (174), Carvajal et al. (175), Rimondini et al. (176)]. Yerden belli bir yükseklikte (50 cm) karşılıklı iki açık ve iki kapalı kolu olan artı şeklinde bir deney düzeneğidir. Farklı ebatlarda hazırlanarak fare ve sıçanlar için kullanılabilir [Moragrega et al. (174), Carvajal et al. (175)]. Bu düzenekte kapalı kola konulan hayvanın açık kola girmesi için geçen süre ve bu kolda kalış süresi değerlendirilir. Yapılan çalışmalarda anksiyolitik ajanların bu iki süreyi artırdığı, anksiyojenik ajanların ise azalttığı bulunmuştur [Rodgers et al. (177), Ferguson and Cada (178), Alcalay et al. (179), Ferguson et al. (180)]. Yükseltilmiş artı labirent testindeki performans mevsimsel değişikliklere bağlıdır ve bu konu çalışmalar sırasında dikkate alınmalıdır. Yükseltilmiş artı labirent düzeneğinin Y-maze ve O-maze gibi çeşitli deriveleri de çalışmalarda kullanılmaktadır [Arendash et al. (172), Vasconcellos et al. (181)].

Yükseltilmiş artı labirent testi ilk olarak hayvanlarda anksiyete ölçümü için geliştirilmiş bir metottur. Bu labirent kullanılarak ayrıca uzun süreli uzaysal bellek de ölçülebilmektedir. Normalde sıçan veya fare açık kollardan birine konulduktan sonra, kapalı kollardan birini tercih eder. Testin birinci günü hayvanlar tek tek açık kollardan birinin ucuna bırakılır. Hayvanın açık koldan kapalı kollardan birine girmesi için geçen süre (geçiş süresi) kaydedilir. Hayvanların kapalı kolda 10 sn kalmalarına müsaade edilir. Birinci uygulamadan 24 saat sonra deney tekrarlanır. Test sırasında her hayvan sadece bir kez kullanılır.

2.14.3. Pasif Sakınma Testi

Duygusal (emosyonel) öğrenme ve bellek fonksiyonları tayini için, pasif sakınma (passive avoidance) test düzeneği kullanıldı [Eagle et al. (182)]. PAT, farelerde kaçınma hafızasının tutulmasını ölçmek için yaygın olarak kullanılır [Tabrizian et al. (183)]. Pasif sakınma testi en hızlı bellek testlerinden biridir. Pasif sakınma prosedürüne göre, fare bir mekik kutusuna yerleştirilir. Cihaz, ortadan bir kapı ile ayrılmış iki bölmeden oluşmaktadır. Bölmelerden biri büyük, karanlık ve hayvana elektrik şoku uygulanmasına uygun şekilde tasarlanmış, diğeri küçük, aydınlık ve hayvanın elektrik şoku almadığı bölmedir. Düzeneğin zemini 0.3 cm çapındaki elektrik ileten çelik barlardan oluşmaktadır. Testin ilk gününde hayvanlar 2 dk boyunca aparatın aydınlık bölümüne yerleştirilir ve alışması sağlanır. Bu sırada karanlık odanın kapısı açık bırakılır. Küçük ve aydınlık bölmeye konulan hayvanın karanlık bölmeye geçmesi için geçen süre kaydedilir. Normalde fare geniş ve aydınlık bölmeye konulduktan sonra karanlık bölümü tercih eder. 300 sn' lik sürede karanlık bölmeye geçmeyen fareler deney dışı bırakılırlar. Hayvan karanlık bölüme geçtiği sırada kapı kapatılır ve belirli süre ve şiddette elektrik şoku (0.1 mA/2s) uygulanır.

30 sn sonra işlem tekrarlanır. Eğer 2. kez aydınlık bölmeye konulan hayvan elektrik şoku alacağını anlayarak karanlık bölmeye geçmez ise olayı öğrenmiş kabul edilir [Porsolt et al. (184), Sanger (185)].

Bu eğitimden bir gün sonra hayvanın kendisine şok verilen başlangıçta tercih ettiği bölme yerine, aydınlık bölmeyi tercih etmesi ve burada zamanını geçirmesi pasif sakınma olarak kabul edilir [Uzbay (186)].

Bu testte ayrıca bir takım davranışlar kaydedilir. Hayvanın merakla gezinip, arka ayakları üzerinde havaya kalkması ve etrafı koklayarak incelemesi “rearing (şaha kalkma)” olarak adlandırılır. Hayvanın strese girip bir köşede hareketsiz biçimde beklemesi “freezing (donma)” olarak bilinir. Etrafını keşfeden hayvanın ön pençeleri ile temizlenmesi/kaşınması gibi davranışları “grooming (temizlenme/süslenme)” olarak adlandırılır. Hayvanın gezerken dışkılaması “defekasyon” olarak bilinir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (SABİDAM) ile Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı araştırma laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya başlamadan önce Çukurova Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından; 10.12.2020 tarih ve 2020/09 sayılı karar gereğince çalışma izni alınmıştır. Çalışmamızda 32-50 gram ağırlığında 10-12 haftalık 50 adet Swiss albino erkek ve dişi fareler kullanıldı. Fareler SABİDAM'da 12 saat aydınlık - 12 saat karanlık ortamda ışıklandırılan, 22 ± 2 °C' deki odalarda, standart pelet yem ile beslenip, yem ve su alımı serbest bırakılarak, standart kafeslerde barındırıldı.

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmamızda deneysel Alzheimer modeli oluşturmak amacıyla $AlCl_3$ (Alüminyum klorür/ Sigma-Aldrich) kullanıldı. Model oluşturulabilmek için hesaplanan alüminyum klorür miktarı hassas terazide tartılarak distile suda çözüldü. Hazırlanan çözelti, farelerin suluklarına doldurularak, günde 50 mg/kg dozunda alüminyum klorür almaları sağlandı. Davranış deneylerinin bitiminde farelere servikal dislokasyon öncesinde, 100 mg/kg Ketamin hidroklorür (Keta-Control) + 10 mg/kg Ksilazin hidroklorür (Bayer) kombinasyonu intraperitoneal olarak uygulandı.

3.1.3. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

Deneysel Alzheimer modeli oluşturulan farelerin davranış, öğrenme ve belleklerini değerlendirmek amacıyla rota rot, yükseltilmiş artı labirent ve pasif sakınma düzeneği kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Çalışma Yeri ve Şartları

Çalışmada kullanılan fareler SABİDAM’ da barındırıldı. Çalışma boyunca farelere alüminyum klorür verilmesi, su tüketimi takibi ve farelerdeki ağırlık değişimi gibi rutin çalışmalar Çukurova Üniversitesi SABİDAM’da yapıldı. Rota rot ve yükseltilmiş artı labirent testleri, gerekli donanımın bulunduğu Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Davranış laboratuvarında, pasif sakınma testleri ise Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Nörofizyoloji laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışmanın sonunda oluşan tıbbi atıklar kırmızı renkli tıbbi atık poşetlerine konularak SABİDAM’a götürüldü.

3.2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Yapılışı

Çalışmada alüminyum klorür uygulaması oral yolla gerçekleştirildi. Alüminyum klorür miktarı hesaplanarak distile suda çözüldü. Hazırlanan 50 mg/kg dozundaki çözelti farelerin suluklarına doldurularak 90 (doksan) gün boyunca verildi. Çalışmada toplam dört grup oluşturuldu.

- 1. Dişi kontrol grubu (n=10):** Dişi farelere 90 (doksan) gün boyunca musluk suyu verildi. Yem kısıtlaması yapılmadı.
- 2. Erkek kontrol grubu (n=10):** Erkek farelere 90 (doksan) gün boyunca musluk suyu verildi. Yem kısıtlaması yapılmadı.
- 3. AlCl₃ verilen dişi deney grubu (n=15):** Bu gruptaki dişi farelere 90 (doksan) gün boyunca oral olarak 50 mg/kg/gün AlCl₃ içeren çözelti verildi. Kilogram başına verilmesi gereken AlCl₃ hesaplanarak çözelti hazırlandı ve su içme şişelerine dolduruldu. Yem kısıtlaması yapılmadı.
- 4. AlCl₃ verilen erkek deney grubu (n=15):** Bu gruptaki erkek farelere 90 (doksan) gün boyunca oral olarak 50 mg/kg/gün AlCl₃ içeren çözelti verildi. Kilogram başına verilmesi gereken AlCl₃ hesaplanarak çözelti hazırlandı ve su içme şişelerine dolduruldu. Yem kısıtlaması yapılmadı.

Doksan günlük deney süresinin bitiminde, farelere davranış testleri yapıldı. Testlerin başlangıcında tüm hayvanlara, motor aktivitelerini gözlemlemek için rota rot testi uygulandı. Ardından iki gün (91 ve 92. günlerde) yükseltilmiş artı labirent testi gerçekleştirildi. Doksan üçüncü gün pasif sakınma testi yapıldı. Uzun süreli bellek kontrolü için 95. gün test tekrarı gerçekleştirildi. Davranış testlerinden sonra fareler servikal dislokasyonla sakrifiye edildi. Hızlı bir şekilde beyinleri çıkarılıp % 10 konsantrasyonda hazırlanmış formaldehite konuldu.

3.2.3. Alzheimer Deney Hayvan Modeli

Çalışmada farelerde Alzheimer modeli oluşturmak amacıyla alüminyum klorür kullanıldı. Alüminyum klorür distile suda çözüldü ve oral olarak verildi.

3.2.4. Rota Rot Testi

Farenin dönen bir çubuk üzerinde motor koordinasyonunu değerlendirmek amacıyla Rota Rot düzeneği kullanıldı (Şekil 3.1). Bu düzenekte çubuğun dönme hızı arttıkça hayvanın çubuk üzerinde dengesini sağlaması zorlaşmaktadır. Deney sırasında cihazın hızı 10 rpm'e ayarlandı. Farelerin alete alışabilmeleri için iki ön deneme yapıldı ve farelerin rota rot cihazında kaldıkları süre kaydedildi. Cihazdan hiç düşmeyen farelerin, cihaz üzerinde kalma süreleri 120 saniye olarak kaydedildi [Nehru et al. (187)].

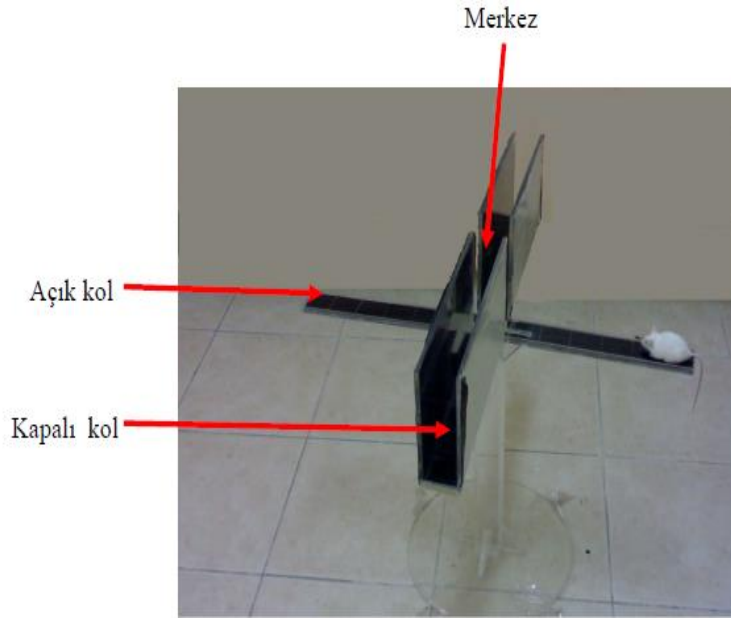


Şekil 3.1. Rota Rot Test Düzeneği

3.2.5. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi

Yükseltilmiş artı labirent (elevated plus maze) testi, farelerde kalıtsal olan yükseklik korkusunu ve anksiyeteyi değerlendirmek için kullanıldı [Carola et al. (188)]. Test düzeneği pleksiglastan yapılmış iki açık, iki kapalı kol (genişliği 12 cm, uzunluğu 50 cm) ve bunların kesiştiği merkez bölgeden oluşur, yerden yüksekliği de 50 cm'dir (Şekil 3.2). Deneyler iki gün süre ile yapıldı. Birinci gün fareler düzeneğin açık ucuna, yüzü merkez platforma ters olacak şekilde konulduktan sonra farelerin kapalı uca girme süreleri kaydedildi. Kapalı alana giren farelerin 10 s kapalı alanda beklemesine izin verildi. İkinci gün aynı şartlarda açık uca bırakılıp kapalı alana girme süreleri kaydedildi [Hlinák et al. (189)]. Toplam 2 dk boyunca açık ve kapalı alanda geçirdikleri süre kaydedildi. Denemeler arasında düzenek alkolle temizlendi.

Bu düzenekte, farelerin açık ve kapalı kolları geçirdikleri süre saniye cinsinden değerlendirilmiştir. Düzeneğin açık kolları fareler için anksiyetenin tetiklendiği, güvenli olmayan ortamlardır. Fareler doğal davranış olarak açık koldan sakınıp kapalı kola geçerler. Açık ve kapalı kolda geçirilen süreler karşılaştırılarak, farelerin anksiyeteleri değerlendirilmektedir.



Şekil 3.2. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi

3.2.6. Pasif Sakınma Düzenegi

Fareler aydınlık odaya yerleştirildi ve karanlık odaya geçene kadar olan süre kaydedildi. Karanlık odaya geçtiklerinde ortadaki kapı kapatıldı, karanlık odada yerdeki ızgaralardan 2 saniye boyunca 0,1 mA elektrik şoku verildi. Hayvanlar karanlık odadan alındı. Uzun süreli belleği değerlendirmek için 24 saat sonra tekrar aydınlık odadan karanlık odaya geçiş süreleri değerlendirildi (Şekil 3.3). Hayvanların odalar arası geçiş süresini değerlendirmek için maksimum bekleme süresi 300 saniye olarak belirlendi [Isik et al. (190)]. Ayrıca bu süre içerisinde farelerin aydınlık odada sergiledikleri ayağa kalkma (şahlanma=rearing) sayısı, donma (freezing) sayısı, temizlenme (süslenme=grooming) sayısı ve dışkılama (defekasyon) sayısı kaydedildi.



Şekil 3.3. Pasif Sakınma Düzenegi

3.3. Histolojik Analizler

3.3.1. Doku Örneklerinin Alınması ve Parafin Doku Takibi

Deney sonrasında genel anestezi altında hayvanlar servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Diseksiyon makası yardımı beyinler çıkarılarak %10' luk nötral formalin solüsyonu ile 48 saat fikse edildi. Fikse edilen örnekler, 1 gece akarsu altında yıkanarak nötral formalin solüsyonunun uzaklaştırılması sağlandı. Dehidratasyon işlemi, % 50' den % 100' e artan etil alkol serilerinden geçirilerek yapıldı.

Şeffaflaştırma amacıyla dokular ksilen-alkol karışımı ve ksilenden geçirildi. 60°C' lik etüv içerisinde ksilen-parafin uygulanıp iki değişim parafin ile infiltrasyonu sağlandıktan sonra dokular parafin bloklar içerisinde gömüldü (Çizelge 3.1) [Baban (191)].

Çizelge 3.1. Parafin Takip Protokolü

İşlem	Kullanılan Madde	Süre
Fiksasyon	% 10'luk Nötral Formalin	48 saat
Fiksasyon Solusyonunun Uzaklaştırılması	Akarsu	1 gece
Dehidratasyon	% 50 Etil Alkol	30 dakika
	% 60 Etil Alkol	30 dakika
	% 70 Etil Alkol	30 dakika
	% 80 Etil Alkol	30 dakika
	% 90 Etil Alkol	1 saat
	% 95 Etil Alkol	1 saat
	% 100 Etil Alkol	1 saat
Şeffaflaştırma	Alkol-Ksilen (1:1)	30 dakika
	Ksilen	1 saat
	Ksilen	1 saat
İnfiltrasyon (60°C Etüvde)	Ksilen-Parafin (1:1)	30 dakika
	Parafin	1 saat
	Parafin	1 saat
Bloklama	Parafin	

3.3.2. Histokimyasal Boyama

Parafin bloklardan Rotary mikrotom (RM 2135, Leica) ile 5 µm' lik parafin kesitler alındı. Parafin doku kesitleri 1 gece 60°C' lik etüvde ve ardından iki değişim ksilenden geçirilerek deparafinize edildi. Rehidratasyon amacı ile % 95' den % 60' a azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 5 dakika akarsu altında yıkandı. Daha sonra doku kesitleri 5 dakika Hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile ardından 30 saniye Eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyandı. Akarsu altında 5 dakika yıkama yapıldıktan

sonra % 80 ve % 95' lik etil alkol serilerinden geçirilerek havada kurutuldu. Şeffaflaştırma amacıyla ksilende bekletilen doku örnekleri entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Çizelge 3.2). Kamera ataçmanlı (SC50, Olympus, Germany) ışık mikroskobu (BX43, Olympus, Japan) altında incelenerek gruplar arasındaki farklılıklar değerlendirildi [Baban (191)].

Çizelge 3.2. Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
Rehidratasyon	% 95 Etil Alkol	2 dakika
	% 80 Etil Alkol	2 dakika
	% 70 Etil Alkol	2 dakika
	% 60 Etil Alkol	2 dakika
Yıkama	Akarsu	5 dakika
Boyama	Hematoksilen	5 dakika
Yıkama	Akarsu	5 dakika
Diferansiyasyon	Asit-Alkol	1-2 saniye
Yıkama	Akarsu	5 dakika
Boyama	Eozin	20 saniye
Yıkama	Akarsu	5 dakika
Dehidratasyon	% 80 Etil Alkol	1 dakika
	% 95 Etil Alkol	1 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	1 saat
	Ksilen	1 saat
Kapama	Entellan	

3.4. İstatistiksel Analizler

Kategorik ölçümler sayı ve yüzde olarak, sayısal ölçümlerse ortalama ve standart sapma (gerekli yerlerde ortanca ve IQR) olarak ifade edildi. Sayısal ölçümlerin normal dağılım varsayımını sağlayıp sağlamadığı Shapiro Wilk testi ile test edildi. Gruplar arasında sayısal ölçümlerin karşılaştırılmasında varsayımların sağlanması durumunda

Bağımsız gruplarda Student T testi, varsayımların sağlanmaması durumunda ise Mann Whitney U testi kullanıldı. Ölçümlerin zaman içindeki değişimini karşılaştırmada Tekrarlı ölçümler analizi kullanıldı. Verilerin istatistiksel analizinde IBM SPSS Statistics Versiyon 20.0 (ref.) paket programı kullanıldı. Tüm testlerde istatistiksel olarak $p < 0,05$ değerleri anlamlı olarak kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. AlCl₃ İle Oluşturulan Alzheimer Modelinde Gözlenen Özellikler

Farelere, alüminyum klorür (AlCl₃) çözeltisi, su şişelerine doldurularak oral yolla verildi. İlaçlı grup olarak, doksan gün boyunca oral yolla 50 mg/kg/gün AlCl₃ alan erkek (n=15) ve dişi (n=15) hayvanlar, kontrol grubu olarak da doksan gün boyunca musluk suyu alan erkek (n=10) ve dişi (n=10) hayvanlar deneye alındı. Doksan gün içinde alüminyum klorürlü su içen dişilerden dört, erkeklerden üç fare hayatını kaybetti. Kontrol grubundan ise dört dişi ve bir erkek fare kaybedildi. Kalan 38 hayvanla deney devam ettirildi.

Deneylere başlanmadan önce ve deneylerin bitiminde, farelerin ağırlıkları ölçüldü. AlCl₃ alan ilaçlı grup ile kontrol grubu arasında bir ağırlık farkı olmakla birlikte, ilaçlı gruptaki ağırlık azalması istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı (p> 0,05). Yapılan ön çalışmalarda aynı dozda AlCl₃ intraperitoneal olarak verildiğinde birkaç hayvanın hemen öldüğü gözlemlendi. Alüminyum klorürün doksan gün boyunca oral yolla verilmesi sonucu kronik ve günlük hayatı taklit eden bir model oluşturulması planlandı. AlCl₃'ün oral yolla verilmesine rağmen, ilaçlı grupta ölüm gözlemlendi ve toplam fare sayısı 30' dan 23'e düştü. Kontrol grubunda beş hayvan kaybedildi.

Doksan gün boyunca ve doksan günün sonunda alüminyum klorür içeren su alan fareler kontrol grubu ile kıyaslandığında herhangi bir morfolojik değişiklik gözlenmedi. Yapılan ön çalışmalarda AlCl₃'ün i.p olarak verildiğinde farelerin batin bölgesinde ani kasılmalar ve kramplar gözlenmiştir, ancak AlCl₃ çözeltisini oral yoldan alan farelerde herhangi bir kasılma gözlenmedi.

4.2. Rota Rot Testi İle Motor Hareketlerin Değerlendirilmesi

Rota Rot testinde 120 saniye boyunca farelerin motor koordinasyonları değerlendirildi. Test düzeneğinde geçirdikleri süreler karşılaştırıldığında, Alzheimer modeli oluşturulan deney grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (p>0,05) (Çizelge 4.1). Bu durum kronik AlCl₃ yüklemesinin motor hareketleri bozmadığı yönünde değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.1. Rota Rot Testinde kontrol ve AlCl₃ alan ilaçlı grubun Rota Rot düzeneğinde geçirdiği sürelerin (sn) karşılaştırılması (Veriler Ort±SS olarak verilmiştir)

Gruplar	Kontrol (n=15) (sn)	AlCl ₃ alan ilaçlı grup (n=23) (sn)
Ortalama+Standart sapma ($\bar{x} \pm \text{STD}$)	119,7±1,3	118,7±5,2
p	0,490	

Rota Rot Testinin sonuçları değerlendirildiğinde, cinsiyetler arasında fark olup olmadığı da bakılmıştır ancak burada da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$) (Çizelge 4.2). Bu sonuç, motor koordinasyon açısından erkek ve dişiler arasında fark olmadığını göstermektedir.

Çizelge 4.2. Rota Rot Testinde cinsiyetlerin karşılaştırılması (Veriler Ort±SS olarak verilmiştir)

Gruplar	Erkek (n=21) (sn)	Dişi (n=17) (sn)
Ortalama+Standart sapma ($\bar{x} \pm \text{STD}$)	120,0±0,0	119,1±2,0
p	0,363	

4.3. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi Değerlendirilmesi

Yükseltilmiş artı labirent düzeneğinde fareler 120 saniye boyunca bırakılarak, düzeneğin açık ve kapalı kollarında geçirdikleri süreler kaydedildi. Sonuçlar değerlendirildiğinde kontrol ve AlCl₃ alan gruptaki farelerin aydınlık kolda geçirdikleri sürenin ikinci gün azaldığı, karanlık kolda geçirdikleri sürenin ise ikinci gün arttığı gözlemlendi. Aydınlık kolda geçirdikleri süre değerlendirildiğinde kontrol ve AlCl₃ alan grupta sürelerin azaldığı, bu azalmanın kontrol grubunda daha yüksek olduğu bulunmuştur ($p=0,032$) (Çizelge 4.3). Karanlık kolda geçirdikleri süre değerlendirildiğinde kontrol ve AlCl₃ alan grupta sürelerin arttığı, bu artışın kontrol

grubunda daha fazla olduğu bulunmuştur ($p=0,025$). Her iki kolda da kontrol grubuna ait değişiklikler, $AlCl_3$ alan ilaçlı gruptan istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Çizelge 4.3. Yükseltilmiş Artı Labirent Testinde $AlCl_3$ alan ilaçlı grup ve kontrol grubunun aydınlık ve karanlık kollarda geçirdikleri sürenin (sn) iki günlük karşılaştırılması (Veriler normal dağılım gösterenler için $Ort \pm SS$, normal dağılım göstermeyenler için $Med \pm IQR$ olarak verilmiştir)

Gruplar	1.gün aydınlık kolda geçirilen süre ($\bar{x} \pm STD$) (sn)	2.gün aydınlık kolda geçirilen süre ($\bar{x} \pm STD$) (sn)	1.gün karanlık kolda geçirilen süre (Med. $\pm IQR$) (sn)	2.gün karanlık kolda geçirilen süre (Med. $\pm IQR$) (sn)
Kontrol (n=15)	108 $\pm$ 13,4	84,7 $\pm$ 26,6	10,0 $\pm$ 21,0	43,0 $\pm$ 48,0
$AlCl_3$ alan ilaçlı grup (n=23)	105,2 $\pm$ 16,7	96,2 $\pm$ 22,7	19,0 $\pm$ 28,0	23,0 $\pm$ 44,0
p değeri	0,032*		0,025**	

*Kontrol grubunda anlamlılığı göstermektedir

** Kontrol grubunda anlamlılığı göstermektedir

Yükseltilmiş artı labirent testinde cinsiyetler arası farka bakıldığında, kontrol grubu farelerde cinsiyetler arası farka rastlanmazken, $AlCl_3$ alan ilaçlı grupta erkek ve dişi fareler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$) (Çizelge 4.4). Erkek ve dişi farelerin aydınlık kolda geçirdikleri süre ikinci gün azalmış, karanlık kolda geçirdikleri süre ikinci gün artmıştır. Ancak bu süre değişimleri dişi farelerde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Çizelge 4.4. Yükseltilmiş Artı Labirent Testinde erkek ve dişi farelerin geçirdikleri süre bakımından (sn) iki günlük karşılaştırılması (Veriler normal dağılım gösterenler için Ort±SS, normal dağılım göstermeyenler için Med±IQR olarak verilmiştir)

Gruplar	1.gün aydınlık kolda geçirilen süre ($\bar{x} \pm \text{STD}$) (sn) p	2.gün aydınlık kolda geçirilen süre ($\bar{x} \pm \text{STD}$) (sn) p	1.gün karanlık kolda geçirilen süre (Med. $\pm \text{IQR}$) (sn) p	2.gün karanlık kolda geçirilen süre (Med. $\pm \text{IQR}$) (sn) p
Kontrol Erkek (n=9)	105,1±15,5	82,1±28,7	20,0±24,0	53,0±48,0
Kontrol Dişi (n=6)	112,3±9,1 0,325	88,7±25,2 0,657	5,0±15,0 0,388	32,0±27,0 0,689
AlCl₃ alan Erkek (n=12)	115,2±8,7	102,9±22,2	0,0±9,5	5,0±39,0
AlCl₃ alan Dişi (n=11)	94,4±16,8 0,001*	88,8±21,8 0,140	28,0±14,0 0,001**	32,0±34,0 0,134

*AlCl₃ alan dişi farelerde anlamlılığı göstermektedir

** AlCl₃ alan dişi farelerde anlamlılığı göstermektedir

4.4. Pasif Sakınma Testinin Değerlendirilmesi

Pasif sakınma test düzeneğinde farelerin 300 saniye boyunca aydınlık ve karanlık kutuda geçirdikleri süreler kaydedilmiştir. Birinci ve ikinci gün aydınlıkta geçirilen süreler açısından karşılaştırıldığında, kontrol ve AlCl₃ alan ilaçlı gruplarda geçirilen süre miktarlarının arttığı ancak bu artışın gruplar arasında istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p>0,05$) (Çizelge 4.5). Karanlık kutuda geçirilen süreler değerlendirildiğinde kontrol grubunun, AlCl₃ alan ilaçlı gruba kıyasla daha fazla zaman geçirdiği ve istatistiksel olarak bunun sınırda anlamlı olduğu saptanmıştır ($p=,055$).

Çizelge 4.5. Pasif Sakınma Test Düzeneginde $AlCl_3$ alan ilaçlı grup ve kontrol grubunun geçirdiği sürelerin (sn) karşılaştırılması (Veriler normal dağılım gösterenler için Ort $\pm$ SS, normal dağılım göstermeyenler için Med $\pm$ IQR olarak verilmiştir)

Gruplar	1.gün aydınlık kutuda geçen süre (Med. $\pm$ IQR) (sn)	2.gün aydınlık kutuda geçen süre ($\bar{x} \pm$ STD) (sn)	2.gün karanlık kutuda geçen süre (Med. $\pm$ IQR) (sn)
Kontrol (n=15)	27,0 $\pm$ 23,0	268,8 $\pm$ 42,7	7,0 $\pm$ 62,0
$AlCl_3$ alan ilaçlı grup (n=23)	27,0 $\pm$ 37,0	286,9 $\pm$ 34,7	0,0 $\pm$ 0,0
p değeri	0,836	0,159	0,055

Pasif sakınmada cinsiyetler arası farka bakıldığında, $AlCl_3$ alan ilaçlı grupta aydınlık kutuda geçirilen zaman açısından erkek ve dişi farelerde istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunmuştur ($p < 0,05$) (Çizelge 4.6). Kontrol grubuna ait erkek ve dişi fareler arasında istatistiksel yönden anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0,05$).

Çizelge 4.6. Pasif Sakınma Test Düzeneginde erkek ve dişi farelerin geçirdikleri süre bakımından (sn) karşılaştırılması (Veriler normal dağılım gösterenler için Ort $\pm$ SS, normal dağılım göstermeyenler için Med $\pm$ IQR olarak verilmiştir)

Gruplar	1.gün aydınlık kutuda geçen süre (Med. $\pm$ IQR) (sn) p	2.gün aydınlık kutuda geçen süre ($\bar{x} \pm$ STD) (sn) p	2.gün karanlık kutuda geçen süre (Med. $\pm$ IQR) (sn) p
Kontrol Erkek (n=9)	27,0 $\pm$ 10,0	256,1 $\pm$ 48,6	21,0 $\pm$ 86,0
Kontrol Dişi (n=6)	30,0 $\pm$ 34,0	287,8 $\pm$ 24,6	2,0 $\pm$ 7,0
p	0,102		0,224
$AlCl_3$ alan Erkek (n=12)	27,5 $\pm$ 16,5	298,1 $\pm$ 5,7	0,0 $\pm$ 0,0
$AlCl_3$ alan Dişi (n=11)	26,0 $\pm$ 47,0	274,8 $\pm$ 48,0	0,0 $\pm$ 43,0
p	0,04*		0,566

* $AlCl_3$ alan dişi farelerde anlamlılığı göstermektedir

Pasif sakınma test düzeneginde, farelerin şahlanması (arka iki ayaklarının üzerinde etrafı izlemesi=rearing), donma hareketi (freezing), temizlenme (süslenme=grooming) ve dışkılama (defekasyon) durumları da kaydedilmiştir. Bu davranış parametrelerinden sadece defekasyon açısından $AlCl_3$ alan ilaçlı grupta erkek

ve dişi fareler arasında fark bulunmuştur ($p=,044$). Gruplar arası ve cinsiyetler arası diğer parametreler değerlendirildiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$) (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. Pasif sakınma test düzeneğinde değerlendirilen diğer davranış parametrelerinin sayı olarak karşılaştırılması (Veriler normal dağılım gösterenler için Ort $\pm$ SS, normal dağılım göstermeyenler için Med $\pm$ IQR olarak verilmiştir)

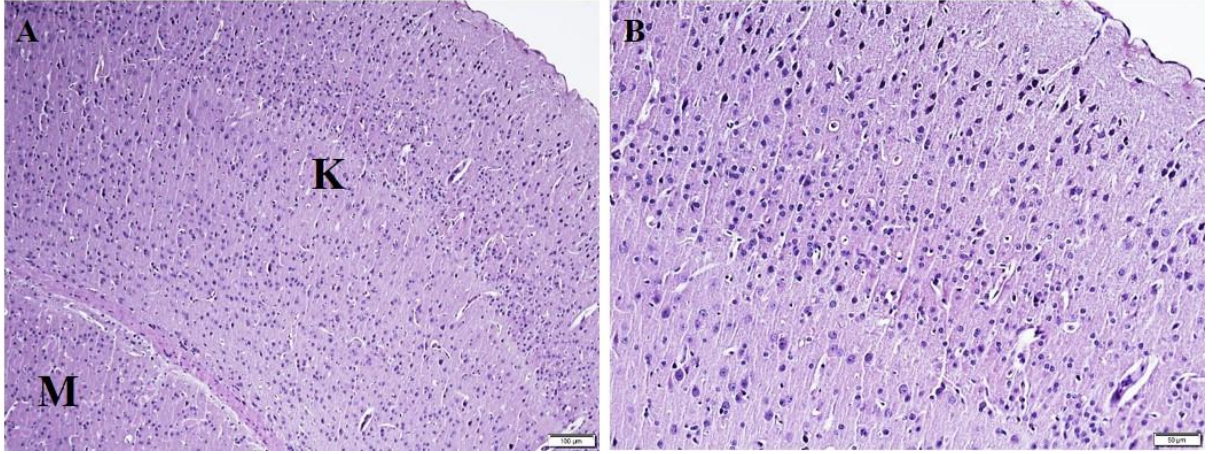
Gruplar	Rearing (Med. $\pm$ IQR) (sayı) p	Freezing (Med. $\pm$ IQR) (sayı) p	Grooming (Med. $\pm$ IQR) (sayı) p	Defekasyon (Med. $\pm$ IQR) (sayı) p
Kontrol Erkek (n=9)	6,0 $\pm$ 5,0	0,0 $\pm$ 2,0	2,0 $\pm$ 3,0	0,0 $\pm$ 1,0
Kontrol Dişi (n=6)	8,5 $\pm$ 3,0	0,5 $\pm$ 1,0	2,0 $\pm$ 2,0	1,5 $\pm$ 2,0
	0,328	0,864	0,864	0,456
AlCl₃ alan Erkek (n=12)	8,0 $\pm$ 12,5	0,0 $\pm$ 2,0	1,5 $\pm$ 1,5	0,0 $\pm$ 1,0
AlCl₃ alan Dişi (n=11)	8,0 $\pm$ 15,0	0,0 $\pm$ 4,0	1,0 $\pm$ 2,0	1,0 $\pm$ 1,0
	0,976	0,880	0,413	0,044*

*AlCl₃ alan dişi farelerde anlamlılığı göstermektedir

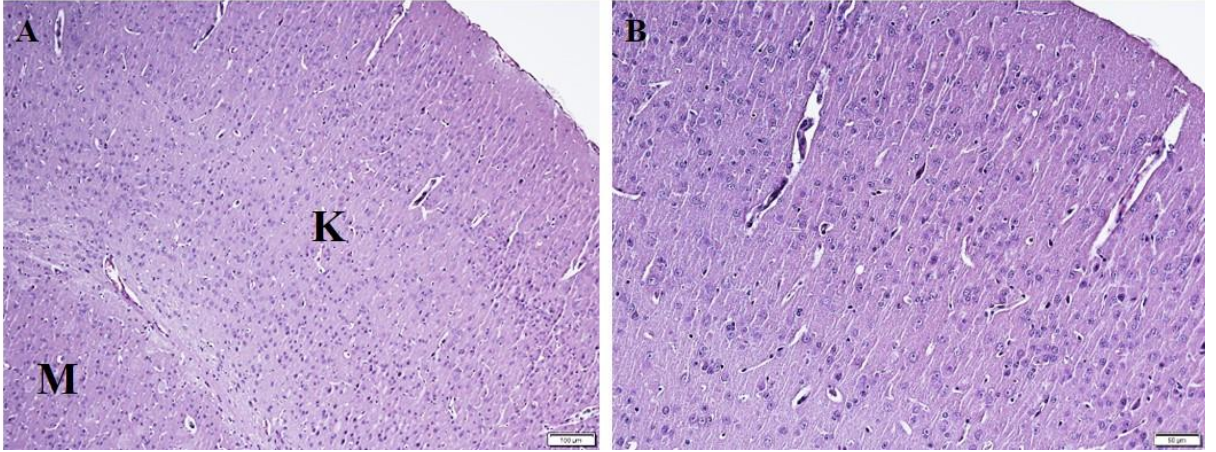
4.5. Histopatolojik Bulgular

4.5.1. Serebral Korteks Histopatolojisi

Tüm gruplara ait serebral korteks bölgeleri hematoxilen-eozin boyaması yapılarak incelendi. Kontrol grubuna ait erkek ve dişi farelerin serebral korteks bölgelerinin histolojik yapısının normal olduğu saptandı. Pia mater'den medullaya kadar stratum granularis eksterna, stratum pyramidalis eksterna, stratum granularis interna, stratum pyramidalis interna ve stratum multiformis olmak üzere altı tabakanın varlığını koruduğu izlendi. Özellikle piramidal nöronların hücre sınırlarının düzgün olduğu, hücre çekirdeğinin yuvarlak ve merkezde yerleşim gösterdikleri görüldü (Şekil 4.1 ve 4.2).

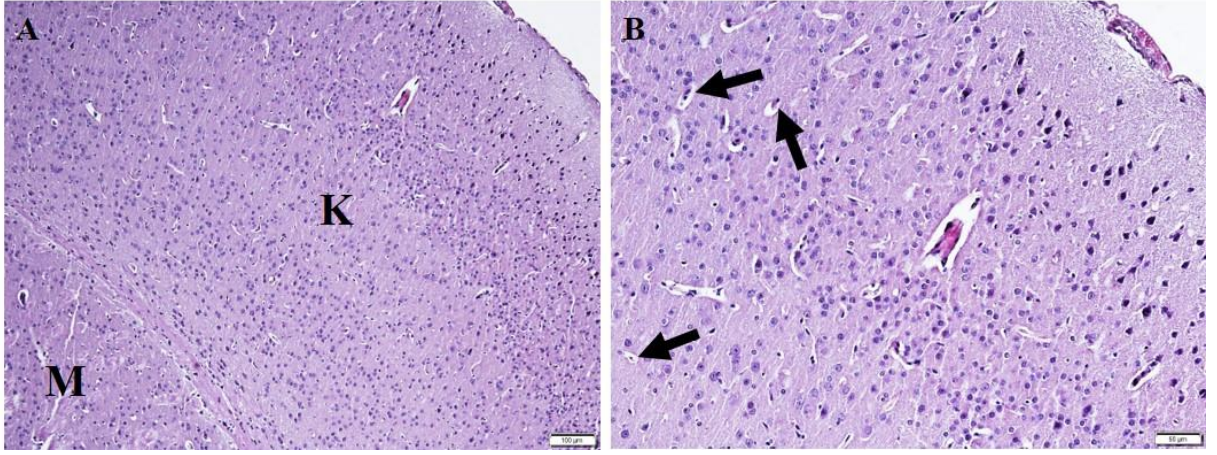


Şekil 4.1. Kontrol grubu dişi farelerin beyin dokusuna ait histolojik görüntüleri, Hematoksilen ve Eozin boyama. K: Korteks, M: Medulla. Büyütmeler: 100 µm (A), 50 µm (B).

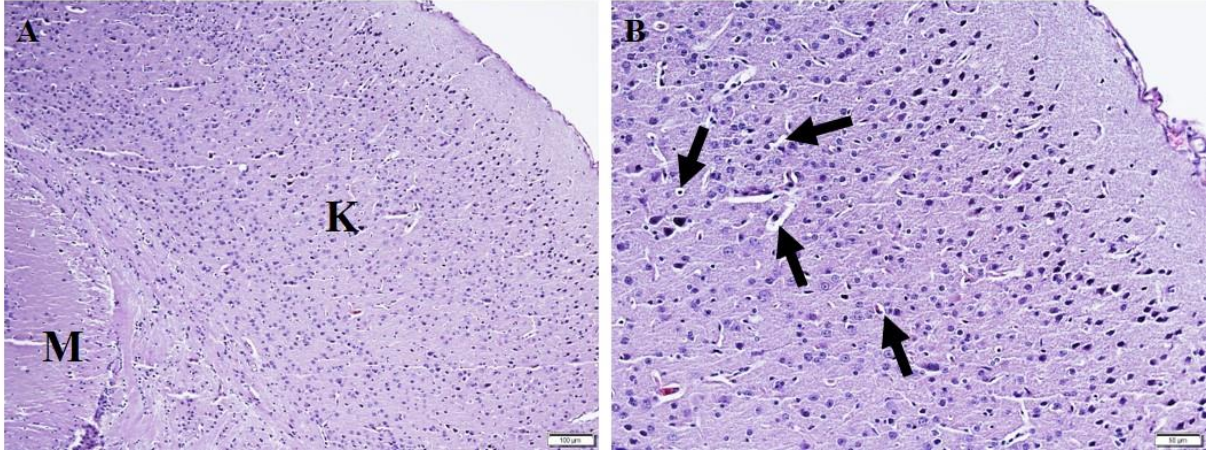


Şekil 4.2. Kontrol grubu erkek farelerin beyin dokusuna ait histolojik görüntüleri, Hematoksilen ve Eozin boyama. K: korteks, M: Medulla. Büyütmeler: 100 µm (A), 50 µm (B).

$AlCl_3$ alan ilaçlı gruplar kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, ilaçlı grupların serebral kortekslerinin altı tabakadan oluştuğu, ancak hücresel hasarların varlığı saptandı. Piknotik çekirdeğe sahip hücre sayısında artış ve serebral vakuollerin oluştuğu görüldü. Dişi ve erkek fareler karşılaştırıldığında, erkek farelere ait serebral kortekste ki hasarın daha fazla olduğu izlendi (Şekil 4.3 ve 4.4).



Şekil 4.3. AlCl_3 alan dişi farelerin beyin dokusuna ait histolojik görüntüleri, Hematoksilen ve Eozin boyama. K: korteks, M: Medulla, Oklar: Serebral vakuoller. Büyütmeler: 100 μm (A), 50 μm (B).

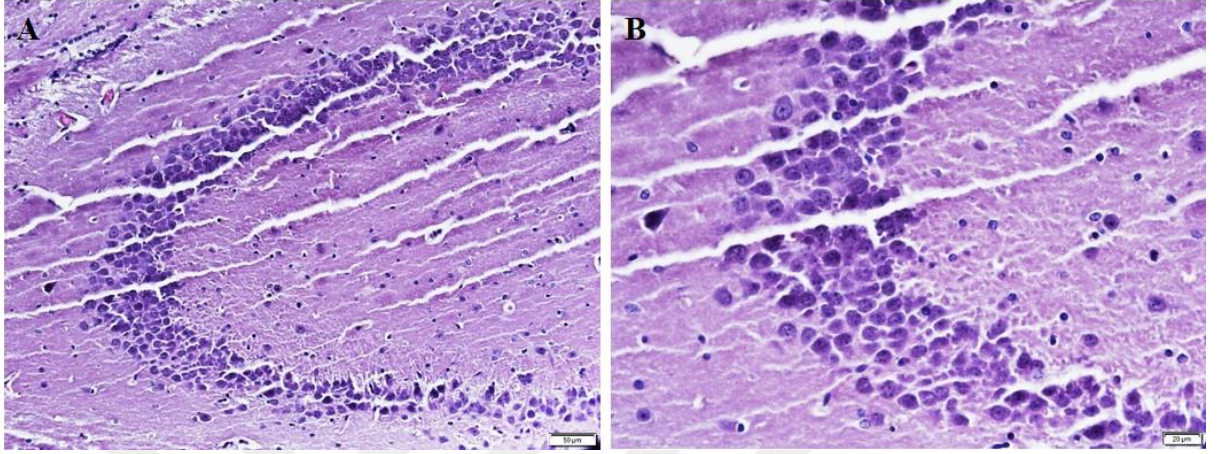


Şekil 4.4. AlCl_3 alan erkek farelerin beyin dokusuna ait histolojik görüntüleri, Hematoksilen ve Eozin boyama. K: korteks, M: Medulla, Oklar: Serebral vakuoller. Büyütmeler: 100 μm (A), 50 μm (B).

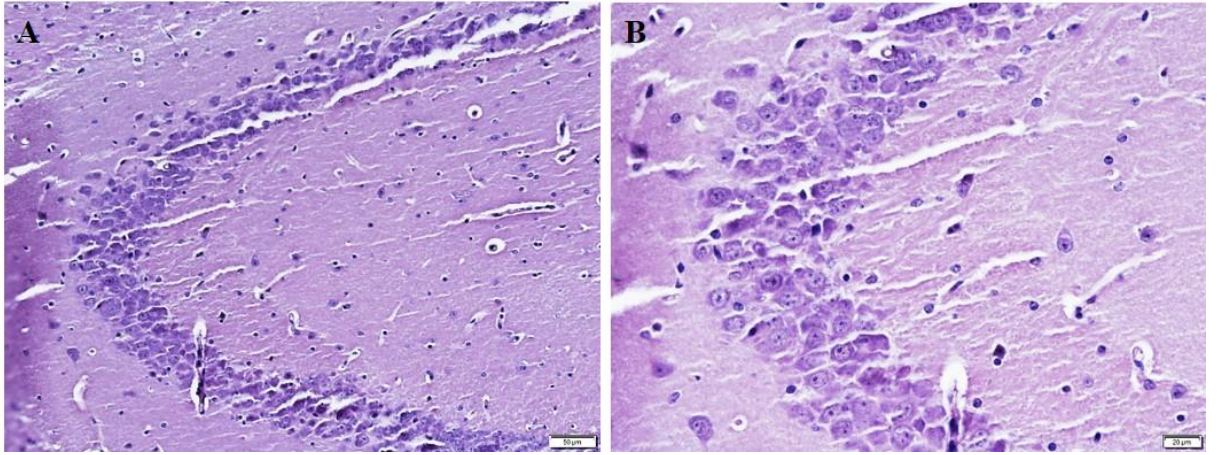
4.5.2. Hipokampus Histopatolojisi

Deney sonrasında alınan beyin dokularında hipokampusun CA1 bölgesi incelenerek gruplar arasındaki farklılıklar ortaya konuldu. Kontrol grubunun erkek ve dişi fareleri incelendiğinde, CA1 bölgesindeki nöronların büyük ökromatik çekirdeğe sahip oldukları ve hücre sınırlarının düzgün olduğu tespit edildi (Şekil 4.5 ve 4.6). AlCl_3 alan ilaçlı gruplara ait CA1 bölgesinde ise, normal görünümlü nöron sayısının azalarak yerini piknotik çekirdekli ve bazofilik boyanmış çekirdeğe sahip nöronların aldığı saptandı. Bazofilik çekirdekli nöronlarda belirgin nörofibriler yumakların olduğu izlendi (Şekil 4.7 ve 4.8). Dişi ve erkek AlCl_3 alan gruplar karşılaştırıldığında

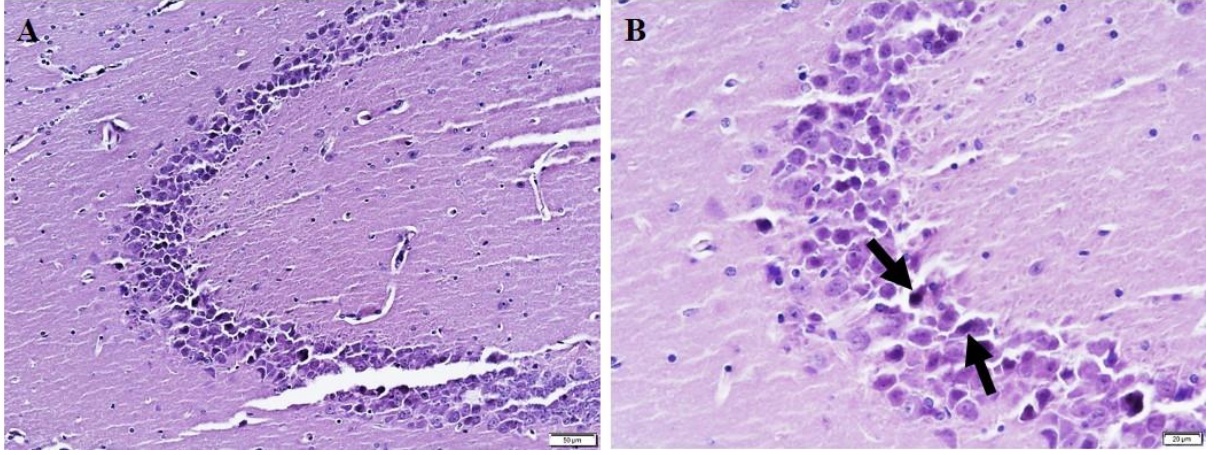
hipokampusun CA1 bölgesindeki histopatolojik bulguların erkek farelerde daha fazla olduğu saptandı.



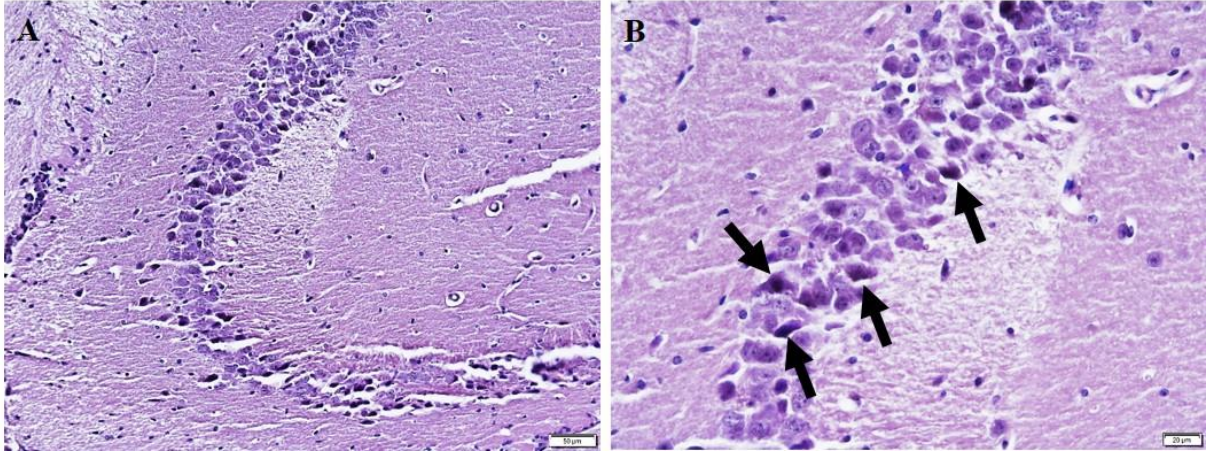
Şekil 4.5. Kontrol grubu dişi farelerin beyinde hipokampus bölgesine ait histolojik görüntüleri, Hematoksilen ve Eozin boyama. K: korteks, M: Medulla. Büyütmeler: 50 µm (A), 20 µm (B).



Şekil 4.6. Kontrol grubu erkek farelerin beyinde hipokampus bölgesine ait histolojik görüntüleri, Hematoksilen ve Eozin boyama. K: korteks, M: Medulla. Büyütmeler: 50 µm (A), 20 µm (B).



Şekil 4.7. AlCl_3 alan dişi farelerin beyinde hippocampus bölgesine ait histolojik görüntüleri, Hematoksilen ve Eozin boyama. K: korteks, M: Medulla, Oklar: Nörofibriller yumaklar. Büyütmeler: 50 μm (A), 20 μm (B).



Şekil 4.8. AlCl_3 alan erkek farelerin beyinde hippocampus bölgesine ait histolojik görüntüleri, Hematoksilen ve Eozin boyama. K: korteks, M: Medulla, Oklar: Nörofibriller yumaklar. Büyütmeler: 50 μm (A), 20 μm (B).

5. TARTIŞMA

AH, bozulmuş biliş, hafıza ve bunama ile karakterize nörodejeneratif bir durumdur [Liu et al. (192)]. Yakın tarihli bir sistematik metaanaliz, dünya çapında 50 milyondan fazla insanın demans hastası olduğunu göstermiştir. ABD’de, 65 yaş üstü ölümlerin nedenleri arasında AH beşinci sırada yer alır. AH’nin etiyolojisi belirsizliğini korumakla birlikte patogenezi açıklayabilmek için amiloid kaskadı, tau ve kolinerjik hipotezler çokça dikkat çekmektedir. Amiloid plaklar, beta amiloid proteinin hücre dışında birikmesiyle oluşurken, nörofibriler yumaklar (NFY) tau proteininin aşırı fosforilasyonu ile oluşur. Bu iki patolojik bulgu, AH’ de beyinde gözlenen en önemli özelliklerdir [Li et al. (193)].

Aβ birikimi, sinaptik hasara, anormal aksonal iletime yol açar, çeşitli mekanizmalar yoluyla nöronal disfonksiyona neden olur ve mitokondri ve golgi aygıtı gibi organellere zarar verir [Arbel-Ornath et al. (194), Choi et al. (195), Joshi et al. (196), Volgyi et al. (197)]. Tau hiperfosforilasyonu ise, sinaptik disfonksiyon dahil olmak üzere mikrotübül stabilitesini tehlikeye atmaktadır [Hoover et al. (198)].

Bilinen AH risk faktörleri hem çevresel hem de genetikdir. Tüm AH’nin yaklaşık % 0,1’ i otozomal dominant kalıtımı yansıtırken (ailesel AH) [Blennow et al. (199)], AH vakalarının büyük çoğunluğunda (sporadik AH) otozomal kalıtım saptanmamıştır [Strittmatter et al. (200)]. Aβ peptitlerinin üretimi ve temizlenmesi arasındaki dengesizlikten kaynaklanan Aβ tortularının, AH’de erken ve sıklıkla başlatıcı bir faktör olabileceği düşünülmektedir [Selkoe and Hardy (201)].

Çevresel kirleticilere maruz kalma, AH dahil olmak üzere birçok hastalık için önemli bir risk faktörü haline gelmiştir. Birçok epidemiyolojik ve toksikolojik çalışma, metal kirleticilerin insan ve hayvanların bilişsel yeteneklerini etkilediğini ve AH patogenezinde önemli roller oynadığını göstermiştir [Liu et al. (192)]. Yapılan çalışmalarda alüminyuma maruz kalmanın, AH’ ye yol açabildiği gösterilmiştir [Oshima et al. (202)]. Yine yapılan çalışmalarda 60 yaş üzeri AH hastalarında yüksek kan kadmiyum seviyelerinin mortaliteyi artırdığı [Min and Min (203)], diğer metallerin de (kurşun, manganez ve arsenik) AH’ ye yol açtığı bildirilmiştir [Huat et al. (204)]. Örneğin kurşunun, farelerde APP ekspresyonunu ve sonuçta Aβ sentezini önemli ölçüde artırdığı gösterilmiştir [Zhou et al. (205)]. Manganezin in vitro olarak yapılan

çalışmalarda tau hiperfosforilasyonunu indüklediği [Cai et al. (206)]; kurşun, arsenik ve kadmiyumun fare beyinde A β ekspresyonunu sinerjik olarak artırdığı bildirilmiştir [Ashok et al. (207)]. Alüminyum her ne kadar canlı organizmalar için zorunlu bir element olmasa da çevremizde, evimizde bol miktarda bulunmaktadır. Nörotoksitesini bildirildikçe bu metale olan ilgi günden güne artmaktadır [Yokel (208)]. Alüminyumun biyoyararlanımı, kan-beyin bariyerini geçme yeteneği ve beyinden nispeten yavaş eliminasyon hızı, artan bir nörotoksikolojik riski oluşturmakta ve alüminyumun beyinde birikmesini hızlandırmaktadır [Priest (209)]. Bu nedenle, alüminyum yaşlanmaya bağlı değişikliklerde ve çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda rol oynamaktadır [Deloncle et al. (210), Kawahara (211)]. Alüminyum nörotoksitesinin, beyinde oksidatif hasarı artırmasından kaynaklandığı düşünölse de, nöronal hasara neden olan moleküler mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır [Moumen et al. (212), Zatta et al. (213)].

Alüminyum beyne kan-beyin bariyerinden girer. Yapılan bir çalışmada 4 hafta boyunca oral alüminyum klorür uygulaması ile, araştırılan tüm beyin bölgelerinde (beyincik, ventral orta beyin, korteks, hipokampus ve striatum) alüminyum konsantrasyonunda önemli bir artışın olduğu bildirilmiştir [Iglesias et al. (214)]. Bu sonuçlar, hem tüm beyinde [Sahin et al. (215)] hem de beyin belirli bölgelerinde [Gupta and Shukla (216), Roig et al. (217)] alüminyum konsantrasyonunda bir artış bildiren ve bazı yazarlar tarafından gözlemlenen motor koordinasyondaki bozulmayı açıklamaya katkıda bulunan önceki çalışmalarla uyumludur [Sahin et al. (218)].

Suh &Checler' in 2002 yılında yaptıkları çalışmaya göre, 2050 yılına kadar dünya genelinde 80 yař üstü insan sayısının 370 milyona yaklaşacağı ve 85 yaşından büyüklerin yarısının AH'ye yakalanacağı tahmin edilmektedir [Suh and Checler (219)]. Maalesef farmakolojik tedaviler, AH semptomlarına yol ačan nöron hasarı ve yıkımını durdurmakta yeterli değildir [Association (220)]. Acil olarak hastalığı önleyecek, başlamasını geciktirecek ya da hastalığın ilerlemesini durduracak tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Cummings ve ark. yaptıkları çalışmada, AH'nin semptomatik evrelerinde etkili olarak kognitif iyileşmeyi sağlayan, hastaların nöropsikiyatrik belirtilerini düzelten tedavilere ve böylece hafıza ve davranışın iyileştirilmesine ihtiyaç duyulduğunu bildirmişlerdir [Cummings ve ark. (221)]. İşte bu sebeplerden, AH'nin bilinmeyen yönlerinin açığa çıkarılması önemlidir.

Bu bilgiler ışığında $AlCl_3$ kullanılarak deneysel Alzheimer modeli oluşturulan farelerde motor koordinasyonlarını değerlendirebilmek amacıyla rota rot, davranışlarını ve anksiyetesini değerlendirebilmek amacıyla yükseltilmiş artı labirent testi, uzun süreli hafızalarını değerlendirebilmek amacıyla ise pasif sakınma testi uygulanmıştır. Son olarak da farelerin beyin dokularında korteks ve hipokampusun CA1 alanları incelenerek farklılıklar saptanmıştır. Literatür taraması yapıldığında çeşitli yöntemlerle gerçekleştirilen deneysel Alzheimer modellerine rastlanmıştır. Bu çalışmada $AlCl_3$ kullanılarak Alzheimer modeli oluşturulmak istenmesinin sebebi, insanların günlük hayatta da gerek mutfak eşyalarında, gerekse yiyecek ve ilaçlar yoluyla alüminyuma maruz kalmalarıdır. $AlCl_3$ kullanılarak gerçekleştirilen AH modellerinde de farklı süreler, farklı doz uygulamaları ve hatta $AlCl_3$ 'ün veriliş şekli konusunda makaleler taranmıştır. Burada AH' nın kronik bir hastalık olması ve alüminyum maruziyetinin farkedilmeden gerçekleşmesi sebebiyle, $AlCl_3$ 'ün uzun süreli ve oral olarak verilmesi planlanmıştır. Böylece oluşturulan model, günlük yaşamla paralel bir seyir gösterecektir. Deneylere başlamadan önce farelere verilecek $AlCl_3$ dozunu saptamak amacıyla literatür taramasına ek olarak, ön çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar sırasında farelere 400 mg/kg, 200 mg/kg, 100 mg/kg ve 50 mg/kg $AlCl_3$ verilmiştir. Ancak 400 mg/kg ve 200 mg/kg dozlarında farelerin öldüğü, 100 mg/kg dozunda ise morfolojik görünümünün hastalıklı hal alması sebebiyle 50 mg/kg dozunda karar kılınmıştır. Oral yolla verilerek de günlük yaşamda farkedilmeden ve uzun süreli $AlCl_3$ alımı taklit edilmiştir.

Üç aylık $AlCl_3$ maruziyetinin ardından davranış ve öğrenme-bellek testleri yapılmıştır. Rota rot testi ile yapılan deneylerde $AlCl_3$ alan ilaçlı grup ve kontrol grubu farelerin motor koordinasyonlarının bozulmadığı gözlenmiştir. $AlCl_3$ 'ün oral olarak verilmesi buna sebep olarak düşünülebilir. Alüminyum klorürün oral yolla verilmesi sonucu organizmada biriken ve organizmadan atılan miktar dengesi, intraperitoneal yolla verilmesinden farklı olacaktır. Uygulanan metot günlük yaşama paralel seyrettiğinden, insanların günlük hayatlarında alüminyuma maruz kalmaları genellikle oral yoldan (yenilen gıdaların korunmasında, boyanmasında ve ilaçlarda kullanılan alüminyum) olmaktadır ve neredeyse her yaştan insan alüminyuma maruz kalmaktadır. Ancak motor koordinasyon bozukluğu alüminyuma maruz kalan tüm bireylerde gözlenmemektedir. Bu anlamda AH'nin ilk ve orta evrelerinde motor koordinasyonu

bozulmamaktadır. Uygulanan yöntem ve $AlCl_3$ dozu ile farelerde motor koordinasyon bozukluğuna rastlanmasa da, $AlCl_3$ 'ün farklı bir yolla ya da farklı dozlarda uygulanması ile yapılacak olan deneyler motor koordinasyonu değerlendirme konusuna açıklık getirecektir.

Çalışmamızda kontrol ve $AlCl_3$ alan ilaçlı farelerde; keşif, anksiyete ve motor davranışları ile uzamsal öğrenme ve belleği değerlendirmek amacı ile yükseltilmiş artı labirent testi kullanıldı. Doğal yaşamlarında fareler yabancı gördükleri ortamı koklayarak ve gezinerek keşfetmeye, kendilerini güvende hissetmezlerse, korku ve kaygıları artarsa da kapalı/karanlık bir ortama girmeyi tercih ederler. Bu çalışmada kontrol ve $AlCl_3$ alan farelerde, aydınlık kolda kalma süreleri ikinci gün azalırken karanlık kolda kalma süreleri ikinci gün artmıştır. Buna rağmen, kontrol grubu farelerde aydınlık kolda geçirilen sürenin azalması ve karanlık kolda geçirilen sürenin artması istatistiksel yönden anlamlı bulunmuştur. Kontrol grubu fareler hayatlarında ilk kez karşılaştıkları ve yerden 50 cm yüksekte bulunan bir labirenti gezerek kendilerini güvensiz hissetmiş, kaygıları artmış, sonuçta kapalı/karanlık kola girerek ve bir kenara yaslanarak hareketsiz durmayı tercih etmişlerdir. Birinci gün tanıştıkları ve keşfettikleri bu düzenek ile ikinci gün karşılaştıklarında kaygı düzeyleri arttığı için kendilerince güvenli buldukları kapalı alana girip, daha uzun süre kalmışlardır. $AlCl_3$ alan ilaçlı fareler ilk gün açık kolda gezip, keşfetme ihtiyacını gidermiş ve yine kapalı kola girmiştir. Ancak ikinci gün açık kola bırakıldıklarında yine ilk kez labirentle karşılaşmış gibi gezinme/ keşfetme hareketlerini tekrarlamışlardır. İki gün arasında süreler karşılaştırıldığında, açık kolda ikinci gün daha kısa süre kalmış olsalar da, istatistiksel açıdan fark bulunamamıştır. Bu $AlCl_3$ alan farelerin kaygı düzeylerinin değişmediği şeklinde yorumlanabilir. Öğrenme ve bellek açısından değerlendirildiğinde, kapalı kolu bulma süresinin kısalması hafıza güçlendirme etkisini gösterir. Bu sürenin uzaması amneziyi işaret eder. Skopolaminle yapılan AH modelinde, bu geçiş süresinin uzadığı bulunmuştur [Hlíák and Krejčí (222), Çelebi (21)]. Bulgularımız bu anlamda literatürle uyumludur. Kontrol grubu farelerin kapalı kolu bulma süresi, $AlCl_3$ alan ilaçlı gruba kıyasla daha kısadır. Bu da $AlCl_3$ maruziyetinin unutkanlığı tetiklediği şeklinde yorumlanabilir.

Cinsiyetler açısından bakıldığında kontrol grubu fareler arasında herhangi bir fark bulunmazken, $AlCl_3$ alan ilaçlı grupta istatistiksel yönden anlamlı bir fark bulunmuştur.

Aydınlık ve açık kolda erkek fareler daha uzun süre gezinirken, dişi farelerde bu sürenin daha kısa olduğu gözlenmiştir. Karanlık ve kapalı kolda dişi fareler erkek farelere göre daha fazla vakit geçirmiştir. Bu sonuçlarla dişi farelerin, erkek farelerden daha kaygılı ve anksiyete düzeylerinin daha yüksek olduğu ifade edilebilir. Ancak kontrol grubunda böyle bir fark görülmediğinden, cinsiyetler arası görülen bu farkın $AlCl_3$ maruziyetinden kaynaklandığı düşünülebilir. Nitekim Alzheimer toplumunda kadınlarda daha fazla görülmektedir. Yine öğrenme-bellek açısından değerlendirildiğinde, erkek farelerde hafızanın dişi farelere nazaran daha fazla bozulduğu görülmüştür.

Pasif sakınma testinde emosyonel öğrenme ve bellek tayini değerlendirildi. Çalışmanın bulgularına göre, aydınlık alanda kalma süreleri bakımından $AlCl_3$ alan ilaçlı grup ve kontrol grubu arasında istatistiksel bakımdan anlamlı bir fark bulunamadı. Buna rağmen $AlCl_3$ alan ilaçlı grubun, kontrol gruba kıyasla aydınlık alanda daha uzun süre kaldığı gözlemlendi. Bunun sebebi $AlCl_3$ ' e maruz kalan farelerde, tıpkı yükseltilmiş artı labirent testinde olduğu gibi kaygı düzeylerinin değişmediği yönünde olabileceği gibi, uygulanan $AlCl_3$ dozunun uzun süreli belleği bozmaya yeterli olmamasından da kaynaklanabilir. Kapalı kutuda geçirilen süre bakımından sınırda anlamlılık gözlemlendi. Deneyin daha fazla sayıda fare ile yapılmasının sonucu anlamlı hale getirebileceği düşünülmektedir. Literatürde AH modeli oluşturulan farelerde, kontrol grubuna kıyasla daha kısa sürede kapalı kutuya girdikleri, bunun da bellek bozukluğuna işaret ettiği şeklinde yorumlanan çalışmalar bulunmaktadır [Çelebi (21), SoukhakLari et al. (223), Moosavi et al. (224)]. Bu çalışmanın bulgularında kontrol grubunun kapalı kutuya daha önce girdiği gözlenmektedir. Literatürle çelişen bu duruma açıklık getirmek, $AlCl_3$ 'ün i.p. olarak ya da daha farklı dozlarda verilmesi sağlanarak, pasif sakınma testinin tekrarlanması ile mümkün olabilir. Böylece akut alüminyum toksisitesinin bellek üzerindeki etkisi konusunda daha net bulgular ortaya çıkacaktır.

Cinsiyetler arası farka bakıldığında, $AlCl_3$ alan ilaçlı grupta istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. Bu sonuçlara göre dişi fareler kapalı kutuya daha erken girerken, erkek fareler daha uzun süre aydınlık kutuda kalmışlardır. Buradaki bulgular, yükseltilmiş artı labirentteki bulguları destekler niteliktedir. Dişi farelerde stres düzeyi erkek farelere nazaran daha fazla olup, karanlık bölgeye girme isteği artmıştır. Ancak aldıkları elektrik şokuna rağmen, ikinci gün yine dişi fareler erkek farelerden önce kapalı kutuya girmişlerdir. Bu bulgulara dayanarak, Alzheimer modeli geliştirilen dişi

farelerde uzun süreli belleğin erkek farelere kıyasla daha fazla bozulduğu düşünülebilir. Ancak sonraki çalışmalarda, daha fazla sayıda fare ile akut ve kronik AH modeli oluşturulup, farklı dozlarda $AlCl_3$ 'ün uzun süreli belleği nasıl etkilediği gözlenebilir. Bu sayede farklı dozlarda alüminyum verilmesiyle, bellek bozukluğuna yol açan eşik seviye de belirlenebilir.

Pasif sakınma testinde değerlendirilen diğer davranışsal parametrelere bakıldığında ayağa kalkma (şahlanma=rearing), donma (hareketsiz kalma=frezing), temizlenme (süslenme=grooming) ve dışkılama (defekasyon) sayıları açısından gruplar ve cinsiyetler arası fark değerlendirildiğinde, sadece defekasyon açısından $AlCl_3$ alan ilaçlı grupta cinsiyetler arası fark anlamlı bulunmuştur. Alzheimer modeli oluşturulan dişi farelerin defekasyon sayısı erkek farelerden yüksek bulunmuştur. Defekasyon sayısı stres düzeyi ile paralellik gösterir. Burada dişi farelerin daha yüksek defekasyona sahip olması, dişilerin stres düzeyinin yüksekliğini doğrular niteliktedir.

Çalışmanın histolojik sonuçlarına göre kontrol ve $AlCl_3$ alan ilaçlı grupların hem korteks hem de hipokampus bölgeleri karşılaştırıldığında, kontrol grubunun histolojik yapısı normalken, $AlCl_3$ alan ilaçlı grupta hücrelerin hasar gördüğü, piknotik çekirdekli hücre sayısında artış olduğu gözlenmiştir. Hipokampus CA1 bölgesinde normal görünümlü nöronların sayısında azalma saptanmıştır. Alzheimer modeli oluşturulan ilaçlı grupta, hipokampusta bazofilik çekirdekli nöronlarda belirgin olarak NFY' ler görülmüştür. Yapılan çalışmalarda, Alzheimer modeli oluşturulan farelerin beyin incelemelerinde hipokampus CA1 bölgesinde nöronal yoğunluğun azaldığı gösterilmiştir [Nakanishi et al. (225)]. Yine başka bir çalışmada AH' li hastalarda CA1 ve CA3 bölgesinde, özellikle CA1 bölgesinde hipokampal nöron yoğunluğunun azaldığı bildirilmiştir [Padurariu et al. (226)]. Bu çalışmalarda gözlemlenen sonuçlar, çalışmamızı destekler niteliktedir.

Histopatolojik incelemelerde cinsiyetler arası farka bakıldığında kontrol grubunda bir değişiklik gözlenmezken, $AlCl_3$ alan ilaçlı grupta erkek ve dişi farelerde korteks ve hipokampusun CA1 bölgesinde hasar gözlenmekle birlikte, erkek farelerde bu hasarın daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç, erkek farelerde hafızanın dişilere göre daha fazla bozulmasını açıklar niteliktedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

AH kronik nörodejeneratif bir hastalıktır. Oluşturulacak deney hayvan modeli seçilirken kronik bir model olması hedeflendi. Aynı zamanda vücuda alüminyum girişinin, tıpkı günlük hayattaki maruziyeti taklit edebilmesi açısından yavaş ve uzun süreli (kronik) alımı sağlandı. Çeşitli endüstriyel uygulamalar ile (gıda koruyucu, renk verici, mutfak eşyalarında hammadde, deodorantlar, ilaçlar, vs.) maruz kalınan alüminyum, kan-beyin bariyerini geçebilmekte ve beynin farklı bölümlerine dağılarak nörotoksik etki yapmaktadır. Alüminyumun beyinde meydana getirdiği toksik etkileri; beyin oksidatif hasarı, nöron ölümü, kolinerjik nöronların bozulması ve amiloid birikimi, ardından öğrenme ve hafıza bozukluğu olarak karşımıza çıkmaktadır.

Çalışmamızda, alüminyum maruziyetinin davranışlarda değişiklik meydana getirdiği, öğrenme ve belleği olumsuz yönde etkilediği bulunmuştur. Histopatolojik incelemelerle de beyindeki değişiklikler gösterilmiştir. Çalışmanın sonundaki öneriler şu şekildedir;

1. Sonraki çalışmalarda, $AlCl_3$ farklı dozlarda uygulanarak, oluşabilecek davranış, öğrenme ve bellek değişimlerini araştırmak hedeflenebilir. Böylece özellikle öğrenme ve belleği olumsuz etkileyen alüminyumun eşik dozu saptanarak, endüstride ve günlük hayatta kullanımı sınırlandırılabilir.
2. Günlük hayatta herhangi bir şekilde yüksek dozda alüminyuma maruz kalan bireylerde, AH gelişme riski göz önünde tutulmalıdır.
3. Endüstride, gıdada ve içme sularında sıklıkla alüminyum miktarı takip edilmelidir.
4. $AlCl_3$ 'ün farklı yollardan uygulaması yapılarak, oluşabilecek davranış, öğrenme ve bellek değişimlerini araştırmak hedeflenebilir. Böylece alüminyumun akut ve kronik birikiminin etkileri, bu etkilerin davranışa özellikle de öğrenme ve belleğe yansması ortaya konabilir.

KAYNAKLAR

1. **Alzheimer's Disease International World Alzheimer Report.** The Global Economic Impact Of Dementia. Published by *Alzheimer's Disease International*. Semptember, **2010**.
2. **Sonkusare SK, Kaul CL, Ramarao P.** Dementia of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders—memantine, a new hope. *Pharmacol Res.* **2005**; 51(1): 1–17.
3. **Haass C, Selkoe DJ.** Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2007**; 8(2): 101-112.
4. **Chong ZZ, Li F, Maiese K.** Stress in the brain: Novel cellular mechanisms of injury linked to Alzheimer's disease. *Brain Res Rev.* **2005**; 49(1): 1-21.
5. **Pratico D.** Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease: A reappraisal. *Trends Pharmacol Sci.* **2008**; 29(12): 609-615.
6. **Salminen A, Ojala J, Kauppinen A, Kaarniranta K, Suuronen T.** Inflammation in Alzheimer's disease: Amyloid- β oligomers trigger innate immunity defence via pattern recognition receptors. *Prog Neurobiol.* **2009**; 87(3): 181-184.
7. **Hynd MR, Scott HL, Dodd PR.** Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* **2004**; 45(5): 583-595.
8. **Qiu C, Kivipelto M, Von Strauss E.** Epidemiology of Alzheimer's Disease: Occurrence, Determinants, and Strategies Toward Intervention. *Dialogues in Clinical Neuroscience.* **2009**; 11(2): 111.
9. **Louis ED, Mayer SA, Rowland LP.** Merrit's Neurology. **2016**; Thirteenth Edition.
10. **Matura S, Carvalho AF, Alves GS, Pantel J.** Physical exercise for the treatment of neuropsychiatric disturbances in Alzheimer's dementia: possible mechanisms, current evidence and future directions. *Curr Alzheimer Res.* **2016**; 13: 1112-23.
11. **Tramutola A, Lanzillotta C, Perluigi M, Butterfield DA.** Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease. *Brain Res Bull.* **2016**; S0361-9230: 30129-0.
12. **Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, et al.** Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* **2015**; 14: 388-405.

13. **Mesulam MM.** A plasticity-based theory of the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci.* **2000**; 924: 42-52.
14. **Çınar N.** Alzheimer Hastalığında Epidemiyoloji ve Klinik Bulgular. *Türkiye Klinikleri Journal of Neurology Special Topics.* **2012**; 5(3): 1-6.
15. **Lazariciu I.** Economic Evaluations of Alzheimer's Disease Medications-Review and an Application, Master Thesis, McGill University Department of Mathematics and Statistics, **2004**, Montreal.
16. **Acosta D, Wortmann M.** What is dementia? in M. Prince (Ed.), J. Jackson (Ed.), *Alzheimer's Disease International World Alzheimer Report*, **2009**; ss. 14-21, London: Alzheimer's Disease International (ADI).
17. **Alzheimer's Association.** Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia.* **2019**; 15(3): 321–387.
18. **Katzman R.** The prevalence and malignancy of alzheimer disease: A major killer. *Archives of Neurology.* **1976**; 33(4): 217–218.
19. **Talwar P, Sinha J, Grover S, Rawat C, Kushwaha S, Agarwal R, et al.** Dissecting Complex and Multifactorial Nature of Alzheimer's Disease Pathogenesis: a Clinical, Genomic, and Systems Biology Perspective, *Molecular Neurobiology.* **2016**; 53(7): 4833–4864.
20. **Eroymak S, Yiğit V.** Alzheimer hastalığının maliyet analizi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi.* **2017**; 4(29): 167-196.
21. **Çelebi A.** Farelerde skopolamin ile oluşturulan demans modelinde agomelatin'in etkilerinin araştırılması. Yüksek lisans tezi, **2019**.
22. **Ertekin A, Demir R, Özdemir G, Özel L, Özyıldırım E, Ulvi H.** An Investigation of the Risk Factors and Prevalence of Alzheimer's Disease in the Eastern Region of Turkey: A Population Based Door-to-Door Survey. *European Journal of General Medicine.* **2015**; 12(2): 144-151.
23. **Rosow K, Holzapfel A, Karlawish JH, Baumgart M, Bain LJ, Khachaturian AS.** Countrywide Strategic Plans on Alzheimer's Disease: Developing the Framework for the International Battle Against Alzheimer's Disease. *Alzheimer's and Dementia.* **2011**; 7(6): 615-621.
24. **Castro DM, Dillon C, Machnicki G, Allegri RF.** The Economic Cost of Alzheimer's Disease: Family or Public-Health Burden?. *Dementia and Neuropsychologia.* **2010**; 4(4): 262-267.
25. **World Alzheimer Report.** The Global Impact of Dementia: An Analysis of Prevalence, Incidence, Cost And Trends. London, *Alzheimer's Disease International (ADI).* **2015**.

26. **Wimo A, Ballard C, Brayne C, Gauthier S, Handels R, Jones RW, et al.** Health Economic Evaluation of Treatments for Alzheimer's Disease: Impact of New Diagnostic Criteria. *Journal of Internal Medicine*. **2014**; 275(3): 304-316.
27. **Alzheimer's Association.** Alzheimer's Disease Facts and Figures Includes a Special Report on Disclosing a Diagnosis of Alzheimer's Disease. *New York: Alzheimer's Association Public Policy Office*. **2015**.
28. **Winblad B, Wimo A, Almkvist O.** Outcome Measures in Alzheimer's Disease: Do They Go far Enough?. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*. **2000**; 11(1): 3-10.
29. **Winblad B, Wimo A.** Assessing the Societal Impact of Acetylcholinesterase Inhibitor Therapies. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*. **1999**; 13: S9-S19.
30. **Karaman Y.** Alzheimer hastalığı ve diğer demanslar. 1. Baskı. Ankara, *Lebib Yalkın Matbaası*. **2002**.
31. **Terry RD, Katzman R, Bick KL, Sisodia SS.** Alzheimer hastalığı. Çeviri editörü İ. Hakan Gürvit. *Yelkovan Yayıncılık*. İstanbul. **2001**.
32. **Yamada M.** Prevalance and risk of dementia in the japanese population. REFR adult heath study. *JAGS*. **1999**; 47: 189-195.
33. **Launer LJ.** Rates and risk for dementia and Alzheimer disease. Resaults from EURODEM pooled analysis. *Neurology*. **1999**; 78-84.
34. **Struys-Ponsar C, Kerkhofs A, et al.** Effects of Aluminum Exposure on Behavioral Parameters in the Rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. **1997**; 56(4): 643-648.
35. **Obulesu M, Rao DM.** Animal models of Alzheimer's disease: an understanding of pathology and therapeutic avenues. *Int J Neurosci*. **2010**; 120(8): 531-7.
36. **Nee LE, Eldridge R, Sunderland T, et al.** Dementia of the Alzheimer type: Clinical and family study of 22 twin pairs. *Neurology*. **1987**; 37: 359.
37. **Goudsmit J, White BJ, Weitkamp LR, et al.** Familial Alzheimer's disease in two kindreds of the same geographic and ethnic origin. *J Neurol Sci*. **1981**; 49: 79.
38. **Silverman JM, Raiford K, Edland S, et al.** The consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD). *Neurology*. **1994**; 44: 1253.
39. **Gao S, Hendrie HC, Hall KS, Hui S.** The relationships between age, sex, and the incidence of dementia and Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry*. **1998**; 55(9): 809-15.

40. **Wang XP, Ding HL.** Alzheimer's disease: epidemiology, genetics, and beyond. *Neurosci Bull.* **2008**; 24(2): 105- 9.
41. **Williamson J, Goldman J, Marder KS.** Genetic aspects of Alzheimer disease. *Neurologist.* **2009**; 15(2): 80-6.
42. **Ertekin TN.** Genetics of Alzheimer's disease: a centennial review. *Neurol Clin.* **2007**; 25(3): 611-67.
43. **Maccioni RB, Muñoz JP, Barbeito L.** The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch Med Res.* **2001**; 32(5): 367-81.
44. **Gilman S.** Alzheimers disease. **1997**; 40(2): 230-45.
45. **Edelberg HK, Wei JY.** The biology of alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev.* **1996**; 91(2): 95-114.
46. **Kok E, Haikonen S, Luoto T, Huhtala H, Goebeler S, Haapasalo H, et al.** Apolipoprotein E-dependent accumulation of Alzheimer disease-related lesions begins in middle age. *Ann Neurol.* **2009**; 65(6): 650-7.
47. **Türkseven Ç.** Alzheimer hastalarının beyin ve iskelet kas hücrelerinde amiloid beta toksisitesi üzerine Huperzin-A'nın etkileri. Yüksek Lisans tezi. Mersin Üniversitesi. **2014**.
48. **Doglio LE, Kanwar R, Jackson GR, Perez M, Avila J, Dingwall C, et al.** Gamma-cleavage-independent functions of presenilin, nicastrin, and Aph-1 regulate cell-junction organization and prevent tau toxicity in vivo. *Neuron.* **2006**; 50 (3): 359-75.
49. **Mozar HN, Bal DG, Howard JT.** Perspectives on the etiology of Alzheimer Disease. *JAMA.* **1987**; 257: 1503-6.
50. **Amaducci LA, Fratiglioni L, Rocca WA.** Risk factors for clinically diagnosed Alzheimer' s Disease: a case-control study of Italian population. *Neurology.* **1986**; 36: 922-31.
51. **Haupt M, Pollmann S, Kurz A.** Symptom progression in Alzheimer's Disease: a case-control study of Italian population. *Neurology.* **1986**; 36: 992-31.
52. **Gao S, Hugh CH, Kathleen SH, Siu H.** The Relationships Between Age, Sex, and the Incidence of Dementia and Alzheimer Disease *Arch Gen Psychiatry.* **1998**; 55: 809-815.
53. **Haupt M, Pallman S, Kurz A.** Symptom progression in Alzheimer' s Disease: relation to onset age and familial aggregation. *Acta Neurol Scand.* **1993**; 88: 349-53.

54. **Ganguli M, Dodge HH, Chen P, Belle S, DeKosky ST.** Ten-year incidence of dementia in a rural elderly US community population: the MoVIES Project. *Neurology*. **2000**; 54(5): 1109–16.
55. **Tyas SL.** Alcohol use and the risk of developing Alzheimer's disease. *Alcohol Res Health*. **2001**; 25(4): 299–306.
56. **Carrasquillo MM, Khan QU, Murray ME, Krishnan S, Aakre J, Pankratz SV, et al.** Late-onset Alzheimer disease genetic variants in posterior cortical atrophy and posterior AD. **2014**; 82(16): 1455-1462.
57. **Nazef K, Khelil M, Chelouti H, Kacimi G, Bendini M, Tazir M, et al.** Hyperhomocysteinemia Is a Risk Factor for Alzheimer's Disease in an Algerian Population. *Arch Med Res*. **2014**; 45(3): 247-250.
58. **Nelson L, Gard P, Tabet N.** Hypertension and Inflammation in Alzheimer's Disease: Close Partners in Disease Development and Progression! *J Alzheimers Dis*. **2014**; 41(2): 331-343.
59. **Mok KY, Jones EL, Hanney M, Harold D, Sims R, Williams J, et al.** Polymorphisms in BACE2 may affect the age of onset Alzheimer's dementia in Down syndrome. *Neurobiol Aging*. **2014**; 35(6): 1513.e1-5.
60. **Wilcock DM, Griffin WS.** Down's syndrome, neuroinflammation, and Alzheimer neuropathogenesis. *J Neuroinflammation*. **2013**; 10: 84.
61. **Cárdenas AM, Ardiles AO, Barraza N, Baéz-Matus X, Caviedes P.** Role of tau protein in neuronal damage in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Arch Med Res*. **2012**; 43(8): 645-654.
62. **Jamshed N, Ozair FF, Aggarwal P, Ekka M.** Alzheimer disease in post-menopausal women: Intervene in the critical window period. *J Midlife Health*. **2014**; 5(1): 38-40.
63. **Kunzler J, Youmans KL, Yu C, Ladu MJ, Tai LM.** APOE modulates the effect of estrogen therapy on A β accumulation EFAD-Tg mice. *Neurosci Lett*. **2014**; 560: 131-136.
64. **Xing Y, Jia JP, Ji XJ, Tian T.** Estrogen associated gene polymorphisms and their interactions in the progress of Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*. **2013**; 111: 53-74.
65. **El Khoury NB, Gratuze M, Papon MA, Bretteville A, Planel E.** Insulin dysfunction and Tau pathology. *Front Cell Neurosci*. **2014**; 8: 22.
66. **Richardson JR, Roy A, Shalat SL, von Stein RT, Hossain MM, Buckley B, et al.** Elevated serum pesticide levels and risk for Alzheimer disease. *JAMA Neurol*. **2014**; 71(3): 284-290.
67. **Grammas P.** Neurovascular dysfunction, inflammation and endothelial activation: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*. **2011**; 26: 2-12.

68. **Wisniewski T, Eduardo C, Ghiso J, Frangione B.** Cerebrospinal fluid inhibits Alzheimer beta-amyloid fibril formation in vitro. *Ann Neurol.* **1993**; 34: 631-3.
69. **Shoji M, Golde TE, Ghiso J.** Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science.* **1992**; 258: 126-9.
70. **Fillit HM, Foley P, Bradford HF.** Auto-immunity to cholinergic specific antigens of the brain in senile dementia of the Alzheimer's type. *Drug Dev Res.* **1988**; 15: 1-9.
71. **Mullan M.** Familial Alzheimer's Disease: second gene focus located. *Br MedJ.* **1992**; 305: 1108.
72. **Szekely CA, Breitner JC, Zandi PP.** Prevention of Alzheimer's disease. *Int Rev Psychiatry.* **2007**; 19(6): 693-706.
73. **Daksat MK.** Damensiyel Sendromlar ve Tedavileri. 1. Baskı. İstanbul: *Cerrahpaşa Yayın Birliği.* **1989**: 72.
74. **Özeren A, Sarıca Y.** Demanslar I. (Tanımı ve klinik bulgular). *Arşiv Derg (Çukurova ÜTF).* **1993**; 2: 153-78.
75. **McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman PR, Price D, Stanlan EM.** Clinical diagnosis of Alzheimer Disease. Report of the NINCDS-ADRDA work group under the auspices of the Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology.* **1984**; 34: 939-44.
76. **Kukull WA, Larson EB, Reifler BV, Lampe TH, Yerby M, Hughes J.** Interrater reliability of Alzheimer Disease (AD) diagnosis. *Neurology.* **1990**; 40: 257-60.
77. **Calsolaro V, Edison P.** Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. *Alzheimers Dement.* **2016**; 12(6): 719-32.
78. **Murphy M.** The molecular pathogenesis of Alzheimer's Disease: clinical prospects. *Lancet.* **1992**; 340: 1512-5.
79. **Sarıca Y, Özeren A.** Demans II. (Tedavi yaklaşımları) *Arşiv Derg. Çukurova ÜTF.* **1993**; 2: 179-97.
80. **Davidson M, Stern RG.** The treatment of cognitive impairment in Alzheimer's Disease. *Psychiat Clin North Am.* **1991**; 14: 461.
81. **Stern Y, Sana M, Mayeux R.** Effects of oral physostigmine in Alzheimer's Disease. *Neurology.* **1987**; 22: 306-10.

82. **Navaratnam DS, Priddle JD.** Anomalous molecular form of acetylcholinesterase in cerebrospinal fluid in histologically diagnosed Alzheimer's Disease brain tissue. *Neurobiol Aging*. **1991**; 337: 447-9.
83. **Parihar MS, Hemnani T.** Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic Interventions. *Journal of Clinical Neuroscience*. **2004**; 11(5): 456-467.
84. **Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK.** The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. **1999**; 66(2): 137-147.
85. **Askarova S, Yang X, Lee J.** Impacts of Membrane Biophysics in Alzheimer's Disease: From Amyloid Precursor Protein Processing to A β Peptide-Induced Membrane Changes. *International Journal of Alzheimer's Disease*. **2011**; 10(4061): 1-12.
86. **Turner PR, O'Connor K, Tate WP, Abraham WC.** Roles of Amyloid Precursor Protein and its Fragments in Regulating Neural Activity, Plasticity and Memory. *Prog. Neurobiol*. **2003**; 70(1): 1-32.
87. **Priller C, Bauer T, Mitteregger G, Krebs B, Kretschmar HA, Herms J.** Synapse Formation and Function is Modulated by the Amyloid Precursor Protein. *J. Neurosci*. **2006**; 26(27): 7212-7221.
88. **Hooper NM.** Roles of proteolysis and lipid rafts in the processing of the amyloid precursor protein and prion protein. *Biochemical Society Transactions*. **2005**; 33(2): 335-338.
89. **Ohnishi S, Takano K.** Amyloid Fibrils from the Viewpoint of Protein Folding. *Cell. Mol. Life Sci*. **2004**; 61(5): 511-24.
90. **Hardy J, Selkoe DJ.** The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. **2002**; 297(5580): 353-356.
91. **Braak H, Braak E.** Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*. **1991**; 82(4): 239-259.
92. **Morgan C, Colombres M, Nunez MT, Inestrosa NC.** Structure and function of amyloid in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*. **2004**; 74(6): 323-49.
93. **Taşkıran ZE, Yılmaz E.** Amiloid birikiminin moleküler temeli ve yeni tedavi yaklaşımları. Derleme. *Hacettepe Tıp Dergisi*. **2007**; 38: 20-25.
94. **Edbauer D, Winkler E, Regula JT, Pesold B, Steiner H, Haass C.** Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat. Cell Biol*. **2003**; 5: 486-488.
95. **Selkoe DJ.** Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature*. **1999**; 399(6738): 23-31.

96. **Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y.** Visualization of A beta 42 (43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42 (43). *Neuron*. **1994**; 13(1): 45-53.
97. **Di Carlo M, Giacomazza D, San Biagio PL.** Alzheimer's disease: biological aspects, therapeutic perspectives and diagnostic tools. *J. Phy: Condens. Matter*. **2012**; 24(24): 1-17.
98. **Cummings JL.** Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. **2004**; 351(1): 56-67.
99. **Wong PT, Schauerte JA, Wisser KC, Ding H, Lee EL, Steel DG, et al.** Amyloid- β Membrane Binding and Permeabilization are Distinct Processes Influenced Separately by Membrane Charge and Fluidity. *J Mol Biol*. **2009**; 386: 81–96.
100. **Verdier Y, Arta Zar M, Penke B.** Amyloid β -Peptide Interactions with Neuronal and Glial Cell Plasma Membrane: Binding Sites and Implications for Alzheimer's Disease. *J. Peptide Sci*. **2004**; 10(5): 229–248.
101. **Goedert M, Spillantini MG, Crowther RA.** Tau Proteins and Neurofibrillary Degeneration. *Brain Pathol*. **1991**; 1(4): 279-286.
102. **Iqbal K.** Tau Pathology in Alzheimer Disease and Other Tauopathies. *Biochim Biophys Acta*. **2005**; 1739(2-3): 198–210.
103. **Mandelkow EM, Mandelkow E.** Tau Protein and Alzheimer's Disease. *Neurobiology of Aging*. **1994**; 15(2): 85-86.
104. **Chun W, Johnson GV.** The Role of Tau Phosphorylation and Cleavage in Neuronal Cell Death. *Front Biosci*. **2007**; 12: 733–756.
105. **Hanger DP, Lau DH, Phillips EC, Bondulich MK, Guo T, Woodward BW, et al.** Intracellular and Extracellular Roles for Tau in Neurodegenerative Disease. *J Alzheimers Dis*. **2014**; 40(1): 37-45.
106. **Duff K, Planel E.** Untangling memory deficits. *Nature Medicine*. **2005**; 11(8): 826-827.
107. **Köpke E, Tung YC, Shaikh S, Alonso ADC, Iqbal K, Grundke-Iqbal I.** Microtubule associated protein tau: abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem*. **1993**; 268(32): 24374–24384.
108. **Tanzi RE.** Tangles and neurodegenerative disease a surprising twist. *N Engl J Med*. **2005**; 353(17): 1853-1855.
109. **Khattoon S, Grundke-Iqbal I, Iqbal K.** Brain levels of microtubule associated protein tau are elevated in Alzheimer's disease brain: a radioimmunoslot-blot assay for nanograms of the protein. *J. Neurochem*. **1992**; 59(2): 750–753.

110. **Alonso ADC, Grundke-Iqbal I, Iqbal K.** Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat. Med.* **1996**; 2(7): 783–787.
111. **Alonso ADC, Grundke-Iqbal I, Barra HS, Iqbal K.** Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of MAP1 and MAP2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**; 94(1): 298–303.
112. **Hardy JA, Higgins GA.** Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* **1992**; 256(5054): 184–185.
113. **Selkoe DJ.** The molecular pathology of Alzheimer's disease, *Neuron.* **1991**; 6(4): 487–498.
114. **Kocahan S, Doğan Z.** Mechanisms of Alzheimer's Disease Pathogenesis and Prevention: The Brain, Neural Pathology, N-methyl-D-aspartate Receptors, Tau Protein and Other Risk Factors., *Clinical psychopharmacology and neuroscience: the official scientific journal of the Korean College of Neuropsychopharmacology.* **2017**; 15(1): 1–8.
115. **Kumar A, Singh A, Ekavali.** A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: An update, *Pharmacological Reports.* **2015**; 67(2): 195–203.
116. **Glenner GG, Wong CW.** Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein, *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **1984**; 120(3): 885–890.
117. **Hardy J.** The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal, *Journal of Neurochemistry.* **2009**; 110: 1129–1134.
118. **Atwood CS, Martins RN, Smith MA, Perry G.** Senile plaque composition and posttranslational modification of amyloid- β peptide and associated proteins, *Peptides.* **2002**; 23: 1343–1350.
119. **Manczak M, Anekonda TS, Henson E, Park BS, Quinn J, Reddy PH.** Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression., *Human molecular genetics.* **2006**; 15(9): 1437–1449.
120. **Prokop S, Miller KR, Heppner FL.** Microglia actions in Alzheimer's disease, *Acta Neuropathologica.* **2013**; 126: 461–477.
121. **Prà ID, Chiarini A, Gui L, Chakravarthy B, Pacchiana R, Gardenal E, et al.** Do Astrocytes Collaborate with Neurons in Spreading the “Infectious” A β and Tau Drivers of Alzheimer's Disease? *The Neuroscientist.* **2015**; 21(1): 9–29.

122. **Pollock NJ, Mirra SS, Binder LI, Hansen LA, Wood JG.** Filamentous aggregates in Pick's disease, progressive supranuclear palsy, and Alzheimer's disease share antigenic determinants with microtubule-associated protein, tau., *The Lancet*. **1986**; 328(8517): 1211.
123. **Calsolaro V, Edison P.** Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions, *Alzheimer's and Dementia*. **2016**; 12(6): 719–732.
124. **Kar S, Issa AM, Seto D, Auld DS, Collier B, Quirion R.** Amyloid β -peptide inhibits high-affinity choline uptake and acetylcholine release in rat hippocampal slices, *Journal of Neurochemistry*. **1998**; 70(5): 2179–2187.
125. **Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, Delon MR.** Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* (New York, NY). **1982**; 215(4537): 1237–1239.
126. **Nordberg A, Alafuzoff I, Winblad B.** Nicotinic and muscarinic subtypes in the human brain: changes with aging and dementia. *Journal of neuroscience research*. **1992**; 31(1): 103–111.
127. **Wilcock GK, Esiri MM, Bowen DM, Smith CCT.** Alzheimer's disease: Correlation of cortical choline acetyltransferase activity with the severity of dementia and histological abnormalities, *Journal of the Neurological Sciences*. **1982**; 57(2): 407–417.
128. **Sims NR, Bowen DM, Allen SJ, Smith CCT, Neary D, Thomas DJ, et al.** Presynaptic Cholinergic Dysfunction in Patients with Dementia. *Journal of Neurochemistry*. **1983**; 40(2): 503–509.
129. **Rylett RJ, Ball MJ, Colhoun EH.** Evidence for high affinity choline transport in synaptosomes prepared from hippocampus and neocortex of patients with Alzheimer's disease, *Brain Research*. **1983**; 289(1): 169–175.
130. **Nilsson L, Nordberg A, Hardy J, Wester P, Winblad B.** Physostigmine restores 3H-acetylcholine efflux from Alzheimer brain slices to normal level, *Journal of Neural Transmission*. **1986**; 67(3): 275–285.
131. **Barage SH, Sonawane KD.** Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease, *Neuropeptides*. **2015**; 52: 1–18.
132. **Bartus RT, Dean RL, Beer B, Lippa AS.** The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction., *Science* (New York, NY). **1982**; 217(4558): 408–414.
133. **Racchi M, Mazzucchelli M, Porrello E, Lanni C, Govoni S.** Acetylcholinesterase inhibitors: novel activities of old molecules. *Pharmacol. Res.* **2004**; 50(4): 441–451.
134. **Lunardi, P, Nardin P, Guerra MC, Abib R, Leite MC, Gonçalves CA.** Huperzine A, but not tacrine, stimulates S100B secretion in astrocyte cultures. *Life Sciences*. **2013**; 92(12): 701–707.

135. **Birks J.** Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev.* **2006**; 1: CD005593.
136. **Bartus RT.** On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp Neurol.* **2000**; 163: 495-529.
137. **Geula C, Nagykerly N, Nicholas A, Wu CK.** Cholinergic neuronal and axonal abnormalities are present early in aging and in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* **2008**; 67: 309-318.
138. **Bartus RT, Emerich DF.** Cholinergic markers in Alzheimer disease. *JAMA.* **1999**; 282(23): 2208-2209.
139. **Grossberg GT.** The ABC of Alzheimer's disease: behavioral symptoms and their treatment. *Int Psychogeriatr.* **2002**; 14(1): 27-49.
140. **Gürvit H.** Sinir Sisteminin Dejeneratif Hastalıkları. Demans Sendromu, Alzheimer Hastalığı ve Alzheimer dışı demanslar. In: Öge AE; eds. Nöroloji. İstanbul: *Nobel Matbaacılık.* **2004**; 367-415.
141. **Pillay R, Maharaj DS, Daniel S, Daya S.** Acetylcholine reduces cyanide-induced superoxide anion generation and lipid peroxidation in rat brain homogenates. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* **2003**; 27(1): 61-64.
142. **James BR.** Acetylcholine. *WormBook, ed The C. elegans Research Community.* **2007**; 1-21.
143. **Wenk GL.** Neuropathologic changes in Alzheimer's disease. *J. Clin. Psychiatry.* **2003**; 64(9): 7-10.
144. **Morrison A, Lyketsos C.** The pathophysiology of Alzheimer's disease and directions in treatments. *Advanced Studies in Nursing.* **2005**; 3(8): 256-270.
145. **Wang R, Tang C.** Neuroprotective Effects of Huperzine A: A Natural Cholinesterase Inhibitor for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Neurosignals.* **2005**; 14(1-2): 71-82.
146. **Chaudiere J, Ferrari I.** Intracellular antioxidants: form chemical to biochemical mechanisms, *Food And Chem. Toxicol.* **1999**; 37(9-10): 949-962.
147. **Uzbay İT.** Alzheimer Hastalığına Yönelik Çalışmalarda Kullanılan Deneysel Hayvan Modelleri. *Demans Dergisi.* **2003**; 1: 5-14.
148. **Götz J, Ittner LM.** Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nature Reviews.* **2008**; 9(7): 532-544.

149. **Bales KR, Liu F, Wu S, Lin S et al.** Human *APOE* Isoform-Dependent Effects on Brain β Amyloid Levels in PDAPP Transgenic Mice. *The Journal of Neuroscience*. **2009**; 29(21): 6771–6779.
150. **Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, et al.** Correlative memory deficits, Ab elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*. **1996**; 274: 99-102.
151. **Richardson JA, Burns DK.** Mouse Models of Alzheimer's Disease: A Quest for Plaques and Tangles. *ILAR Journal*. **2002**; 43(2): 89-99.
152. **Holden HM, Rayment I, Thoden JB.** Structure and function of enzymes of the Leloir pathway for galactose metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*. **2003**; 278(45): 43885–43888.
153. **Xu XH, Zhao TQ.** Effects of puerarin on D-galactose-induced memory deficits in mice. *Acta Pharmacologica Sinica*. **2002**; 23(7): 587–590.
154. **Hua X, Lei M, Zhang Y, Ding J, Han Q, Hu G, et al.** Long-term D-galactose injection combined with ovariectomy serves as a new rodent model for Alzheimer's disease. *Life Sciences*. **2007**; 80(20): 1897-1905.
155. **Hua X, Lei M, Ding J, Han Q, Hu G, Xiao M.** Pathological and biochemical alterations of astrocytes in ovariectomized rats injected with D-galactose: A potential contribution to Alzheimer's disease processes. *Experimental Neurology*. **2008**; 210(2): 709–718.
156. **Yang W, Shi L, Chen L, Zhang B, Ma K, Liu Y, et al.** Protective effects of perindopril on d-galactose and aluminum trichloride induced neurotoxicity via the apoptosis of mitochondria-mediated intrinsic pathway in the hippocampus of mice, *Brain Res. Bull.* **2014**; 109: 46–53.
157. **Vucetic-Arsic S, Radonjić NV, Jovanovic M, Selaković V, Nikolic T, Velimirovic M, et al.** Oxidative stress precedes mitochondrial dysfunction in gerbil brain after aluminum ingestion, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2013**; 36: 1242–1252.
158. **Alfrey AC.** Role of iron and oxygen radicals in the progression of chronic renal failure. *Am. J. Kidney Dis.* **1994**; 23: 183–87.
159. **Anthony J, Fadl S, Mason C, Davidson A, Berry J.** Absorption, deposition and distribution of dietary aluminum in immature rats: Effects of dietary vitamin D3 and food-borne chelating agent. *J. Environ. Sci. Health B*. **1986**; 21: 191–205 pp.
160. **Blundell G, Henderson WJ, Price EW.** Soil particles in the tissues of the foot in endemic elephantiasis of the lower legs. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **1989**; 83: 381– 85 pp.
161. **Belcheva I, Stoytchev T, Alov P.** Comparative study of the anticonvulsive activity of N-aminomethylpiperazine- 3,3-diethyl- 2,4-pyridinediones with the activity of known antiepileptic agents. *Acta Physiol. Pharmacol. Bulg.* **1984**; 10: 59-63.

162. **Singh GB, Srimal RC, Dhawan BN.** Pharmacological studies on 3- [gamma- (p-fluoronezoyl) propyl]- 2,3,4,4a,5,6- hexahydro- 1 -(H)- pyrazino (1,2-a) quinoline hydrochloride (Compound 69/i83). Part IV: Other CNS effects and acute toxicity. *Arzneim. Forsch.* **1978**; 28: 1641-1644.
163. **Skoldinov AP, Rayevski KS, Likhoshesterov AM, Stavroskaja AW, Ruger C, Rostock A, et al.** Synthese und neurologische Wirkung neuer 11-substituierter-5H-dibenzo[b,e][1,4]diazepine. *Pharmazie.* **1984**; 32: 812-813.
164. **Tongia SK, Triavedi CP, Mathar SV, Chouhan RS, Kaushal R.** Neuropharmacological actions of some newly synthesized Mannich bases. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* **1981**; 25: 269-273.
165. **Morato GS, Lemos T, Takahashi RN.** Acute exposure to maneb alters some behavioral functions in the mouse. *Neurotoxicol. Teratol.* **1989**; 11: 421-425.
166. **Nedev H, Rolka K, Minchev S, Kupryzewski G, Kolasa K, Kleinrok Z.** Opiate-like peptides. Part XI. 2-[2-phenyl-1,3-indandionyl]--amides of enkephalin analogs. Synthesis and analgesic activity. *Pol.J. Pharmacol. Pharm.* **1988**; 40: 303-311.
167. **Paul V, Balasubramanian E, Sheela S, Krishnamoorthy MS.** Effects of endosulfan and aldrin on muscle coordination and conditioned avoidance in rats. *Pharmacol. Toxicol.* **1992**; 71: 254-257.
168. **Rolka K, Kolasa K, Kleinrok Z, Kupryzewski G.** Opiate-like peptides. Part VIII. Methylamides and dimethylamides of [D-Leu⁵]-enkephalin and [D-Ala², D-Leu⁵]-enkephalin. Synthesis and analgesic activity. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* **1986**; 38: 391-402.
169. **Wong PT, Tan SF.** Pharmacological profiles of 5-phenylmethylebydantoin and its methoxy substituted derivatives. *Jpn. J. Pharmacol.* **1989**; 49: 309-115.
170. **Pellow S, Chopin P, File SE, et al.** Validation of open:closed arm entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci Methods.* **1985**; 14: 149-167.
171. **Li XL, Aou S, Hori T, Oomura Y.** Spatial memory deficit and emotional abnormality in QLETF rats. *Physiology&Behavior.* **2002**; 75: 15-23.
172. **Arendash GW, King DL, Gordon MN, Morgan D, Hatcher JM, et al.** Progressive age related behavioral impairments in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin-1 transgenes. *Brain Research.* **2001**; 891: 42-53.
173. **Thorsell A, Caberlotto L, Rimondini R, Heilig M.** Leptin suppression of hypothalamic NPY expression and feeding, but not amygdala NPY expression and experimental anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* **2002**; 71: 425-430.
174. **Moragrega I, Carrasco MC, Vicens P, Redolat R.** Spatial learning in male mice with different levels of aggressiveness: effect of housing conditions and nicotine administration. *Behavioural Brain Research.* **2003**; 147: 1-8.

175. **Carvajal CC, Vercauteren F, Dumant Y, Michalkiewicz M, Quirion R.** Aged neuropeptide Y transgenic rats are resistant to acute stress but not maintain spatial and nonspatial learning. *Behavioural Brain Research*. **2004**; 153: 471-480.
176. **Rimondini R, Agren G, Borjesson S, Sommer W, Heilig M.** Persistent behavioural and autonomic super sensitivity to stress following prenatal stress exposure in rats. *Behavioural Brain Research*. **2003**; 140: 75-80.
177. **Rodgers RJ, Cao BJ, Dalvi A.** Animal models of anxiety, an ethological perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. **1997**; 30: 289-304.
178. **Ferguson SA, Cada AM.** Spatial learning/ memory and social and nonsocial behaviors in the spontaneously hypertensive, Wistar-Kyoto and Sprague Dawley rat strains. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. **2004**; 77: 583-594.
179. **Alcalay RN, Giladi E, Pick CG, Gozes I.** Intranasal administration of NAP, a neuroprotective peptide, decreases anxietylike behavior in aging mice in the elevated plus maze. *Neuroscience Letters*. **2003**; 1-4.
180. **Ferguson GD, Herschman HR, Storm DR.** Reduced anxiety and depression like behavior in synoptatgmin IV (-/-) mice. *Neuropharmacology*. **2004**; 47: 604-611.
181. **Vasconcellos APS, Tabajora AS, Ferrari C, Rocha E, Dalmaz C.** Effects of chronic stress on spatial memory in rats is attenuated by lithium treatment. *Physiology&Behavior*. **2003**; 79: 143-149.
182. **Eagle AL, Wang H, Robison AJ.** Sensitive Assessment of Hippocampal Learning Using Temporally Dissociated PassiveAvoidance Task. *Bio Protoc*. **2016**; 6(11): 1821.
183. **Tabrizian K, Yazdani A, Baheri B, Payandemehr B, Sanati M, Hashemzaei M, et al.** Zinc chloride and lead acetate-induced passive avoidance memory retention deficits reversed by nicotine and bucladesine in mice, *Biol. Trace Elem. Res*. **2016**; 169: 106–113.
184. **Porsolt RD, Martin P, Fromage S, Lenegre A, Drieu K.** Anti-stress effects of EGb 761 in rodent models. In: Christen Y, Costentin J, Lacour M, Effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) on the central nervous system. **1991**; 135-145.
185. **Sanger DJ.** Animal models of anxiety and the screening and development of novel anxiolytic drugs. In: Boulton AA, Baker GB, Martin-Iverson MT. *Neuromethods: Animal models in Psychiatry II*, New Jersey. **1991**; 150-186.
186. **Uzbay T.** Psikofarmakolojinin Temelleri ve Deneysel Arastırma Teknikleri. 1. Baskı Cizgi Tıp Kitabevi. **2004**, Bolum 2- 3.

187. **Nehrua B, Verma R, Khanna P, Sharma SK.** Behavioral alterations in rotenone model of Parkinson's disease: Attenuation by co-treatment of centrophenoxine. *Brain Res.* **2008**; 1201: 122-127.
188. **Carola V, D'Olimpio F, Brunamonti FE, Mangia F, Renzi P.** Evaluation of the elevated plusmaze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behav Brain Res.* **2002**; 134: 49-57.
189. **Hlinák Z, Vinsová J, Kasafirek E.** Effect of alaptide, its analogues and oxiracetam on memory for an elevated plus-maze in mice. *Eur J Pharmacol.* **1996**; 314(1-2): 1-7.
190. **Isik AT, et al.** Curcumin ameliorates impaired insulin/IGF signalling and memory deficit in a streptozotocin-treated rat model. *Age (Dordr).* **2009**; 31(1): 39-49.
191. **Baban D.** The effect of selenium on the morphological changes in the hippocampus and cerebral cortex of scopolamine induced Alzheimer's type dementia rat model by histological analysis. Yeditepe University, Institute of Health Sciences, Department of Histology and Embryology, Master Thesis, **2021**, İstanbul (Supervisor: Assist. Prof. Dr. Alev Cumbul).
192. **Liu PP, Xie Y, Meng XY, Kang J.** History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. *Signal Transduct. Target Ther.* **2019**; 4: 29.
193. **Li H, Liu CC, Zheng H, Huang TY.** Amyloid, tau, pathogen infection and antimicrobial protection in Alzheimer's disease -conformist, nonconformist, and realistic prospects for AD pathogenesis. *Transl. Neurodegener.* **2018**; 7: 34.
194. **Arbel-Ornath M, Hudry E, Boivin JR, Hashimoto T, Takeda S, Kuchibhotla KV, et al.** Soluble oligomeric amyloid-beta induces calcium dyshomeostasis that precedes synapse loss in the living mouse brain. *Mol. Neurodegener.* **2017**; 12: 27.
195. **Choi H, Kim HJ, Kim J, Kim S, Yang J, Lee W, et al.** Increased acetylation of Peroxiredoxin1 by HDAC6 inhibition leads to recovery of Abeta-induced impaired axonal transport. *Mol. Neurodegener.* **2017**; 12: 23.
196. **Joshi G, Chi Y, Huang Z, Wang Y.** Abeta-induced Golgi fragmentation in Alzheimer's disease enhances Abeta production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**; 111: E1230–E1239.
197. **Volgyi K, Juhasz G, Kovacs Z, Penke B.** Dysfunction of endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria (MT) in Alzheimer's disease: the role of the ER-MT crosstalk. *Curr. Alzheimer Res.* **2015**; 12: 655–672.
198. **Hoover BR, Reed MN, Su J, Penrod RD, Kotilinek LA, Grant MK, et al.** Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration. *Neuron.* **2010**; 68: 1067–1081.
199. **Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H.** Alzheimer's disease. *Lancet.* **2006**; 368: 387–403.

200. **Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, et al.** Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**; 90: 1977–1981.
201. **Selkoe DJ, Hardy J.** The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol. Med.* **2016**; 8: 595–608.
202. **Oshima E, Ishihara T, Yokota O, Nakashima-Yasuda H, Nagao S, Ikeda C, et al.** Accelerated tau aggregation, apoptosis and neurological dysfunction caused by chronic oral administration of aluminum in a mouse model of tauopathies. *Brain Pathol.* **2013**; 23: 633–644.
203. **Min JY, Min KB.** Blood cadmium levels and Alzheimer's disease mortality risk in older US adults. *Environ. Health.* **2016**; 15: 69.
204. **Huat TJ, Camats-Perna J, Newcombe EA, Valmas N, Kitazawa M, Medeiros R.** Metal toxicity links to Alzheimer's disease and neuroinflammation. *J. Mol. Biol.* **2019**; 431: 1843–1868.
205. **Zhou CC, Gao ZY, Wang J, Wu MQ, Hu S, Chen F, et al.** Lead exposure induces Alzheimers's disease (AD)-like pathology and disturbs cholesterol metabolism in the young rat brain. *Toxicol. Lett.* **2018**; 296: 173–183.
206. **Cai T, Che H, Yao T, Chen Y, Huang C, Zhang W, et al.** Manganese induces tau hyperphosphorylation through the activation of ERK MAPK pathway in PC12 cells. *Toxicol. Sci.* **2011**; 119: 169–177.
207. **Ashok A, Rai NK, Tripathi S, Bandyopadhyay S.** Exposure to As-, Cd-, and Pb mixture induces Abeta, amyloidogenic APP processing and cognitive impairments via oxidative stress-dependent neuroinflammation in young rats. *Toxicol. Sci.* **2015**; 143: 64–80.
208. **Yokel RA.** The toxicology of aluminum in the brain: a review. *Neurotoxicology.* **2000**; 21: 813–28.
209. **Priest ND.** The biological behaviour and bioavailability of aluminium in man, with special reference to studies employing aluminium-26 as a tracer: review and study update. *J Environ Monit.* **2004**; 6: 375–403.
210. **Deloncle R, Huguet E, Fernandez B, Quellard N, Babin PH, Guillard O.** Ultrastructural study of rat hippocampus after chronic administration of aluminium L-glutamate: an acceleration of aging process. *Exp Gerontol.* **2001**; 36: 234–44.
211. **Kawahara M.** Effects of aluminum on the nervous system and its possible link with neurodegenerative diseases. *J Alzheimers Dis.* **2005**; 8: 171–82.

212. **Moumen R, Ait-Oukhatar N, Bureau F, Fleury C, Bouble D, Arhan P, et al.** Aluminium increases xanthine oxidase activity and disturbs antioxidant status in the rat. *J Trace Elem Med Biol.* **2001**; 15: 89–93.
213. **Zatta P, Kiss T, Suwalsky M, Berthon G.** Aluminium (III) as a promoter of cellular oxidation. *Coord Chem Rev.* **2002**; 228: 271–84.
214. **Iglesias SS, Otero RS, Gonzalez JI, Alonso MCB, Barrera PB, Alvarez EM.** Analysis of brain regional distribution of aluminium in rats via oral and intraperitoneal administration. *J Trace Elem Med Biol.* **2007**; 21: 31–34.
215. **Sahin G, Varol I, Temizer A, Benli K, Demirdamar R, Duru S.** Determination of aluminum levels in the kidney, liver, and brain of mice treated with aluminum hydroxide. *Biol Trace Elem Res.* **1994**; 41: 129–35.
216. **Gupta A, Shukla GS.** Effect of chronic aluminum exposure on the levels of conjugated dienes and enzymatic antioxidants in hippocampus and whole brain of rat. *Bull Environ Contam Toxicol.* **1995**; 55: 716–22.
217. **Roig JL, Fuentes S, Colomina MT, Vicens P, Domingo JL.** Aluminum, restraint stress and aging: behavioral effects in rats after 1 and 2 years of aluminum exposure. *Toxicology.* **2006**; 218: 112–24.
218. **Sahin G, Taskin T, Benli K, Duru S.** Impairment of motor coordination in mice after ingestion of aluminum chloride. *Biol Trace Elem Res.* **1995**; 50: 79–85.
219. **Suh YH, Checler F.** Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol. Rev.* **2002**; 54: 469–525.
220. **Association AS.** Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia.* **2019**; 15(3): 321–87.
221. **Cummings J, Lee G, Ritter A, Zhong K.** Alzheimer's disease drug development pipeline. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions.* **2018**; 4: 195–214.
222. **Hlíák Z, Krejčí I.** Oxiracetam prevented the scopolamine but not the diazepam induced memory deficits in mice. *Behav. Brain Res.* **2002**; 133: 395–399.
223. **SoukhakLari R, Moezi L, Pirsalami F, Ashjazadeh N, Moosavi M.** Curcumin ameliorates scopolamine-induced mice memory retrieval deficit and restores hippocampal p-Akt and p-GSK-3 β . *Eur J Pharmacol.* **2018**; 841: 28–32.

224. **Moosavi M, SoukhakLari R, Moezi L, Pirsalami F.** Scopolamine-induced passive avoidance memory retrieval deficit is accompanied with hippocampal MMP2, MMP-9 and MAPKs alteration. *European Journal of Pharmacology*. **2018**; 819: 248–253.
225. **Nakanishi K, Sakakima H, Norimatsu K, Otsuka S, Takada S, Tani A,et al.** Effect of low-intensity motor balance and coordination exercise on cognitive functions, hippocampal AB deposition, neuronal loss, neuroinflammation, and oxidative stress in a Mouse model of Alzheimer's disease. *Experimental Neurology*. **2021**;337:113590.
226. **Padurariu M, Ciobica A, Mavroudis I, Fotiou D, Baloyannis S.** Hippocampal neuronal loss in the CA1 and CA3 areas of Alzheimer's disease patients. *Psychiatr Danub*. **2012**; 24: 152–158

