



T.C
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ASTROSİTLERDE AMİLOİD BETA UYARIMLI ENFLAMASYON
MODELİNDE FASUDİL UYGULAMASININ ETKİLERİ**

Burçin Nilay YENER
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. Hülya ÇİÇEK

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Abu Shameem Md. Saadat KHANDAKAR

GAZİANTEP

2017



T.C
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ASTROSİTLERDE AMİLOİD BETA UYARIMLI ENFLAMASYON
MODELİNDE FASUDİL UYGULAMASININ ETKİLERİ**

Burçin Nilay YENER
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. Hülya ÇİÇEK

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Abu Shameem Md. Saadat KHANDAKAR

GAZİANTEP

2017

T.C.

**GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**ASTROSİTLERDE AMİLOİD BETA UYARIMLI ENFLAMASYON MODELİNDE
FASUDİL UYGULMASININ ETKİLERİ**

BURÇİN NİLAY YENER

Tez Savunma Tarihi : 28.07.2017

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışmanın bir “Yüksek Lisans” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Hülya Çiçek

Yrd. Doç Dr. Abu Shameem Md. Saadat KHANDAKAR

Tez Danışmanı

İkinci Tez Danışmanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

İmza

Doç. Dr. Hülya ÇİÇEK

Yrd. Doç. Dr. Ayşegül ÇÖRT

Yrd. Doç. Dr. Mustafa ÖRKMEZ

BEYAN

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

Tarih: 22.06.2017

İmza:

Ad Soyadı: Burçin Nilay YENER

TEŞEKKÜR

Çalışmam boyunca yardımını ve desteğini esirgemeyen danışmanım Doç. Dr. Hülya ÇİÇEK'e, yüksek lisans eğitimimin her aşamasında engin bilgilerinden yararlanma fırsatı bulduğum yardım ve desteğini esirgemeyen Trakya Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Suat ERDOĞAN'a, laboratuvar deneyimlerinden faydalandığım ve yardımlarından dolayı değerli hocam Doç. Dr. Esin DOĞANTEKİN'e teşekkür ederim. Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU hocama ve Anabilim Dalımızın sayın hocaları, Prof. Dr. Ayşe Binnur ERBAĞCI, Prof. Dr. Seyithan TAYSI, Prof. Dr. İclal GEYİKLİ ÇİMENCI, Yrd. Doç. Dr. Mustafa ÖRKMEZ ve Yrd. Doç. Dr. Elif İŞBİLEN'e teşekkür ederim.

Tıbbi Biyoloji Anabilim dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Shameem Saadat'a teşekkür ederim. Tezimin yazım aşamasında bilgi ve desteğini esirgemeyen arkadaşım Halil DAĞDELEN'e, sevgi ve desteğiyle yanımda olan arkadaşım Pınar ÖKKE'ye teşekkür ederim.

Eğitimim süresince her anımda yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ellerinden gelen maddi ve manevi fedakârlığı karşılıksız gösteren, beni şekillendiren ve bu günlere getiren başta annem Saadet ÖĞÜLMEN, ablam Oya YENER, abim Yıldırım YENER ve Tayfun ÖZKAYA'ya teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜRLER	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	iv
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÖZET	1
ABSTRACT	2
BİRİNCİ BÖLÜM	3
1.GİRİŞ ve AMAÇ	3
İKİNCİ BÖLÜM	5
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1 Alzheimer Hastalığı'nın Klinik Özellikleri	5
2.2 Alzheimer Hastalığı'nın Genetiği	6
2.3 Alzheimer Hastalığı'nın Fizyopatolojisi	7
2.3.1 Nörofibriler Yumaklar	8
2.3.2 Amiloid Plaklar	8
2.3.3. Enflamasyon	9
2.3.3.1 Enflamasyonda astroglial hücreler	10
2.3.3.2 Enflamasyonda sitokinler	11
2.4 Apoptoz	13
2.5 Oksidatif Stres ve Alzheimer Hastalığı	15
2.6. Rho-Kinaz Aktivitesi ve Apoptoz	16
2.6.1. Fasudil	16
ÜÇÜNCÜ BÖLÜM	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1. Hücre Kültürü	18

3.2. MTT Viabilite Testi	19
3.3. RNA İzolasyonu	20
3.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyon (RT-PCR) Analizleri	21
DÖRDÜNCÜ BÖLÜM	25
4. BULGULAR	25
4.1. Spektrofotometrik analizler	25
4.1.1. Hücre Viabilite Testlerinin İstatistiksel Analizi	25
4.1.2. Farklı konsantrasyonlardaki A β 'nın hücre viabilitesi üzerine etkisi	27
4.1.3. Farklı konsantrasyonlardaki Fasudil'in hücre viabilitesi üzerine etkisi	28
4.2. A β ile muamele edilen astrosit hücrelerinin morfolojisinde Fasudil etkisi	29
4.3. RT-PCR Sonuçları	34
4.3.1. İstatistiksel Sonuçlar	34
4.3.2. TNF- α mRNA transkripsiyonu	37
4.3.3. IL-1 β mRNA transkripsiyonu	37
4.3.4. IL-12 mRNA transkripsiyonu	38
4.3.5. IL-10 mRNA transkripsiyonu	39
4.3.6. IL-6 mRNA transkripsiyonu	40
4.3.7. Cas-3 mRNA transkripsiyonu	40
4.3.8. Cas-8 mRNA transkripsiyonu	41
4.3.9. Bcl-2 mRNA transkripsiyonu	42
4.3.10. BAX mRNA transkripsiyonu	43
BEŞİNCİ BÖLÜM	44
5. TARTIŞMA	44
ALTINCI BÖLÜM	48
6. SONUÇ	48
KAYNAKLAR	49
ÖZGEÇMİŞ	64

KISALTMALAR DİZİNİ

ATCC:	Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
AH:	Alzheimer Hastalığı
Aβ:	Amiloid Beta
ApoE:	Apolipoprotein E
APP:	Amiloid Prokürsör Protein
BAX:	BCL-2 ilişkili X Proteini
BCL2:	B hücre CLL/lenfoma 2
BOS:	Beyin Omurilik Sıvısı
Cas-3:	Kaspaz 3
Cas-8:	Kaspaz 8
Ced-3:	Caenorhabditis elegans
cDNA:	Komplementer DNA
CO₂:	Karbondioksit
DMEM:	Dulbecco'nun Modifiye Edilmiş Eagle's Ortamı
DMSO:	Dimetil Sülfoksit
DNA:	Deoksiribonükleik asit
DSM:	Mental Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı
FBS:	Fetal Sığır Serumı
GDP:	Güanozin trifosfat
GTP:	Güanozin difosfat
IFN:	İnterferon
IL-1β:	İnterlökin 1 Beta
IL-6:	İnterlökin 6
IL-10:	İnterlökin 10
IL-12:	İnterlökin 12
MAP:	Mikrotübül Asosiye Proteinler
MSS:	Merkezi Sinir Sistemi
MTT:	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
NF-κB:	Nükleer Faktör Kappa B
NFY:	Nörofibril Yumak
NMDA:	N-metil D-aspartik asit
NO:	Nitrik Oksit
PS1:	Presenilin 1
PS2:	Presenilin 2
RCF:	Relatif Santrifüj Kuvveti
RNA:	Ribonükleik asit
RT:	Reverz Transkriptaz
RT-PCR:	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SSS:	Santral Sinir Sistemi
SP:	Senil Amiloid Plak
TNF-α:	Tümör Nekroz Faktör Alfa

TABLolar DİZİNİ

Tablo 3.1. Çalışmada cDNA sentezi için kullanılan sıcaklık ve süreler	21
Tablo 3.2. Çalışmada RT-PCR ile gen ekspresyon analizlerinde kullanılan primer sekansların listesi.	23
Tablo 3.3. Applied Biosystems StepOnePlus real-time PCR systems cihazı PCR protokolü.	24
Tablo 4.1. Hücre viabilitesi tek yönlü varyans analiz tablosu.	25
Tablo 4.2. Hücre viabilitesinin TUKEY testinde (her bir ikili karşılaştırmada) anlamlılık düzeyleri	26
Tablo 4.3. PCR sonuçları tek yönlü varyans analiz tablosu	34
Tablo 4.4. Tukey testi sonuçlarına göre ikili karşılaştırmalar tablosu	35

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. A β 'nın farklı konsantrasyonlarının hücre viabilitesi üzerine etkisi	27
Şekil 4.2. Farklı Fasudil konsantrasyonlarının hücre viabilitesi üzerine etkisi	28
Şekil 4.3. A β (5 μ M) ile birlikte Fasudil (2,5 μ M) konsantrasyonunun hücre viabilitesi üzerine etkisi	29
Şekil 4.4. Astrosit hücreleri kontrol grubu 24. saat mikroskop görüntüleri	30
Şekil 4.5. Astrosit hücreleri A β (5 μ M) eklenen grupta 24. saat mikroskop görüntüleri	31
Şekil 4.6. Astrosit hücrelerine Fasudil 2(.5 μ M) eklenen grupta 24. saat mikroskop görüntüleri	32
Şekil 4.7. Astrosit hücrelerine A β muamelesi sırasında Fasudil eklenen grupta 24. saat mikroskop görüntüleri	33
Şekil 4.8. TNF- α mRNA ekspresyon seviyeleri	37
Şekil 4.9. IL-1 β mRNA ekspresyon seviyeleri	38
Şekil 4.10. IL-12 mRNA ekspresyon seviyeleri	39
Şekil 4.11. IL-10 mRNA ekspresyon seviyeleri	39
Şekil 4.12. IL-6 mRNA ekspresyon seviyeleri	39
Şekil 4.13. Cas-3 mRNA ekspresyon seviyeleri	41
Şekil 4.14. Cas-8 mRNA ekspresyon seviyeleri	41
Şekil 4.15. Bcl-2 geni mRNA ekspresyon seviyesi	42
Şekil 4.16. Bax mRNA ekspresyon seviyesi	43

ÖZET
ASTROSİTLERDE AMİLOİD BETA UYARIMLI ENFLAMASYON
MODELİNDE FASUDİL TEDAVİSİNİN ROLÜ

Burçin Nilay YENER

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hülya ÇİÇEK

58 sayfa, Temmuz 2017

Alzheimer hastalığı bugüne kadar görülen en yaygın nörodejeneratif bozukluktur. Nöropatolojik özellikleri amiloid plak ve nörofibriller yumaklardır. Ancak enflamatuvar süreç Alzheimer hastalığının patogeneğinde temel bir role sahiptir. Sitokinler, Alzheimer hastalığında enflamatuvar ve anti-enflamatuvar süreçlerde kilit rol oynamaktadır.

Son zamanlarda, çok sayıda apoptoz düzenleyici faktör ve çoklu yollar belirlenmiş ve apoptotik hücre ölümü, Alzheimer hastalığında nöronal kayıp ile ilişkilendirilmiştir. Glial hücreler nöronlara kıyasla oksidatif strese karşı daha dirençli olsalar da, geniş oksidatif stresin glial hücrelerde de apoptotik hücre ölümüne neden olduğu görülmektedir.

Rho/kinaz birçok santral sinir sistemi (SSS) hastalığında aşırı aktive olur ve inhibe edilmesinin enflamatuvar ve demiyelinizan hastalıklarda potansiyel tedavi edici ajan olabileceği düşünülmektedir. Fasudil bir rho/kinaz inhibitörüdür ve nöroprotektif etkilere sahiptir. Çalışmada astrosit hücre hattında amiloid beta uyarımlı enflamasyonda fasudil uygulamasının Alzheimer hastalığında farmakolojik bir yaklaşım olup olmayacağı hakkında mevcut literatüre katkı sağlanması amaçlandı.

Hücreler kontrol ve amiloid beta olmak üzere iki gruba ayrıldı ve 24 saat süresince 5 µM amiloid beta ile inkübe edildi. Başka bir gruba tedavi amacıyla Rho-kinaz inhibitörü 2.5 µM fasudil eklendi. Hücrelerden izole edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi yapıldı. Gerçek zamanlı PCR metodu ile gen ekspresyon analizleri yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre amiloid beta uygulanan hücre kültürü örneklerinde TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12, Cas-3, Cas-8, Bax, Bcl-2 mRNA ekspresyon düzeylerinde kontrol grubuna göre 2-27 kat artış gözlemlendi. Fasudil tedavisi ise amiloid beta uyarımlı enflamatuvar ve bazı apoptotik genlerdeki artışı önemli derecede azalttı (p<0.001). Mikroskop incelemelerinde fasudilin koruyucu etkisini gösterdi. Sonuç olarak, fasudil ile rho-kinaz inhibisyonu amiloid beta aracılı enflamasyonun baskılanmasında koruyucu etkinliği olan ve tedavide kullanılabilecek bir ajan olabileceği gösterildi. Ancak, ileriki çalışmalara ihtiyaç duyulduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: Alzheimer hastalığı, Amiloid beta, Fasudil, TNF-α, Cas-3, Cas-8

ABSTRACT

THE ROLE OF FASUDIL TREATMENT ON AMYLOID BETA INDUCED INFLAMMATION MODEL IN ASTROCYTES

Burçin Nilay YENER

Master Thesis, Department of Medical Biochemistry

Supervisor: Associate Professor Dr. Hülya ÇİÇEK

58 Pages , July 2017

Alzheimer's disease is the most common neurodegenerative disorder to date. Neuropathological features is amyloid plaque and neurofibrillary tangles. However, the inflammatory process has a fundamental role in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Cytokines play a key role in inflammatory and anti-inflammatory processes in Alzheimer's disease. Recently, a large number of apoptotic regulatory factors and multiple pathways have been identified, and apoptotic cell death has been associated with neuronal loss in Alzheimer's disease.

Rho-kinase is overactivated in many CNS disorders and inhibition of rho is thought to be a potential therapeutic agent in inflammatory and demyelinating diseases. Fasudil is a rho-kinase inhibitor and has neuroprotective effects. The main purpose of this thesis is to investigate whether fasudil is beneficial for beta amyloid induced neuronal toxicity.

In this study, it was aimed to contribute to current literature about whether pharmacological approach to Alzheimer's disease of amyloid beta induced inflammation in the astrocyte cell line would be fasudil. Cells were incubated with 5 μ M amyloid beta for 24 hours. Another group of rho kinase inhibitors for treatment was added to 2,5 μ M fasudil. cDNA synthesis was performed from RNA samples isolated from the cells. Gene expression analysis was performed by real-time PCR method. According the results obtained, amyloid beta TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, Cas-3, Cas-8, Bax, Bcl-2 mRNA expression levels were 2 to 27 higher than control group. Fasudil therapy significantly reduced the increase in amyloid beta-stimulated inflammation and some apoptotic genes. ($p < 0.001$). Microscopic examinations also showed of fasudil cell protective effect. As a result, the inhibition of rho kinase by fasudil may be an agent that can be used in therapy with a protective effect on the suppression of amyloid beta mediated inflammation. However, further work is needed to arrive at a definite conclusion.

Key Words: Alzheimer's disease, Amyloid beta, Fasudil, TNF- α , Cas-3, Cas-8

BİRİNCİ BÖLÜM

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Alzheimer hastalığı (AH); santral sinir sisteminin (SSS) belirli kısımlarında sinaps ve nöron kaybı ile meydana gelen; bilişsel işlevlerde kayıp, kişinin öz bakımında yetersizlik ve davranışsal bozukluklar ile karakterize nörodejeneratif bir hastalıktır (1, 2). Her yıl tüm dünya da 4.6 milyon yeni AH olgusu geliştiği düşünülmektedir (3). Hastalığın görülme riski yaşa bağımlı bir şekilde logaritmik artış gösterir (4, 5). Alzheimer hastalığının tek bir faktöre bağlı olmadığı epidemiyolojik çalışmalarda belirtilmektedir. Hastalığın meydana gelmesinde yaşlanmaya bağlı olarak nöronal bozukluklar önemli bir faktördür. Bunu yanında kafa travmaları, virüs enfeksiyonları ve metabolik lezyonlar da AH riskini çoğaltmaktadır (6). Histopatolojik olarak senil amiloid plaklar (SP), nörofibriler yumak (NFY) oluşumu, sinaps-nöron kaybı ve beyinde belirgin bir atrofi mevcuttur (4). NFY'ler hücre iskeletinin bütünlüğünü ve aksonal transportun işlevini etkileyerek hücre kaybına neden olurlar (6).

AH'deki bir diğer nöropatolojik değişiklik ise ana bileşeni amiloid beta ($A\beta$) olan, amiloid plaklardır. Diffüz plaklar halinde agregate olan amiloid β yoğun nöritik (iltihaplı sinir hücresi) plaklara dönüşür. Ancak amiloid β 'nin zararsız gevşek plaklarının nasıl zararlı β kıvrımlı yoğun plaklara dönüştüğü henüz net olarak bilinmemektedir. Gevşek plaklarda biriken $A\beta$ oksidatif gerilime ve sonrasında serbest radikallerin oluşumuna, bu da plakların fiziksel olarak değişimine sebep oluyor olabilir (7). $A\beta$ 40-42 aminoasitten oluşan bir proteindir ve büyük bir transmembran proteini olan, 19. kromozomda kodlanan ve işlevi tam olarak bilinmeyen amiloid prokürsör protein (APP)'den proteolitik yolla oluşur (7, 8). Sonuç olarak $A\beta$, APP'nin metabolizma ürünlerindendir.

AH'de meydana gelen nörodejenerasyonun, SSS'ne yapılan bir saldırıya karşı immün ya da enflamatuvar bir yanıt olduğuna dair bulgular vardır. AH'de beyinde dejenerasyona bağlı olarak akut faz cevabı meydana gelmektedir. Bu durum 'sitokin' adı verilen ve vücudun savunma sistemini harekete geçiren proteinlerde hızlı bir artışa neden olmaktadır (9,10). Mikroglial hücreler beyin parankimi fagositer hücreleri olarak bilinmektedir. Aktive hale geldiklerinde makrofajlara benzer biçimde fagositoz, antijen

sunumu, çeşitli enflamatuvar ve nörotoksik faktörlerin salınımı gibi görevler üstlenirler. İn vitro deney koşullarında mikrogial hücrelerden salınan enflamatuvar sitokinler nöronal hasara neden olmaktadır (11). Patolojik bulgulara beyin dokusunda bulunan amiloid plaklar ve nörofibriler yumakların yanında astroglial ve mikrogial aktivasyonunda eklenmesi ve plakların etrafında sitokinler, akut faz proteinleri ve proteazlar gibi enflamasyon sürecine katılan birçok maddenin varlığının belirlenmiş olması, AH'da enflamatuvar sürecin ve glial aktivasyonun hastalığın ilerlemesine katkı sağladığı öne sürülmektedir (11, 12). İddia edilen patojenik mekanizmalardan bir diğeri ise; amiloid peptid ve enflamatuvar uyaranlarla birlikte aktive olan mikrogial hücrelerden salınan proenflamatuvar sitokinlerin ve nörotoksinlerin nöronal hasara neden olmasıdır (13). Aktive hale gelen mikrogial hücrelerden interlökin 1 β , interlökin 6, IL-12 ve tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) gibi pro-enflamatuvar sitokinlerin salınımı gerçekleşir ve bu durumu takiben de komşu nöronlarda hasar oluşabilmektedir(11).

Hücre içi birçok sinyal iletim yollarına aracılık eden ve küçük bir G proteini olan Rho'nun iki efektörü tanımlanmıştır. Bunlar ROCK α /ROCK II ve ROCK β / ROCK I Rho kinazlar'dır (14). Rho kinazların kan basıncı homeostazı, düz kas kontraksiyonu, hücre proliferasyonu, hücre adezyonu, migrasyonu ve enflamatuvar cevabı da içeren çok sayıda fizyolojik olayda görev aldığı bilinmektedir. Rho proteinleri gen ekspresyonunun ve aktin hücre iskeletini kontrol eden sinyalleme yollarında etkilidir. Aynı zamanda enflamatuvar hücrelerin migrasyonu hücre iskeleti aktini tarafından düzenlenmektedir ve bu olayı düzenleyen en önemli mekanizmalardan birisi Rho ile indükelenen sinyal ileti mekanizmasıdır.

Bu çalışmada AH fizyopatolojisinde önemli rol oynayan A β 'in astrositler üzerindeki nöroinflamasyon etkisi ve sonrasında gelişen hasarlarda Rho-kinaz enziminin rolünün belirlenmesi hedeflenmiştir. Böylece yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlarla Rho kinaz modülasyonunun Alzheimer Hastalığının korunması ve tedavisinde potansiyel farmakolojik bir yaklaşım olup olmayacağı yönünde bilgilerin elde edilmesi amaçlanmıştır.

İKİNCİ BÖLÜM

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Alzheimer Hastalığı'nın Klinik Özellikleri

Alzheimer hastalığı (AH), en çok yaşlılarda görülen ve demansın en sık nedeni olan, bilişsel işlevlerde ve günlük yaşamı sürdürme becerilerinde azalma belirtileri ile karakterize, progresif nörodejeneratif bir hastalıktır. Hastalığın başlangıç dönemindeki en belirgin klinik belirtisi bellek bozukluğudur. Hastalığın seyir sürecinde dikkat, yürütücü işlevler, davranış, düşünce, görsel-uzamsal işlevler gibi kognitif alanlarla ilgili işlev bozuklukları klinik tabloya eklenmektedir (1, 15, 16).

Alzheimer hastalığının klinik tanısı için belirlenen ve yaygın bir biçimde kullanılan iki tanı ölçütü vardır. Bu ölçütlerden bir tanesi, Ulusal Nörolojik ve İletişim Hastalıkları Enstitüsü ve İnme-Alzheimer Hastalığı ve İlişkili Hastalıklar Derneği (NINCDS-ADRDA) tarafından geliştirilen tanı ölçütü, diğeri ise Mental Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı (DSM) ölçütüdür. Bu iki ölçütten faydalanılarak hastada öğrenme bozukluğu, apraksi, afazi, agnozi, yönetsel işlevlerde ve bellekte bozukluğun olup olmadığı ve SSS ile alakalı başka bir patolojik sorun olup olmadığı gibi değerlendirmeler yapıp AH tanısı konulabilmektedir (17).

Hastalar arasında belirtilerin ortaya çıkma sürelerinin önemli ölçüde farklılık olduğu bildirilmiştir. Hastalığın belirtilerine dair klinik seyir 7 evrede tanımlanmıştır:

1. Evre: Bilişsel zayıflık semptomlarının görülmeye başladığı evredir. Bu evre başlangıç evresi olarak bilinir ve SSS'nde de patolojik süreçlerin geliştiği bilinmektedir.
2. Evre: (Çok hafif bilişsel zayıflık) Hasta anahtar, gözlük, cüzdan gibi temel eşyaların yerlerini unutmaya başlamıştır ancak iletişim yetileri bozulmamıştır.
3. Evre: (Hafif bilişsel bozukluk) Hasta konuşurken kelime seçiminde ve tanıdıklarının isimlerini çağırırken zorlanmakta, eşyalarını sıklıkla

kaybetmektedir. Bu evrede hastanın plan yapma ve organizasyon yetisi azalmıştır.

4. Evre: (Orta Bilişsel Zayıflık) Hastada kısa dönem hafızada ciddi kayıplar gözlenmektedir. Kişinin kendi geçmişi ile ilgili hafıza zayıflıkları söz konusudur ve hasta sosyal konularda içine kapanmıştır.
5. Evre: (Orta-şiddetli bilişsel zayıflık) Hasta yer, zaman gibi olgular ile ilgili olarak zihinsel karışıklık yaşamaktadır. Telefon numarası, adres ya da mezun oldukları okulun ismi gibi önemli detayları hatırlamakta zorlanmaktadır. Bazı nesleri tanımakta zorlanmaktadır (agnozi). Sonradan kazanılmış ve motor beceri isteyen hareketleri uygulama yetileri bozulmaya başlamıştır (apraksi). Bu evrede olan hastalar günlük aktiviteler (banyo yapma, giyinme, yemek yeme gibi) için yardıma ihtiyaç duyarlar.
6. Evre: (Şiddetli bilişsel zayıflık) Kelime bulmakta ve anlık konuşma becerilerinde kayıplar vardır (afazi). Hastanın günlük aktiviteleri için daha çok yardıma ihtiyacı vardır.
7. Evre: (Çok şiddetli bilişsel zayıflık) Bu evredeki hastaların konuşma becerileri azalmış ya da yitirilmiştir ve yutmada zorluk yaşanmaktadır. Hasta bu evrede 24 saat bakıma muhtaç durumdadır.

Alzheimer hastalığı tanısı konulan hastaların genelinde bilişsel zayıflığın yanında davranış farklılıkları ve psikolojik belirtilerde eklenmiştir (1, 16). Ancak AH'nın tipik seyrine uymayan ve aynı zamanda patolojik olarak AH tanısı konulan hastalarda başka klinik bulgular da bildirilmiştir. Hastalığın genetik olarak 1. ya da 14. kromozomlardaki mutasyonlarla karakterize edilmiş erken başlangıçlı şeklinde, kişilik bozuklukları ve motor bozukluklar erken dönemde görülebilir (18).

2.2 Alzheimer Hastalığı'nın Genetiği

Alzheimer hastalığının oluşumunda önemli olan risk faktörlerinden biriside genetik yatkınlıktır. Alzheimer'lı birinci derece akrabalara sahip bireylerde hastalık riskinin arttığı bildirilmiştir(19, 20).

Alzheimer hastalığı ile ilişkili olduğu belirlenmiş olan başlıca 3 ayrı gen vardır. Bunlar; amiloid prekürsör protein (APP), presenilin 1 (PS1), presenilin 2 (PS2), apolipoprotein E (ApoE)'dir. Erken başlangıçlı AH'nın %5 'ni APP, PS1 ve PS2 genlerinde meydana gelen mutasyonlar olduğu, ApoE epsilon 4 ($\epsilon 4$) alelinin ise hastalığın riskini artırdığı bildirilmiştir (19). Aynı zamanda 1. kromozomda bulunan PS2 ve 21. kromozomda bulunan APP genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonucunda, A β peptid seviyesinin arttığı gözlenmiştir (21). 14. kromozomda bulunan PS1 geninde meydana gelen mutasyonlar sonucu APP hatalı bölünür ve bu da toksik A β üretimine sebep olur. Ayrıca diğer taraftan, PS1 geninde oluşan mutasyon tau proteininin hiperfosforilasyonuna neden olur ve buda nörofibril yumak (NFY) oluşumunu tetiklemektedir (22). APP geni mutasyonu erken başlangıçlı ailesel AH'nın %2-3'ünü, PS2 geninin mutasyonu %20'sini, PS1 geninin mutasyonu ise %70-80'inini oluşturduğu bildirilmiştir (1, 23). 19. kromozomda bulunan ApoE geninin ise geç başlangıçlı AH'nın oluşumunda rol aldığı bildirilmiştir (21). ApoE geninin $\epsilon 2$ alelinin AH riskini azalttığı (koruyucu alel), $\epsilon 4$ alelinin ise hastalık riskini artırdığı rapor edilmiştir ve aynı zamanda bu alelin amiloid plak ve NFY oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir (24). Geç başlangıçlı AH'nın yaklaşık %50-80'ini ApoE geninde meydana gelen mutasyonlar oluşturmaktadır (25).

2.3 Alzheimer Hastalığı'nın Fiziopatolojisi

Alzheimer hastalığının gözle görülebilen patolojik bulguları beyinde küçülme, giruslarda daralma, sulkuslarda ve ventrikülerde genişleme olarak bilinmektedir (26). Hastalığın temel mikroskobik değişiklikleri ise; nöron içerisinde birikim gösteren NFY'lar, ekstraselüler birikim gösteren amiloid plaklar ve nöron kayıpları olarak bilinmektedir (27). NFY patolojisi beyinde klinik bulgular ile paralel bir ilerleme gösterir ancak amiloid plaklar klinik bulgular ile direkt olarak ilişkili değildir (28).

NFY'lerin ana bileşeni mikrotübül bağıntılı bir protein olan taunun hiperfosforile hali, hücre gövdesinde dentirtilerde biriken çift sarmal iplikçik yığınlarıdır (29). Tau hiperfosforilasyonunun, fosforilasyonu düzenleyen farklı kinazların ve fosfotazların aktiviteleri arasındaki dengesizlik sonucunda oluşabileceği düşünülmektedir (30). Tau proteininin hiperfosforile olduktan sonra mikrotübüllerle etkileşiminin azaldığı ve hücre

işlevlerinde bozukluk meydana getirdiği öne sürülmüştür (31). Senil plaklarda APP'nin metabolizma ürünü olan $A\beta$ 'nin ekstraselüler birikimi mevcuttur (29). Amiloid prekürsör proteinin metabolizma yollarından biri olan non-amiloidojenik yol; APP'yi parçalayan alfa sekretaz ve gama sekretaz enzimlerinin yer aldığı ve meydana gelen ürünlerin toksik olmadığı yolaktır. İkinci yani amiloidojenik yolda ise gama sekretaz ve alfa sekretaz enzimlerinin aracılığıyla $A\beta_{1-40}$ ve $A\beta_{1-42}$ oluşmaktadır (32, 33). Amiloid birikiminin ana bileşeni $A\beta_{1-42}$ 'dir (34). Nörotoksik olan $A\beta$, hücresel kompartmanlarda birikerek mitokondriyal ve sinaptik hasara birde tau proteininin hiperfosforilasyonuna yol açarak hücresel fonksiyonlara zarar verir (31, 35).

2.3.1 Nörofibriler Yumaklar

Alzheimer hastalığındaki nörofibriler yumakların ana bileşeni hiperfosforile tau proteinleridir. 17. kromozom tarafından kodlanan tau, mikrotübül asosiye proteinler (MAP) ailesinden olup mikrotübüllerin stabilizasyonu, hücre iskeletinin bütünlüğü ve aksonal transportta önemli bir role sahiptir. AH'nın patogeneğinde hiperaktif kinazlar ve hipoaktif fosfotazlar tau proteininin hiperfosforilasyonuna yol açarak mikrotübüllere bağlanma yeteneğini bozarlar ve bağlanmamış olan fosforile tau çözilemeyen çift sarmallı filamanlara polimerize olur. Bunlar zaman içinde intranöronal NFY'ler halinde yoğunlaşır. NFY'ler sonuç olarak hücre iskeletinin bütünlüğünü ve aksonal iletimi bozarak hücre ölümüne yol açar. Hücre ölümüyle meydana gelen NFY 'hayalet yumak' olarak adlandırılır (36,37).

2.3.2 Amiloid Plaklar

Ana bileşeni amiloid beta ($A\beta$) proteinidir. 40-42 aminoasitten oluşur ve daha büyük transmembran proteini olan APP'den proteolitik yolla oluşur, henüz normal işlevi bilinmemektedir. Çözilemeyen amiloid fibrillerin oluşması, AH'deki ilk patolojik olay olabilir. Her transmembran proteininde olduğu gibi APP'ninde hücre içi karboksi ucu, hücre dışı amino ucu ve hücre içinde seyreden 28 aminoasitlik bölümü bulunmaktadır.

APP a, β ve γ sekretaz adı verilen proteolitik enzimlerle kesilerek metabolize edilir. a-sekretaz APP'yi yaklaşık olarak orta kısmından keser ve çözülebilir A β yerine APP ya da sAPP denilen ekstraselüler yeni protein oluşur. Diğer iki enzimden β -sekretaz APP'yi amino ucundan, γ -sekretaz ise karboksi ucundan keser ve ürün olarak amiloid β meydana gelir. Meydana gelen amiloid β 'lar 40-42 aminoasit uzunluğunda olup bunlardan daha fazla amiloidojenik olanı 42 aminoasitlik form olup ilk çökendir (38). Ardından amiloid β diffüz plaklar halinde agregre olur ve akabinde yoğun nöritik plaklara dönüşür (39). Erken demans görülen hastaların beyin dokuları ve BOS'unda amiloid β 42 ve amiloid β oligomerleri bulunur ve bunların düzeyleri kognitif bozukluk ile paraleldir (40, 41).

AH'de amiloid β miktarının artışı ya substrat olan APP miktarındaki artış ile ya da APP'den amiloid β üreten β sekretaz veya γ sekretaz aktivasyonuna bağlı fazla miktarda üretim ile koreledir. Ancak, tau proteini genindeki mutasyonlar AH dışı dejenerasyonlara sebep olmaktadır. İleride demans olsun ya da olmasın büyük ölçüde 60 yaşından itibaren normal bireylerde de amiloid β plaklarda birikmeye başlar. İlk birikim neokortekste olur ve gevşek plaklar halindedir. Bunlar lokal nörotoksik etkilere sahip β kıvrımlı amiloid değildir. Zararsız amiloid β içeren gevşek plakların zararlı β kıvrımlı yoğun plaklara nasıl dönüştüğünü açıklayan bir çok teori bulunmaktadır. Nöritik olmayan katı plakların demanssız beyinlerde görülme olasılığı bulunmaktadır. Katı plakların lokal nörotoksitesi, hücre ölümü ve nöritik dejenerasyona yol açar. Dejenere nöritler içeren katı plaklar 'nöritik plakalar' olarak adlandırılır. Nöritik plaklar sadece demanslı beyinlerde görülür (6). β kıvrımlı plakların serebral neokortekste fazla ve az yoğunlukta olmaları AH'nın kesin tanısı için gereklidir (42).

2.3.3. Enflamasyon

Enflamasyon hücredeki hasar sonucu meydana gelen nekrotik hücre ve dokuları ortadan kaldırmak için verilen immün bir yanıttır. Eğer oluşan hasar sonucunda doku kendini sağlıklı bir şekilde yenilemezse, enflamasyon meydana gelir ve kronik bir durum olur. Devamında ise doku düzensiz bir hal alır. Bu tür enflamasyonlarda, doku hasarı ve iyileşme aynı anda ilerlemektedir. Normalde çökmüş olan hasarlı bölge yavaşça birikir,

bazen de yıllar içerisinde asemptomatik bir şekilde birikir. Bu da ciddi doku bozulmalarına neden olabilir (43).

Beyin enflamasyonu Alzheimer hastalığının patolojik bir işaretidir. Bununla birlikte şişme, ısı ve ağrı gibi karakteristik enflamatuvar özellikler beyinde oluşmaz ve bu nedenle burada akut inflamasyona değiniriz (44). Akut enflamasyon; kısa süreli doku hasarıdır. Zamanla iyileşebilir ya da kronik enflamasyona dönüşebilir. Kronik enflamasyonlu dokular, merkezi sinir sisteminde artmış monosit ve monosit türevi olan doku makrofajı yani mikrogliyal hücreler ile karakterizedir (43, 44). Alzheimer'lı beyinlerde patolojik olarak enflamasyon açıkça görülür ve bununla birlikte akut faz proteinlerinin ve proenflamatuvar sitokinlerin ekspresyonlarında artış görülür. Ancak bu artış normal beyinlerde pek belirgin değildir (45, 46). Enflamasyondan mikrogliyal, astrositler ve nöronlar sorumludur. Aktifleştirilmiş hücreler, proenflamatuvar sitokinler, kemokinler, prostoglandinler, lökotrienler, reaktif oksijen türleri, proteazlar, proteaz inhibitörleri ve bu gibi enflamatuvar mediatörleri üretirler.(44, 47, 48, 49, 50).

2.3.3.1 Enflamasyonda astrogliyal hücreler

Astrositler, nöronlara metabolik ve yapısal olarak destek olan hücreler olarak ilk defa 1856 yılında Virchow tarafından tanımlanmıştır (51). Astrositler beyinde en çok görülen hücrelerdir (52) ve glial hücrelerin %80'ini oluştururlar (53). Astrositler morfolojik olarak büyük, yıldız şeklinde, ortasında çekirdeği ve birçok uzantısı bulunan hücrelerdir. Astrositlerin tam işlevsel kapasitesi tam olarak aydınlatılmamıştır ancak beyin bağ dokusu ve iskelet fonksiyonu ile ilişkilidir. Nöronal sinapsların fonksiyonel bütünlüğünü korurlar ve nöronların aktivitesini etkilerler (54). Beyin hasara uğradığında astrositlerin iyileşme sürecinin bir parçası olarak glial skar dokusunu oluşturduğu düşünülmektedir (47). Alzheimer hastalığına bağlı enflamasyon sürecinde astrositin rolünü belirlemek daha zordur. Alzheimer hastalığında senil plaklar reaktif astrositlerle ilişkilidir (55). Astrositlerde mikrogliyalardan salgılanan prostoglandinler, interlökinler, lökotreinler, pıhtılaşma faktörleri, tamamlayıcı faktörler gibi birçok pro-enflamatuvar molekülleri salgırlar.

Astrositler A β parçalanması ve temizlenmesi, nöronlara trofik destek sağlamak ve A β birikintileriyle nöronlar arasında korucu bir bariyer oluşturmak açısından önemlidir (56). Ancak kronik stres ile ilgili belirli koşullar altında astrositlerin yararlı bir rolü olmayabilir. Kronik strese yanıt olarak APP'nin β -sekretazı aşırı sentezlemesi astrositlerin A β için kaynak olabileceğini düşündürmektedir (56).

2.3.3.2 Enflamasyonda sitokinler

Sitokinler moleköl ağırlıkları 8000 ila 40000 Da arasında değişen küçük ve yapısal olmayan proteinlerdir. Başlangıçta bu moleküllerin kaynaklarını belirtmek amacıyla lenfokin ve monokin olarak adlandırılıyordu. Bu proteinler hemen hemen tüm çekirdekli hücrelerden sentezlenebildiği ve dolayısıyla bunlara cevap verebilme yeteneğine sahip oldukları için 'sitokin' teriminin en uygun adlandırma olduğu bildirilmiştir. Sitokinleri bağlayan bir amino asit sekansı, motifi ya da üç boyutlu yapı bulunmamaktadır. Sitokinler çeşitli bağışıklık sistemi hücrelerinden (T-lenfosit, makrofaj vb.) ya da farklı hücrelerden (fibroblast vb.) sentezlenebilir (56). Sitokinler tarafından indüklenen bazı biyolojik etkiler; hücre proliferasyonu, sitotoksitite/apoptoz, antiviral aktivite, hücre büyümesi ve farklılaşması, enflamatuvar yanıt ve yüzey membran proteinlerinin ekspresyonunun artışının uyarılması veya inhibisyonu olarak bilinir (57).

Sitokinler aynı zamanda interlökinler (IL), tümör nekroz faktör (TNF), interferonlar (IFN) ve bazı büyüme faktörlerini içeren bir protein ailesidir. Enflamatuvar durumlarda üretimleri artar ve bağışıklık sisteminin yanıtının yoğunluğunu ve süresini düzenlerler (47). SSS'nde hem mikrogliya hemde astrosit tarafından üretilirler (58). Alzheimer'lı hastaların beyin, beyin omurilik sıvısı ve kan düzeylerindeki değişikliklerini gösteren birçok araştırma bulunmaktadır. Hastaların beyin dokusunda IL-1 α , IL-1 β , IL-6, granulosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör, IFN- α düzeylerinin arttığı bildirilmiştir (59, 60). Sitokinler senil plaklarda bulunan bir dizi proteinin algılanmasını da uyarabilir (60). Aynı zamanda sitokinler ve A β arasında sinerjik etkiler de görülebilir.

Demansın nihai nedeni, nöronların kaybı ve aralarında sinaptik bağlantılar olmasıdır. Doğal bağışıklık yanıtı ve sonucunda nihai nöroenflamasyon, AH'da nöronal hasara yol

açmakta önemli bir role sahip olabilir. Bu immün yanıt mikrogliya, astrosit ve komplement sistemin aktivasyonunu, ayrıca artmış sitokin ekspresyonu ve akut faz protein yanıtını içerir (44, 61). AH'da enflammatuvar yanıtın zararlı etkisi, antienflammatuvar ajanların potansiyel koruyucu etkisi epidemiyolojik kanıtlarla desteklenmektedir (62, 63). Buna ilave olarak kanıtlar, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12- TNF- α gibi mediatörlerin genetik varyasyonundan AH riskinin etkilenebileceğini göstermektedir (64). Tümör nekroz faktör; enflammatuvar yanıt sırasında sitokin kaskadının başlatılmasında ve düzenlenmesinde merkezi bir rol oynayan temel proenflammatuvar sitokindir (65, 66). İn vitro çalışmalarda TNF- α 'nın interferon γ ile kombinasyonu halinde A β üretimini artırdığına ve çözünür nöroprotektif APP salınımını inhibe ettiğine dair kanıtlar vardır. TNF- α hem nükleer faktör kappa B (NF-kB) proteininin aktifleştirilmesiyle hem de buna bağlı apolipoprotein E (APOE) ve daha fazla TNF- α salınımıyla ilişkilendirilmiştir (67).

IL-1 β akut nöroenflammatuvar süreçlerin in vivo olarak ayrıntılı bir şekilde işlenmesinde yer alır. Kemirgen beyninin IL-1 β 'ya maruz kalması, hem astrositlerin hem de mikrogliaların sağlam ve hızlı aktivasyonunu ortaya çıkarır. İlave olarak IL-1 β 'nın kapsül enjeksiyonu veya parankimal ekspresyonu, kemirgenlerin beyin parankimi içerisinde pro-enflammatuvar sitokinlerin, lökosit kemotaktik kemokinlerin, hücre yüzey adezyon moleküllerinin, siklooksigenazların ve matris metalloproteazların ekspresyonunu artırır (68, 69). Daha da önemlisi sıçangillerde görülen IL-1 β indüksiyon yoluyla, IL-1 β 'nın insan beyninde uygulaması ya da ekspresyonu, IL-1 β 'nın kendi ekspresyonunun artışı tetikleme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir (69, 70). Beyindeki potansiyel nöroenflammatuvar değişiklikleri görmek için IL-1 β 'daki küçük lokalize yükselmeler yeterli olabilir (71, 72).

Interlökin 6 (IL-6); 1985 yılının başlangıcında B hücresi farklılaşma faktörü olarak tanımlanan bir sitokin, B hücresinde antikor üreten ve hücrenin olgunlaşmasını sağlayan bir faktördür (73). 1990'ların başında, T hücreleri gibi diğer bağışıklık hücrelerinin kontrol edilmesinin yanı sıra hepatositlerin, hematopoietik progenitör hücrelerin, kardiyovasküler sistemin, plasentanın, sinir ve endokrin sistemlerin düzenlenmesinde IL-6 'nın da önemli olduğu bildirilmiştir (74). Prototip bir sitokin olarak enflamasyonun kontrolünde rol alan IL-6, nöroenflamasyonun rol oynadığı merkezi sinir sistemi

hastalıklarında değişime uğrar. Bu nedenle Alzheimer hastalarının beyinlerinde IL-6 ekspresyonunun değiştiği ve amiloid plakların beyin omurilik sıvısında arttığı bildirilmiştir (75, 76). Ayrıca kültürlenmiş sıçan kortikal nöronlarında, IL-6'nın beta-amiloid peptidin indüklediği sinir hasarını da arttırdığı görülmüştür (77). İn vitro olarak yapılan transgenik fare modellerinde IL-6'nın bu zararlı etkisine rağmen, ilk olarak beta-amiloid birikimini zayıflatan büyük bir gliozise ve plak kleransının arttırılmasına neden olduğu için IL-6'nın yararlı bir etkisi olduğu gösterilmektedir (78).

Enflamatuvar yanıtta TNF- α ve interlökin-10 (IL-10)'un zıt rolleri vardır. TNF- α genellikle pro-enflamatuvardır, IL-10 ise enflamatuvar reaksiyonları sınırlar ve sonlandırır (79). IL-10; TNF- α , IL-1 α , IL-1 β ve IL-6 'nın güçlü bir bastırıcısıdır ve bunların tümü AH ile potansiyel ilişkisi için araştırılmıştır (80). Yapılan in vitro çalışmalar (81, 82), IL-10 'un sıçan ve sıçangil mikrogliasında amiloid beta peptid veya lipopolisakkarid kaynaklı enflamatuvar sitokinleri baskıladığını göstermiştir. Yetişkin çağda meydana gelen baş yaralanmaları, geç yaşamda artmış AH riski ile (83), ve non-steroid anti-enflamatuvar ilaçların rutin kullanımı AH'nın insidansında azalma ile ilişkilendirilebilir (84). Yapılan bir araştırmada (85), Alzheimer hastalarından alınan tam kan örnekleri ve kontroller standart koşullar altında ekzotoksin ile ex vivo olarak uyarılmış ve tipik bir pro-enflamatuvar sitokin olan IL-1 β (86) ve anti-enflamatuvar bir sitokin olan IL-10'un (87) düzeyleri değerlendirilmiştir. Alzheimer hastaları, IL-10 miktarına kıyasla IL-1 β üretimini 7 ile 10 kat artırmışlar ve IL-10 üretiminin mutlak azaltılmasının AH'nın gelişimine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir (85). Bu nedenle, Alzheimer hastaları proenflamatuvar bir genotip gösterirler ve enflamasyonun genetik kontrolü AH'nın gelişmesine koruyucu bir rol oynayabilir. İşte bu sebeple bizde bu tezde AH'ında anti-enflamatuvar sitokin olan IL-10'un da rolünü değerlendirdik.

2.4 Apoptoz

Apoptoz, programlanmış hücre ölümü olarak bilinir. Apoptotik hücre ölümünün, hem akut hem de kronik nörolojik hastalıklarda rol oynadığı düşünülmektedir (88, 89, 90). Akut hareketlerden sonra, yaralanmadan ciddi olarak etkilenmeyen bölgelere apoptoz

meydana gelir. Apoptotik ölüm, aynı zamanda beyin veya omurilik hasarından sonra ortaya çıkan lezyonun bir bileşenidir (91, 92, 93). Hücre ölümünün baskın şekli kronik nörodejeneratif hastalıklarda görülür (94, 95). Apoptozda; bir biyokimyasal kaskat, hücrenin hayatta kalması için gerekli molekülleri yok eden proteazları yani diğer bir başka deyişle hücre intiharı programına aracılık eden proteazları aktive eder. (İşlem sırasında mitokondri ve ribozomlar agregre olur ve stoplazma yoğunlaşır, kromatinler agregre olur ve çekirdek yoğunlaşır). Ölümden sonra, hücre parçaları 'apoptotik cisimler'e bölünür ve kromozomal DNA enzimatik olarak 180-bp internükleozomal fragmanlara bölünür. Apoptozun diğer özellikleri, mitokondri zar potansiyelinin azaltılması, hücre içi asitleştirme, serbest radikal oluşumu ve fosfotidilserin kalıntılarının dışa vurumudur (96, 97, 98, 99, 100).

Alzheimer hastalığı beyindeki geniş nöron kaybı ve takibinde bu hücrelerin neden ve nasıl öldüğüne dair sorularla çok fazla spekülasyona neden olmuştur. Beyindeki nöronal ölümün altındaki moleküler mekanizmalar tamamen tartışmaya açıktır. Nöronal ölümle sonuçlanan birincil mekanizmalardan birinin apoptoz olabileceği öne sürülmüştür (101). AH olan beyinde apoptoz tarafından nöronal ölümün gerçekleştiği görüşünü destekleyen kanıtlar, Bcl-2 ile ilgili hücre ölümüne bağlı proteinlerin değişmiş seviyelerinin gösterilmesi ile sağlanmıştı (102). Bcl-2 ile ilgili proteiner, mitokondriyal bütünlüğü ve kaspaz aktivasyonunu düzenleyen belirgin bir düzenleyici protein ailesini içerir. Bu ailenin proapoptotik üyeleri BAK ve BAD, antiapoptotik olan Bcl-2 ve Bcl-xl proteinlerinin daha düşük seviyede bulunduğu yaşa bağlı kontrollere kıyasla, AH'lı beyinlerde daha yüksek seviyelerde bulunduğu bildirilmiştir. Bu veriler Alzheimer hastalığı olan beyinlerdeki apoptotik nöronal ölüm sürecine kanıt olarak yorumlanmıştır.

Araştırmacılar 1993'te, *ced-3*'teki *Caenorhabditis elegans* hücre ölüm geninin, pro-interlökin-1 β 'nın olgunlaşmasından sorumlu, bir memeli proteinazı olan IL-1 β dönüştürücü enzim (kaspaz-1) ile olağan üstü dizi benzerliği olduğunu keşfettiler (103-104). Bu seminal bulgu, kaspaz ailesinin ilk iki üyesini tasvir etti ve bu proteinazların apoptoz sırasında işlev görebileceğini önermişti. Sonraki çalışmalar apoptoz ve/veya enflamasyon için önemli olan bir düzine kaspaz aile üyesi tespit etti (105, 106). Birkaç kanıt, kaspazın apoptoz için önem taşıdığını göstermektedir. İlk

olarak, kaspaz aktivasyonu apoptozun başlangıcı ile ilişkilidir ve kaspaz inhibisyonu apoptozu zayıflatır. Apoptotik hücreler başlangıç sinyali ne olursa olsun bilindik bir ölümle sonuçlanır (107). Sitoplazma küçülür, plazma membranı kanar ve vesiküllendir, fostotidilserin hücre yüzeyine yeniden dağılır. Aynı anda çekirdek küçülür, kromatin yoğunlaşır ve DNA fragmanları, yüksek molekül ağırlıkları ve oligonükleozomal parçalarına ayrılır. Kaspaz substratlarının tanımlanması, kaspazın bu değişiklikleri nasıl sağladığına dair bilgi sağlamıştır. Muhtemelen pro ve anti-apoptotik proteinler bir apoptotik uyarıyı takiben ilk kaspazı hedefler (108, 109, 110). Bu bölünme olayları sinyal amplifikasyonuna ve inhibitör inaktivasyonuna dahildir. Kaspaz-3, apoptoz proteinlerinin anti-apoptotik işlevini yok eden ve pro-apoptotik olan C-terminal fragmanlarını serbest bırakan Bcl-2 ve Bcl-xl'yi parçalara ayırır. Benzer şekilde kaspaz-8, pro-apoptotik Bcl-2 ailesinin üyesi olan BID'yi parçalayıp, mitokondriyal sitokrom c salınımını indükleyen bir C-terminal fragmanı çıkarır (111, 112).

2.5 Oksidatif Stres ve Alzheimer Hastalığı

Oksidatif stres Alzheimer hastalığının etyopatogenezi ile ilgili hipotezlerden bir tanesidir. Hastalıkta oksidatif hasarın arttığı ve bu artışın da nöronal dejenerasyona ve ölüme sebebiyet verebileceği düşünülmüştür. Alzheimer hastalarının beyinlerinde serbest radikal oluşumunu uyaran demir, civa ve alüminyum konsantrasyonlarının artması, protein ve DNA oksidasyonunun artması, enerji metabolizmasının bozulması ve sitokrom oksidaz C miktarının azalması, lipid peroksidasyonunun artması, NFY'lerde ve amiloid plaklarda ileri glikozilasyon son ürünlerine rastlanması oksidatif stresin Alzheimer hastalığının etyopatogeneze katkısını gösteren bulgulardır (113, 114). Yapılan bazı çalışmalar arjinin- NO yolağının AH'nın patogenezi ile alakalı olduğu (115), hastalığın seyri boyunca nitrik oksit (NO) düzeyinin artarak beyin homeostazını bozduğu, beyin lezyonlarına ve patolojilerine sebep olduğu gösterilmiştir(116). Nitrik oksidin fazla üretimi sonucunda N-metil-D-aspartik asit (NMDA) reseptörleri aracılı gerçekleşen nörotoksisitede rol oynayabileceği düşünülmüştür (117). NO'nin amiloid plak ve NFY oluşum süreçlerinde yer aldığı ve nörotoksik A β 'ların NO üretimini arttırdıkları yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. NO'nin

aşırı üretimi sonucu meydana gelen reaktif oksijen türlerinin farklı nörotoksik mekanizmaları aktif hale getirdiği ve bu mekanizmaların Alzheimer hastaları üzerinde nöron ve bellek kaybı oluşturabileceği bildirilmiştir(118).

2.6. Rho-Kinaz Aktivitesi ve Apoptoz

Küçük bir G proteini Rho, hücre poliferasyonu, adezyonu ve apoptoz gibi birçok hücrel olayda görev almaktadır. Rho'nun en çok bilinen ve çalışılan efektörü Rho kinazdır ve iki izoformu bulunmaktadır. ROCK α /ROCK II ve ROCK β /ROCK I (119,120). Apoptoz, biyolojik işlevleri bozulan ve artık gereksinim duyulmayan hücrelerin, etrafa zarar vermeden meydana gelen programlı ölümüdür. ROCK'nin iki izoformunun da apoptozda önemli role sahip olduğu bilinmektedir. ROCK I, kaspaz 3 aracılı kesilme ile etkin olurken (121, 122), ROCK II granzim B aracılı kesilme ile etkin hale getirilmektedir (123). Rho'nun; hücre içerisindeki aktif formu GTP'ye bağlı, inaktif formu ise GDP'ye bağlı olarak bulunur (124). Gen ekspresyonu ve aktin hücre iskeletini kontrol eden sinyal yollarında Rho proteinleri etkilidir. Rho-kinaz'ın stres lif oluşumunu, düz kas kasılmalarını, hücre migrasyon ve poliferasyonunu düzenlediği düşünülmektedir (125). Buna ek olarak ROCK'un apoptozu düzenlediğine dair bilgiler üzerine in vivo ve in vitro olarak yapılan çalışma sayısının arttığı görülmektedir (126). ROCK inhibisyonunun nöroprotektif mekanizması artan bölgesel serebral kan akışı, azalan enflamatuvar yanıt, değişen nöronal aktin hücre iskeletinin polimerizasyonu, tau hiperfosforilasyonu ve p25/CDK5'in artması ile ilişkilidir (127, 128, 129, 130, 131). Ancak az sayıda araştırma ROCK'un serebral iskemi sonrası nöronal apoptoz üzerine etkisini araştırmıştır. Son çalışmalar ise ROCK'un iskemik hasara doğrudan neden olduğunu göstermiştir (132, 133). Fakat, ROCK'un serebral iskemi sonrasında nöronal ölümü nasıl etkilediği konusunda henüz çalışma yoktur (134).

2.6.1. Fasudil

Rho-kinaz enzimini inhibe eden ajanlar arasında, Y-27632, fasudil (HA-1077), hidroksifasudil, Y-32885, Y-39983, H-1152P, SLx-2119, azabenzimidazol-aminofurazanlar (GSK-269962A ve SB772077) ve Wf-536 gibi birçok madde bulunmaktadır (135). Yakın zamanda fasudilin beyin dokusunu iskemik hasara karşı koruduğu bildirilmiştir (128, 136, 137). Başlangıçta hücre içi kalsiyum antogonisti olarak nitelendirilen fasudil, subaraknoid kanamadan sonra ortaya çıkan serebral vazospazmların tedavisinde bir süreliğine Japonya da kullanılmıştır (138). Fasudilin beyinde oluşan damar tıkanıklığına karşı etki gösterdiği mekanizmaların, bölgesel serebral kan akışında artış ve inflamasyon tepkisinde düşüşe neden olduğu düşünülmektedir (128, 137, 139). ROCK blokajıyla indüklenen enflamatuar yanıtların azalması nötrofil migrasyonunun inhibisyonu ile sağlanmaktadır (139). Bununla birlikte in vivo iskemik ataklar sırasında ROCK aktivitesi ve nöronal hücre hasarına bağlı olarak doğrudan bir ilişki olduğunu gösteren rapor bulunmamaktadır.

ROCK aktivitesinin iskemik nöronal hasara doğrudan neden olduğu varsayılan fikir;

- a) Sıçan retinasında NMDA kaynaklı nörotoksite Rho/ROCK yolunun dahil edildiği
- b) İnsalarda fokal serebral infarktta nöronlarda bir Rho ifadesi bulunduğu
- c) Hasarlı nöronlarda aksonal rejenerasyon ile ROCK arasında bir ilişki olduğunu bildiren raporlara dayanmaktadır (140).

Fasudil, özellikle enflamatuar reaksiyonlar ve hemodinamik bozukluk gibi serebral iskeminin başlangıcından sonra sekonder zararlı mekanizmaları hedeflemeye etkilidir.

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

Araştırmada A β peptidi ile nörotoksisite modeli oluşturmak için C8D1-A (fare kökenli astrosit hücre hattı) kullanıldı. Fare menşeyli astrosit C8-D1A hücre hattı, American Type Culter Collection (ATCC)'den alımı yapıldı ve laboratuvarımızda pasajlanarak sıvı azot içinde stokları yapıldı. Astrositler, hücre çeperinde bulunan adezyon molekülleri sayesinde yüzeye yapışarak ve yıldız şeklinde uzantılar oluşturarak büyürler. Gözle göremediğimiz ameboid hareketler gösterirler. Mikroskopta baktığımızda ilk aşamada hücreler oval ve iri çekirdekli olarak görülür. Büyüdükçe uzantılar oluşturur ve çekirdek bölünerek kromatin ipliklere dönüşür. Uzantıların bir ucu nöronlara diğer ucu ise damarlara tutunur ve böylelikle damarlardan nöronların büyümesini ve beslenmesini sağlar. C8-D1A astrosit hücreleri sıvı besi yeri Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) de (medyum) çoğalan hücelerdir. Astrosit C8-D1A hücre hattı %10 oranında inaktive edilmiş fetal sıgır serumu (FBS), %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM sıvı besiyerinde (komple medyum) 37°C, %5 CO₂, ve %95 hava bulunduran steril inkübatörde inkübe edildi. Hücrelerin çoğaltılması için yaklaşık 1x10⁶/ml sayıda hücre 15 ml komple medyum bulunan 75 cm² steril kültür kabına (flask) (T75, Thermo) konularak üç gün süreyle inkübasyona bırakıldı. Besi ortamındaki hücreler 2-3 günde bir kez 1/2 oranında pasajları yapıldı. Pasajlama yaparken Tripsin/EDTA (Sigma) kullanıldı. İlk olarak komple medyum ve Tripsin/EDTA su banyosunda 37°C de 15 dakika bekletildi. Daha sonra güvenlik kabinine alındı ve flasktaki medyumun tamamı atıldı. Böylece hücreler üzerini örten medyumdan arındırıldı. Flaskın içerisinde tabana yapışık halde bulunan hücrelerin üzerine 3 ml Tripsin/EDTA eklendi ve 5 dakika inkübatörde bekletildi. Tripsin/EDTA güçlü bir enzimdir ve hücrelere zarar vermeden hücrelerin tabandan ayrılmasını sağlar. Ayrıca Tripsin/EDTA'nın içinde fenol red vardır. Fenol red ortamın pH dengesini sağlamaktadır. 5 dakika sonunda hücreler inkübatörden alındı ve mikroskopta incelendi. Hücrelerin tabandan ayrıştığı görüldü. Daha sonra hücreler güvenlik kabinine alındı ve üzerine 7 ml komple medyum eklenerek 10 ml'e

tamamlandı. Solüsyonun tamamı 15 ml'lik ependorf tüpe alındı ve 120 relatif santrifüj kuvveti (RCF)'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası hücreler tüpün alt kısmında pelet şeklinde görüldü. Daha sonra üstte kalan medyum atıldı ve birkaç parmak hareketiyle hücre peleti kaldırıldı. Hücreleri dağıtmak ve birbirinen ayırmak için üzerine 10 ml komple medyum konuldu pipetleme işlemi yapıldı. Yeterli pipetleme yapıldıktan sonra solüsyon 5'er ml olmak üzere iki ayrı 75 cm²'lik flaska konuldu. Daha sonra üzerlerine 10'ar ml komple medyum konularak inkübasyona bırakıldı.

Hücre dondurma işlemi Dimethyl Sulfoxide (DMSO) ile yapıldı. 2 flask hücre Tripsin/EDTA ile kaldırıldıktan sonra iki ayrı 15 ml ependorfta 5 dakika 120 RCF'de santrifüj edildi. Bu sırada 15 ml'lik otoklav edilmiş ependorfa 6 ml komple medyum ve üzerine %5 DMSO (0.3ml) konularak bir solüsyon oluşturuldu. Santrifüj sonrası tüplerdeki medyum atılarak hücre peleti hareketlendirildi. DMSO+komple medyum solüsyonunun tamamı 1.tüpe konuldu pipetleme işlemi yapılarak hücrelerin tamamı alındı ve 2. tüpe aktarıldı. İkinci tüpte de pipetleme işlemi yapılarak hücrelerin süspanse hale gelmesi sağlandı. Hücreler dört ayrı 1.8 ml'lik tüpe 1.5 ml olarak eşit miktarda konuldu. Üzerlerine hücre adı, pasaj no, tarih ve isim yazılarak -80 °C'ye bırakıldı. 2 gün sonra ise -152°C'ye kaldırılarak dondurma ve stoklama işlemi tamamlandı.

3.2. MTT Viabilite Testi

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) kullanılarak bir hücre topluluğundaki hücrelerin sayısı spektrofotometrik yöntemle kantitatif olarak hesaplanabilmektedir. Bu yöntem sağlıklı hücrelerde mitokondrial redüktazlar tarafından MTT'nin tetrazolium halkasını parçalayabilmesine dayanmaktadır. Bu reaksiyon mitokondrial bir enzim olan süksinat dehidrogenaz aktivitesine bağlıdır. Sağlıklı hücrelerde tetrazolium halkasının parçalanması üzerine soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşür.

Öncelikle hücreler 25x10³ hücre/kuyucuk/96 well olacak şekilde flaska ekimi yapıldı. 24 saat 37°C de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra A β için (2.5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 80 μ M) doz çalışması yapıldı. Kontrol grubu da dahil olmak üzere altışarlı gruplar halinde 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saatin sonunda MTT çözeltisi

(son konsantrasyon, ortamdaki 1mg/ml stok çözeltisi) her kuyucuğa 100 µl olacak şekilde konuldu ve 37°C’de 1.5 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası MTT solüsyonu kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve kuyucuklara 100’er µl 2-proponol konularak tekrar 1.5 saat inkübasyona bırakıldı. 1.5 saatin sonunda mikropleyt okuyucuda 570 nm dalga boyunda absorbanslar elde edildi. İstatistikler ve literatür taraması sonucu uygun doz 5µM Aβ olarak belirlendi. Fasudil için farklı dozlarda (2.5µM-80µM) MTT yapıldı ve analiz edilen istatistikler sonucunda uygun doz 2,5µM fasudil olarak bulundu.

3.3. RNA İzolasyonu

Hücreler 25 cm² lik flasklara 2x10⁶ olacak şekilde pasajlandı. Bir gün sonra kontrol, Aβ, fasudil ve Aβ+fasudil olarak ilaç uygulaması yapıldı. 24 saatlik inkübasyonun sonunda flasklar güvenlik kabinine alındı ve medyumları boşaltıldı. Üzerlerine 1’er ml Trizol Reagent eklendi. Birkaç dakika bekledikten sonra her bir flask içeriği ependorf tüplere alındı.

Trizol’un içerisinde fenol red vardır ve bu madde uçucu ve zararlıdır. Ayrıca içerisinde guanidyum, timin gibi maddeler vardır ve bu maddeler hücreleri lizis ederek hücre içeriğinin dışarı çıkmasını sağlar. Aynı zamanda proteinleri, RNA ve deoksiribonükleik asit (DNA)’yı ayrıştırır.

Tüplere alınan içerikler 120000 RCF’de 10 dk 4 °C de soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üstte oluşan sıvı ayrı bir ependorfa alındı ve üzerine RNA’yı içeren solüsyondan lipidleri uzaklaştırmak amacıyla 200 µl kloroform eklendi. Daha sonra 15 saniye vortekslendi ve 3 dk oda ısısında bekletildi. Bekleme sonunda 120000 RCF 4°C’de santrifüj edildi. Oluşan üst faz tekrar ayrı bir tüpe alındı. Üzerine 500 µl izopropanol eklendi. Amaç glikojen bağlarını yıkmaktır. İzopropanol eklendikten sonra 10 dk oda sıcaklığında bekletildi ve ardından yine 120000 RCF 4°C de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üstte oluşan faz atıldı, altta kalan RNA peletine 1 ml %75’lik etanol konuldu ve pipetlemeyle peletler çözüldü. Daha sonra 15 saniye vortekslendi ve 7500 RCF 4°C ‘de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra RNA peleti dipte kaldı üstteki alkol atıldı. Kalan alkolü uçurmak için 30 dk oda ısısında yatay konumda kurumaya bırakıldı. Kurumanın sonunda her bir tüpe 20 µl RNaze free water eklendi ve

(OD 260nm ve 280nm’de) RNA/DNA oranıyla saflıkları belirlendi. 1.7 ve üzerinde saflık değeri olanlar çalışmada kullanıldı.

3.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyon (RT-PCR) Analizleri

TNF-a, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, BCL2, BAX, Cas-3, Cas-8 transkripsiyon düzeyleri RT-PCR yöntemi ile belirlendi.

PCR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılmak üzere her bir örneğe ait RNA’dan 1 μ g alınarak önce reverz transkriptaz (RT) ile komplementer DNA (cDNA) sentezi yapıldı. Bu amaçla komplementer DNA kitinin prosedürü uygulandı. Her bir örnek için 10xRT buffer’dan 2 μ l, 25xdNTP mix(100mM)’dan 0.8 μ l, 10xRT random primer’den 2 μ l, multi scribe reverse transkriptase’den 1 μ l ve RNase free water’dan 3.2 μ l ve saflıkları belirlenen RNA’larda 1 μ g olacak şekilde hazırlandı ve aşağıda (Tablo 3.1) verilen sıcaklık ve sürelerde ısı düzenleyici (thermal cycler) cihazında inkübe edildi.

	1. Adım	2. Adım	3. Adım
Sıcaklık	25°C	37 °C	85 °C
Zaman	10 dakika	120 dakika	5 dakika

Tablo 3.1. Çalışmada cDNA sentezi için kullanılan sıcaklık ve süreler.

cDNA eldesi yapıldıktan sonra her bir örneğe ait cDNA ‘dan 1 μ l alınarak yine her bir örnek için 6 μ l SYBR Green master mix (Power SYBR Green PCR master mix 5 ml), bir çift primerin geri ve ileri primerlerinden (Tablo 3.2’de verilen primer sekans dizaynları kullanıldı) 0.3’er μ l ve 4.4 μ l RNase free water konularak uygun tasarım ve protokol hazırlanarak aşağıda (Tablo3.3) verilen sıcaklık ve sürelerde inkübasyona bırakıldı. DNA amplifikasyonu PCR yöntemiyle anlık PCR Applied Biosystems StepOnePlus real-time PCR systems sistemi kullanılarak yapıldı. Amplifikasyon işleminden sonra elde edilen amplifikasyon eğrilerine ait kopya eşiği (Ct) değerleri karşılaştırılarak, hedef genlerin mRNA transkripsiyon düzeylerinin nisbi değişimleri 2-DDCt

metodu ile hesaplandı. Bu hesaplamada; $DDCt = (Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{Bactin}})_{\text{denek}}$

grubu $-(C_{t_{\text{hedef gen}}} - C_{t_{\text{B-actin}}})_{\text{kontrol grubu}}$ formülü uygulandı; hesaplanan değer her bir $-DDC$ gen için 2 konularak mRNA transkripsiyon düzeyi yüzde olarak down- ya da up-regüle şeklinde belirlendi. Her örnek için kontrol gen olarak kabul edilen B-actin geni (housekeeping gen) düzeltme faktörü amaçlı her RNA örneği için reaksiyona tabi tutuldu. Real Time-PCR sisteminde Syber Green boyası çift iplikçikli DNA parçasına bağlanarak elektriksel impuls ile birlikte floresan ışıma yapar ve bu ışıma sistemin lazer dedektörü tarafından alınarak bilgisayar ortamında grafik formatına çevirilir. Ölçülen floresan şiddeti PCR ürünün miktarı ile doğru orantılıdır. Daha sonra gruplar arasındaki farklar grafiklerde verildi.

SİTOKİN	İleri primer (Forward)	Geri primer (Reverse)
B-Actin(Beta aktin)	House keeping gen	
TNF-a(Tümör Nekroze Edici Faktör alfa)	5'-AGCCGATGGGTTGTACCTTGTCTA-3'	5'-TGAGATAGCAAATCGGCTGACGGT-3'
IL-1β (İnterlökin 1 beta)	5'-TTGTGGCTGTGGAGGGGCTGT-3'	5'-AACGTCACACACCAGCAGTT-3'
IL-6 (İnterlökin 6)	5'-ATCCAGTTGCCTTCTTGGGACTGA-3'	5'-TAAGCCTCCGACTTGTGAA GTGGT-3'
BAX (BCL2-ilişkili X protein)	5' - TTCATCCAGGATCGAGCAG A -3'	5'-GCAAAGTAGAAGGCAACG -3'
BCL2 (B-hücre CLL/ lenfoma 2)	5'-ATGTGTGTGGAGAGCGTCA A- 3'	5'-ACAGTTCCACAAAGGCATC C- 3'
(CAS-3) Kaspaz-3	5'GGTATGAGACAGACAGT GG-3'	5'CATGGGATCTGTTTCTTT GC-3'
(CAS-8) Kaspaz-8	5'CTGGGGATGGCCACTGT G-3'	5'TCGCCTCGAGGACATCG CTCTC-3'
IL-12 (interlökin-12)	5-'TGGGTCTATTCCGTTGTG TC-3'	5'-CCAAGAACTTGCAGCTGA AG-3'
IL-10 (interlökin 10)	5'TCAAACAAAGGACCAGC TGGACAACATACTG-3'	5'CTGTCTAGGTCTCTGGAGT CCAGCAGACTCA-3'

Tablo 3.2. Çalışmada RT-PCR ile gen ekspresyon analizlerinde kullanılan primer sekansların listesi.

Yapılan deneyde Applied Biosystems StepONEPlus real-time PCR systems cihazı kullanıldı ve deney süresinde kullanılan protokol aşağıdaki tabloda (Tablo 3.3) verildiği gibi uygulandı.

Sıcaklık	Süre	Aşama	Döngü sayısı
95 °C	5 dakika	İlk denatürasyon	Yalnızca 1 döngü
95 °C	15 saniye	Denatürasyon	40 döngü
60 °C	40 saniye	Bağlanma	
70 °C	45 saniye	Uzama	

Tablo 3.3. Applied Biosystems StepOnePlus real-time PCR Systems cihazı PCR protokolü.

4. BULGULAR

4.1. Spektrofotometrik analizler

4.1.1. Hücre Viabilite Testlerinin İstatistiksel Analizi

<i>Değişken</i>	<i>n</i>	$\bar{X} \pm SD$	<i>M (min-max)</i>	<i>%95 Güven aralığı (mean)</i>	P
Fasudil (2.5µM)	4	79,38±15,85	81,70 [58,60- 95,53]	(54,17-100,00)	*P=0,001
Amiloid Beta(5µM)	5	18,68 ± 2,30	18,92 [16,05-22,13]	(15,83-21,54)	
Fasudil+ Amiloid beta	5	76,60±18,14	79,63 [51,47-98,00]	(54,07-99,12)	

Tablo 4.1. Hücre viabilitesi tek yönlü varyans analiz tablosu

Bağımsız gruplar olarak çalışılan deneme dizaynımızda yüzde değerine göre çalışılan 3 ayrı bağımsız grup arasında istatistiksel açıdan farklılık olup olmadığı Tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) testi ile analiz edilmiştir ve gruplar arasında * (p=0,001) istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur. Daha sonra bu anlamlı farklılığın hangi gruplar arasında olduğuna dair yapılan Tukey testinde (herbir ikili karşılaştırmada) (**Fasudil 2,5 µM ile Amiloid Beta 5 µM**) arasında (**p=0,001**) olarak hesaplanmış olup iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir. Benzer şekilde (**Fasudil Amiloid beta ile Amiloid Beta 5 µM**) arasında (p=0,001) olarak hesaplanmış olup ilgili iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. Son olarak (**Fasudil+ Amiloid beta ile Fasudil 2,5 µM**) arasında (p=0,952) olarak hesaplanmış ve ilgili gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

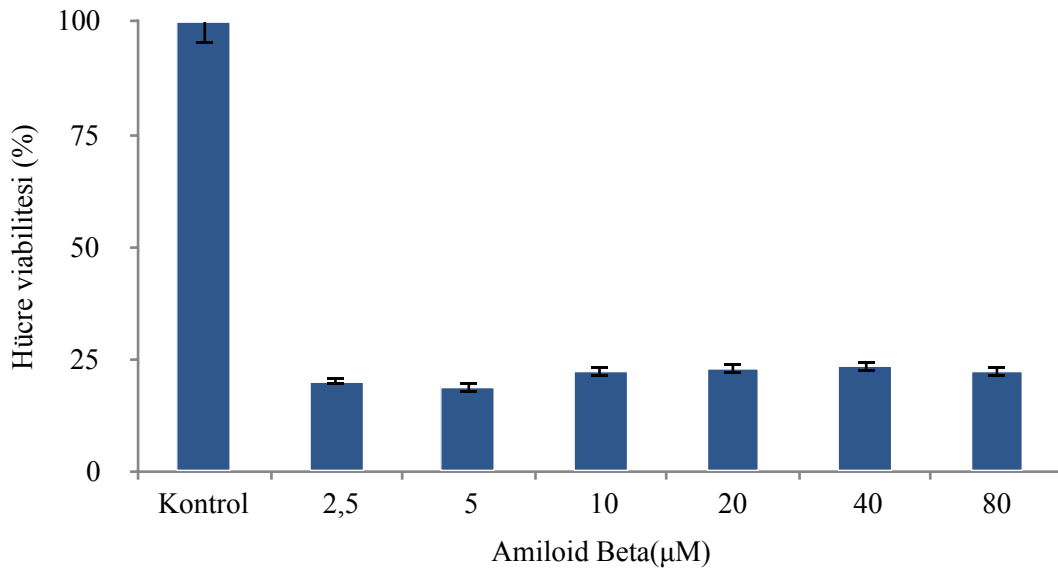
I.grup	II.grup	Ortalama Fark (I-II)	P	%95 güven aralığı
Fasudil 2,5 µM	Amiloid beta 5 µM	60,70090*	0,001	(35,7237 85,6781)
	Fasudil+ Amiloid beta	2,78333	0,952	(-22,1939 27,7606)
Amiloid beta 5 µM	Fasudil 2,5 µM	-60,70090*	0,001	(-85,6781 -35,7237)
	Fasudil+ Amiloid beta	-57,91757*	0,001	(-81,4663 -34,3688)
Fasudil+ Amiloid beta	Fasudil 2,5 µM	-2,78333	0,952	(-27,7606 22,1939)
	Amiloid beta 5 µM	57,91757*	0,001	(34,3688 81,4663)

Tablo 4.2. Hücre viabilitesinin TUKEY testinde (herbir ikili karşılaştırmada) Anlamlılık düzeyleri

Tablo 4.2 de görüldüğü gibi [Fasudil 2,5 µM ile Amiloid Beta 5 µM] arasında istatistiksel anlamlılık hesabı ($p=0,001$) olup iki grup ortalamaları arası fark 60,70 olarak hesaplanmıştır. Benzer şekilde [Fasudil Amiloid beta ile Amiloid Beta 5 µM] arasında istatistiksel anlamlılık hesabı ($p=0,001$) olarak hesaplanmış ve ilgili gruplar arasındaki ortalamalar arası fark 57,92 olarak hesaplanmıştır.

4.1.2. Farklı konsantrasyonlardaki A β 'nın hücre viabilitesi üzerine etkisi

96 kuyucuklu kültür kaplarındaki astrosit hücrelerine (C8-D1A hücreleri) A β 'nın farklı konsantrasyonları (2,5-80 μ M) eklendi ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda MTT metoduyla viabilite kontrolleri yapıldı. Buna göre 5 μ M A β eklenen grupta, canlı hücre sayısı kontrol grubuna göre anlamlı bir düzeyde azaldığı tespit edildi. (Şekil 4.1)

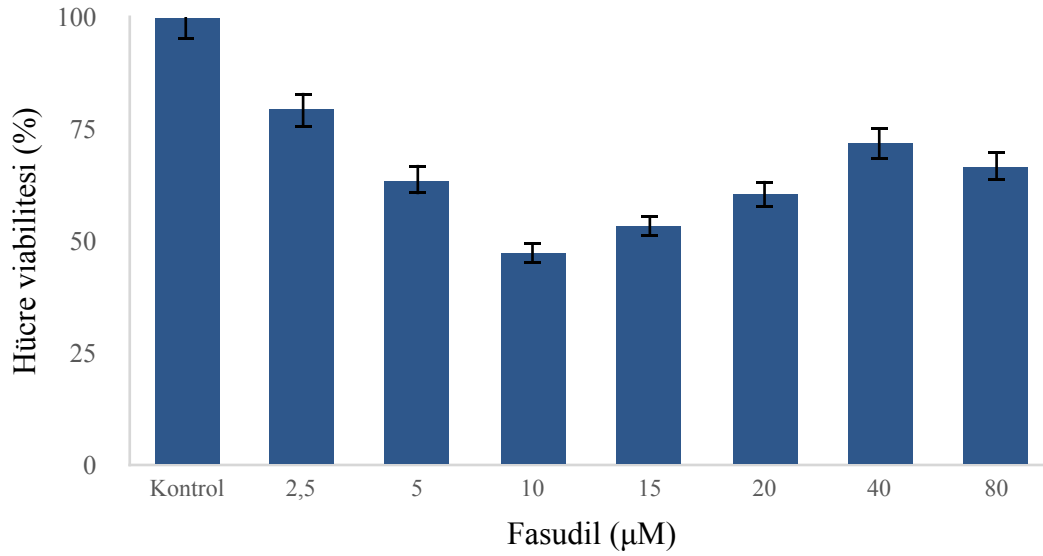


Şekil 4.1. A β 'nın farklı konsantrasyonlarının hücre viabilitesi üzerine etkisi

İnkübasyon sonrası 5 μ M A β eklenen gruptaki hücre kayıpları kontrol grubuna göre önemli oranda artış gösterdiği tespit edildi. ($p < 0.001$). Araştıma süresince A β 'nın 5 μ M'lık konsantrasyonu hücrede stres oluşturmak amacıyla kullanıldı. Kontrol 100 kabul edildi ve viabilite değerleri ise; 2,5 μ M: 20,10, 5 μ M: 18,68, 10 μ M: 22,34, 20 μ M: 22,63, 40 μ M: 23,41, 80 μ M: 22,43 olarak bulundu.

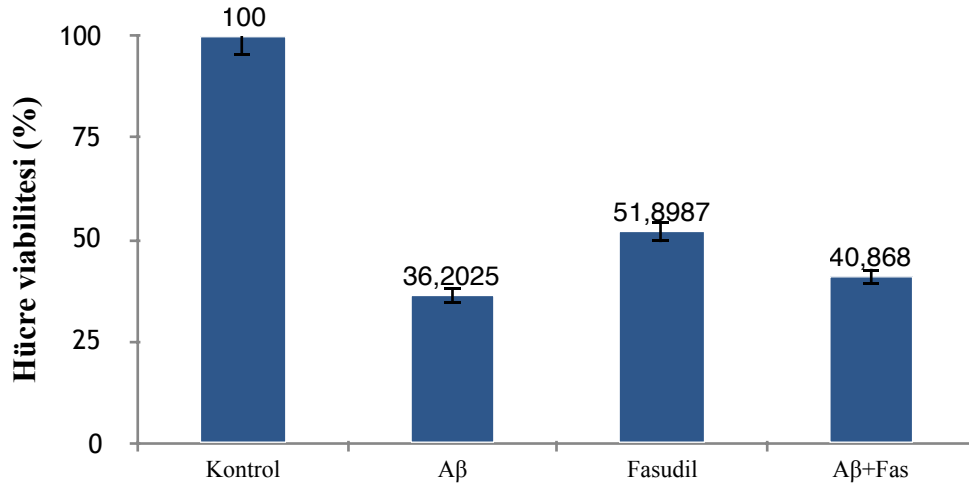
4.1.3. Farklı konsantrasyonlardaki Fasudil'in hücre viabilitesi üzerine etkisi

Astrosit hücrelerinde (96 kuyucuklu kültür kaplarında) farklı konsantrasyonlarda (2,5-80 μ M) Fasudil eklenerek, çalışmada kullanılacak etkili konsantrasyon tespiti için hücre viabilitesi kontrolleri MTT metoduyla değerlendirildi.



Şekil 4.2. Farklı Fasudil konsantrasyonlarının hücre viabilitesi üzerine etkisi

Buna göre 24 saat inkübasyon sonrası 2,5 μ M Fasudil eklenen grupta kontrol grubuna göre belirgin düzeyde azalma (Şekil 4.2) tespit edildi ($p<0.001$). Kontrol 100 kabul edilerek viabilite değerleri; 2,5 μ M: 79,38, 5 μ M: 63,7, 10 μ M: 42,27, 15 μ M: 53,32, 20 μ M: 60,50, 40 μ M: 71,72, 80 μ M: 66,69 olarak belirlendi. En fazla hücre kaybı 10 μ M Fasudil grubunda görülürken en az hücre kaybı 2,5 μ M eklenen grupta görüldü.

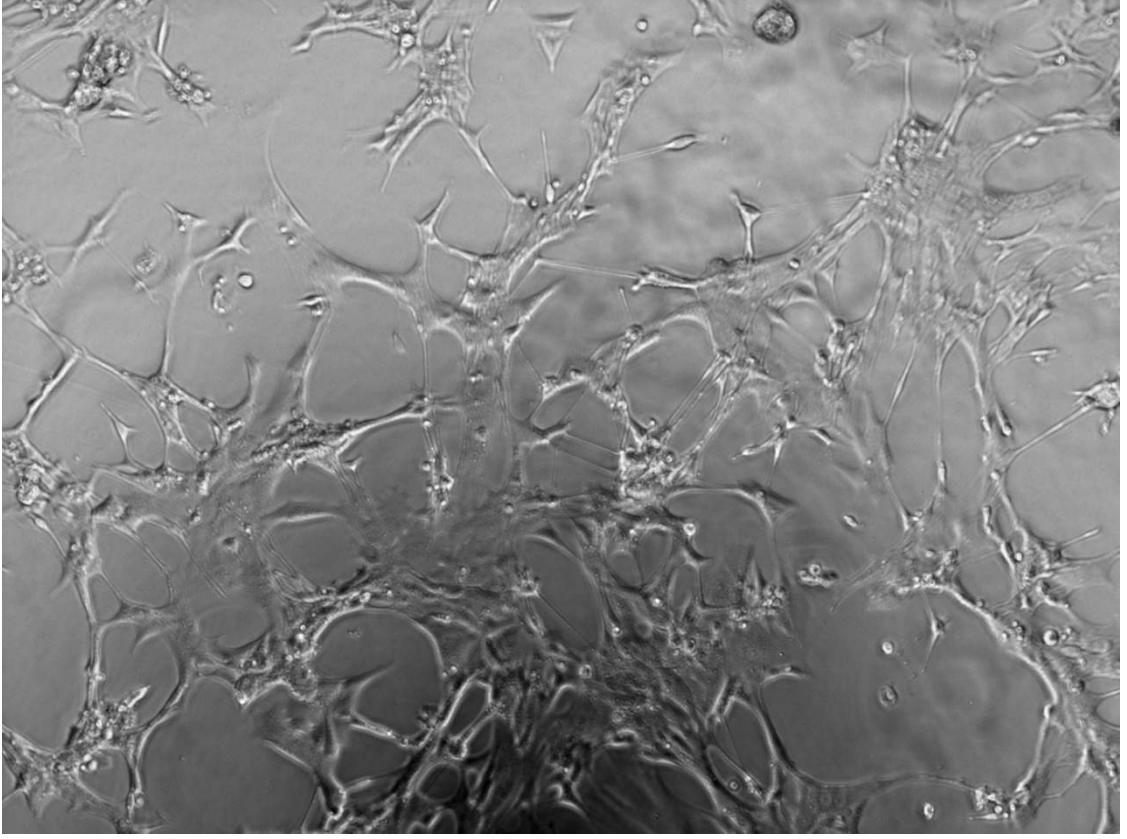


Şekil 4.3. Aβ (5 µM) ile birlikte Fasudil (2,5 µM) konsantrasyonunun hücre viabilitesi üzerine etkisi

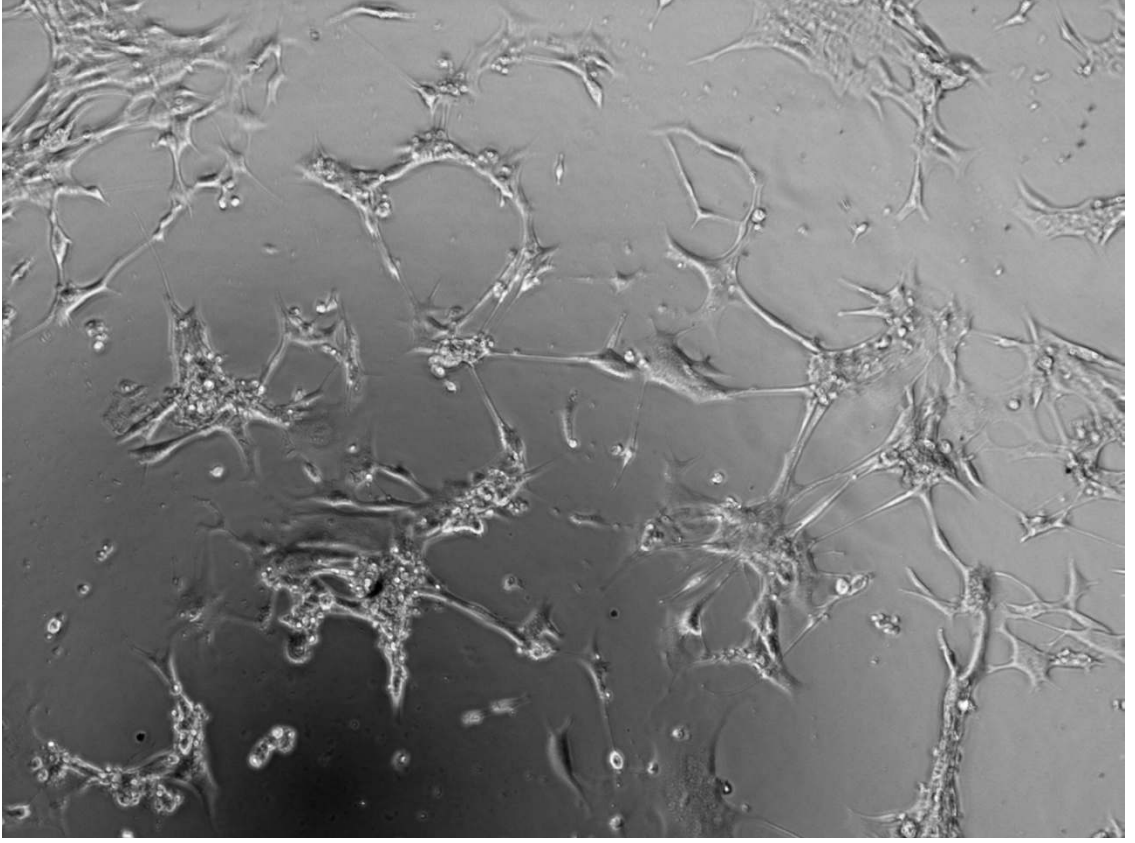
Fasudil'in 2,5 µM konsantrasyonuna Aβ eklenen grupta, yalnız Aβ eklenen gruba göre meydana gelen hücre kayıplarını Fasudil'in önemli düzeyde iyileştirdiği ($76,60 \pm 18,14$) (Şekil 4.3) saptandı ($p < 0.001$). Kontrol 100 kabul edildi ve viabilite değerleri; Aβ 5 µM yaklaşık 36,20, Fasudil 2,5 µM yaklaşık 51,89 ve Aβ+Fasudil ise yaklaşık 40,86 olarak tespit edildi.

4.2. Aβ ile muamele edilen astrosit hücrelerinin morfolojisinde Fasudil tedavisi

Astrosit hücrelerine Fasudil (2,5 µM) ve akabinde Aβ (5 µM) eklenerek 24 saat maruziyeti sağlandı. Süre sonunda elde edilen hücre örneklerinden invert mikroskopun 40X büyütme objektifi ile çekilen fotoğraflar incelendiğinde, hücre ölümlerinin Aβ uygulanan grupta (Şekil 4.5) kontrol grubuna (Şekil 4.4) göre önemli oranda artırdığı, tek başına Fasudil uygulamasında hücre ölümlerinin daha az olduğu (Şekil 4.6) ancak Fasudil tedavisinin (Şekil 4.7) Aβ'nin neden olduğu hücre ölümlerini önemli derecede azalttığı saptandı.



Şekil 4.4. Astrosit hücreleri kontrol grubu 24. Saat mikroskop görüntüleri (40X büyütme)



Şekil 4.5. Astrosit hücreleri A β (5 μ M) eklenen grupta 24. saat mikroskop görüntüleri (40X büyütme)



Şekil 4.6. Astrosit hücrelerine Fasudil (2,5 µM) eklenen grupta 24. saat mikroskop görüntüleri (40X büyütme)



Şekil 4.7. Astrosit hücrelerine A β muamelesi sırasında Fasudil eklenen grupta 24. saat mikroskop görüntüleri (40X büyütme)

4.3. RT-PCR sonuçları

Astrosit hücre kültür ortamına (25 cm² flasklarda) amiloid beta (5 µM) ve takiben (2.5 µM) fasudil eklendi. 24 saatlik inkübasyon sonunda elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi yapılarak belirli genlerin (sitokinlerden TNF- α , IL-12, IL-6, IL-10, IL-1 β ve apoptotik genlerden (Cas-3, Cas-8, BCL-2, BAX) mRNA transkripsiyon seviyeleri spesifik primerler kullanılarak RT-PCR yöntemiyle araştırıldı.

4.3.1. İstatistiksel Sonuçlar

<i>Değişken</i>	<i>n</i>	$\bar{X} \pm SD$	<i>M(min-max)</i>	<i>%95 Güven aralığı ($\bar{X}$)</i>	P
Kontrol	9	1,00 $\pm$ 0,00	[1-1]	(- -)	*P=0,001
Amiloid Beta	9	4,95 $\pm$ 4,30	2,82 [1,93-14,12]	(1,64 8,26)	
Fasudil	9	0,88 $\pm$ 0,34	0,92 [0,17-1,28]	(0,62 1,14)	
AB+Fas	9	0,71 $\pm$ 0,47	0,53 [0,27-1,74]	(0,35 1,07)	

Tablo 4.3. PCR sonuçları tek yönlü varyans analiz tablosu

Bağımsız gruplar olarak çalışılan $\Delta\Delta Cq$ değerinin ortalamaları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık olup olmadığı Tek yönlü Varyans analizi (one-way ANOVA) testi ile analiz edilmiş ve gruplar arasında anlamlılık düzeyinin *(p=0,001) istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yarattığı tespit edilmiştir. Daha sonra bu farklılığın hangi gruplar arasında olduğuna dair yapılan Tek yönlü varyans analizi Post-Doc testlerinden Tukey Testine göre ikili gruplardan [Kontrol-Amiloid Beta] arasında (p=0,003), [Fasudil-Amiloid Beta] arasında (p=0,002) ve [AB+Fas-Amiloid Beta] arasında (p=0,001) istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir.

(I)	(J)	Ortalama Fark (I-J)	%95 Güven Aralığı		P
			Alt Sınır	Üst Sınır	
Kontrol	Amiloid Beta	-3,94889*	-6,7223	-1,1755	0,003
	Fasudil	0,12111	-2,6523	2,8945	0,999
	AB+Fas	0,29111	-2,4823	3,0645	0,992
Amiloid Beta	Kontrol	3,94889*	1,1755	6,7223	0,003
	Fasudil	4,07000*	1,2966	6,8434	0,002
	AB+Fas	4,24000*	1,4666	7,0134	0,001
Fasudil	Kontrol	-0,12111	-2,8945	2,6523	0,999
	Amiloid Beta	-4,07000*	-6,8434	-1,2966	0,002
	AB+Fas	0,17000	-2,6034	2,9434	0,998
AB+Fas	Kontrol	-0,29111	-3,0645	2,4823	0,992
	Amiloid Beta	-4,24000*	-7,0134	-1,4666	0,001
	Fasudil	-0,17000	-2,9434	2,6034	0,998

*(p<0,05)

Tablo 4.4. Tukey Testi Sonuçlarına göre ikili karşılaştırmalar tablosu

Tablo 4.4 de görüldüğü gibi [Kontrol ile Amiloid Beta] arasında istatistiksel anlamlılık hesabı (p=0,003) olup iki grup ortalamaları arası fark -3,95 olarak hesaplanmıştır. Benzer şekilde [Fasudil ile Amiloid Beta] arasında istatistiksel anlamlılık hesabı (p=0,002) olarak hesaplanmış ve ilgili gruplar arasındaki ortalamalar arası fark -4,07 olarak hesaplanmıştır. [AB+Fas ile Amiloid Beta] arasında istatistiksel anlamlılık hesabı (p=0,001) olup iki grup ortalamaları arası fark -4,24 olarak hesaplanmıştır

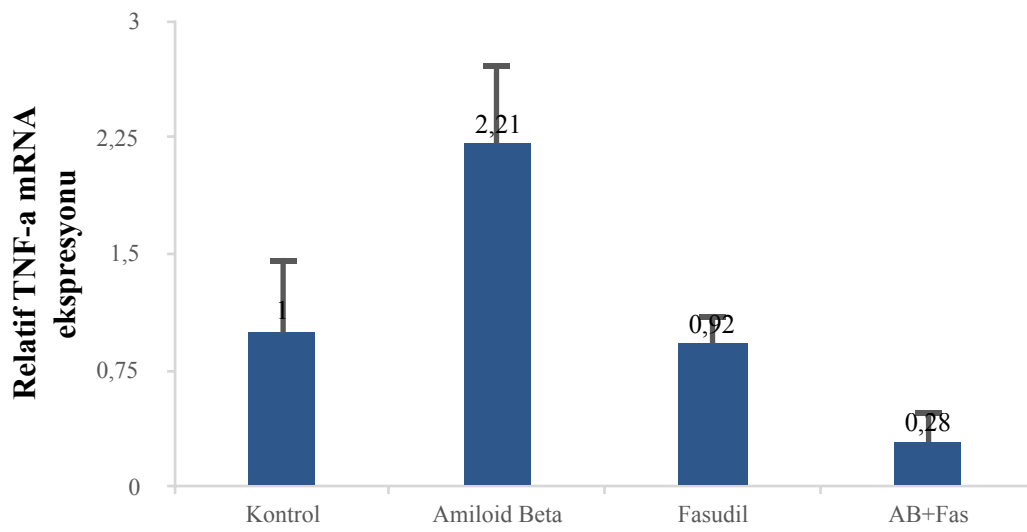
İstatistiksel Detay

Araştırmada elde edilen veriler SPSS 20 (Statistical Package for Social Sciences) programında, One-way Anova varyans analizi yöntemi kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel farklar Tukey testi ile belirlendi. İstatistiksel olarak $p < 0.05$ ve altı önemli kabul edildi. Tanımlayıcı istatistiklerden ortalama $\pm$ standart sapma (S.D) kullanıldı.

Yapılan çalışmada kullanılan istatistik metodlar şu şekildedir. Öncelikle herbir değişkenin $\Delta\Delta C_q$ değerleri bakımından dağılımının Normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile analiz edilmiştir ve değişkenlerin dağılımının Normal dağılıma uygunluğu tespit edilmiştir. Bunun akabinde Tek yönlü varyans analizi ile (one-way ANOVA) testi ile 4 değişkenimizin istatistiksel olarak ortalamalar bakımından anlamlı bir fark gösterip-göstermediği sınanmıştır. Son olarak bağımsız değişkenlerde rastlanan farklılığın hangi gruplar arasında olduğuna Tek yönlü varyans analiz testinin Post-doc testi olan Tukey testi ile analiz edilmiştir.

4.3.2. TNF- α mRNA ekspresyonu

Çalışmadan yaklaşık 24 saat önce 25 cm²'lik flasklara bölünen astrosit hücreleri üzerine 5 μ M düzeyinde amiloid beta ve takiben 2.5 μ M fasudil ilave edilerek 24 saatlik inkübasyonları sağlandı, bu süre sonunda elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi yapıldı ve yangı öncülü bir sitokin TNF- α mRNA ekspresyon seviyeleri RT-PCR yöntemiyle araştırıldı.

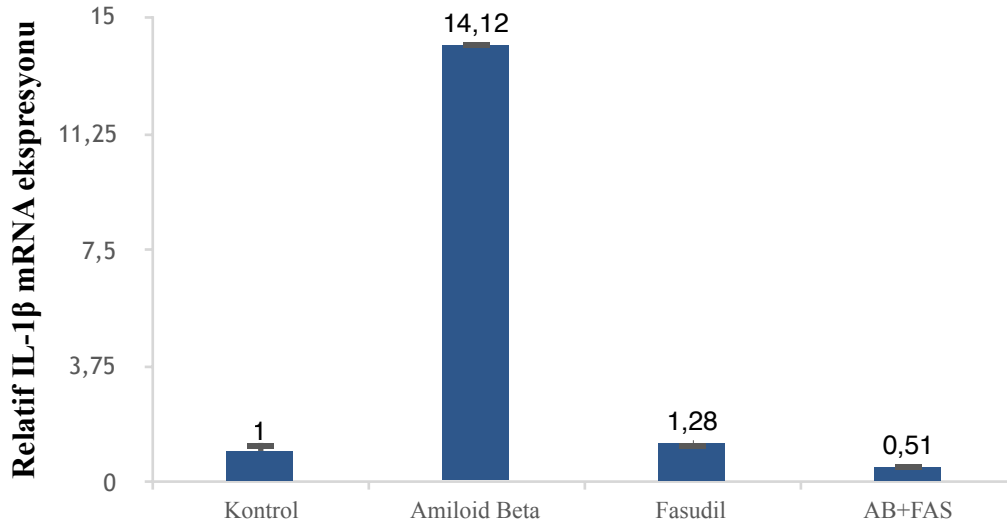


Şekil 4.8. TNF- α mRNA ekspresyon seviyeleri (24 saat).

TNF- α mRNA ekspresyon seviyesinin amiloid beta eklenen grupta kontrol grubuna göre %221 uyarıldığı ancak fasudil tedavisinin bu uyarılmayı %28 iyileştirdiği saptandı (Şekil 4.8).

4.3.3. IL-1 β mRNA ekspresyonu

25 cm²'lik flasklarda büyütülen hücreler amiloid beta ve fasudil eklenerek inkübasyona bırakıldı. 24 süre sonunda elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi yapıldı. Yangı öncülü sitokinlerden olan IL-1 β ekspresyon seviyeleri RT-PCR yöntemiyle analiz edildi.

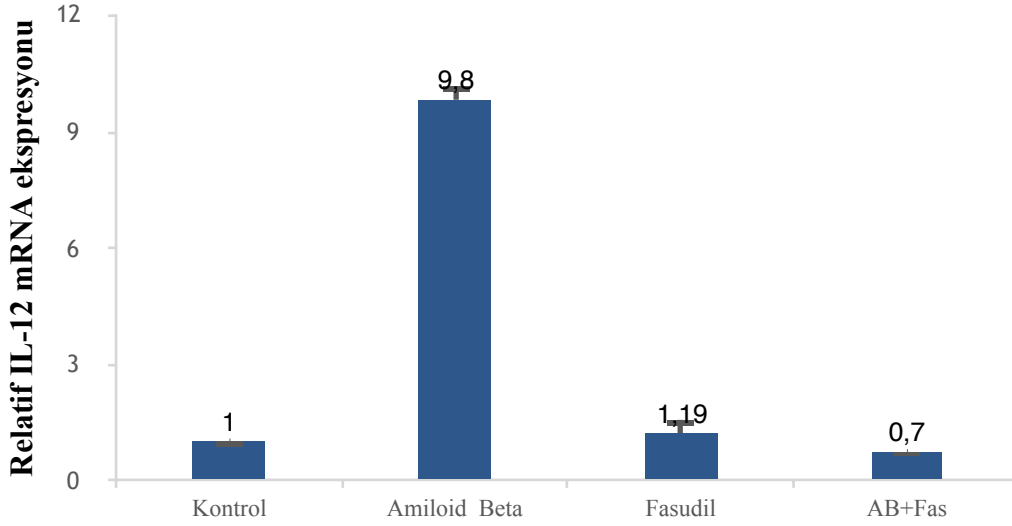


Şekil 4.9. IL-1β mRNA ekspresyon seviyeleri (24 saat)

Buna göre; IL-1β mRNA ekspresyon seviyeleri, amiloid beta eklenen grupta kontrol grubuna göre %177 uyarıldığı, ancak amiloid beta muamelesi ile birlikte eklenen fasudilin bu artışı %51 iyileştirdiği saptandı (Şekil.4.9).

4.3.4. IL-12 mRNA ekspresyonu

Astrosit hücrelerine amiloid beta ve akabinde fasudil eklendi. 24 saat inkübasyon sonrasında elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi yapıldı. Yangı başlatıcı sitokinlerden olan IL-12 mRNA ekspresyon seviyeleri RT-PCR yöntemiyle analiz edildi.

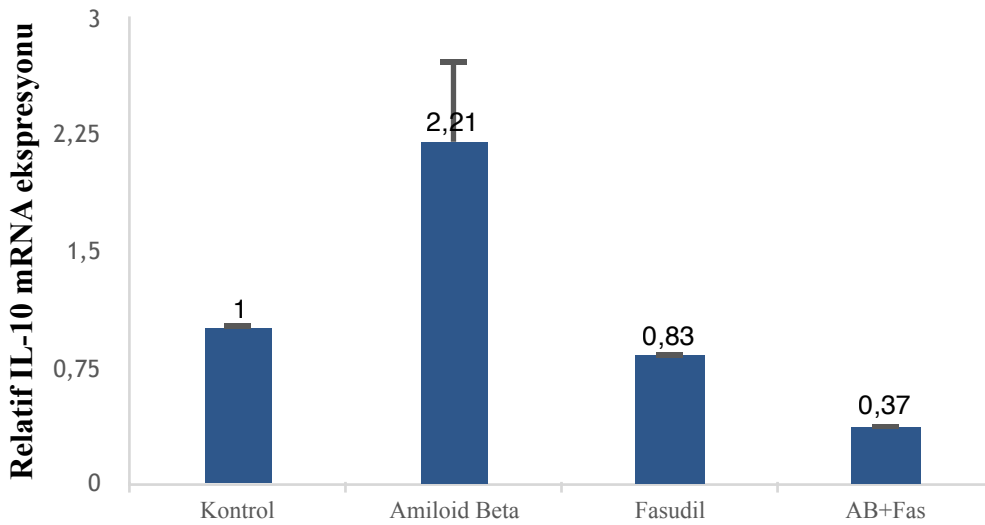


Şekil 4.10. IL-12 mRNA ekspresyon seviyeleri (24 saat)

Buna göre; IL-12 geni mRNA ekspresyonu, amiloid beta eklenen grupta kontrol grubuna göre %98 uyarıldığı, ancak fasudil muamelesi sonrası amiloid beta eklenen grupta bu artışın fasudil tarafından %70 baskılandığı saptandı (Şekil 4.10).

4.3.5. IL-10 mRNA ekspresyonu

25 cm'lik hücre kültür kaplarında büyütülen astrosit hücrelerine amiloid beta ve fasudil eklenerek inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonunda elde edilen RNA örneklerinde cDNA sentezi yapıldı. Anti-enflamatuar bir sitokin olan IL-10 mRNA ekspresyon seviyeleri RT-PCR yöntemiyle analiz edildi.

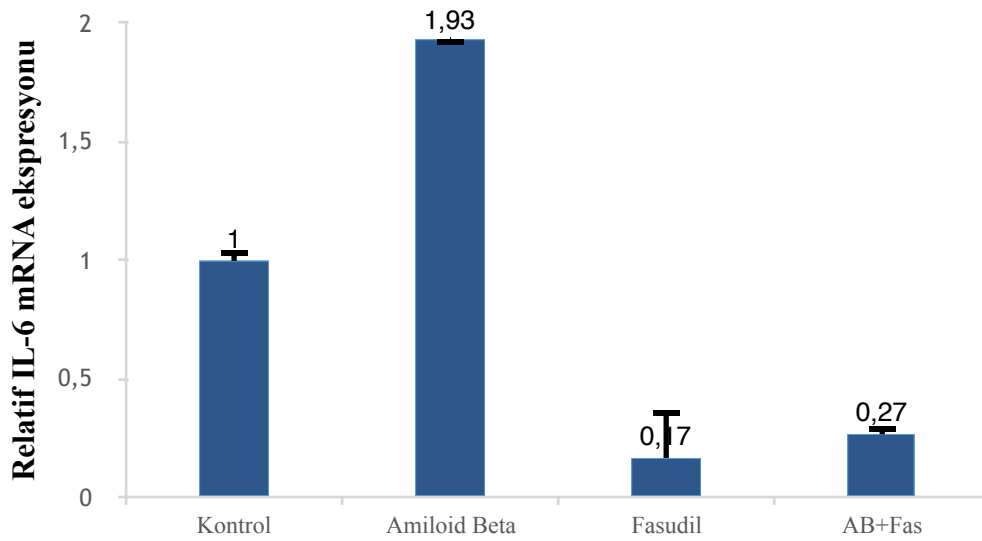


Şekil 4.11. IL-10 mRNA ekspresyon seviyeleri (24 saat)

Buna göre; IL-10 geni mRNA ekspresyonu, amiloid beta uygulanan grupta kontrol grubuna göre %221 uyarıldığı, ancak fasudil uygulmasının amiloid beta uygulanan gruptaki artışı %37 baskıladığı saptandı (Şekil 4.11).

4.3.6. IL-6 mRNA ekspresyonu

Astrosit hücrelerine amiloid beta ve fasudil eklendi. 24 saat inkübasyonun sonunda elde edilen RNA örneklerinde cDNA sentezi yapıldı. Beta-amiloid peptidin indüklediği sinir hasarını artırdığı bilinen bir sitokin olan IL-6 ekspresyon seviyeleri RT-PCR yöntemiyle analiz edildi.

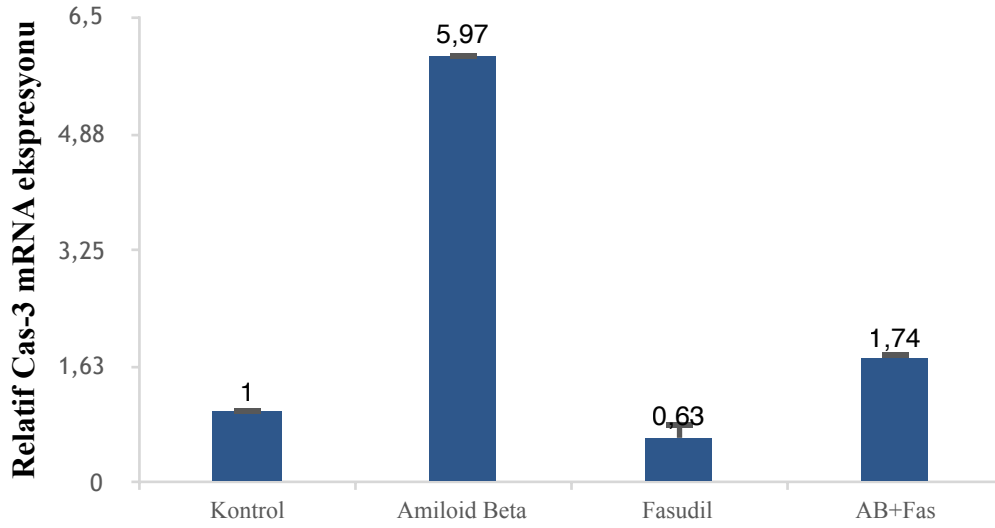


Şekil 4.12. IL-6 mRNA ekspresyon seviyeleri (24 saat)

Buna göre; IL-6 geni mRNA ekspresyon seviyesi, amiloid beta uygulanan grupta kontrol grubuna göre %193 uyarıldığı, ancak amiloid beta ile birlikte fasudil eklenen grupta bu artışı fasudilin %27 baskıladığı saptandı (Şekil 4.12).

4.3.7. Kaspaz-3 mRNA ekspresyonu

25 cm'lik flasklarda çoğaltılan astrosit hücrelerine amiloid beta ve fasudil eklendi. 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası elde edilen RNA örneklerinde cDNA sentezi yapıldı. Apoptotik bir gen olan Cas-3 ekspresyon seviyelerine gerçek zamanlı PCR metoduyla analiz edildi.

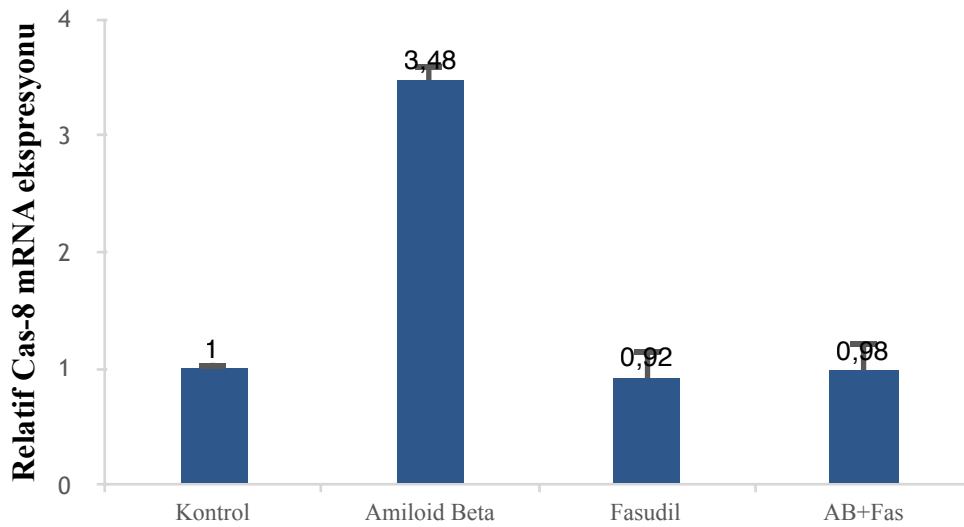


Şekil 4.13. Cas-3 mRNA ekspresyon seviyeleri (24 saat)

Buna göre; Cas-3 geni mRNA ekspresyon seviyesi, amiloid beta uygulanan grupta kontrol grubuna göre %278 arttığı, ancak fasudil eklenen grupta bu artışın %174 baskılandığı saptandı (Şekil 4.13).

4.3.8. Kaspaz-8 mRNA ekspresyonu

Amiloid beta ve fasudil ile muamele edilen astrosit hücreleri inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonunda elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi yapıldı. Apoptozun devam ettirilmesinde rolü olan Cas-8 geni ekspresyon seviyelerine RT-PCR metoduyla analiz edildi.

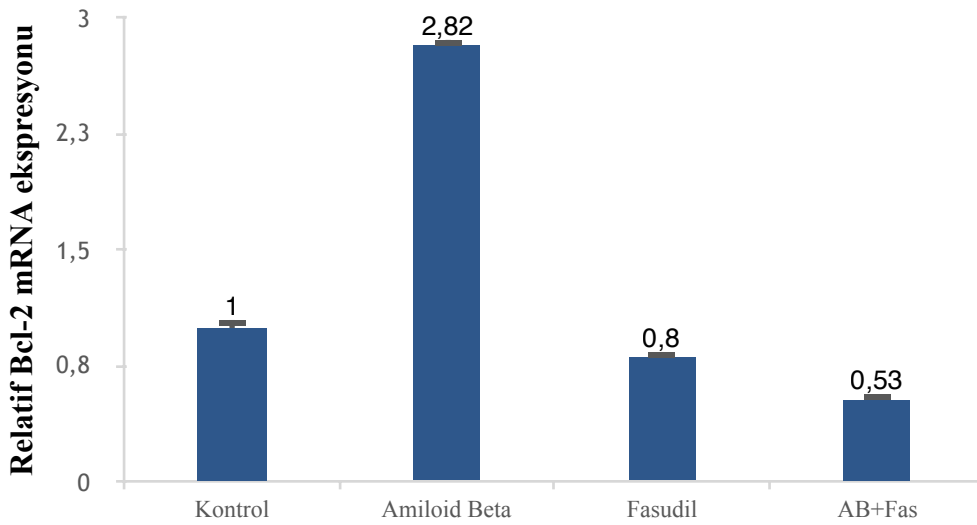


Şekil 4.14. Cas-8 mRNA ekspresyon seviyeleri (24 saat)

Buna göre; Cas-8 geni ekspresyonu, amiloid beta eklenen grupta kontrol grubuna göre %348 uyarıldığı, ancak amiloid beta ile indüklenen gruba eklenen fasudilin bu artışı %110 baskıladığı saptandı (Şekil 4.14).

4.3.9. Bcl-2 mRNA ekspresyonu

24 saat boyunca amiloid beta ve fasudil ile inkübasyona bırakılan astrosit hücrelerinden elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi yapıldı. Anti-apoptotik Bcl-2 geninin ekspresyon seviyelerine RT-PCR yöntemiyle analiz edildi.

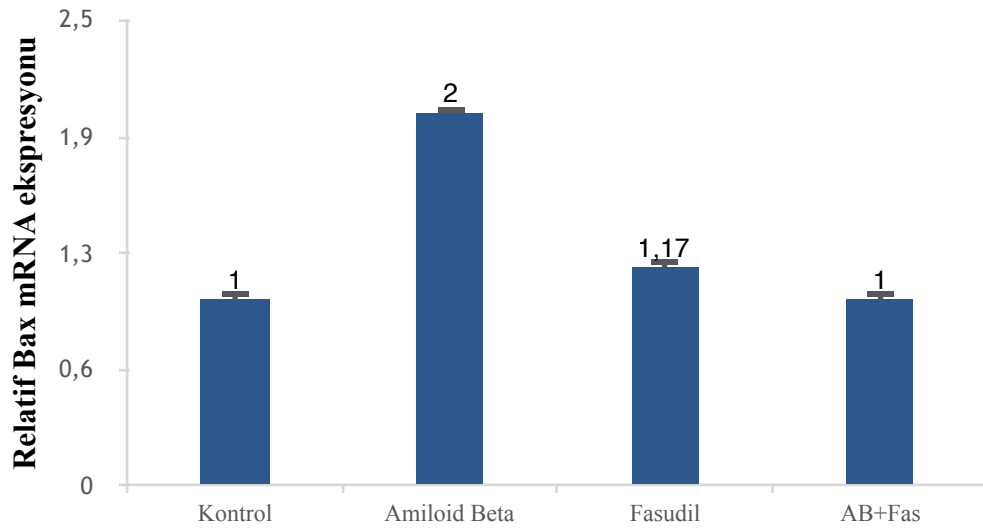


Şekil 4.15. Bcl-2 geni mRNA ekspresyon seviyesi (24 saat)

Buna göre; Bcl-2 geni ekspresyon seviyesinde, amiloid beta eklenen grupta kontrol grubuna göre %282 artışa neden oldu. Ancak amiloid beta uygulanan gruba eklenen fasudilin bu artışı %53 baskıladığı saptandı (Şekil 4.15).

4.3.10. Bax mRNA ekspresyonu

Astrosit hücreleri 25 cm'lik kültür kaplarında çoğaltıldı. Amiloid beta ve fasudil eklendikten sonra 24 saat inkübasyona bırakıldı. Elde edilen RNA örneklerinde cDNA sentezi yapıldı. Bax geni ekspresyon düzeylerine gerçek zamanlı PCR metoduyla analiz edildi.



Şekil 4.16. Bax mRNA ekspresyon seviyesi (24 saat)

Buna göre; Amiloid beta uygulanan grupta kontrol grubuna göre Bax geni ekspresyon seviyesinde %200 artış gözlemlendi. Ancak fasudil ve amiloid beta'nın birlikte uygulandığı grupta fasudilin bu artışı %100 baskıladığı saptandı (Şekil 4.16).

BEŞİNCİ BÖLÜM

5. TARTIŞMA

Alzheimer hastalığı ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır ve yaşlılarda demansın en yaygın nedenidir. Alzheimer hastalığının insidansı hızla artmakta ve gelişmiş ülkelerde Alzheimer hastalığı dördüncü ölüm nedenine dönüşmektedir (142, 143). Alzheimer hastalıklı beyinlerin ortak özelliği; senil plaklar, beta-amiloidin birikimiyle meydana gelen amiloid plaklar ve hiperfosforile tau proteininin oluşturduğu nörofibriller yumaklardır. Rho GTPaz aktivitelere aracılık eden ve serin/treonin kinazlardan biri olan Rho kinaz (ROCK), ROCK1 ve ROCK2 olmak üzere iki aile üyesinden oluşur (144). Aktin sitoskeletonun düzenlenmesindeki tipik etkisinin yanı sıra, ROCK'un hücre göçü, kemotaksis, adezyon, reaktif oksijen türü oluşumu ve apoptozda kritik bir rol oynadığı bildirilmiştir (145). ROCK'u inhibe etmek nöroenflamasyonu ve daha ileri nöronal hasarı önlemek için faydalıdır. Fasudil güçlü bir ROCK inhibitörüdür. Bu tez çalışmasında fare kökenli astrosit hücreleri kullanılarak A β ile oluşturulmuş Alzheimer modeline ve enflamasyona karşı Fasudil'in etkinliği araştırıldı.

Astrositlerin insan nöral hücrelerinin %30 ila 50'sini temsil ettiği tahmin edilmektedir (146) ve uzun süredir nöronlar için trofik ve metabolik destek sağladığı kabul edilmektedir. Alzheimer hastalığı olan beyinde astrosit morfolojisinde, gen ekspresyonunda, protein kompozisyonunda ve aktivitede astrosit fonksiyonundaki değişikliklere bağlı farklılıklar vardır (147). Önemli olan: sinapslarda fosforile tau'nun varlığı ile birlikte astrosit aktivasyonu, AH'deki bilişsel düşüşün en iyi biyolojik korelasyonlarından biridir. (148). Astrogliosis, nitrik oksit (NO), reaktif oksijen türleri, pro-enflamatuvar sitokinler (TNFa, IL-1 β ve IL-6 gibi) ve prostaglandin salınımı da dahil olmak üzere bir dizi hücresel olay ile ilişkilidir. Son yıllarda yapılan araştırmalar, astrositlerin A β tarafından aktive edildiğini ve bu da AH hücre modellerinde sinaptik ve nöronal sağlığı bozan enflamatuvar faktörlerin salındığını ortaya koymuştur (149, 150, 151). Önemli olan, astrositler A β 'nın tau fosforilasyonuna ve bölünmesi üzerindeki etkilerine aracılık etmek zorundadır ve bu, IL-1 β , TNFa ve IL-6 da dahil olmak üzere enflamatuvar mediyatörlerin salınımına bağlıdır (150).

Yapılan deneysel kanıtlar; nöroinflamasyonun basit 'seyirci' bir patoloji olmasından ziyade, AH'nin gelişiminde ve ilerlemesinde aktif rol oynadığını göstermektedir (152,

153). Aβ'nın iltihaplı sinyal iletiminin indüksiyonu ile birlikte astrositlerin ve mikrogliaların aktivasyonuna neden olduğu bilinmektedir (149, 150). Hem mikroglia hem de astrositler farklı koşullar altında sayısız pro ve antienflamatuvar sitokin salgılar. Hücresel çevredeki değişiklikler, iyi tanımlanmamış veya öngörülemeyen çeşitli cevaplar ortaya çıkarmaktadır ve muhtemelen, hastalık modellerinde glial stimülasyonun hem koruyucu hem de nörotoksik etkilerinin raporlarını içermektedir (150, 154).

Bu çalışmada Aβ uyarımlı inflamasyondaki hücre ölümüne karşı Fasudil'in etkinliği araştırıldı. Bu amaçla Aβ aracılı Alzheimer modeli oluşturularak hücre canlılık testleri yapıldı. Astrosit hücrelerine 5 µM Aβ 24 saatlik inkübasyonu sonrası hücre viabilite kontrolleri incelendiğinde, Aβ eklenen grupta kontrol grubuna göre anlamlı hücre ölümünün şekillendiği, ancak 2,5 µM fasudil ile birlikte Aβ maruziyeti eklenen grupta ise bu hücre kayıplarının anlamlı derece giderildiği gösterildi. Satoh ve ark. (2006) (155) Fasudil'in gecikmeli uygulamasının gerbil hipokampusunun CA1 bölgesindeki iskemi kaynaklı hücre kaybı üzerine etkisini araştırmışlardır ve edvaron (3, 10 mg/kg) ile oluşturulan gecikmiş iskemik nöron hasarına karşı Fasudil'in (10 mg/kg) koruyucu etkinliğini göstermişlerdir.

Yangı (inflamasyon) yüksek yapılı organizmaların patojenler, fiziksel etkiler ve birçok kimyasal maddenin dokularda oluşturduğu hasara karşı geliştirdiği savunma mekanizmasıdır. Sitokinler yangının başlaması ve devamını sağlayan proteinlerdir.

TNF-α pro-enflamatuvar bir sitokindir. Son yıllarda yapılan çalışmalar AH'nin patogeneğinde TNF-α'nın rolünü incelemiştir. IL-1β, in vivo akut nöroenflamatuvar süreçlerin detaylandırılmasında yakından yer alır. Aβ tarafından indüklenen proenflamatuvar sitokinler, pro-apoptotik ve sinaptotoksik etkilere neden olabilir ve bu nöronlar için son derece toksiktir (156). Dahası, inflamasyonun agregasyona uğramış Aβ ve senil plakların oluşumunda katkıda bulunan bir faktör olabileceğini gösteren kanıtlar vardır ve bu nedenle AH patolojisinde önemli bir rol oynamaktadır (157). Dolayısıyla, Aβ ile indüklenen proenflamatuvar sitokin üretimini inhibe etmek, AH'nı önleme ve tedavi için ilaçların geliştirilmesinde cazip bir stratejidir. Yung Son ve ark. (2013) (158) yaptığı bir çalışmada ratların hipokampusuna Aβ ile enjekte edilen

Fasudil'in ROCK inhibisyonunu sağlayarak IL-1 β ve TNF- α artışını ELISA yöntemiyle yaptıkları sitokin deneyinde göstermişlerdir.

İnterlökin-6 (IL-6) başlangıçta B hücresi farklılaşma faktörü olarak tanımlanan ve B hücrelerinin antikor üreten hücrelere dönüşmesini tetikleyen bir sitokindir. IL-6 sinir sistemi de dahil olmak üzere başlıca fizyolojik sistemlerde birçok kritik rol alır. Alzheimer hastalığında (AH), plaklarda IL-6 immünreaktivitesi daha önceden bulunmuştur (159). Daha yakın zamanlarda, yüksek konsantrasyonlarda IL-6, AH olan beyinlerde biyokimyasal olarak tespit edilmiştir (160). Dahası, IL-6'nın transgenik farelerde amiloid patolojisinin yokluğunda nörodejenerasyona neden olduğu gösterilmiştir (161). İnterlökin-12 yardımcı T lenfositlerinin farklılaşmasını ve aktivasyonunu sağlayan bir sitokindir (162). İnterlökin-10 antienflamatuvar bir sitokindir.

Apoptozun nöronal ölümle sonuçlanan birincil mekanizmalardan biri olabileceği öne sürülmüştür (163). Apoptoz, sitoplazmik ve nükleer proteinlerin proteolitik bozunumuna, nükleer yoğunlaşmaya, DNA bozunumuna ve nihayetinde hücre ölümüne aracılık eden kaspazların aktivasyonuna yol açan mitokondriyal disfonksiyon ile karakterize edilir (164). Apoptotik programdaki başlıca uygulayıcılar kaspazlar olarak bilinen proteazlardır (sisteine bağımlı, aspartat özgü proteazlar) (165, 166). Kaspazlar, aktive edildiğinde hücresel altyapının ana bileşenlerini yok ederek ve hücrelere zarar verecek faktörleri aktive ederek ölüm programını başlatan latent öncülerdir. D'Amelio ve ark. (2011) (167) çalışma öncesi yaptıkları araştırmada insan APP'lerini barındıran ailesel Alzheimer hastalığına bağlı mutant alel Tg2576 transgenik fare modelinin hipokampal sinaplarındaki kaspaz-3 aktivitesini analiz etmişlerdir ve Amiloid plak birikimi saptanabilir hale gelmeden önce 3. ayda Tg2576 hipokampus sinapslarında kaspaz-3 aktivitesinin arttığını bulmuşlardır (168). Bcl-2 mitokondriyal membranlarda bulunan bir proteindir. Oksidatif stres de dahil olmak üzere çok çeşitli apoptotik uyarılara karşı hücreleri koruma yeteneğine sahiptir. Bcl-2, Alzheimer hastalarında DNA hasarına sahip nöronlarda yukarı-regüle edilir, ancak yumak olan nöronlarda aşağı-regüle edilir (169). Bcl-ilişkili X proteini, Bcl-2 ailesinin bir üyesidir. Bax, Bcl-2 proteini ile kapsamlı amino asit dizilimi homolojisine sahiptir (170) ve merkezi ve

periferik sinir sisteminin nöronlarında eksprese edilir (171). Bax proteinin aşırı ekspresyonunun apoptotik hücre ölümünü indüklediği bilinmektedir (170). Bu çalışmada kullanılan astrosit hücrelerin 24 saat süresince A β ile maruziyeti bazı yangı öncülü sitokinlerden IL-1 β , TNF- α , IL-12, IL-6, IL-10'un ve bazı apoptotik genler cas-3, cas-8, Bcl-2 ve Bax'ın ekspresyon seviyeleri analiz edildi. Buna göre; A β 'nın bu sitokinlerin ekspresyon seviyelerini önemli derecede artırdığı saptandı. Bu sonuçlar ve daha önce yapılan çalışmalar Fasudil'in Alzheimer hastalığında tedavi edici bir ajan olabileceğini göstermektedir.

ALTINCI BÖLÜM

6. SONUÇ

Sonuç olarak; C8-D1A fare astrosit hücrelerinde A β uyarımlı enflamasyon modelinde Rho-kinaz inhibitörü olan Fasudil'in anti-enflamatuvar etkinliği araştırıldı. A β 'nın enflamasyonu etkin bir şekilde uyatarak yoğun hücre kayıplarına sebep olduğu saptandı. Fasudil ise Amiloid beta'nın meydana getirdiği bu olumsuz tabloyu, etkin bir şekilde giderdiği, bu araştırma sonuçlarına göre tespit edildi. Bu durumda Fasudil'in amiloid beta aracılı enflamasyonun baskılanması üzerine koruyucu etkisi ile tedavide kullanılacak bir ajan olabileceği düşünülebilir. Bu tez çalışmasında alınan sonuçlar; in vitro koşullarda Fasudil'in Alzheimer hastalığında farmakolojik bir yaklaşım olup olmadığı konusunda sonraki yapılacak kapsamlı çalışmalar için bir kaynak olarak kullanılabileceği gibi, aynı zamanda literatürdeki boşlukların doldurulmasına da büyük katkılar sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Gilman S. Alzheimers disease. *Perspect Biol Med*. 1997;40(2):230-45.
2. Lleó A, Greenberg SM, Gowdon JH. Current pharmacotherapy for Alzheimers disease. *Annu Rev Med* 2006;57:513-33
3. Feri CP, Prince M, Brayne C. , et al. Global prevalence of demantia:a Delphi consensus study. *Lanset* 2005; 366:2112-7.
4. Katzman R, Saitoh T. Advances in Alzheimer's disease. *FASEB J* 1991; 5: 278-86.
5. Taneli B, Sivrioğlu Y, Taneli T. Alzheimer disease. In: H Aydın, İT Uzbay eds. *Gülhane Psychopharmacology Symposium*. 1. Basım. Ankara: Gülhane Millitary Medical Academy Printing Office; 1999: 31-80
6. Öztürk GB, Karan MA. Alzheimer hastalığının fizyopatolojisi. *Klinik Gelişim Dergisi* 2009; 22/3: 36-45
7. Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 120:885-90
8. Masters CL, Simms G, Weinman NA, et al. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985; 82 4245-9.
9. Clarkson AN, Sutherland BA, Appleton I. The biology and pathology of hypoxia-ischemia: an update. *Arch Immunol Ther Exp*. 2005; 53: 213-25.
10. Ramirez MR, Muraro F, Zylbersztejn DS, Abel CR, Arteni NS, Lavinsky D, et al. Neonatal hypoxia-ischemia reduces ganglioside, phospholipid and cholesterol contents in the rat hippocampus. *Neuroscience Research*. 2003; 46(3): 339-47.
11. Benveniste EN, Nguyen VT, O'Kecfe GM. Immunological aspects of microglia: relevance to Alzheimer's disease. *Neurochem Int*. 2001; 39:381-91.
12. Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, et al. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2000; 21: 383-421.

13. Kara İ, Müdüroğlu A. İnflamasyon ve Norodejeneratif Hastalıklar. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2008; 28(Suppl): 115-8.
14. Leung T, Manser E, Tan L, Lim L. A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. J Biol Chem 1995; 270: 29051-4
15. Samanta MK, Wilson B, Santhi K, Kumar KP, Suresh B. Alzheimer disease and its management: a review. Am J Ther 2006; 13(6): 516-26.
16. Friedlander AH, Norman DC, Mahler ME, Norman KM, Yagiela JA. Alzheimer's disease: psychopathology, medical management and dental implications. J Am Dent Assoc 2006; 137(9): 1240-51.
17. Kelley BJ, Petersen RC. Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. Neurol Clin 2007; 25(3): 577-609.
18. Lewy-Lahad E and Bird TD. Genetic factors in Alzheimer's disease: a review of recent advances. Ann Neurol 1996; 40:829-84
19. Wang XP, Ding HL. Alzheimer's disease: epidemiology, genetics, and beyond. Neurosci Bull 2008; 24(2): 105-9.
20. Williamson J, Goldman J, Marder KS. Genetic aspects of Alzheimer disease. Nippon Rinsho 2009; 67(4): 835-44.
21. Ertekin Taner N. Genetics of Alzheimer's disease: a centennial review. Neurol Clin 2007; 25(3): 611-67.
22. Maccioni RB, Muñoz JP, Barbeito L. The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. Arch Med Res 2001; 32(5): 367-81.
23. Edelberg HK, Wei JY. The biology of Alzheimer's disease. Mech Ageing Dev 1996; 91(2): 95-114.
24. Kok E, Haikonen S, Luoto T, Huhtala H, Goebeler S, et al. Apolipoprotein E-dependent accumulation of Alzheimer disease-related lesions begins in middle age. Ann neurol 2009; 65(6): 650-7.
25. Edelberg HK, Wei JY. The biology of Alzheimer's disease. Mech Ageing Dev 1996; 91(2): 95-114.

26. Baysal Aİ, Yeşilbudak Z. Alzheimer Hastalığı'nın Klinik Bulguları. Türkiye Klinikleri Nöroloji Dergisi 2003; 1(1): 1-5.
27. Lopes JP, Oliveira CR, Agostinho P. Cell cycle reentry in Alzheimer disease: a major neuropathological characteristic? Curr Alzheimer Res 2009; 6(3): 205-12.
28. Duyckaerts C, Panchal M, Delatour B, Potier MC. Morphologic and molecular neuropathology of Alzheimer's disease. Ann Pharm Fr. 2009;67(2):127-35.
29. Octave JN, Pierrot N. Alzheimer's disease: cellular and molecular aspects. Bull Acad Natl Med 2008;42(8):467-74.
30. Chung SH. Aberrant phosphorylation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. BMB Rep 2009;42(8):476-74.
31. Mohandas E, Rajmohan V, Raghunath B. Neurobiology of Alzheimer's disease. Indian J Psychiatry 2009;51(1):55-61.
32. Hooper NM. Roles of proteolysis and lipid rafts in the processing of the amyloid precursor protein and prion protein. Biochem Soc Trans 2005;33(Pt 2):335-8.
33. Kolev MV, Ruseva MM, Harris CL, Morgan BP, Donev RM. Implication of complement system and its regulators in Alzheimer's disease. Curr Neuropharmacol 2009;7(1):1-8.
34. Silvestrelli G, Lanari A, Parnetti L, Tomassoni D, Amenta F. Treatment of Alzheimer's disease: From pharmacology to a better understanding of disease pathophysiology. Mech Ageing Dev 2006;127(2):148-57.
35. Reddy PH, Beal MF. Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. Trends Mol Med 2008;14(2):45-53.
36. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. Acta Neuropathol 1991; 82: 239-59.
37. Bennet DA, Schneider JA, Wilson RS, et al. Neurofibrillary tangles mediate the association of amyloid load with clinical Alzheimer disease and level of cognitive function. Arch Neurol 2004; 61: 378.

38. Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, et al. Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron* 1994; 13: 45-53.
39. Cummings JL. Alzheimer's disease. *N Engl Med* 2004; 351: 56.
40. Naslund J, Haroutunian V, Mohs R, et al. Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA* 2000; 283: 1571.
41. Georganopoulou DG, Chang L, Nam JM, et al. Nanoparticle-based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 2273.
42. NIA: Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Age*. 1997; 18: S1-S2.
43. R. Mitchell, R. Cotran. 'Acute and chronic inflammation', in Robbins Basic Pathology, V. Kumar, R. Cotran, and S. Robbins, Eds., Saunders, Philadelphia, Pa, USA, 2003.
44. Akiyama H, Barger S, Barnum S, et al., Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. 2000; 21: 383-421.
45. W. S. T. Griffin, R. E. Mrak, 'Interleukin-1 in the genesis and progression of and risk for development of neuronal degeneration in Alzheimer's disease,' *Journal of Leukocyte Biology*. 2002; 72: 2, 233-238.
46. C.E. Finch and T. E Morgan, Systemic inflammation, infection, ApoE alleles, and Alzheimer disease: a position paper, *Current Alzheimer Research*, vol.4, no. 2, pp. 185-189, 2007.
47. Tuppo EE, Arias HR. The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int J BiochemCell Biol* 2005;37:289-305
48. Griffin WST, Sheng JG, Royston MC, et al. Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a 'cytokine cycle' in disease progression. *Brain Pathology*. 1998; 8-1:65-72.
49. Mrak RE, Sheng JG, Griffin WST. Glial cytokines in Alzheimer's disease: review and pathogenic implications. *Human Pathology*. 1995; 26(8): 816-823.

50. Town T, Nikolic V, Tan J. The microglial 'activation' continuum: from innate to adaptive response. *Journal of Neuroinflammation*. 2005; 2(24).
51. Laming PR, Kimelberg H, Robinson S, Salm A, Hawrylak N, et al. Neuronal-glial interactions and behaviour. *Neurosci Biobehav Rev* 2000; 24 (3):295-340.
52. Raivich G, Bohatschek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Brain Res Rev*. 1999; 30 (1): 77-105.
53. Overmyer M, Helisalmi S, Soininen H, Laakso M, Riekkinen P, Alafuzoff I. Reactive microglia in aging and dementia: an immunohistochemical study of postmortem human brain tissue. *Acta Neuropathol*. 1999; 97: 383-392.
54. Perez JMR, Ruiz JMM. Inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *The Scientific World Journal*. 2012 : 1-15
55. Dickson DW. The pathogenesis of senile plaques. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 1997; 56: 321-339.
56. Robner S, Lange-Dohna C, Zeitschel U, Perez-Polo JR. Alzheimer's disease β -secretase BACE1 is not a neuron -specific enzyme. *Journal of Neurochemistry*. 2005; 115(9): 226-234.
57. Steinman L. A brief history of TH17, the first major revision in the T H1/TH2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. 2007; 13(2): 139-145.
58. Hopkins SJ, Rothwell NJ. Cytokines and the nervous system I: expression and recognition. *Trends in Neuroscience*. 1995; 18: 83-88.
59. Walker D, McGeer E, McGeer P. Involvement of inflammation and complement in Alzheimer's disease. *Clinical Neuroimmunology*. 1997: 172-188.
60. McGeer E, McGeer P. Inflammatory cytokines in the CNS. *CNS Drug*. 1997; 7: 214-288.
61. Weiner HL, Salkoe DJ. Inflammation and therapeutic vaccination in CNS diseases. *Nature*. 2002; 420: 879-884.

62. Breitner JC. Inflammatory processes and antiinflammatory drugs in Alzheimer's disease: a current appraisal. *Neurobiol Aging*. 1996; 17: 789-794.
63. McGeer PL. Cyclo-oxygenase-2 inhibitors: rationale and therapeutic potential for Alzheimer's disease. *Drug Aging*. 2000;17: 1-11.
64. McGeer PL, McGeer EG. Polymorphisms in inflammatory genes and the risk of Alzheimer's disease. *Arch Neurol*. 2001;58: 1790-1792.
65. Greun JR, Weissman SM. evolving views of the major histocompatibility complex. *Blood*. 1997; 90: 65-4252.
66. Makhatadze NJ. TNF locus: genetic organisation, and biological implications. *Hum Immunol*. 1998; 59: 9-571.
67. Bales KR, Du Y, Holtzman D, Cordell B, Paul SM. Neuroinflammation and Alzheimer's disease: critical roles for cytokine/A β -induced glial activation, NF-kB, and apolipoprotein E. *Neurobiol*. 2000; 21: 427-432.
68. Proescholdt MG, Chakravarty S, Foster JA, Foti SB, Briley EM, Herkenham M. Intracerebroventricular but not intravenous interleukin-1 beta induces widespread vascular-mediated leukocyte infiltration and immun signal mRNA expression followed by brain-wide glial activation. *Neuroscience*. 2002; 112(3): 731-749.
69. Shatfel SS, Krykanides S, Olschowka JA, Miller JN, Johnson RE, O'Banion MK. Sustained hippocampal IL-1 beta overexpression mediates chronic neuroinflammation and ameliorates Alzheimer plaque pathology. *J Clin Invest*. 2007; 117(6): 1595-1604.
70. Depino A, Ferrari C, Pott Godoy MC, Tarelli R, Pitossi FJ. Differential effects of interleukin-1 beta on neurotoxicity, cytokine induction and glial reaction in specific brain regions. *J Neuroimmunol*. 2006; 168(1-2): 96-110.
71. Basu A, Krady JK, O'Malley M, Styren SD, DeKosky ST, Levison SW. The type 1 interleukin-1 receptor is essential for the efficient activation of microglia and the induction of multiple pro-inflammatory mediators in response to brain injury. *J Neurosci*. 2002; 22(14): 6071-6082.

72. Lin HW, Basu A, Druckman C, Cicchese M, Krady JK, Levison SW. Astroglialosis is delayed in type 1 interleukin-1 receptor-null mice following a penetrating brain injury. *J Neuroinflammation*. 2006; 3:15.
73. Hirano T, Taga T, Nakano N, Yasukawa K, Kashiwamura S, et al. Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 82: 5490-4.
74. Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood*. 1995; 86: 54-1243.
75. Bauer J, Strauss S, Schreiter-Gasser U, Ganter U, Schlegel P, Witt I, et al. Interleukin-6 and alpha-2 macroglobulin indicate an acute-phase state in Alzheimer's disease cortices. *FEBS Lett*. 1991; 285: 4-111.
76. Hampel H, Haslinger A, Scheloske M, Padberg F, Fischer P, et al. Pattern of interleukin-6 receptor complex immunoreactivity between cortical regions of rapid autopsy normal and Alzheimer's disease brain. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2005; 255: 78-269.
77. Qui Z, Gruol DL. Interleukin-6, beta-amyloid peptide and NMDA interactions in rat cortical neurons. *J Neuroimmunol*. 2003; 139: 7-51.
78. Chakrabarty P, Jansen-West K, Beccard A, Ceballos-Diaz C, Levites Y, et al. Massive gliosis induced by interleukin-6 suppresses Abeta deposition in vivo: evidence against inflammation as a driving force for amyloid deposition. *FASEB J*. 2010; 24: 59-548.
79. Opal SM, Huber CE. The role of interleukin-10 in critical illness. *Curr Opin Infect Dis*. 2000; 13: 221-226.
80. Strle K, Zhou JH, Shen WH, et al. Interleukin-10 in the brain. *Crit Rev Immunol*. 2001; 21: 427-449.
81. Ledebroer A, Breve JJ, Poole S, Tilders FJ, Van Dam AM. Interleukin-10, interleukin-4, and transforming growth factor- β differentially regulate lipopolysaccharide-induced production of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide in co-cultures of rat astroglial and microglial cell line. *Glia*. 2000; 30: 134-142.

82. Szczepanik AM, Funes S, Petko W, Ringheim GE. IL-4, IL-10 and IL-13 modulate A β (1-42)- induced cytokine and chemokine production in primary murine microglia and a human monocyte cell line. *J Neuroimmunol.* 2001; 113: 49-62.
83. Plasman BL, Havlik RJ, Steffens DC, et al. Documented head injury in early adulthood and risk of Alzheimer's disease and other dementias. *Neurology.* 2000; 55: 1158-1166.
84. McGeer EG, McGeer PL. The importance of inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease. *Exp Gerontol.* 1998; 33: 371-378.
85. Remarque EJ, Bollen EL, Weverling-Rijnsburger AW, Laterveer JC, Blauw GJ, Westendorp RG. Patients with Alzheimer's disease display a pro-inflammatory phenotype. *Exp Gerontol.* 2001; 36: 171-176.
86. Dantzer R. Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand?. *Brain Behav Immun.* 2001; 15: 7-24.
87. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001;19: 683-765.
88. Yuan J, Yankner BA,. Apoptosis in the nervous system. *Nature.* 2000; 407: 9-802.
89. Martin LJ. Neuronal cell death in the nervous system development, disease, and injury. *Int J Mol Med.* 2001; 7: 78-455.
90. Martin JB. Molecular basis of the neurodegenerative disorders. *N Engl J Med.* 1999; 340: 80-1970.
91. Emery E, Aldana P, Bunga MB, et al. Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. *J Neurosurg.* 1998; 89: 20-911.
92. Crowe MJ, Bresnahan JC, Shuman SL, Masters JN, Beattie MS. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat Med.* 1997; 3: 6-73.[Erratum, *Nat Med.* 1997;3 : 240.]
93. Rink A, Fung KM, Trojanowski JQ, Lee WM, Neugebauer E, McIntosh TK. Evidence of apoptotic cell death after experimental traumatic brain injury in the rat. *Am J Pathol.* 1995; 147: 83-1575.

94. Thomas LB, Gates DJ, Richfield EK, O'Brien TF, Schweitzer JB, Steindler DA. DNA end labeling (TUNEL) in Huntington's disease and other neuropathological conditions. *Exp Neurol*. 1995; 133: 72-265.
95. Smale G, Nichols NR, Brady DR, Finch CE, Horton WE Jr. Evidence for apoptotic cell death in Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 1995; 133: 30-225.
96. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000; 407: 6-770.
97. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*. 1980; 68: 251-306.
98. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26: 57-239.
99. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*. 1980; 284: 6-555.
100. Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X. DFF, a heterodimeric protein that function downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*. 1997; 89: 84-175.
101. Cotman CW, Su JH. Mechanisms of neuronal death in Alzheimer's disease. *Brain Pathol*. 1996; 6: 493-506.
102. Shimohama S. Apoptosis in Alzheimer's disease- an update. *Apoptosis*. 2000; 5: 9-16.
103. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. *Cell*. 1993; 19: 641-652.
104. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*. 1992; 356: 768-774.
105. Van de Craen M, Vandenabeele P, Declercq W, Van den Brande I, Van Loo G, Molemans F, Schotte P, Van Crielinge W, Beyaert R, Fiers W. *FEBS Lett*. 1997; 403: 61-69.
106. Shimin H, Snipas SJ, Vincenz C, Salvasen G, Dixit VM. J. Caspase-14 is a novel developmentally regulated protease. *Biol. Chem*. 1998; 273: 29648-29653.

107. Martin SJ, Gren DR, Cotter TG. Dicing with death: dissecting the components of the apoptotic machinery. *Trends Biochem. Sci.* 1994; 19: 26-30.
108. Cohen GM. *Biochem. J.* Caspases: the executioners of apoptosis. 1997; 326: 1-16.
109. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci.* 1997; 22: 299-306.
110. Cryns V, Yuan J. Proteases to die for. *Genes Dev.* 1998; 12: 1551-1570.
111. Li H, Zhu H, Xhu C, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell.* 1998; 94: 491-501.
112. Luo X, Budihardjo I, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell.* 1998; 94: 481-90.
113. Markesbery WR. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.* 1997; 23(1): 134-47.
114. Reddy VP, Zhu X, Perry G, Smith MA. Oxidative stress in diabetes and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2009; 16(4): 763-74.
115. Vural H, Sirin B, Yilmaz N, Eren I, Delibas N. The role of the arginine-nitric oxide pathway in patients with Alzheimer disease. *Biol Trace Elem Res.* 2009; 129(1-3): 58-64.
116. Aliyev A, Seyidova D, Rzayev N, Obrenovich ME, Lamb BT, Chen SG, et al. Is nitric oxide a key target in the pathogenesis of brain lesions during the development of Alzheimer's disease?. *Neurol Res.* 2004; 26(5): 547-53.
117. Snyder SH. Nitric oxide and neurons. *Curr Opin Neurobiol.* 1992; 2(3): 73-96.
118. Law A, Gauthier S, Quirion R. Say NO to Alzheimer's disease: the putative links between nitric oxide and dementia of the Alzheimer's type. *Brain Res Rev.* 2001; 35(1): 73-96.

119. Leung T, Manser E, Tan L, Lim L. A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membrane. *J Biol Chem.* 1995; 270: 29051-4.
120. Ishizaki T, Maekawa M, Fujisawa K, Iwamatsu A, Fujita A, et al. The small GTPbinding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *EMBO J.* 1996; 15: 1883-93.
121. Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol.* 2001; 3: 339-45.
122. Sebbagh M, Renvoize C, Hamelin J, Riche N, Bertoglio J, Breard J. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MCL phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol.* 2001; 3: 346-52.
123. Sebbagh M, Hamelin J, Bertoglio J, Solary E, Breard J. Direct cleavage of ROCK II by granzyme B induces target cell membrane blebbing in caspase-independent manner. *J Exp Med.* 2005; 201:465-71.
124. Wheeler AP, Ridley AJ. Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Exp Cell Res.* 2004;15:43-9.
125. Amano M, Fukata Y, Kaibuchi K. Regulation and functions of Rho-associated kinase. *Exp Cell Res.* 2000;261:44-51.
126. Shi J, Wei L. Rho kinase in the regulation of cell death and survival. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2007;55:61-75.
127. Satoh S, Utsunomiya T, Tsurui K, Kobayashi T, Ikegaki I, et al. Pharmacological profile of hydroxy fasudil as a selective rho kinase inhibitor on ischemic brain damage. *Life Sci.* 2001;69:1441-1453.
128. Rikitake Y, Kim HH, Huang Z, Seto M, Yano K, A et al. Inhibition of rho kinase (ROCK) leads to increased cerebral blood flow and stroke protection. *Stroke.* 2005;36:2251-2257.
129. Shin HK, Salomone S, Potts EM, Lee SW, Millican E, et al. Rho-kinase inhibition acutely augments blood flow in focal cerebral ischemia via endothelial mechanisms. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007;27:998-1009.

130. Gisselsson L, Toresson H, Ruscher K, Wieloch T. Rho kinase inhibition protects CA1 cells in organotypic hippocampal slices during in vitro ischemia. *Brain Res.* 2010;1316:92-100.
131. Castro-Alvares JF, Gutierrez-Vargas J, Darnaudery M, Cardona-Gomez GP. ROCK inhibition prevents tau hyperphosphorylation and p25/CDK5 increase after global cerebral ischemia. *Behav Neurosci.* 2011;125:465-472.
132. Yamashita K, Kotani Y, Nakajima Y, Shimazawa M, Yoshimura S. Fasudil, a Rho kinase (ROCK) inhibitor, protects against ischemic neuronal damage in vitro in vivo by acting directly on neurons. *Brain Res.* 2007;1154:215-224.
133. Yano K, Kawasaki K, Hattori T, Tawara S, Toshima Y, et al. Demonstration of elevation and localization of Rho-kinase activity in the brain of a rat model of cerebral infarction. *Eur J Pharmacol.* 2008;594:77-83.
134. Lingor P, Tonges L, Pieper N, Bermel C, Barski E, et al. ROCK inhibition and CNTF interact on intrinsic signalling pathways and differentially regulate survival and regeneration in retinal ganglion cells. *Brain.* 2008;131:250-263.
135. Shimokawa H, Rashid M. development of rho-kinase inhibitors for cardiovascular medicine. *Trends Pharmacol Sci.* 2007;28:296-302.
136. Satoh, S, Utsunomiya T, Tsurui K, Kobayashi K, Ikegaki I, et al. Pharmacological profile of hydroxyphasudil as a selective rho kinase inhibitor on ischemic brain damage. *Life Sci.* 2001;69:1441-1453.
137. Hitomi A, Satoh S, Ikegaki I, Suzuki Y, Shibuya M, Asano T. Hemorheological abnormalities in experimental cerebral ischemia and effects of protein kinase inhibitor on blood fluidity. *Life Sci.* 2000;67:1929-1939.
138. Shibuya M, Suzuki Y, Sugita K, Saito I, Sasaki T, et al. Effect of AT877 on cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg.* 1992;76:571-577.
139. Satoh S, Kobayashi T, Hitomi A, Ikegaki I, Suzuki Y, et al. Inhibition of neutrophil migration by a protein kinase inhibitor for the treatment of ischemic brain infarction. *Jpn J Pharmacol.* 1999;30:41-48.

140. Fournier AE, Takizawa BT, Strittmatter SM. Rho kinase inhibition enhances axonal regeneration in the injured. *CNS J Neurosci*. 2003;23:1416–1423.
141. Arai M, Sasaki Y, Nozawa R. Inhibition by the protein kinase inhibitor HA1077 of the activation of NADPH oxidase in human neutrophils. *Biochem. Pharmacol*. 1993;46:1487–1490.
142. Aguzzi A, O'Connor T. Protein aggregation diseases: pathogenicity and therapeutic perspectives. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9:237–248.
143. Citron M. Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9:387–398.
144. Ishizaki T, Maekawa M, Fujisawa K, Okawa K, Iwamatsu, A, F, et al. The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *Embo J*. 1996;15, 1885-93.
145. Doe C, Bentley R, Behm DJ, et al. Novel Rho kinase inhibitors with anti-inflammatory and vasodilatory activities. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;320:89–98.
146. Lent R, Azevedo F.A, Andrade-Moraes C.H and Pinto AV. How many neurons do you have? Some dogmas of quantitative neuroscience under revision. *Eur. J. Neurosci*. 2012; 35, 1–9.
147. Sofroniew M.V. and Vinters H.V. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010;119, 7–35
148. Perez-Nievas B.G, Stein T.D, Tai H.C, Dols-Icardo O, Scotton T.C, et al. Dissecting phenotypic traits linked to human resilience to Alzheimer's pathology. *Brain* . 2013;136, 2510–2526
149. Jana A. and Pahan K. Fibrillar amyloid- β -activated human astroglia kill primary human neurons via neutral sphingomyelinase: implications for Alzheimer's disease. *J. Neurosci*. 2010; 30, 12676–12689
150. Garwood C.J, Pooler A.M, Atherton J, Hanger D.P and Noble W. Astrocytes play a key role in A β -induced tau phosphorylation and neurotoxicity in primary culture. *Cell Death Dis*. 2012 ;2, e167

151. Furman J.L, Sama D.M, Gant J.C, Beckett, T.L, Murphy M.P, B et al. Targeting astrocytes ameliorates neurologic changes in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 2012;32, 16129–16140 .
152. McGeer E.G. and McGeer P.L. Neuroinflammation in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a field in its infancy. *J. Alzheimers Dis.* 2010; 19, 355–361.
153. Zhang B, Gaiteri C, Bodea L.G, Wang Z, McElwee J, et al. Integrated systems approach identifies genetic nodes and networks in late-onset Alzheimer's disease. *Cell* 2013;153, 707–720.
154. Perry V.H. Contribution of systemic inflammation to chronic neurodegeneration. *Acta Neuropathol.* 2010;120, 277–286.
155. Satoh S, Toshima Y, Ikegaki I, Iwasaki M, Asano T. Wide therapeutic time window for fasudil neuroprotection against ischemia-induced delayed neuronal death in gerbils. *Brain Research.* 2007; 1128: 175-180.
156. Li B, Zhong L, Yang X, Andersson T, Huang M, Tang SJ. WNT5A signaling contributes to Ab-induced neuroinflammation and neurotoxicity. *PLoS ONE.* 2011;6: e22920.
157. Johnston H, Boutin H, Allan SM. Assessing the contribution of inflammation in models of Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans* 2011;39:886–890.
158. Song Y, Chen X, Wang LY, Gao W, Zhu MJ. Rho kinase inhibitor Fasudil Protects against β - amyloid-induced hippocampal neurodegeneration in rats. *CNS Neurosci & Therapeutics.* 2013.
159. Bauer J, Strauss S, Schreiter-Gasser U, Ganter U, Schlegel P, Witt I, et al. Interleukin-6 and alpha-2 macroglobulin indicate an acute-phase state in Alzheimer's disease cortices. *FEBS Lett.* 1991; 285: 111-4.
160. Wood JA, Wood PL, Ryan R, Graff-Radford NR, Pilapil C, et al. Cytokine indices in Alzheimer's temporal cortex: no changes in mature IL-1 beta or IL-1RA but increases in the associated acute phase proteins IL-6, alpha 2-macroglobulin and C-reactive protein. *Brain Res.* 1993; 629: 245-52.

161. Campbell IL, Abraham CR, Masliah E, Kemper P, Inglis JD, et al. Neurologic disease in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90: 10061-5.
162. Sinigaglia F, D'Ambrosio D, Panina-Bordignon P, Rogge L. Regulation of the IL-12/IL-12R axis: a critical step in T-helper cell differentiation and effector function. *Immunol. Rev* 1999. 170: 65-72.
163. Cotman CW, Su JH. Mechanisms of neuronal death in Alzheimer's disease. *Brain Pathol*. 1996;6:493–506.
164. Bamberger ME, Landreth GE. Inflammation, Apoptosis, and Alzheimer's disease. *Neuroscientist* 2012;8(3):276–283.
165. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770-6.
166. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996;87:171.
167. D'Amelio M, Cavallucci V, Middei S, Marchetti C, Pacioni S, et al. Caspase-3 Triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience*. 2011; 14: 69-76.
168. Mattson M.P, Keller J.N. & Begley J.G. Evidence for synaptic apoptosis. *Exp. Neurol*. 1998; 153, 35–48.
169. Su J. H., Satou T., Anderson A. J. and Cotman C. W. Up-regulation of Bcl-2 is associated with neuronal DNA damage in Alzheimer's disease. *Neuroreport*. 1996; 7, 437±440.
170. Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993;74:609-19.
171. Krajewski S, Krajewski M, Shabaik A, Miyashita T, Wang HG, Reed JC. Immunohistochemical determination of in vivo distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2. *Am J Pathol*. 1994;145:1323-36.

ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında doğdu. İlk ve orta öğrenimini Gaziantep’te tamamladı. 2009 yılında Dumlupınar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü Kazandı. 2014 yılında mezun oldu.