

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

**Alzheimer Modelinde Gözlenen İnsülin Yolağı Değişiklikleri
Üzerinde Siklo-Z Terapötik Etkisinin Biyokimyasal ve
Elektrofizyolojik Parametreler Yardımıyla İncelenmesi**

Alev Duygu KUZUZU

DOKTORA TEZİ

2023-ANTALYA

ALEV DUYGU KUZUZU

DOKTORA TEZİ

2021-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

**Alzheimer Modelinde Gözlenen İnsülin Yolağı Değişiklikleri
Üzerinde Siklo-Z Terapötik Etkisinin Biyokimyasal ve
Elektrofizyolojik Parametreler Yardımıyla İncelenmesi**

Alev Duygu KUZUZU

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Piraye YARGIÇOĞLU AKKİRAZ

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından
TDK-2018-3272 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2023-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Biyofizik Anabilim Dalı Biyofizik Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. .../...../.....

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Piraye YARGIÇOĞLU AKKİRAZ
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Narin DERİN
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. V. Nimet UYSAL
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. İsmail ABİDİN
Karadeniz Teknik Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Deniz AKPINAR
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Melike CENGİZ

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

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

Öğrencinin

Alev Duygu KUZUZU

İmza

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Piraye YARGIÇOĞLU AKKİRAZ

İmza

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilimsel ve akademik açıdan yol göstericim olan, öğrencisi olmaktan ömür boyu gurur ve minnet duyacağım çok kıymetli tez danışmanım ve saygı değer hocam Prof. Dr. Piraye YARGIÇOĞLU AKKİRAZ'a,

Doktora eğitimim süresince bilgilerini, tecrübelerini ve desteğini benden esirgemeyen başta kıymetli hocam Prof. Dr. Narin DERİN olmak üzere Biyofizik Anabilim Dalı'nın kıymetli hocaları Prof. Dr. Semir ÖZDEMİR, Prof. Dr. Nazmi YARAŞ ve Prof. Dr. Murat CANPOLAT'a,

Doktora eğitimime başladığım günden beri bilgisiyle, tecrübesiyle, dostluğuyla her daim yanımda olan sevgili ekip arkadaşlarım Dr. Öğretim Gör. Deniz KANTAR GÜL ve Dr. Öğr. Üyesi Hakan ER'e,

Doktora eğitimim süresince manevi desteğiyle her daim yanımda olan ve bu süreçte akademik bilgilerini benimle paylaşan Ebru AFŞAR'a,

Hayatım boyunca benden hiçbir zaman sevgilerini, şefkatlerini, desteklerini esirgemeyip bugünlere gelmemde çok büyük emekleri olan canımdan çok sevdiğim annem Nejla ACUN, babam Şeref ACUN, kardeşim Ahmet ACUN'a,

Son olarak, hayatımı paylaşmaktan gurur duyduğum ve her daim desteğiyle yanımda olan sevgili eşim Uzm. Dr. Kadir Bahadır KUZZU ve hayatımın en büyük güzelliği olan canım kızım Ülkü Asya KUZZU'ya,

Sonsuz saygı ve teşekkürü bir borç bilirim.

ÖZET

Amaç: Çalışmamızda A β O enjeksiyonuyla oluşturulan erken dönem AH sıçan modelinde insulin yolağının moleküler mekanizmalarının, hafıza ve beyin osilasyonlarının değişimlerinin araştırılması hedeflenmiştir. Ayrıca, Siklo-Z terapötik ajanının bu değişimler üzerine etkisinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Yöntem: Her grupta 3 aylık 20 adet erkek Wistar sıçan olmak üzere, SH, SHZ, AH ve AHZ grupları oluşturulmuştur. İyileşme periyodunu takiben 3 hafta boyunca 10 mg Zn/kg ile 0,2 mg SHP/kg içeren Siklo-Z ajanı SHZ ve AHZ gruplarına verilmiştir. Siklo-Z uygulanan gruplarla eş hacimli musluk suyu SH ve AH gruplarına uygulanmıştır. Bu sürecin bitiminde nesne ve konum hafıza testleri gerçekleştirilmiş ve A β O indüklü beyin aktivitesi değişimlerini belirlemek için spontan EEG kayıtları alınmıştır. Deney sürecinin sonunda sıçanların hipokampus ve total beyin dokularında biyokimyasal analizler gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: AHZ grubunda kilo kaybı, periferik insülin direnci ve beyin insülin miktarları üzerinde Siklo-Z tedavisi olumlu bir etkiye sahipken, SHZ grubu üzerinde Zn⁺² toksisitesi nedeniyle ters etki göstermiştir. AHZ grubu sıçanların İDE ve NEP enzimlerinin artışına bağlı olarak A β O toksisitesi azalmıştır, ancak Tau Ser356 fosforilasyonda artışa neden olmuştur. SHZ grubunda İDE ve NEP enzimlerinin seviyesi artmış olsa da A β O birikiminin ve tau toksisitesinin Zn⁺² toksisitesine bağlı olarak arttığı gözlenmiştir. Siklo-Z ajanı, SHZ ve AHZ gruplarının nesne ve konum hafıza testlerini güçlenmiştir. Siklo-Z tedavisinin özellikle sol temporal bölgede spindle güç değerlerinin artmasında önemli etkisi olduğu bulunmuştur. AH patolojisinin uyku EEG'sinin delta güç değerlerinde azalmaya neden olduğu gözlenmiştir.

Sonuç: Bulgularımız, Siklo-Z ajanının AH hastalığının erken döneminde ortaya çıkan moleküler değişimler, hafıza ve beyin osilasyonları üzerinde anlamlı terapötik etkilerinin olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Amiloid-beta oligomer, insulin, Siklo-Z, hafıza, EEG

ABSTRACT

Objective: In our study, it was aimed to investigate the molecular mechanisms of the insulin pathway, changes in memory and brain oscillations in the early period AD rat model created by A β O injection. In addition, it is aimed to reveal the effect of the Cyclo-Z therapeutic agent on these changes.

Method: SH, SHZ, AH and AHZ groups were formed, including 20 male Wistar rats 3 months old in each group. Cyclo-Z agent containing 10 mg Zn / kg and 0,2 mg SHP / kg was administered to SHZ and AHZ groups for 3 weeks following the recovery period. Equal volumes of tap water were applied to the SH and AH groups with the Cyclo-Z applied groups. At the end of this process, object and position memory tests were performed and spontaneous EEG records were taken to determine A β O-induced brain activity changes. At the end of the experimental process, biochemical analyzes were performed in the hippocampus and total brain tissues of the rats. It has been observed that AH pathology causes a decrease in delta power values of sleep EEG.

Results: While Cyclo-Z treatment had a positive effect on weight loss, peripheral insulin resistance and brain insulin amounts in the AHZ group, it had an adverse effect on the SHZ group due to Zn⁺² toxicity. A β O toxicity was decreased in AHZ group rats due to the increase in IDE and NEP enzymes, but Tau Ser356 caused an increase in phosphorylation. Although the levels of IDE and NEP enzymes were increased in the SHZ group, it was observed that A β O accumulation and tau toxicity increased due to Zn⁺² toxicity. The cyclo-Z agent enhanced the object and localization memory tests of the SHZ and AHZ groups. Cyclo-Z treatment was found to have a significant effect on increasing spindle power values, especially in the left temporal region.

Conclusion: Our findings show that Cyclo-Z agent has significant therapeutic effects on molecular changes, memory and brain oscillations that occur in the early stages of AD disease.

Key words: Amyloid-beta oligomer, insulin, Cyclo-Z, memory, EEG

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Alzheimer Hastalığı	3
2.1.1. Alzheimer Hastalığının Epidemiyolojisi	3
2.1.3. Amiloid Oligomerlerinin Yapısı	7
2.1.4. Amiloid Kaskad Hipotezinden Amiloid- β Oligomer Hipotezine Geçiş	8
2.1.5. Amiloid- β Oligomerlerin Nörotoksik Etkileri	9
2.1.6. Amiloid- β Oligomerleri Tarafından Tau Toksisitesi Başlatılabilir ve Güçlendirilebilir	10
2.2. Diyabet	11
2.2.1. Tip 2 Diyabet	11
2.2.2. Periferde İnsülin	11

2.2.3. Beyinde İnsülin	12
2.2.4. İnsülin Sinyalizasyonu	14
2.2.5. Beyin İnsülin Direnci	15
2.2.6. Beyindeki İnsülinin İşlevleri	16
2.3. Alzheimer Hastalığı Patogenezinde Amiloid- β Oligomerlerinin İnsülin Reseptörleri Üzerindeki Rolü	18
2.3.1. Alzheimer Hastalığında Beyin İnsülin Direnci ve Amoloid- β Patolojisi	19
2.3.2. Alzheimer Hastalığında Beyin İnsülin Direnci ve Tau Patolojisi	20
2.3.3. Alzheimer Hastalığında Yeni Bir Terapötik Yaklaşım Olarak Beyin İnsülin Sinyalizasyonunun Uyarılması	20
2.4. Amiloid- β 'nın Beyinden Temizlenmesi	21
2.5. Çinkonun Alzheimer Hastalığı ile İlişkisi	24
2.6. Siklo (His-Pro) ve Çinko Kombinasyonu: Siklo-Z	26
2.6.1. İnsülin Degrade Edici Enzim ve Neprilisin Sentezinin Siklo (His-Pro) Artı Çinko ile Tedavisi	27
2.7. Elektroensefalografi (EEG)	28
2.7.1. Alzheimer Hastalığı ve Uyku Aktivitesi	31
3. GEREÇ ve YÖNTEM	34
3.1. Gruplandırma	34
3.2. Deney Protokolü	34
3.3. Davranış Testleri	37
3.3.1. Yeni Nesne Tanıma Testi	38

3.3.2. Nesne Lokalizasyon Testi	39
3.4. Dinlenme Durumu Beyin Osilasyonlarının (Spontan EEG) Kaydedilmesi	40
3.5. Dinlenme Durumu Beyin Osilasyonlarının (Spontan EEG) Analizi	40
3.6. Biyokimyasal Yöntemler	41
3.6.1. İnsulin Miktarının Plazma ve Hipokampus Doku Homejenatlarında Ölçülmesi	42
3.6.2. Amiloid Beta Peptid-42 (A β -42) Oligomer Miktarının Total Beyin ve Hipokampus Doku Homejenatlarında Ölçülmesi	44
3.6.3. Protein Tayini	47
3.6.4. Western Blot Tekniği ile Protein Seviyelerinin Ölçülmesi	47
3.7. Sonuçların Değerlendirilmesi	48
4. BULGULAR	49
4.1. Genel Görünüm	49
4.2. Ağırlık Değişimi	49
4.3. Biyokimyasal Analiz Sonuçları	50
4.3.1. Plazma Açlık Kan Glukoz Düzeyleri	50
4.3.2. Serum İnsülin Düzeyleri	50
4.3.3. Hipokampus İnsülin Düzeyleri	50
4.3.4. HOMA-IR Sonuçları	50
4.3.5. Total Beyin A β O Düzeyleri	51
4.3.6. Hipokampus A β O Düzeyleri	51

4.4. Western Blot Sonuçları	54
4.4.1. Total Beyin p-IRS-1 (Ser612) Düzeyleri	54
4.4.2. Hipokampus p-IRS-1 (Ser612) Düzeyleri	54
4.4.3. Total Beyin p-GSK-3 β (Ser-21) Düzeyleri	54
4.4.4. Hipokampus p-GSK-3 β (Ser-21) Düzeyleri	55
4.4.5. Total Beyin p-Tau (Ser356) Düzeyleri	55
4.4.6. Hipokampus p-Tau (Ser356) Düzeyleri	56
4.4.7. Total Beyin İDE Düzeyleri	58
4.4.8. Hipokampus İDE Düzeyleri	58
4.4.9. Total Beyin NEP Düzeyler	58
4.4.10. Hipokampus NEP Düzeyleri	59
4.5. Davranış Deneyleri Sonuçları	60
4.5.1. Yeni Nesne Tanıma Ayrım İndeksi	60
4.5.2. Nesne Konum Ayrım İndeksi	61
4.6. EEG Analizleri	62
4.6.1. Delta (0.1-4 Hz) Bantlarının Güç Spektrumu Analizleri	62
4.6.2. Alfa (8-12 Hz) Bantlarının Güç Spektrumu Analizleri	62
4.6.3. Spindle (8-12 Hz) Bantlarının Güç Spektrumu Analizleri	62
4.6.4. Beta (13-29 Hz) Bantlarının Güç Spektrumu Analizleri	63
4.7. Korelasyon Analizi Sonuçları	65

4.7.1. Yeni Nesne Tanıma Ayrım İndeksi ve Hipokampus p-IRS-1	
(Ser612) Seviyeleri Arasındaki İlişki	65
4.7.2. Nesne Konum Ayrım İndeksi ve Hipokampus p-IRS-1	
(Ser612) Seviyeleri Arasındaki İlişki	65
4.7.3. Yeni Nesne Tanıma Ayrım İndeksi ve Sol Temporal (T3)	
Spindle (8-12 Hz) Güç Spektrumları Arasındaki İlişki	66
4.7.4. Nesne Konum Ayrım İndeksi ve Sol Temporal (T3)	
Spindle (8-12 Hz) Güç Spektrumları Arasındaki İlişki	66
5. TARTIŞMA	67
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	78
KAYNAKLAR	80
ÖZGEÇMİŞ	116

TABLÖLAR DİZİNİ

- Tablo 4.1.** Sham ve deney gruplarının tüm elektrot bölgelerinden ölçülen delta (0.1-4 Hz), alfa/spindle (8-12 Hz) ve beta (13-29 Hz) spontan EEG osilasyonlarının ortalamaları 64



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Amiloid prekürsör proteininin α , β ve γ sekretazlar tarafından proteolitik kesilmesi	5
Şekil 2.2.	Oligomerler, protofibriller ve fibriller dahil olmak üzere amiloid agregatları	7
Şekil 2.3.	İnsülin sinyal mekanizması	15
Şekil 2.4.	Uluslararası 10-20 elektrot yerleşimi	30
Şekil 3.1.	Deney gruplarının oluşturulması	36
Şekil 3.2.	Elektrofizyolojik kayıtlar için vidaların yerleştirilmesi ve açlık kan glukoz ölçümü	37
Şekil 3.3.	Yeni nesne tanıma testi deney basamakları	39
Şekil 3.4.	Nesne lokalizasyon testi deney basamakları	40
Şekil 3.5.	$x(t)$ sinyalinin T zamandaki örnek görünümü. R_{xx} : Otokorelasyon fonksiyonunun matematiksel ifadesi, S_{xx} : Güç spektral yoğunluk fonksiyonunun matematiksel ifadesi.	41
Şekil 4.1.	Sham ve deney grubu hayvanlarının ağırlık artışı	49
Şekil 4.2.	Sham ve deney gruplarının biyokimyasal analiz sonuçları	53

Şekil 4.3.	Sham ve deney hayvanlarının p-IRS(Ser612), p-GSK3 β (Ser21) ve pTau(Ser356) western blot sonuçları.	57
Şekil 4.4.	Sham ve deney hayvanlarının İDE ve NEP western blot sonuçları.	60
Şekil 4.5.	Sham ve deney gruplarının yeni nesne tanıma ve nesne konum ayırım indeksi sonuçları.	61
Şekil 4.6.	Yeni nesne tanıma ve nesne konum ayırım indeksleri ile hipokampus p-IRS-1(Ser612) seviyeleri arasındaki ilişki	66
Şekil 4.7.	Yeni nesne tanıma ve nesne konum ayırım indeksleri ile sol temporal (T3) spindle (8-12 Hz) güç spektrumu arasındaki ilişki.	67

SİMGELER ve KISALTMALAR

AH	: Alzheimer Hastalığı
AICD	: Amiloid Prekürsör Protein İntraselüler Domain
AMPA	: α -amino-3-hidroksi-5-metil-izoksazol-4-propinonik asit
AMPAR	: α -amino-3-hidroksi-5-metil-izoksazol-4-propinonik asit reseptörü
APP	: Amiloid prekürsör protein
Aβ	: Amiloid beta
AβO	: Amiloid beta oligomer
EEG	: Elektroensefalografi
GABA	: Gama aminobütrik asit
GABAR	: Gama aminobütrik asit reseptörü
GLUT	: Glikoz taşıyıcı
GSK-3β	: Glikojen sentaz kinaz-3 β
HOMA-IR	: Homoeostatik model değerlendirmesi
İR	: İnsülin Reseptör
İRS	: İnsülin reseptör substratları
İDE	: İnsülin degrade edici enzim
LTD	: Uzun süreli depresyon
LTP	: Uzun süreli potansiyasyon
MSS	: Merkezi sinir sistemi

NEP	: Neprilisin
NFY	: Nörofibriler Yumak
NMDA	: N-metil D-aspartat
NMDAR	: N-metil D-aspartat reseptörü
PI3K	: Fosfatidilinositol 3-kinaz
PIP2	: Fosfatidilinositol 4,5 bifosfat
PIP3	: Fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfat
PKB/Akt	: Protein Kinaz B
PS	: Presenilin
p-Tau	: Fosforile Tau
Ser	: Serin
SHP	: Siklo (His-Pro)
Siklo-Z	: Siklo ve çinko kombinasyonu
T1D	: Tip 1 diyabet
T2D	: Tip 2 diyabet
T3D	: Tip 3 diyabet
Zn⁺²	: Çinko
ZnT	: Çinko transporter

1. GİRİŞ

Alzheimer Hastalığı (AH), hücre dışı amiloid-beta ($A\beta$) peptitlerinin ve hücre içi nörofibriler yumakların (NFY) birikmesinden kaynaklanan ilerleyici bir demans türüdür (Maher ve Schubert, 2009). Bu bugüne kadar yapılan çalışmalarda, AH patojenezinin anahtar faktörünün $A\beta$ birikimi olduğuna işaret edilmiştir. Daha spesifik olarak, $A\beta$ peptidinin oligomerik tiplerinin sinaptik disfonksiyonu, nörodejenerasyonu ve demansı tetiklediği düşünülmektedir (Lambert ve ark., 1998; Walsh ve ark., 2002; Lesne ve ark., 2006; Shankar ve ark., 2008). Nöral ağ disfonksiyonuna yol açan hücresel patoloji halen tam olarak açıklanabilmiş değildir. Bununla birlikte; $A\beta$ maruziyetinin presinaptik ve postsinaptik sinapslarda değişiklikleri indüklediği, tau birikimlerinin ise sinaptik ileti bozukluğunda etkili olduğu ve nöral sinaptik ağ dinamiklerini bozduğu gösterilmiştir (Miyauchi ve ark., 1994; Brunovsky ve ark., 2003).

Son zamanlarda yapılan birçok çalışmada; beyin insülin direncinin, AH'nin erken bir özelliği olduğundan ve AH semptomlarının başlangıcından önce geliştiğinden bahsedilmektedir. Beyinde artan insülin direnci hem AH'ye özgün moleküler değişimler gözlenmeden önce hem de hastalığın ilerleyen safhalarında bilişsel bozukluğa katkıda bulunur (de la Monte ve Wands, 2005). İnsülin, nöronlardaki enerji metabolizmasının düzenlenmesi ve nöronal canlılık üzerinde önemli etkiye sahiptir ve beyinde büyüme faktörü gibi davranmaktadır. Beyinde insülin sinyalizasyon mekanizması, bilişsel işlevlerde rol oynayan sinaptik plastisitenin oluşumu için gereklidir (Schuh ve ark., 2011). Amiloid- β oligomerleri ($A\beta O$), AH'de beyinde biriken güçlü sinaptotoksinlerdir ve özellikle sinapslara spesifik ligandlar gibi davranırlar (Ferreira ve ark., 2007; Haass ve Selkoe, 2007; Ferreira ve Klein, 2011). İnsülin ve $A\beta$, ortak bir dizi tanıma motifini paylaşan amiloidojenik peptidlerdir. Bu nedenle, $A\beta O$ 'lar insülin reseptörüne bağlanabilir ve otofosforilasyonunu inhibe edebilir (Xie ve ark., 2002). Ayrıca, insülin reseptörünün plazma zarından ayrılmasını tetikleyerek yüzey insülin reseptörlerinin ve insülin duyarlılığının azalmasına neden olurlar (W. Q. Zhao ve ark., 2008b; De Felice ve ark., 2009a). Amiloid- β oligomerleri insülin reseptörlerine bağlandıklarında, insülin sinyalinin aşağı akış yolunu bloke ederler. Bu durum, tau hiperfosforilasyonu ve aşırı α ve γ -sekretaz aktivasyonu nedeniyle sırasıyla NFY ve aşırı $A\beta$ üretimine neden olur (Lane ve ark., 2012;

Hamze ve ark., 2022). Ayrıca; beyin insülin direncinde gözlenen artış, AH'de insülin degrade edici enzim (İDE) ve Neprilisin (NEP) düzeylerinin düşürerek AβO degradasyonunda azalmaya neden olur. Bu, insülin direncinin kötüleşmesine ve daha fazla toksik AβO'ların üretilmesine yol açar (Jha ve ark., 2015; Morales-Corraliza ve ark., 2016; Pivovarova ve ark., 2016). İnsülin sinyali ise, oligomerlerin neden olduğu sinaps kaybına karşı fizyolojik bir savunma mekanizması sağlar (Lacor ve ark., 2007; De Felice ve ark., 2009a). İnsülinin reseptörüne bağlanmasıyla gerçekleşen tirozin (Thr) kinaz aktivitesi, nöronlardaki oligomer bağlanma bölgelerini aşağıya doğru düzenler (Lacor ve ark., 2007; De Felice ve ark., 2009a). Bu nedenle, AH'de insülin sinyalinin ve AβO degradasyonunun güçlendirilmesi önemli bir terapötik hedef olarak görülmektedir. Çinkonun (Zn^{+2}) insülin sinyalini kolaylaştırarak insülin benzeri etkilere sahip olduğu (Miao ve ark., 2013) ve hem IDE hem de NEP sentezini uyardığı (Lifshitz ve ark., 2013) bilinmektedir. Ayrıca Zn^{+2} eksikliği AH'de sık görülen bir durumdur (Roberts ve ark., 2014; Afkarian ve ark., 2016). Bu nedenle, Zn^{+2} şelatasyon potansiyel bir terapötik yaklaşımdır (Watt ve ark., 2010). Siklo (His-Pro) (SHP), L-histidin molekülü içerdiğinden, Zn^{+2} şelatlama ve bağırsak Zn^{+2} emilimini ve Zn^{+2} alımını uyarma yeteneğine sahiptir (Rosenthal ve ark., 2001). Birlikte uygulandıklarında terapötik etkinliklerinin arttığı bilinen Siklo-Z ise SHP artı Zn^{+2} kombinasyonudur.

Şu an literatürde, AH patogenezinde rol oynayan ve erken evrelerinde ortaya çıkan beyin insülin sinyal yolağındaki değişiklik tam olarak bilinmemektedir. Aynı zamanda, insülin sinyal yolunun değişmesinden dolayı tau proteininin hiperfosforilasyonu ile bağlantılı moleküler yollar hala net olarak aydınlatılamamıştır. Ayrıca, AβO'ların sinaptik fonksiyon bozukluklarına bağlı beyin osilasyonlarında meydana getireceği değişiklikler ve bu değişikliklerin Siklo-Z tedavisiyle olan ilişkisini ortaya koyan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Dolayısıyla çalışmamızda; AβO ile indüklenen erken AH sıçan modelinde, hastalığın ilk evrelerinde gözlemlenen insülin sinyal yolundaki moleküler değişimler ile bu değişimlerin tau fosforilasyonu, AβO birikimi, bilişsel fonksiyonlar ve beyin osilasyonları üzerine etkisi incelenmiştir. Ayrıca insülin sinyal stimülatörlerinden biri olduğu bilinen Siklo-Z terapötik ajanının insülin sinyal yolunda yaptığı moleküler değişikliklerin AH nöropatolojisi, bilişsel fonksiyonlar ve beyin osilasyonları üzerindeki etkileri detaylı olarak çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

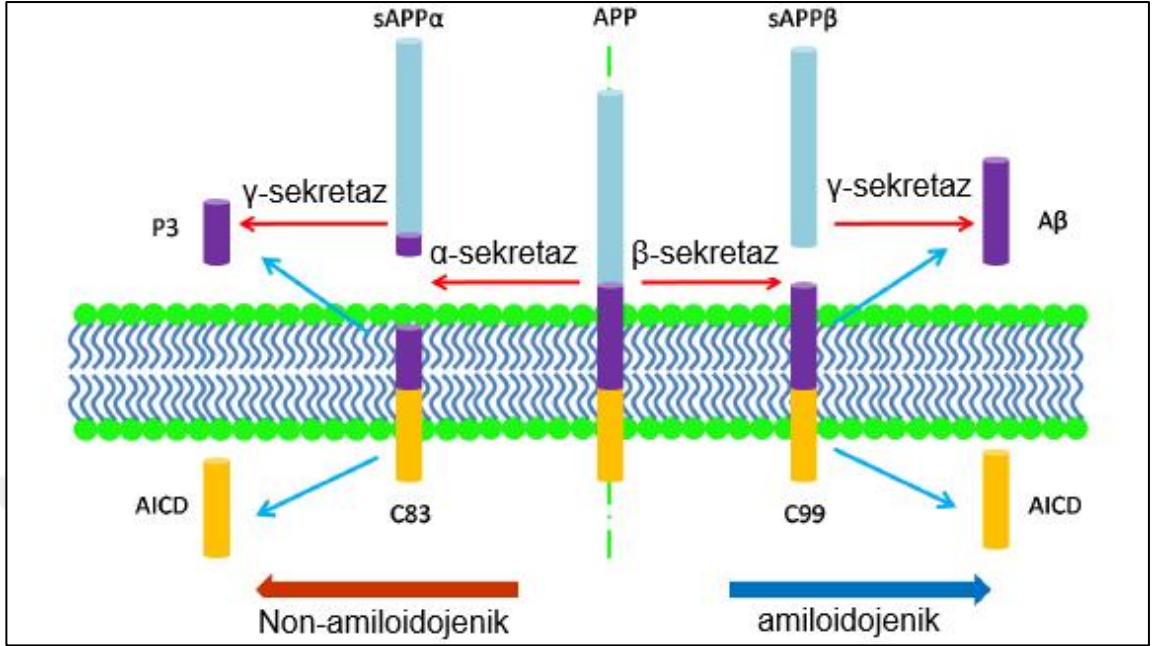
2.1.1. Alzheimer Hastalığının Epidemiyolojisi

Dünyada yaklaşık 47 milyon demans hastası bulunmaktadır ve yeni vakaların sayısı her yıl yaklaşık 10 milyon artmaktadır. Demans hastalarının toplam sayısının 2030 yılına kadar yaklaşık 75 milyona ve 2050 yılına kadar ise neredeyse üç katına çıkarak 132 milyona ulaşabileceği tahmin edilmektedir. Demansın en sık görülen biçimi, 65 yaşın üzerindeki kişilerin yaklaşık %6'sını etkileyen ve tüm demans vakalarının %60-70'ini oluşturan AH'dir. Global Hastalık Yüğü Çalışması'na göre, 2015 yılında dünya çapında yaklaşık 29,8 milyon AH hastası vardır ve bunun yaklaşık 1,9 milyonu ölümle sonuçlanmıştır. Bu durum, AH'yi günümüzdeki ana sağlık sorunlarından ve Amerika Birleşik Devletleri ve diğer sanayileşmiş ülkelerde altıncı ölüm nedenlerinden biri haline getirmiştir. 2015 yılında, AH'nin ulusal maliyetinin 220 milyon dolar olduğu ve bunun 2050 yılına kadar 1 trilyon dolara ulaşabileceği beklenmektedir. Bu nedenle demans, toplum ve dünya ekonomisine büyük yük getiren bir tehdit olarak görülmektedir (Alzheimer's, 2015).

2.1.2. Alzheimer Hastalığının Nöropatolojisi

Alzheimer hastalığı, kognitif bozukluk ve nöronal kayıpla birlikte ilerleyen sinaptik hasarla karakterize edilen nörodejeneratif bir hastalıktır. Beyindeki histopatolojik değişiklikleri; A β 'nin çeşitli peptid varyantlarından oluşan hücre dışı amiloid plaklar ve esas olarak fosforile tau (p-Tau) proteinlerinden oluşan hücre içi NFY'dir. Alzheimer hastalarının beyinde gözlemlenen sinaptik iletim azalması ve dendritik spinlerin kaybı gibi sinaptik fonksiyon bozukluklarının, A β plaklarının ve nöronal kayıpların oluşmasından önce meydana geldiği düşünülmektedir. Erken evrelerde gözlemlenen bu patolojik değişiklikler öncelikle medial temporal lobda gözlenir ve daha sonra neokorteksle ilişkili beyin bölgelerine doğru ilerler. Aynı zamanda, hastalığın başlangıç aşamalarında gözlemlenen bu değişiklikler, ilk bilişsel belirtilerin ortaya çıkmasından neredeyse yirmi yıl önce başlayabilir (Mroczko ve ark., 2018).

Alzheimer hastalığının sürekli artan insidansı, araştırmacıları ve klinisyenleri bir tedavi arayışına yöneltmiştir. Uzun dönem yapılan çalışmaların sonucunda, AH patogenezi tetikleyen en önemli olayın toksik A β oluşumu olduğu konusunda fikir birliğine varılmıştır. Amiloid- β , amiloid prekürsör proteininin (APP) β - ve γ -sekretazlar tarafından ardışık proteolitik bölünmesiyle üretilen 38 ila 43 amino asit uzunluğunda bir peptittir (Chow ve ark., 2010). Amiloid prekürsör proteini α , β ve γ olmak üzere üç farklı sekretaz tarafından proteolitik olarak kesilmektedir. Hastalığın gelişimi açısından APP'nin hangi sekretaz tarafından kesildiği çok önemlidir. Amiloid prekürsör proteininin α ve γ sekretazlar tarafından kesilmesi amiloidojenik olmayan (non-amiloidojenik) yolu oluştururken, β ve γ sekretazlar tarafından kesilmesi amiloidojenik yolu oluşturmaktadır. Non-amiloidojenik yolda APP, α -sekretaz tarafından C-terminal fragmanından (CTF) kesilir. Ardından γ -sekretaz membrana bağlı kalan ve C83 olarak da bilinen α -CTF'yi kesmesi sonucunda APP intraselüler domaini (AICD) ve P3 peptidini oluşturur. Amiloidojenik yolda ise APP, β -sekretaz tarafından CTF'den kesilir. Ardından γ -sekretaz, membrana bağlı kalan ve C99 olarak da bilinen β -CTF'nin çeşitli bölgelerinden kopararak çeşitli uzunluklarda A β peptidlerini ve AICD oluşturur (Şekil 2.1). En çok oluşan A β peptidleri, A β -40 ve A β -42'dir (Thinakaran ve Koo, 2008). Amiloid prekürsör protein işlendiğinde, A β 42'den daha fazla A β 40 proteini oluşmasına rağmen A β 42'nin C-terminal bölgesinde alanin ve izoleüsin rezidüleri bulunması onu daha hidrofobik ve amiloidojenik yapmıştır. Bu durum, A β 42'yi toplanmaya ve plaklarda birikmeye daha yatkın hale getirir (Burdick ve ark., 1992; Jarrett ve ark., 1993; Bitan ve ark., 2003). (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Amiloid prekürsör proteininin α , β ve γ sekretazlar tarafından proteolitik kesilmesi (Chen ve Mobley, 2019).

Günümüzde APP'nin aksonal veziküler trafikten, sinaps oluşumundan ve nöronal plastisiteden sorumlu olduğu düşünülse de kesin fizyolojik işlevi halen tam olarak tanımlanamamıştır. Buna rağmen, APP'den türeyen aşırı A β üretiminin AH gelişiminde rol oynadığı iyi bilinen bir gerçektir. Alzheimer hastalarının beyinde A β 'nın aşırı üretiminin yanı sıra A β seviyelerini düzenleyen iki yol daha vardır: üretilen A β 'nın temizlenmesi ya da bozulması ve beyine yeniden girmesi. Bu nedenle, bu üç yolla korunan dinamik dengede herhangi bir dengesizlik olması durumunda A β birikimi gerçekleşir (Mucke, 2009; Yoon ve Jo, 2012). Hastalığın çok erken evrelerinde, amiloid proteinlerinin üretimi ve temizlenmesi arasındaki dengenin değiştiği görülmektedir. Dahası, bu dengesizlik çoğu zaman AH'de başlangıç faktörü de olabilir (Mroczko ve ark., 2018).

Alzheimer hastalığının etiyopatogenezini netleştirmek için yapılan girişimler birkaç farklı, kısmen tamamlayıcı hipotezle sonuçlanmıştır. Sinir dokusunun hasar görmesinde ana faktör olarak amiloid birikintilerinin gösterildiği amiloid kaskad hipotezi, 25 yıldan fazla bir süredir temel olarak varsayılmaktadır. Amiloid kaskad hipotezi, ilerleyen A β birikiminin, AH'nin prelinik öncesi evrelerinde ve nihayetinde tüm AH hastalarında gözlenmesiyle desteklenmiştir (Mroczko ve ark., 2018). Buna istinaden uzun bir dönem

AH alanında yapılan araştırmalar, temel olarak AH'nin karakteristik özelliklerinden biri olan amiloid plak çalışmalarını kapsamıştır (J. A. Hardy ve Higgins, 1992). Ancak araştırmacılar, hastalığın seyri ile plak yükü arasında bir korelasyon eksikliği olduğunu görüncü çelişkiye düşmüşlerdir. Dahası, demans derecesinin en iyi korelasyonunun amiloid yüküyle değil, sinaps kaybıyla olduğu gösterilmiştir (Terry ve ark., 1991). Plak yükü ve demans arasındaki bu uyumsuzluğun aksine, NFY'lerin hastalığın seyri ile olan korelasyonu çok daha güçlüdür (Arriagada ve ark., 1992; Bierer ve ark., 1995; Gomez-Isla ve ark., 1997; Giannakopoulos ve ark., 2003). Mikrotübüle bağlı protein olan tau'nun yanlış şekilde katlanmış ve aşırı fosforile izoformları, NFY'lerin temelini oluşturmaktadır (Grundke-Iqbal ve ark., 1986; Kosik ve ark., 1986; Wood ve ark., 1986). Normal koşullarda tau, mikrotübüllerin birleşmesinden ve stabilizasyonundan sorumlu olan çözünür bir proteindir ve sinir hücrelerinde tipik olarak aksonlarda bulunmaktadır. Ancak, AH gibi tauopatilerde bu tau proteini anormal filamentli bir formda bulunarak soma ve nöritlere yeniden dağıtılır (Goedert ve ark., 1989). Hiperfosforile tau formları, nöronların içinde NFY'ler olarak birikir (Goedert ve ark., 1991). Bu durum, mikrotübülün parçalanmasına ve nöronal taşınmanın tahrip olmasına neden olarak (Iqbal ve ark., 2005), nöronlar arası iletişimin bozulmasına ve son olarak nöronların ölümüne yol açar (Chun ve Johnson, 2007).

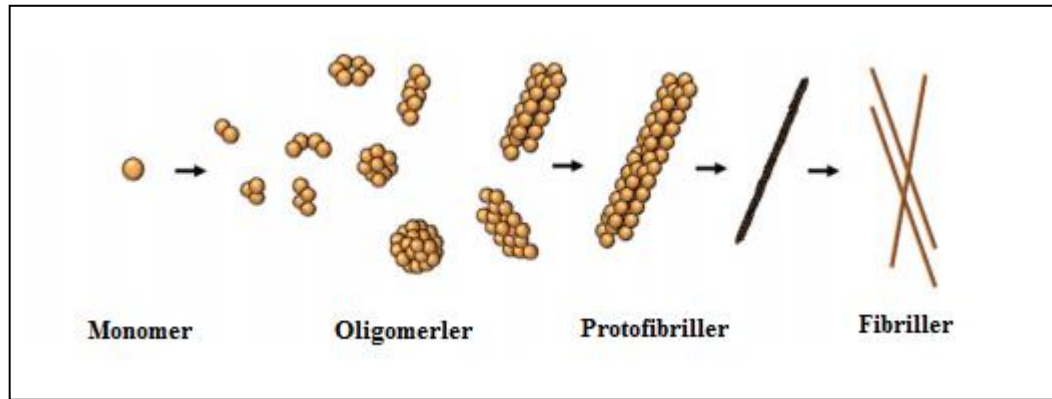
Araştırmacılar, AH ile plak yükü arasındaki korelasyon eksikliği olduğunu bulmalarının yanı sıra, nöron ölümünün plak olmayan beyin bölgelerinde de olduğunu görmüştür. Daha sonra bilişsel olarak normal olan bireylerde A β plaklarının bulunduğu keşfedilmiştir (Sloane ve ark., 1997; Erten-Lyons ve ark., 2009). İleri AH nöropatolojisine sahip gibi görünen ancak herhangi bir demansa sahip olmayan bu bireyler, plak yükünün biliş veya dejenerasyona uymadığını göstermiştir. Önemli miktarda plak yüküne sahip olan bu kişilerde ne hafıza bozukluğu ne de beyin hacminde herhangi bir değişiklik bildirilmemiştir. Bu durum, bilişsel bozulma için büyük agregatların gerekli olmadığını işaret etmiştir (Erten-Lyons ve ark., 2009; Petersen ve ark., 2013). Kapsamlı araştırmalar sonucunda, toksik A β O'ların doğru hedef olduğu bulunmuştur (Viola ve Klein, 2015; Montoliu-Gaya ve Villegas, 2016). Günümüzde A β O'lar, AH'de sinaps disfonksiyonundan ve hafıza kaybından sorumlu proksimal toksinler olarak kabul edilmektedir (Haass ve Selkoe, 2007; Krafft ve Klein, 2010; Selkoe, 2011; Wilcox ve ark.,

2011). Alzheimer hastalarının beyinlerinde biriken sinaptotoksinler olarak çözünür A β O'ların tanımlanması (Lambert ve ark., 1998; Gong ve ark., 2003; Lacor ve ark., 2004; Xia ve ark., 2009) bu alanda bir paradigma kaymasını uyarmıştır. Bu nedenle araştırmaların odağı, A β 'nin çözünür oligomerlerine doğru kaymıştır (Glabe, 2006).

2.1.3. Amiloid Oligomerlerinin Yapısı

Hastalığın mekanizmasını çözmeyi amaçlayan çok sayıda araştırma, plaklardan daha önce oluşan ve patogenez ile bağlantılı olan A β 'nin bir ara yapısını kabul etmiştir (J. Hardy ve Selkoe, 2002; Kaye ve Lasagna-Reeves, 2013; Klein, 2013). Çeşitli A β izoformlarına rağmen, toplanma için farklı eğilimleri olan üç ana A β grubu vardır. Bunlar monomerler, çözünür oligomerler ve çözünmeyen fibrillerdir (Goure ve ark., 2014).

Çeşitli A β O türleri arasında küçük, küresel parçacıklar ve bu küresel parçaların zincirlerini temsil eden uzun protofibriller bulunur. Amiloid- β oligomerlerin oluşumu, monomerik A β 'nin konformasyonundaki değişikliklerle başlar, düşük moleküler ağırlıklı dimer ve trimerler ile sonuçlanır. Bunu takiben çözünür küresel oligomerlerde toplanma 12 ila 24 monomerde başlar. Düşük moleküler ağırlıklılar sonunda “protofibriller” adı verilen yüksek moleküler ağırlıklı oligomerlere doğru gelişir. Kısaca fibrillogenez süreci, çeşitli oligomerik türleri oluşturmak için bir araya gelen amiloid monomerleriyle başlar ve daha sonra nihayetinde olgunlaşarak çözünmez fibriller halinde uzar (Mroczko ve ark., 2018) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Oligomerler, protofibriller ve fibriller dahil olmak üzere amiloid agregatları

Amiloid- β , hücre dışı alanda fibriller oluşturmak üzere toplandığında, proteolitik bölünmeye dirençli hale gelir (Walsh ve Selkoe, 2007). Oligomerik amiloid, olgun fibrillerin oluşumunda bir ara adımdır (Tjernberg ve ark., 1999; Bu ve ark., 2007). Fibrillerin oligomerik amiloidlere karşı nispi toksisitesi bir tartışma alanıdır. En çok zarar veren çözünür amiloidin boyutu (dimer, trimerler veya daha büyük) da aktif bir araştırma konusudur (Bao ve ark., 2012). Araştırmalar, amiloid oligomerlerinin daha fazla toksisiteye sahip olduğu konusunda fikir birliği oluşturmaya rağmen, her türünün belli bir miktar toksisiteye sahip olduğu gösterilmiştir (Cleary ve ark., 2005). Yapılan çalışmalar, AH'de birincil nörotoksik ajanların fibrillerden ziyade düşük moleküler ağırlıklı oligomerlerin olduğuna işaret etmektedir (Glabe, 2008). Bu oligomerler, hücre zarlarıyla etkileşime girerek hücre bütünlüğünü bozduğu için en zararlı olarak gösterilmektedir (Stefani, 2010).

2.1.4. Amiloid Kaskad Hipotezinden Amiloid- β Oligomer Hipotezine Geçiş

Amiloid- β oligomer-A β O hipotezi 1998'de ortaya atılmıştır. Alzheimer hastalığına yol açan beyin hasarının, çözünür, ligand benzeri A β O'lar tarafından başlatıldığı öne sürülmüştür. Bu hipotez, A β O'ların fibril içermeyen sentetik preparatlarının, hızlı bir şekilde LTP'yi inhibe eden ve zamanla selektif sinir hücresi ölümüne neden olan güçlü merkezi sinir sistemi (MSS) nörotoksinleri olduğu keşfine dayanmaktadır. İnsan beyin parankimi ve damarlarında A β O'ların ilk olarak tespiti orijinal amiloid kaskad hipotezi uygulanıp geliştirilirken bildirilmiştir. O zamanlarda A β O'lar, A β 'nin patojenik formu olduğuna inanılan amiloid plakların oluşmasına giden yolda aracı olarak kabul edilmekteydi. Günümüzde bu A β O'lar yaygın olarak A β 'nin en toksik ve patojenik formu olarak kabul edilmektedir (Cline ve ark., 2018).

Bu A β O'ların ekstraselüler veya intraselüler proteinler olup olmadığı da uzun süre tartışma konusu olmuştur. Şu anda, her iki lokalizasyon için de inandırıcı kanıtlar mevcuttur. Amiloid- β oligomerlerin yüzey membranları ile ekstraselüler ilişkileri, AH patolojisinin çok erken aşamalarında gözlenmiş olsa da, intranöronal birikimi de ekstraselüler amiloid plak oluşumundan önce ortaya çıkmaktadır. İntranöronal A β O birikimi sadece intraselüler üretimden değil, aynı zamanda ekstraselüler A β havuzunun çeşitli reseptörler ve taşıyıcılar aracılığıyla alınmasından ve internalizasyonundan da kaynaklanabilir. Bu

durum bize, A β O'ların dinamik bir değişime uğradıklarını ve ekstraselüler alan ile hücrelerin içinde yer değiştirebileceklerini göstermektedir (Mroczko ve ark., 2018).

Alzheimer hastalığına sahip olan insan ve hayvan modellerinde A β O'ların varlığı gösterilmiş, ve birikimlerinin, hem immünokimya hem de immünohistokimya ile plaklardan önce ortaya çıktığı kanıtlanmıştır. Önceleri AH hastalığının patolojisi plaklar ve NFY bağlı demans olarak tanımlanmış olmasına rağmen, günümüzde bu tanımdaki plakların A β O'lar ile değiştirilmesi patojenik mekanizmaya daha yakın olacaktır (Cline ve ark., 2018).

2.1.5. Amiloid- β Oligomerlerin Nörotoksik Etkileri

Alzheimer hastalığının erken bilişsel semptomu, yeni anılar oluşturmadaki yetersizliktir. Bu erken hafıza kaybının sebebi olarak, çözünür A β O'ların neden olduğu bir sinaps yetmezliği ile ilgili olduğu varsayılmaktadır. Çeşitli kökenlere sahip amiloid oligomerleri tarafından nöronal değişikliklerin üretilebileceği bir dizi deneyde gösterilmiştir. Çözünür A β O'lar, A β O'lara maruz kalmanın artmasıyla hızlanan oldukça seçici bir nöron ölümüne neden olabilir. Çözünebilir A β O'ların, nöronal sinyalizasyon işlev bozukluğunu doğrudan tetikleyebileceği, bunun da erken hafıza kaybına ve AH'da demansın ilerlemesine yol açabileceği gösterilmiştir. Ayrıca, beyin dilimlerinde yapılan bir çalışmada A β O'lar sinapsların LTP'sini hızla engellemiştir. A β O'nun zararlı aktivitesi, sinaps bileşiminde, şekli ve yoğunluğunda bazı sapmaları indükleyebilir (Mroczko ve ark., 2018). Ayrıca çözünür bu oligomere maruz kalmanın artışıyla birlikte oldukça seçici ve hızlı bir nöron ölümüne neden olabilir. Bu etkiler, nanomolar altındaki A β O konsantrasyonlarında dahi ortaya çıkmaktadır (Lambert ve ark., 1998; Shankar ve ark., 2007; W. Q. Zhao ve ark., 2008b; Maezawa ve ark., 2011; Larson ve ark., 2012). Bu bulgular A β O'ların bellekle ilişkili sinapsların bozulmuş fonksiyonu ile yakından ilişkili olduğunu ve AH'nin erken dönemlerinde gözlenen bağlantı kaybı ve bozulmuş bellek fonksiyonu için moleküler bir temel sunabileceğini göstermektedir (Mroczko ve ark., 2018).

Genel olarak, A β O'ların tau patolojisini, nöronal polarite kaybını, aksonal taşınmanın bozulmasını, sinapsların bozulmasını, oksidatif stresi, endoplazmik retikulum stresini, insulin direncini, nöroenflamasyonu, kolinerjik bozukluğu, trofik faktörlerin kaybını,

epigenetik değişiklikleri, ektopik mitozisi ve ölüm kaybını artırdığı bulunmuştur. Bu sonuçlar bize, A β O'ların başlattığı hücrel hasarın sonuçları olarak AH nöropatolojisinin ve bilişsel kaybın ortaya çıkabileceğine dair güçlü kanıtlar sunmaktadır (Cline ve ark., 2018).

2.1.6. Amiloid- β Oligomerleri Tarafından Tau Toksisitesi Başlatılabilir ve Güçlendirilebilir

Amiloid- β oligomerlerin tau patolojisini tetikleyebileceği hipotezini destekleyecek şekilde, 2008'de fibrillerin bulunmadığı nöron kültüründe A β O'ların tau hiperfosforilasyonu indükleyebildikleri gösterilmiştir. Oligomer kaynaklı tau fosforilasyonunun mekanizması, spesifik olarak hedeflenen nöronlara bağlanmaya bağlıdır ve Src ailesi tirozin kinazlar ve PI3K yoluyla sinyalleşmeyi gerektirir. Bu çalışmada A β O'ların, AH'deki ana nörotoksinler olduğu ve oligomer aktivitesinin doğrudan tau hiperfosforilasyonuna bağlı olduğu sonucuna varılmıştır. Aynı zamanda, A β O'ya maruz kalan nöronlardaki tau dağılımının ektopik olarak dendritlere yeniden dağıtıldığı bulunmuştur. Bununla beraber, A β O'ların tau-bağımlı mikrotübül ayrışmasına neden olduğu, eksitator sinapslara tau translokasyonunu bozduğu ve tau'ya bağlı spin kaybına ve tau hiperfosforilasyonuna yol açtığı gösterilmiştir. Tau hiperfosforilasyonuna bağlı olarak NFY'lerin oluşumunu indüklediği ve nöritik distrofiye neden olduğu da ortaya konulmuştur. Bu A β O'lar, tau'nun en toksik formu olduğu düşünülen tau oligomerlerinin oluşumunu bile tetikleyebilmektedir. Alzheimer hastalarının beyinde, sinaptik A β O'ların sinaptik fosforile edilmiş tau'dan önce geldiği, hatta belki de p-Tau'nun sinaptik bölgelerdeki yayılımını yönlendirdiği bulunmuştur. Son veriler A β O'ların eksozomlar içinde p-Tau salgılaması için nöronları indükleyebileceğini, böylece A β O kaynaklı tau patolojisinin ilerlemesi için potansiyel bir mekanizma olabileceğini ortaya koymaktadır (Cline ve ark., 2018).

2.2. Diyabet

2.2.1. Tip 2 Diyabet

Diyabet, hem Tip 1 diyabet (T1D) hem de T2D olmak üzere önemli sağlık sorunlarından. Tip 1 diyabet, pankreas β -hücrelerinin genellikle otoimmün yıkımı sonucu glukozu karşı β -hücrelerinin yanıt veremediği mutlak insülin eksikliği durumudur. Tip 2 Diyabet ise insülinin etkisine karşı direnç gelişmesi ya da insülin duyarlılığının azalması ile insülin sentezinin ve salgılanmasının azaldığı hatta tamamen ortadan kalkabildiği durumdur. Tip 2 Diyabette hasta, insülin sinyalizasyonunu doğru bir şekilde işleyememektedir ve vücut insüline dirençli hale gelir. Vücudun insüline karşı insülin sinyaliyle verdiği tepkinin bozulmasının temel sorumlusu, insülinin hücre membranında bulunan reseptörleridir. Bunun temel nedeni henüz tam olarak bilinmemektedir. Vücudun insüline dirençli hale gelmesi, karaciğer, kas ve yağ dokularındaki hücrelerin normal insülin seviyelerine yeterince tepki verememesi demektir. Bu durumda da insülin talebine ayak uydurmak için pankreas giderek daha fazla insülin salgılar. Bu nedenle hastalığın başlangıcında hiperinsülinemi durumu görülmektedir. Pankreas insülin direncini telafi etmek için yeterli insülin üretebilme yeteneğini kaybettiğinde de T2D tablosu ortaya çıkar ve sonuç olarak kan şekeri seviyeleri artık kontrol altında tutulmaz. Dolayısıyla hastalığın ilerleyen aşamaları, hastaların artık insülin üretmediği bir sürece doğru kötüleşir. Tüm diyabetik hastaların yüzde 90'ından fazlasında “erişkin başlangıçlı diyabet” olarak da bilinen T2D hastalığı vardır (M. K. Song, Bischoff, ve ark., 2017).

2.2.2. Periferde İnsülin

İnsülin, 1921'de köpeklerin Langerhans adacıklarındaki β -hücrelerinden izole edilmiş bir hipoglisemik ajan olarak keşfedilmiştir (Banting ve ark., 1922). İnsan insülini, pankreas β -hücreleri tarafından üretilen bir hormondur. Sentezi ve kana salınımı, dolaşımdaki glukoz seviyesindeki artışla uyarılır (Henquin, 2009; Wortham ve Sander, 2016), ancak amino asitler, asetilkolin, kolesistokinin ve inkretin hormonları dahil olmak üzere diğer maddelerin seviyelerindeki değişim ile de salınımı gerçekleşebilir. İnsülin prekürsörü olan 109 aminoasit rezidülü polipeptid “preproinsülin”, pankreasın Langerhans adacıklarındaki β -hücrelerindeki ribozomlarda sentezlenmektedir (Chan ve ark., 1976;

Lomedico ve ark., 1977). Daha sonra, endoplazmik retikuluma geçen preproinsülin 23 aminoasitli hidrofobik özellik gösteren pre-bölgesini kaybederek 86 aminoasitli “proinsüline” dönüşür (Patzelt ve ark., 1978). Proinsülin golgi kompleksi içine alındığında, C-peptid segmentini proteazların etkisiyle kaybeder ve böylece insülin sentezlenmiş olur (Nishi ve ark., 1990).

İnsülin vücuttaki dokulara etki eder. En bilinen rolü, glukoz alımını teşvik etmek ve glukoz üretimini ve glukozun karaciğer tarafından salınmasını engelleyerek plazma glukozunu fizyolojik bir aralıkta tutmaktır. İnsülin ayrıca; yağ asidi ve amino asit alımını, enerji depolamayı ve hücresel büyümeyi destekleyen bir anabolik hormon olarak da işlev görür. Tersine, insülin, glukoneogenez, glikoliz, lipoliz ve proteoliz gibi katabolik süreçleri inhibe eder. Metabolizmadaki rolüne ek olarak, insülin ayrıca hücre büyümesini, hücre farklılaşmasını ve gen ekspresyonunu da düzenler (Potter ve ark., 2001; Han ve ark., 2015).

2.2.3. Beyinde İnsülin

Beyin, daha önceleri insüline duyarsız bir organ olarak kabul edilmekteydi. Köpeklere intrasisternal olarak enjekte edilen insulin, hem BOS hem de kanda önemli bir glukoz seviyesi düşüşüne neden olmuştur. Bu durum, bilim insanlarının insülinin beyne de etki edebileceğini varsaymalarına neden olmuştur (Woods ve Porte, 1975). Beyindeki insülinin varlığı daha sonra Havrankova ve ark. tarafından tanımlanmış ve beyindeki insülin konsantrasyonunun periferdekinden yaklaşık 10 ila 100 kat daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Havrankova ve ark., 1978).

İnsülinin beyinde sentezlenip sentezlenemeyeceği de uzun yıllar tartışılmıştır. Daha sonra, 1970'lerin sonlarında 1980'lerin başlarında hem insan hem de kemirgen beyinlerinde insülinin varlığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda, yakın zamanda yapılan çalışmalar, genetiği değiştirilmiş hayvanlarda insülin mRNA'sını tespit etmiştir. Bu durumda beyindeki bazı nöronlarda fonksiyonel insülinin üretilebildiği sonucuna varılmıştır. İki intraserebral insülin kaynağı vardır: beyinde sentezlenen insülin ve pankreatik insulin. Hem insan hem de kemirgen beyinlerinde insülin saptanmasına rağmen, insülinin esas olarak pankreasın Langerhans adacıklarındaki endokrin β -hücrelerinden üretildiği

düşünülmektedir. Günümüzde insülinin sadece periferde değil, aynı zamanda beyinde de etkili olduğu iyi bilinmektedir. Beyindeki insülinin büyük bir kısmı periferden geliyor gibi görünmektedir. Bu nedenle periferik insülin, beyindeki sabit insülin seviyesinin (steady-state) korunmasına yardımcı olur. Beynin belirli bölgelerindeki nöronların da nöronal uyarılmaya yanıt olarak insülin ürettiği ve salgıladığı gösterilmiştir. Böylece beyin; periferik insülinin aksine, nöral yanıt hızına karşılık olarak da hızlı bir şekilde insülin sağladığı düşünülmektedir (Nakabeppu, 2019).

İnsülin, kan-beyin bariyerini (KBB) doyurulabilir, reseptör aracılı bir taşıma mekanizması ile geçebilir (Nakabeppu, 2019). Bu taşıma mekanizması obezite, enflamasyon, diyabet ve dolaşımdaki trigliserit seviyeleri gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir (Banks ve ark., 2012). Bunun yanı sıra yaşın artması ve AH gibi hastalık durumlarında azaldığı bildirilmektedir (Sartorius ve ark., 2015; Stanley ve ark., 2016). Muhtemel bir açıklama KBB'den insülinin taşınmasının azalmasıdır (Arnold ve ark., 2018).

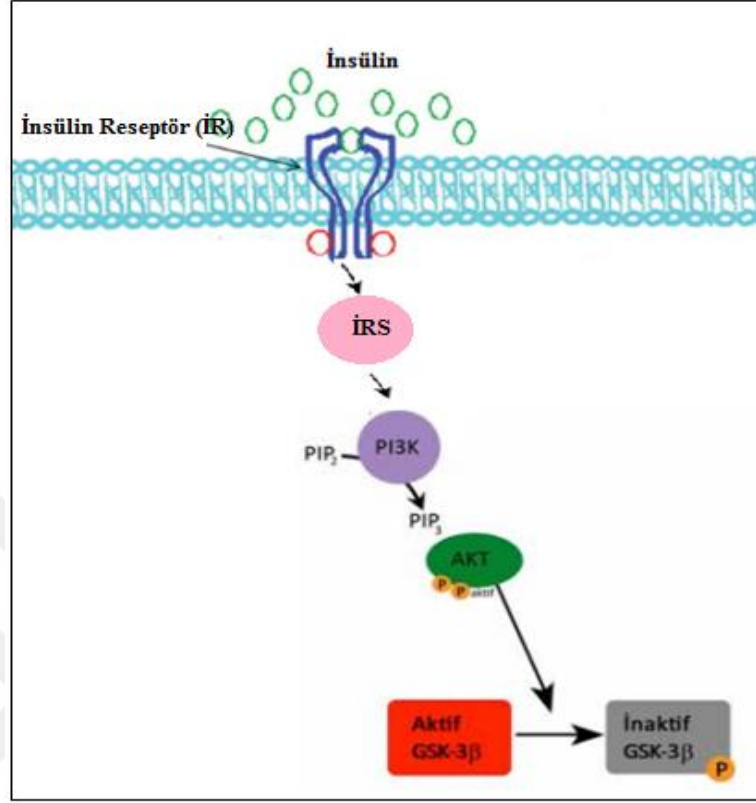
Beyin insülin için spesifik reseptörler, periferik dokudakilere benzerdir (Frank ve Pardridge, 1981; Pardridge ve ark., 1985). İnsülinin geçirgenliği, farklı beyin bölgeleri arasında değişmektedir. Bu geçirgenlik pons-medulla ve hipotalamusta en yüksek iken midbrain ve oksipital kortekste hiç yoktur (Banks ve Kastin, 1998). Ayrıca, insülin beyin içinde de sentezlenebilmektedir. İnsülin sentezi, hipokampustaki piramidal nöronlar, prefrontal korteks, entorinal korteks ve olfaktör bulbus gibi bir nöron alt grubuyla sınırlı olabilir (D. W. Clarke ve ark., 1986). İnsülin mRNA transkriptleri insan post mortem beyin dokusunda, özellikle de hipokampus ve hipotalamusta tespit edilmiştir, ancak AH'li bireylerin post-mortem beyin dokusunda mevcut seviyelerinin azalmış olduğu gösterilmiştir (Steen ve ark., 2005). Son zamanlarda, sıçan embriyolarının beyin kortekslerinden izole edilen astrositlerin de insülin salgıladığı bildirilmiştir. Nöronlar veya astrositler tarafından salgılanan insülin, beyin fonksiyonlarıyla ilişkili yüksek enerji taleplerini sürdürebilmekte temel rol oynamaktadır. (Pitt ve ark., 2017; Takano ve ark., 2018).

Beyindeki insülinin rolü, beyindeki insülin reseptör (İR)'lerin tanımlanması ile daha da doğrulanmıştır. Beyindeki İR dağılım yoğunluğu, farklı beyin bölgeleri arasında değişmektedir. En yüksek İR yoğunluğunun olfaktör bulbus, serebral korteks,

hipokampus, hipotalamus ve serebellum bölgelerinde olduğu görülür (Hill ve ark., 1986; Werther ve ark., 1987). İnsülin reseptörlerinin MSS içindeki bu geniş dağılımı, insülinin çok işlevli olduğuna işaret eder (Kleinridders ve ark., 2014). İnsülin reseptörleri, zengin sinaptik girdi alan dendritik alanlarda bol miktarda bulunmaktadır (Werther ve ark., 1987). Aynı zamanda; insülin sinyal yolunun diğer alt üyeleri de beyindeki İR ile benzer bir ekspresyon paterni ortaya koymaktadır (Moss ve ark., 1990; Horsch ve Kahn, 1999; Leroy ve Brion, 1999). Bütün bu deliller, sinaptik fonksiyon ve biliş ile yakından ilişkili olan beyin bölgelerinde aktif bir insülin sinyal iletimi olduğunu göstermektedir.

2.2.4. İnsülin Sinyalizasyonu

İnsülin hormonu işlevini, insülin sinyal iletim yolunu aktive eden İR'ye bağlanarak gerçekleştirir. İnsülin reseptörleri, reseptör Thr kinazların bir alt ailesine aittir (Saltiel ve Kahn, 2001). İnsülin reseptörü, insülinle aktive edildiğinde intrinsik bir Thr kinaz aktivitesi kazanır ve insülin reseptör substratları (İRS) 1 ve 2 (İRS1, İRS2) gibi adaptör proteinlerini Thr rezidülerinden fosforile eder ve pek çok ikincil haberci sinyal kaskadını aktifleştirir. Bunlardan biri fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) olup, insülinin metabolik aktivitelerinin neredeyse tamamından sorumludur. İnsülin reseptör substrat-1'in serin (Ser) rezidülerinden fosforilasyonu, insülin sinyalizasyonun hücre içi kaskadını inhibe etmektedir. Bu nedenle fosforile Ser İRS-1 seviyesi, bozulmuş insülin sinyalizasyonunun bir işareti olarak düşünülebilir (Hotamisligil ve ark., 1996). İnsülin reseptör substrat-1'in Thr rezidülerinin fosforilasyonunun ardından PI3K aktifleştirilir. Bu PI3K, membrandaki fosfatidilinositol 4,5 bifosfatı (PIP2) fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfata (PIP3) dönüştürür. Daha sonra, PIP3, protein kinaz B'yi (PKB, Akt olarak da bilinir) plazma membranına alır, burada fosforile eder. Protein kinaz B ya da Akt'nin glikojen sentaz kinaz-3 β (GSK-3 β) fosforilasyonunu da içeren birçok önemli hücresel hedefi vardır. Protein kinaz-B ya da Akt aktive edildiğinde, GSK-3 β 'yı fosforile eder ve inaktifleşmesini sağlar (Lyra ve ark., 2019) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. İnsülin sinyal mekanizması

İnsülin sinyal mekanizmasının uyarılmasından sonra, insülin-reseptör kompleksi internalize edilir. Sistemi sıfırlama için, inaktif insülin reseptöründen ayrılır ve reseptör hücre yüzeyine geri döner veya sitozolde indirgenir. İnaktif insülin ise, endozom içinde İDE tarafından bozulur ve daha sonra Katepsin D gibi lizozomal peptidazlarla amino asitlerine kadar tamamen sindirilir. Eğer insülin sitozolde tamamen degrade edilemezse, sitoplazmadaki insülin peptid parçaları insülin kaynaklı sinyal iletim mekanizmalarına müdahale ederek insülin direnci ve diyabete neden olur (M. K. Song, Bischoff, ve ark., 2017).

2.2.5. Beyin İnsülin Direnci

Tip 2 diyabette insülin direnci, “vücut dokularında insülinin etkisine daha az duyarlılık göstermesi” olarak tanımlanmıştır. Benzer şekilde, beyin insülin direnci de “beyin hücrelerinin insüline yanıt verememesi” durumu olarak tanımlanabilir. Mekanik olarak bu cevap eksikliği, İR’lerin aşağı doğru regülasyonundan, İR’lerin insüline bağlanamamasından veya insülin sinyal kaskadının hatalı aktivasyonundan

kaynaklanabilir (Arnold ve ark., 2018). İnsülin reseptörlerinin sürekli aktivasyonu, İRS'lerde Ser ve Thr rezidülerinin aşırı fosforilasyonuna neden olur (Czech ve ark., 1988; Singh, 1993; Tanti ve ark., 1994). İnsülin reseptör substratlarının bu anormal fosforilasyonu, İR bağlanma duyarlılığının azalmasına ve İRS'nin aktif kısmının membrandan sitozole translokasyonuna neden olur. Bu durum da insülin direncinin ana moleküler temellerinden birisidir (Aguirre ve ark., 2002; Boura-Halfon ve Zick, 2009; Copps ve White, 2012; Ryu ve ark., 2014). İnsülin direncinin nasıl geliştiği tam olarak aydınlatılamamış olsa da İR ekspresyonunun, İR Thr kinaz aktivitesinin, İRS-1 ve PI3K aktivitesinin azalmasından kaynaklanabileceği de düşünülmektedir (Virkamaki ve ark., 1999).

2.2.6. Beyindeki İnsülinin İşlevleri

Beyindeki insülinin bilinen ilk fonksiyonlarından biri, gıda alımının düzenlenmesi ve vücut ağırlığının kontrolüdür. İnsülin, gıda alımı ve kilo düzenlemesinde rol alan hipotalamusun nöronal aktivitesini etkiler. Periferik glukoz üretiminin inhibisyonu için hipotalamik insülin sinyali gerekir. İnsan çalışmalarında insülin ve beyin glikoz metabolizması arasında yakın bir ilişki olduğu gözlenmiştir. Daha yüksek insülin direnci, öğrenme ve hafıza ile ilgili beyin bölgelerinde düşük serebral glukoz metabolik hızı ile ilişkilidir. İnsülin sinyalini inhibe etmek, bilişsel aktivite sırasında hipokampal enerji metabolizmasının azalmasına yol açar. İnsülin, periferde olduğu gibi nöronal enerji substrat alımını doğrudan düzenleyebilir. Beyin, tamamen sentezlenemeyen veya nöronlarda depolanamayan enerji için glikoza güvenir. Glikoz KBB boyunca, KBB'nin endotelial hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilen glikoz taşıyıcı (GLUT) 1-GLUT1 ile taşınır. Daha sonra, ana nöronal GLUT olan, GLUT3, hücre dışı alandan nöronlara glikoz alımına aracılık eder. GLUT1 ve GLUT3 insüline duyarlı olduklarından, daha önceleri, biliş üzerindeki glikoz metabolizmasının düzenlenmesinde insülinin etkisinin olmadığı düşünülmüştür. Daha sonra, insüline duyarlı GLUT4, hipokampus ve temporal korteks gibi hafıza ve bilişle ilgili beyin bölgelerinde bulunmuştur. İnsülinin i.c.v enjeksiyonu; hipokampal bağımlı işler sırasında, glikoz alımındaki artışları yansıtan GLUT4'ün hipokampal plazma membranına translokasyonunu uyarmıştır. Bu durum,

insülinin GLUT4 aracılı glikoz alımı yoluyla hafızayı da kısmen etkileyebileceğini göstermektedir (Nakabeppu, 2019).

İnsülin, ayrıca bir nörotrofik faktör olarak da bilinmektedir. Çünkü nöronal proliferasyonda, farklılaşmada, ve nörit büyümesinde rol oynamaktadır. Ayrıca, insülinin nöronları apoptozis ve oksidatif stres gibi çeşitli faktörlere karşı koruyabildiği bilinmektedir. İnsülin temelde PI3K yolağı aracılığıyla, nekroz veya apoptozun neden olduğu ölümlere karşı nöronları korumaktadır. İnsülin seviyesinin uzun süreli azalması, nöron kaybına ve bilişsel bozulmaya neden olabilir (Nakabeppu, 2019).

Beyindeki insülinin en çok çalışılan işlevi, nöral plastisite ve biliş üzerindeki rolleridir. İnsülinin, kortikal ve hipokampal sinaptik plastisiteye glutaminerjik ve gama aminobütrik asit (GABA)erjik iletimin modülasyonu ile katıldığı, böylece hafızayı ve öğrenmeyi etkilediği bildirilmiştir. Kronik insülin ilavesi, plastisitede büyük önem taşıyan AMPAR'nin sinapsa translokasyonunu arttırarak, sessiz sinapsların işlevsel olanlara dönüşüm sürecini hızlandırır. İnsülin NMDAR'lerin Thr fosforilasyonunu ve potansiyel hipokampal NMDAR aktivitesini artırabilir. Aynı zamanda, NMDAR'nin hücre yüzeyine ekzositoz yoluyla iletilmesini destekleyerek LTP dahil eksitatör sinaptik plastisiteyi arttırır. İnsülin, fonksiyonel GABA reseptörlerinin (GABAR) ekspresyonunu ve postsinaptik plazma membranına translokasyonunu arttırır. Böylece GABAR'nin aracılık ettiği minyatür inhibitör postsinaptik akımların genliği artar. Bu işlevlerinin yanı sıra insülinin asetilkolin ve norepinefrin gibi diğer nörotransmitterlerin üretimini ve alımını da modüle ederek bilişsel işlevi etkilediği bilinmektedir. Fakat, insülinin biliş üzerindeki bu etkilerinin altında yatan moleküler mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır. Hipokampus ve serebral korteks gibi hafızanın oluşumundan ve konsolidasyonundan sorumlu olan beyin bölgeleri, İR ve aşağı akış efektörlerinin bol ekspresyonuna sahiptir. Bu durum, insülin sinyalizasyonunun hafıza ve biliş üzerindeki potansiyel rolünü ortaya koymaktadır. Morris su labirentiyle eğitilen hayvanların hipokampal sinaptik membranındaki İR protein seviyelerinin yükseldiği ve İR duyarlılığının artmış olduğu bulunmuştur. Sinaptik zardaki aşağı akış moleküllerinden IRS-1 ve Akt'nin yukarı doğru regülasyonu, uzun süreli hafıza oluşumundan sonra da gözlenmiştir (Nakabeppu, 2019). Bu çalışmalar genel olarak insülin sinyal yolunun aktif olarak glikoz metabolizmasının

düzenlenmesi, enerji kullanımı, sinaptik iletim ve plastisitenin düzenlenmesi yoluyla öğrenme ve hafızayı geliştirdiğini göstermektedir.

2.3. Alzheimer Hastalığı Patogenezinde Amiloid- β Oligomerlerinin İnsülin Reseptörleri Üzerindeki Rolü

Hızla gelişen bir araştırma alanı, AH hastalarının beyinde gözlemlenen insülin sinyalizasyonundaki direnç ve A β O'lar arasındaki ilişkidir. Bu ilişkinin detaylı bir incelemesi yakın zamanda ortaya çıkmıştır. Hikayenin bir tarafı insülinin A β O'lara karşı savunmasına odaklanmaktadır. Burada MSS insülin sinyali, A β O birikimini ve A β O'nun nörotoksik bağlanmasını engelleyebileceği yönündedir. Hikayenin diğer tarafı ise, A β O toksisitesinin insülin sinyali üzerindeki toksik etkisine odaklanmaktadır (Viola ve Klein, 2015). Alzheimer hastalığı, T1D'nin (insülin eksikliği) ve T2D'nin (insülin direnci) kompozit özelliklerine sahip bir beyin hastalığı olarak kabul edildiği için bilim insanı “de la Monte” bu kavramı pekiştirmek için, AH'nin “Tip-3-Diyabet-T3D” olarak adlandırılmasını önermiştir (Rivera ve ark., 2005; Steen ve ark., 2005; de la Monte, 2014).

Amiloid- β 'nin küçük oligomerleri, AH'de nörodejeneratif süreçlere yol açan sinapto-toksositeye ve aşağı akış olaylarına katkıda bulunur (Nisbet ve ark., 2015; Zimbone ve ark., 2018). İnsülin ve A β 'nin her ikisi de ortak bir sekans tanıma motifini paylaşan amiloidojenik peptitlerdir. Bu nedenle A β O'lar, İR'ye bağlanabilmekte ve bu reseptörün otomatik fosforilasyonunu inhibe edebilmektedir (Xie ve ark., 2002). Aynı zamanda, İR'nin plazma zarından ayrılmasını tetikleyerek yüzey İR'nin ve insülin duyarlılığını azalmasına neden olurlar (W. Q. Zhao ve ark., 2008a; De Felice ve ark., 2009b). Alzheimer hastalığında A β O'ların birikmesi, IRS'nin inhibitör Ser fosforilasyonuna ve hücre yüzeyinden İR'lerin çıkarılmasına yol açarak insülin direncine neden olabilir (Bedse ve ark., 2015). Olgun hipokampal nöronların kültürlerinde, A β O'ların özellikle dendritlerde, hızlı ve önemli bir yüzey İR kaybı meydana getirdiği gösterilmiştir (W. Q. Zhao ve ark., 2010). İnsülin reseptörleri, öğrenme, hafıza ve tau fosforilasyonu da dahil olmak üzere önemli nörolojik süreçlerde rol oynamaktadır. Bu nedenle, A β O'ların neden olduğu insülin sinyalizasyonundaki zararlı etkiler ve membran İR kaybı, bellek bozukluğunun ve AH'nin diğer patolojik özelliklerinin altında yatan önemli erken mekanizmaları temsil edebilir (Tumminia ve ark., 2018). Aynı zamanda, insülin nöronal

yüzeylerinde ortak bir bağlanma yerine sahip olduğundan A β O'larla rekabet ederek nöroprotektif olarak görev yapmaktadır (Bedse ve ark., 2015).

2.3.1. Alzheimer Hastalığında Beyin İnsülin Direnci ve Amoloid- β Patolojisi

Amiloid- β oligomerleri İR'ye bağlandığında insülin sinyalizasyonunun aşağı akış yolu olan PI3K→Akt yolunu bloke eder ve GSK-3 β 'nin aktivitesini arttıracak yönde etki gösterir. In vitro ve in vivo kanıtlar, GSK-3 β aktivasyonunun, APP'nin bölünmesini hem modüle ederek AH beyinde A β oluşumunda ve birikmesinde rol oynadığını göstermiştir. Yapılan çalışmalarda, AH hastalarında GSK-3 β hiper aktivasyonunun hem β -sekretaz ekspresyonunu hem de γ -sekretaz transkripsiyonunu arttırarak APP üzerinden A β 'nin aşırı üretimine neden olduğu gösterilmiştir. Amiloid prekürsör protein üzerindeki doğrudan etkisinin yanı sıra, GSK-3 β aktivitesi, insülin sinyal yolunun bozulması yoluyla A β patolojisini de indükleyebilir. İn vivo çalışmalar, A β ve GSK-3 β seviyeleri arasında pozitif bir korelasyon olduğunu ortaya koymuştur (Lauretti ve ark., 2020).

Son olarak, insülin ve A β 'nin her ikisi de İDE substratlarıdır. Bu nedenle hiperinsülineminin İDE'yi rekabetçi bir şekilde bloke ederek A β degradasyonunu önlediği öne sürülmüştür (Farris ve ark., 2003). İnsülin degradasyon enziminin A β 42'nin yanı sıra insülini degrade edebilme kabiliyeti nedeniyle, hiperinsülemi, insülin direnci ve AH'yi bağlayan bir bağlantı olduğu düşünülmektedir (Authier ve ark., 1996; Qiu ve Folstein, 2006). Alzheimer hastalarının beyinde A β degradasyon aktivitesi ve İDE'nin mRNA ve protein seviyesi azalır. Bu azalış, A β seviyesi ile negatif bir korelasyon gösterir (Perez ve ark., 2000; Cook ve ark., 2003b; Z. Zhao ve ark., 2007b). Azalan İDE seviyesi, AH hastalarında ve AH Tg farelerinde gözlenen beyin insülin sinyalizasyonundaki eksiklik ile ilişkilidir (L. X. Zhao, Teter, Morihara, Ubeda, ve ark., 2004). İnsülinin, PI3K'nın aktivasyonuna bağlı olarak İDE'nin ekspresyonunu arttırabildiği gösterilmiştir (Galagovsky ve ark., 2014). İDE'nin yalnızca monomerik A β 'yi parçaladığı düşünülmekle birlikte (Hulse ve ark., 2009; T. Saido ve Leissring, 2012), etkisindeki bir azalma dengeyi A β oligomerizasyonuna doğru kaydırır (Ho ve ark., 2004; Starks ve ark., 2015). Dolayısıyla, bu veriler toplu olarak değerlendirildiğinde A β O'ların beyinde insülin direncini şiddetlendirdiği ileri beslemeli bir döngü gösterir; bu da A β temizliğini azaltır ve A β oligomerizasyonu için eğilimi arttırır (J. R. Clarke ve ark., 2015).

2.3.2. Alzheimer Hastalığında Beyin İnsülin Direnci ve Tau Patolojisi

Tau, tübülün düzenliğini sabitleyerek mikrotübülleri stabilize ettiği bilinen bir mikrotübül ilişkili proteindir. Tau işlevi ve mikrotübüller için afinitesi esas olarak fosforilasyon durumuna bağlıdır. Alzheimer hastalığında tau hiper-fosforiledir ve sitoplazmada birikir. Bu durum; mikrotübüllerin parçalanmasına, nöronal bütünlük kaybına ve nihayetinde NFY oluşumuna yol açar. Tau hiper-fosforilasyonu üzerine yapılan erken çalışmaların çoğu, GSK-3 β 'nın AH tau patolojisinin gelişiminde rol oynayabilecek ana tau kinaz olacağı sonucuna varmıştır. Tau proteininin GSK-3 β aracılı fosforilasyonu, mikrotübül bağlanma bölgelerine ve bunların amino asit rezidülerine yakın olan alanlarda görülür. İn vitro ve in vivo çalışmalar, GSK-3 β inhibisyonunun tau'nun hiper fosforilasyonuna neden olduğunu gösterdiğinden, tau patolojisine karşı ilaç keşif ve geliştirme programlarının çoğunda hedef GSK-3 β aktivitesidir (Lauretti ve ark., 2020).

İnsülinin, kültürel nöronlarda GSK-3 β inhibisyonu yoluyla tau fosforilasyonunu düzenlediği gösterilmiştir (Hong ve Lee, 1997). Kronik insülin direnci, tau hiperfosforilasyonunu teşvik eder. Bu etki, başlangıçta insülin sinyal proteinlerinin (İRS-1, Akt, vb.) düşük ekspresyonunu gösteren bölgelerde daha belirgindir (Mullins ve ark., 2017). Aynı zamanda, AH hastalarının beyinde, artmış sitozolik İRS-1 pS312 ve pS616 seviyeleri, NFY'lerin mevcudiyeti ile ilişkilidir. Bu bulgu, İRS-1 fosfo-türlerinin, beyin insülin direnci gelişimindeki rollerinin ötesinde AH'de tau patolojisini teşvik eden etkilere sahip olabileceğini göstermektedir (Moloney ve ark., 2010). Bu nedenle artmış bir GSK-3 β aktivitesinin A β üretiminin yükselmesine ve artmış tau fosforilasyonuna yol açması şaşırtıcı değildir. Dolayısıyla, beyin insülin sinyalizasyonunun uyarılması hem A β hem de tau patolojisi için önemli bir terapötik hedef olarak görülebilir.

2.3.3. Alzheimer Hastalığında Yeni Bir Terapötik Yaklaşım Olarak Beyin İnsülin Sinyalizasyonunun Uyarılması

Beyin insülin sinyalizasyonu, AH için ana risk faktörü olan yaşla birlikte azalmaktadır. Bu durum, insülin sinyalinin geri kazanılmasının AH'li hastalarda faydalı olabileceğini düşündürmektedir. İnsülin, nöronal A β O bağlanma bölgelerinin aşağı doğru regülasyonuna neden olarak ve oligomerin temizlenmesini arttırarak nöroproteksiyon

sağlamaktadır. Aynı zamanda İR internalizasyonunu ve sinaps kaybını önlediği de bilinmektedir. İnsülinin sinapslar üzerindeki bu koruma mekanizmaları nedeniyle normal bireylerde bilişsel fonksiyona katkıda bulunabilir. İnsülin sinyalizasyonundaki azalmalar ise nöronları oligomer kaynaklı sinaptotoksisteye karşı savunmasız hale getirebilir. Son zamanlarda belirtildiği gibi insulin, AH'nin erken ve/veya orta evrelerinde önemli terapötik etkilere sahip olabilir. Oligomerin sinapslara bağlanmasını ve İR patolojisinin bloke edilmesini önlemektedir. İnsülinle ilişkili sinyal yollarını güçlendirmek için alternatif yaklaşımlar AH'de ek terapötik fırsatlar sağlayabilir (De Felice ve ark., 2014).

2.4. Amiloid- β 'nın Beyinden Temizlenmesi

Amiloid- β birikiminin, AH olan hastaların beyinde merkezi bir patoloji olduğu düşünülmektedir. Amiloid- β 'nın kararlı durumu, amiloid peptidini degrade eden proteolitik enzimler ve perivasküler drenaj ile kontrol edilmektedir. Amiloid- β birikimi; üretim, birikim ve degradasyon arasındaki dengenin değişmesinden kaynaklanabilir (Spencer ve ark., 2007). Sağlıklı bir insanın beyinde, A β yüksek temizlenme oranına sahip olduğu için birikimi önlenmektedir. Ancak bu temizlenme oranı AH'de düşmektedir (Bateman ve ark., 2006; Mawuenyega ve ark., 2010; Elbert ve ark., 2015). Bu nedenle, beyindeki A β peptidinin sağlıklı seviyesinin korunmasında A β degrade edici enzimler kilit rol oynamaktadır (Pacheco-Quinto ve ark., 2016; Schoenfeld ve ark., 2017; Nalivaeva ve Turner, 2019).

2.4.1. Neprilisin (NEP)

İlk kez 1995 yılında sentetik A β 'nın kullanıldığı bir in vitro çalışmada NEP'in A β degradasyonu yapabildiği gösterilmiştir (Howell ve ark., 1995). Daha sonrasında, A β degradasyonundan sorumlu ana enzimin NEP olduğu sonucuna varılmıştır (T. C. Saido ve Iwata, 2006). Aynı zamanda, diğer substratlarından ziyade A β 'ya karşı afinitesinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Miners ve ark., 2008).

Tip II integral membran proteinidir. Aktif bölgesi hücre dışında yer aldığı için interstisyel sıvıdaki çözünebilir A β 'nın degradasyonunu sağlar (Nalivaeva, Beckett, ve ark., 2012). Uzun hücre dışı parçası üzerinde, Zn⁺² bağlayıcı bölge olarak işlev gören bir "HEXXH"

motifi bulunmaktadır. Bu enzim en yüksek oranda böbrekte sentezlenmektedir. Ayrıca vücutta pek çok hücreden de sentezlenebilmektedir (Carson ve Turner, 2002). Beyindeki ekspresyonları böbreğe göre çok azdır. Beyinde başlıca nigrostriatal yolda fakat daha az oranda korteks ve hipokampusta da bulunmaktadır (Nalivaeva, Belyaev, ve ark., 2012). Neprilisin, astrosit ve mikroglialar tarafından eksprese edilememektedir. Bu enzim sadece nöronlar tarafından sentezlenebilmektedir ve genellikle akson terminallerinde yer almaktadır (T. Saido ve Leissring, 2012). Ağırlıklı olarak da presinaptik membranda bulunmaktadır. Bu nedenle, A β degradasyonunu genellikle sinaptik aralıkta gerçekleştirmektedir (Iwata ve ark., 2005).

2.4.2. Alzheimer Hastalığının Patolojisinde Neprilisin Enziminin Rolü

Yaşla birlikte ve AH hastalarında NEP mRNA'sında ve protein ekspresyonunda gözlenen azalma, NEP'nin A β birikiminin düzenlemedeki rolünü doğrulamaktadır (Sikanyika ve ark., 2019). Bu durum bize, presinaptik NEP'deki düşüşün, AH'nin patogeneze yol açan en erken hücre içi olaylardan biri olabileceğini göstermektedir (Sharma ve ark., 2019). Açıkçası, NEP'deki bu düşüş, sinaptik yapıların etrafındaki A β seviyelerini yükselterek, sinapsların bozulmasına neden olur ve NEP'nin presinaptik lokalizasyonunda daha da azalmasına neden olur. Bu durum, BOS'taki NEP'in AH'de sinaptogenezi izlemek için önemli biyobelirteçlerden biri olabileceğini göstermektedir (Hafez ve ark., 2011; Marr ve Hafez, 2014; Nilsson ve ark., 2015; Bayes-Genis ve ark., 2016; Schoenfeld ve ark., 2017; Zhang ve ark., 2017).

Neprilisin, A β monomerlerinin yanı sıra A β O formlarını da degrade edebilmektedir (Iwata ve ark., 2005). NEP, diğer substratlarına kıyasla A β 'ya karşı daha fazla afinite göstermektedir (Miners ve ark., 2008). Alzheimer hastalığında, A β O'ları sinaptik aralıkta yıkan esas enzim olan NEP düzeylerindeki bu azalma neticesinde A β O'lar tam anlamı ile degrade edilememekte ve beyinde A β O'lar birikmeye başlamaktadır. Bu yüzden LTP oluşumu engellenerek hafıza bozukluklarına sebebiyet vermektedir (T. C. Saido ve Iwata, 2006). Amiloid- β oligomerleri, sinaptik aralıkta birikerek LTP oluşumunu engellendiği ve hafıza bozukluklarına neden olduğu bilindiği için NEP enzimi A β O'ların toksik etkilerine karşı koruma sağlar (Lambert ve ark., 1998; Iwata ve ark., 2005; Hartley ve ark.,

2008). Bu nedenle, NEP'in azalması, AH'nin ilerlemesinde önemli bir faktör olarak kabul edilmektedir (Miners ve ark., 2006).

2.4.3. İnsülin Degrade Edici Enzim (İDE)

İnsülin degrade edici enzim, 110-kDa molekül ağırlığında tiyol Zn^{+2} -metaloendopeptidazdır (Goldfine ve ark., 1984; Seta ve Roth, 1997; Duckworth ve ark., 1998; Vekrellis ve ark., 2000). İnsülin degrade edici enzim geni insanlarda 10q23-24 kromozomunda bulunur ve defekti AH patogenezi etkililer (M. Kim ve ark., 2007). Bu enzim, nöronal ve mikroglial hücrelerde A β seviyelerinin ana düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır (Farris ve ark., 2003). İnsülin degrade edici enzimin A β 'ye yönelik degradasyon faaliyetinin keşfedilmesinden bu yana (Kurochkin ve Goto, 1994; Kurochkin, 2001), insan hipokampal lizitlerindeki A β temizlenmesinden, sitoplazma (Stargardt ve ark., 2013) ve BOS'da (Portelius ve ark., 2017) A β 'nin parçalanmasından sorumlu ana proteaz olduğu gösterilmiştir.

İnsülin degrade edici enzim birçoğu belli koşullar altında β -yapısını oluşturan substratlara özgüdür. Bunlar A β , insülin, glukagon, amilin, atriyal natriüretik faktör ve kalsitonin gibi ortak bir amiloidojenik motif barındıran substratlardır (Bennett ve ark., 2000; Kurochkin, 2001). Bu substratların içinden degrade ettiği in vivo olarak en iyi belgelenen insülin ve A β 'dir (E. S. Song ve Hersh, 2005). İnsülin degrade edici enzimin ana yeri sitozol olmasına rağmen, diğer hücre bölmelerinde, hücre dışı veziküllerde ve hücre içi zarlarda da bulunabilir (Tundo ve ark., 2017). Ayrıca kan, BOS ve kanonik bir sinyal peptidi sekansı olmamasına rağmen hücre kültürü ortamında da saptanmıştır (Tundo ve ark., 2017). Bu enzimin hücrelerin dışına taşınmasına, hemen hemen bütün hücre tipleri tarafından salgılanan endositik kökenli ve hücre dışı veziküler eksozomların aracılık ettiği gösterilmiştir (Bullock ve ark., 2010). Hem eksozomlarda (Bullock ve ark., 2010) hem de endozomlarda (Hamel ve ark., 1991; E. S. Song, Jang, ve ark., 2017) İDE'nin varlığı, salgılanan, endozomal bölmede üretilen veya hücre dışı ortamdan bozunma için alınan β -eğilimli peptitlere erişimini sağlar. Bu durum İDE'nin fizyolojik şartlar altında hücre dışına çıkarak A β degradasyonu yaptığına işaret eder. Nöronlarda ve mikroglia'da hem insülin hem de A β yıkımı için İDE gerektiğinden, T2D ve AH patogenezi arasındaki olası bağlantılardan birini temsil etmektedir (Qiu ve Folstein, 2006; Mittal ve Katare, 2016).

2.4.4. Alzheimer Hastalığının Patolojisinde İnsülin Degrade Edici Enzimin Rolü

İnsülin degrade edici enzimin beyindeki aktivitesi yaşla birlikte ve AH'nin erken evrelerinde azalmaktadır (Stargardt ve ark., 2013). Bu durum, İDE'nin AH için ileride bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini düşündürmüştür. Aynı zamanda hastalığın evrelerinin ilerlemesiyle birlikte İDE aktivitesindeki ve seviyesindeki azalma ilerlemekte (Z. Zhao ve ark., 2007a; Stargardt ve ark., 2013) ve A β 42 seviyesi ile de negatif bir korelasyon sergilemektedir (Z. Zhao ve ark., 2007a). Bu nedenle, İDE tarafından A β bozulmasının veya İDE eksikliğinin AH'ye neden olması mümkündür.

Alzheimer hastalarının beyinlerinde İDE protein ve mRNA seviyesi kontrollere göre daha düşüktür (Cook ve ark., 2003a). Alzheimer hastalarında İDE ve insülin arasında paralel bir azalmanın olduğu görülmüştür. Bu durum, insülinin, insülin sinyal yolağı üzerinden negatif bir geri bildirim mekanizması ile İDE ekspresyonuna müdahale edebileceği düşündürmüştür. Bunun üzerine yapılan bir çalışmada bu geribildirim mekanizmasının PI3K ile gerçekleştiği bulunmuştur (L. Zhao, Teter, Morihara, Lim, ve ark., 2004). Bu nedenle merkezi insülin sinyalizasyonunun fonksiyon bozukluğunun A β O'nun degradasyonunu da bozmaktadır (L. Zhao, Teter, Morihara, Lim, ve ark., 2004; W. Q. Zhao ve ark., 2009). Amiloid- β oligomerlerinin artması, İR'ye bağlanmak için insülin ile rekabet ederek insülin sinyalizasyonuna müdahale edebilir (Ling ve ark., 2002; Xie ve ark., 2002). Bu durum beyinde, zararlı bir pozitif geri besleme döngüsü ile sonuçlanan insülin direncini artırabilir (Li ve ark., 2015) ve daha fazla toksik A β O'ların üretimine yol açabilir. Bu nedenle A β 'yi bozan proteazların düzenlenmesi, AH tedavisi için mantıklı bir terapötik yaklaşımı temsil eder. Beklenileceği üzere, İDE aktivatörleri A β bozulmasını arttıracak, birikimi ve ideal olarak AH semptomlarına yol açan nöronal kaybı önleyecektir. Bu nedenle, substrata özgü İDE aktivatörlerinin geliştirilmesi veya beyne özgü İDE aktivatörlerinin verilmesi, büyük terapötik ilgi alanına girecektir (Nalivaeva ve ark., 2008). Çinko desteğinin hem İDE hem de NEP'in sentezini uyarması mümkündür.

2.5. Çinko ve Çinkonun Alzheimer Hastalığı ile İlişkisi

Çinko, çoğu vücut dokusunda iki değerlikli katyon olarak bulunan bir geçiş metalidir. İnsan vücudunda toplam 2-4 gr Zn⁺² bulunurken plazmada 12-16 μ M bulunmaktadır

(Jansen ve ark., 2009; A. S. Prasad, 2014). Fizyolojik koşullarda Zn^{+2} 'nin büyük bir bölümü (yaklaşık 1-2 mg) pankreasta yer alır (Bosco ve ark., 2010). Çinkonun fizyolojik konsantrasyonun 15-30 μM olduğu bilinmektedir (Lubag ve ark., 2011; Nygaard ve ark., 2014). Hücre içindeki Zn^{+2} konsantrasyonu fizyolojik koşullarda sıkı bir şekilde denetim altında tutulmaktadır (Nygaard ve ark., 2014). Çinko insan sağlığı için vazgeçilmez bir unsurdur ve belirlenen Ulusal Bilimler Akademisi Beslenme Kuruluna göre günde 15-20 mg/gün tavsiye edilen dozudur (M. K. Song, Bischoff, ve ark., 2017). İnsan vücudundaki Zn^{+2} çoğunlukla enterositlerin apikal yüzeylerine lokal yerleşmiş Zn^{+2} taşıyıcılarıyla aktif transport ile duodenum, ileyum ve jejunumdan emilmektedir (Tyszka-Czochara ve ark., 2014),

Beyinde en yüksek seviyede bulunan eser metal Zn^{+2} 'dir (Watt ve ark., 2010). Çinko iyonları insan beslenmesinde temel bir takviyedir ve sayısız hücresel işlemlerin düzenlenmesinde yer aldığı iyi bir şekilde belgelenmiştir (Beyersmann ve Haase, 2001; Gaither ve Eide, 2001). Bunların arasında, IRS-1'in aktivasyonuna neden olarak insülin direncini azaltmak (Kelly ve Ruderman, 1993), nöronal sağ kalım ve gelişime katkıda bulunmak (Frederickson ve ark., 2005) ve beyinde NMDAR'leri üzerinde voltaj bağımlı ve voltaj bağımsız inhibisyon yaratarak glutamatın olası toksik etkilerinden korumak (Jimenez-Jimenez ve ark., 1998) bulunmaktadır. Çinko, glutamaterjik nöronlara lokalize özel veziküllerde depolanır (Bitanirwe ve Cunningham, 2009), ve beyin uyarılabilirliğini düzenler (Hambidge ve Krebs, 2007), öğrenme ve sinaptik plastisiteyi etkiler (Nakashima ve Dyck, 2009; Tamano ve ark., 2015). Çinko, hem çeşitli enzimlerin aktif bölgesinin ayrılmaz bir parçası hem de bir düzenleyici faktör olarak çeşitli hücresel işlemlerde rol oynar (Ilouz ve ark., 2002). Çinkonun dikkat çekici özelliklerinden biri, insülin benzeri işlevi ve insülin direnci ve T2D ile olan potansiyel bağlantısıdır (Ilouz ve ark., 2002). Çinkonun insülinin sinyal iletimini kolaylaştırarak insülin benzeri etkiler verdiği gösterilmiştir (Miao ve ark., 2013). Fizyolojik seviyelerde bulunan Zn^{+2} iyonu, IRS-1'in aktivasyonuna neden olarak insülin direncini azaltır (Kelly ve Ruderman, 1993). In vitro deneylerle, Zn^{+2} takviyesinin hem konsantrasyon hem de zamana bağlı bir şekilde Akt fosforilasyonunu indüklediği kanıtlanmıştır (Y. Wang ve ark., 2009; Gao ve ark., 2015; Y. Zhao ve ark., 2015). Diğer taraftan Zn^{+2} , GSK-3 β üzerinde inhibisyon yaratan önemli bir eser elementtir (Ilouz ve ark., 2002). Aynı zamanda, GSK-3 β , IRS-1 bağımlı

yolakta negatif kontrol sağlamaktadır. Bu nedenle aşırı GSK-3 β aktivasyonu, insülinin etkilerine karşı direnç göstermektedir (Joje ve ark., 2007). GSK-3 β aktivitesi, insülin sinyal yolunun bozulması yoluyla A β patolojisini ve tau hiperfosforilasyonuna bağlı NFY oluşumuna neden olmaktadır (Lauretti ve ark., 2020). Aynı zamanda, Zn⁺² takviyesinin hem İDE hem de NEP sentezini uyarması mümkündür (Lifshitz ve ark., 2013). Ayrıca, Zn⁺², insülin sinyalizasyonu olmadığında insülin reseptörünün β -alt ünitesini fosforile etmek için ATP'yi aktive edebilmektedir (Ezaki, 1989). Alzheimer hastalığında serum Zn⁺² seviyelerinin kontrol gruplarına göre azaldığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Rulon ve ark., 2000). Beyindeki Zn⁺² homeostazının bozulması sinaptik ve hafıza eksikliğine neden olduğu için AH'nin patogenezi için kritik bir rol olabilir. Bu nedenle Zn⁺² şelatı AH hastalığının patogenezi için potansiyel bir terapötik yaklaşımdır (Watt ve ark., 2010).

Bununla birlikte, bazı araştırmacılar, yüksek miktarda Zn⁺² dozunun, A β agregasyonuna neden olarak AH semptomlarını kötüleştirebileceğini bildirmiştir (Moreira ve ark., 2000). Böylece, AH hastalarının Zn⁺² ile tedavisinden kaçınılmıştır. Yakın tarihli bir rapor Zn⁺²'nin AH için bir nöronal koruyucu faktör olduğunu ve Zn⁺² eksikliğinin AH ilerlemesinin asıl nedeni olacağı öne sürerek reddetmiştir (Brewer, 2012). Bu çelişkili raporlar değerlendirildiğinde, AH hastaları için 1 mM Zn⁺² dozunun A β agregasyonunu güçlendirebileceği ve nöronal A β plaklarının sayısında veya büyüklüğünde bir artışa neden olabileceği için zararlı olabileceği, ancak, 50 μ M Zn⁺² dozunun ise A β -kaynaklı toksisiteye karşı koruyucu etki gösterdiği gerçeği ile açıklanmıştır (Moreira ve ark., 2000). Alzheimer hastalığı plak yükü, hastalığın başlamasından 20 yıl önce birikmeye başladığından, yeterli erken Zn⁺² alımı, AH gelişimini yavaşlatan veya önleyen koruyucu bir faktör olabilir (Brewer, 2014).

2.6. Siklo (His-Pro) ve Çinko Kombinasyonu: Siklo-Z

Siklo (His-Pro) (SHP), PGlu-His-Pro amid kimyasal formülü içeren bir tirotropin salgılatıcı hormonun (TSH) metabolitidir (Prakash ve ark., 2002). Siklo (His-Pro-SHP), TRH'den üretilbilse de büyük çoğunluğu aslında endojen olarak sentezlenebilmektedir. Ayrıca, SHP kendine özgü reseptörlere, metabolik yollara ve biyolojik etkilere sahiptir (C. Prasad, 1998). Siklo (His-Pro); MSS'de her yerde, kanda, gastrointestinal kanalda ve

ayrıca birkaç vücut sıvısında bulunur (C. Prasad, 1995). Aynı zamanda; protein açısından zengin, işlenmiş gıdalarda ve peptid kaynaklarında bulunur. Siklo (His-Pro), iki amino asidin, L-histidin ve prolinin siklik bir şeklidir. Siklik dipeptitler, dipeptitleri ve bunların amidlerinin enzimatik olmayan siklizasyonundan elde edilen basit bileşiklerdir (Hilton ve ark., 1992). Bu siklik form, peptidazlar ile bölünmeye karşı direnç sağlamaktadır. Ayrıca, bağırsaktan aktif taşınması (Mizuma ve ark., 1997) ve KBB geçişi için de gereklidir (Banks ve ark., 1992; Banks ve ark., 1993; Jaspán ve ark., 1994). Siklo (His-Pro), lineer muadillerinden daha fazla in vivo stabiliteye sahip bir dipeptittir olarak ve bu nedenle terapötik bir ajan çok daha büyük bir vaat gösterir (Grottelli ve ark., 2016). Hayvanlara ve insan deneklere yüksek dozlarda bile verildiğinde hiçbir yan etkisi olmadığı gözlenmiştir. Bu nedenle, SHP alımının insanlar için güvenli olduğu beklenmektedir ve SHP için maksimum güvenli doz belirlenmemiştir (M. K. Song, Bischoff, ve ark., 2017).

Siklo-Z, SHP artı Zn^{+2} kombinasyonudur. Yapılan diyabet çalışmalarında kan glukoz seviyelerinin kontrolünde tek başına Zn^{+2} veya tek başına SHP uygulamasının minimum düzeyde etkili olduğu gösterilmiştir. Ancak birlikte uygulandıkları form olan Siklo-Z, genetik olarak İDE eksikliği olan T2D sıçanlarında ve obez diyabetik farelerde kan glukoz seviyelerinin kontrolünde çok etkili olmuştur. Bununla birlikte, bağırsak Zn^{+2} emilimi ve doku Zn^{+2} alımı konsantrasyon bağımlı bir şekilde Siklo-Z varlığında uyarılmıştır (M. K. Song, Bischoff, ve ark., 2017). Bu nedenle SHP ve Zn^{+2} 'nin sinerjistik bir mekanizma ile glisemik kontrolü ile iyileştirdiği açıklanmıştır.

2.6.1. Alzheimer Hastalığı ve Siklo-Z

Çinko eksikliği ile AH (Vural ve ark., 2010; Brewer, 2012) ve bilişsel bozulmanın (Brewer, 2012; Meramat ve ark., 2015) pozitif bir korelasyon gösterdiği bilinmektedir ve Zn^{+2} takviyesi, bilişsel bozulmanın azaltılmasında yardımcı olabilir (Brewer, 2014; Meramat ve ark., 2015). Çinko eksikliği çoğunlukla bozulmuş bağırsak Zn^{+2} emiliminden ve hücresel Zn^{+2} alımından kaynaklanır. Siklo (his-pro) (SHP), Zn^{+2} üzerinde şelatlayıcı bir etkiye sahiptir ve normal elemental Zn^{+2} taşıma sisteminden bağımsız olarak intestinal bir SHP taşıma mekanizması aracılığıyla Zn^{+2} taşınmasına yardımcı olur. Normal Zn^{+2} absorpsiyon mekanizması, Zn^{+2} akışına aracılık eden ve hücre içi veziküllere ileten ZnT proteinleri yoluyla kolaylaştırılmış bir difüzyon taşıma işlemidir. Bu proteinler SHP'ye

benzer şekilde değişken sayıda histidin içerir. Siklo-Z'nin Zn^{+2} şelatı ve dolayısıyla bağırsak Zn^{+2} emilimini uyarmak için yüksek miktarda histidin içerdęi gerçeğine dayanarak AH'nin önlenmesinde ve tedavisinde yardımcı olabilir. Siklo-Z, hücre içi İDE'yi artırabilen tek ajandır. Her iki Zn^{+2} enzimi olan İDE ve NEP, benzer katalitik etki ile Aβ'yi temizler. Çinko desteğinin hem İDE hem de NEP'nin sentezini uyarması mümkündür. Siklo-Z uygulanan APP Tg farelerin beyin dokularındaki İDE aktivitesinin, normal kontrol farelerine kıyasla yaklaşık %30 arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, kontrollere kıyasla Aβ40 (%60) ve Aβ42 (%25) seviyelerinde önemli bir düşüş olduğu bulunmuştur. Dolayısıyla, Siklo-Z'nin beyindeki Aβ proteinlerini parçalayabilen İDE seviyeleri üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğunu söyleyebiliriz (M. K. Song, Bischoff, ve ark., 2017).

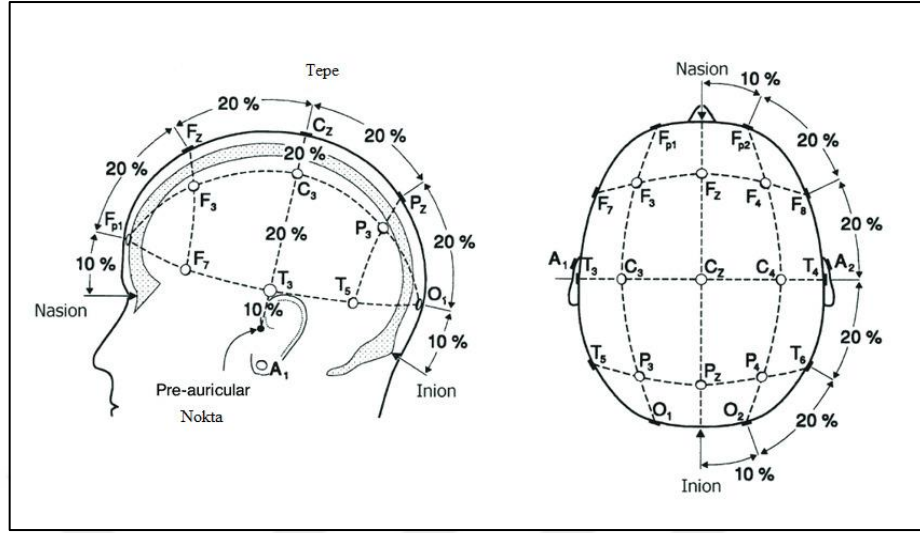
2.7. Elektroensefalografi (EEG)

Kafa derisi üzerine yerleştiren elektrotlar aracılığı ile beyin aktivitesinin ölçülmesini sağlayan yönteme elektroensefalografi (EEG) denir. Böyle bir aktivitenin varlığı ilk kez 1875'te Richard Caton tarafından tavşan ve maymun serebral hemisferlerden kaydedilmiştir (Caton, 1875). İnsan beyin aktivitesinin de elektrotlar aracılığı ile saçlı kafa derisi üzerinden kaydedilebileceği ilk kez 1929 yılında Hans Berger tarafından ortaya konulmuştur (Berger, 1929). O yıllarda bu dalgalar “gürültü” olarak adlandırılmıştır. Ancak, 1934 yılında yayınlanan bir çalışmada Berger'in tanımladığı aktiviteleri destekler nitelikte 10-12 Hz aralığında salınımlar olduğunu belirtilmiş ve bu salınımlar “alfa ritmi” olarak adlandırılmıştır (Adrian, 1934). Bu yöntemin beyin fonksiyonları için önemi 1975 yılında yapılan bazı çalışmalar sayesinde anlaşılmıştır (Başar, 1975a, 1975b, 1975c; Freeman, 1975).

Elektroensefalografi, yüksek temporal çözünürlüğe sahip nörotransmisyon sırasında elektriksel aktivite hakkında in vivo veri sağlayan nispeten düşük maliyetli, invaziv olmayan bir tekniktir. Elektroensefalografi, nörobilişsel bozuklukların incelenmesinde başarıyla kullanılmaktadır (Luck ve ark., 2011). Kafa derisinden kaydedilen rutin EEG aktivitesinin en önemli kaynağı, beyin sapı, talamus ve diğer kortikal yapılardan gelen sinyallerin, serebral korteksin 5. ve 6. katmanlarında bulunan piramidal hücrelerin postsinaptik potansiyelleridir (Babiloni ve ark., 2016). Sinaptik aktivitenin uyarıcı veya

inhibe edici olmasına göre, postsinaptik membran depolarize veya hiperpolarize hale gelir. Milyonlarca nörondan gelen bu uyarıcı ve inhibe edici postsinaptik potansiyeller tarafından üretilen toplam elektrik akımı, yüzeysel EEG aktivitesini yaratır. Beyindeki farklı bölgelerden gelen sinyaller, beynin sorumlu bölgelerini keşfetmek ve sinapsların işleyişini gerçek zamanlı olarak doğrudan ölçmek için kullanılır (Adeli ve ark., 2008; Ghosh-Dastidar ve ark., 2008). Elektroensefalogram, beynin fonksiyonel işlevi hakkında bilgi sağlamaktadır. Elektroensefalografi, senkronize kortikal nöronların postsinaptik dendritik akımlarını direkt olarak ölçerek sinaptik fonksiyonu klinik olarak en iyi yansıtan in vivo yöntemidir. Eşzamanlı uyarılan nöronların sayısı EEG'nin gücünü ifade etmektedir (Babiloni ve ark., 2016). Yüksek zamansal çözünürlüğe sahip olan EEG, son yıllarda yeni terapötik ajanların taranması için yararlı bir araç olarak kullanılmaya başlanılmıştır. Ayrıca, belirli beyin bölgelerindeki EEG ölçümlerinin biliş gibi belirli işlevlerle ilişkisinin hem hayvanlarda hem de insanlarda tutarlı sonuçlar gösterdiği ileri sürülmektedir. Bu nedenle, EEG, ilaç etkililiğinin ölçümlerini sağlamada ve etkisini tahmin etmede yardımcı olmaktadır. Beyinde A β ve hiperfosforile tau birikiminin, AH hastalığında bilişsel ve duygusal işlevlerde bozulmaya yol açan hipokampal-kortikal nöronal ağlardaki sinaptik işlevi bozduğu güncel çalışmalardan bilinmektedir (Stoiljkovic ve ark., 2019).

Elektroensefalografide kullanılan elektrotların sayısı araştırmaların amacına göre farklılaşabilse de genellikle uluslararası 10-20 sistemine göre kafa derisi üzerine yerleştirilmektedir (Jasper, 1958). Burun (nasion), başın arka kısmı (inion), sağ ve sol kulak arkaları (preauriculars) olmak üzere dört nokta seçilmektedir ve elektrotlar da bu noktaların arasındaki mesafelerin %10-%20-%20-%20-%20-%10 oranlarında bölünmesi ile yerleştirilmektedir. Elektrotlara Frontal, Temporal, Santral, Paryetal ve Oksipital lobları temsil etmek üzere sırasıyla F, T, C, P, O harfleri verilmektedir. Elektrotların hemisfer üzerindeki yerleşimini belirtmek için bu harflere bitişik olarak rakamlar ya da harfler tanımlanmaktadır. Tek rakamlar sol hemisferi tanımlarken, çift rakamlar sağ hemisferi temsil etmektedir. Orta hatta bulunan elektrotlar ise “zero (z)” harfi ile gösterilmektedir. Referans elektrotları da A1 ve A2 şeklinde tanımlanmıştır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Uluslararası 10-20 elektrot yerleşimi (Strobbé, 2015)

Her bir elektrodun gösterdiği elektriksel aktivite, frekans ve genlik olarak tanımlanmaktadır. Beynin elektrofizyolojik aktivitesini, gözler açık ya da kapalı şekilde ölçülen spontan (dinlenme) durumu EEG kayıtlarının farklı frekans aralıklarından oluşan dalgaların süperpozisyonunu (dalgaların üst üste binmesi) meydana getirir. Bu EEG kayıtlarının genlikleri 5-200 μ V arasında değişirken frekansı 1-100 Hz arasında tanımlanır (Miller, 2007). Bu frekans aralıkları delta (0,5-4 Hz), teta (4-8 Hz), alfa (8-13 Hz), beta (14-30 Hz) ve gama (>30 Hz) olarak tanımlanmaktadır.

Hans Berger, gözlemlediği ilk ritmik EEG aktivitesini "alfa dalgası" olarak adlandırdı. Gözlerin kapatılması ve gevşeme ile ortaya çıkar, göz açma veya zihinsel eforla zayıflar. Kişi uyanık ancak istirahat durumunda iken EEG’de alfa frekansı hakimken delta aktivitesi oldukça düşüktür. “Zemin ritmi” olarak da adlandırılan bu alfa frekansı, duyuşal ve bilişsel-motor olaylar esnasında desenkronize haldedir. Alfa ritmi aynı zamanda “posterior dominant ritim” olarak da adlandırılmaktadır. Bunun nedeni; sağlıklı kişilerde alfa ritminin parieto-okspital bölgede bulunan kortikal piramidal nöronların senkronizasyonunun sonucu olarak ortaya çıkan baskın osilasyon aktivitesine karşılık gelmesidir (Pfurtscheller ve Lopes da Silva, 1999). Talamo-kortikal ve kortiko-kortikal etkileşimler tarafından alfa aktivitesi modüle edilebilmektedir (Brunia, 1999; Pfurtscheller ve Lopes da Silva, 1999). Bellek ve bilişle ilişkili olduğu bilinen alfa aktivitesi (Klimesch, 1999), yaşlanma sürecinden en çok etkilenen beyin aktivitesidir

(Pfurtscheller ve Lopes da Silva, 1999; Babiloni ve ark., 2005; Babiloni, Binetti, Cassetta, ve ark., 2006; Babiloni, Ferri, ve ark., 2006; Babiloni, Frisoni, ve ark., 2006; Babiloni, Frisoni, Pievani, Toscano, ve ark., 2008; Babiloni, Frisoni, Pievani, Vecchio, ve ark., 2008).

Beta dalgası, 15-30 Hz frekans aralığına sahiptir ve hızlı aktivite olarak bilinmektedir. Beta ritmi, zihinsel çaba içerisinde, uyanıklık durumunda, sinir sistemi duygusal bir bilgiyi işlerken ve dikkatini yönlendirmiş bireylerde gözlenmektedir. Bu aktivite, frontosantral lokalizasyonda belirgindir (Frost ve ark., 1973).

Teta dalgası 4-7 Hz frekans aralığına sahiptir. Temporal lob epilepsisinde ve yetişkinlerde üzüntü, duygusal gerginlik, sevinç, uykuya geçiş dönemi gibi anlarda bu dalga formu gözlenmektedir.

Delta dalgası, derin uyku ve anestezi gibi beyin düşük aktivite gösterdiği zamanlarda belirginleşmektedir. Normalde yetişkinlerin yavaş dalga uykusunda görülür. Bu dalga formu, yetişkinlerde frontal, çocuklarda ise oksipital bölgede daha belirgin bir şekilde gözlenmektedir. Bu dalgalar genliği en yüksek ve frekansı en düşük olan dalgalardır.

Gama dalgası ise 30-100 Hz frekans aralığına sahiptir ve kişinin odaklanma anında ortaya çıkmaktadır. Aynı zamanda uykunun karakteristiğinin belirlenmesine de yardımcı olmaktadır (Basar ve ark., 2000).

2.7.1. Alzheimer Hastalığı ve Uyku Aktivitesi

Uyku bozukluğu ile AH patolojisi arasında çift yönlü bir ilişki olduğu yapılan pek çok çalışmanın sonucunda öne sürülmüştür. Uyku spindle salınım aktivitesi, AH için bir biyobelirteç olma potansiyeline sahip spesifik bir EEG ritimidir (Weng ve ark., 2020). Bunların işlevsel rolü, duygusal girdiyi engelleyerek uykuyu korumak ve buna göre hafıza oluşumunu ve öğrenme kapasitesini arttırmaktır. Hayvan çalışmaları, uyku spindle aktivitesinin, yeni öğrenmenin pekiştirilmesinde yer alan hipokampal neokortikal diyalogun kortikal yönünü yansıttığını göstermektedir (Weng ve ark., 2020). Uyku spindle salınım aktivitesi hafıza (Gais ve ark., 2002) ve sinaptik plastisite (Steriade ve Timofeev, 2003) oluşumunda kritik bir role sahiptir. Talamusun retiküler çekirdeğinde üretilerek

kortiko-talamik döngüler yoluyla eksprese edilirler (Weng ve ark., 2020). Birkaç saniye (0,5 ila 3) süren 7-14 Hz frekansa sahip parlama ve sönme biçimli salınımlardan oluşur (Bonjean ve ark., 2012). Bu aktivite hızlı göz hareketlerinin olmadığı (NREM) uyku evresinde ortaya çıkar (Contreras ve Steriade, 1996) ve hızlı göz hareketlerinin (REM) ortaya çıkmasıyla kaybolur (Steriade ve Llinas, 1988).

Genel olarak, yoğunluk, genlik, süre ve frekans ile karakterize edilen spindle salınım aktivitesinin AH'de bozulduğu bilinmektedir. Uyku spindle salınım aktivitesinin yoğunluğunun, AH patolojisinin biyobelirteçleri olarak yaygın şekilde kullanılan BOS A β -42, p-Tau ve total-tau seviyeleri ile negatif korelasyon gösterdiği bulunmuştur. Azalan spindle yoğunluğu, tau ile ilgili erken bir disfonksiyonu temsil ederek, erken nöronal disfonksiyon için potansiyel olarak yeni bir biyobelirteç haline getirir (Weng ve ark., 2020). Aynı zamanda, HBB ve AH'li hastalarda spindle yoğunluğunda azalma ve daha düşük spindle aktivitesi olduğu saptanmıştır. Alzheimer hastalığında uyku spindle ekspresyonunda azalma olduğu gözlemlenmiştir (Mander, 2020). Sonuç olarak, uyku spindle aktivitelerinin kantitatif ve kalitatif özellikleri, AH için potansiyel invazif olmayan ve uygun maliyetli biyobelirteçleri temsil eder (Weng ve ark., 2020).

Frekansı <4 Hz olan spesifik uyku aktivitelerinden biri olan delta aktivitesi “yavaş dalga” olarak tanımlanmaktadır. Aynı zamanda, AH hastalarında yavaş dalga aktivitesinin de azalmış olduğu bulunmuştur. Yavaş dalga uykusunun bellek konsolidasyonundaki kritik rolü ile tutarlı olarak, AH hastalarında gözlenen azalmış yavaş dalga aktivitesinin bozulmuş bellek konsolidasyonu ile ilişkilidir. Hastalığın erken dönemlerinde A β plaklarının birikmesinden önce oligomerik A β varlığında beyin dalgalarının yavaş dalga bozukluğu sergilediği belirtilmiştir (Lee ve ark., 2020). Aynı zamanda, yüksek tau birikiminin azalan delta gücü ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Lucey ve ark., 2019). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada da Tg-AH fare modelinde uyku delta spektral gücünün ilerleyici tauopatının olası bir sonucu olarak birikim ile eş zamanlı olacak şekilde azaldığı gösterilmiştir (Holton ve ark., 2020). Bu kanıt, yavaş dalga aktivite bozulmaları ve AH patolojisi arasındaki ilişki için güçlü destek sağlar. Bilişsel olarak normal yaşlı yetişkinlerdeki uyku bozuklukları, yaşamın ilerleyen dönemlerinde A β yükünü ve tau birikimini tahmin edebilir. Hızlı antidepressan etkileri olan ve yavaş dalga uykusu üzerinde

iyi tanımlanmış etkileri olan bir ilaç olan ketamin, yeni terapötiklerde yer alan uyku-uyanıklık mekanizmalarını araştırmak için yararlı bir müdahaledir (Duncan ve ark., 2019).



3. GEREÇ ve YÖNTEM

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik ve Deney Hayvanları Ünitesinde gerçekleştirilen çalışmamızda 80 adet 3 aylık, ortalama 200-300 g ağırlığında erkek Wistar sıçan kullanılmıştır. Bu çalışmanın gerçekleştirilebilmesi için gerekli olan etik kurulu belgesi Akdeniz Üniversitesi Hayvan Araştırmaları Etik Yerel Komitesi'nden (Etik Onay Tarihi ve Numarası: 26.01.2018/2018.01.014-17) alınmıştır.

3.1. Gruplandırma

Her grupta 20 hayvan olacak şekilde 4 grup oluşturulacaktır.

Grup 1: 1.25 µl DMSO ve 8.75 µl PBS ile hazırlanan 10µl'lik çözelti, ve gavaj ile musluk suyu uygulanan Sham grubu (SH)

Grup 2: 1.25 µl DMSO ve 8.75 µl PBS ile hazırlanan 10µl'lik çözelti, ve gavaj ile Siklo-Z (musluk suyunda çözdürülmüş 10 mg Zn²⁺/kg ve 0,2 mg SHP/kg) uygulanan Siklo-Z grubu (SHZ)

Grup 3: DMSO ve PBS ile hazırlanan 10µl'lik Aβ-42 oligomeri, ve gavaj ile musluk suyu uygulanan Alzheimer hastalığı modeli grubu (AH)

Grup 4: DMSO ve PBS ile hazırlanan 10µl'lik Aβ-42 oligomeri ve gavaj ile Siklo-Z (musluk suyunda çözdürülmüş 10 mg Zn²⁺/kg ve 0,2 mg SHP/kg) uygulanan Alzheimer hastalığı tedavi grubu (AHZ)

3.2. Deney Protokolü

Alzheimer hastalığının erken dönemini yansıtan çalışmamızda indüklenebilir AH sıçanlarını oluşturabilmek için Aβ-42 oligomer enjeksiyonu yapılmıştır. Deney süresi boyunca, hayvanlar her kafeste 5 sıçan olacak şekilde, 12 saatlik aydınlık/karanlık siklusunda tutulmuşlardır. Ayrıca tüm hayvanlar ticari sıçan yemi ve musluk suyu verilerek beslenmiş ve vücut ağırlıkları cerrahi işlemlerin başlangıcında ve hayvanların feda edilmesinden önce olmak üzere iki kere kaydedilmiştir. Deneysel hayvan

modellerinin ve elektrot implantasyonlarının yapılacağı gün açlık kan glukoz düzeyleri ölçüleceği için hayvanlar 12 saat öncesinden aç bırakılmıştır.

Deneylerde;

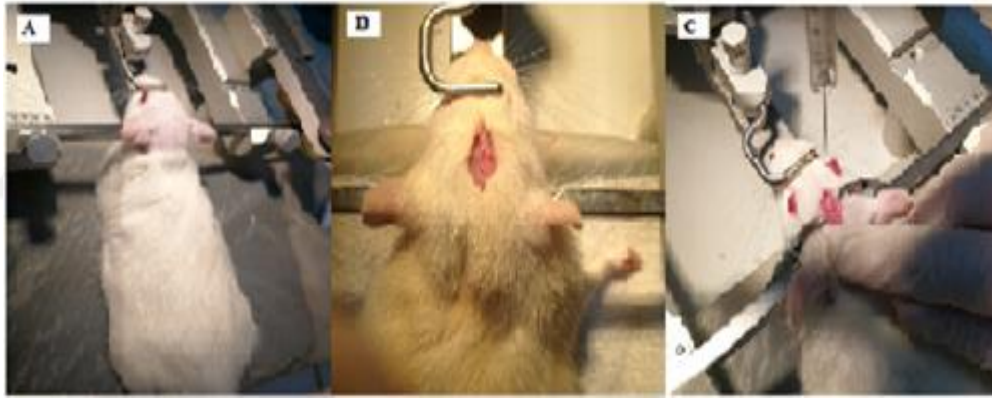
- Amiloid β -42 Oligomeri (Sigma, Missouri, United States): Sıçanlarda Alzheimer modeli oluşturmak için nörotoksik ajan olarak kullanılmıştır. A β 1–42 oligomerleri literatüre uygun olarak hazırlanmıştır (X. Wang, Hu, ve ark., 2015). Amiloid- β oligomerleri kısaca şu şekilde hazırlanmıştır. Amiloid- β 1-42 peptitleri DMSO içinde 2 mmol konsantrasyonda olacak şekilde çözülmüştür ve daha sonra steril PBS içinde 8 kez seyreltilmiştir, oda sıcaklığında 30 dakika boyunca vortekslendikten sonra 1 saat boyunca 4°C’de 15000×g’de santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar (250 μ l) alikotlanarak (25 μ l) -20°C’de dondurulmuştur. Amiloid- β 42 oligomerleri 4°C’ye çıkarıldığında 24 saat içinde kullanılmıştır.

- Siklo-Z [SHP-Siklo (His-Pro) (Santa Cruz Biotechnology, Europe) ile ZnCl (Molar Kimya (MZK.100310.1000))]: 2.5 g Zn⁺² ve 50 mg SHP-Siklo (His-Pro) 1 L musluk suyunda çözülerek Siklo-Z çözeltisi hazırlanmıştır. Siklo-Z çözeltisi 10 mg Zn⁺²/kg ve 0,2 mg SHP/kg olacak şekilde gavaj yoluyla uygulanmıştır. Nöronal Zn⁺² alımını arttırdığı bilinen Siklo-Z, terapötik ajan olarak kullanılmıştır.

Cerrahi İşlemler ve Elektrot İmplantasyonu

Tüm sıçanlara serum fizyolojik içinde çözülerek hazırlanan ketamin (100 mg/kg) ve ksilazin (5 mg/kg) intraperitoneal (i.p) yolla uygulanarak anestezi oluşturulmuş ve vücut sıcaklığı anestezi esnasında azalacağından dolayı sürekli kontrol edilerek 36-37°C arasında sabit tutulmuştur. Bunun için cerrahi işlemler sırasında sıçanların altına elektrikli ısıtıcı ped konulmuştur. Anestezik madde verildikten sonra stereotaksik cihaza yerleştirilen sıçanların kafası cihazın kulak çubuklarıyla sabitlenmiştir. Daha sonrasında sıçanların kafa derisi üzerine batikon sürüldükten sonra orta hattan bistüri ile kesilerek açılmıştır ve referans nokta olan bregma tespit edilmiştir. Hayvan modelleri oluşturulurken stereotaksik atlası göre bilateral olarak Antero-Posterior, AP= -0,8 mm, Medio-Lateral, ML= -1,4 ve 1,4 mm ve Dorso-Ventral, DV= -4,00 mm koordinatlarında

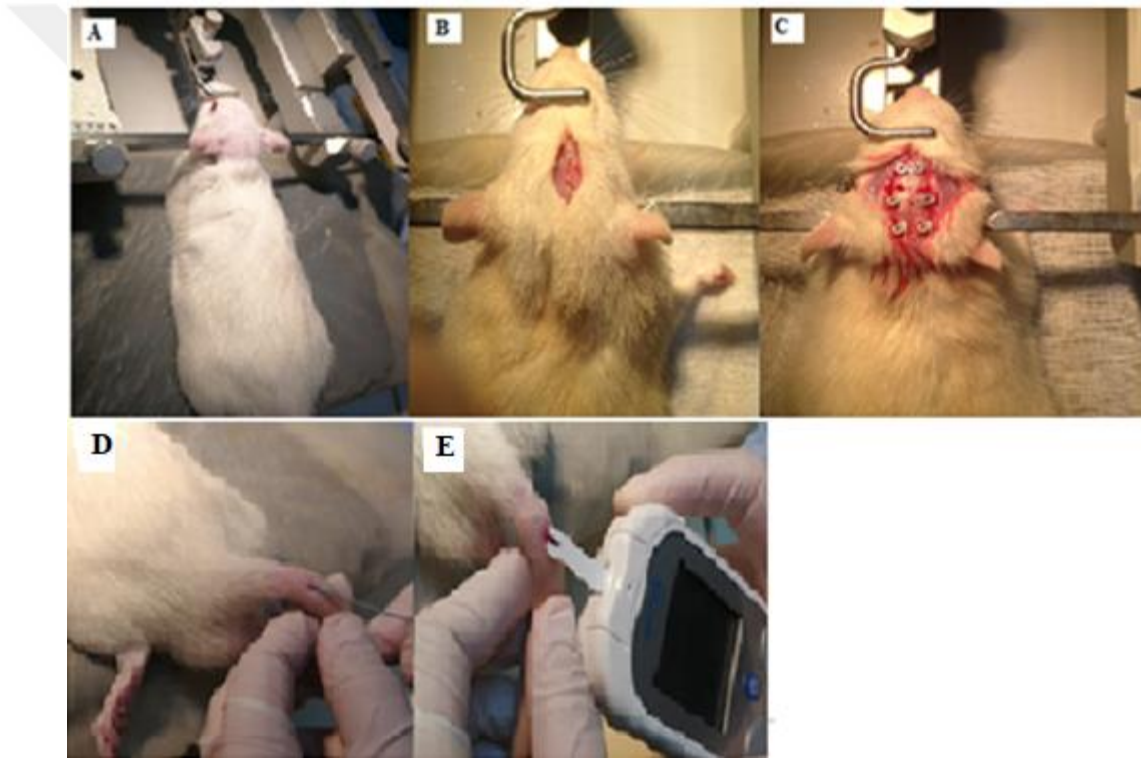
bulunan lateral ventriküllere (Paxinos G, 2007) enjekte edilecek madde Hamilton mikroiğnesi (26G) kullanılarak 1 µl/dk hızında ve 5 dk boyunca belirlenen bölgede bırakılarak uygulanmıştır. Alzheimer modeli oluşturulan sıçanlara (AH ve AHZ) Aβ42 oligomeri (2,5 nmol/10 µl) (Canas ve ark., 2009) i.c.v olarak uygulanmıştır. SH ve SHZ gruplarında bulunan hayvanlara aynı hacimde olacak şekilde 1.25 µl DMSO ve 8.75 µl PBS ile hazırlanan 10µl'lik çözelti i.c.v olarak enjekte edilmiştir. Daha sonrasında ekspozite edilen kafatası sütür atılarak kapatılmış ve cerrahi işlem tamamlanmıştır (Şekil 3.1). Cerrahi sahanın enfeksiyonunu önlemek amacıyla sütür atılan bölgeye 3 gün boyunca antibiyotikli krem sürülmüştür. Ameliyattan sonra 3 gün boyunca sıçanlara 100000 U/gün penisilin ve analjezi için oral olarak 200 mg/kg parasetamol uygulanarak bir hafta boyunca iyileşmeleri ve AβO'ların patolojik hasarı oluşturması için beklenmiştir.



Şekil 3.1. Deney gruplarının oluşturulması, A) Hayvanların stereotaksik cihaza yerleştirilmesi, B) kafa derisinin orta hattın açılması, C) Hamilton mikroiğnesiyle maddelerin enjekte edilmesi gösterilmiştir.

Ameliyat bitiminin 1 hafta sonrasından itibaren 3 hafta boyunca SHZ ve AHZ gruplarına 10 mg Zn⁺²/kg ve 0,2 mg SHP/kg içecek şekilde musluk suyu içinde çözünerek hazırlanan Siklo-Z çözeltisi (M. K. Song ve ark., 2009), SH ve AH gruplarına ise Siklo-Z çözeltisi verilen gruplarla eş hacimli olarak musluk suyu 3 hafta gavaj yoluyla uygulanmıştır. Gavaj uygulamasının bitiminde davranış deneyleri gerçekleştirilmiş ve ardından ketamin/ksilazin anestezisi altında elektrofizyolojik kayıtlar için elektrot implantasyonu gerçekleştirilmiştir. Stereotaksik cihaza yerleştirilen sıçanların kafa derisi orta hattın bistüri ile kesilerek açıldıktan sonra referans nokta olan bregma tespit edilmiş ve kafatasına matkap (“drill”) ile delik açılarak vida elektrotlar duranın hemen yüzeyine tutturulmuştur. Aktif elektrotları bilateral olarak frontal (Bregmaya göre AP: 4.5 mm, ML:

+2 ve -2 mm, DV: 1.8 mm), temporal (Bregmaya göre AP: -8.0 mm, ML: +6.6 ve -6.6 mm, DV: 3.3 mm) korteks bölgelerine, referans ve toprak elektrotları ise serebellum (Bregmaya göre AP:-12.72 mm, ML: 2.5 ve -2.5 mm, DV: 3.2 mm) üzerine yerleştirilmiştir. Elektrotlar yerleştirildikten sonra açlık kan glukoz düzeylerinin ölçümü için kuyruk bölgesi kanatılmış ve ardından glukometre kullanılarak glukozoksidasyon metodu ile ölçülmüştür (plusMED Blood GlucoseMeter, Accuro,pM1-300, Bionime Corporation, Taiwan). Sıçanlar stereotaksik cihazdan çıkarılmış ve elektrofizyolojik kayıtları alınmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Elektrofizyolojik kayıtlar için vidaların yerleştirilmesi ve açlık kan glukoz ölçümü, A) Hayvanların stereotaksik cihaza yerleştirilmesi, B) kafa derisinin orta hattan açılması ve bregmanın tespit edilmesi, C) vidaların yerleştirilmesi, D) kuyruk bölgesinin kanatılması, E) açlık kan glukoz ölçümü gösterilmiştir.

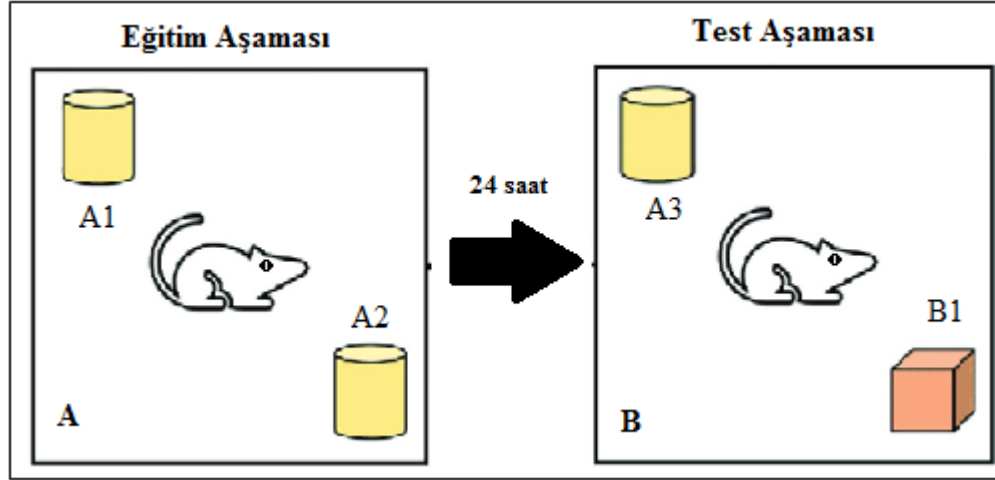
3.3. Davranış Testleri

Yeni nesne tanıma ve nesne lokalizasyon testleri, Roozendaal ve arkadaşlarının tanımladığı protokolün sıçanlara uyarlanmış hali kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Roozendaal ve ark., 2010). Deneyin gerçekleştirildiği sistem, 40 cm x 40 cm x 40 cm boyutlarında, eşit olarak aydınlatılmış, beyaz mat taban ve kenarlara sahip bir kutudan

oluşmaktadır. Deney esnasında dışarıdan gelecek herhangi bir uyarının deney parametrelerine karışmasını önlemek amacıyla deney, ses yalıtımı yapılmış bir odada gerçekleştirilmiştir. Yeni nesne tanıma testinin ardından 3 gün sonra her sıçan için nesne lokalizasyon testi gerçekleştirilmiştir. Kemirgenlerde uzun süreli hafıza tipik olarak denemeden 24 ila 48 saat sonra incelenir ve de novo transkripsiyon ve translasyon gerektirir (Haettig ve ark., 2011).

3.3.1. Yeni Nesne Tanıma Testi

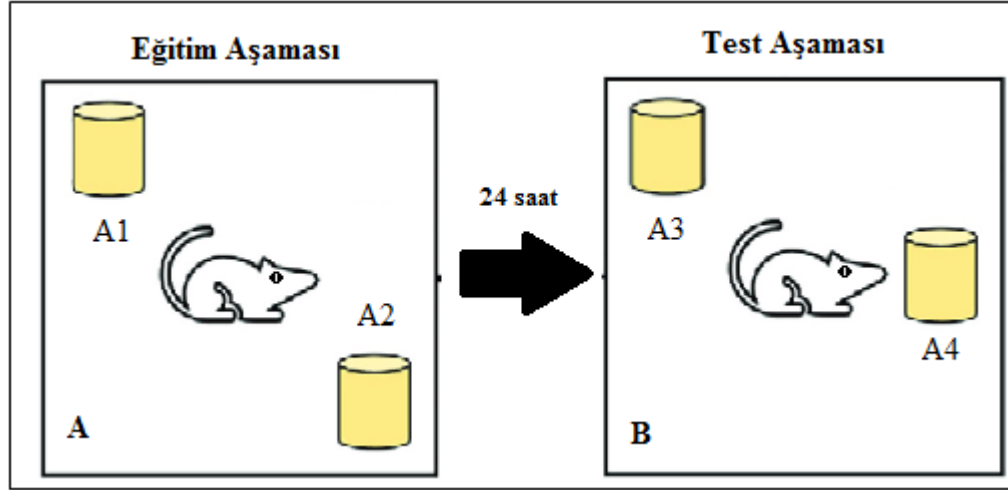
Yeni nesne tanıma testi iki aşamadan oluşmaktadır: eğitim aşaması ve test aşaması. Eğitim aşaması sırasında iki özdeş nesne (A1-A2) deney sisteminin içerisine en yakın köşeden aynı uzaklıkta iki zıt konuma yerleştirilmiştir. Daha sonra sıçanlar merkezden alana bırakılmış ve bu iki özdeş nesneleri (A1-A2) keşfetmeleri için 5 dakika izin verilmiştir. Eğitim aşamasını tamamlayan sıçanlar tekrar kafeslerine konulduktan 24 saat sonrasında test aşamasına alınmıştır. Test aşamasında yeni nesne tanıma ayırım indeksini test edebilmek için, tanıdık nesnenin bir kopyası (A3) ve yeni bir nesne (B1) eğitim denemesi sırasında olduğu gibi aynı yere yerleştirilmiştir (Şekil 3.3). Deneyde kullanılan nesnelerin her biri hareket etmesini engellemek için zemine sabitlenmiştir. Sıçanların test aşamasındaki davranışları video kamera ile 5 dakika boyunca kaydedilmiş ve sıçanların nesnelerle geçirdikleri süreleri belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Koku alma ipuçlarının varlığını engellemek için, tüm kutu ve nesneler her denemeden sonra her zaman %70 etanol ile iyice temizlenmiştir. Yeni nesne tanıma testinde hafıza gücünü gösteren ayırım indeksi (%) değerleri analiz edilmiştir. Ayırım indeksi (%), yeni nesnede geçirilen sürenin eski nesnede geçirilen süreden farkının toplam süreye bölünüp 100 ile çarpılmasıyla elde edilen bir denklemdir.



Şekil 3.3. Yeni nesne tanıma testi deney basamakları. A) Eğitim aşaması, B) test aşaması gösterilmektedir.

3.3.2. Nesne Lokalizasyon Testi

Nesne lokalizasyon testi iki aşamadan oluşmaktadır: eğitim aşaması ve test aşaması. Nesne lokalizasyon testi eğitim aşaması sırasında iki özdeş nesne (A1-A2) deney sisteminin içerisine yerleştirilmiştir. Daha sonra sıçanlar merkezden alana bırakılmış ve bu iki özdeş nesneleri (A1-A2) keşfetmeleri için 5 dakika izin verilmiştir. Eğitim aşamasını tamamlayan sıçanlar tekrar kafeslerine konulduktan 24 saat sonrasında test aşamasına alınmıştır. Test aşamasında nesne lokalizasyon belleğini test edebilmek için, tanıdık nesnenin bir kopyası (A3) eğitim aşamasındaki yerine yerleştirilirken, diğer tanıdık nesne (A4) eğitim aşamasından farklı bir lokalizasyona yerleştirilmiştir (Şekil 3.4). Deneyde kullanılan nesnelerin her biri hareket etmesini engellemek için zemine sabitlenmiştir. Sıçanların test aşamasındaki davranışları 5 dakika boyunca video kamera ile kaydedilmiş ve sıçanların nesnelerle geçirdikleri süreleri belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Koku alma ipuçlarının varlığını engellemek için, tüm kutu ve nesneler her denemeden sonra her zaman %70 etanol ile iyice temizlenmiştir. Nesne lokalizasyon testinde ayırım indeksi (%) değerleri analiz edilmiştir. Ayırım indeksi (%), lokalizasyonu değiştirilen nesnede geçirilen sürenin eski lokalizasyonda bulunan nesnede geçirilen süreden farkının toplam süreye bölünüp 100 ile çarpılmasıyla elde edilen bir denklemdir.



Şekil 3.4. Nesne lokalizasyon testi deney basamakları. A) Eğitim aşaması, B) test aşaması gösterilmektedir.

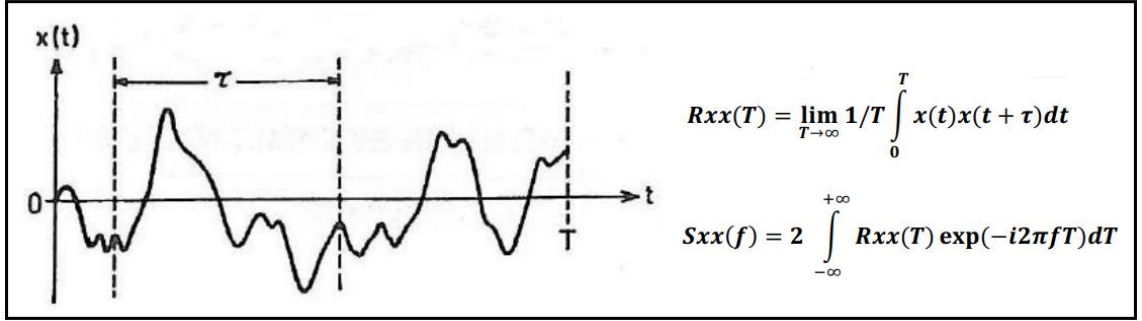
3.4. Dinlenme Durumu Beyin Osilasyonlarının (Spontan EEG) Kaydedilmesi

Tüm kayıtlar, sestan yalıtılmış ve elektromanyetik olarak korunan bir kayıt odasında alınmıştır. Sıçanlardan ketamin-ksilazin anestezisi altında paslanmaz çelikten yapılmış vida elektrotlar aracılığıyla 10 dakikalık spontan EEG kayıtları BrainVision Recorder (Brainvision Recorder, Brain Products, Munich, Germany) cihazı kullanılarak alınmıştır. Sıçanlardan EEG sinyali çift taraflı olarak frontal (AP: 4,5 mm, ML: +2 and -2 mm, DV: +1,8 mm) ve temporal (AP: -8,0 mm, ML: +6,6 and -6,6 mm, DV: 3,3 mm) lokasyonlardan sürekli olarak kaydedilmiştir. Tüm elektrotların empedansları 5 kOhm'dan az olacak şekilde ayarlanmıştır. EEG sinyali amplifiye edilmiş (Brainamp EEG/EP Amplifier, Brain Products, Münih, Almanya), bant geçişi filtrelenmiş (0,1–500 Hz) ve 1000 Hz örnekleme hızında sayısallaştırılarak bilgisayara kaydedilmiştir.

3.5. Dinlenme Durumu Beyin Osilasyonlarının (Spontan EEG) Analizi

EEG analizi çevrim-dışı (off-line) olarak yapılmıştır. Tüm EEG analizleri, Brain Vision Analyzer 2.2. (Brain Products GmbH; Gilching, Germany) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Öncelikle 50 Hz'lik notch filtre uygulanmıştır ve daha sonrasında 10 saniyelik EEG segmentlerinin frekans analizi yapılmıştır. Frekans analizi, BrainVision Analyzer yazılımı kullanılarak %10 konik uzunluğuna sahip bir Hanning pencere hızlı Fourier dönüşümü (Fast Fourier Transform-FFT) algoritması kullanılarak yapıldı. Her bir frekans bandında genlik değerlerinin elde edilmesi için Hızlı Fourier Dönüşümü (Fast

Fourier Transform – FFT) uygulanmıştır (BrainProducts GmbH, Munchen). Her elektrot konumu için her sıçanın spektral güçlerinin ortalaması alındı. Hızlı Fourier dönüşümü ile amplitüd-zaman olarak kaydedilen EEG sinyalleri frekans boyutuna çevrilmektedir. Çalışmamızda elde edilen zaman serilerini incelemek amacıyla frekans analizinde kullanılan güç spektral yoğunluk fonksiyonu (güç spektrumu) yöntemi uygulanmıştır. Güç spektral yoğunluk fonksiyonu, otokorelasyon fonksiyonu kullanılarak elde edilmiştir. Otokorelasyon fonksiyonu, bir verinin, örneğin $x(t)$, t ve $t+\tau$ zamanındaki (τ =gecikme zamanı) değerlerinin birbirleri ile çarpımının tüm T zamanına bölünerek ortalama alınması ile hesaplanmaktadır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. $x(t)$ sinyalinin T zamandaki örnek görünümü. Rxx : Otokorelasyon fonksiyonunun matematiksel ifadesi, Sxx : Güç spektral yoğunluk fonksiyonunun matematiksel ifadesi.

Denklemden görülen t , zamanı; f , frekansı; Rxx , zaman bölgesindeki sinyali, Sxx ise frekans bölgesindeki sinyali göstermektedir. Bu uygulama sonrasında ortalama hesaplanmış ve güç spektrumları her bir elektrot için delta (0.1-4 Hz), alfa/spindle (8-12 Hz), beta (13-29 Hz) frekanslarının en yüksek genlik değerleri ölçülmüştür. Her bir frekansta açığa çıkan en yüksek değer istatistiksel analizde kullanılan değer olarak belirlenmiştir.

3.6. Biyokimyasal Yöntemler

Elektrofizyolojik kayıtların alınmasının hemen ardından ketamin-ksilazin anestezisi altında sıçanların veninden EDTA'lı tüplere kan alınmıştır. Daha sonrasında kardiyak kanül aracılığıyla heparinli izotonik kullanılarak kardiyak perfüzyon ile beyin dokuları kandan arındırılmıştır. Çıkarılan beyin dokuları sıvı nitrojen içerisinde dondurulduktan sonra -80°C 'de biyokimyasal parametrelerin ölçümleri için saklanmıştır.

3.6.1. İnsülin Miktarının Plazma ve Hipokampus Doku Homejenatlarında Ölçülmesi

İnsülin ölçümü sandviç ELISA ticari kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Bioassay Technology Laboratory, E0707Ra).

Prensip: Plazma insülin ve beyin doku homejenatlarında insülin düzeyi kantitatif sandviç enzim immünassay teknik ile ölçülmüştür. Bu kitlerin içinde sıçan insülin antikoru ile kaplı 96 wellplate'ler bulunmaktadır. Daha sonra biyotinile edilmiş sıçan insülin antikoru ilave edilir ve örnekteki insüline bağlanır. İnsüline spesifik horseradish peroxidase (HRP) konjugat poliklonal antikor eklendiğinde insülinin immobilazasyonu sağlanır ve sandviç modeli oluşturulmuş olur. Bu nedenle daha sonra streptavidin-HRP eklenir ve Biotinile edilmiş insülin antikoru bağlanır. İnkübasyondan sonra bağlanmamış Streptavidin-HRP yıkama basamağı sırasında 5 kez yıkanır. İnkübasyon ve yıkamanın ardından bağlanmamış komponentler uzaklaştırılır. Substrat solüsyonu daha sonra ilave edilir. Substrat solüsyonu eklendiğinde HRP enzim ile reaksiyona girerek renk oluşumuna yol açar. Bu yöntemde sadece insülin içeren kuyucuklarda renk oluşumu gözlenir. Sıçan insülin miktarı ile orantılı olarak renk gelişir. Reaksiyon, asidik stop solüsyonu ilave edilerek sonlandırılır ve optik dansite (OD) 450 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür. Örnek insülin miktarı standart eğri grafiği ile hesaplanır.

Alzheimer hastalığında glukoz homeostazisi ve insülin direnci Homeostatik Model Değerlendirmesi (HOMA-IR) (açlık insülin (mIU/L) x açlık kan glukozu (mM)/22.5) formülü kullanılarak değerlendirilmiştir (Yang ve ark., 2017).

Reaktifler:

- 1- 96 kuyucuklu protein bağlayıcı plate
- 2- Standart solüsyonu (48mIU/L)
- 3- Standart dilüent (3 ml)
- 4- Streptavidin-HRP (6 ml)
- 5- Stop solüsyonu
- 6- Substrat solüsyonu A (6 m l)
- 7- Substrat solüsyonu B (6 ml)

- 8- 30x Yıkama tamponu
- 9- Biotinile edilmiş sıçan insülin antikoru

Reaktiflerin Hazırlanması:

30x Yıkama Tamponu: 500 ml 1x yıkama tamponu elde etmek için 20 ml yıkama tamponu konsantresini elde etmek için 30x distile su ile dilüe edilmiştir.

Standartların ölçülmesi: Bütün reaktifler oda ısısına getirilmiştir. 6 adet ependorf 0'den 5'e kadar numaralandırılmıştır. S5 tüpüne 120 µl standart (48 mIU/L) ile 120 µl standart dilüent konularak standart stok solüsyonu (24 mIU/L) elde edilmiştir. Standart 15 dk boyunca hafif hafif çalkalanmıştır. S5 tüpündeki karışımdan 120 µl S4 tüpüne aktarılmıştır. Bu işlem 120'er µl olarak S1 tüpüne kadar tekrarlanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan insülin standartları aynı numune gibi çalışılmıştır. Bilinen insulin standartlarının absorbans değerlerinin standart eğrisi insulin standart konsantrasyonlarının (pg/ml) logaritmasının fonksiyonu olarak çizildi.

Plazma Hazırlanması: EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri, toplama işleminden sonraki 30 dakika içinde 2-8°C'de 1000xg (veya 3000 dev/dak) ile 15 dakika boyunca santrifüj edilerek plazma elde edilmiştir. Plazma -80°C'de insülin ölçümleri için saklanmıştır.

Doku Homojenatlarının Hazırlanması: Doku örnekleri tartılmıştır ve daha sonra homojen doku ağırlığına bağlı olarak PBS içinde buz üzerinde homojenize edilmiştir (PRO 200 Homogenizater, PRO Scientific Inc, Connecticut, USA). Homojenize edilen örnekler 4°C'de 5000xg'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar ayrılarak -80°C'de muhafaza edildi. İnsulin ölçümleri bu süpernatantlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

İşlemler:

- 1- Tüm reaktifler oda ısısına çıkarılmıştır ve deney prosedürü oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.
- 2- 50 µl standartlar, standart kuyucuklarına eklenmiştir. Standart solüsyonu biyotinile edilmiş antikor içerdiği için antikor eklenmemiştir.

- 3- Örnek kuyucuklarına 40 µl hazırlanan doku homojenatları ve plazma örnekleri konulmuştur. 10 µl anti-insülin antikoru eklenmiştir. Daha sonra 50 µl streptavidin-HRP standart ve örnek kuyucuklarına eklenmiştir. Plate kaplanarak 37°C’de 60 dakika inkübe edilmiştir.
- 4- Plate 5 kez 30xyıkama tamponu ile yıkanmıştır.
- 5- Her kuyucuğa öncelikle 50 µl substrat solüsyonu A ve daha sonra substrat solüsyonu B eklenmiştir. Daha sonra plate kaplanarak 37°C’de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- 6- Her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklenmiştir. Mavi renk sarı renge dönüşmüştür.
- 7- Optik densitenin belirlenmesi için her kuyucuk mikropate okuyucuda 10 dakika içinde 450 nm’de okutulmuştur.

İnsülin Düzeylerinin Hesaplanması: Her örnek için absorbans değerleri hesaplandıktan sonra insülin miktarları standart eğri grafiği yardımıyla pg/ml olarak hesaplanmıştır. Elde edilen değerler protein miktarına bölünerek insülin miktarı pg /mg olarak ifade edilmiştir.

3.6.2. Amiloid Beta Peptid-42 (Aβ-42) Oligomer Miktarının Total Beyin ve Hipokampus Doku Homejanatlarında Ölçülmesi

Amiloid Beta Peptid-42 (Aβ-42) oligomer ölçümü sandviç ELISA ticari kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir (YL biont-YLA0372RA).

Prensip: Beyin doku homejanatlarında sıçan Aβ1-42 düzeyini ölçmek için kantitatif sandviç enzim immünassay teknik ile ölçülmüştür. Amiloid beta peptit 1-42 monoklonal antikor ile önceden kaplanmış kuyucuklara Aβ 1-42 ilave edilir ve daha sonra inkübe edilir. Bundan sonra, bağışıklık kompleksi oluşturan streptavidin-HRP ile birleştirmek için biyotin ile etiketlenmiş anti-Aβ1-42 antikorları eklenmiştir. İnkübasyon ve yıkamanın ardından bağlanmamış komponentler uzaklaştırılır. Substrat solüsyonları A ve B daha sonra ilave edilir. Substrat solüsyonu eklendiğinde HRP enzim ile reaksiyona girerek renk oluşumuna yol açar. Bu yöntemde sadece Aβ1-42 içeren kuyucuklarda renk oluşumu gözlenir. Sıçan Aβ1-42 miktarı ile orantılı olarak renk gelişir. Reaksiyon, asidik stop

solüsyonu ilave edilerek sonlandırılır ve OD 450 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülür. Örnek A β 1-42 miktarı standart eğri grafiği ile hesaplanır.

Reaktifler:

- 1- 96 kuyucuklu protein bağlayıcı plate
- 2- Standart solüsyonu (2400 pg/ml)
- 3- Standart dilüsyonu (3 ml)
- 4- Streptavidin-HRP (6 ml)
- 5- Stop solüsyonu (6 ml)
- 6- Kromojen solüsyonu A (6 ml)
- 7- Kromojen solüsyonu B (6 ml)
- 8- 30x Yıkama Tamponu
- 9- Biotinile edilmiş anti A β 1-42 antikoru

Reaktiflerin Hazırlanması:

30x Yıkama Tamponu: 500 ml 1x yıkama tamponu elde etmek için 20 ml yıkama tamponu konsantresini elde etmek için 30x distile su ile dilüe edilmiştir.

Standartların ölçülmesi: Bütün reaktifler oda ısısına getirilmiştir. 6 adet ependorf 0’dan 5’e kadar numaralandırıldı. S5 tüpüne 120 μ l standart (2400 pg/ml) ile 120 μ l standart dilüent konularak standart stok solüsyonu (1200 pg/ml) elde edilmiştir. Standart 15 dk boyunca hafif hafif çalkalanmıştır. S5 tüpündeki karışımdan 120 μ l S4 tüpüne aktarılmıştır. Bu işlem 120’er μ l olarak S1 tüpüne kadar tekrarlanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan A β 1-42 standartları aynı numune gibi çalışılmıştır. Bilinen A β 1-42 standartlarının absorbans değerlerinin standart eğrisi A β 1-42 standart konsantrasyonlarının (pg/ml) logaritmasının fonksiyonu olarak çizilmiştir.

Doku Homojenatlarının Hazırlanması: Doku örnekleri tartılmıştır ve daha sonra homojen doku ağırlığına bağlı olarak PBS içinde buz üzerinde homojenize edilmiştir (PRO 200 Homogenizater, PRO Scientific Inc., Connecticut, USA). Homojenize edilen örnekler 4°C’de 2000-3000 RPM’de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar ayrılarak -80°C’de muhafaza edildi. Amiloid beta 1-42 ölçümleri bu süpernatantlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

İşlemler:

- 1-Tüm reaktifler oda ısısına çıkarılmıştır ve deney prosedürü oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.
- 2- 50 µl standartlar, standart kuyucuklarına eklenmiştir. Standart solüsyonu biyotinile edilmiş antikor içerdiği için antikor eklenmemiştir.
- 3- Örnek kuyucuklarına 40 µl hazırlanan total beyin ve hipokampus doku homojenatları örnekleri konulmuştur. 10 µl Aβ1-42 antikor eklenmiştir. Daha sonra 50 µl streptavidin-HRP standart ve örnek kuyucuklarına eklenmiştir. Plate kaplanarak 37°C’de 60 dakika inkübe edilmiştir.
- 4- Plate 5 kez 30x yıkama tamponu ile yıkanmıştır.
- 5- Her kuyucuğa öncelikle 50 µl kromojen solüsyonu A ve daha sonra kromojen solüsyonu B her kuyucuğa eklenmiştir. Daha sonra plate kaplanarak 37°C’de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- 6- Her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklenmiştir. Mavi renk sarı renge dönüşmüştür.
- 7- Optik densitenin belirlenmesi için her kuyucuk mikropate okuyucuda 10 dakika içinde 450 nm’de okutulmuştur.

Amiloid Beta Peptid 1-42 Düzeylerinin Hesaplanması: Her örnek için absorbans değerleri hesaplandıktan sonra Aβ1-42 miktarları standart eğri grafiği yardımıyla pg/ml olarak hesaplanmıştır. Elde edilen değerler protein miktarına bölünerek Aβ1-42 miktarı pg /mg olarak ifade edilmiştir.

3.6.3. Protein Tayini

Alınan beyin dokularında protein tayini modifiye Bradford yöntemine dayanan ticari bir kit ile gerçekleştirilmiştir (Bradford, 1976).

Reaktifler:

1. Standart solüsyon: 2µg/µl bovin serum albümin (Albümin Bovine, Sigma, A- 8022)
2. Coomassie Plus Protein Assay Reagent (CPPA, Pierce-1856210) Reaktifi

İşlemler: 1 µl doku süpernatantı 999 µl distile su ile dilüe edildikten (1:1000) sonra üzerine 1 ml CPPA (Coomassie Plus Protein Assay) reaktifi eklenmiştir ve 595 nm’de absorbans değerleri spektrofotometrik olarak okutulmuştur. Standart çalışmasında, numune yerine artan konsantrasyonlarda 1:1000 dilüsyona sahip 2 µg/µl bovin serum albümin (BSA; Albümin Bovina) kullanılarak yapılmıştır.

Protein Miktarının Hesaplanması: Dokulardaki protein miktarları standart grafiği kullanılarak hesaplanmıştır.

3.6.4. Western Blot Tekniği ile Protein Seviyelerinin Ölçülmesi

Western-blot için örnekler -80°C’den çıkartılmıştır. Doku homojenatlarının hazırlanması için dondurulmuş beyin numuneleri sıvı nitrojenle ezilmiş ve daha sonra ezilen beyin dokusu numuneleri proteaz inhibitörü kokteyl tabletleri ilave edilen liziz buffer (50mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 µM EDTA, 100 µM EGTA, 1% NP- 40, 0.1 % SDS, 0.1 % deoksikolik asit) ile süspansiyon edilmiştir. Daha sonrasında, numuneler 10.000×g de 10 dakika +4°C santrifuj edilmiştir ve supernatantlar alınarak homejanat elde edilmiştir. Western blot yöntemine başlanmadan önce her bir grubun protein tayini yapılmıştır. Her grubun protein miktarı Bradford yöntemi ile tayin edilmiştir. Protein içeriği belirlendikten sonra eşit miktardaki proteinler (20µg/ml) her bir kuyucuğa yüklenmiştir ve yaklaşık 1,5 saat süre ile 100V 30 mA’da %12 SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrıştırılmıştır. Jel elektroforezi ile ayrıştırılan proteinler transfer sistemi (Trans-Blot Turbo BioRad) ile 25V 1.3mA 10 dakika poliviniliden diflorür membrana transfer edilmiştir. Bu aşamadan sonra membranlar TTBS (solüsyonunda (%3 oranında albumin içeren) %0,1 Tween-20,

10 mM Tris ve 150 mM NaCl) alınmış ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon aşamasının ardından %3 oranında albumin içeren TTBS solüsyonunda birincil antikorlar istenilen protokole göre hazırlanılmış ve bir gece (+4°C) inkübasyona bırakılmıştır. Bu primer antikorlar İDE (Ylbiont, YID2780), NEP (SinoGeneClon Biotech Co., SG-0527-R), p-İRS1 (Ylbiont, YIG0585), p-GSK-3 β (SinoGeneClon Biotech Co., SG-5368R), p-tau (ser356) (ThermoFisher, 44-752G)'dur. Membranlar daha sonra TTBS solüsyonu ile 3 defa 10'ar dakika süreyle yıkanmıştır ve ardından primer antikorlara uygun olan ikincil antikorlama (Goat anti-rabbit IgG/HRP-Ylbiont, YIF0010) aşamasına geçilmiştir. Son olarak, bağlı antikorlar kemiluminesans tabanlı HRP Substrat Sistem ile tespit edilmiştir. Membranlar Hyperfilm'e maruz bırakılmıştır. Elde edilen sonuçlar Image J software kullanarak analiz edilmiştir ve protein ekspresyonu, eşlenen GAPDH hedef proteinin oranına göre belirlenmiştir.

3.7. Sonuçların Değerlendirilmesi

İstatistiksel değerlendirme 23.0 SPSS paket programı kullanılarak yapılmıştır. Ağırlık artışı, biyokimyasal ve western blot verileri tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve onu takiben Tukey Post Hoc Testleri ile incelenmiştir. Yeni nesne tanıma ve lokalizasyon testlerine ait veriler ANOVA ve onu takiben Tukey Post Hoc Testleri ile analiz edilmiştir. Elektrofizyolojik kayıtların incelenmesinde elde edilen yinelenen ölçümler Repeated Measure ANOVA testiyle değerlendirilmiş ve takiben Bonferroni Post Hoc Testi tercih edilmiştir. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. Elde edilen sonuçlarda $p < 0,05$ 'i sağlayan değerler istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir. Elde edilen verilerin karşılaştırılmasında uygulanan istatistiksel metodlar bulgular kısmında ayrıntılı olarak yazılmıştır.

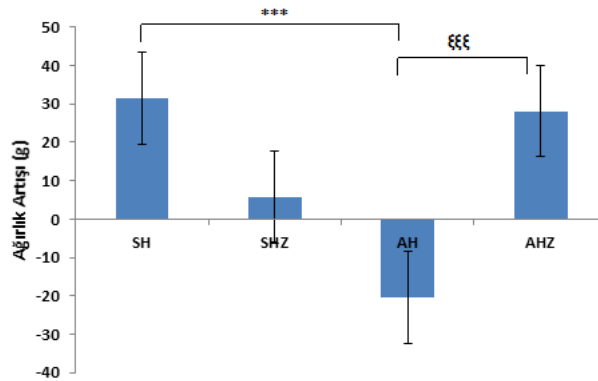
4. BULGULAR

4.1. Genel Görünüm

Deney süresi boyunca hayvanların genel görünümünde ve davranışlarında anormal olarak nitelendirilebilecek herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir.

4.2. Ağırlık Değişimi

Deney süresi boyunca hayvanların ağırlık takipleri deneyin başlangıcında ve deneyin son aşamasında yapılmıştır. Tüm grupların deney başlangıcındaki ve deney sonundaki ağırlık ölçümleri ve ağırlık artışları Şekil 4.1’de gösterilmiştir. Hayvanların deney süresi boyunca ağırlık artışlarında gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur [$F(3,48) = 11.39$, $p < 0.001$]. AH grubunun ağırlık artışının ($-20,38 \pm 13,26$) SH grubunun ağırlık artışına ($31,46 \pm 2,17$) göre anlamlı olarak azaldığı görülmüştür ($p < 0,001$). AHZ grubunun ağırlık artışının ($28,15 \pm 2,93$) ise, AH grubunun ağırlık artışına göre anlamlı olarak artmış olduğu bulunmuştur ($p < 0,001$). Ayrıca, AHZ grubu ile SH grubunun ağırlık artışları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir. Aynı zamanda, SHZ grubunun ağırlık artışının da ($5,77 \pm 3,54$) SH grubunun ağırlık artışına göre daha az olduğu gözlenmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.



Şekil 4.1. Sham ve deney grubu hayvanlarının ağırlık artışı. N=13, sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. ***, $p < 0,001$ SH grubuna göre farkı göstermektedir. §§§, $p < 0,001$ AH grubuna göre farkı göstermektedir.

4.3. Biyokimyasal Analiz Sonuçları

4.3.1. Plazma Açlık Kan Glukoz Düzeyleri

Sham ve deney grubu hayvanlarının açlık kan glukoz sonuçları Şekil 4.2-A'da verilmiştir. Tüm grupların açlık kan glukoz değerleri incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir [$F(3,20)= 24.88$, $p<0.001$]. AH grubunun (191.33 ± 5.524 mg/dL) plazma açlık kan glukoz düzeylerinin SH grubuna (143.00 ± 6.033 mg/dL) göre anlamlı olarak artmış olduğu görülmüştür ($p<0,01$). AHZ grubunda (161.00 ± 5.092 mg/dL) plazma açlık kan düzeylerinin AH grubuna göre anlamlı olarak azalmış olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Ayrıca, SHZ grubunun (226.00 ± 10.957 mg/dL) açlık kan glukoz düzeyinin SH grubuna göre anlamlı olarak yüksektir ($p<0,001$).

4.3.2. Serum İnsülin Düzeyleri

Sham ve deney grubu hayvanlarının serum insülin sonuçları Şekil 4.2-B'de verilmiştir. Tüm grupların serum insülin düzeyleri incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir [$F(3,28)= 7.84$, $p<0.01$]. AH grubunun (2.71 ± 0.074 mIU/L) SH grubuna (2.37 ± 0.059 mIU/L) göre serum insülin düzeylerinin anlamlı olarak arttığı görülmüştür ($p<0,01$). SHZ grubunun (2.69 ± 0.057 mIU/L) serum insülin düzeylerinin de SH grubuna göre anlamlı olarak artmış olduğu gösterilmiştir ($p<0,01$). AHZ grubunda serum insülin düzeylerinin ise AH grubuna göre azalma eğilimi gösterdiği görülmüş, ancak istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır. AHZ grubu ile SH ve SHZ grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

4.3.3. Hipokampus İnsülin Düzeyleri

Sham ve deney grubu hayvanlarının hipokampus insülin düzeyleri Şekil 4.2-C'de verilmiştir. Tüm grupların hipokampus insülin değerleri incelendiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmuştur [$F(3,20)= 3.64$, $p<0.05$]. AH grubunun (0.162 ± 0.021 mIU/L) hipokampus insülin düzeylerinin SH grubuna (0.233 ± 0.016 mIU/L) göre anlamlı olarak azalmış olduğu görülmüştür ($p<0,05$). SHZ grubunun hipokampus insülin seviyesinin SH grubuna göre azalmış olduğu görülmüştür ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark

gözlenmemiştir. AHZ grubunun hipokampus insülin seviyesinin AH grubuna göre artmış olduğu görülmüş ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

4.3.4. HOMA-IR Sonuçları

Sham ve deney grubu hayvanlarının HOMA-IR düzeyleri Şekil 4.2-D’de verilmiştir. Tüm grupların HOMA-IR değerleri incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir [$F(3,20)= 9.21$, $p<0.001$]. AH grubunun (1.276 ± 0.037) HOMA-IR düzeyinin SH grubuna (0.891 ± 0.046) göre anlamlı olarak arttığı görülmüştür ($p<0,01$). SHZ grubunun (1.263 ± 0.095) HOMA-IR düzeyinin de SH grubuna göre anlamlı olarak arttığı saptanmıştır ($p<0,01$). SHZ ve AHZ gruplarının HOMA-IR düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Ayrıca AHZ grubu ile AH grubu karşılaştırıldığında AHZ grubunun HOMA-IR düzeyinin AH grubundan az olduğu görülmüş, ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır.

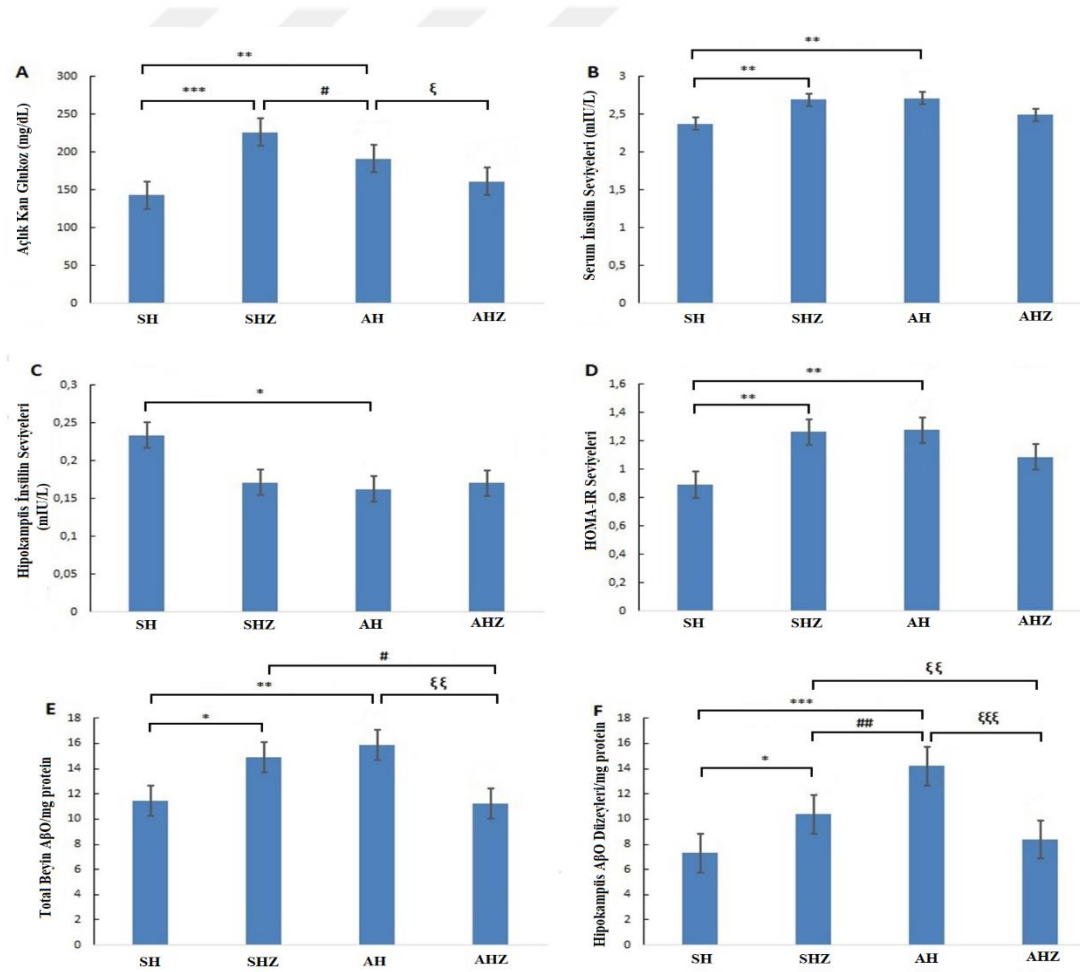
4.3.5. Total Beyin A β O Düzeyleri

Sham ve deney grubu hayvanlarının total beyin A β O düzeyleri Şekil 4.2-E’de verilmiştir. Tüm grupların total beyin A β O düzeyleri incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir [$F(3,28)= 7.21$, $p<0.01$]. AH grubunun (15.90 ± 0.913 mg/protein) total beyin A β O düzeyleri SH grubuna (11.46 ± 0.573 mg/protein) göre anlamlı olarak artmıştır ($p<0,01$). AHZ grubunun (11.24 ± 1.154 mg/protein) total beyin A β O düzeyleri ise AH grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır ($p<0,01$). SHZ grubunun (14.91 ± 0.792 mg/protein) total beyin A β O düzeyleri SH grubundan anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). Ayrıca, SHZ grubunun total beyin A β O düzeylerinin AHZ grubundan anlamlı olarak yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). SH grubu ile AHZ grubu arasında ise anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.

4.3.6. Hipokampus A β O Düzeyleri

Sham ve deney grubu hayvanlarının hipokampus A β O düzeyleri Şekil 4.2-F’de verilmiştir. Tüm grupların hipokampus A β O düzeyleri incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu belirlenmiştir [$F(3,28)= 21.41$, $p<0.001$]. AH

grubunun (14.250 ± 0.817 mg/protein) hipokampüs A β O düzeylerinin SH grubuna (7.920 ± 0.645 mg/protein) göre anlamlı olarak arttığı bulunmuştur ($p < 0,001$). AHZ grubunun (8.380 ± 0.528 mg/protein) hipokampüs A β O düzeylerinin AH grubuna göre anlamlı azaldığı gösterilmiştir ($p < 0,001$). Aynı zamanda, AH grubunun hipokampüs A β O düzeylerinin SHZ (10.369 ± 0.604 mg/protein) grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu gösterilmiştir ($p < 0,01$). SHZ grubunun hipokampüs A β O düzeyleri SH grubundan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$). SHZ grubunun hipokampüs A β O düzeyleri AHZ grubundan anlamlı olarak fazladır ($p < 0,01$). SH grubu ile AHZ grubu arasında da anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.



Şekil 4.2. Sham ve deney gruplarının biyokimyasal analiz sonuçları. **A:** Sham ve deney grubu hayvanlarının açlık kan glukoz değerleri (N=6); **B:** Sham ve deney grubu hayvanlarının serum insülin değerleri (N=8); **C:** Sham ve deney grubu hayvanlarının hipokampus insülin değerleri (N=6); **D:** Sham ve deney grubu hayvanlarının HOMA-IR değerleri (N = 6); **E:** Sham ve deney grubu hayvanlarının total beyin AβO düzeyleri (N=8); **F:** Sham ve deney grubu hayvanlarının hipokampus AβO düzeyleri (N=8). Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001 SH grubundan farkı göstermektedir. #; p<0,05; ##, p<0.01; ###, p<0,001 SHZ grubundan farkı göstermektedir. ξ, p<0,05 ξξ, p<0,01; ξξξ, p<0,001 AH grubundan farkı göstermektedir.

4.4. Western Blot Sonuçları

4.4.1. Total Beyin p-IRS-1 (Ser612) Düzeyleri

Sham ve deney grubu hayvanlarının total beyin p-IRS-1 (Ser612) değerleri Şekil 4.3-A'da verilmiştir. Tüm grupların değerleri incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu belirlenmiştir [$F(3,20)= 6.91, p<0.01$]. AH grubunun (0.495 ± 0.023) total beyin p-IRS-1 (Ser612) düzeyinin SH grubuna (0.686 ± 0.055) göre anlamlı olarak azaldığı görülmüştür ($p<0,05$). AHZ grubunun (0.693 ± 0.040) total beyin p-IRS-1 (Ser612) düzeyi AH grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ($p<0,05$). Ayrıca SHZ grubunun da (0.777 ± 0.054) total beyin p-IRS-1 (Ser612) düzeyi AH grubundan anlamlı olarak fazlalık göstermektedir ($p<0,01$). SHZ grubunun total beyin p-IRS-1 (Ser612) düzeyinin de SH grubuna göre artmış olduğu görülse de bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Aynı zamanda, AHZ ve SHZ grupları arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

4.4.2. Hipokampus p-IRS-1 (Ser612) Düzeyleri

Sham ve deney grubu hayvanlarının hipokampus p-IRS-1 (Ser612) değerleri Şekil 4.3-B'de verilmiştir. Tüm grupların hipokampus p-IRS-1 (Ser612) değerleri incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu belirlenmiştir [$F(3,24)= 16.42, p<0.001$]. AH grubunun hipokampus p-IRS-1 (Ser612) düzeyi SH grubuna kıyasla azalma eğilimi gösterse de istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. SHZ grubunun (0.755 ± 0.042) hipokampus p-IRS-1 (Ser612) düzeyleri SH grubundan (0.508 ± 0.020) anlamlı olarak fazladır ($p<0,001$). AH grubunun (0.428 ± 0.043) hipokampus p-IRS-1 (Ser612) düzeyi AHZ grubundan (0.644 ± 0.031) anlamlı olarak daha azdır ($p<0,01$). SHZ grubunun hipokampus p-IRS-1 (Ser612) düzeyleri AHZ grubundan anlamlı olarak fazladır ($p<0,001$).

4.4.3. Total Beyin p-GSK-3 β (Ser-21) Düzeyleri

Sham ve deney grubu hayvanlarının total beyin p-GSK-3 β (Ser-21) düzeyleri Şekil 4.3-C'de verilmiştir. Tüm grupların total beyin p-GSK-3 β (Ser-21) düzeyleri incelendiğinde

gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu belirlenmiştir [$F(3,24)= 8.31$, $p<0.01$]. AH grubunun (0.405 ± 0.075) total beyin p-GSK-3 β (Ser-21) düzeyleri SH grubuna (0.705 ± 0.068) göre anlamlı olarak azalmıştır ($p<0,05$). AHZ grubunun (0.837 ± 0.084) total beyin p-GSK-3 β (Ser-21) düzeyinin AH grubuna göre anlamlı olarak arttığı bulunmuştur ($p<0,01$). SHZ grubunun (0.850 ± 0.053) total beyin p-GSK-3 β (Ser-21) düzeyi de AH grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ($p<0,01$). SHZ grubunun total beyin p-GSK-3 β (Ser-21) düzeyinin SH grubuna göre artma eğiliminde olduğu görülmüş, ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ayrıca, SH ve AHZ grubunun total beyin p-GSK-3 β (Ser-21) düzeyleri arasında anlamlı bir fark görülmemiştir.

4.4.4. Hipokampus p-GSK-3 β (Ser-21) Düzeyleri

Sham ve deney grubu hayvanlarının hipokampus p-GSK-3 β (Ser-21) düzeyleri Şekil 4.3-D’de verilmiştir. Tüm grupların hipokampus p-GSK-3 β (Ser-21) düzeyleri incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu belirlenmiştir [$F(3,28)= 9.90$, $p<0.001$]. AH grubunun (0.467 ± 0.030) hipokampus p-GSK-3 β (Ser-21) düzeyinin SH grubuna (0.747 ± 0.068) göre anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur ($p<0,001$). AHZ grubunun (0.701 ± 0.023) hipokampus p-GSK-3 β (Ser-21) düzeyinin AH grubuna göre anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir ($p<0,05$). Ayrıca, SHZ grubunun (0.805 ± 0.051) hipokampus p-GSK-3 β (Ser-21) düzeyinin AH grubundan anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0,001$). SHZ grubunun hipokampus p-GSK-3 β (Ser-21) düzeyinin SH grubuna göre artma eğiliminde olduğu görülmüştür, ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Ayrıca, SH ve AHZ grubu arasında anlamlı bir fark görülmemektedir.

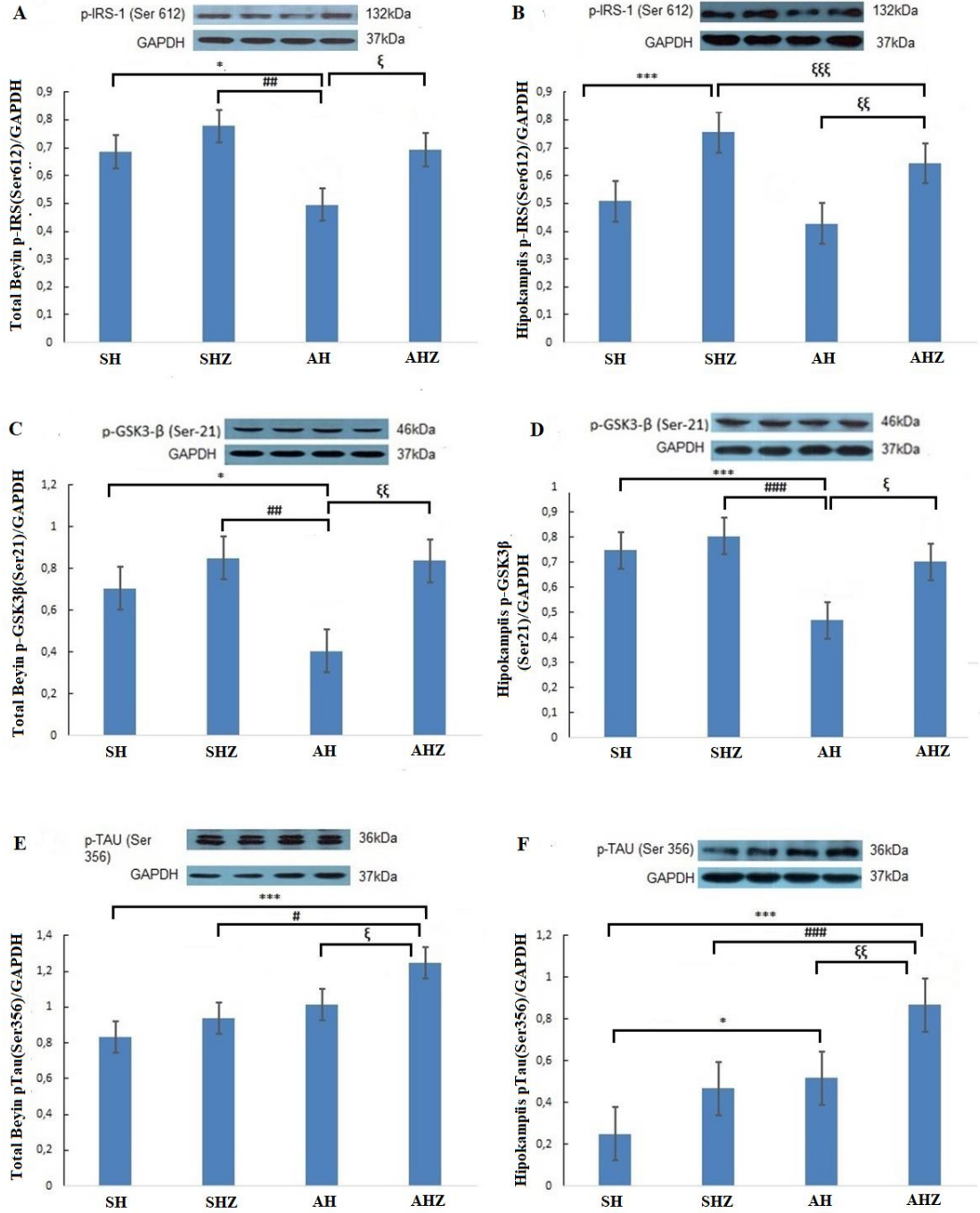
4.4.5. Total Beyin p-Tau (Ser356) Düzeyleri

Sham ve deney grubu hayvanlarının total beyin p-Tau (Ser356) düzeyleri Şekil 4.3-E’de verilmiştir. Tüm grupların total beyin p-Tau (Ser356) düzeyleri incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu belirlenmiştir [$F(3,20)= 10.09$, $p<0.001$]. AH grubunun total beyin p-Tau (Ser356) düzeyinin SH grubuna göre artmış olduğu gözlenmiş olmasına rağmen anlamlı bulunamamıştır. SH ve SHZ gruplarının total beyin p-Tau (Ser356) düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık gösterilememiştir. AHZ grubunun

(1.245±0.075) total beyin p-Tau (Ser356) düzeylerinin AH grubuna (1.015±0.056) göre anlamlı olarak artmış olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Aynı zamanda SH (0.833±0.038) ($p<0,001$) ve SHZ (0.935±0.041) ($p<0,05$) gruplarının total beyin p-Tau (Ser356) düzeyleri AHZ grubundan anlamlı olarak düşüktür.

4.4.6. Hipokampus p-Tau (Ser356) Düzeyleri

Sham ve deney grubu hayvanlarının hipokampus p-Tau (Ser356) düzeyleri Şekil 4.3-F’de verilmiştir. Tüm grupların hipokampus p-Tau (Ser356) düzeyleri incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu belirlenmiştir [$F(3,20)= 17.40$, $p<0.001$]. AH grubunun (0.516±0.060) hipokampus p-Tau (Ser356) düzeyinin SH grubuna (0.250±0.042) göre anlamlı olarak arttığı bulunmuştur ($p<0,05$). Aynı zamanda, SHZ grubunun (0.466±0.033) hipokampus p-Tau (Ser356) düzeyinin SH grubuna göre artma eğiliminde olduğu görülmüştür. AHZ grubunun (0.866±0.091) hipokampus p-Tau (Ser356) düzeyleri AH grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ($p<0,01$). AHZ grubunun hipokampus p-Tau (Ser356) düzeyleri SH ve SHZ gruplarına göre de anlamlı olarak yüksektir ($p<0,001$).



Şekil 4.3. Sham ve deney hayvanlarının p-IRS(Ser612), p-GSK3β(Ser21) ve pTau(Ser356) western blot sonuçları. **A:** Sham ve deney grubu hayvanlarının total beyin p-IRS-1 (Ser612) değerleri (N = 6) **B:** Sham ve deney grubu hayvanlarının hipokampus p-IRS-1 (Ser612) değerleri (N=7) **C:** Sham ve deney grubu hayvanlarının total beyin p-GSK3β (Ser-21) düzeyleri (N=7) **D:** Sham ve deney grubu hayvanlarının hipokampus p-GSK3β (Ser-21) düzeyleri (N=8) **E:** Sham ve deney grubu hayvanlarının total beyin p-Tau (Ser356) düzeyleri (N=6) **F:** Sham ve deney grubu hayvanlarının hipokampus p-Tau (Ser356) düzeyleri (N=6). Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001 SH grubundan farkı göstermektedir. #, p<0,05; ##, p<0,01; ###, p<0,001 SHZ grubundan farkı göstermektedir. ξ, p<0,05 ξξ, p<0,01; ξξξ, p<0,001 AH grubundan farkı göstermektedir.

4.4.7. Total Beyin İDE Düzeyleri

Sham ve deney grubu hayvanlarının total beyin İDE düzeyleri Şekil 4.4-A’da verilmiştir. Tüm grupların total beyin İDE düzeyleri incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı belirlenmiştir. AH grubunun total beyin İDE düzeyleri SH grubuna göre azalma eğiliminde olduğu gözlenmiştir. SHZ grubunun total beyin İDE düzeyleri SH grubuna göre artma eğiliminde olduğu görülmüştür. SHZ grubunun total beyin İDE düzeyleri AHZ grubuna göre yüksek olduğu bulunmuştur. AHZ grubunun total beyin İDE düzeyleri AH grubuna göre artmış olduğu görülmüştür. Ancak gruplar arasındaki bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır.

4.4.8. Hipokampus İDE Düzeyleri

Sham ve deney grubu hayvanlarının hipokampus İDE düzeyleri Şekil 4.4-B’de verilmiştir. Tüm grupların hipokampus İDE düzeyleri incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu belirlenmiştir [$F(3,20)= 47.70, p<0.001$]. AH grubunun (0.723 ± 0.019) hipokampus İDE düzeylerinin SH grubuna (0.890 ± 0.025) göre anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur ($p<0,001$). SHZ grubunun (1.080 ± 0.031) hipokampus İDE düzeyleri de SH grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ($p<0,001$). Ayrıca SHZ grubunun hipokampus İDE düzeyleri AHZ grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,001$). SHZ grubunun hipokampus İDE düzeyleri AH grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,001$). AHZ grubunun hipokampus İDE düzeyleri AH grubuna göre artmış olduğu görülmüş ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

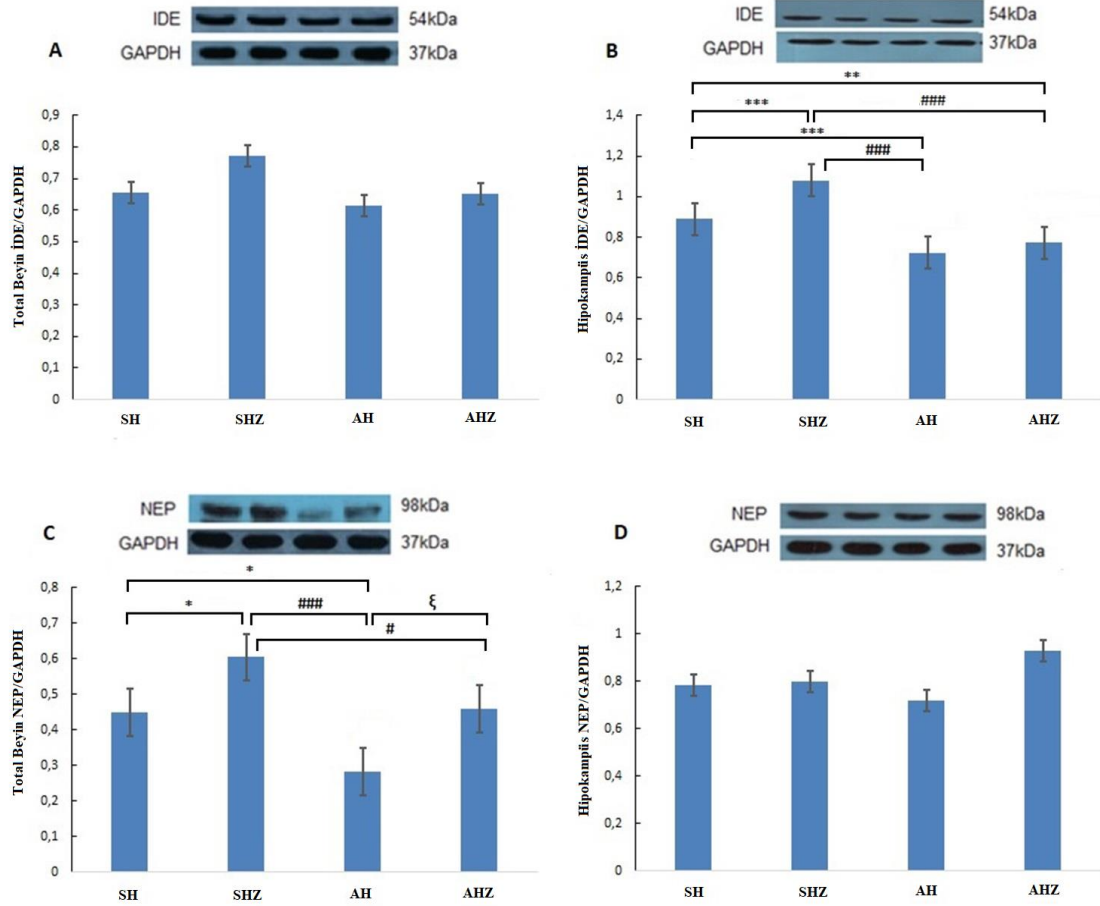
4.4.9. Total Beyin NEP Düzeyler

Sham ve deney grubu hayvanlarının total beyin NEP düzeyleri Şekil 4.4-C’de verilmiştir. Tüm grupların total beyin NEP düzeyleri incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu belirlenmiştir [$F(3,24)= 12.80, p<0.001$]. AH grubunun (0.281 ± 0.033) total beyin NEP düzeyinin SH grubuna (0.450 ± 0.036) göre anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur ($p<0,05$). SHZ grubunun (0.604 ± 0.048) total beyin NEP düzeyi ise

SH grubuna ($p<0,05$) ve AH grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ($p<0,001$). AHZ grubu (0.460 ± 0.024) total beyin NEP düzeyinin AH grubuna göre anlamlı olarak artmış olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). Ayrıca, SHZ grubunun total beyin NEP düzeyinin AHZ grubunda anlamlı olarak yüksek olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). SH ve AHZ grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

4.4.10. Hipokampus NEP Düzeyleri

Sham ve deney grubu hayvanlarının hipokampus NEP düzeyleri Şekil 4.4-D’de verilmiştir. Tüm grupların hipokampus NEP düzeyleri incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$). AH grubunun hipokampus NEP düzeyinin SH grubuna göre azalma eğiliminde olduğu gözlenmiştir ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. SHZ ile SH grubunun hipokampus NEP düzeyleri arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Ayrıca, AHZ grubunun hipokampus NEP düzeyinin AH grubuna göre artma eğiliminde olduğu bulunmuş ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır.



Şekil 4.4. Sham ve deney hayvanlarının İDE ve NEP western blot sonuçları. **A:** Sham ve deney grubu hayvanlarının hipokampus İDE değerleri (N=6) **B:** Sham ve deney grubu hayvanlarının hipokampus İDE değerleri (N=6) **C:** Sham ve deney grubu hayvanlarının total beyin NEP değerleri (N=7) **D:** Sham ve deney grubu hayvanlarının hipokampus NEP değerleri (N=6). Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. *, $p<0,05$; **, $p<0,01$; ***, $p<0,001$ SH grubundan farkı göstermektedir. #, $p<0,05$; ##, $p<0,01$; ###, $p<0,001$ SHZ grubundan farkı göstermektedir. ξ , $p<0,05$ $\xi\xi$, $p<0,01$; $\xi\xi\xi$, $p<0,001$ AH grubundan farkı göstermektedir.

4.5. Davranış Deneyleri Sonuçları

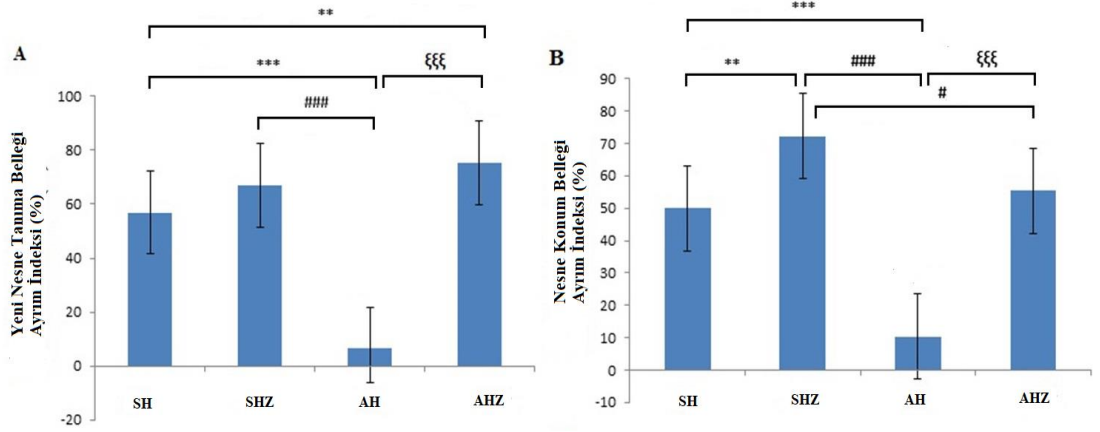
4.5.1. Yeni Nesne Tanıma Ayrım İndeksi

Sham ve deney grubu hayvanlarının yeni nesne tanıma ayrım indeksi Şekil 4.5-A'da verilmiştir. Tüm grupların yeni nesne tanıma ayrım indeksi değerleri incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu belirlenmiştir [$F(3,40)=70.28$, $p<0.001$]. AH grubunun (8.953 ± 2.625) yeni nesne tanıma ayrım indeksinin SH grubuna (56.943 ± 3.504) göre anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur ($p<0,001$). AHZ grubunun (75.262 ± 4.032) yeni nesne tanıma ayrım indeksi AH grubuna göre anlamlı olarak artmıştır

($p<0,001$). Ayrıca SHZ grubunun yeni nesne tanıma ayrım indeksinin SH grubuna göre arttığı görülse de anlamlı değildir.

4.5.2. Nesne Konum Ayrım İndeksi

Sham ve deney grubu hayvanlarının nesne konum ayrım indeksi Şekil 4.5-B’de verilmiştir. Tüm grupların nesne konum ayrım indeksi değerleri incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir [$F(3,36)= 47.53$, $p<0.001$]. AH grubunun (10.343 ± 3.437) nesne konum ayrım indeksinin SH grubuna (49.895 ± 2.633) göre anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur ($p<0,001$). AHZ grubunun (55.374 ± 4.567) nesne konum ayrım indeksinin AH grubuna göre anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir ($p<0,001$). SHZ grubunun (72.201 ± 4.253) nesne konum ayrım indeksi SH grubundan anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuştur ($p <0,01$). Ayrıca SHZ grubu ile AHZ grubunun nesne konum ayrım indeksi anlamlı bir fark bulunamamıştır.



Şekil 4.5. Sham ve deney gruplarının hafıza testi sonuçları. **A:** Sham ve deney grubu hayvanlarının yeni nesne tanıma ayrım indeksi (N=11) **B:** Sham ve deney grubu hayvanlarının nesne konum ayrım indeksi (N=10). Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. *, $p<0,05$; **, $p<0,01$; ***, $p<0,001$ SH grubundan farkı göstermektedir. #, $p<0,05$; ##, $p<0,01$; ###, $p<0,001$ SHZ grubundan farkı göstermektedir. ξ , $p<0,05$ $\xi\xi$, $p<0,01$; $\xi\xi\xi$, $p<0,001$ AH grubundan farkı göstermektedir.

4.6. EEG Analizleri

Sham ve deney gruplarındaki her bir sıçanın spontan EEG kayıtları analiz edilerek tüm elektrot bölgelerinden ölçülen delta (0.1-4 Hz), alfa/spindle (8-13 Hz) ve beta (14-29 Hz) bantlarındaki güç değerleri belirlenmiştir. İlgili frekans bantlarındaki maksimum güç değerlerinin ortalaması ve standart hataları Tablo 4.1.'de verilmiştir. Spontan EEG'deki güç değerlerine 4 kayıt bölgesi (Fp1, Fp2, T3 ve T4) x 4 deney grubu (SH, SHZ, AH, AHZ) olacak şekilde Tekrarlı ANOVA uygulanmıştır.

4.6.1. Delta (0.1-4 Hz) Bantlarının Güç Spektrumu Analizleri

Tekrarlı ANOVA testinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Elektrot bölgesi x grup etkileşiminin anlamlı olduğu bulunmuştur [$F(3,52)= 2.13, p< 0.001$]. Post Hoc Bonferroni testinde sol temporal bölgede SH grubunun delta güç değerinin AH, SHZ ve AHZ gruplarına göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu saptanmıştır ($p<0,001$).

4.6.2. Alfa (8-12 Hz) Bantlarının Güç Spektrumu Analizleri

Tekrarlı ANOVA testinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Alfa güç değerlerinin analizi sonucunda kayıt elektrot bölgeleri arasında anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($p<0,001$). Post Hoc Bonferroni testi sonucunda frontal bölgelerde alfa güç değerlerinin temporal bölgelere göre anlamlı düzeyde artmış olduğu saptanmıştır ($p<0,001$). Elektrot bölgesi x grup etkileşiminin anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p>0,05$).

4.6.3. Spindle (8-12 Hz) Bantlarının Güç Spektrumu Analizleri

Tekrarlı ANOVA testinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmuştur [$F(3,52)= 238.26, p<0.05$]. SHZ grubunun spindle güç değerlerinin SH, AH ve AHZ gruplarından anlamlı olarak büyük olduğu görülmüştür ($p<0,001$). Spindle güç değerlerinin analizi sonucunda kayıt elektrot bölgeleri arasında anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($p<0,001$). Post Hoc Bonferroni testi sonucunda frontal bölgelerde spindle güç değerlerinin temporal bölgelere göre anlamlı düzeyde artmış olduğu saptanmıştır ($p<0,001$). Elektrot bölgesi x grup etkileşiminin anlamlı olduğu bulunmuştur [$F(3,52)=3.94, P<0.05$]. Post Hoc Bonferroni testinde tüm elektrot bölgelerinde (Fp1, Fp2,

T3, T4) SHZ grubunun spindle güç değerlerinin SH, AH ve AHZ gruplarından anlamlı düzeyde yüksek olduğu saptanmıştır ($p<0,01$). Aynı zamanda sadece sol temporal bölgede (T3) AH grubunun spindle güç değeri SH ve AHZ grubundan düşüktür ($p<0,05$).

4.6.4. Beta (13-29 Hz) Bantlarının Güç Spektrumu Analizleri

Tekrarlı ANOVA testinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Beta güç değerlerinin analizi sonucunda kayıt elektrot bölgeleri arasında anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($p<0,001$). Post Hoc Bonferroni testi sonucunda frontal bölgelerde beta güç değerlerinin temporal bölgelere göre anlamlı düzeyde artmış olduğu saptanmıştır ($p<0,001$). Elektrot bölgesi x grup etkileşiminin anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p>0,05$).

Tablo 4.1. Sham ve deney gruplarının tüm elektrot bölgelerinden ölçülen delta (0.1-4 Hz), alfa/spindle (8-12 Hz) ve beta (13-29 Hz) spontan EEG osilasyonlarının ortalamaları. Tüm değerler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir (SH grubunda n=14, SHZ grubunda n=13, AH grubunda n=15, AHZ grubunda n=14) Fp1, sol frontal bölge; Fp2, sağ frontal bölge; T3, sol temporal bölge; T4, sağ temporal bölge.

	GRUPLAR	DELTA(μV^2)	ALFA (μV^2)	SPİNDLE (μV^2)	BETA (μV^2)
Fp1	SH	1094,89 $\pm$ 195,48	83,15 $\pm$ 11,24	66,44 $\pm$ 11,12	7,35 $\pm$ 0,99
	SHZ	1062,89 $\pm$ 202,85	79,43 $\pm$ 11,67	116,65 $\pm$ 11,54**	8,88 $\pm$ 1,02
	AH	961,02 $\pm$ 188,85	65,12 $\pm$ 10,86	54,10 $\pm$ 10,74##	8,23 $\pm$ 0,95
	AHZ	1373,71 $\pm$ 195,48	69,99 $\pm$ 11,24	54,87 $\pm$ 11,12##	7,83 $\pm$ 0,99
Fp2	SH	856,09 $\pm$ 147,89	71,53 $\pm$ 11,75	56,78 $\pm$ 10,83	6,03 $\pm$ 0,83
	SHZ	1038,51 $\pm$ 153,47	68,60 $\pm$ 12,19	100,81 $\pm$ 11,24**	7,45 $\pm$ 0,86
	AH	966,61 $\pm$ 142,87	68,68 $\pm$ 11,35	56,88 $\pm$ 10,46##	8,04 $\pm$ 0,80
	AHZ	1071,73 $\pm$ 147,89	59,25 $\pm$ 11,75	48,56 $\pm$ 10,83##	6,97 $\pm$ 0,83
T3	SH	1557,32 $\pm$ 144,442	16,23 $\pm$ 1,84	13,39 $\pm$ 1,75	2,77 $\pm$ 0,29
	SHZ	738,67 $\pm$ 149,89***	14,55 $\pm$ 1,91	24,16 $\pm$ 1,82***	2,79 $\pm$ 0,30
	AH	471,58 $\pm$ 139,54***	9,43 $\pm$ 1,78	7,87 $\pm$ 1,69*,###	1,78 $\pm$ 0,28
	AHZ	705,35 $\pm$ 144,44***	16,70 $\pm$ 1,84	13,83 $\pm$ 1,75###, ξ	2,88 $\pm$ 0,29
T4	SH	1502,66 $\pm$ 580,52	14,49 $\pm$ 1,79	11,72 $\pm$ 1,83	2,18 $\pm$ 0,24
	SHZ	2459,37 $\pm$ 602,44	13,58 $\pm$ 1,86	25,25 $\pm$ 1,90**	2,33 $\pm$ 0,25
	AH	848,00 $\pm$ 560,84	10,60 $\pm$ 1,73	8,71 $\pm$ 1,77##	1,61 $\pm$ 0,23
	AHZ	911,24 $\pm$ 580,52	11,089 $\pm$ 1,79	9,07 $\pm$ 1,83##	1,72 $\pm$ 0,24

*: SH grubundan farkı, #: SHZ grubundan farkı, ξ: AH grubundan farkı, ψ: frontal bölgelerden farkı göstermektedir. *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001, #: p<0,05; ##: p<0,01; ###: p<0,001, ξ: p<0,05, ξξ: p<0,01, ξξξ: p<0,001

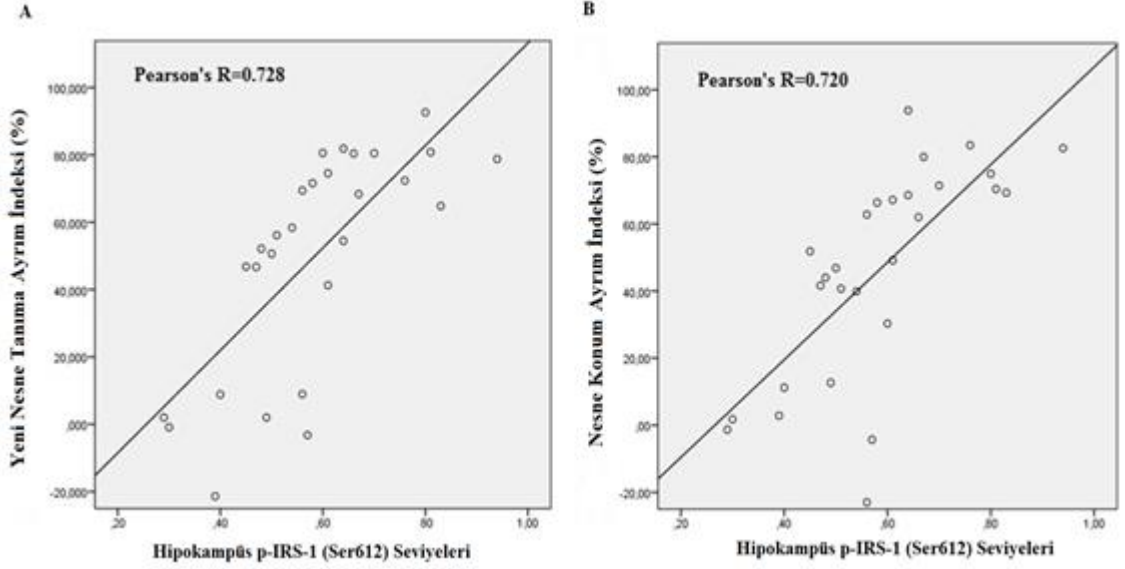
4.7. Korelasyon Analizi Sonuçları

4.7.1. Yeni Nesne Tanıma Ayrım İndeksi ve Hipokampus p-IRS-1 (Ser612) Seviyeleri Arasındaki İlişki

Yeni nesne tanıma ayrım indeksi ile hipokampus p-IRS-1 (Ser612) seviyeleri arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için Pearson korelasyon analizi kullanılmıştır. Yapılan analiz sonucunda yeni nesne tanıma ayrım indeksi ile hipokampus p-IRS-1 (Ser612) seviyelerindeki değişimler arasında pozitif bir ilişkinin (Pearson $r= 0,728$, $p<0,001$, $N=28$) (Şekil 4.6-A) olduğu bulunmuştur. Korelasyon analizinin sonuçlarına göre hipokampus p-IRS-1 (Ser612) seviyelerinin artışına bağlı olarak yeni nesne tanıma ayrım indeksinde anlamlı iyileşmelerin olduğu sonucu çıkarılabilmektedir.

4.7.2. Nesne Konum Ayrım İndeksi ve Hipokampus p-IRS-1 (Ser612) Seviyeleri Arasındaki İlişki

Nesne konum ayrım indeksi ile hipokampus p-IRS-1 (Ser612) seviyeleri arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için Pearson korelasyon analizi kullanılmıştır. Yapılan analiz sonucunda nesne konum ayrım indeksi ile hipokampus p-IRS-1 (Ser612) seviyelerindeki değişimler arasında pozitif bir ilişkinin (Pearson $r= 0,720$, $p<0,001$, $N=28$) (Şekil 4.6-B) olduğu bulunmuştur. Korelasyon analizinin sonuçlarına göre hipokampus p-IRS-1 (Ser612) seviyelerinin artışına bağlı olarak nesne konum ayrım indeksinde anlamlı iyileşmelerin olduğu sonucu çıkarılabilmektedir.



Şekil 4.6. Yeni nesne tanıma ve nesne konum ayırım indeksleri ile hipokampus p-IRS-1(Ser612) seviyeleri arasındaki ilişki. **A:** Yeni nesne tanıma ayırım indeksi ile hipokampus p-IRS-1 (Ser612) seviyeleri arasındaki ilişki. Pearson korelasyon analizi yeni nesne tanıma ayırım indeksi ile hipokampus p-IRS-1 (Ser612) değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir pozitif artışın olacağını göstermektedir. **B:** Nesne konum ayırım indeksi ile hipokampus p-IRS-1 (Ser612) seviyeleri arasındaki ilişki. Pearson korelasyon analizi nesne konum ayırım indeksi ile hipokampus p-IRS-1 (Ser612) değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir pozitif artışın olacağını göstermektedir.

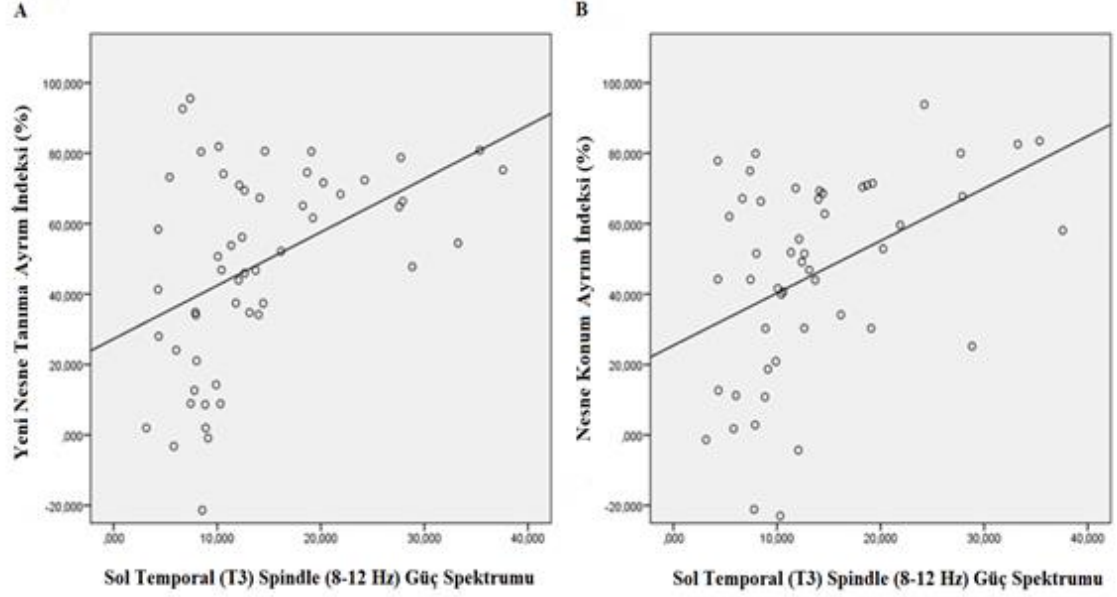
4.7.3. Yeni Nesne Tanıma Ayırım İndeksi ve Sol Temporal (T3) Spindle (8-12 Hz) Güç Spektrumları Arasındaki İlişki

Yeni nesne tanıma ayırım indeksi ile sol temporal (T3) spindle güç spektrumları arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için Pearson korelasyon analizi kullanılmıştır. Yapılan analiz sonucunda yeni nesne tanıma ayırım indeksi ile sol temporal bölge spindle güç spektrumlarındaki değişimler arasında pozitif bir ilişkinin (Pearson $r = 0,448$, $p < 0,001$, $N = 53$) (Şekil 4.7-A) olduğu bulunmuştur. Korelasyon analizinin sonuçlarına göre sol temporal bölgede (T3) spindle güç spektrumu seviyesinin artışına bağlı olarak yeni nesne tanıma ayırım indeksinde anlamlı iyileşmelerin olduğu sonucu çıkarılabilmektedir.

4.7.4. Nesne Konum Ayırım İndeksi ve Sol Temporal (T3) Spindle (8-12 Hz) Güç Spektrumları Arasındaki İlişki

Nesne konum ayırım indeksi ile sol temporal (T3) spindle güç spektrumları arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için Pearson korelasyon analizi kullanılmıştır. Yapılan analiz sonucunda yeni nesne tanıma ayırım indeksi ile sol temporal bölge spindle güç

spektrumlarındaki değişimler arasında pozitif bir ilişkinin (Pearson $r = 0,433$, $p < 0,01$, $N = 50$) (Şekil 4.7-B) olduğu bulunmuştur. Korelasyon analizinin sonuçlarına göre sol temporal bölgede (T3) spindle güç spektrumu seviyesinin artışına bağlı olarak nesne konum ayırım indeksinde anlamlı iyileşmelerin olduğu sonucu çıkarılabilmektedir.



Şekil 4.7. Yeni nesne tanıma ve nesne konum ayırım indeksleri ile sol temporal (T3) spindle (8-12 Hz) güç spektrumu arasındaki ilişki. **A:** Yeni nesne tanıma ayırım indeksi ile sol temporal (T3) spindle güç spektrumları arasındaki ilişki. Pearson korelasyon analizi yeni nesne tanıma ayırım indeksi ile sol temporal (T3) bölge spindle gücü değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir pozitif artışın olacağını göstermektedir. **B:** Nesne konum ayırım indeksi ile sol temporal (T3) spindle güç spektrumları arasındaki ilişki. Pearson korelasyon analizi nesne konum ayırım indeksi ile sol temporal (T3) bölge spindle gücü değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir pozitif artışın olacağını göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Alzheimer hastalığının patolojik değişiklikleri, klinik semptomların ortaya çıkmasından 20 yıl önce başlar (Kshirsagar ve ark., 2021). Bu açıdan hastalığın erken evrelerinde görülen patolojik değişikliklerin araştırılması önem kazanmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda, AH patolojisinin erken aşamalarında gözlemlenen benzer değişiklikleri indüklemek için i.c.v. A β O uygulamasına dayalı bir sıçan modeli kullanmıştır.

Alzheimer hastalarında sıklıkla görülen kilo kaybı, demans semptomlarının başlamasından önce bile hastalığın bir işareti olabilir. Hipokampal A β enjeksiyonu ile oluşturulan AH sıçan modelinde, kilo kaybının hastalığın erken döneminin bir özelliği olduğu gösterilmiştir (James ve ark., 2014). Alzheimer hastalığının erken dönemini yansıtan çalışmamızda da AH grubu sıçanların ağırlık artışının SH grubundan anlamlı olarak düşük olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda, AH grubu sıçanların SH grubuna göre anlamlı düzeyde ağırlık kaybı yaşadığı sonucuna varılmıştır. Literatürdeki bilgiler ve çalışmamızdan elde edilen veriler neticesinde, kilo kaybının AH'nin erken döneminde görülen belirtilerden biri olabileceği sonucuna varılabiliriz.

İnsülin direncinin veya eksikliğinin, AH'nin başlamasına yol açan A β birikimini ve tau protein fosforilasyonunu değiştirebildiği de bilinen bir gerçektir (M. K. Song, Bischoff, ve ark., 2017). Yapılan bir araştırmada hastalığın başlangıç evresinde gelişen hiperglisemi ve hiperinsülinemisinin AH'nin erken bir belirteci olabileceği bulunmuştur. Bunun tersine, ileri düzeyde AH'li hastalarda ise hipoinsülinemi durumu olduğu bildirilmiştir (Craft ve ark., 1996). Aynı zamanda, HBB bozukluğu olan hastaların bile periferik insulin direncinin göstergesi olan HOMA-IR indeksinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu gösterilmiştir (H. J. Zhao ve ark., 2019). Bu bağlamda, periferik glukoz metabolizmasının yaygın belirteçleri olarak kullanılan açlık kan şekeri ve serum insülin düzeyleri çalışmamızda ölçülmüş ve periferik insülin direnci HOMA-IR indeksiyle belirlenmiştir. Alzheimer hastalığının erken dönemini mimik eden çalışmamızda da A β O enjeksiyonu yapılan sıçanların açlık kan glukoz ve serum insülin seviyelerinin SH grubuna kıyasla anlamlı ölçüde arttığı gösterilmiştir. Aynı zamanda AH grubunun HOMA-IR indeksi SH grubundan anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuştur. Bu

nedenle, bulgularımız, periferik insülin direncinin, erken AH biyobelirteçlerinin patogeneze katkıda bulunduğunu ve AD'nin patogeneze ilişkin içgörüler ortaya koyduğunu desteklemektedir. Aynı zamanda, kronik periferik hiperinsülineminin KBB'de bulunan İR'lerin aşağı doğru regülasyonuna yol açtığı ve beyne taşınan insülin miktarını azalttığı bilinmektedir (Sano ve ark., 2007). Nitekim, periferik hiperinsülinemi durumuna sahip görünen AH'li hastaların beyin insülin konsantrasyonlarının daha düşük olduğu da gözlenmiştir (Rui, 2014). Çalışmamızda da AH grubunda gözlemlenen periferik insülin düzeyi artışının aksine hipokampus insülin düzeyinin SH grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde düştüğü gösterilmiştir. Literatürdeki bilgilerle paralellik gösteren bulgularımız, AH'deki kronik hiperinsülineminin beyindeki insülin seviyesinin azalmasına neden olabileceğini kuvvetle önermektedir.

İnsülin ve Aβ'nın ortak bir sekans tanıma motifini paylaşan amiloidojenik peptitler olduğu ve AβO'ların İR'ye bağlanarak reseptörün fosforilasyonunu inhibe edebileceği bilinmektedir (Xie ve ark., 2002). Çalışmamızda AβO enjeksiyonu yapılarak oluşturulan sıçan modelinde, AβO'ların insülin sinyal yolağına etkisinin incelenmesi planlanmıştır. Merkezi sinir sisteminde insülin sinyal yolunun zamana bağlı değişimini detaylı bir şekilde araştıran bir araştırmada hücre dışı Aβ plak oluşumunun görülmediği hastalığın erken döneminde total IRS-1 düzeylerinde azalma görülmesine rağmen IRS-1 Ser612 fosforilasyonunun da azalmış olduğu gösterilmiştir. Bu durum, insülin sinyalini devam ettirmeye çalışan telafi edici bir mekanizma olarak yorumlanmıştır ve hastalığın ilerlemesiyle IRS-1 Ser612 fosforilasyonu giderek arttığı gözlenmiştir. Sonuç olarak AH hayvan modellerinde IRS-1'in düzensiz aktivasyonunun olduğu görülmüştür (Velazquez ve ark., 2017). Aβ plak oluşumunun öncesini temsil eden çalışmamızda da total beyin IRS-1 Ser612 fosforilasyonunun AH grubunda SH grubuna göre anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca hipokampus IRS-1 Ser612 fosforilasyonu da AH grubunda azalmış olmasına rağmen anlamlı bulunamamıştır. Bulgularımız ve daha önceki sonuçlar, beyindeki azalmış p-IRS-1 Ser612 düzeylerinin AH'nin erken evresinin bir belirtici olduğunu düşündürmektedir.

İnsülin sinyal yolağının devamında aktifleşen IRS-1 kompleksi, PI3K→PKB/Akt yolağının aktive ederek GSK-3β'nin Ser9/21 bölgesini fosforile eder ve GSK-3β

aktivitesini baskılar (Y. Wang, Yang, ve ark., 2015; Lauretti ve ark., 2020). Çalışmalarda, insülin direnci veya eksikliğinin GSK-3 β 'nın aşırı aktivasyonuna yol açarak (Lauretti ve ark., 2020) AH'nin başlamasına yol açan A β ve tau protein fosforilasyonunu değiştirebildiği gösterilmiştir (X. Li ve ark., 2015). Zira çalışmamızda da AH grubu sıçanlarda meydana gelen IRS-1 fosforilasyonu değişimi, hipokampus ve total beyin bölgelerinde GSK-3 β Ser21 fosforilasyon düzeylerinin anlamlı olarak azalmasına neden olmuştur. Glikojen sentaz kinaz-3 β , tau proteininin mikrotübüllere bağlanmasından sorumludur (Ahmad, 2013). Bu nedenle, A β O enjeksiyonuna bağlı AH hastalığının erken dönemini mimik eden çalışmamızda, A β 'ya bağlı tau toksisitesini yansıtan p-Tau Ser356 bölgesi incelenmiştir. Tau'nun Ser356 bölgesinden fosforilasyonu mikrotübüllere tau bağlanmasını azaltır ve tau toksisitesinin artmasında rol oynar. Bununla birlikte, AH patolojisinin başlamasına yol açan A β 'den kaynaklanan tau toksisitesinin, spesifik olarak Tau Ser 262/356 bölgesinin fosforilasyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir (Ando ve ark., 2016). Bu görüşle uyumlu olarak, çalışmamızda da hipokampus bölgesinde p-Tau Ser 356 düzeyinde anlamlı bir artış olduğu, toplam beyin bölgesinde de anlamlı olmasa da artma eğiliminde olduğu bulunmuştur.

Merkezi sinir sisteminde insülin sinyali, belleği modüle eden genlerin ekspresyonu için gereklidir (Velazquez ve ark., 2017). Dolayısıyla; çalışmamızda gözlemlenen insülin sinyal yolağındaki değişimin bilişsel fonksiyonlar üzerinde de değişikliklere neden olması beklenilir. Bu bağlamda, hafıza eksikliklerinin yaygın bir belirteci olan yeni nesne tanıma ve nesne konum testleri kullanılmıştır. Nesne konum belleği; kodlama, konsolidasyon ve bilgiyi geri çağırmak için hipokampusa ihtiyaç duyar (Mumby ve ark., 2002; Haettig ve ark., 2011). Yakın tarihli bir araştırmaya göre, A β O enjeksiyonları, nesne konum ayırım indeksinde önemli bir bozulmaya neden oldu. Bu çalışmada, A β O'ların hipokampal bağımlı ilişkisel öğrenme görevlerinde performansı bozduğu sonucuna varılmıştır (Rozema ve ark., 2020). Nesne konum ayırım indeksi sonuçlarına göre AH grubundaki hayvanların SH grubuna göre anlamlı olarak hipokampus bağımlı öğrenmelerinin azaldığı çalışmamızda gösterilmiştir. Yeni nesne tanıma testi için ise insular korteks (Bermudez-Rattoni ve ark., 2005; Balderas ve ark., 2008), perirhinal korteks (Winters ve ark., 2004; Winters ve Bussey, 2005; Balderas ve ark., 2008) ve ventromedial prefrontal korteks (Akirav ve Maroun, 2006) dahil olmak üzere bir dizi farklı beyin bölgesi kritiktir.

Perirhinal korteks, uzun süreli bellekte konsolidasyonunun gerçekleştirilmesi istenen sinaptik girdilerin hipokampüse iletilecek kısmını belirleyen önemli bir filtreleme merkezidir. Dolayısıyla perirhinal korteksin, uzun süreli belleğin konsolide edeceği bilgiyi belirleyen kritik bir istasyon olduğu sonucuna varabiliriz (Unal ve ark., 2012; Unal ve ark., 2013). Önceki bir araştırmada, nesne tanıma ayırım indeksinin, A β 1-42 oligomer ile tedavi edilen farelerde önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (D. H. Kim ve ark., 2016). Çalışmamızda da bu bilgi ile paralel olarak yeni nesne tanıma testi uygulanan AH grubu sıçanların ayırım indeksi sonuçları SH grubundan anlamlı olarak düşüktür. Toplu olarak bu bulgular, A β O'nun AH'nin başlangıcında beynin insülin sinyal yolunu değiştirerek hafıza fonksiyonlarını bozduğunu ve nihayetinde AH patolojisine katkıda bulunduğunu göstermektedir. Bu nedenle A β 'yı bozan proteazların düzenlenmesi, AH tedavisi için mantıklı bir terapötik yaklaşımı temsil edebilir. Beyindeki A β metabolizmasını esas olarak düzenleyen iki ana peptidaz Zn⁺² bağımlı NEP ve İDE enzimleridir (Yamamoto ve ark., 2018). Alzheimer hastalığının erken evrelerinde İDE (Z. Zhao ve ark., 2007a; Stargardt ve ark., 2013) ve NEP (Sikanyika ve ark., 2019) düzeylerinin yaşla birlikte azaldığı iyi bilinmektedir. Çalışmamızda da AH grubu sıçanların hipokampus bölgesinde İDE düzeylerinin SH grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur. Total beyin bölgesinde de anlamlı olmasa da düşüş olduğu gösterilmiştir. Ayrıca AH grubunun total beyin bölgesi NEP düzeylerinde SH grubuna kıyasla anlamlı bir azalışın olduğu bulunmuştur. Hipokampus bölgesinde benzer azalma görülmüş ancak anlamlı bulunamamıştır.

Alzheimer hastalığında Zn⁺² eksikliği yaygın olarak bildirilen bir durumdur (Roberts ve ark., 2014; Afkarian ve ark., 2016). Daha önceki çalışmalar, Siklo-Z'nin Zn⁺² emilimini artırdığını (Rosenthal ve ark., 2001) ve kilo kontrolünü iyileştirdiğini göstermektedir (M. K. Song ve ark., 2009). Çalışmamızda da AHZ grubu hayvanların ağırlık artışının AH grubu hayvanlara göre anlamlı bir şekilde arttığı ve SH grubundan farklı olmadığı bulunmuştur. Ayrıca, Siklo-Z'nin kan şekeri seviyesini düşürdüğü (M. K. Song ve ark., 1998; M. K. Song ve ark., 2001; Hwang ve ark., 2003), insülin duyarlılığını ve glukoz toleransını önemli ölçüde artırdığı da bilinen bir gerçektir (Hwang ve ark., 2003; M. K. Song ve ark., 2003; M. K. Song ve ark., 2005). Çalışmamızda AHZ grubundaki hayvanların açlık kan şekeri düzeylerinin AH grubuna göre düştüğü, HOMA-IR indeksi

ve serum insülin düzeylerinin de anlamlı olmasa da düşme eğiliminde olduğu gösterilmiştir. Hipokampus insülin düzeyleri incelendiğinde AHZ grubunda anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Bununla birlikte, Siklo-Z uygulanan SHZ grubu sıçanlarda SH grubuna kıyasla kilo kaybı eğilimi olduğu gözlenmiştir. Bu kilo kaybı eğilimi kısmen Zn^{+2} toksisitesi ile açıklanabilir. Çinkonun aşırı maruziyet sonrasında akut ve kronik toksisitelere neden olduğu bilinen bir gerçektir ve Zn^{+2} toksisitesi semptomlarından biri de vücut ağırlığı kaybıdır. Aşırı Zn^{+2} takviyesinin insanlar için potansiyel bir risk faktörü olduğu da yapılan çalışmalarda gösterilmektedir (Yeh ve ark., 2011). Aynı zamanda SHZ grubunun açlık kan şekeri seviyeleri, serum insülin seviyeleri ve HOMA-IR indeksi de SH grubuna göre yükselmiştir. Ayrıca, SHZ grubunun hipokampal insülin seviyesi de SH grubuna kıyasla düşme eğilimi göstermektedir. Çinkonun glukoz homeostazını koruyan hücre sinyallemede yer alan anahtar molekülleri aktive ettiği bilinmesine rağmen aşırı miktarı da diyabet komplikasyonlarına neden olmaktadır (Bjorklund ve ark., 2020). Dolayısıyla, insan sağlığı için vazgeçilmez bir unsur olan Zn^{+2} 'nin günde 15-20 mg/gün tavsiye edilen dozundan (M. K. Song, Bischoff, ve ark., 2017) fazlası toksisiteye neden olmaktadır. Çalışmamızda, Siklo-Z terapötik ajanının AH hastalığının erken döneminde ortaya çıkan kilo kaybı, periferik insülin direnci ve beyin insülin seviyeleri üzerinde olumlu bir etkisinin olduğu, ancak sağlıklı bireylere Zn^{+2} toksisitesine bağlı olarak kilo kaybına, periferik insülin direncine ve beyin insülin düzeyinin azalmasına yol açabileceği sonucuna varılmıştır.

Beyin insülin direncinin bir göstergesi olarak tanımlanan IRS-1 'in Ser fosforilasyonunun hangi bölgelerden gerçekleştiğine bağlı olarak insülin sinyalizasyonunu negatif ve pozitif olarak düzenleyebildiği son zamanlarda ortaya konulmuştur. IRS1'in serin rezidüleri üzerindeki fosforilasyonu, insülin etkilerini arttırmak veya sonlandırmak için ikili bir rol oynar. Eğer insülin, IRS-1'i Ser rezidüleri üzerinden fosforile ederse insulin sinyali duyarsızlaşır ve insulin sinyali negatif olarak etkilenir. Aslında, uzun süreli insülin stimülasyonunun ardından, IRS1'in, PI3K'ın aşağı akışında aktive edilen PKB/Akt tarafından Ser rezidüleri üzerinde fosforile edildiği ve bu durumunda insülin sinyal yolağının pozitif olarak düzenlendiği gösterilmiştir. İnsülin reseptör substrat proteinlerinin PKB/Akt fosforilasyon bölgeleri olarak işlev gören dört Ser rezidüsü vardır ve çalışmamızda incelenen Ser612 rezidüsü de bunlardan biridir. İnsulin sinyalinin uzun

sürekli aktivasyonu sonucu PKB/Akt aşırı eksprese olur ve IRS-1'i bu Ser bölgelerinden fosforile ederek Thr defosforilasyon oranını zayıflatır. Bu durum, Thr fosfatazlarının hızlı etkisinden koruyarak IRS-1'i fosforile aktif bir formda tutar ve insülin sinyallerinin pozitif bir geri besleme mekanizması olarak hareket etmesini sağlar (Paz ve ark., 1999; Gual ve ark., 2005). Çalışmamızda da Siklo-Z tedavisi alan AHZ grubu sıçanların hem hipokampus hem de total beyin bölgelerinde p-IRS-1 Ser612 düzeylerinin AH grubundan anlamlı olarak artmış olduğu bulunmuştur. Benzer şekilde SHZ grubu sıçanların da p-IRS-1 Ser612 seviyelerinin hipokampus bölgesinde anlamlı olarak arttığı, total beyin bölgesinde de artma eğiliminde olduğu bulunmuştur. Daha sonra insülin sinyal yolunda IRS-1 fosforilasyonunu takip eden p-GSK-3 β Ser21 seviyelerinin değişimi incelenmiş ve AHZ'ye karşı AH'de hipokampus ve toplam beyin bölgelerinde anlamlı bir artış olduğu bulunmuştur. Ayrıca, SHZ grubunun p-GSK-3 β Ser-21 düzeyleri incelendiğinde SH grubuna göre hipokampus ve total beyin bölgesinde de artma eğiliminde olduğu gösterilmiştir. Çinkonun insülin sinyal iletimini kolaylaştırarak insülin benzeri etkiler gösterdiği çok iyi bilinmektedir (Miao ve ark., 2013). Bu etkileri de büyük ölçüde PKB/Akt sinyalizasyonunun aktivasyonuna bağlıdır (Sun ve ark., 2018) ve Zn⁺² takviyesinin hem konsantrasyon hem de zamana bağlı bir şekilde PKB/Akt fosforilasyonunu indüklediği kanıtlanmıştır (Y. Wang ve ark., 2009; Gao ve ark., 2015; Y. Zhao ve ark., 2015). Bu nedenle, hem AH grubu sıçanlara hem de sağlıklı sıçanlara uygulanan Siklo-Z uygulamasının, beyin insülin yolu üzerinde faydalı bir etkiye sahip olduğu gözlenmiştir.

Siklo-Z tedavisinin A β O ve tau protein fosforilasyonu üzerine etkileri de incelenmiştir. Siklo-Z tedavisi alan AHZ grubunun AH grubuna göre A β O düzeylerinin her iki bölgede de anlamlı olarak azalttığı ve SH grubundan farklı olmadığı bulunmuştur. Alzheimer hastalarına uygulanan Siklo-Z tedavisinin A β O seviyeleri üzerinde gösterdiği bu olumlu etki tau p-Ser356 düzeylerinde gözlenmemiştir. Bu durum, AH'nin patofizyolojisinde önemli bir rol oynadığı bilinen artan p-Tau Ser356 seviyelerinde başka olası mekanizmaların rol oynayabileceğini düşündürmektedir. GSK-3 β ve protein fosfat 2A (PP2A), tau hiperfosforilasyonunu kontrol eden önemli enzimlerdir. Bu iki enzim arasındaki ilişki ve bunun tau hiperfosforilasyonu üzerindeki etkisi henüz tam anlamıyla

anlaşılamamıştır. Yapılan bir çalışmada, GSK-3 β ve PP2A'nın birbirlerini düzenlediği ve tau fosforilasyonunu doğrudan ve dolaylı olarak birbirlerinin modülasyonu yoluyla düzenlediği bulunmuştur. PI3K-Akt aktivasyonundan kaynaklanan GSK-3 β 'nin inaktivasyonunun PP2A inaktivasyonuna yol açarak tau hiperfosforilasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Spesifik olarak, GSK-3 β 'yı hedeflemenin PP2A'ya duyarlı bölgelerden biri olan Ser262/356'da tau fosforilasyonunun artmasına neden olabileceği bu çalışmada ortaya konulmuştur. PP2A, özellikle tau'nun anormal hiperfosforilasyonu için gerekli bölge olan Ser262/356 bölgesinde tau fosforilasyonunun ana düzenleyicisidir. Bu nedenle, tau patolojisi için gerekli olan Ser262/356 bölgesinin PP2A'ya spesifik olduğu ve tau patolojisi için terapötik hedef olarak PP2A'nın ele alınması önerilmiştir (Y. Wang, Yang, ve ark., 2015). Nitekim bizim çalışmamızda da Siklo-Z terapötik ajanının AHZ grubunda GSK-3 β aktivitesini azaltmasına rağmen p-Tau Ser356 seviyesini azaltmadığı bulunmuştur. Siklo-Z ajanının AHZ grubunda A β O seviyesini azalttığı bulunsada SHZ grubunun A β O düzeylerinin hem hipokampus hem de total beyin bölgelerinde SH grubuna kıyasla anlamlı ölçüde arttığı gösterilmiştir. Sağlıklı sıçanlara uygulanan Siklo-Z ajanının A β O seviyelerine olumsuz etkisi olduğu bulunmuştur. İn vitro fizyolojik koşullar altında Zn⁺² iyonlarının varlığında A β peptitlerinin agregasyonunun hızla indüklenebileceği ve Zn⁺² iyonlarının A β birikintileri ile birlikte yerleştiği bilinmektedir. Fibrilasyonun oluşması için gerekli olan Zn⁺² konsantrasyonu tartışmalı olmakla birlikte, A β agregasyonunda önemli bir rolü olduğu kesindir (Watt ve ark., 2010). Aynı zamanda, yüksek Zn⁺² iyon konsantrasyonlarının A β agregasyonunu ve tau protein modifikasyonuna neden olduğu da bilindiği için (Kabir ve ark., 2021) sağlıklı sıçanlara uygulanan Siklo-Z tedavisinin A β O seviyesini arttırması şaşırtıcı değildir. Siklo-Z ajanının SHZ grubu p-Tau Ser356 düzeylerini arttırma eğilimi gösterdiği bulunsada anlamlı değildir. Dolayısıyla, SHZ grubunda gözlemlediğimiz gibi aşırı Zn⁺² takviyesinin Alzheimer benzeri toksisitelere neden olabileceği düşünülmektedir.

Aynı zamanda, Siklo-Z tedavisinin bilişsel işlevler üzerindeki etkisini incelemek için davranış testleri kullanılmıştır. Çalışmamızda yeni nesne tanıma testi uygulanan AHZ grubu sıçanların ayırım indeksi sonuçlarının AH grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde, SHZ grubu hayvanların yeni nesne tanıma ayırım

indekslerinin de artma eğilimi gösterdiği belirtilmiştir. Aynı zamanda yeni nesne tanıma ayırım indeksinin hipokampus bölgesindeki p-IRS-1 Ser612 düzeyleri ile pozitif bir korelasyona sahiptir ilişkinin (Pearson $r=0,728$, $p<0,001$, $N=28$). Benzer şekilde, AHZ ve SHZ grubunun nesne konum ayırım indeksleri sırasıyla AH ve SH grubuna göre anlamlı derecede yüksektir. Aynı zamanda hipokampus bölgesindeki p-IRS-1 Ser612 seviyeleri ile nesne konum testi ayırım indeksi arasında pozitif bir ilişki vardır (Pearson $r=0,720$, $p<0,001$, $N=28$). Bulgularımız, artan p-IRS-1 Ser612 seviyelerinin bilişsel işlev bozukluklarını iyileştirdiğini gösteren bir çalışma ile paralellik sergilemektedir (Tanokashira ve ark., 2019). Aynı zamanda, A β 'yi parçalayabildiği bilinen İDE ve NEP enzimleri (Shirotani ve ark., 2001) üzerinde Siklo-Z ajanının etkisi çalışmamızda incelenmiştir. Çalışmamızda Siklo-Z tedavisinin AHZ grubunun total beyin NEP seviyesini AH grubuna göre anlamlı olarak arttırdığı ve hipokampal İDE seviyesinin de artırma eğiliminde olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda, SHZ grubunun hipokampal İDE ve total beyin NEP enzim seviyesi SH grubuna göre anlamlı olarak artmıştır. Bu enzimlerinin hem gen ekspresyonları hem de aktiviteleri için Zn^{+2} 'ye ihtiyaç duyduğu bilinmektedir (Watt ve ark., 2010), böylece Zn^{+2} takviyesi A β 'yi parçalayan bu enzimlerin sentezini indükleyebilir (Lifshitz ve ark., 2013). Çalışmamız sonucunda daha önceki çalışmalarda hücre içi İDE miktarını arttırdığı bilinen tedavi edici ajan Siklo-Z'nin (Hwang ve ark., 2003; M. K. Song ve ark., 2003) NEP miktarına etkisi olduğu ortaya konulmuştur.

Biriken kanıtlar, A β maruziyetinin presinaptik ve postsinaptik sinapslarda değişikliklere neden olduğunu ve tau birikimlerinin sinaptik iletim bozukluğunda etkili olduğunu ve sinirsel sinaptik ağ dinamiklerini bozduğunu göstermektedir (Miyauchi ve ark., 1994; Brunovsky ve ark., 2003). Ayrıca, A β O'ların A β yapıları arasında en patolojik olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, ketamin anestezisi altında yüksek zamansal çözünürlüğe sahip olan EEG tekniği ile A β O'ların sinir ağı dinamikleri ve değişiklikleri üzerindeki etkilerini araştırdık. Ketamin, rekabetçi olmayan bir NMDAR antagonistidir. Ketamin anestezisi altında spontan EEG'nin uyku EEG modellerini taklit ettiği (Lazarewicz ve ark., 2010) ve AH patofizyolojisinin uyku fizyolojisini belirgin şekilde bozduğu iyi bilinmektedir (Ladenbauer ve ark., 2017). Uyku sırasında oluşan kortikal yavaş salınımlar, talamokortikal spindle aktivitesi ve bunların zamansal koordinasyonu, hafıza oluşumu

için kritik kabul edilmektedir. Uyku, metobolik ihtiyacın karşılanması fonksiyonunun yanı sıra, hipokampüsteki geçici depodan neokorteksteki kalıcı depoya bellek transferinde de önemli bir rol oynar. Spesifik olarak, EEG ile ölçülebilen yavaş salınımlar ve spindle aktiviteleri bellek için kritiktir (Ladenbauer ve ark., 2017).

Hastalığın erken evrelerinde, A β plaklarının birikmesinden önce beyin dalgalarının oligomerik A β varlığında yavaş dalga bozukluğu gösterdiği bulunmuştur (Y. F. Lee ve ark., 2020). Aynı zamanda, yüksek tau birikiminin azalan delta gücü ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Lucey ve ark., 2019). Çalışmamızda sol temporal bölgede AH, SHZ ve AHZ gruplarında delta güç değerlerinin SH grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı saptanmıştır. Siklo-Z uygulaması, AHZ grubunda uyku delta spektral gücünü arttırsa da anlamlı olmadığı sonucuna varılmıştır. SHZ grubunda gözlemlenen anlamlı azalış A β O ve Zn⁺² toksisitesine bağlı tau patolojisi ile ilişkilendirilmiştir.

Nöroplastisiteye kritik bir şekilde bağlı olan karakteristik uyku salınımı, spindle aktivitesidir. Talamusun retiküler çekirdeğinde üretilirler ve kortiko-talamik döngüler yoluyla eksprese edilirler. Alzheimer hastalığında uyku spindle ekspresyonunda ve spindle yoğunluğunda azalma olduğu saptanmıştır (Mander, 2020). Ayrıca, AH patolojisinin APP/PS1 Tg kortikal spindle gücünün anlamlı olarak zayıflattığı da gösterilmiştir (Zhurakovskaya ve ark., 2019). Çeşitli uyku elektroensefalografi aktiviteleri arasında, uyku spindle aktivitesi AH için bir biyobelirteç olma potansiyeline sahip spesifik bir elektroensefalografik ritim olarak önerilmektedir (Weng ve ark., 2020). Çalışmamızda da sol temporal bölgede AH spindle güç değerlerinin SH ve AHZ'den anlamlı olarak düşük olduğu bulunmuştur. Dolayısıyla azalan sol temporal bölge spindle güç spektrumunun AH hastalığının belirgin bir özelliği olduğu sonucuna varabiliriz. Siklo-Z tedavisine bağlı olarak AHZ grubunun spindle spektral güç değerleri anlamlı olarak AH grubuna göre artmıştır. Ancak, SHZ grubunda A β O ve tau patolojisi görülmesine rağmen SHZ grubunun spindle gücünün tüm elektrot bölgelerinde SH, AH ve AHZ'den anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuştur. Yapılan bir çalışmada, yeterli Zn⁺² konsantrasyonunun iyi uyku kalitesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Ji ve Liu, 2015). Ayrıca, artan spindle gücünün, bellek konsolidasyonu üzerinde önemli etkileri olan uyku kalitesine katkıda bulunabileceği fikrine varılmıştır (Ladenbauer ve ark., 2017). Nitekim,

sol temporal (T3) spindle gücünün, yeni nesne tanıma ayırım indeksi ve nesne konum ayırım indeksi (Pearson $r = 0,433$, $p < 0,01$, $N = 50$) ile pozitif bir korelasyona sahip olduğu da çalışmamızın sonuçlarından biridir. Bu açıdan bakıldığında, Siklo-Z'nin sol temporal bölgede spindle gücünü ve bellek konsolidasyonunu artırabileceği sonucuna varılabilir.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak projemizin ana bulguları aşağıdaki gibi özetlenmektedir.

- Kilo kaybı, hiperglisemiye karşı gösterilen hiperinsülinemi durumu ve periferik insülin direnci AH'nin erken evresinin muhtemel biyobelirteçleridir.
- Alzheimer hastalığının erken evrelerinde görülen periferik hiperinsülinemi durumu hipokampal insülin konsantrasyonunu azaltmaktadır.
- Artan IRS-1 Ser612 fosforilasyonu, hastalığın erken döneminde insülin sinyal yolağını devam ettiren koruyucu bir mekanizmadır. Değişen insulin sinyal yolunun GSK-3 β Ser21 fosforilasyonunun azalmasına yol açtığı gösterilmiştir.
- AH'nin erken döneminde A β O toksisitesi ve Tau Ser356 fosforilasyonu artmıştır.
- Alzheimer hastalığının erken aşamalarında A β O degradasyonundan sorumlu IDE ve NEP enzimlerinin seviyesi azalır.
- Beyin insülin sinyal yolağında meydana gelen değişim, nesne ve konum hafıza fonksiyonlarının azalmasına neden olmaktadır.
- Siklo-Z tedavisi AHZ grubunda kilo kaybı, periferik insülin direnci ve beyin insülin miktarları üzerinde olumlu bir etkiye sahipken, SHZ grubu üzerinde Zn+2 toksisitesine bağlı olumsuz etki göstermektedir.
- Siklo-Z terapötik ajanı, insülin sinyal yolağı üzerinde olumlu bir etkiye sahiptir. AHZ ve SHZ gruplarının Siklo-Z'ye bağlı nesne ve konum hafıza fonksiyonlarının yükseldiği bulunmuştur.
- AHZ sıçanlarına uygulanan Siklo-Z tedavisi, artan amiloid parçalayıcı enzimlere bağlı olarak A β O toksisitesini azaltır, ancak Tau Ser356 fosforilasyonunu engelleyememiştir.

- SHZ grubuna uygulanan Siklo-Z tedavisinin, amiloid parçalayıcı enzimlerinin seviyesini arttırabilse de Zn^{+2} toksisitesine bağılı olarak $A\beta O$ birikimine ve bunu bağılı tau birikimine neden olabileceğı gözlenmiştir.

- Alzheimer hastalığında sol temporal bölge spindle güç değerlerindeki azalma, hastalığın erken biyobelirteçlerinden biri olabilir.

- Siklo-Z tedavisinin sol temporal bölgede spindle güç değerlerini arttırdığı bulunmuştur. Böylece, Zn^{+2} şelatının spindle güç değerleri üzerine bir etkisi olduğu fikrine varabiliriz.

- Sol temporal (T3) bölge spindle güç değerleri ile bellek arasında pozitif güçlü bir ilişki olduğu bulunmuştur.

- Alzheimer hastalığının erken dönem patolojisi, uyku EEG'sinin sol temporal bölge delta güç değerlerinde azalmaya neden olmaktadır. Ayrıca, Siklo-Z tedavisinin sol temporal bölge delta gücünü bir miktar artırdığı bulunmuştur.

Çalışmamız literatüre yeni ve önemli bilgiler sağlayarak yeni projelere yön gösterecek özelliktedir.

KAYNAKLAR

- Adeli, H., Ghosh-Dastidar, S., & Dadmehr, N. A spatio-temporal wavelet-chaos methodology for eeg-based diagnosis of alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2008; 444 (2): 190-194.
- Adrian, E. D. M., B.H. The berger rhythm: Potential changes from the occipital lobes in man. *Brain*. 1934; 57 (4): 355-385.
- Afkarian, M., Zelnick, L. R., Hall, Y. N., Heagerty, P. J., Tuttle, K., Weiss, N. S., & de Boer, I. H. Clinical manifestations of kidney disease among us adults with diabetes, 1988-2014. *JAMA*. 2016; 316 (6): 602-610.
- Aguirre, V., Werner, E. D., Giraud, J., Lee, Y. H., Shoelson, S. E., & White, M. F. Phosphorylation of ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol Chem*. 2002; 277 (2): 1531-1537.
- Ahmad, W. Overlapped metabolic and therapeutic links between alzheimer and diabetes. *Mol Neurobiol*. 2013; 47 (1): 399-424.
- Akirav, I., & Maroun, M. Ventromedial prefrontal cortex is obligatory for consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Cereb Cortex*. 2006; 16 (12): 1759-1765.
- Alzheimer's, A. 2015 alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*. 2015; 11 (3): 332-384.
- Ando, K., Maruko-Otake, A., Ohtake, Y., Hayashishita, M., Sekiya, M., & Iijima, K. M. Stabilization of microtubule-unbound tau via tau phosphorylation at ser262/356 by par-1/mark contributes to augmentation of ad-related phosphorylation and abeta42-induced tau toxicity. *PLoS Genet*. 2016; 12 (3): e1005917.

- Arnold, S. E., Arvanitakis, Z., Macauley-Rambach, S. L., Koenig, A. M., Wang, H. Y., Ahima, R. S., Nathan, D. M. Brain insulin resistance in type 2 diabetes and alzheimer disease: Concepts and conundrums. *Nat Rev Neurol*. 2018; 14 (3): 168-181.
- Arriagada, P. V., Growdon, J. H., Hedley-Whyte, E. T., & Hyman, B. T. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of alzheimer's disease. *Neurology*. 1992; 42 (3 Pt 1): 631-639.
- Authier, F., Posner, B. I., & Bergeron, J. J. Insulin-degrading enzyme. *Clin Invest Med*. 1996; 19 (3): 149-160.
- Babiloni, C., Binetti, G., Cassarino, A., Dal Forno, G., Del Percio, C., Ferreri, F., . . . Rossini, P. M. Sources of cortical rhythms in adults during physiological aging: A multicentric eeg study. *Hum Brain Mapp*. 2006; 27 (2): 162-172.
- Babiloni, C., Binetti, G., Cassetta, E., Dal Forno, G., Del Percio, C., Ferreri, F., . . . Rossini, P. M. Sources of cortical rhythms change as a function of cognitive impairment in pathological aging: A multicenter study. *Clin Neurophysiol*. 2006; 117 (2): 252-268.
- Babiloni, C., Brancucci, A., Capotosto, P., Romani, G. L., Arendt-Nielsen, L., Chen, A. C., & Rossini, P. M. Slow cortical potential shifts preceding sensorimotor interactions. *Brain Res Bull*. 2005; 65 (4): 309-316.
- Babiloni, C., Ferri, R., Binetti, G., Cassarino, A., Dal Forno, G., Ercolani, M., . . . Rossini, P. M. Fronto-parietal coupling of brain rhythms in mild cognitive impairment: A multicentric eeg study. *Brain Res Bull*. 2006; 69 (1): 63-73.
- Babiloni, C., Frisoni, G., Steriade, M., Bresciani, L., Binetti, G., Del Percio, C., . . . Rossini, P. M. Frontal white matter volume and delta eeg sources negatively correlate in awake subjects with mild cognitive impairment and alzheimer's disease. *Clin Neurophysiol*. 2006; 117 (5): 1113-1129.

- Babiloni, C., Frisoni, G. B., Pievani, M., Toscano, L., Del Percio, C., Geroldi, C., . . . Rossini, P. M. White-matter vascular lesions correlate with alpha eeg sources in mild cognitive impairment. *Neuropsychologia*. 2008; 46 (6): 1707-1720.
- Babiloni, C., Frisoni, G. B., Pievani, M., Vecchio, F., Infarinato, F., Geroldi, C., . . . Rossini, P. M. White matter vascular lesions are related to parietal-to-frontal coupling of eeg rhythms in mild cognitive impairment. *Hum Brain Mapp*. 2008; 29 (12): 1355-1367.
- Babiloni, C., Lizio, R., Marzano, N., Capotosto, P., Soricelli, A., Triggiani, A. I., . . . Del Percio, C. Brain neural synchronization and functional coupling in alzheimer's disease as revealed by resting state eeg rhythms. *Int J Psychophysiol*. 2016; 103: 88-102.
- Balderas, I., Rodriguez-Ortiz, C. J., Salgado-Tonda, P., Chavez-Hurtado, J., McGaugh, J. L., & Bermudez-Rattoni, F. The consolidation of object and context recognition memory involve different regions of the temporal lobe. *Learn Mem*. 2008; 15 (9): 618-624.
- Banks, W. A., & Kastin, A. J. Differential permeability of the blood-brain barrier to two pancreatic peptides: Insulin and amylin. *Peptides*. 1998; 19 (5): 883-889.
- Banks, W. A., Kastin, A. J., Akerstrom, V., & Jaspan, J. B. Radioactively iodinated cyclo(his-pro) crosses the blood-brain barrier and reverses ethanol-induced narcosis. *Am J Physiol*. 1993; 264 (5 Pt 1): E723-729.
- Banks, W. A., Kastin, A. J., & Jaspan, J. B. Orally administered cyclo(his-pro) reduces ethanol-induced narcosis in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 1992; 43 (3): 939-941.
- Banks, W. A., Owen, J. B., & Erickson, M. A. Insulin in the brain: There and back again. *Pharmacol Ther*. 2012; 136 (1): 82-93.

- Banting, F. G., Best, C. H., Collip, J. B., Campbell, W. R., & Fletcher, A. A. Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. *Can Med Assoc J.* 1922; 12 (3): 141-146.
- Bao, F., Wicklund, L., Lacor, P. N., Klein, W. L., Nordberg, A., & Marutle, A. Different beta-amyloid oligomer assemblies in alzheimer brains correlate with age of disease onset and impaired cholinergic activity. *Neurobiol Aging.* 2012; 33 (4): 825 e821-813.
- Basar, E., Basar-Eroglu, C., Karakas, S., & Schurmann, M. Brain oscillations in perception and memory. *International Journal of Psychophysiology.* 2000; 35 (2-3): 95-124.
- Başar, E., Gön̈der, A., Ö̈zesmi, C. ve Urgan, P. Dynamics of brain rhythmic and evoked potentials i. Some computational methods for the analysis of electrical signals from the brain. *Biological Cybernetics.* 1975a; 20: 137–143.
- Başar, E., Gön̈der, A., Ö̈zesmi, C. ve Urgan, P. Dynamics of brain rhythmic and evoked potentials ii. Studies in the auditory pathway, reticular formation, and hippocampus during the waking stage. *Biological Cybernetics.* 1975b; 20: 145-160.
- Başar, E., Gön̈der, A., Ö̈zesmi, C. ve Urgan, P. Dynamics of brain rhythmic and evoked potentials iii. Studies in the auditory pathway, reticular formation, and hippocampus during sleep. *Biological Cybernetics.* 1975c; 20: 161-169.
- Bateman, R. J., Munsell, L. Y., Morris, J. C., Swarm, R., Yarasheski, K. E., & Holtzman, D. M. Human amyloid-beta synthesis and clearance rates as measured in cerebrospinal fluid in vivo. *Nat Med.* 2006; 12 (7): 856-861.
- Bayes-Genis, A., Barallat, J., & Richards, A. M. A test in context: Nprilysin: Function, inhibition, and biomarker. *J Am Coll Cardiol.* 2016; 68 (6): 639-653.
- Bedse, G., Di Domenico, F., Serviddio, G., & Cassano, T. Aberrant insulin signaling in alzheimer's disease: Current knowledge. *Front Neurosci.* 2015; 9: 204.

- Bennett, R. G., Duckworth, W. C., & Hamel, F. G. Degradation of amylin by insulin-degrading enzyme. *J Biol Chem.* 2000; 275 (47): 36621-36625.
- Berger, H. Über das elektrenkephalogramm des menschen i. Bericht. *Archiv Fuer Psychiatrie und Nervenkrankheiten.* 1929; 87: 527-570.
- Bermudez-Rattoni, F., Okuda, S., Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. Insular cortex is involved in consolidation of object recognition memory. *Learn Mem.* 2005; 12 (5): 447-449.
- Beyersmann, D., & Haase, H. Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *Biometals.* 2001; 14 (3-4): 331-341.
- Bierer, L. M., Hof, P. R., Purohit, D. P., Carlin, L., Schmeidler, J., Davis, K. L., & Perl, D. P. Neocortical neurofibrillary tangles correlate with dementia severity in alzheimer's disease. *Arch Neurol.* 1995; 52 (1): 81-88.
- Bitan, G., Kirkitadze, M. D., Lomakin, A., Vollers, S. S., Benedek, G. B., & Teplow, D. B. Amyloid beta -protein (abeta) assembly: Abeta 40 and abeta 42 oligomerize through distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100 (1): 330-335.
- Bitanhirwe, B. K., & Cunningham, M. G. Zinc: The brain's dark horse. *Synapse.* 2009; 63 (11): 1029-1049.
- Bjorklund, G., Dadar, M., Pivina, L., Dosa, M. D., Semenova, Y., & Aaseth, J. The role of zinc and copper in insulin resistance and diabetes mellitus. *Curr Med Chem.* 2020; 27 (39): 6643-6657.
- Bonjean, M., Baker, T., Bazhenov, M., Cash, S., Halgren, E., & Sejnowski, T. Interactions between core and matrix thalamocortical projections in human sleep spindle synchronization. *J Neurosci.* 2012; 32 (15): 5250-5263.
- Bosco, M. D., Mohanasundaram, D. M., Drogemuller, C. J., Lang, C. J., Zalewski, P. D., & Coates, P. T. Zinc and zinc transporter regulation in pancreatic islets and the

- potential role of zinc in islet transplantation. *Rev Diabet Stud.* 2010; 7 (4): 263-274.
- Boura-Halfon, S., & Zick, Y. Phosphorylation of irs proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009; 296 (4): E581-591.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-254.
- Brewer, G. J. Copper excess, zinc deficiency, and cognition loss in alzheimer's disease. *Biofactors.* 2012; 38 (2): 107-113.
- Brewer, G. J. Alzheimer's disease causation by copper toxicity and treatment with zinc. *Front Aging Neurosci.* 2014; 6: 92.
- Brunia, C. H. Neural aspects of anticipatory behavior. *Acta Psychol (Amst).* 1999; 101 (2-3): 213-242.
- Brunovsky, M., Matousek, M., Edman, A., Cervena, K., & Krajca, V. Objective assessment of the degree of dementia by means of eeg. *Neuropsychobiology.* 2003; 48 (1): 19-26.
- Bu, Z., Shi, Y., Callaway, D. J., & Tycko, R. Molecular alignment within beta-sheets in abeta(14-23) fibrils: Solid-state nmr experiments and theoretical predictions. *Biophys J.* 2007; 92 (2): 594-602.
- Bulloj, A., Leal, M. C., Xu, H., Castano, E. M., & Morelli, L. Insulin-degrading enzyme sorting in exosomes: A secretory pathway for a key brain amyloid-beta degrading protease. *J Alzheimers Dis.* 2010; 19 (1): 79-95.
- Burdick, D., Soreghan, B., Kwon, M., Kosmoski, J., Knauer, M., Henschen, A., Glabe, C. Assembly and aggregation properties of synthetic alzheimer's a4/beta amyloid peptide analogs. *J Biol Chem.* 1992; 267 (1): 546-554.

- Canas, P. M., Porciuncula, L. O., Cunha, G. M., Silva, C. G., Machado, N. J., Oliveira, J. M., . . . Cunha, R. A. Adenosine a2a receptor blockade prevents synaptotoxicity and memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci.* 2009; 29 (47): 14741-14751.
- Carson, J. A., & Turner, A. J. Beta-amyloid catabolism: Roles for neprilysin (nep) and other metallopeptidases? *J Neurochem.* 2002; 81 (1): 1-8.
- Caton, R. The electric currents of the brain. *British Medical Journal.* 1875; 2: 278.
- Chan, S. J., Keim, P., & Steiner, D. F. Cell-free synthesis of rat preproinsulins: Characterization and partial amino acid sequence determination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976; 73 (6): 1964-1968.
- Chen, X. Q., & Mobley, W. C. Alzheimer disease pathogenesis: Insights from molecular and cellular biology studies of oligomeric abeta and tau species. *Front Neurosci.* 2019; 13: 659.
- Chow, V. W., Mattson, M. P., Wong, P. C., & Gleichmann, M. An overview of app processing enzymes and products. *Neuromolecular Med.* 2010; 12 (1): 1-12.
- Chun, W., & Johnson, G. V. The role of tau phosphorylation and cleavage in neuronal cell death. *Front Biosci.* 2007; 12: 733-756.
- Clarke, D. W., Mudd, L., Boyd, F. T., Fields, M., & Raizada, M. K. Insulin is released from rat-brain neuronal cells in culture. *Journal of Neurochemistry.* 1986; 47 (3): 831-836.
- Clarke, J. R., Lyra, E. S. N. M., Figueiredo, C. P., Frozza, R. L., Ledo, J. H., Beckman, D., De Felice, F. G. Alzheimer-associated abeta oligomers impact the central nervous system to induce peripheral metabolic deregulation. *EMBO Mol Med.* 2015; 7 (2): 190-210.

- Cleary, J. P., Walsh, D. M., Hofmeister, J. J., Shankar, G. M., Kuskowski, M. A., Selkoe, D. J., & Ashe, K. H. Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci.* 2005; 8 (1): 79-84.
- Cline, E. N., Bicca, M. A., Viola, K. L., & Klein, W. L. The amyloid-beta oligomer hypothesis: Beginning of the third decade. *J Alzheimers Dis.* 2018; 64 (s1): S567-S610.
- Contreras, D., & Steriade, M. Spindle oscillation in cats: The role of corticothalamic feedback in a thalamically generated rhythm. *J Physiol.* 1996; 490 (Pt 1): 159-179.
- Cook, D. G., Leverenz, J. B., McMillan, P. J., Kulstad, J. J., Ericksen, S., Roth, R. A., Craft, S. Reduced hippocampal insulin-degrading enzyme in late-onset alzheimer's disease is associated with the apolipoprotein e-epsilon4 allele. *Am J Pathol.* 2003a; 162 (1): 313-319.
- Cook, D. G., Leverenz, J. B., McMillan, P. J., Kulstad, J. J., Ericksen, S., Roth, R. A., Craft, S. Reduced hippocampal insulin-degrading enzyme in late-onset alzheimer's disease is associated with the apolipoprotein e-epsilon 4 allele. *American Journal of Pathology.* 2003b; 162 (1): 313-319.
- Copps, K. D., & White, M. F. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins irs1 and irs2. *Diabetologia.* 2012; 55 (10): 2565-2582.
- Craft, S., Newcomer, J., Kanne, S., Dagogo-Jack, S., Cryer, P., Sheline, Y., Alderson, A. Memory improvement following induced hyperinsulinemia in alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 1996; 17 (1): 123-130.
- Czech, M. P., Klarlund, J. K., Yagaloff, K. A., Bradford, A. P., & Lewis, R. E. Insulin receptor signaling. Activation of multiple serine kinases. *J Biol Chem.* 1988; 263 (23): 11017-11020.

- De Felice, F. G., Lourenco, M. V., & Ferreira, S. T. How does brain insulin resistance develop in alzheimer's disease? *Alzheimers Dement.* 2014; 10 (1 Suppl): S26-32.
- De Felice, F. G., Vieira, M. N., Bomfim, T. R., Decker, H., Velasco, P. T., Lambert, M. P., Klein, W. L. Protection of synapses against alzheimer's-linked toxins: Insulin signaling prevents the pathogenic binding of abeta oligomers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009a; 106 (6): 1971-1976.
- De Felice, F. G., Vieira, M. N. N., Bomfim, T. R., Decker, H., Velasco, P. T., Lambert, M. P., . . . Klein, W. L. Protection of synapses against alzheimer's-linked toxins: Insulin signaling prevents the pathogenic binding of a beta oligomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2009b; 106 (6): 1971-1976.
- de la Monte, S. M. Type 3 diabetes is sporadic alzheimers disease: Mini-review. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2014; 24 (12): 1954-1960.
- de la Monte, S. M., & Wands, J. R. Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: Relevance to alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2005; 7 (1): 45-61.
- Duckworth, W. C., Bennett, R. G., & Hamel, F. G. Insulin acts intracellularly on proteasomes through insulin-degrading enzyme. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 244 (2): 390-394.
- Duncan, W. C., Jr., Ballard, E. D., & Zarate, C. A. Ketamine-induced glutamatergic mechanisms of sleep and wakefulness: Insights for developing novel treatments for disturbed sleep and mood. *Handb Exp Pharmacol.* 2019; 253: 337-358.
- Elbert, D. L., Patterson, B. W., & Bateman, R. J. Analysis of a compartmental model of amyloid beta production, irreversible loss and exchange in humans. *Math Biosci.* 2015; 261: 48-61.

- Erten-Lyons, D., Woltjer, R. L., Dodge, H., Nixon, R., Vorobik, R., Calvert, J. F., Kaye, J. Factors associated with resistance to dementia despite high alzheimer disease pathology. *Neurology*. 2009; 72 (4): 354-360.
- Ezaki, O. Iib group metal ions (zn^{2+} , cd^{2+} , hg^{2+}) stimulate glucose transport activity by post-insulin receptor kinase mechanism in rat adipocytes. *J Biol Chem*. 1989; 264 (27): 16118-16122.
- Farris, W., Mansourian, S., Chang, Y., Lindsley, L., Eckman, E. A., Frosch, M. P., Guenette, S. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100 (7): 4162-4167.
- Ferreira, S. T., & Klein, W. L. The abeta oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in alzheimer's disease. *Neurobiol Learn Mem*. 2011; 96 (4): 529-543.
- Ferreira, S. T., Vieira, M. N., & De Felice, F. G. Soluble protein oligomers as emerging toxins in alzheimer's and other amyloid diseases. *IUBMB Life*. 2007; 59 (4-5): 332-345.
- Frank, H. J. L., & Pardridge, W. M. A direct invitro demonstration of insulin binding to isolated brain micro-vessels. *Diabetes*. 1981; 30 (9): 757-761.
- Frederickson, C. J., Koh, J. Y., & Bush, A. I. The neurobiology of zinc in health and disease. *Nat Rev Neurosci*. 2005; 6 (6): 449-462.
- Freeman, W. J. Mass action in the nervous system: New York: Academic Press.; 1975, p:
- Frost, J. D., Jr., Carrie, J. R., Borda, R. P., & Kellaway, P. The effects of dalmane (flurazepam hydrochloride) on human eeg characteristics. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1973; 34 (2): 171-175.
- Gais, S., Molle, M., Helms, K., & Born, J. Learning-dependent increases in sleep spindle density. *J Neurosci*. 2002; 22 (15): 6830-6834.

- Gaither, L. A., & Eide, D. J. Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *Biometals*. 2001; 14 (3-4): 251-270.
- Galagovsky, D., Katz, M. J., Acevedo, J. M., Sorianoello, E., Glavic, A., & Wappner, P. The drosophila insulin-degrading enzyme restricts growth by modulating the pi3k pathway in a cell-autonomous manner. *Mol Biol Cell*. 2014; 25 (6): 916-924.
- Gao, Y., Zhang, M., Wu, T., Xu, M., Cai, H., & Zhang, Z. Effects of d-pinitol on insulin resistance through the pi3k/akt signaling pathway in type 2 diabetes mellitus rats. *J Agric Food Chem*. 2015; 63 (26): 6019-6026.
- Ghosh-Dastidar, S., Adeli, H., & Dadmehr, N. Principal component analysis-enhanced cosine radial basis function neural network for robust epilepsy and seizure detection. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2008; 55 (2 Pt 1): 512-518.
- Giannakopoulos, P., Herrmann, F. R., Bussiere, T., Bouras, C., Kovari, E., Perl, D. P., Hof, P. R. Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in alzheimer's disease. *Neurology*. 2003; 60 (9): 1495-1500.
- Glabe, C. G. Common mechanisms of amyloid oligomer pathogenesis in degenerative disease. *Neurobiol Aging*. 2006; 27 (4): 570-575.
- Glabe, C. G. Structural classification of toxic amyloid oligomers. *J Biol Chem*. 2008; 283 (44): 29639-29643.
- Goedert, M., Spillantini, M. G., & Crowther, R. A. Tau proteins and neurofibrillary degeneration. *Brain Pathol*. 1991; 1 (4): 279-286.
- Goedert, M., Spillantini, M. G., Jakes, R., Rutherford, D., & Crowther, R. A. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: Sequences and localization in neurofibrillary tangles of alzheimer's disease. *Neuron*. 1989; 3 (4): 519-526.
- Goldfine, I. D., Williams, J. A., Bailey, A. C., Wong, K. Y., Iwamoto, Y., Yokono, K., Roth, R. A. Degradation of insulin by isolated mouse pancreatic acini. Evidence for cell surface protease activity. *Diabetes*. 1984; 33 (1): 64-72.

- Gomez-Isla, T., Hollister, R., West, H., Mui, S., Growdon, J. H., Petersen, R. C., Hyman, B. T. Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 1997; 41 (1): 17-24.
- Gong, Y., Chang, L., Viola, K. L., Lacor, P. N., Lambert, M. P., Finch, C. E., Klein, W. L. Alzheimer's disease-affected brain: Presence of oligomeric a beta ligands (addls) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100 (18): 10417-10422.
- Goure, W. F., Krafft, G. A., Jerecic, J., & Hefti, F. Targeting the proper amyloid-beta neuronal toxins: A path forward for alzheimer's disease immunotherapeutics. *Alzheimers Res Ther.* 2014; 6 (4): 42.
- Grottelli, S., Ferrari, I., Pietrini, G., Peirce, M. J., Minelli, A., & Bellezza, I. The role of cyclo(his-pro) in neurodegeneration. *Int J Mol Sci.* 2016; 17 (8).
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M., & Binder, L. I. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986; 83 (13): 4913-4917.
- Gual, P., Le Marchand-Brustel, Y., & Tanti, J. F. Positive and negative regulation of insulin signaling through irs-1 phosphorylation. *Biochimie.* 2005; 87 (1): 99-109.
- Haass, C., & Selkoe, D. J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: Lessons from the alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8 (2): 101-112.
- Haettig, J., Stefanko, D. P., Multani, M. L., Figueroa, D. X., McQuown, S. C., & Wood, M. A. Hdac inhibition modulates hippocampus-dependent long-term memory for object location in a cbp-dependent manner. *Learn Mem.* 2011; 18 (2): 71-79.
- Hafez, D., Huang, J. Y., Huynh, A. M., Valtierra, S., Rockenstein, E., Bruno, A. M., Marr, R. A. Nephrilysin-2 is an important beta-amyloid degrading enzyme. *Am J Pathol.* 2011; 178 (1): 306-312.

- Hambidge, K. M., & Krebs, N. F. Zinc deficiency: A special challenge. *J Nutr.* 2007; 137 (4): 1101-1105.
- Hamel, F. G., Mahoney, M. J., & Duckworth, W. C. Degradation of intraendosomal insulin by insulin-degrading enzyme without acidification. *Diabetes.* 1991; 40 (4): 436-443.
- Hamze, R., Delangre, E., Tolu, S., Moreau, M., Janel, N., Bailbe, D., & Movassat, J. Type 2 diabetes mellitus and alzheimer's disease: Shared molecular mechanisms and potential common therapeutic targets. *Int J Mol Sci.* 2022; 23 (23).
- Han, J. B., Li, E. W., Chen, L. Q., Zhang, Y. Y., Wei, F. C., Liu, J. Y., Wang, Y. G. The creb coactivator *crtc2* controls hepatic lipid metabolism by regulating *srebp1*. *Nature.* 2015; 524 (7564): 243-+.
- Hardy, J., & Selkoe, D. J. The amyloid hypothesis of alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 2002; 297 (5580): 353-356.
- Hardy, J. A., & Higgins, G. A. Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis. *Science.* 1992; 256 (5054): 184-185.
- Hartley, D. M., Zhao, C., Speier, A. C., Woodard, G. A., Li, S., Li, Z., & Walz, T. Transglutaminase induces protofibril-like amyloid beta-protein assemblies that are protease-resistant and inhibit long-term potentiation. *J Biol Chem.* 2008; 283 (24): 16790-16800.
- Havrankova, J., Schmechel, D., Roth, J., & Brownstein, M. Identification of insulin in rat-brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1978; 75 (11): 5737-5741.
- Henquin, J. C. Regulation of insulin secretion: A matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia.* 2009; 52 (5): 739-751.

- Hill, J. M., Lesniak, M. A., Pert, C. B., & Roth, J. Autoradiographic localization of insulin-receptors in rat-brain - prominence in olfactory and limbic areas. *Neuroscience*. 1986; 17 (4): 1127-1138.
- Hilton, C. W., Prasad, C., Vo, P., & Mouton, C. Food contains the bioactive peptide, cyclo(his-pro). *J Clin Endocrinol Metab*. 1992; 75 (2): 375-378.
- Ho, L., Qin, W., Pompl, P. N., Xiang, Z., Wang, J., Zhao, Z., Pasinetti, G. M. Diet-induced insulin resistance promotes amyloidosis in a transgenic mouse model of alzheimer's disease. *FASEB J*. 2004; 18 (7): 902-904.
- Holton, C. M., Hanley, N., Shanks, E., Oxley, P., McCarthy, A., Eastwood, B. J., Wafford, K. A. Longitudinal changes in eeg power, sleep cycles and behaviour in a tau model of neurodegeneration. *Alzheimers Res Ther*. 2020; 12 (1): 84.
- Hong, M., & Lee, V. M. Insulin and insulin-like growth factor-1 regulate tau phosphorylation in cultured human neurons. *J Biol Chem*. 1997; 272 (31): 19547-19553.
- Horsch, D., & Kahn, C. R. Region-specific mrna expression of phosphatidylinositol 3-kinase regulatory isoforms in the central nervous system of c57bl/6j mice. *Journal of Comparative Neurology*. 1999; 415 (1): 105-120.
- Hotamisligil, G. S., Peraldi, P., Budavari, A., Ellis, R., White, M. F., & Spiegelman, B. M. Irs-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in tnf- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science*. 1996; 271 (5249): 665-668.
- Howell, S., Nalbantoglu, J., & Crine, P. Neutral endopeptidase can hydrolyze beta-amyloid(1-40) but shows no effect on beta-amyloid precursor protein metabolism. *Peptides*. 1995; 16 (4): 647-652.
- Hulse, R. E., Ralat, L. A., & Wei-Jen, T. Structure, function, and regulation of insulin-degrading enzyme. *Vitam Horm*. 2009; 80: 635-648.

- Hwang, I. K., Go, V. L., Harris, D. M., Yip, I., Kang, K. W., & Song, M. K. Effects of cyclo (his-pro) plus zinc on glucose metabolism in genetically diabetic obese mice. *Diabetes Obes Metab.* 2003; 5 (5): 317-324.
- Ilouz, R., Kaidanovich, O., Gurwitz, D., & Eldar-Finkelman, H. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 β by bivalent zinc ions: Insight into the insulin-mimetic action of zinc. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 295 (1): 102-106.
- Iqbal, K., Alonso Adel, C., Chen, S., Chohan, M. O., El-Akkad, E., Gong, C. X., Grundke-Iqbal, I. Tau pathology in alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1739 (2-3): 198-210.
- Iwata, N., Higuchi, M., & Saido, T. C. Metabolism of amyloid-beta peptide and alzheimer's disease. *Pharmacol Ther.* 2005; 108 (2): 129-148.
- James, D., Kang, S., & Park, S. Injection of beta-amyloid into the hippocampus induces metabolic disturbances and involuntary weight loss which may be early indicators of alzheimer's disease. *Aging Clin Exp Res.* 2014; 26 (1): 93-98.
- Jansen, J., Karges, W., & Rink, L. Zinc and diabetes--clinical links and molecular mechanisms. *J Nutr Biochem.* 2009; 20 (6): 399-417.
- Jarrett, J. T., Berger, E. P., & Lansbury, P. T., Jr. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: Implications for the pathogenesis of alzheimer's disease. *Biochemistry.* 1993; 32 (18): 4693-4697.
- Jaspan, J. B., Banks, W. A., & Kastin, A. J. Study of passage of peptides across the blood-brain barrier: Biological effects of cyclo(his-pro) after intravenous and oral administration. *Ann N Y Acad Sci.* 1994; 739: 101-107.
- Jasper, H. H. The ten–twenty electrode system of the international federation. *Electroencephalogr. Clinical Neurophysiology.* 1958; 10: 371–375.
- Jha, N. K., Jha, S. K., Kumar, D., Kejriwal, N., Sharma, R., Ambasta, R. K., & Kumar, P. Impact of insulin degrading enzyme and neprilysin in alzheimer's disease biology:

- Characterization of putative cognates for therapeutic applications. *J Alzheimers Dis.* 2015; 48 (4): 891-917.
- Ji, X., & Liu, J. Associations between blood zinc concentrations and sleep quality in childhood: A cohort study. *Nutrients.* 2015; 7 (7): 5684-5696.
- Jimenez-Jimenez, F. J., Molina, J. A., Aguilar, M. V., Meseguer, I., Mateos-Vega, C. J., Gonzalez-Munoz, M. J., Martinez-Para, M. C. Cerebrospinal fluid levels of transition metals in patients with parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna).* 1998; 105 (4-5): 497-505.
- Joje, R. S., Yuskaitis, C. J., & Beurel, E. Glycogen synthase kinase-3 (gsk3): Inflammation, diseases, and therapeutics. *Neurochem Res.* 2007; 32 (4-5): 577-595.
- Kabir, M. T., Uddin, M. S., Zaman, S., Begum, Y., Ashraf, G. M., Bin-Jumah, M. N., Abdel-Daim, M. M. Molecular mechanisms of metal toxicity in the pathogenesis of alzheimer's disease. *Mol Neurobiol.* 2021; 58 (1): 1-20.
- Kayed, R., & Lasagna-Reeves, C. A. Molecular mechanisms of amyloid oligomers toxicity. *J Alzheimers Dis.* 2013; 33 Suppl 1: S67-78.
- Kelly, K. L., & Ruderman, N. B. Insulin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase. Association with a 185-kda tyrosine-phosphorylated protein (irs-1) and localization in a low density membrane vesicle. *J Biol Chem.* 1993; 268 (6): 4391-4398.
- Kim, D. H., Choi, S. M., Jho, J., Park, M. S., Kang, J., Park, S. J., Kim, B. C. Infliximab ameliorates ad-associated object recognition memory impairment. *Behav Brain Res.* 2016; 311: 384-391.
- Kim, M., Hersh, L. B., Leissring, M. A., Ingelsson, M., Matsui, T., Farris, W., Tanzi, R. E. Decreased catalytic activity of the insulin-degrading enzyme in chromosome 10-linked alzheimer disease families. *J Biol Chem.* 2007; 282 (11): 7825-7832.

- Klein, W. L. Synaptotoxic amyloid-beta oligomers: A molecular basis for the cause, diagnosis, and treatment of alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis.* 2013; 33 Suppl 1: S49-65.
- Kleinridders, A., Ferris, H. A., Cai, W., & Kahn, C. R. Insulin action in brain regulates systemic metabolism and brain function. *Diabetes.* 2014; 63 (7): 2232-2243.
- Klimesch, W. Eeg alpha and theta oscillations reflect cognitive and memory performance: A review and analysis. *Brain Res Brain Res Rev.* 1999; 29 (2-3): 169-195.
- Kosik, K. S., Joachim, C. L., & Selkoe, D. J. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986; 83 (11): 4044-4048.
- Krafft, G. A., & Klein, W. L. Addls and the signaling web that leads to alzheimer's disease. *Neuropharmacology.* 2010; 59 (4-5): 230-242.
- Kshirsagar, V., Thingore, C., & Juvekar, A. Insulin resistance: A connecting link between alzheimer's disease and metabolic disorder. *Metab Brain Dis.* 2021; 36 (1): 67-83.
- Kurochkin, I. V. Insulin-degrading enzyme: Embarking on amyloid destruction. *Trends Biochem Sci.* 2001; 26 (7): 421-425.
- Kurochkin, I. V., & Goto, S. Alzheimer's beta-amyloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme. *FEBS Lett.* 1994; 345 (1): 33-37.
- Lacor, P. N., Buniel, M. C., Chang, L., Fernandez, S. J., Gong, Y., Viola, K. L., Klein, W. L. Synaptic targeting by alzheimer's-related amyloid beta oligomers. *J Neurosci.* 2004; 24 (45): 10191-10200.
- Lacor, P. N., Buniel, M. C., Furlow, P. W., Clemente, A. S., Velasco, P. T., Wood, M., Klein, W. L. Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2007; 27 (4): 796-807.

- Ladenbauer, J., Ladenbauer, J., Kulzow, N., de Boor, R., Avramova, E., Grittner, U., & Floel, A. Promoting sleep oscillations and their functional coupling by transcranial stimulation enhances memory consolidation in mild cognitive impairment. *J Neurosci.* 2017; 37 (30): 7111-7124.
- Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Klein, W. L. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95 (11): 6448-6453.
- Lane, R. F., Shineman, D. W., Steele, J. W., Lee, L. B., & Fillit, H. M. Beyond amyloid: The future of therapeutics for alzheimer's disease. *Adv Pharmacol.* 2012; 64: 213-271.
- Larson, M., Sherman, M. A., Amar, F., Nuvolone, M., Schneider, J. A., Bennett, D. A., . . . Lesne, S. E. The complex prp(c)-fyn couples human oligomeric abeta with pathological tau changes in alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2012; 32 (47): 16857-16871a.
- Lauretti, E., Dincer, O., & Pratico, D. Glycogen synthase kinase-3 signaling in alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2020; 1867 (5): 118664.
- Lazarewicz, M. T., Ehrlichman, R. S., Maxwell, C. R., Gandal, M. J., Finkel, L. H., & Siegel, S. J. Ketamine modulates theta and gamma oscillations. *J Cogn Neurosci.* 2010; 22 (7): 1452-1464.
- Lee, Y. F., Gerashchenko, D., Timofeev, I., Bacsikai, B. J., & Kastanenka, K. V. Slow wave sleep is a promising intervention target for alzheimer's disease. *Front Neurosci.* 2020; 14: 705.
- Leroy, K., & Brion, J. P. Developmental expression and localization of glycogen synthase kinase-3 beta in rat brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy.* 1999; 16 (4): 279-293.

- Lesne, S., Koh, M. T., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C. G., Yang, A., Ashe, K. H. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature*. 2006; 440 (7082): 352-357.
- Li, X., Song, D., & Leng, S. X. Link between type 2 diabetes and alzheimer's disease: From epidemiology to mechanism and treatment. *Clin Interv Aging*. 2015; 10: 549-560.
- Lifshitz, V., Benromano, T., Weiss, R., Blanga-Kanfi, S., & Frenkel, D. Insulin-degrading enzyme deficiency accelerates cerebrovascular amyloidosis in an animal model. *Brain Behav Immun*. 2013; 30: 143-149.
- Ling, X., Martins, R. N., Racchi, M., Craft, S., & Helmerhorst, E. Amyloid beta antagonizes insulin promoted secretion of the amyloid beta protein precursor. *J Alzheimers Dis*. 2002; 4 (5): 369-374.
- Lomedico, P. T., Chan, S. J., Steiner, D. F., & Saunders, G. F. Immunological and chemical characterization of bovine preproinsulin. *J Biol Chem*. 1977; 252 (22): 7971-7978.
- Lubag, A. J., De Leon-Rodriguez, L. M., Burgess, S. C., & Sherry, A. D. Noninvasive mri of beta-cell function using a zn²⁺-responsive contrast agent. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108 (45): 18400-18405.
- Lucey, B. P., McCullough, A., Landsness, E. C., Toedebusch, C. D., McLeland, J. S., Zaza, A. M., . . . Holtzman, D. M. Reduced non-rapid eye movement sleep is associated with tau pathology in early alzheimer's disease. *Sci Transl Med*. 2019; 11 (474).
- Luck, S. J., Mathalon, D. H., O'Donnell, B. F., Hamalainen, M. S., Spencer, K. M., Javitt, D. C., & Uhlhaas, P. J. A roadmap for the development and validation of event-related potential biomarkers in schizophrenia research. *Biol Psychiatry*. 2011; 70 (1): 28-34.

- Lyra, E. S. N. M., Goncalves, R. A., Boehnke, S. E., Forny-Germano, L., Munoz, D. P., & De Felice, F. G. Understanding the link between insulin resistance and alzheimer's disease: Insights from animal models. *Exp Neurol*. 2019; 316: 1-11.
- Maezawa, I., Zimin, P. I., Wulff, H., & Jin, L. W. Amyloid-beta protein oligomer at low nanomolar concentrations activates microglia and induces microglial neurotoxicity. *J Biol Chem*. 2011; 286 (5): 3693-3706.
- Maher, P. A., & Schubert, D. R. Metabolic links between diabetes and alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother*. 2009; 9 (5): 617-630.
- Mander, B. A. Local sleep and alzheimer's disease pathophysiology. *Front Neurosci*. 2020; 14: 525970.
- Marr, R. A., & Hafez, D. M. Amyloid-beta and alzheimer's disease: The role of neprilysin-2 in amyloid-beta clearance. *Front Aging Neurosci*. 2014; 6: 187.
- Mawuenyega, K. G., Sigurdson, W., Ovod, V., Munsell, L., Kasten, T., Morris, J. C., Bateman, R. J. Decreased clearance of cns beta-amyloid in alzheimer's disease. *Science*. 2010; 330 (6012): 1774.
- Meramat, A., Rajab, N. F., Shahar, S., & Sharif, R. Cognitive impairment, genomic instability and trace elements. *J Nutr Health Aging*. 2015; 19 (1): 48-57.
- Miao, X., Sun, W., Fu, Y., Miao, L., & Cai, L. Zinc homeostasis in the metabolic syndrome and diabetes. *Front Med*. 2013; 7 (1): 31-52.
- Miller, R. Theory of the normal waking eeg: From single neurones to waveforms in the alpha, beta and gamma frequency ranges. *Int J Psychophysiol*. 2007; 64 (1): 18-23.
- Miners, J. S., Baig, S., Palmer, J., Palmer, L. E., Kehoe, P. G., & Love, S. Abeta-degrading enzymes in alzheimer's disease. *Brain Pathol*. 2008; 18 (2): 240-252.

- Miners, J. S., Van Helmond, Z., Chalmers, K., Wilcock, G., Love, S., & Kehoe, P. G. Decreased expression and activity of neprilysin in alzheimer disease are associated with cerebral amyloid angiopathy. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006; 65 (10): 1012-1021.
- Mittal, K., & Katare, D. P. Shared links between type 2 diabetes mellitus and alzheimer's disease: A review. *Diabetes Metab Syndr*. 2016; 10 (2 Suppl 1): S144-149.
- Miyauchi, T., Hagimoto, H., Ishii, M., Endo, S., Tanaka, K., Kajiwar, S., Kosaka, K. Quantitative eeg in patients with presenile and senile dementia of the alzheimer type. *Acta Neurol Scand*. 1994; 89 (1): 56-64.
- Mizuma, T., Koyanagi, A., & Awazu, S. Intestinal transport and metabolism of analgesic dipeptide, kyotorphin: Rate-limiting factor in intestinal absorption of peptide as drug. *Biochim Biophys Acta*. 1997; 1335 (1-2): 111-119.
- Moloney, A. M., Griffin, R. J., Timmons, S., O'Connor, R., Ravid, R., & O'Neill, C. Defects in igf-1 receptor, insulin receptor and irs-1/2 in alzheimer's disease indicate possible resistance to igf-1 and insulin signalling. *Neurobiol Aging*. 2010; 31 (2): 224-243.
- Montoliu-Gaya, L., & Villegas, S. Abeta-immunotherapeutic strategies: A wide range of approaches for alzheimer's disease treatment. *Expert Rev Mol Med*. 2016; 18: e13.
- Morales-Corraliza, J., Wong, H., Mazzella, M. J., Che, S., Lee, S. H., Petkova, E., Mathews, P. M. Brain-wide insulin resistance, tau phosphorylation changes, and hippocampal neprilysin and amyloid-beta alterations in a monkey model of type 1 diabetes. *J Neurosci*. 2016; 36 (15): 4248-4258.
- Moreira, P., Pereira, C., Santos, M. S., & Oliveira, C. Effect of zinc ions on the cytotoxicity induced by the amyloid beta-peptide. *Antioxid Redox Signal*. 2000; 2 (2): 317-325.
- Moss, A. M., Unger, J. W., Moxley, R. T., & Livingston, J. N. Location of phosphotyrosine-containing proteins by immunocytochemistry in the rat forebrain

- corresponds to the distribution of the insulin-receptor. *P Natl Acad Sci USA*. 1990; 87 (12): 4453-4457.
- Mroczko, B., Groblewska, M., Litman-Zawadzka, A., Kornhuber, J., & Lewczuk, P. Amyloid beta oligomers (abetaos) in alzheimer's disease. *J Neural Transm* (Vienna). 2018; 125 (2): 177-191.
- Mucke, L. Neuroscience: Alzheimer's disease. *Nature*. 2009; 461 (7266): 895-897.
- Mullins, R. J., Diehl, T. C., Chia, C. W., & Kapogiannis, D. Insulin resistance as a link between amyloid-beta and tau pathologies in alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci*. 2017; 9: 118.
- Mumby, D. G., Gaskin, S., Glenn, M. J., Schramek, T. E., & Lehmann, H. Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: Memory for objects, places, and contexts. *Learn Mem*. 2002; 9 (2): 49-57.
- Nakabeppu, Y. Origins of brain insulin and its function. *Adv Exp Med Biol*. 2019; 1128: 1-11.
- Nakashima, A. S., & Dyck, R. H. Zinc and cortical plasticity. *Brain Res Rev*. 2009; 59 (2): 347-373.
- Nalivaeva, N. N., Beckett, C., Belyaev, N. D., & Turner, A. J. Are amyloid-degrading enzymes viable therapeutic targets in alzheimer's disease? *J Neurochem*. 2012; 120 Suppl 1: 167-185.
- Nalivaeva, N. N., Belyaev, N. D., Zhuravin, I. A., & Turner, A. J. The alzheimer's amyloid-degrading peptidase, neprilysin: Can we control it? *Int J Alzheimers Dis*. 2012; 2012: 383796.
- Nalivaeva, N. N., Fisk, L. R., Belyaev, N. D., & Turner, A. J. Amyloid-degrading enzymes as therapeutic targets in alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2008; 5 (2): 212-224.

- Nalivaeva, N. N., & Turner, A. J. Targeting amyloid clearance in alzheimer's disease as a therapeutic strategy. *Br J Pharmacol.* 2019; 176 (18): 3447-3463.
- Nilsson, P., Loganathan, K., Sekiguchi, M., Winblad, B., Iwata, N., Saido, T. C., & Tjernberg, L. O. Loss of neprilysin alters protein expression in the brain of alzheimer's disease model mice. *Proteomics.* 2015; 15 (19): 3349-3355.
- Nisbet, R. M., Polanco, J. C., Ittner, L. M., & Gotz, J. Tau aggregation and its interplay with amyloid-beta. *Acta Neuropathologica.* 2015; 129 (2): 207-220.
- Nishi, M., Sanke, T., Nagamatsu, S., Bell, G. I., & Steiner, D. F. Islet amyloid polypeptide. A new beta cell secretory product related to islet amyloid deposits. *J Biol Chem.* 1990; 265 (8): 4173-4176.
- Nygaard, S. B., Larsen, A., Knuhtsen, A., Rungby, J., & Smidt, K. Effects of zinc supplementation and zinc chelation on in vitro beta-cell function in ins-1e cells. *BMC Res Notes.* 2014; 7: 84.
- Pacheco-Quinto, J., Eckman, C. B., & Eckman, E. A. Major amyloid-beta-degrading enzymes, endothelin-converting enzyme-2 and neprilysin, are expressed by distinct populations of gabaergic interneurons in hippocampus and neocortex. *Neurobiol Aging.* 2016; 48: 83-92.
- Pardridge, W. M., Eisenberg, J., & Yang, J. Human blood-brain-barrier insulin-receptor. *Journal of Neurochemistry.* 1985; 44 (6): 1771-1778.
- Patzelt, C., Labrecque, A. D., Duguid, J. R., Carroll, R. J., Keim, P. S., Heinrikson, R. L., & Steiner, D. F. Detection and kinetic behavior of preproinsulin in pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978; 75 (3): 1260-1264.
- Paxinos G, W. C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th Edition/Ed. Academic Press, Elsevier, Amsterdam ; Boston. 2007.

- Paz, K., Liu, Y. F., Shorer, H., Hemi, R., LeRoith, D., Quan, M., Zick, Y. Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (irs-1) by protein kinase b positively regulates irs-1 function. *J Biol Chem.* 1999; 274 (40): 28816-28822.
- Perez, A., Morelli, L., Cresto, J. C., & Castano, E. M. Degradation of soluble amyloid beta-peptides 1-40, 1-42, and the dutch variant 1-40q by insulin degrading enzyme from alzheimer disease and control brains. *Neurochemical Research.* 2000; 25 (2): 247-255.
- Petersen, R. C., Aisen, P., Boeve, B. F., Geda, Y. E., Ivnik, R. J., Knopman, D. S., Jack, C. R., Jr. Mild cognitive impairment due to alzheimer disease in the community. *Ann Neurol.* 2013; 74 (2): 199-208.
- Pfurtscheller, G., & Lopes da Silva, F. H. Event-related eeg/meg synchronization and desynchronization: Basic principles. *Clin Neurophysiol.* 1999; 110 (11): 1842-1857.
- Pitt, J., Wilcox, K. C., Tortelli, V., Diniz, L. P., Oliveira, M. S., Dobbins, C., Klein, W. L. Neuroprotective astrocyte-derived insulin/insulin-like growth factor 1 stimulates endocytic processing and extracellular release of neuron-bound abeta oligomers. *Mol Biol Cell.* 2017; 28 (20): 2623-2636.
- Pivovarova, O., Hohn, A., Grune, T., Pfeiffer, A. F., & Rudovich, N. Insulin-degrading enzyme: New therapeutic target for diabetes and alzheimer's disease? *Ann Med.* 2016; 48 (8): 614-624.
- Portelius, E., Mattsson, N., Pannee, J., Zetterberg, H., Gisslen, M., Vanderstichele, H., Blennow, K. Ex vivo (18)o-labeling mass spectrometry identifies a peripheral amyloid beta clearance pathway. *Mol Neurodegener.* 2017; 12 (1): 18.
- Potter, C. J., Huang, H., & Xu, T. Drosophila tsc1 functions with tsc2 to antagonize insulin signaling in regulating cell growth, cell proliferation, and organ size. *Cell.* 2001; 105 (3): 357-368.

- Prakash, K. R., Tang, Y., Kozikowski, A. P., Flippen-Anderson, J. L., Knoblach, S. M., & Faden, A. I. Synthesis and biological activity of novel neuroprotective diketopiperazines. *Bioorg Med Chem.* 2002; 10 (9): 3043-3048.
- Prasad, A. S. Impact of the discovery of human zinc deficiency on health. *J Trace Elem Med Biol.* 2014; 28 (4): 357-363.
- Prasad, C. Bioactive cyclic dipeptides. *Peptides.* 1995; 16 (1): 151-164.
- Prasad, C. Limited proteolysis and physiological regulation: An example from thyrotropin-releasing hormone metabolism. *Thyroid.* 1998; 8 (10): 969-975.
- Qiu, W. Q., & Folstein, M. F. Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid-beta peptide in alzheimer's disease: Review and hypothesis. *Neurobiol Aging.* 2006; 27 (2): 190-198.
- Rivera, E. J., Goldin, A., Fulmer, N., Tavares, R., Wands, J. R., & de la Monte, S. M. Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of alzheimer's disease: Link to brain reductions in acetylcholine. *J Alzheimers Dis.* 2005; 8 (3): 247-268.
- Roberts, R. O., Knopman, D. S., Geda, Y. E., Cha, R. H., Pankratz, V. S., Baertlein, L., Petersen, R. C. Association of diabetes with amnestic and nonamnestic mild cognitive impairment. *Alzheimers Dement.* 2014; 10 (1): 18-26.
- Roosendaal, B., Hernandez, A., Cabrera, S. M., Hagewoud, R., Malvaez, M., Stefanko, D. P., Wood, M. A. Membrane-associated glucocorticoid activity is necessary for modulation of long-term memory via chromatin modification. *J Neurosci.* 2010; 30 (14): 5037-5046.
- Rosenthal, M. J., Hwang, I. K., & Song, M. K. Effects of arachidonic acid and cyclo (his-pro) on zinc transport across small intestine and muscle tissues. *Life Sci.* 2001; 70 (3): 337-348.

- Rozema, N. B., Procissi, D., Bertolino, N., Viola, K. L., Nandwana, V., Abdul, N., Weiss, C. Abeta oligomer induced cognitive impairment and evaluation of acu193-mns-based mri in rabbit. *Alzheimers Dement (N Y)*. 2020; 6 (1): e12087.
- Rui, L. Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol*. 2014; 4 (1): 177-197.
- Rulon, L. L., Robertson, J. D., Lovell, M. A., Deibel, M. A., Ehmann, W. D., & Markesber, W. R. Serum zinc levels and alzheimer's disease. *Biol Trace Elem Res*. 2000; 75 (1-3): 79-85.
- Ryu, J., Galan, A. K., Xin, X., Dong, F., Abdul-Ghani, M. A., Zhou, L., Dong, L. Q. Appl1 potentiates insulin sensitivity by facilitating the binding of irs1/2 to the insulin receptor. *Cell Rep*. 2014; 7 (4): 1227-1238.
- Saido, T., & Leissring, M. A. Proteolytic degradation of amyloid beta-protein. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; 2 (6): a006379.
- Saido, T. C., & Iwata, N. Metabolism of amyloid beta peptide and pathogenesis of alzheimer's disease. Towards presymptomatic diagnosis, prevention and therapy. *Neurosci Res*. 2006; 54 (4): 235-253.
- Saltiel, A. R., & Kahn, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001; 414 (6865): 799-806.
- Sano, H., Eguez, L., Teruel, M. N., Fukuda, M., Chuang, T. D., Chavez, J. A., McGraw, T. E. Rab10, a target of the as160 rab gap, is required for insulin-stimulated translocation of glut4 to the adipocyte plasma membrane. *Cell Metab*. 2007; 5 (4): 293-303.
- Sartorius, T., Peter, A., Heni, M., Maetzler, W., Fritsche, A., Haring, H. U., & Hennige, A. M. The brain response to peripheral insulin declines with age: A contribution of the blood-brain barrier? *PLoS One*. 2015; 10 (5): e0126804.
- Schoenfeld, H. A., West, T., Verghese, P. B., Holubasch, M., Shenoy, N., Kagan, D., Bateman, R. J. The effect of angiotensin receptor neprilysin inhibitor,

- sacubitril/valsartan, on central nervous system amyloid-beta concentrations and clearance in the cynomolgus monkey. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2017; 323: 53-65.
- Schuh, A. F., Rieder, C. M., Rizzi, L., Chaves, M., & Roriz-Cruz, M. Mechanisms of brain aging regulation by insulin: Implications for neurodegeneration in late-onset alzheimer's disease. *ISRN Neurol.* 2011; 2011: 306905.
- Selkoe, D. J. Resolving controversies on the path to alzheimer's therapeutics. *Nat Med.* 2011; 17 (9): 1060-1065.
- Seta, K. A., & Roth, R. A. Overexpression of insulin degrading enzyme: Cellular localization and effects on insulin signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 231 (1): 167-171.
- Shankar, G. M., Bloodgood, B. L., Townsend, M., Walsh, D. M., Selkoe, D. J., & Sabatini, B. L. Natural oligomers of the alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an nmda-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci.* 2007; 27 (11): 2866-2875.
- Shankar, G. M., Li, S., Mehta, T. H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N. E., Smith, I., Selkoe, D. J. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med.* 2008; 14 (8): 837-842.
- Sharma, H. S., Muresanu, D. F., Castellani, R. J., Nozari, A., Lafuente, J. V., Tian, Z. R., Sharma, A. Nanowired delivery of cerebrolysin with neprilysin and p-tau antibodies induces superior neuroprotection in alzheimer's disease. *Prog Brain Res.* 2019; 245: 145-200.
- Shirotani, K., Tsubuki, S., Iwata, N., Takaki, Y., Harigaya, W., Maruyama, K., Saido, T. C. Neprilysin degrades both amyloid beta peptides 1-40 and 1-42 most rapidly and efficiently among thiorphan- and phosphoramidon-sensitive endopeptidases. *J Biol Chem.* 2001; 276 (24): 21895-21901.

- Sikanyika, N. L., Parkington, H. C., Smith, A. I., & Kuruppu, S. Powering amyloid beta degrading enzymes: A possible therapy for alzheimer's disease. *Neurochem Res.* 2019; 44 (6): 1289-1296.
- Singh, T. J. Insulin receptor serine kinase activation by casein kinase 2 and a membrane tyrosine kinase. *Mol Cell Biochem.* 1993; 121 (2): 167-174.
- Sloane, J. A., Pietropaolo, M. F., Rosene, D. L., Moss, M. B., Peters, A., Kemper, T., & Abraham, C. R. Lack of correlation between plaque burden and cognition in the aged monkey. *Acta Neuropathol.* 1997; 94 (5): 471-478.
- Song, E. S., & Hersh, L. B. Insulysin: An allosteric enzyme as a target for alzheimer's disease. *J Mol Neurosci.* 2005; 25 (3): 201-206.
- Song, E. S., Jang, H., Guo, H. F., Juliano, M. A., Juliano, L., Morris, A. J., Hersh, L. B. Inositol phosphates and phosphoinositides activate insulin-degrading enzyme, while phosphoinositides also mediate binding to endosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017; 114 (14): E2826-E2835.
- Song, M. K., Bischoff, D. S., Song, A. M., Uyemura, K., & Yamaguchi, D. T. Metabolic relationship between diabetes and alzheimer's disease affected by cyclo(his-pro) plus zinc treatment. *BBA Clin.* 2017; 7: 41-54.
- Song, M. K., Hwang, I. K., Rosenthal, M. J., Harris, D. M., Yamaguchi, D. T., Yip, I., & Go, V. L. Anti-hyperglycemic activity of zinc plus cyclo (his-pro) in genetically diabetic goto-kakizaki and aged rats. *Exp Biol Med (Maywood).* 2003; 228 (11): 1338-1345.
- Song, M. K., Rosenthal, M. J., Hong, S., Harris, D. M., Hwang, I., Yip, I., Go, V. L. Synergistic antidiabetic activities of zinc, cyclo (his-pro), and arachidonic acid. *Metabolism.* 2001; 50 (1): 53-59.
- Song, M. K., Rosenthal, M. J., Naliboff, B. D., Phanumas, L., & Kang, K. W. Effects of bovine prostate powder on zinc, glucose, and insulin metabolism in old patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism.* 1998; 47 (1): 39-43.

- Song, M. K., Rosenthal, M. J., Song, A. M., Uyemura, K., Yang, H., Ament, M. E., Cornford, E. M. Body weight reduction in rats by oral treatment with zinc plus cyclo-(his-pro). *Br J Pharmacol*. 2009; 158 (2): 442-450.
- Song, M. K., Rosenthal, M. J., Song, A. M., Yang, H., Ao, Y., & Yamaguchi, D. T. Raw vegetable food containing high cyclo (his-pro) improved insulin sensitivity and body weight control. *Metabolism*. 2005; 54 (11): 1480-1489.
- Spencer, B., Rockenstein, E., Crews, L., Marr, R., & Masliah, E. Novel strategies for alzheimer's disease treatment. *Expert Opin Biol Ther*. 2007; 7 (12): 1853-1867.
- Stanley, M., Macauley, S. L., & Holtzman, D. M. Changes in insulin and insulin signaling in alzheimer's disease: Cause or consequence? *J Exp Med*. 2016; 213 (8): 1375-1385.
- Stargardt, A., Gillis, J., Kamphuis, W., Wiemhoefer, A., Kooijman, L., Raspe, M., Reits, E. Reduced amyloid-beta degradation in early alzheimer's disease but not in the appswepts1de9 and 3xtg-ad mouse models. *Aging Cell*. 2013; 12 (3): 499-507.
- Starks, E. J., Patrick O'Grady, J., Hoscheidt, S. M., Racine, A. M., Carlsson, C. M., Zetterberg, H., Bendlin, B. B. Insulin resistance is associated with higher cerebrospinal fluid tau levels in asymptomatic apoevarepsilon4 carriers. *J Alzheimers Dis*. 2015; 46 (2): 525-533.
- Steen, E., Terry, B. M., Rivera, E. J., Cannon, J. L., Neely, T. R., Tavares, R., de la Monte, S. M. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? *J Alzheimers Dis*. 2005; 7 (1): 63-80.
- Stefani, M. Biochemical and biophysical features of both oligomer/fibril and cell membrane in amyloid cytotoxicity. *FEBS J*. 2010; 277 (22): 4602-4613.
- Steriade, M., & Llinas, R. R. The functional states of the thalamus and the associated neuronal interplay. *Physiol Rev*. 1988; 68 (3): 649-742.

- Steriade, M., & Timofeev, I. Neuronal plasticity in thalamocortical networks during sleep and waking oscillations. *Neuron*. 2003; 37 (4): 563-576.
- Stoiljkovic, M., Kelley, C., Stutz, B., Horvath, T. L., & Hajos, M. Altered cortical and hippocampal excitability in tgf344-ad rats modeling alzheimer's disease pathology. *Cereb Cortex*. 2019; 29 (6): 2716-2727.
- Strobbe, G. Advanced forward models for eeg source imaging. Ghent University, 2015, Ghent, Belgium
- Sun, W., Yang, J., Wang, W., Hou, J., Cheng, Y., Fu, Y., Cai, L. The beneficial effects of zn on akt-mediated insulin and cell survival signaling pathways in diabetes. *J Trace Elem Med Biol*. 2018; 46: 117-127.
- Takano, K., Koarashi, K., Kawabe, K., Itakura, M., Nakajima, H., Moriyama, M., & Nakamura, Y. Insulin expression in cultured astrocytes and the decrease by amyloid beta. *Neurochem Int*. 2018; 119: 171-177.
- Tamano, H., Minamino, T., Fujii, H., Takada, S., Nakamura, M., Ando, M., & Takeda, A. Blockade of intracellular zn²⁺ signaling in the dentate gyrus erases recognition memory via impairment of maintained ltp. *Hippocampus*. 2015; 25 (8): 952-962.
- Tanokashira, D., Fukuokaya, W., & Taguchi, A. Involvement of insulin receptor substrates in cognitive impairment and alzheimer's disease. *Neural Regen Res*. 2019; 14 (8): 1330-1334.
- Tanti, J. F., Gremeaux, T., van Obberghen, E., & Le Marchand-Brustel, Y. Serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 modulates insulin receptor signaling. *J Biol Chem*. 1994; 269 (8): 6051-6057.
- Terry, R. D., Masliah, E., Salmon, D. P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Katzman, R. Physical basis of cognitive alterations in alzheimer's disease: Synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol*. 1991; 30 (4): 572-580.

- Thinakaran, G., & Koo, E. H. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem*. 2008; 283 (44): 29615-29619.
- Tjernberg, L. O., Callaway, D. J., Tjernberg, A., Hahne, S., Lilliehook, C., Terenius, L., Nordstedt, C. A molecular model of alzheimer amyloid beta-peptide fibril formation. *J Biol Chem*. 1999; 274 (18): 12619-12625.
- Tumminia, A., Vinciguerra, F., Parisi, M., & Frittitta, L. Type 2 diabetes mellitus and alzheimer's disease: Role of insulin signalling and therapeutic implications. *Int J Mol Sci*. 2018; 19 (11).
- Tundo, G. R., Sbardella, D., Ciaccio, C., Grasso, G., Gioia, M., Coletta, A., Coletta, M. Multiple functions of insulin-degrading enzyme: A metabolic crosslight? *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2017; 52 (5): 554-582.
- Tyszka-Czochara, M., Grzywacz, A., Gdula-Argasinska, J., Librowski, T., Wilinski, B., & Opoka, W. The role of zinc in the pathogenesis and treatment of central nervous system (cns) diseases. Implications of zinc homeostasis for proper cns function. *Acta Pol Pharm*. 2014; 71 (3): 369-377.
- Unal, G., Apergis-Schoute, J., & Pare, D. Associative properties of the perirhinal network. *Cereb Cortex*. 2012; 22 (6): 1318-1332.
- Unal, G., Pare, J. F., Smith, Y., & Pare, D. Differential connectivity of short- vs. Long-range extrinsic and intrinsic cortical inputs to perirhinal neurons. *J Comp Neurol*. 2013; 521 (11): 2538-2550.
- Vekrellis, K., Ye, Z., Qiu, W. Q., Walsh, D., Hartley, D., Chesneau, V., Selkoe, D. J. Neurons regulate extracellular levels of amyloid beta-protein via proteolysis by insulin-degrading enzyme. *J Neurosci*. 2000; 20 (5): 1657-1665.
- Velazquez, R., Tran, A., Ishimwe, E., Denner, L., Dave, N., Oddo, S., & Dineley, K. T. Central insulin dysregulation and energy dyshomeostasis in two mouse models of alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2017; 58: 1-13.

- Viola, K. L., & Klein, W. L. Amyloid beta oligomers in alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. *Acta Neuropathol.* 2015; 129 (2): 183-206.
- Virkamaki, A., Ueki, K., & Kahn, C. R. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest.* 1999; 103 (7): 931-943.
- Vural, H., Demirin, H., Kara, Y., Eren, I., & Delibas, N. Alterations of plasma magnesium, copper, zinc, iron and selenium concentrations and some related erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with alzheimer's disease. *J Trace Elem Med Biol.* 2010; 24 (3): 169-173.
- Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Cullen, W. K., Anwyl, R., Wolfe, M. S., Selkoe, D. J. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature.* 2002; 416 (6880): 535-539.
- Walsh, D. M., & Selkoe, D. J. A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem.* 2007; 101 (5): 1172-1184.
- Wang, X., Hu, X., Yang, Y., Takata, T., & Sakurai, T. Systemic pyruvate administration markedly reduces neuronal death and cognitive impairment in a rat model of alzheimer's disease. *Exp Neurol.* 2015; 271: 145-154.
- Wang, Y., Feng, W., Xue, W., Tan, Y., Hein, D. W., Li, X. K., & Cai, L. Inactivation of gsk-3beta by metallothionein prevents diabetes-related changes in cardiac energy metabolism, inflammation, nitrosative damage, and remodeling. *Diabetes.* 2009; 58 (6): 1391-1402.
- Wang, Y., Yang, R., Gu, J., Yin, X., Jin, N., Xie, S., Liu, F. Cross talk between pi3k-akt-gsk-3beta and pp2a pathways determines tau hyperphosphorylation. *Neurobiol Aging.* 2015; 36 (1): 188-200.
- Watt, N. T., Whitehouse, I. J., & Hooper, N. M. The role of zinc in alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis.* 2010; 2011: 971021.

- Weng, Y. Y., Lei, X., & Yu, J. Sleep spindle abnormalities related to alzheimer's disease: A systematic mini-review. *Sleep Med.* 2020; 75: 37-44.
- Werther, G. A., Hogg, A., Oldfield, B. J., Mckinley, M. J., Figdor, R., Allen, A. M., & Mendelsohn, F. A. O. Localization and characterization of insulin-receptors in rat-brain and pituitary-gland using invitro autoradiography and computerized densitometry. *Endocrinology.* 1987; 121 (4): 1562-1570.
- Wilcox, K. C., Lacor, P. N., Pitt, J., & Klein, W. L. Abeta oligomer-induced synapse degeneration in alzheimer's disease. *Cell Mol Neurobiol.* 2011; 31 (6): 939-948.
- Winters, B. D., & Bussey, T. J. Transient inactivation of perirhinal cortex disrupts encoding, retrieval, and consolidation of object recognition memory. *J Neurosci.* 2005; 25 (1): 52-61.
- Winters, B. D., Forwood, S. E., Cowell, R. A., Saksida, L. M., & Bussey, T. J. Double dissociation between the effects of peri-postrhinal cortex and hippocampal lesions on tests of object recognition and spatial memory: Heterogeneity of function within the temporal lobe. *J Neurosci.* 2004; 24 (26): 5901-5908.
- Wood, J. G., Mirra, S. S., Pollock, N. J., & Binder, L. I. Neurofibrillary tangles of alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986; 83 (11): 4040-4043.
- Woods, S. C., & Porte, D., Jr. Effect of intracisternal insulin on plasma glucose and insulin in the dog. *Diabetes.* 1975; 24 (10): 905-909.
- Wortham, M., & Sander, M. Mechanisms of beta-cell functional adaptation to changes in workload. *Diabetes Obes Metab.* 2016; 18 Suppl 1: 78-86.
- Xia, W., Yang, T., Shankar, G., Smith, I. M., Shen, Y., Walsh, D. M., & Selkoe, D. J. A specific enzyme-linked immunosorbent assay for measuring beta-amyloid protein oligomers in human plasma and brain tissue of patients with alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2009; 66 (2): 190-199.

- Xie, L., Helmerhorst, E., Taddei, K., Plewright, B., Van Bronswijk, W., & Martins, R. Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor. *J Neurosci.* 2002; 22 (10): RC221.
- Yamamoto, N., Ishikuro, R., Tanida, M., Suzuki, K., Ikeda-Matsuo, Y., & Sobue, K. Insulin-signaling pathway regulates the degradation of amyloid beta-protein via astrocytes. *Neuroscience.* 2018; 385: 227-236.
- Yang, S., Chen, Z., Cao, M., Li, R., Wang, Z., & Zhang, M. Pioglitazone ameliorates abeta42 deposition in rats with diet-induced insulin resistance associated with akt/gsk3beta activation. *Mol Med Rep.* 2017; 15 (5): 2588-2594.
- Yeh, Y. H., Lee, Y. T., Hsieh, Y. L., & Hwang, D. F. Dietary taurine reduces zinc-induced toxicity in male wistar rats. *J Food Sci.* 2011; 76 (4): T90-98.
- Yoon, S. S., & Jo, S. A. Mechanisms of amyloid-beta peptide clearance: Potential therapeutic targets for alzheimer's disease. *Biomol Ther (Seoul).* 2012; 20 (3): 245-255.
- Zhang, H., Liu, D., Wang, Y., Huang, H., Zhao, Y., & Zhou, H. Meta-analysis of expression and function of neprilysin in alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2017; 657: 69-76.
- Zhao, H. J., Wu, C. L., Zhang, X. P., Wang, L. P., Sun, J. H., & Zhuge, F. Y. Insulin resistance is a risk factor for mild cognitive impairment in elderly adults with t2dm. *Open Life Sciences.* 2019; 14 (1): 255-261.
- Zhao, L., Teter, B., Morihara, T., Lim, G. P., Ambegaokar, S. S., Ubeda, O. J., Cole, G. M. Insulin-degrading enzyme as a downstream target of insulin receptor signaling cascade: Implications for alzheimer's disease intervention. *J Neurosci.* 2004; 24 (49): 11120-11126.
- Zhao, L. X., Teter, B., Morihara, T., Ubeda, O., Frautschy, S. A., & Cole, G. M. Insulin-degrading enzyme as a downstream target of insulin receptor signaling cascade. *Neurobiology of Aging.* 2004; 25: S590-S591.

- Zhao, W. Q., De Felice, F. G., Fernandez, S., Chen, H., Lambert, M. P., Quon, M. J., Klein, W. L. Amyloid beta oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors. *Faseb Journal*. 2008a; 22 (1): 246-260.
- Zhao, W. Q., De Felice, F. G., Fernandez, S., Chen, H., Lambert, M. P., Quon, M. J., Klein, W. L. Amyloid beta oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors. *FASEB J*. 2008b; 22 (1): 246-260.
- Zhao, W. Q., Lacor, P. N., Chen, H., Lambert, M. P., Quon, M. J., Krafft, G. A., & Klein, W. L. Insulin receptor dysfunction impairs cellular clearance of neurotoxic oligomeric $\alpha\{\text{beta}\}$. *J Biol Chem*. 2009; 284 (28): 18742-18753.
- Zhao, W. Q., Santini, F., Breese, R., Ross, D., Zhang, X. D., Stone, D. J., Ray, W. J. Inhibition of calcineurin-mediated endocytosis and α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (ampa) receptors prevents amyloid beta oligomer-induced synaptic disruption. *J Biol Chem*. 2010; 285 (10): 7619-7632.
- Zhao, Y., Tang, Z., Shen, A., Tao, T., Wan, C., Zhu, X., . . . Zhang, D. The role of ptp1b o-glcnacylation in hepatic insulin resistance. *Int J Mol Sci*. 2015; 16 (9): 22856-22869.
- Zhao, Z., Xiang, Z., Haroutunian, V., Buxbaum, J. D., Stetka, B., & Pasinetti, G. M. Insulin degrading enzyme activity selectively decreases in the hippocampal formation of cases at high risk to develop alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2007a; 28 (6): 824-830.
- Zhao, Z., Xiang, Z. M., Haroutunian, V., Buxbaum, J. D., Stetka, B., & Pasinetti, G. M. Insulin degrading enzyme activity selectively decreases in the hippocampal formation of cases at high risk to develop alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. 2007b; 28 (6): 824-830.
- Zhurakovskaya, E., Ishchenko, I., Gureviciene, I., Aliev, R., Grohn, O., & Tanila, H. Impaired hippocampal-cortical coupling but preserved local synchrony during sleep in app/ps1 mice modeling alzheimer's disease. *Sci Rep*. 2019; 9 (1): 5380.

Zimbone, S., Monaco, I., Giani, F., Pandini, G., Copani, A. G., Giuffrida, M. L., & Rizzarelli, E. Amyloid beta monomers regulate cyclic adenosine monophosphate response element binding protein functions by activating type-1 insulin-like growth factor receptors in neuronal cells. *Aging Cell*. 2018; 17 (1).



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	ALEV DUYGU	Uyruğu	T.C.
Soyadı	KUZZU	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Özel Abdülkadir Özkan Fen Lisesi	2003
Lisans	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eğitim Fakültesi/Fizik Öğretmenliği	2009
Yüksek Lisans	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ortaöğretim Fen Ve Matematik Alanlar Eğitimi (YL) (Tezli)	2012
Doktora	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik ABD	2023

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Araştırma Görevlisi	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı	2018'den beri

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YÖKDİL	80.00

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Alzheimer hastalığının erken döneminde hepatik sfingolipid metabolizmasının değişimi ve Siklo-Z terapötik ajanının bu değişime etkisi. Proje No: BAP2214	İstanbul Kültür Üniversitesi Teknoloji ve Proje Destek Birimi	2022-2023
Kronik etanole maruz kalan sıçanlarda asetil-L-Karnitin uygulamasının EEG üzerine etkileri Proje No: TSA-2022-5728	Akdeniz Üniversitesi Araştırma Projeleri Yönetim Birimi	2022-2024
Yüksek Frekanslı Elektromanyetik Radyasyon Uygulaması ve Transkranial Alternatif Akım Stimülasyonunun Beyin	Akdeniz Üniversitesi Araştırma Projeleri Yönetim Birimi	2017-2020

Osilasyonları Üzerindeki Modüle Edici Etkisi Proje No: TSA-2017-2007		
Düşük frekanslı elektrik alanların stres yanıtına etkisi ve mekanizmasının elektrofizyolojik olarak incelenmesi Proje No: TSA-2018-3651	Akdeniz Üniversitesi Araştırma Projeleri Yönetim Birimi	2018-2021
Alzheimer hastalığında önemli bir role sahip olan amiloid beta nın bilissel fonksiyonlar üzerine etkileri Biyobelirteç olarak beyin osilasyonları Proje No: 315S054	TÜBİTAK	2014-2015

Yayınlar ve Bildiriler:

A. Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

A1. Acun AD, Kantar D, Er H, Erkan O, Derin N, Yargıoğlu P. Investigation of Cyclo-Z Therapeutic Effect on Insulin Pathway in Alzheimer's Rat Model: Biochemical and Electrophysiological Parameters. *Molecular Neurobiology.*, 2023. doi:10.1007/s12035-023-03334-7

A2. Kantar D, **Acun AD**, Er H, Afsar H, Yargıoğlu P. Anxiolytic-like effects of extremely low frequency electric field in stressed rats: involvement of 5-HT_{2C} receptors. *International Journal of Radiation Biology*, 2022. doi: 10.1080/09553002.2022.2087929.

A3. Kantar D, **Acun AD**, Danışman B. Effects of thymoquinone on scopolamine-induced spatial and echoic memory changes through regulation of lipid peroxidation and cholinergic impairment. *Behavioural Brain Research*, 2022. doi: 10.1016/j.bbr.2022.113972.

A4. Kantar Gok D, Hidisoglu E, Ocak GA, Er H, **Acun AD**, Yargıoğlu P. Protective role of rosmarinic acid on amyloid beta 42-induced echoic memory decline: implication of oxidative stress and cholinergic impairment. *Neurochem Intl.* 2018 118:1-13. doi: 10.1016/j.neuint.2018.04.008.

A5. Kantar Gok D, Hidisoglu E, Er H, **Acun AD**, Yargicoglu P. Decrease of auditory evoked delta, alpha and beta oscillatory responses in D-galactose induced aging model: effects of rosmarinic acid. International Journal of Gerontology, 2018. doi: 10.1016/j.ijge.2018.02.006

A6. Hidisoglu E, Kantar Gok D, Er H, **Acun AD**, Yargicoglu P. Alterations in spontaneous delta- and gamma-activity might provide clues to detect changes induced by amyloid- β administration. Eur J Neurosci. 2018 22. doi: 10.1111/ejn.13832.

A7. Kantar Gok D, Hidisoglu E, Er H, **Acun AD**, Olgar Y, Yargicoglu P. Changes of auditory event-related potentials in ovariectomized rats injected with D-galactose: Protective role of rosmarinic acid. Neurotoxicology 2017 62:64–74. doi: 10.1016/j.neuro.2017.05.003.

A8. **Acun AD**, Soyalp F. Elastic and phonon properties of FeSi and CoSi in the B2 structure. Philosophical Magazine, 2012. doi: 10.1080/14786435.2011.617323.

Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

C1. Kantar D, **Acun AD**, ER H. Evaluate the effects of rosmarinic acid in ovariectomized rats: urethane-induced cortical oscillations. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 2022. cilt.79, sa.4, ss.632-645.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceeding) basılan bildiriler.

B1. Hidisoglu E, Kantar Gok D, Er H, **Acun AD**, Yargicoglu P. Dose Dependent Effects of Amyloid Beta 1-42 on Auditory Evoked Potentials. 3rd Annual International Conference on Biology, Atina, 2017.

B2. Yargicoglu P, Kantar Gok D, Hidisoglu E, Er H, **Acun AD**. Protective role of rosmarinic acid in ovariectomized rats injected with D-Galactose. 14th Asia-Pacific Federation for Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine Congress, Taiwan, 2016.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan bildiri kitabında basılan bildiriler

C1. Er H, Kantar Gok D, Hidisoglu E, **Acun AD**, Yargicoglu P. Deneysel Alzheimer Modelinde Beyinde Ortaya Çıkan Biyokimyasal ve Histolojik Değişiklikler, 27. Ulusal Biyofizik Kongresi, Malatya, 2015.

C2. Yargıçoğlu P, Hidişoğlu E., Kantar-Gök D., Er H., Akpınar D., **Acun AD.**, Özen Ş. Kronik 2100-MHz Elektromanyetik Radyasyonun Görsel Uyarılma Potansiyellerine Etkisi, 3. Elektromanyetik Alanlar ve Etkileri Sempozyumu, Mersin, Eylül, 2015.