

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON
ANABİLİM DALI

**DEKSMEDETOMİDİNİN ZEBRA BALIĞI
AMİLOİD BETA TOKSİSİTESİ
MODELİNDEKİ DAVRANIŞSAL
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

DR. NİLAY ÇAKMAK

TIPTA UZMANLIK TEZİ

İZMİR 2022

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON
ANABİLİM DALI

**DEKSMEDETOMİDİNİN ZEBRA BALIĞI
AMİLOİD BETA TOKSİSİTESİ
MODELİNDEKİ DAVRANIŞSAL
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DR. NİLAY ÇAKMAK

**Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. LEYLA İYİLİKÇİ
KARAOĞLAN**

Bu tez DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından
Proje No: 2021.KB.SAG.043 Talep No: 2021/26 ile desteklenmiştir.

BEYAN

Uzmanlık Tezi olarak sunduğum “Deksmedetomidinin Zebra Balığı Amiloid Beta Toksisitesi Modelindeki Davranışsal Etkilerinin İncelenmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Leyla İYİLİKÇİ KARAOğLAN’ın sorumluluğunda tamamladığımı, tezin planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynakçada eksiksiz gösterdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Dr. Nilay ÇAKMAK

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, hekimlik sanatının ve anesteziyolojinin temel ilkelerini öğrendiğim değerli hocalarım, Sayın Prof. Dr. Ali Necati Gökmen'e, Sayın Prof. Dr. Semih Küçükgülü'ye, Sayın Prof. Dr. Bahar Kuvaki Balkan'a, , Sayın Prof. Dr. Hasan Hepağuşlar'a, Sayın Prof. Dr. Uğur Koca'ya, Sayın Prof. Dr. Çimen Olguner'e, Sayın Prof. Dr. Fikret Maltepe'ye, Sayın Prof. Dr. Sevda Özkardeşler'e, Sayın Prof. Dr. Volkan Hancı'ya, Sayın Prof. Dr. Bülent Serhan Yurtlu'ya, Sayın Doç. Dr. Ferim Günenç'e, Sayın Doç. Dr. Yüksel Erkin'e, Sayın Doç. Dr. Dilek Ömür Arça'ya, Sayın Doç. Dr. Elvan Özçmen'e, Sayın Doç. Dr. Şule Özbilgin'e, Sayın Doç. Dr. Sibel Büyükçoban'a, Sayın Doç. Dr. Nilay Boztaş'a, Sayın Doç. Dr. Gönül Sağıroğlu'na, değerli bilgilerinden yararlandığım ve eğitimime katkıda bulunan uzmanlarımız Sayın Uzm. Dr. İçten Ezgi İnce'ye, Sayın Uzm. Dr. Gül İnal'a, Sayın Uzm. Dr. Mine Sarı'ya,

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tezimin her aşamasında emek ve yardımlarını esirgemeyen, destekleyen, büyük bir sabır ve özveriyle katkıda bulunan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Leyla İyilikçi Karaoğlu'na ve Doç. Dr. Hale Aksu Erdost'a,

Tezimde emeği geçen, deneysel uygulamasında bilgi ve deneyimlerini özveri ile paylaşan ve çalışmanın sonuçlarına en hızlı şekilde ulaşmamı sağlayan Sayın Doç. Dr. Hatice Güneş Özhan'a, Sayın Araş. Gör. Yusuf Kaan Poyraz'a, Sayın Araş. Gör. Makbule Dilek Nazlı'ya,

Bugünlere gelmemde büyük emekleri bulunan, her zaman yanımda olan, desteklerini ve sevgilerini hep hissettiren aileme,

Hayatı benimle paylaşan, her zaman yanımda olan canım eşim Süleyman Çakmak'a

Sevgi ve saygılarımla sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Nilay Çakmak

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	I
TEŞEKKÜR.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
TABLO LİSTESİ.....	VI
ŞEKİL LİSTESİ.....	VII
GRAFİK LİSTESİ.....	VII
RESİM LİSTESİ.....	IX
KISALTMALAR.....	X
ÖZET.....	XII
SUMMARY.....	XIV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Alzheimer Hastalığı (AH).....	4
2.1.1. AH Epidemiyolojisi.....	4
2.1.2. AH Fizyopatolojisi.....	4
2.1.3. AH Kliniği.....	6
2.1.4. AH Tanısı.....	7
2.1.4.1. AH Laboratuvar Testleri.....	7
2.1.4.2. AH Görüntüleme Yöntemleri.....	8
2.1.5. AH Tedavisi.....	9
2.1.5.1. Farmakolojik Olmayan Tedaviler.....	9
2.1.5.2. Farmakolojik Tedaviler.....	9
2.2. Deksmetomidin.....	12
2.2.1. Deksmetomidinin Farmakokinetik Özellikleri.....	12
2.2.2. Deksmetomidinin Farmakodinamik Özellikleri.....	13
2.2.3. Deksmetomidinin SSS'ne Etkileri.....	14

2.2.4. Deksmetomidinin Solunum Sistemine Etkileri.....	15
2.2.5. Deksmetomidinin Kardiyovasküler Sisteme Etkileri.....	15
2.2.6. Deksmetomidinin Klinik Kullanım Alanları.....	16
2.2.7. Deksmetomidinin Yan Etkileri.....	16
2.3. Zebra Balığı.....	19
2.3.1. Zebra Balığının Genel Özellikleri ve Morfolojisi.....	19
2.3.2. Model Organizma Olarak Zebra Balığı	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1. Deksmetomidin Dozlarını Belirlemek İçin Sitotoksikite Çalışması.....	22
3.2. Deney Grupları ve Protokol.....	23
3.3. Deneysel Çalışma Modeli.....	25
3.3.1. Serebroventriküler Mikro Enjeksiyon (CVMI).....	26
3.3.1.1. Enjeksiyon Karışımının Hazırlanması.....	26
3.3.1.2. Enjeksiyon Aparatının Hazırlanması.....	26
3.3.1.3. CVMI.....	27
3.3.2. Retroorbital Deksmetomidin Enjeksiyonu.....	28
3.3.2.1. Protokol.....	29
3.3.3. Yetişkin Zebra Balıklarına Uygulanan Davranış Testleri.....	30
3.3.3.1. Sosyal Etkileşim Testi.....	30
3.3.3.2. Ayna Isırma Testi.....	32
3.3.3.3. Novel Tank Testi.....	33
3.4. Moleküler Çalışmalar.....	34
3.4.1. qPCR ile Alzheimer Gen Ekspresyon Analizi.....	34
3.4.2. Western Blot ile GFAP Validasyonu.....	35
3.4.3. İmmünohistokimya ve Görüntüleme.....	35

4. BULGULAR.....	36
4.1. Davranış Testleri Sonuçları.....	36
4.2. Moleküler Çalışmaların Sonuçları.....	39
4.2.1. qPCR ile Alzheimer Gen Ekspresyon Analizi.....	39
4.2.2. Western Blot ile GFAP Validasyonu.....	45
4.2.3. İmmünohistokimya ve Görüntüleme.....	46
5. TARTIŞMA.....	48
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	53
7. KAYNAKLAR.....	54

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Alzheimer Hastalığı Belirtileri.....	7
Tablo 2: AH’nda Koruyucu Antioksidanlar.....	10
Tablo 3: Deksmetomidinin Yan Etkileri.....	17
Tablo 4: Deney Grupları ve Protokol.....	25
Tablo 5: Sosyal Etkileşim Testinde Separatör Önünde Harcanan Süre (sn)	36
Tablo6: Novel Tank Testinde Grupların 00-01 ve 09-10 Dakikaları Arası Tankın Alt Kısımında Geçirdikleri Süreler ve 10 Dakika Boyunca Kat Edilen Toplam Mesafeler	37
Tablo 7: Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR ile Değerlendirilen Genlerin Kontrol Grubuna Göre Rölatif Ekspresyonları.....	40

SEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Deksmetomidinin Kimyasal Yapısı.....	12
Şekil 2: Zebra Balığının Yetişkin Erkek ve Dişi AB Suşu.....	19
Şekil 3: Benzerlik Gösteren Zebra Balığı (Danio Rerio) ve İnsan Organ Sistemleri.....	21
Şekil 4: Zebra Balığı Embriyolarının Farklı Konsantrasyonlardaki Deksmetomidin İçeren Kuyucuklara Ekildikten Sonra 1. Ve 5. Günlerdeki Mikroskopik Görüntüleri.....	23
Şekil 5: Novel Tank Testi.....	33
Şekil 6: Zebra balığı telensefalon bölgesinden alınan kesitlerde immünfloresan boyamaların konfokal mikroskop görüntüleri.....	47

GRAFİK LİSTESİ

Grafik 1: Sosyal Etkileşim Davranış Testi.	37
Grafik 2: Novel Tank Testi.....	38
Grafik 3: Novel tank testi.....	39
Grafik 4: <i>appa</i> Geninin Kontrol Grubuna Göre Rölatif Ekspresyonları.....	40
Grafik 5: <i>appb</i> Geninin Kontrol Grubuna Göre Rölatif Ekspresyonları.....	41
Grafik 6: <i>psen1</i> Geninin Kontrol Grubuna Göre Rölatif Ekspresyonları.....	41
Grafik 7: <i>psen2</i> Geninin Kontrol Grubuna Göre Rölatif Ekspresyonları.....	42
Grafik 8: <i>bace1</i> Geninin Kontrol Grubuna Göre Rölatif Ekspresyonları.....	42
Grafik 9: <i>pcna</i> Geninin Kontrol Grubuna Göre Rölatif Ekspresyonları.....	43
Grafik 10: <i>gfap</i> Geninin Kontrol Grubuna Göre Rölatif Ekspresyonları.....	43
Grafik-11: Western Blot Yöntemi ile GFAP/B-Actin Bağlı Protein İfade Seviyeleri.....	45

RESİM LİSTESİ

Resim 1: Mikroenjeksiyon Tutucu ve A β 42 Enjeksiyon Solüsyonu Yüklenen Cam Kapillerin Yerleştirilip 45°'ye Ayarlanmış Enjeksiyon Aparatı.....	27
Resim 2: Balığın Kafatasında 30 G'lik Bir İğnenin Ucu Kullanılarak Bir Yarık Oluşturulması ve Cam Kılcalın Ucunun 45° Açıyla Telensefalona Doğru Yönlendirilerek Çözeltinin Enjekte Edilmesi.....	28
Resim 3: İğnenin Saat 7:00 Konumunu ve Balığa 45 Derecelik Bir Açığı Gösterecek Şekilde 1-2 mm Yavaşça Sokulması.....	29
Resim 4: Delikli şeffaf bir ayırıcı ile dikey olarak ortadan ikiye ayrılmış olan tankı ve denekler.....	31
Resim 5: Sosyal Etkileşim Testi Smart v3.0 ile analiz	31
Resim 6: Ayna Isırma Testi Smart v3.0 ile Analiz	32
Resim 7: Novel tank testi için kullanılan tank.....	33
Resim 8: Telensefalonunun Çıkarılması İçin Kafatası Disseke Edilen Zebra Balığı.....	34

KISALTMALAR

AH:	Alzheimer Hastalığı
APOE:	Apolipoprotein E
APP:	Amiloid Prekürsör Protein
Aβ:	Amiloid β
BOS:	Beyin Omurilik Sıvısı
CVMI:	Serebroventriküler Mikro Enjeksiyon
Deks:	Deksmedetomidin
FDA:	<i>Food and Drug Administration</i>
GABA:	Gama Aminobütirik Asit
GFAP:	Glial Fibriller Asidik Protein
IL1-β:	İnterlökin 1- β
IV:	İntravenöz
LPS:	Lipopolisakkarit
MAK:	Minimum Alveolar Konsantrasyon
MAO:	Monoaminooksidaz
MRG:	Manyetik Rezonans Görüntüleme
NMDA:	N-Metil-D-Aspartat
PBS:	Fosfat Tamponlu Salin
PET:	Pozitron Emisyon Tomografisi
POKD:	Postoperatif Kognitif Disfonksiyon
PS1:	Presenilin 1
PS2:	Presenilin 2
qPCR:	<i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>

ROE:	Retro-orbital Enjeksiyon
ROS:	Reaktif Oksijen Ürünleri
SPECT:	Tek Foton Emisyonlu Bilgisayarlı Tomografisi
SSS:	Santral Sinir Sistemi
SVME:	Serebroventriküler Mikro Enjeksiyon
TNF-α:	Tümör Nekrozis Faktör- α
VLPO:	Ventrolateral Preoptik Çekirdek



ÖZET

Deksmedetomidinin Zebra Balığı Amiloid Beta Toksisitesi Modelindeki Davranışsal Etkilerinin İncelenmesi

Dr. Nilay Çakmak, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi,

Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı, İzmir

Amaç: Deksmetomidinin, anti-enflamatuar ve nöroprotektif özellikler sergilediği ve postoperatif bilişsel bozuklukların insidansını azalttığı bilinmektedir. Çalışmamızın amacı; erişkin zebra balığında oluşturulan amiloid beta toksisitesi modelinde düşük veya yüksek doz deksmedetomidin uygulamalarının nörodavranışsal özelliklere olan etkisini araştırmak ve deksmedetomidinin bu modelde nöroprotektan etkisinin olup olmadığını gözlemlemektir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada amiloid beta (A β) peptidi zebra balıklarının beyne serebroventriküler enjeksiyon ile enjekte edilerek A β ile tetiklenebilen Alzheimer Hastalığı modeli oluşturuldu. Erişkin zebra balıklarına A β toksisitesi varlığında veya yokluğunda; düşük (250 μ M) veya yüksek (500 μ M) doz deksmedetomidin, retro-orbital enjeksiyon yöntemi ile uygulandı. Dört grup ve her grupta 6 adet olmak üzere toplam 24 adet, yaş aralığı 6-12 ay arasında olan *wild* (yabanıl) tip zebra balıkları kullanıldı. Grup 1 (Sham grubu), Grup 2 (A β toksisitesi grubu), Grup 3 (A β toksisitesi oluşturulup 250 μ M deksmedetomidine maruz kalan grup), Grup 4 (A β toksisitesi oluşturulup 500 μ M deksmedetomidine maruz kalan grup) olarak gruplara ayrıldı. A β ve deksmedetomidin uygulamaları sonrası zebra balıklarına sosyal etkileşim, ayna ısırma ve *Novel tank* davranış testleri yapıldı. Sonrasında telensefalon diseksiyonu yapıp qPCR ile Alzheimer gen ekspresyon analizleri ve *Western Blot* ile GFAP validasyonu yapıldı.

Bulgular: qPCR gen ekspresyon analizlerinde *psen1*, *psen2* ve *appa* genlerinin sonuçlarında benzer şekilde “A β -PBS” grubuna göre kıyaslandığında “A β -Düşük Doz Deks” ve “A β -Yüksek Doz Deks” deney gruplarında istatistiksel olarak önemli bir azalış gözlemlendi. Bunun yanında “A β -Düşük Doz Deks” ve “A β -Yüksek Doz Deks” grupları arasında anlamlı fark yoktu. *pcna* geni için “PBS-PBS” grubuna kıyasla “A β -Düşük Doz Deks” ve “A β -Yüksek Doz Deks” deney gruplarındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu. *Western Blot* analizlerine göre G2’nin GFAP bağlı ifadesinde G1’e kıyasla istatistiksel olarak önemli

derecede artış gözlemlendi. Deksmetomidin uygulanan G3 ve G4 deney grupları G2 ile kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli olarak GFAP ifadesinde düşüş gözlemlendi.

Sonuç: Elde edilen veriler doğrultusunda, zebra balığı amiloid beta toksisitesi modelinde $\alpha 2$ adrenarjik reseptör agonisti olan deksmedetomidinin düşük (250 μM) ve yüksek (500 μM) dozlarının nöroprotektif etkilerinin bulunduğu saptandı. Davranış testlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilmedi.

Anahtar kelimeler: Alzheimer hastalığı, deksmedetomidin, zebra balığı, anestezi, davranış, nöroprotektif



SUMMARY

Investigation of Behavioral Effects of Dexmedetomidine in the Zebrafish Amyloid Beta Toxicity Model

Nilay Çakmak, MD, Dokuz Eylul University School of Medicine, Department of Anesthesiology and Reanimation, İzmir

Background: Dexmedetomidine is known to exhibit anti-inflammatory and neuroprotective properties and reduce the incidence of postoperative cognitive disorders. The aim of our study; to investigate the effect of low or high dose dexmedetomidine applications on neurobehavioral properties in amyloid beta toxicity model created in adult zebrafish and to observe whether dexmedetomidine has a neuroprotectant effect in this model.

Materials and Methods: In the study, A β -induced Alzheimer's Disease model was created by injecting A β peptide into the brain of zebrafish by cerebroventricular injection. In the presence or absence of A β toxicity to adult zebrafish; low (250 μ M) or high (500 μ M) dose dexmedetomidine was administered by retro-orbital injection method. A total of 24 wild-type zebrafish, aged between 6-12 months, were used in 4 groups and 6 in each group. They were divided into groups as Group 1 (Sham group), Group 2 (A β toxicity group), Group 3 (group exposed to 250 μ M dexmedetomidine with A β toxicity), Group 4 (group exposed to 500 μ M dexmedetomidine with A β toxicity). Social interaction, mirror biting and Novel tank behavior tests were performed on zebrafish after A β and dexmedetomidine applications. Afterwards, dissection of the telencephalon was performed and Alzheimer's gene expression analyzes by qPCR and GFAP validation were performed by Western Blot.

Results: In qPCR gene expression analyzes, a statistically significant decrease was observed in the results of *psen1*, *psen2* and *appa* genes in the "A β -Low Dose Dex" and "A β -High Dose Dex" experimental groups when compared to the "A β -PBS" group. In addition, there was no significant difference between the "A β -Low-Dose Dex" and "A β -High-Dose Dex" groups. For the *pcna* gene, the increase in the "A β -Low Dose Dex" and "A β -High Dose Dex" experimental groups was statistically significant compared to the "PBS-PBS" group. According to Western blot analysis, a statistically significant increase was observed in the relative expression of GFAP in G2 compared to G1. A statistically significant decrease in

GFAP expression was observed when dexmedetomidine administered G3 and G4 experimental groups were compared with G2.

Conclusions: In line with the data obtained, it was determined that low (250 μ M) and high (500 μ M) doses of dexmedetomidine, an α 2 adrenergic receptor agonist, had neuroprotective effects in the zebrafish amyloid beta toxicity model. No statistically significant results were obtained in behavioral tests.

Keywords: Alzheimer's disease, dexmedetomidine, zebrafish, anesthesia, behavior, neuroprotective



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Demansın en yaygın nedeni olan Alzheimer hastalığı (AH), bireyler ve toplum için büyük etkileri olan, küresel bir sağlık sorunu, sosyal ve ekonomik yük haline gelen nörodejeneratif bir hastalıktır. *Alois Alzheimer* 1907'de (1) ilk vakayı rapor ettiğinden beri AH patogenezi ve hastalığın nasıl kavramsallaştırıldığını anlamamızdaki büyük kazanımlara rağmen, hala hastalığı modifiye edici tedavi yoktur (2). AH klinik olarak ilerleyici bellek bozukluğu, görsel-uzaysal gerileme, afazi ve yürütücü işlev kaybı gibi heterojen bir dizi semptomla karakterizedir (3).

AH birkaç farklı etyopatolojik mekanizmayı içerir. Amiloid β öncü protein (APP), presenilin 1 (PS1) veya presenilin 2 (PS2) mutasyonlarının neden olduğu erken başlangıçlı ailesel AH formu, tüm vakaların <1'ini oluşturur (4). Vakaların %99'undan fazlasını oluşturan AH'nın geç başlangıçlı sporadik formunun kesin nedenleri henüz anlaşılmamıştır. AH'nın sporadik formu, metabolik düzensizlikler, kafa travması, metal iyon toksisitesi, hipertansiyon, vasküler yaralanma, sigara içme, psikolojik stres ve vitamin eksiklikleri gibi yaşlanma ile birlikte muhtemelen birkaç farklı etyopatolojik mekanizmayı içerir (5).

AH, histopatolojik olarak sırasıyla amiloid beta peptidlerinden ve anormal derecede hiperfosforile tau proteininden oluşan amiloid β (A β) plaklarının ve nörofibriler yumakların varlığı ile karakterize edilen heterojen ve multifaktöriyel bir bozukluktur (6). Çeşitli etyopatolojik mekanizmalardan bağımsız olarak, nörodejenerasyon, AH patolojisinin nihai ortak sonucudur. Bu nedenle, AH için oldukça umut verici bir terapötik strateji, dengeyi nörodejenerasyondan nöral rejenerasyona kaydırmaktır (7,8).

Demansın ortaya çıkardığı önemli halk sağlığı sorununa rağmen, bugüne kadar AH için yalnızca iki sınıf ilacı içeren yalnızca beş tıbbi tedavi onaylanmıştır ve bunlar hastalığın seyrini değiştirmek yerine semptomları kontrol etme işlevi görür (9). AH için onaylanmış ilaç tedavileri kolinesteraz inhibitörleri (10) ve NMDA reseptör blokörü olan Memantin'dir (11). Bu ilaçlar AH'nda mevcut en iyi farmakolojik tedavilerimizi temsil ederken, nispeten küçük ortalama genel etkiye sahiptirler ve altta yatan nörodejeneratif sürecin seyrini değiştirmezler. Üzerinde çalışılan anti-amiloid tedavi, aşılama, monoklonal antikorlar, tau hedefli tedavi gibi tedavi şekilleri de gelecekteki potansiyel ilaç tedavilerini oluşturur (12–16).

Yeni bir klinik anestezi ajan türü olan deksmedetomidin, sedatif, anksiyolitik, sempatolitik ve analjezik etkileri olan ve minimal solunum depresyonu yapan yüksek selektif ve güçlü bir α_2 -adrenoseptör agonistidir (17). $\alpha_2:\alpha_1$ reseptör afinite oranı 1620:1 olan deksmedetomidin oldukça selektif bir α_2 agonist ajandır. Propofol ve benzodiazepinler gibi sedatif ilaçların aksine, deksmedetomidin gama-aminobutirik asit (GABA) reseptörlerinde etkili değildir (18). *Lokus coeruleus*taki santral presinaptik ve postsinaptik α_2 -reseptörlerinin aktivasyonu yoluyla hipnotik etkisini uygular, böylece hastaların kolayca uyandırılabilir ve kooperatif olduğu benzersiz bir özellik ile doğal uykuya benzer bir bilinçsizlik durumunu indükler (19). Başlangıçta sadece yetişkin yoğun bakım ünitesi popülasyonunda mekanik ventilatöre bağlı hastalarda 24 saate kadar intravenöz (İV) infüzyon kullanımı için onaylanmış olmasına rağmen, klinik uygulamada deksmedetomidin uygulamaları son birkaç yıldır genişletilmiştir.

Deksmedetomidin anti-inflamatuar özellikler gösterir ve Alzheimer hastalarında postoperatif kognitif disfonksiyonu (POKD) üzerinde inhibitör etki ve beyin iskemisine karşı nöroprotektif eylemler gösteren birkaç anestezi türünden biridir (20,21). Deneysel ve prelinik çalışmalarda çoklu nöroprotektif eylemleri nedeniyle son zamanlarda çokça dikkat çekmektedir. Deksmedetomidinin doğal nöroprotektif etkilerinin, beyinde üretilmiş nörotrofik faktör ve prosurvival kinazların artan ekspresyonu dahil olmak üzere birkaç moleküler mekanizma tarafından aracılık edildiği düşünülmektedir. Deksmedetomidinin, IL1- β ve TNF- α genlerinin ekspresyonunu inhibe ederek hipokampus ve kortekste lipopolisakkaritlerin (LPS) neden olduğu nöroinflamasyonu hafiflettiği bildirilmiştir (22). Deksmedetomidinin, neonatal farelerde nöronal hücreleri izofluran kaynaklı hipokampal nöronal yaralanmaya karşı koruduğu da gösterilmiştir (23). Yine başka bir çalışmada Sanders ve ark. (24), deksmedetomidinin, izofluran kaynaklı nöronal hasarı ve hipokampus ve talamustaki nörobilişsel bozukluğu hafiflettiğini göstermiştir. Yan etkiler esas olarak hemodinamiktir ve vazokonstriksiyon, sempatoliz ve barorefleks aracılı parasempatik aktivasyonun bir sonucu olarak hipertansiyon, hipotansiyon ve bradikardiyi içerir (25,26). Deksmedetomidin hızla dağılır ve esas olarak glukuronidasyon ve hidroksilasyon ile aktif olmayan metabolitlere hepatik olarak metabolize edilir (27). Metabolitlerin % 95'i renal yoldan, % 4'ü fekal yoldan ve % 1'den azı da değişmeden atılır (28–30).

Zebra balığı, Hindistan'a özgü küçük, dayanıklı bir tatlı su balığıdır ve genellikle ev akvaryumlarında tutulur. Zebra balığı, onu çok yönlü bir hayvan modeli yapan birçok özelliğe

sahiptir. Zebra balığı genomu kapsamlı bir şekilde açıklanmıştır ve AH'nda temel roller oynadığı düşünülen mutasyona uğramış tüm insan genlerine ortolog genlere sahiptir. Zebra balığı kullanılarak yapılan araştırmalar, bu genlerin kemirgen modellerinde gözlemlenmesi zor olan benzersiz özelliklerini ortaya çıkarmıştır (31). Zebra balıklarının omurgalı genomu ve nörobiyolojisi ve bu organizmadaki gen aktivitesini hızla genişletme yeteneğimiz, AH patolojisinin gizemlerini araştırmak için alternatif yollar sunar. Zebra balığı sadece kolayca ölçülebilir davranışlar sergilemekle kalmaz, aynı zamanda iyi korunmuş, basit bir sinir sistemine ve diğer hayvan modellerine benzer bir nükleotid dizisine sahip tam olarak karakterize edilmiş bir genoma sahiptir (32,33). Zebra balıklarının üremesi kolaydır, çabuk olgunlaşır ve insanlara %95 homolojiye sahiptir (34). Tüm bu özelliklerinden dolayı zebra balığı çalışmamız için çok uygun bir hayvan modeli olarak bulunmuştur.

Deksmedetomidinin birçok çalışmada gösterilen nöroprotektif etkisi çoğunlukla embriyolarda ve larvalarda, özellikle diğer anesteziiklerle oluşan nöroapoptozda ve serebral iskemi durumlarında çalışılmışken, erişkin bir nörodejeneratif hastalık modelinde çok az çalışılmıştır. Nöroprotektif etkisi gösterilen deksmedetomidin ile yapacağımız bu çalışma rejenerasyon yeteneği yüksek olan zebra balığının bu özelliği ile birleşerek Alzheimer benzeri nörodejeneratif hastalıkları daha iyi tedavi etmemizi sağlayacak terapötik yaklaşımlar tasarlamamıza olanak sağlayabilir.

Çalışmamızın amacı; erişkin zebra balığında oluşturulan amiloid beta toksisitesi modelinde düşük veya yüksek doz (zebra balıklarının toleransının belirlendiği doz ön çalışmasının sonuçlarına göre belirlediğimiz deksmedetomidin dozları) deksmedetomidin uygulamalarının ardından zebra balıkları davranış modellerinde değişim olup olmadığını araştırmak ve deksmedetomidinin bu modelde nöroprotektan etkisinin olup olmadığını gözlemlemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı (AH)

AH yaşlılar arasında en sık görülen demanstır ve 60 yaş üstü demansların yaklaşık % 70'ini oluşturur (35).

AH, hastaların bilişsel, davranışsal ve bellek işlev bozukluğuna neden olan, en yaygın görülen ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır. İlk olarak 1907 yılında tanımlanan AH'nın etiyolojisinde birden fazla faktör vardır (36). Histopatolojik olarak A β peptitlerinin oluşturduğu hücre dışı amiloid plaklarının birikimi ile giden ve hiperfosforile mikrotübül ilişkili tau proteininden oluşan hücre içi nörofibriler düğümlerin birikmesi sonucu nöronal ve sinaptik kayıplarla seyreden bir hastalıktır (37). AH çoğu zaman sporadik olarak görülür; % 5 kadarı aileseldir, ailesel olan formunda amiloid β öncü protein ya da presenilin protein birikimi görülür (37).

2.1.1. AH Epidemiyolojisi

AH giderek artmaktadır ve 2050 yılına gelindiğinde, 100 milyonun üzerinde Alzheimer hastasının olacağı tahmin edilmektedir (36). Birleşmiş Milletler'de 2021 yılında 65 yaş ve üstü AH olan toplam 6,2 milyon insan bulunmaktadır (38). Bu hastaların yarısından fazlası ise kadındır. Yaş ilerledikçe AH'na yakalanma riski de artmaktadır; 2011 yılında Birleşmiş Milletler'de 65 yaş üstü bireylerde AH insidansı % 11,2 olarak hesaplanmıştır (39). Bu hastaların yaklaşık üçte ikisi 85 yaş ve üzerindedir. *Centers for Disease Control* (CDC) verilerine göre, 2019 yılında AH'dan ölen 121 bin 499 insan bildirilmiştir (35).

Ülkemizde ise Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK 2021) verilerine göre yaşlı nüfus (65 yaş ve üzeri) 2015 yılında 6 milyon 495 bin 239 kişi iken, son beş yılda %22,5 artarak 2020 yılında 7 milyon 953 bin 555 kişi olmuştur. AH'ndan hayatını kaybeden yaşlıların sayısı, 2015 yılında 12 bin 59 iken, 2019 yılında 13 bin 498'e yükselmiştir. AH'ndan ölen yaşlıların oranı 2015 yılında erkeklerde %3,4, kadınlarda %5,2 iken, bu oranlar 2019 yılında erkeklerde %3,2'ye düşerken, kadınlarda %5,4'e yükselmiştir.

2.1.2. AH Fiziopatolojisi

AH oluşumunda temelde iki patolojik durum vardır; bunlardan birincisi A β proteinlerinin oluşturduğu senil (amiloid) plaklar ikincisi ise tau proteininin oluşturduğu

nörofibriler yumakların birikimidir. A β peptitleri, APP'in β -sekretaz ve γ -sekretaz enzimleri ile proteolitik yıkımı sonucu oluşur (40). A β hücre dışında birikmeye başlar. Bu durum tau proteinin hiperfosforilasyonuna, mitokondriyal ve sinaptik hasara neden olur. AH olan kişilerde bu hasar hipokampus ve neokorteks bölgelerinde belirgindir. Mikrotübüllerin temel bileşeni olan tau proteinlerinin hiperfosforilasyonu tau proteininin mikrotübüllerden ayrılmasına ve mikrotübüllerin dağılmasına neden olur. Hiperfosforile olan tau proteinleri bir araya gelerek nörofibriller yumaklar oluşur. Hücre içinde akson ve dentritlerde birikmeye başlarlar. Zamanla biriken nörofibriler yumaklar hücrenin normal işleyişini ve aksonal transportu bozarak hücre kaybına neden olurlar. Nörofibriler yumaklar en çok temporal lobun entorhinal korteksinde ve hipokampüste bulunurlar. İlerleyen dönemlerde yayılım heteromodal alanlarda ve korteksin diğer bölgelerinde de görülür (41).

AH'nda amiloid plaklar ve nörofibril yumakların dışında beyinde görülen en belirgin patolojik değişimlerden biri de nöron ölümü ve sinaptik dejenerasyon sonucu özellikle serebral korteks ile hipokampus, amigdala ve temporal korteks gibi subkortikal alanlarda meydana gelen atrofilerdir (42).

AH ailesel kalıtımla ve sporadik olarak ortaya çıkabilir. Büyük çoğunluğu sporadik olarak oluşan AH, %4-6 arası otozomal dominant geçiş gösteren APP, PSEN1 (presenilin 1) ve PSEN2 (presenilin 2) genleri ile aktarılır (4). Sporadik olarak ortaya çıkan AH 65 yaş üzerinde görülürken; erken başlangıçlı AH'ndan genetik olarak aktarılan APP, PSEN1 ve PSEN2 genleri sorumlu tutulmaktadır. Geç başlangıçlı AH'na birçok genin ve çevresel faktörlerin birbirleri ile etkileşiminin etkisi olduğu düşünülmektedir ve çoğu sporadiktir. Geç başlangıçlı AH'nda risk faktörü olarak tanımlanan başlıca gen APOE (Apolipoprotein E) genidir (43). AH'nın sporadik formu, serebrovasküler hastalıklar, metabolik düzensizlikler, kafa travması, metal iyon toksisitesi, hipertansiyon, vasküler yaralanma, sigara içme, psikolojik stres ve vitamin eksiklikleri gibi yaşlanma ile birlikte muhtemelen birkaç farklı etiyopatolojik mekanizmayı da içerir (5). Diğer bir patogeneze ise oksidatif hasar sonucu oluşan reaktif oksijen ürünleridir (ROS). ROS ürünleri, A β ile kompleksler oluşturarak nöronal metabolizmayı ciddi şekilde etkileyebilir. A β , oksidatif stres ile ROS üretimini doğrudan arttırarak AH patogeneze neden olabilir (44).

APOE, kolesterol metabolizmasında yer alan aracı bir moleküldür. APOE geni 19. kromozom üzerinde bulunur ve ϵ 2, ϵ 3, ϵ 4 olmak üzere üç adet alleli tanımlanmıştır. APOE

ε4 alleli geç başlangıçlı sporadik AH için büyük oranda ilişkili bulunmuştur (40). APOE ε4 alleleline sahip hastalarda BOS'ta BACE1 (β-sekretaz) aktivitesinin arttığı gösterilmiştir, bu nedenle APOE ε4 alleleline sahip hastalarda BOS'ta BACE1 seviyelerin in vivo ölçümleri amiloidojenik süreci saptamak için kullanılabilir (45).

Birçok genin ve çevresel faktörlerin etkisi ile ortaya çıkan, binlerce genin ekspresyonunun değişebildiği, multiple patojenik yolların meydana geldiği ve sonunda Aβ depolanması, tau hiperfosforilasyonu, inflamasyon, oksidatif stres, enerji metabolizması ve hücrelerin hücre döngüsü ve apoptoz yollarında oluşan hatalar sonucu ortaya çıkan AH'nda, histon modifikasyonları ve DNA metilasyonları gibi epigenetik mekanizmalar da hastalığın karmaşık patogenezinde rol oynamaktadır (40). Ayrıca geç başlangıçlı AH'nda genetik olarak genom ilişkili ve tek nükleotid polimorfizm temelli çalışmalar da mevcuttur (46).

Bir astrositik hücre iskeleti proteini olan glial fibriller asidik protein (GFAP), nöronal hasara bağlı anormal astrositik fonksiyonel remodeling sırasında plazma seviyeleri artabilir ve bu durum reaktif astroglizis olarak adlandırılabilir (47). Yapılan çalışmalarda reaktif astrositlerin, amiloid plaklarına nüfuz edip çevreleyerek amiloid ilişkili patolojik sürece katkıda bulunduğu gösterilmiştir (48).

Plazma GFAP seviyesinin amiloid yükü ve bilişsel bozulma ile ilgili olabileceği öne sürülmüştür (49–51). AH riski taşıyan normal yaşlı bireylerde GFAP serum ve plazma seviyeleri yüksek bulunur ve daha kötü bilişsel işlevle ilişkilidir (50). Demansı olmayan kişilerde GFAP seviyeleri, amiloid yükü ile ilişkilidir ve hastalık öncesi AH ile ilişkili patolojiler için bir biyobelirteç olarak kullanılır.

2.1.3. AH Kliniği

AH belirtileri bireyler arasında farklılık gösterir. Dejeneratif süreç öncelikle hipokampuslar ile entherodinal kortekse yayılım gösterir. En yaygın başlangıç semptomu, yeni bilgileri hatırlamada giderek kötüleşen bir yakın bellek kaybı ve kısa süreli bellek problemleridir. Bunun nedeni, hasar gören ve yok edilen ilk nöronların genellikle yeni anıların oluşturulmasıyla ilgili beyin bölgelerinde olmasıdır. Hastalığın nörodejeneratif sürecin etkilediği alanlara paralel olarak ilerlediği görülmektedir ve buna bağlı olarak birtakım semptomlar görülür. Bu semptomlar tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo-1: Alzheimer Hastalığı Belirtileri (52)

SEMPATOMLAR
• Günlük yaşamı bozan hafıza kaybı • Problemleri planlama veya çözmedeki zorluklar • Evde, işte veya boş zamanlarında tanıdık görevleri tamamlamada zorluk • Zaman veya yer ile ilgili karışıklık • Görsel imgeleri ve uzamsal ilişkileri anlamada sorun • Konuşurken veya yazarken kelimelerle ilgili yeni sorunlar • Eşyaları yanlış yere koymak ve adımları takip etme yeteneğini kaybetmek • Azalmış veya zayıf yargılama becerisi • İşten veya sosyal faaliyetlerden çekilme • Apati ve depresyon dahil olmak üzere ruh hali ve kişilikte değişiklikler • Artan kaygı, ajitasyon ve uyku bozuklukları

Semptomlar, hafif, orta derece ve şiddetli olarak ayrılabilirken; ilerleme hızı kişiden kişiye değişir. Hastalık ilerledikçe, bilişsel ve işlevsel yetenekler azalır. Daha ileri aşamalarda günlük yaşamın temel aktivitelerinde yardıma ihtiyaç duyarlar, iletişim kurma yeteneklerini kaybederler, yakın çevresini tanıyamazlar ve yatağa ve bakıma muhtaç hale gelirler.

2.1.4. AH Tanısı

AH teşhisinde birçok değerlendirme yöntemi kullanılabilir. Bunların başında anamnez, nöropsikiyatrik testler, laboratuvar belirteçleri ve görüntüleme yöntemleri gelir. Hastalığı kesin tanısı yapılan biyopsi ya da otopsi sonucu patolojik inceleme ile koyulur.

2.1.4.1. AH Laboratuvar Testleri

AH plazma belirteçleri, küçük veya lipofilik proteinleri ve bos-beyin bariyerini geçebilen proteinleri içerir. Normal şartlarda, beyinde A β üretimi ve birikimi ve trombositler tarafından periferik üretim ile dengelenen sabit bir beyin A β seviyesi vardır ve bilişsel olarak sağlıklı bireylerde beyin A β seviyeleri, plazma A β konsantrasyonları tarafından yansıtılır. A β 'nın amiloid plaklarında biriktiği demanslı hastalarda, beyin ve plazma A β seviyeleri arasındaki ilişki net değildir. Ailesel AH'da ve *Down* sendromuna bağlı AH'da toplam A β seviyeleri ve A β_{1-42} plazma seviyeleri yükselir (53).

BOS'ta A β_{1-42} ve tau seviyeleri beyindeki metabolik süreçleri yansıtır ve doğru tanıya yardımcı olmak için AH'nın erken evresinde kullanılabilir. AH'da bilişsel olarak normal

bireylere kıyasla BOS'ta tau artarken $A\beta_{1-42}$ azalır (45). Örneğin APOE $\epsilon 4$ alleli taşıyan ya da yaşlı bir hastada beyinde $A\beta_{1-42}$ birikimi olur ve BOS'ta $A\beta_{1-42}$ azalır (54).

2.1.4.2. AH Görüntüleme Yöntemleri

Görüntüleme yöntemleri hastalığın gidişatı hakkında bilgi verir. En sık kullanılan görüntüleme yöntemleri ise yapısal ve fonksiyonel MRG'ler, PET ve SPECT görüntülemeleridir. Yapısal MRG'de, geç başlangıçlı AH'nda parahipokampüste bulunan medial temporal lobda ve amigdalada atrofi bulguları görülürken; erken başlangıçlı AH'da atrofi bulguları daha posterior posterior korteks, oksipital loblar, posterior singulat ve precuneus'ta belirgindir (53). Bu bulgular AH'na özgü bulgular olmamakla birlikte diğer nörodejeneratif hastalıklarda da görülebilir. AH'da, demansı olmayan kişilere kıyasla serebral perfüzyonda azalma görülmüştür (55). Fonksiyonel MRG, dinlenme sırasında ya da bir aktivite sırasında nöronal aktiviteyi ölçer. En yaygın olarak deoksihemoglobinin konsantrasyonlarındaki değişikliklere bağlı olarak kan akışındaki değişikliklerin MRG ile ölçümü kullanılır (56). AH'nda bilişsel görev sırasında yapılan fonksiyonel MRG kontrollerinde, medial temporal lob, pariyetal lob ve hipokampal alanlarında, diğerlerine kıyasla sinyalin azaldığını gösterilmiştir (57). Fonksiyonel MRG, nörodejeneratif bozuklukların erken evrelerinde bilişsel-davranışsal işlevlerin incelenmesini mümkün kılar ve böylece bu hastalıklardan etkilenen nöroanatomik ağların tanımlanmasına izin verebilir ve demansın altında yatan çeşitli hastalıkların ayırıcı tanısında yardımcı olabilir.

PET görüntülemesi ile beyindeki amiloid birikimi tanımlanabilir. $A\beta$ içeren fibriller plakların PET görüntülemesi, AH ve AH olmayan hastalıkları ayırt etmek için en doğrudan tekniği sağlar. PET taramaları, glukozun doku metabolizmasındaki değişiklikleri saptayarak, AH'nda temporopariyetal glukoz hipometabolizmasını ve daha şiddetli demans ile ilişkili daha düşük metabolizmayı gösterir (58). Fibriller amiloid plakların tespiti için duyarlılıkları %90'dan daha fazladır; bu nedenle, negatif bir amiloid PET taraması, hafif bilişsel bozukluğu veya demansı olan hastalarda AH'nın dışlanması için güvenilir bir göstergedir (59). Tek Foton Emisyonlu Bilgisayarlı Tomografisi (SPECT) ise beynin belirli bölümlerindeki kan akımı ve metabolizmanın belirlenmesinde önemli bir tanı yöntemidir. SPECT görüntülemelerinde, dopamin taşıyıcı proteinleri ya da reseptörleri (60) ve kolinerjik ajanlar (61) sık olarak kullanılır. Dopaminerjik hedeflerin kullanımı, AH'nı Lewy Body Demans'tan

yüksek hassasiyet ve özgüllükle ayırır ve azalmış strial sinyalin azalmış nigral nöronal sayıya karşılık geldiği gösterilir; herhangi bir A β ya da tau miktarı gösterilmez (62).

2.1.5. AH Tedavisi

AH tedavisini farmakolojik ve farmakolojik olmayan tedaviler olarak ikiye ayırabiliriz.

2.1.5.1. Farmakolojik Olmayan Tedaviler

Farmakolojik olmayan tedaviler genellikle bilişsel işlevi, günlük yaşam aktivitelerini gerçekleştirme becerisini veya genel yaşam kalitesini sürdürmek veya geliştirmek amacıyla kullanılır. Ayrıca depresyon, apati, dolaşma, uyku bozuklukları, ajitasyon ve saldırganlık gibi davranışsal semptomları azaltmak amacıyla da kullanılabilirler. Örnekler arasında sanat terapisi, aktiviteye dayalı terapi ve hafıza eğitimi sayılabilir. Egzersizler ve kelime oyunları, müzik dinleme ve yemek pişirme gibi bilişsel aktiviteler de bu tedaviler arasında denenebilir.

2.1.5.2. Farmakolojik Tedaviler

AH'nı iyileştiren ya da durduran bir ilaç günümüzde mevcut değildir. Günümüzdeki ilaçlar hastalığın semptomlarını azaltmak ya da hastalığın gidişatının yavaşlatmak için kullanılmaktadır. Hastaların kognitif fonksiyonlarında azalma, SSS'deki kolinerjik nöron kaybıyla ilişkilidir. Bilişsel semptomları azaltmak için kullanılan ilaçlar kolinerjik etkiyi arttırmaya yönelik etki eder. Bu ilaçlar sinapslardaki asetil kolin yıkımına neden olan kolinesteraz enzimlerini inhibe ederler ya da asetil kolin agonistleri olarak görev yaparlar. Asetil kolinesteraz enzim inhibitörleri olarak kullanılan ilaçlar donepezil, galantamin ve rivastigmin (63). Bu ilaçlardan galantamin ve rivastigmin tek başlarına hafif bilişsel semptomları olan hastalarda kullanılabilirken; donepezil tüm aşamalarda kullanılabilir (64). Donepezil ve galantamin selektif asetil kolinesteraz enzim inhibitörleri iken rivastigmin hem asetil kolinesteraz enzim inhibitörü hem de butiril kolin esteraz inhibitörüdür. Galantaminin etkisi kanda beyine göre daha kısıtlı iken donepezil ve rivastigminin beyindeki etkisi daha yüksek olmaktadır. Bir diğer bilişsel semptomları azaltan ilaç N-metil D-aspartat (NMDA) antagonisti olan memantindir (65). Memantin aşırı glutamat ile ilişkili toksik etkileri bloke eder ve glutamat aktivasyonunu düzenler; AH'na bağlı orta şiddetli semptomlarda kullanılır

(66). Daha şiddetli semptomları olan hastalarda memantin ve donepezil kombinasyonu olan ilaç kullanımı yaygınlaşmıştır (64,66,67).

AH patogeneğinde yer alan oksidatif stresin tedavisi ya da önlenmesi de AH'nda tedavi amaçlarından biridir. Çeşitli antioksidanların, AH'na karşı koruyucu olduğu ve oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir (Tablo-2),(66).

Tablo-2: AH'nda Koruyucu Antioksidanlar (66)

Antioksidan	Etkisi
E vitamini	Serbest radikal aracılı nöronal toksisiteyi azaltır
C vitamini	Lipid peroksidasyonunu inhibe eder
β karoten	Lipid peroksidasyonunu azaltır
B12 vitamini	Bilişsel yeteneğin geliştirilmesine yardımcı
α-lipoik asit	Vitamin C, E, glutatyon gibi diğer antioksidanların geri dönüşümüne yardımcı olur Lipid peroksidasyon reaksiyonlarından kaynaklanan reaktif ürünlere karşı asetilkolin üretimini artırır
Koenzim Q10	Aβ plak birikimine karşı nöronal korumaya yardımcı olur
Kurkumin	Aβ plak seviyelerini azaltır Antioksidan, antiinflamatuvar, nöroprotektif Lipid peroksidasyonunu inhibe eder
Palmitin	Aβ plak seviyelerini azaltır ROS ve RNS oluşumunu engeller
Melatonin	Memeli hücrelerinde oksidatif stresi azaltır Tau hiperfosforilasyonu azaltır Aβ tarafından indüklenen toksisiteyi azaltır
Östrojen	Nöronların Aβ toksisitesinden korunmasına yardımcı olur
Selegilin (MAOA-B inh)	Nigral nöronların oksidatif deaminasyondan korunmasına yardımcı olur
Resveratrol	Mitokondriyal membran potansiyelindeki bozulmayı önleyerek beyin dokusunda ROS üretimini azaltır Antiinflamatuvar, Tau hiperfosforilasyonu azaltır Lipid peroksidasyonunu azaltır
Berberin	Aβ plak seviyelerini azaltır ROS ve RNS oluşumunu engeller

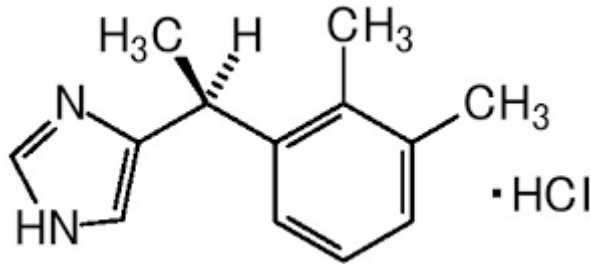
AH'nda monoamin oksidaz (MAO) aktivitesinde bir artış olur. MAO, ksenobiyotik ve biyojenik aminlerin oksidatif deaminasyonunu katalize eder. MAO inhibitörleri antioksidan özellikte olup nöroprotektif etkiye sahip olduğu da düşünülmektedir. Oksidatif deaminasyonu bloke ederek, vasküler endoteli A β 'nın etkilerinden korur ve nigral nöronların hayatta kalmasını ve işlevini iyileştirir (68). Ayrıca nöronal hasarı azaltarak AH'nın ilerlemesini azalttığı bildirilmektedir (66).

Aducanumab, AH'nda beyindeki plak sayısını azaltmaya yardımcı olan anormal A β 'yı ortadan kaldıran hastalığı modifiye edici immunoterapi olarak kullanılmaya başlanmıştır. Aducanumab çözünmeyen ve fibriller A β peptitlerini hedefler ve klinik yararları konusunda süregelen tartışmalara rağmen Alzheimerlı bireylerde amiloid yükünü önemli ölçüde azaltır (69). Aducanumab ikinci nesil antikorlardan ilk kullanılmaya başlayan ve FDA onayı alan bir ilaçtır. Diğer ikinci nesil antikorlar lecanemab, donanemab, gantenerumab ise faz 3 çalışmasında olan anti-amiloid monoklonal antikorlardır (70).

2.2. Deksmedetomidin

Deksmedetomidin kısa süreli analjezik ve sedatif olarak yoğun bakım ünitelerinde kullanılmak üzere 1999 yılında FDA tarafından onaylanan α_2 adrenarjik reseptör agonistidir. Genel ve lokal anestezi için anestezik ve postoperatif dönemde sedatif ve analjezik olarak uygulamaları benzodiazepinlerinkine benzer; ancak deksmedetomidin yan etki bakımından daha avantajlıdır. Deksmedetomidin, genelde solunum fonksiyonlarını etkilemez. Benzodiazepinlere kıyasla daha düşük bir deliryum geliştirme riski olduğu düşünülmektedir (71). Deksmedetomidinin dezavantajları; yüksek maliyet, nadiren müdahale gerektiren bradikardi ve hipotansiyondur (72).

Deksmedetomidin, medetomidinin dekstro-izomeri ve aktif formudur. Medetomidin α_2 adrenoreseptörler için selektivitesi olan lipofilik bir ajandır. Deksmedetomidin suda tamamen çözünebilir olup, pKa'sı 7,1'dir (73). Deksmedetomidin, pH'sı 4,5-7,0 arasında olan berrak, renksiz, izotonik bir solüsyondur. Kimyasal olarak (+)-4-(S)-[1-(2,3-dimetilfenil)etil]-1H-imidazol monohidroklorid şeklindedir ve formülü $C_{13}H_{16}N_2 \cdot HCl$ olmakla birlikte 200,285 g molekül ağırlığına sahiptir (Şekil-1),(73).



Şekil-1: Deksmedetomidinin Kimyasal Yapısı (73)

2.2.1. Deksmedetomidinin Farmakokinetik Özellikleri

Deksmedetomidin, İV infüzyonu takiben hızlı bir dağılım fazı görülür, dağılım yarı ömrü yaklaşık 6 dakikadır, eliminasyon yarı ömrü ise 2-3 saattir. Pik konsantrasyonları, sürekli İV infüzyondan 1 saat sonra elde edilir (74). Deksmedetomidinin proteine bağlanma oranı %93,7'dir. Deksmedetomidin, plazmada ana bağlayıcı proteini olan serum albümini ve α_1 -asit glikoproteinine bağlanır. Bu oran cinsiyet veya renal patolojiden etkilenmemekle birlikte hepatic yetersizlikte azalmaktadır (74). Deksmedetomidin öncelikle karaciğerde

N-glukronidasyona, hidroksilasyona ve N-metilasyona uğrar ve %95'i idrarla, %4'ü dışkıda metabolize edilerek elimine edilir (73). Bilinen aktif veya toksik metaboliti bulunmamaktadır (74). Deksmetomidin, sadece IV kullanımı için patentli olsa da, birçok uygulama yolları denenmiştir. Deksmetomidinin, fazla miktarda ilk geçiş eliminasyonuna uğraması nedeniyle oral biyoyararlanımı oldukça azdır. Subkutan veya intramusküler veriliş sonrasında deksmedetomidin hızla absorbe edilir. İntranasal ve bukkal mukozadan iyi emildiği gösterilen deksmedetomidinin, seçilmiş vakalarda, çocuk veya geriatric hastalarda kullanımı yararlı olabilir (75). Artan dozlarla orantılı olarak pik plazma konsantrasyonu artmakla birlikte farmakokinetiği nonlineer bir şekil göstermektedir (76). Bu nedenle 0.5-1 ng/ml gibi çok dar bir terapötik aralıkta kullanılabilir. Yoğun bakım ünitelerinde sedasyon için standart doz aralığı saatte 0.2 ile 0.7 mcg/kg'dır; bu doz daha sonra hastanın yanıtına bağlı olarak, istenilen sedasyon düzeyine ulaşılacak şekilde, 0.2-1.4 mcg/kg/saat doz aralığında basamaklar halinde ayarlanabilir.

2.2.2. Deksmetomidinin Farmakodinamik Özellikleri

Deksmetomidin, selektivitesi yüksek α_2 agonisttir. Bu özelliğiyle yaygın olarak yetişkinlerde kısa süreli sedasyon amacı ile yoğun bakım ünitelerinde kullanılır. Sedasyon ve analjezik etkilerini özellikle α_2 adrenoseptörlerin subtipi olan α_{2A} üzerinden gerçekleştirmektedir (73).

Bir imidazol bileşiği olan deksmedetomidin, spesifik ve seçici α_2 adrenoseptör agonizmi sergileyen medetomidinin farmakolojik olarak aktif dekstroizomeridir (76). Vücudumuzda α_2 adrenoreseptörler özellikle santral sinir sisteminde, damar düz kası gibi efektör organlarda ve sempatik sinir sistemi tarafından uyarılan diğer dokularda yerleşmişlerdir. Sempatik sinir uçlarındaki α_2 adrenoreseptörlerin presinaptik aktivasyonu noradrenalin salınımını engeller ve sempatolitik etki gösterir. Bu etkilerini inhibitör G proteini üzerinden K iyon kanalları gibi iyon kanallarının geçirgenliğini değiştirerek yapar (77). *Locus ceruleus* ve medulla spinalisin α_2 adrenoreseptörlerini bağlar ve sırasıyla sedasyon ve analjeziye neden olur, bunun yanında hipotansiyon ve bradikardi yapar (78). Diğer alanlardaki reseptörlerin aktivasyonuna verilen yanıtlar ise; mide bağırsak yolunda azalan salivasyon, azalmış sekresyon, azalmış bağırsak hareketliliği; vasküler ve diğer düz kasların kasılması, renin salınımının inhibisyonu, artan glomerüler filtrasyon, böbrekte sodyum ve suyun salgılanmasının artması; göz içi basıncı azalması ve pankreastan insülin salınımının

azalmasıdır (77). Deksmedetomidinin α_2 reseptör selektivitesinin yüksek olması ve α_2 reseptörlerin SSS'nde daha yoğun olması nedeniyle sedasyon ve anksiyolizis etkileri daha belirgindir.

Deksmedetomidinin, α_2 selektivitesi, hayvanlarda düşük ve orta dozların (10-300 mcg/kg) yavaş İV infüzyonu sonrasında gözlenmiştir. Hem α_1 hem α_2 aktivitesi, yüksek dozların (≥ 1000 mcg/kg) yavaş İV infüzyonu sonrasında veya hızlı İV uygulama ile gözlenmiştir. Kardiyovasküler etkiler doza bağlıdır; daha düşük infüzyon oranlarında santral etkiler baskın olarak kalp atım hızı ve kan basıncında azalmaya neden olurken; daha yüksek dozlarda periferik vazokonstriktif etkiler ön plana çıkar ve sistemik vasküler direnç ve kan basıncında artışa neden olur, ayrıca bradikardik etki de belirginleşir (79).

Diğer α_2 reseptör agonisti Klonidin ise α_2 reseptörler üzerinde parsiyel agonistik etki gösterirken, deksmedetomidin tam agonisttir ve deksmedetomidinin daha yüksek intrinsek aktivitesi vardır. Klinik kullanımda selektivitesi en yüksek α_2 reseptör agonisti, deksmedetomidindir. Klonidinin α_2/α_1 selektivitesi 220/1 iken, deksmedetomidinin α_2/α_1 selektivitesi 1620/1'dir (80).

2.2.3. Deksmedetomidinin SSS'ne Etkileri

Alfa-2 agonistler, sedatif etkilerini SSS'nde uyanıklık modülatörü ve beyin baskın noradrenerjik nükleusu olan *locus seruleus*un inhibisyonu ile sağlar. Analjezik yanıt ise α_2 agonistlerin nosiseptif yoldaki substans P salınımının bloke edildiği dorsal nöron kökleri düzeyinde gerçekleşmektedir. Spinal korddaki α_2A reseptörlerinin aktivasyonu, supraspinal düzeyde *locus seruleus*un inhibisyonunu ve nöradrenalin salgılanmasını azalttığı düşünülmektedir (76). Uyku düzeninde etkili olan ventrolateral preoptik çekirdek (VLPO), *locus seruleus* tarafından inhibe edilir. α_2 agonistler *locus seruleus*u inhibe ederek VLPO üzerinde disinhibisyon sağlar ve aktive olan VLPO uykuya meyil yaratır. Bu nedenle deksmedetomidinin oluşturduğu sedasyon fizyolojik uyku durumuna daha çok benzemektedir. Uzun süreli kullanımından sonra tolerans görülebilir. Ancak kısa süreli kullanımlarında tolerans, bağımlılık, addiksiyon ciddi bir problem oluşturmaz (81). Kortikal kan damarlarında presinaptik α_2 adrenoseptörlerin aktivasyonu norepinefrin salınımını azaltırken, postsinaptik α_2 adrenoseptörler vasküler düz kas tonusu arttırabilir. Böylece deksmedetomidin infüzyonu hem direkt olarak vasküler düz kas konstrüksiyonunu tetikler hem de indirekt yoldan santral sempatik aktivitede değişiklikler yapar, böylece serebral

metabolik hızı azaltarak serebral kan akımını etkileyebilir (82). Deksmetomidin, inflamasyonu baskılayarak, anti-apoptotik sinyal yollarını aktive ederek ve nöronal otofajiyi inhibe ederek, serebral iskemi/reperfüzyon hasarını azalttığı gösterilmiştir (83). Ayrıca farelerde yapılan travmatik beyin hasarı modelinde deksmedetomidinin, erken nörolojik disfonksiyonu hafiflettiği, nötrofil infiltrasyonunu ve mikrogial aktivasyonla birlikte proinflamatuvar mediatör sekresyonunu azalttığı, kan-beyin bariyeri hasarını ve hücrel apoptozu azalttığı, NF- κ B ve NLRP3 inflamatuvar aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (84).

2.2.4. Deksmetomidinin Solunum Sistemine Etkileri

Diğer birçok sedatif ve analjeziğin tersine, tedavi dozlarında solunum depresyonu beklenmez. Karbondioksit verilen solunum yanıtı değişmez. Bununla birlikte solunum seslerinde azalma, bradipne, dispne, hipoventilasyon ve bronkodilatasyon gözlenebilir (85). Yapılan bir hayvan çalışmasında histamin kaynaklı bronkokonstriksiyonu engellediği gösterilmiştir (86). Sağlıklı bireylerde tek akciğer ventilasyonu sırasında intrapulmoner şanti azalttığı gösterilmiştir (87). Ayrıca deksmedetomidin, pulmoner arter basıncını doğrudan azaltır. Önceden pulmoner hipertansiyonu olan hastalarda pulmoner arter basıncını artırmaz (88). Kalp cerrahisi sonrası mevcut pulmoner hipertansiyonu olan hastalarda pulmoner arter basıncını etkili bir şekilde azaltır (89). Akciğer cerrahisi geçiren orta dereceli KOAH'lı hastalarda klinik olarak anlamlı farklılık sağlar; tek akciğer ventilasyonu sırasında oksijenasyonu iyileştirir ve ölü boşluk ventilasyonunu azaltır (90). Yüksek plazma konsantrasyonlarında pulmoner vasküler direnci arttırarak pulmoner hipertansiyona neden olduğu da gösterilmiştir (26).

2.2.5 Deksmetomidinin Kardiyovasküler Sisteme Etkileri

α_2 agonistler hem hipotansiyon hem de hipertansiyona neden olabilir. Düşük dozlarda sempatoлизis etkisi ön plandadır; otonom sinir sistemi üzerinde α_2A adreno-reseptörler aracılığıyla blokaj aktivitesi vardır (91). Bu etkilerini *locus seruleus* nöradrenarjik blokaj nöroefektör bileşkede nörepinefrin salgısını inhibe ederek gerçekleştirmesi etki mekanizmaları arasındadır. Yüksek dozlardaki α_2 agonistler, damar duvarlarındaki düz kas hücrelerinde bulunan α_2B adreno-reseptörler aracılığıyla hipertansiyona neden olur.

Deksmedetomidinin bolus enjeksiyonunu takiben, periferik α_2 aktivasyonu yolu ile kan basıncında geçici bir artış ve kalp hızında düşüşe neden olur (73). Kalp hızı 15 dakika içinde bazal değerlere dönerken kan basıncı 1 saat boyunca tedrici olarak bazal değerinin altında seyreder. Ayrıca deksmedetomidin, ciddi bradikardiye (<40 atım/dk) ve nadiren de sinüs arrestine yol açabilir; bu durum sıklıkla kendiliğinden geri döner veya antikolinergik ilaçlar ile kolaylıkla tedavi edilir (73).

2.2.6. Deksmedetomidinin Klinik Kullanım Alanları

Deksmedetomidinin solunum depresyonu olmaksızın analjezik, anksiyolitik ve anti-deliryum etkileri olduğu gösterilmiştir (92). Bu özellikleri onu yoğun bakım ünitesinde ve perioperatif dönemde sedasyon için uygun bir seçenek haline getirmektedir. Sedatif etkisi nedeni ile premedikasyonda kullanılabilir. Ayrıca hipnotik etkisi nedeni ile opioid, intravenöz ve inhalasyon anesteziyelerinin gereksinimini azaltmak amacıyla adjuvan olarak kullanılmaktadır. Yoğun bakım hastalarında deksmedetomidin ile yapılan sedasyonların daha fazla fizyolojik uyku-uyanıklık döngüsü ile sonuçlanması nedeni ile hastaların uyandırılabilir ve kooperatif kaldığı dolayısıyla deliryum riskinin azaldığı ileri sürülmüştür (93). Deksmedetomidin, düşük doz infüzyonlarda amnezi sağlar ve intraoperatif dönemde hemodinamik stabilite sağlar, anestezi ve analjezi gereksinimini azaltır (94). Sevofluran ile beraber kullanımında anlamlı derecede düşük MAK gereksinimi olduğu gösterilmiştir (95).

Sedasyon için dozu, cerrahiden 15 dakika önce İV infüzyon ile uygulanan 0,33-0,67 $\mu\text{g/kg}$ 'dır ve bu doz aralığında endotrakeal entübasyonda hemodinamik yanıtı azaltır. Morfinin analjezik etkisini potansiyalize ederler ve cerrahi sonrası analjezik kullanımını %10-15 oranında azaltır. Opioid ajanların hızlı detoksifikasyonunda ve kokain kesilme sendromunda da kullanılmaktadır (77).

2.2.7. Deksmedetomidinin Yan Etkileri

Deksmedetomidinin, en sık görülen yan etkileri hipotansiyon, bradikardi, ağız kuruluğu, bulantı ve hipoksidir. Diğer sistem yan etkileri Tablo-3'te gösterilmiştir.

Tablo-3: Deksmetomidinin Yan Etkileri

Genel Sistem-Metabolizma	Hiperglisemi, hipoglisemi Hipotermi, hipotermi Metabolik asidoz, hipoalbuminemi Hipovolemi, hipokalsemi
Psikiyatrik	Ajitasyon, halusinasyon İnsomnia, sinirlilik
Kardiyak	Bradikardi, MI, Taşikardi AV-blok, AF, VT
Pulmoner	Solunum depresyonu, atelektazi Plevral efüzyon, pulmoner ödem Dispne
Vasküler	Hipotansiyon Hipertansiyon
SSS	Baş dönmesi, baş ağrısı Nevralji, nörit Konuşma bozukluğu
GİS	Bulantı, kusma, ağız kuruluğu Abdominal ağrı
Biliyer Sistem	Artmış GGT, AST, ALT
Ürogenital	Poliüri, hematüri
Diğer	Hemostaz bozukluğu Anemi Geçici iskemik atak Fotopsi Ciltte döküntü-erüpsiyon

Özellikle yaşlı hastalarda, genel anestezi sonrası görülen ve bilişsel yeteneklerde kısa süreli hasar ile karakterize olan hafıza kaybı, duygu durum bozukluğu, konfüzyon ve uyku bozuklukları ile seyreden POKD yaygın görülen komplikasyonlardan biridir (96). Bu durum mortalite artışına, iyileşme sürecinin gecikmesine ve beklenmedik komplikasyonlara neden olabilir. Kısa süreli görülen POKD AH'na dönüşebilmektedir (97). Genel anestezi altında

deksmedetomidinin perioperatif kullanımı, POKD’u ve buna zemin hazırlayan inflamasyon sürecini anlamlı olarak azalttığı birçok çalışmada gösterilmiştir (98).

Sıçanlarda yapılan bir çalışmada, deksmedetomidinin nöroprotektif etkisi, antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik mekanizmalarla, izofluran kaynaklı oluşan bilişsel bozulmayı azalttığı gösterilmiştir (99).



2.3. Zebra Balığı

2.3.1. Zebra Balığının Genel Özellikleri ve Morfolojisi

Cyprinidae familyasından olan zebra balığı (*Danio rerio*), doğal yaşam ortamı Güney Asya, özellikle Hindistan, Pakistan, Bangladeş ve Güneydoğu Himalayalar olan tropikal bir tatlı su balığıdır (100). “Zebra balığı” adı, vücutlarının her iki tarafındaki yatay mavi çizgilerden gelir.

Yetişkinleri 2,5-4 cm uzunluğunda olup 6 cm’ye kadar ulaşabilir. Erkekler dişilerden daha ufak ve incedir, karınları düzdür. Dişiler, yumurtaları barındıran daha büyük karınlarından tanınabilir ve erkeklerle göre daha irilerdir. Vücutları temelde gümüş renklidir ve boydan boya, kuyruğa kadar devam eden 7 ile 9 arasında çizgiye sahiptir (Şekil-2). Erkekler, dişi zebra balıklarına göre daha kırmızımsı olma eğilimindedir (101).



Şekil-2: Zebra Balığının Yetişkin Erkek ve Dişi AB Suşu (<https://www.asianscientist.com/2014/12/in-the-lab/zebrafish-switch-sex/> adresinden küçük değişikliklerle uyarlanmıştır.)

Hareketli bir balık türüdür ve sürü halinde yaşarlar. Beslenme alışkanlıklarına göre zebra balığı omnivorlar olarak sınıflandırılırlar. Zebra balıkları su sıcaklığı bakımından geniş bir yelpazede yaşayabilir. 18-30°C aralığında bir sorun olmadan hayatını sürdürebilmektedir. Zebra balıklarının üremeleri oldukça kolaydır ve üremeleri için ideal sıcaklık 26-28°C’dir. Laboratuvar ortamında yaşadıkları suyun pH’sı genellikle 7.2-7.6 ve sıcaklığı 28,5°C’dir.

Zebra balıkları 3 aylık kısa bir sürede büyüyebilirler ve dişiler haftada yüzlerce yumurta verebilir. Embriolar, 2-4 gün içinde hızlıca gelişmekte olup, 24 saat içinde kalp

atışı ve eritrositler diseksiyon mikroskobu altında kolayca gözlenebilir (102). Jenerasyon süresi hızlı olduğundan 3 ayda erişkinliğe ulaşırlar ve ortalama 2-3 yıl yaşarlar.

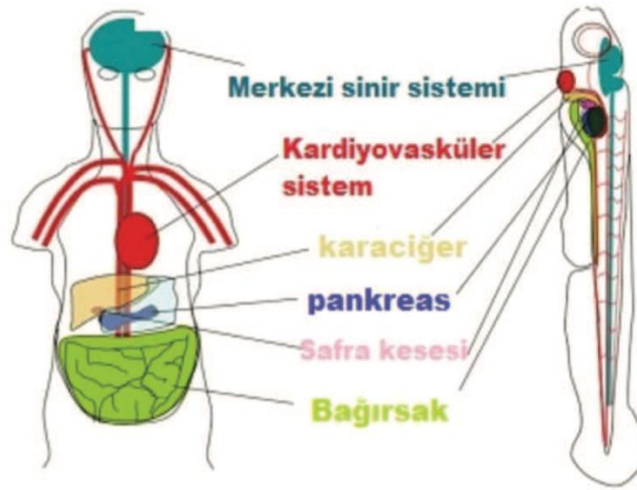
2.3.2. Model Organizma Olarak Zebra Balığı

Zebra balığı, birçok çalışmada kullanılan önemli bir omurgalı modelidir ve bu canlıyla çalışmanın pek çok avantajı vardır. Bunun nedenleri, jenerasyon zamanının kısalığı, düşük maliyeti, kolay bakımı, yumurta ve embriyoların optik transparan olması, gen manipülasyonlarının kolaylığı, laboratuvar ortamında kolay beslenebilmesi ve çoğalabilmesi, yüksek fekondite göstermesi (ergin dişiler haftalık aralıklarla yüzlerce yumurta bırakır), dayanıklı bir tür olması, kolay bulunabilmesi ve tüm genomu dizilenmiş olmasıdır (103,104).

Ayrıca gelişimin hızlı olması ve major organların fertilizasyondan 24 saat sonra oluşması, hastalık durumunda canlı dokusundaki görüntüyü alabilmek ve gerçek zamanlı olarak patolojiyi gözleyebilmek de en önemli avantajlarındanıdır.

Zebra balığı, kardiyoloji, nöroloji ve çevresel toksikoloji dâhil olmak üzere çeşitli tıbbi ve bilimsel disiplinlerde model organizma olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Zebra balığı, ilk olarak *George Streisinger* (Oregon Üniversitesi) tarafından biyolojik bir model olarak 1970'lerde kullanılmıştır. Çünkü genetik olarak manipüle etmek için kullanımı ve yetiştirilmesi fareden daha basit ve kolaydır (105). Bir başka önemli husus da zebra balığı genomunun dizilenmesinin 2013 yılında *Sanger* Enstitüsü tarafından Zebra Balığı Araştırma Topluluğu ile iş birliği halinde yayınlanmış olmasıdır (106). Protein kodlayan insan genlerinin %70'inin zebra balıklarında bulunan genlerle benzer olduğunu (gen diziliminin aynı olması) ve insanlarda görülen hastalıklarla ilişkili olduğu bilinen genlerin %84'ünün zebra balığında da rastlandığını açıklamışlardır. Bu sebeplerden dolayı zebra balıkları, insan hastalıklarıyla ilişkili genlerin biyolojik aktivitelerinin anlaşılmasında da başarıyla kullanılmaktadır (106).

Zebra balığı, beyin, sindirim sistemi, kas sistemi, damar sistemi ve doğuştan gelen bağışıklık sistemi dahil olmak üzere insanlarla birçok fizyolojik ve genetik benzerliğe sahiptir (Şekil-3).



Şekil-3: Benzerlik Gösteren Zebra Balığı (*Danio Rerio*) ve İnsan Organ Sistemleri

Yetişkin zebra balığı ayrıca SSS tarafından kontrol edilen bilişsel, duyumotor ve temel motor tepkiler gibi nörobiyolojik tepkilere sahip olup, insanlarla homolog beyin yapıları içeren entegre bir sinir sistemine sahiptir (107). Aslında, beyinlerinin hücresel yapısının yanı sıra sinaptik yapısı ve işlevi de insanlarınkiyle benzerlik göstermektedir. Bu nedenle, günümüzde hem larva hem de yetişkin zebra balığı, beyin işlevi, işlev bozukluğu ve bunların genetik ve farmakolojik modülasyonu gibi sinir sistemi hakkındaki bilgilerimizi zenginleştirmek için kullanılmaktadır (108).

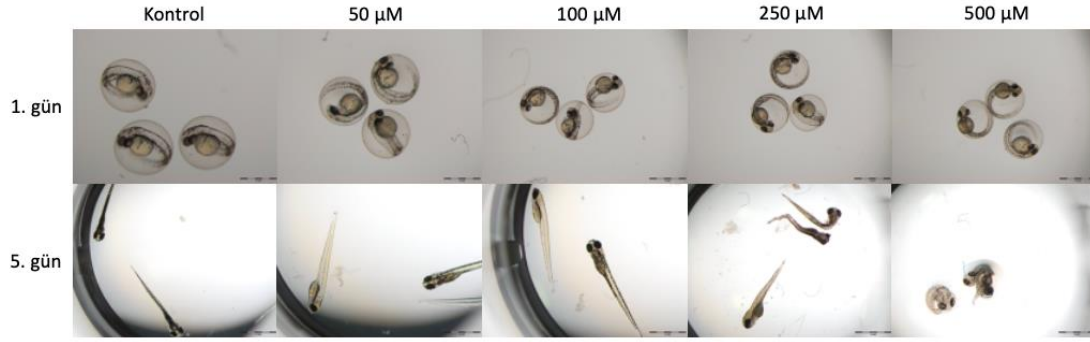
Birçok insan hastalığı zebra balığında başarılı bir şekilde modellenmiştir. Zebra balığı modeli, ilaç araştırmalarında memeli modellerine bir alternatif olmakla birlikte ilaç keşfi sürecinin her aşamasında kullanılabilen çok değerli bir modeldir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Deksmedetomidinin zebra balığı amiloid beta toksisitesi modelindeki davranışsal etkilerinin incelendiği bu çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İBG-HADYEK) 12/02/2020 tarih ve 2020-007 protokol numaralı onayı (EK 1) alınmasının ardından projenin in-vivo deneyleri için kullanılacak zebra balıkları İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi Zebra Balık Birimi'nde üretilmiştir ve yine bu birimde yapılacak olan in-vivo deneylerde kullanılmıştır. Çalışmaya *wild* (yabanıl) tip (wt TL), yaş aralığı 6-12 ay olan, 15 erkek, 15 dişi olmak üzere toplam 30 adet zebra balığı alınmıştır. Zebra balıkları, İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu yönergesinde belirlenen etik kurallara uygun olarak barındırıldı. Denekler standart zebra balığı yemi ile beslendi ve standart zebra balığı birimi koşullarında (Tank suyu sıcaklığı 28,3° C, pH 7,43) izlendi.

3.1. Deksmetomidin Dozlarını Belirlemek İçin Sitotoksite Çalışması

Çalışmada kullanılacak düşük ve yüksek doz deksmedetomidin dozlarını belirlemek amacıyla zebra balığı embriyolarında neden olduğu toksisiteyi ve uygun konsantrasyonu belirlemek için sitotoksite çalışması yapılmıştır. Fertilizasyon sonrası 24 saatlik yabanıl tip (wt TL) zebra balığı embriyolarına çeşitli konsantrasyonlarda deksmedetomidin uygulandı. Embriyolar E3 zebra balığı embriyo ortamından (NaCl, KCl, CaCl₂.2H₂O ve MgCl₂.6H₂O; pH 7.2) alınarak konsantrasyonları daha önce zebra balığında deksmedetomidin uygulanan çalışmalardaki profillere göre seçilmiş kuyucuklara ekilmiştir (109–112). Uygulama 3 embriyo/1 kuyucuk olacak şekilde ve deksmedetomidin konsantrasyonları 0,1 µM, 1 µM, 10 µM, 50 µM, 100 µM, 250 µM ve 500 µM olacak şekilde gerçekleştirildi. Kontrol grubuyla da beraber toplam 8 grup belirlenmiş ve her grup için 3 kuyucuk olacak şekilde toplam 24 kuyucuğa ekilmiştir. Zebra balığı embriyoları deksmedetomidin ilavesinden 24 saat sonra stereo mikroskop kullanılarak gözlemlenmiştir (Şekil-4). Toksisite ve gelişim defektleri açısından gözlem yapılmıştır (113).



Şekil-4: Zebra balığı embriyolarının farklı konsantrasyonlardaki deksmedetomidin içeren kuyucuklara ekildikten sonra 1. ve 5. günlerdeki mikroskopik görüntüleri

24 saatlik maruziyet sonunda hiçbir kuyucukta toksisite ve ölüm gözlenmedi. Bunun üzerine 5. günde tekrar gözlem yapıldı; 250 ve 500 µM konsantrasyondaki embriyolarda gelişimi etkiledi ve ölüm gözlemlendi. 24. saatte embriyolar koryon içinde, 5. günde ise koryondan çıkmış olduğu için, ilacın koryonu geçemediği ve zebra balıklarında gelişimi etkilediği için ölüme sebep olduğu düşünüldü. Çalışma sonunda embriyolar sakrifiye edildi.

Bunun üzerine çalışmamızda da, zebra balıklarına (0,7 gr ortalama ağırlığı), insandaki gibi prosedürel sedasyonda yükleme dozuna göre deksmedetomidin hesaplanıp, 250 ve 500 µM konsantrasyonlarda, 2 µL retro-orbital enjeksiyon (ROE) yapıldı. 24. saatte toksisite ve ölüm gözlenmemesi üzerine düşük ve yüksek doz konsantrasyonları 250 ve 500 µM olarak belirlendi.

3.2. Deney Grupları ve Protokol

Kontrol Grubu (Grup 1, n=6): Serebroventriküler mikro enjeksiyon (CVMI) yöntemi ile 2 µL PBS enjeksiyonu yapıldı. 3 gün sonra ROE ile 2 µL PBS verildi. Ardından 24 saat sonra davranış testleri yapıldıktan sonra yüksek doz trikain ile sakrifiye edilerek balıkların yarısına *western blot*, diğer yarısına qPCR yapıldı. İmmünfloresan boyamalar ile de konfokal mikroskop ile görüntülendi.

Aβ Toksisitesi Grubu (Grup 2, n= 6): CVMI yöntemi ile 2 µL, 40 µM Aβ42 enjeksiyonu yapılarak Aβ toksisitesi oluşturuldu. 3 gün sonra ROE ile 2 µL PBS verildi. Ardından 24 saat sonra davranış testleri yapıldıktan sonra, yüksek doz trikain ile sakrifiye

edilerek, balıkların yarısına *western blot*, diğer yarısına qPCR yapıldı. İmmünfloresan boyamalar ile de konfokal mikroskop ile görüntülendi.

Deksmedetomidin Grubu (Grup 3, n=6): CVMI yöntemi ile 2 µL PBS enjeksiyonu yapıldı. 3 gün sonra ROE ile 2 µL, 250 µM deksmedetomidin verildi. Ardından 24 saat sonra davranış testleri yapıldıktan sonra, yüksek doz trikain ile sakrifiye edilerek balıkların yarısına *western blot*, diğer yarısına qPCR yapıldı. İmmünfloresan boyamalar ile de konfokal mikroskop ile görüntülendi.

Aβ Toksisitesi + Deksmedetomidin Grubu (Grup 4, n=6): CVMI yöntemi ile 2 µL, 40 µM Aβ42 enjeksiyonu yapılarak Aβ toksisitesi oluşturuldu. 3 gün sonra ROE ile 2 µL, 250 µM deksmedetomidin verildi. Ardından 24 saat sonra davranış testleri yapıldıktan sonra yüksek doz trikain ile sakrifiye edilerek balıkların yarısına *western blot*, diğer yarısına qPCR yapıldı. İmmünfloresan boyamalar ile de konfokal mikroskop ile görüntülendi.

Aβ Toksisitesi + Yüksek Doz Deksmedetomidin Grubu (Grup 5, n=6): CVMI yöntemi ile 2 µL, 40 µM Aβ42 enjeksiyonu yapılarak Aβ toksisitesi oluşturuldu. 3 gün sonra ROE ile 2 µL, 500 µM deksmedetomidin verildi. Ardından 24 saat sonra davranış testleri yapıldıktan sonra yüksek doz trikain ile sakrifiye edilerek balıkların yarısına *western blot*, diğer yarısına qPCR yapıldı. İmmünfloresan boyamalar ile de konfokal mikroskop ile görüntülendi.

Tablo-4: Deney Grupları ve Protokol

	Deney Grupları	Serebroventriküler Mikro Enjeksiyon (CVMI)	Retro-orbital Enjeksiyon (ROE)	Davranış Testi	Moleküler
1	Kontrol Grubu	PBS (2 µL)	PBS (2 µL)	Sosyal Etkileşim, Ayna Isırma & Novel Tank	Western Blot, qPCR & İmmü floresan Boyama
2	Aβ Toksisitesi Grubu	Aβ42 (2 µL, 40 µM)	PBS (2 µL)	Sosyal Etkileşim, Ayna Isırma & Novel Tank	Western Blot, qPCR & İmmü floresan Boyama
3	Deks Grubu	PBS (2 µL)	Düşük Doz Deks (250 µM, 2 µL)	Sosyal Etkileşim, Ayna Isırma & Novel Tank	Western Blot, qPCR & İmmü floresan Boyama
4	Aβ Toksisitesi + Deks Grubu	Aβ42 (2 µL, 40 µM)	Düşük Doz Deks (250 µM, 2 µL)	Sosyal Etkileşim, Ayna Isırma & Novel Tank	Western Blot, qPCR & İmmü floresan Boyama
5	Aβ Toksisitesi + Yüksek Doz Deks Grubu	Aβ42 (2 µL, 40 µM)	Yüksek Doz Deks (500 µM, 2 µL)	Sosyal Etkileşim, Ayna Isırma & Novel Tank	Western Blot, qPCR & İmmü floresan Boyama

3.3. Deneysel Çalışma Modeli

Zebra balıklarında Aβ toksisitesi oluşturmak amacıyla CVMI yöntemi ile Amiloid-beta 42 (Aβ42) enjeksiyonu yapıldı. Enjeksiyonun ardından 3. gün balıklara retro-orbital (RO) yolla deksmedetomidin enjeksiyonu yapıldı. RO deksmedetomidin enjeksiyonu ardından 24 saat sonra davranış testleri yapıldı. Davranış testleri tamamlanan balıklar kurban ediliş, qPCR, western blot analizleri ve immü floresan boyamalar yapıldı.

3.3.1. Serebroventriküler Mikro Enjeksiyon (CVMI)

A β 42 peptidinin yetişkin zebra balığı beynine uygulanması için transportan (TR-A β 42) insan A β 42 hücre penetrasyon peptidi kullanıldı ve CVMI ile uygulama yapıldı (114–116).

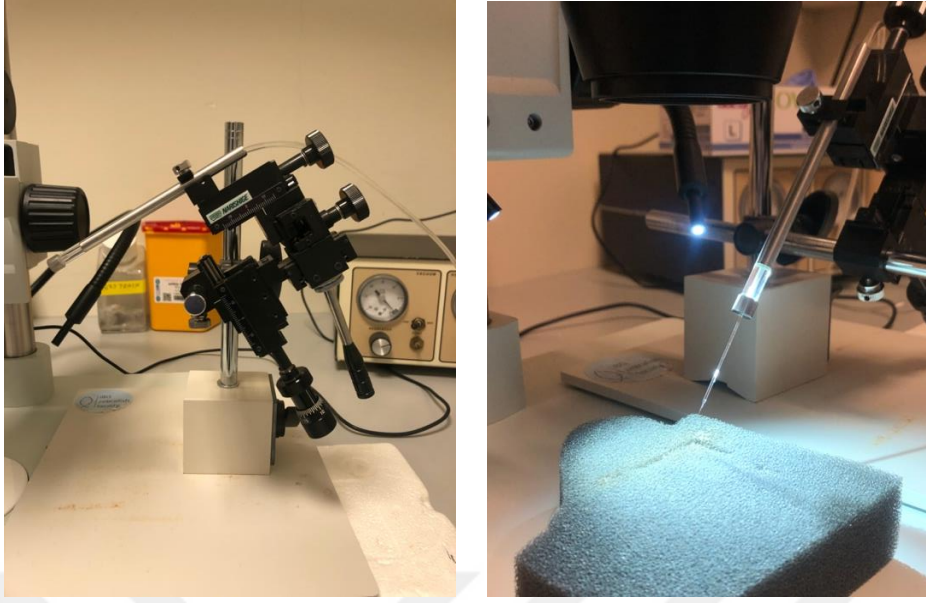
3.3.1.1. Enjeksiyon Karışımının Hazırlanması

Önceden hazır olarak temin ettiğimiz liyofilize A β 42 peptitlerini fosfat tamponlu salin (PBS) (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4) ile seyrelterek 40 μ M konsantrasyonundaki enjeksiyon solüsyonunu hazırladık.

3.3.1.2. Enjeksiyon aparatının hazırlanması

Aşağıdaki parametrelere sahip bir iğne çekici kullanarak cam enjeksiyon kapillerleri hazırlandı:

- Isıtma döngüsü, 537; çekme döngüsü, 250; hız, 1.5 s; süre, 80 ms.
- Cam kapillere daha önceden hazırlanan A β 42 enjeksiyon solüsyonunu yüklendi.
- Cam kapilleri mikroenjeksiyon tutucuya yerleştirildi ve enjeksiyon açısını 45°'ye ayarlandı (Resim-1).

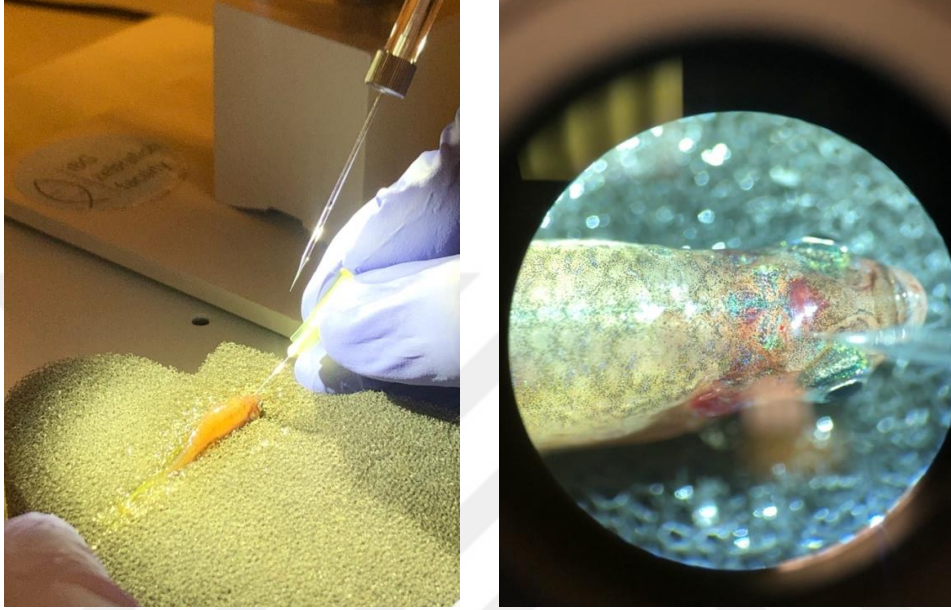


Resim-1: Mikroenjeksiyon Tutucu ve A β 42 Enjeksiyon Solüsyonu Yüklenen Cam Kapillerin Yerleştirilip 45°'ye Ayarlanmış Enjeksiyon Aparatı

3.3.1.3. SVME

- Enjeksiyon yapılacak balık bulunduğu tankından, trikain içeren bir taşıma kabına (4.2ml (4mg/ml) trikain/100ml balık suyu) alındı.
- Balıkta operküler hareket (yüzgeç hareketi) durana kadar, anestezi içinde bekletildi.
- Operküler hareketi duran balık, üzerinde balığı yerleştirmek için yarı oluşturulan sünger üzerine alındı.
- Balığı forseps ile tutarak iki yan plakanın birleştiği optik tektum üzerinde kafatasında 30 G'lik bir iğnenin ucunu kullanarak bir yarı oluşturuldu (Resim-2). Kanamaya ve hasara neden olacağı için iğne ucu beyin dokusuna sokulmadı. İğnenin yalnızca ucu kullanıldı ve kafatasından 1 mm'den fazla nüfuz ettirilmedi.
- Balık tutularak, cam kılcal damarın ucu kesi bölgesinden geçirildi.
- Cam kılcalın ucu 45° açıyla telensefalona doğru yönlendirildi ve çözeltinin 2 μ L'si enjekte edildi (Resim-2). Sıvı, enjeksiyondan hemen sonra dağıldı.

- Balık toparlanana kadar bir taşıma kabına geri konuldu. (Derlenme normalde 1 dakika sürdü. Daha uzun derlenme süresinde, bir sonraki balık daha kısa süre anesteziye tutuldu.)



Resim-2: Balığın Kafatasında 30 G'lik Bir İğnenin Ucu Kullanılarak Bir Yarık Oluşturulması ve Cam Kılcalın Ucunun 45° Açıyla Telensefalona Doğru Yönlendirilerek Çözeltinin Enjekte Edilmesi

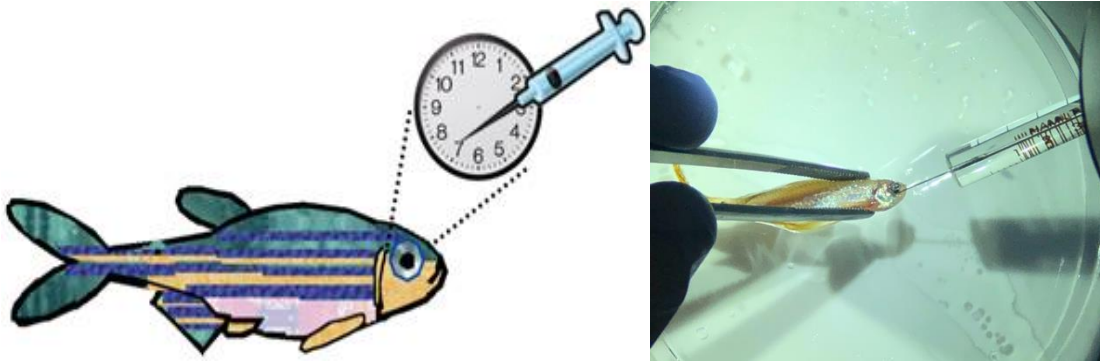
3.3.2. Retroorbital Deksmetomidin Enjeksiyonu

Zebra balıklarında (*Danio rerio*), damar çapının küçük olması nedeniyle, İV ilaç enjeksiyonu uzun süre zor olmuştur. Tarihsel olarak, kan dolaşımına enjeksiyonlar doğrudan kalpten yapılırdı. Bununla birlikte, kalp içi girişimlerin çok yüksek bir ölüm oranı vardır. Enjeksiyon sırasında kalp genellikle delinir ve bu da balıkları enfeksiyona, büyük kan kaybına veya ölümcül organ hasarına eğilimli hale getirir. Bu nedenlerle, enjeksiyon bölgesinin gözün arkasında olduğu, retro-orbital venöz sinüse yeni bir enjeksiyon prosedürü geliştirilmiştir. Ayrıca, uygun şekilde yapıldığında, enjekte edilen hücreler ve/veya ilaçlar hızla kan dolaşımına girmektedir. Bu enjeksiyon tekniği, materyalin yetişkin balıkların kan dolaşımına verimli bir şekilde verilmesine izin verirken, ölüm oranını en aza indirir (117).

Zebra balıklarında A β toksisitesi oluşturmak amacıyla CVMI yöntemi ile A β 42 enjeksiyonu yapılmasının ardından 3. günde balıklara RO yolla PBS, 250 μ M deksmedetomidin ya da 500 μ M deksmedetomidin enjeksiyonu yapıldı.

3.3.2.1. Protokol

- Balığa trikain (4.2ml (4mg/ml) trikain/100ml balık suyu) içinde anestezi uygulandı.
- Balık operküler hareketi durduktan sonra sağ tarafı yukarı bakacak şekilde boş petri kabı içerisine yan yatar şekilde yerleştirildi.
- PBS ya da 250/500 μ M deksmedetomidinden 2 μ L çektiğimiz Hamilton şırıngasını sağ el ve işaret parmağımızla pistonun üzerinde tutarak sol el ile balığın gövdesini forseps ile nazikçe sabitledik.
- İğneyi, (balık gözü bir saat olsaydı) iğne 7:00 konumunu ve balığa 45 derecelik bir açıyı gösterecek şekilde eğim yukarı bakacak şekilde konumlandırdık (Resim-3).
- İğne 1-2 mm yavaşça 7:00 konumuna sokuldu ve pistonu yavaşça bastırıldı.
- Balık toparlanana kadar bir taşıma kabına geri konuldu.



Resim-3: İğnenin Saat 7:00 Konumunu ve Balığa 45 Derecelik Bir Açığı Gösterecek Şekilde 1-2 mm Yavaşça Sokulması (117)

3.3.3. Yetişkin Zebra Balıklarına Uygulanan Davranış Testleri

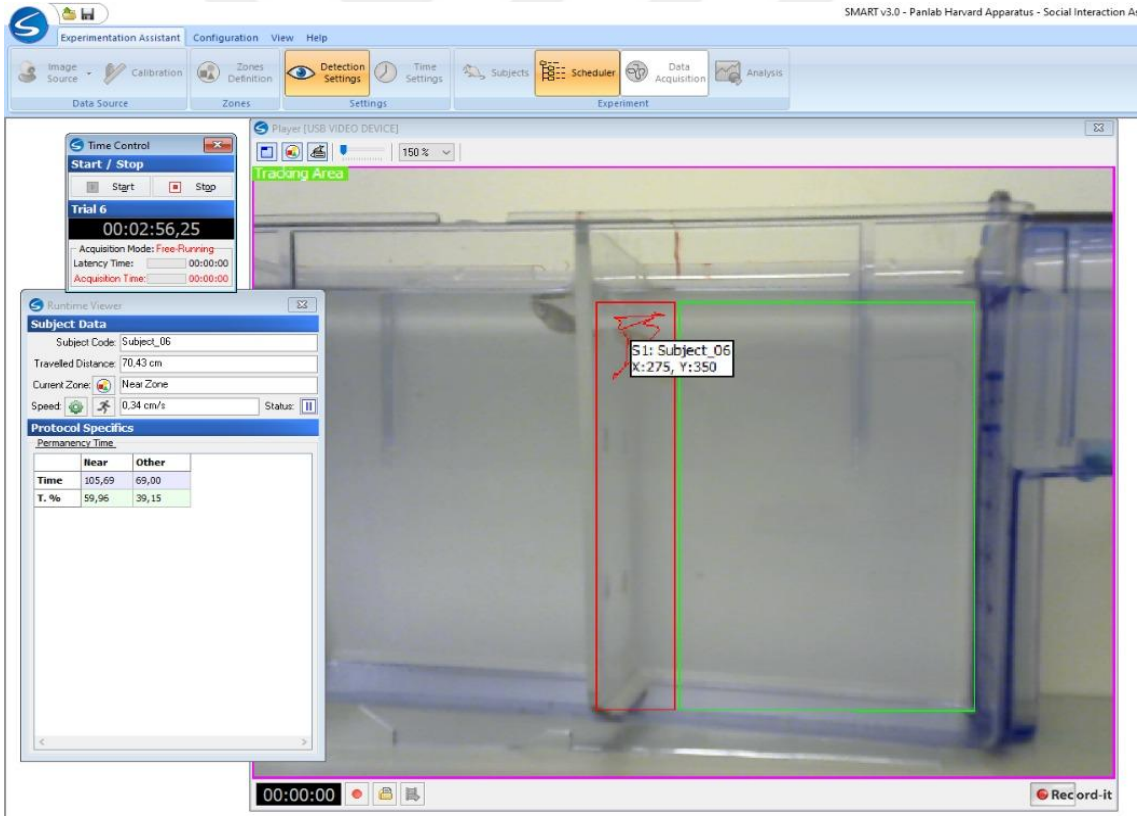
Zebra balıklarına retro-orbital PBS ya da deksmedetomidin ilaç enjeksiyonundan 24 saat sonra etkileri değerlendirilmek üzere davranış testleri yapıldı. Proje önerisinde davranış testi olarak öğrenme fonksiyonlarını geri kazanıp kazanmadığını anlayabilmek için T-labirenti davranış testi planlanmış olmakla birlikte, bu testin multifaktöriyel çevresel etkenler nedeniyle protokole uygun yapılamaması ve sonuç elde edilememesi nedeniyle davranış testi olarak sosyal etkileşim testi, ayna ısırma testi ve Novel Tank testi yapılmasına karar verildi. Böylece A β birikiminin ve deksmedetomidinin sosyal davranışlara olan etkisi değerlendirildi. Yetişkin zebra balıklarında yapılan bu davranış testlerinde; balıkların davranışları kamera ile kaydedildi. Daha sonra Smart v3.0 uygulaması kullanılarak sonuçlar analiz edildi.

3.3.3.1. Sosyal Etkileşim Testi

Proje önerisinde planlanmamış olmasına rağmen, A β 42 ve/veya deksmedetomidin enjekte edilmiş zebra balıklarının sosyal davranışlarının değerlendirilmesinin, çalışma sonuçlarına etki edebileceği düşünüldü. Sosyal etkileşim testi, zebra balığı sosyal fenotiplerini incelemek için faydalı bir modeldir. Normalde, zebra balığı, aynı türdeki balıklarla birlikte bir tanka yerleştirildiğinde güçlü bir sosyallik sergiler (118). Bu testte tank, delikli şeffaf bir ayırıcı ile dikey olarak ortadan ikiye ayrılmıştır. Ayırıcının bir tarafına deney grubu konulurken, diğer tarafına ise türdeşi konuldu. Deney grubunda bulunan balıkların türdeşleri ile kurdukları sosyal etkileşimleri ölçüldü (Resim-4). Etkileşim bölgesi ayırıcıdan 3 cm sonrası olarak seçildi. Deney grubunda bulunan bir balık tanka konulduktan sonra, 3 dakika boyunca ortama alışması beklendi. Ortama adaptasyondan sonra kayıt başlatılıp, 5 dakika boyunca kaydedildi. Elde edilen videoda balıkların separatör önünde harcadıkları süre Smart v3.0 ile analiz edildi (Resim-5), (119).



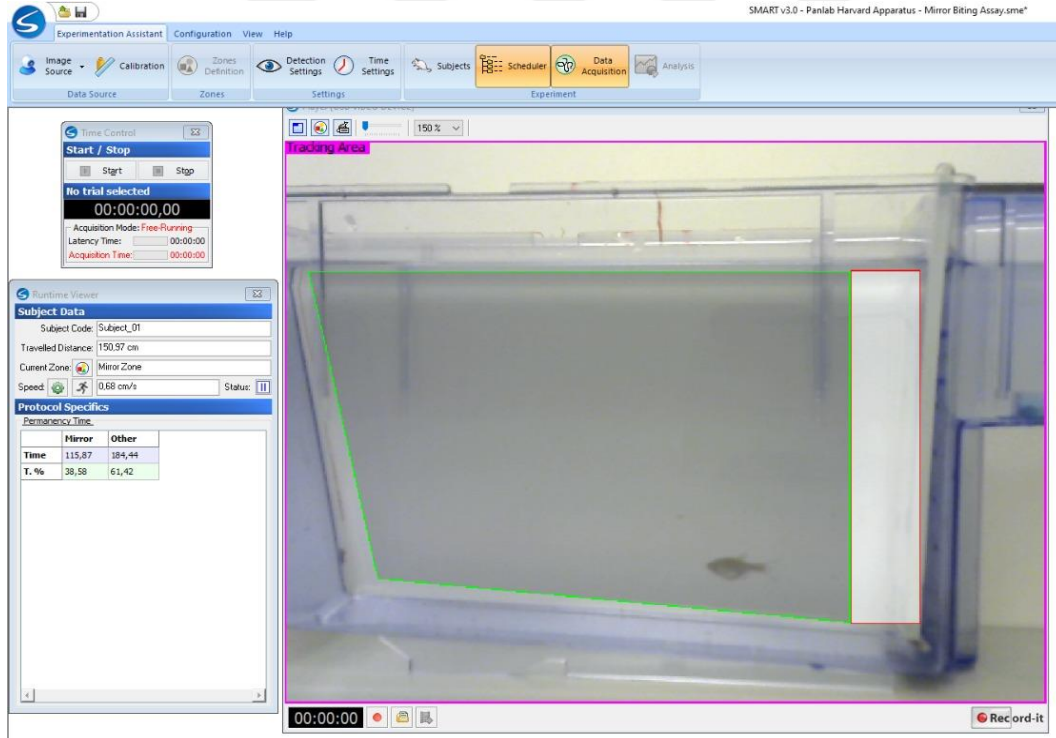
Resim-4: Delikli şeffaf bir ayırıcı ile dikey olarak ortadan ikiye ayrılmış olan tankın bir tarafına deney grubu konulurken, diğer tarafına ise türdeşi konuldu.



Resim-5: Sosyal Etkileşim Testi Smart v3.0 ile analiz. Ayırıcıdan sonraki 3 cm uzaklık etkileşim bölgesi olarak seçilmiştir. Balık tanka konulduktan sonra, 3 dakika boyunca ortama alışması beklenmiş, sonrasında, balıkların separatör önünde harcadıkları süre 5 dk boyunca analiz edilmiştir.

3.3.3.2. Ayna Isırma Testi

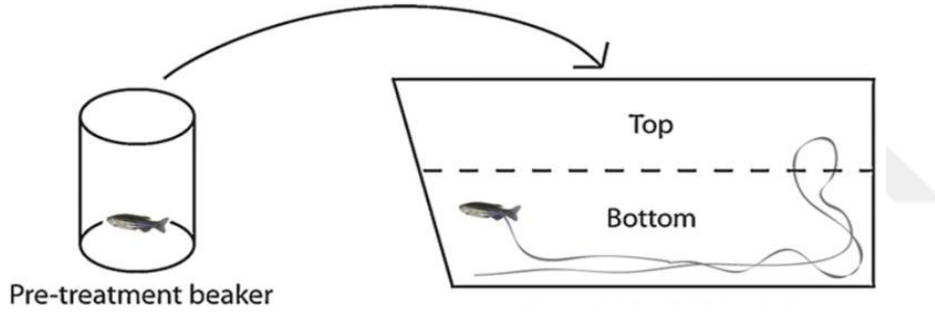
Proje önerisinde planlanmamış olmasına rağmen, A β 42 ve/veya deksmedetomidin enjekte edilmiş zebra balıklarının agresiflik seviyelerinin değerlendirilmesinin, çalışmanın sonuçlarına etki edebileceği düşünüldü. Ayna ısırma testi, yetişkin zebra balıklarının sosyal/agresif davranışlarını incelemek için yaygın olarak kullanılan köklü bir balık paradigmasıdır (120,121). Tankın bir tarafına koyulacak olan ayna ile yürütülen bu ayna ısırma testi, yetişkin zebra balığının aynadaki görüntüsüne tepkisini gösterir. 'Isırma', balığın hızlı bir şekilde yukarı aşağı veya ileri geri yüzerken yansımalarını takip ederken yaptığı hareket olarak tanımlanır ve balığın aynanın önünde kalıp aynaya temas ettiği sürenin sayılmasıyla ölçülmektedir (119). Balıklar tanka koyulduktan sonra 3 dakika boyunca ortama alışmaları beklendi. Alıştırmadan sonra, zebra balığı davranışı 5 dakika boyunca kaydedilerek, Smart v3.0 aracılığıyla ayna tarafında geçirdiği süre hesaplandı (Resim-6), (119).



Resim-6: Ayna Isırma Testi Smart v3.0 ile Analiz. Tankın bir tarafına koyulan aynadan önceki 3 cm uzaklık etkileşim bölgesi olarak seçilmiş, balıkların 3 dakika boyunca ortama alışması beklenmiş, sonrasında ayna önünde harcadıkları süre 5 dk boyunca analiz edilmiştir.

3.3.3.3. Novel Tank Testi

Proje önerisinde planlanmamış olmasına rağmen, A β 42 ve/veya deksmedetomidin enjekte edilmiş zebra balıklarının anksiyete seviyelerinin değerlendirilmesinin, çalışma sonuçlarına etki edebileceği düşünüldü. Novel tank dalış testi (Resim-7), kemirgenlerde anksiyeteyi incelemek için yapılan “thigmotaxis” testine benzer bir testtir ve yetişkin zebra balıklarında balık, yeni bir ortama maruz kaldığında kaygısını ölçmek için kullanılır. Normalde, bir zebra balığı yeni bir ortama yerleştirildiğinde dipte yaşama davranışı sergilerken, birkaç dakikalık adaptasyondan sonra bölgeyi keşfetmeye başlar (Şekil-5), (122,123). Davranışsal tepkiler 0-1 ve 9-10 dakikaları arasında 1 dakika süreyle kaydedildi. Kaydedilen videodan yetişkin zebra balıklarının; tankın alt kısmında geçirdikleri süre (sn cinsinden) ve kat edilen toplam mesafeleri (cm cinsinden) Smart v3.0 aracılığıyla analiz edildi (119).



Şekil-5: Novel Tank Testi (123)



Resim-7: Novel tank testi için kullanılan tank (122)

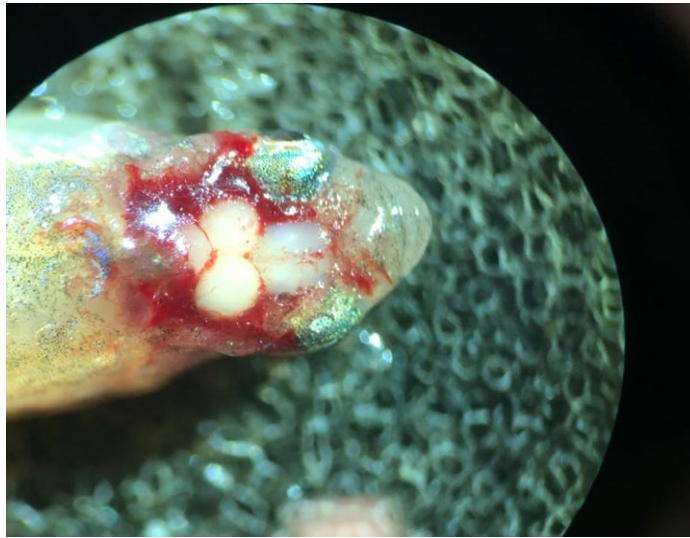
3.4. Moleküler Çalışmalar

Her bir deney grubundaki balıklardan 3 tanesi kantitatif gerçek zamanlı PCR’da gen analizleri için ve diğer 3 tanesi de western blot analizleri için kullanıldı. Ayrıca her bir gruptaki zebra balıklarından alınan telensefalon bölgelerinin kesitlerinde immünfloresan boyamalar yapıp konfokal mikroskop görüntülemeleri yapıldı.

3.4.1. qPCR ile Alzheimer Gen Ekspresyon Analizi

Hipoksinin Alzheimer patogenezi tetikleyici bir unsur olduğu göz önünde bulundurularak (31), oluşturulan zebra balığı Alzheimer modelinde hipoksise ekspresyonu artan, amiloidojenik sinyal yolağında bulunan ve A β toksisitesi sonucu işlevlerinde bozulma meydana gelen *psen1*, *psen2*, *appa*, *appb* ve *bace1* genlerinin ekspresyonları kantitatif gerçek zamanlı PCR ile değerlendirildi. Balıkların toksisiteye cevaben savunma mekanizması olarak proliferasyon belirteci olan *pcna* ve glial hücrelerin belirteci olan *gfap* genlerinin de ifadelerine bakıldı.

Kantitatif gerçek zamanlı PCR için ayrılan balıklar yüksek doz trikain içeren taşıma kabına alınarak ötenazi edildi ve beyinlerinin telensefalon bölgeleri disseke edilerek çıkarıldı (Resim-8). Sırasıyla RNA izolasyonu, RNA’lardan cDNA sentezi ve kantitatif gerçek zamanlı qPCR analizi yapıldı.



Resim-8: Telensefalonunun Çıkarılması İçin Kafatası Disseke Edilen Zebra Balığı

3.4.2. Western Blot ile GFAP Validasyonu

Western blot için, numuneler 5X yükleme boyasında çözündürüldü ve %15 akrilamid-bis akrilamid jeli üzerinde SDS jel elektroforezi ile ayrıldı. Proteinler jelden bir poliviniliden florür (PVDF) zarına (GE Healthcare Life Science, Chicago, IL, ABD) aktarıldı. Zarlar, oda sıcaklığında 45 dakika boyunca %5'lik süt tozu içinde bloke edildi ve ilgili dilüsyonlarda aşağıdaki antikorlarla inkübe edildi. Primer antikorlar: mouse anti-GFAP (1:1000; abcam, ab154474) ve rabbit anti- β -actin (1:1000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, ABD). Sekonder antikorlar: anti-rabbit IgG, horseradish peroxidase (HRP)-linked ve anti-mouse IgG, HRP-linked (her ikisi de 1:2500; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, ABD).

3.4.3. İmmünohistokimya ve Görüntüleme

Proje önerisinde planlanmamış olmasına rağmen, kantitatif gerçek zamanlı PCR analizlerini desteklemek amacıyla immünofloresan boyamalar yapıldı (115). İmmünofloresan boyamalar için ayrılan zebra balıkları yüksek doz tricaine ile sakrifiye edildikten sonra telensefalon bölgelerinden kriyostat ile 14 mikronluk kesitler alındı (124). Ardından amiloid beta plaklarının belirteci olan A β ve proliferasyon belirteci olan PCNA immünofloresan boyamaları yapıldı. Bu boyamalar konfokal mikroskopide incelendi.

4. BULGULAR

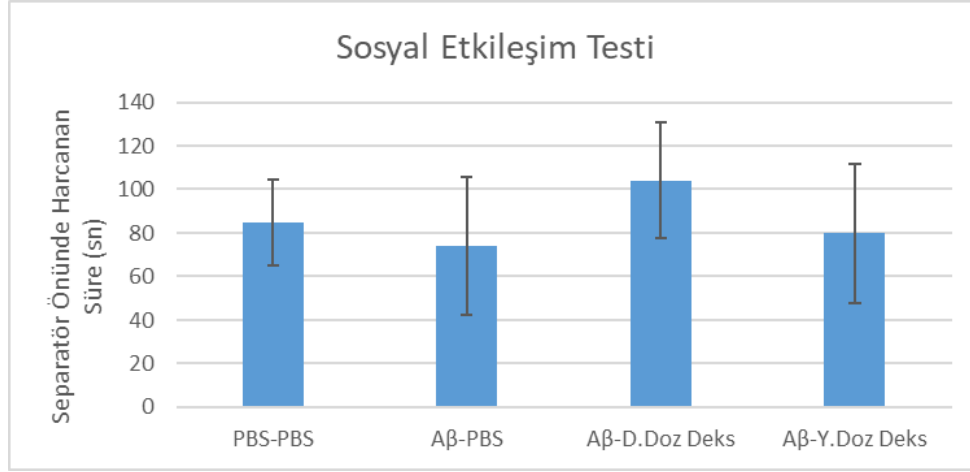
Dokuz Eylül Üniversitesi İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi Zebra Balık Birimi'nde gerçekleştirilen bu çalışmaya yabancı tip (wt TL), yaş aralığı 6-12 ay, ortalama ağırlıkları 0,7 gr olan, 12 erkek, 12 dişi olmak üzere toplam 24 adet zebra balığı dahil edildi. Çalışmanın başında toplam 5 grup şeklinde planlanmış olup, Grup 3 (Deksmedetomidin grubu)'ün çalışmanın sonuçlarına anlamlı katkısı olmayacağı için ve balık sarfiyatını azaltmak için çalışmadan çıkarılmıştır. Exitus olan zebra balığı olmadı, tüm balıklar çalışmayı tamamladı.

4.1. Davranış Testleri Sonuçları

Tüm gruplardaki zebra balıklarına ait kaydedilen veriler Tablo-5, Tablo-6, Grafik-1, Grafik-2 ve Grafik-3'te sunulmuştur.

Tablo-5: Sosyal Etkileşim Testinde Separatör Önünde Harcanan Süre (sn) (Değerler ortalama $\pm$ SS olarak sunuldu)

	PBS-PBS	A β -PBS	A β -Düşük Doz Deks	A β -Yüksek Doz Deks
Separatör önünde harcanan süre (sn)	84,98 $\pm$ 19, 76	73,93 $\pm$ 31,8 0	104,11 $\pm$ 26,37	79,70 $\pm$ 32,19

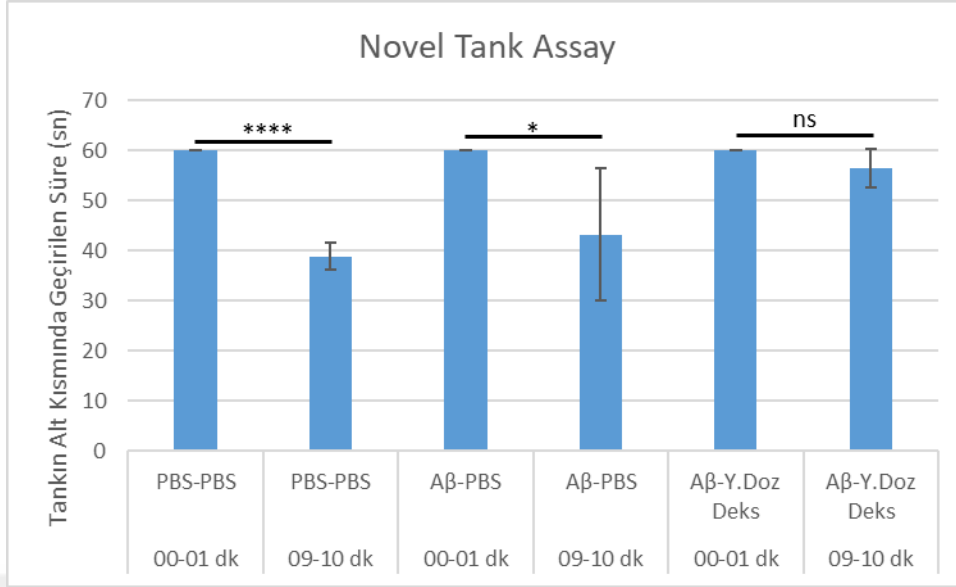


Grafik-1: Sosyal Etkileşim Davranış Testi. “PBS-PBS”, “Aβ-PBS”, “Aβ-Düşük Doz Deks” ve “Aβ-Yüksek Doz Deks” deney gruplarında, separatör önünde harcanan süre (sn) hesaplandı. Hata çubukları $\pm$ standart sapmayı göstermektedir.

Sosyal etkileşim testinde, 3 dakikalık ortama alışma süresinden sonra, 5 dakika boyunca separatör önünde harcadıkları süreleri karşılaştırılan PBS-PBS, Aβ-PBS, Aβ-Düşük Doz Deks ve Aβ-Yüksek Doz Deks grupları arasında ortaya çıkan fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Ayna ısırma testinde de sosyal etkileşim testinde olduğu gibi tüm gruplar arasında ortaya çıkan fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

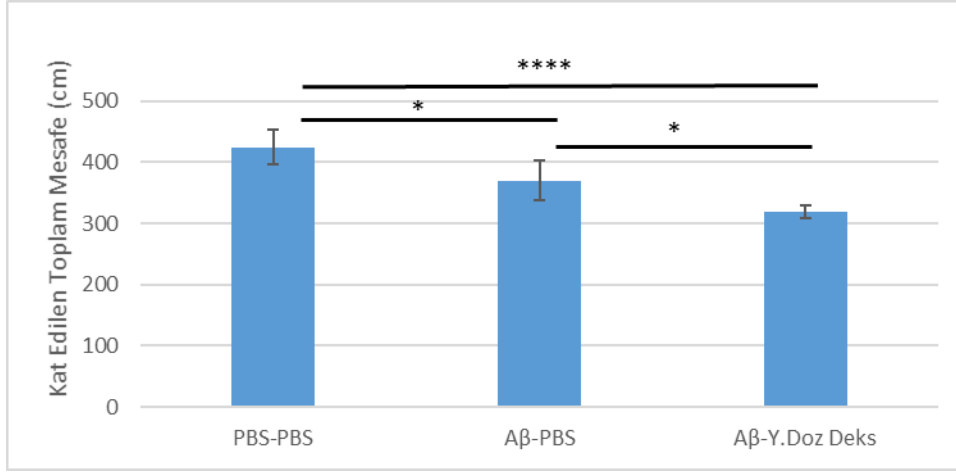
Tablo-6: Novel Tank Testinde Grupların 00-01 ve 09-10 Dakikaları Arası Tankın Alt Kısımında Geçirdikleri Süreler ve 10 Dakika Boyunca Kat Edilen Toplam Mesafeler (Değerler ortalama $\pm$ SS olarak sunuldu)

	PBS-PBS	Aβ-PBS	Aβ-Yüksek Doz Deks
00-01 dk arası alt kısımda geçen süre (sn)	60 $\pm$ 0	60 $\pm$ 0	60 $\pm$ 0
09-10 dk arası alt kısımda geçen süre (sn)	38,88 $\pm$ 2,74	43,18 $\pm$ 13,19	56,51 $\pm$ 3,80
Kat edilen mesafe (cm)	424,36 $\pm$ 27,88	369,96 $\pm$ 33,20	318,13 $\pm$ 10,26



Grafik-2: Novel Tank Testi. “PBS-PBS”, “Aβ-PBS” ve “Aβ-Yüksek Doz Deks” deney gruplarında, 00-01 ve 09-10 dakikalarında tankın alt kısmında geçirilen süre (sn) hesaplandı. Hata çubukları $\pm$ standart sapmayı göstermektedir. (ns: anlamlı değil; *, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.005$; ****, $P<0.001$).

Novel tank testinin sonuçlarına göre “PBS-PBS” grubunda 00-01 dk’larına kıyasla 09-10 dk’larında balıkların anksiyetesinde, istatistiksel olarak önemli bir azalış gözlemlendi ($P<0.001$). “Aβ-PBS” grubunda da 00-01 dk’larına kıyasla 09-10 dk’larında anksiyetesinde istatistiksel olarak önemli bir azalış gözlemlendi ($P<0.05$) fakat bu azalış “PBS-PBS” grubuna kıyasla daha düşüktü. “Aβ-Yüksek Doz Deks” grubunda 00-01 dk’larına kıyasla 09-10 dk’larında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. Bu sonuç Aβ’nın zebra balıklarında anksiyeteyi artırdığı, deksmedetomidininse Aβ’ya göre daha da fazla artırdığı şeklinde yorumlanabilir. Başka bir bakış açısıyla da deksmedetomidinin sedatif etkisine maruz kalan zebra balıklarının hareketliğinde, azalmaya sebep olduğunu düşündürdü.



Grafik-3: Novel tank testi. “PBS-PBS”, “Aβ-PBS” ve “Aβ-Yüksek Doz Deks” deney gruplarında, 10 dakika boyunca kat edilen toplam mesafe (cm) hesaplandı. Hata çubukları $\pm$ standart sapmayı göstermektedir. (ns: anlamlı değil; *, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.005$; ****, $P<0.001$).

Novel tank testinde 10 dk da kat edilen toplam mesafeye(cm) bakıldığında “PBS-PBS” grubuna kıyasla “Aβ-PBS” ve “Aβ-Yüksek Doz Deks” deney gruplarında istatistiksel olarak önemli bir azalış gözlemlendi. “Aβ-Yüksek Doz Deks” grubundaki bu azalış “Aβ-PBS” grubuna kıyasla daha yüksekti. “Aβ-Yüksek Doz Deks” grubunda kat edilen toplam mesafenin hem “PBS-PBS” hem de “Aβ-PBS” grubuna kıyasla daha düşük bulunması, deksmedetomidinin anestezi etkisine bağlı olduğu şeklinde yorumlandı.

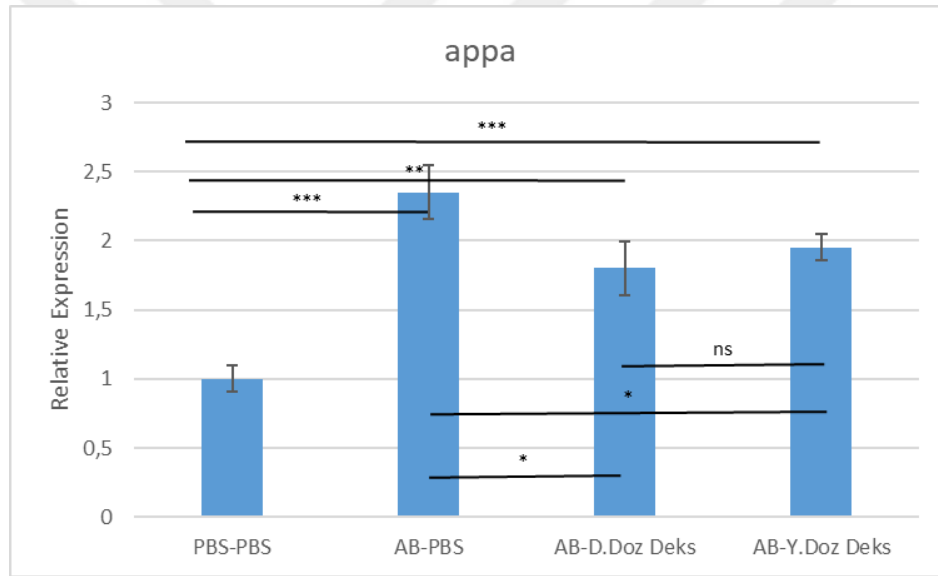
4.2. Moleküler Çalışmaların Sonuçları

4.2.1. qPCR ile Alzheimer Gen Ekspresyon Analizi

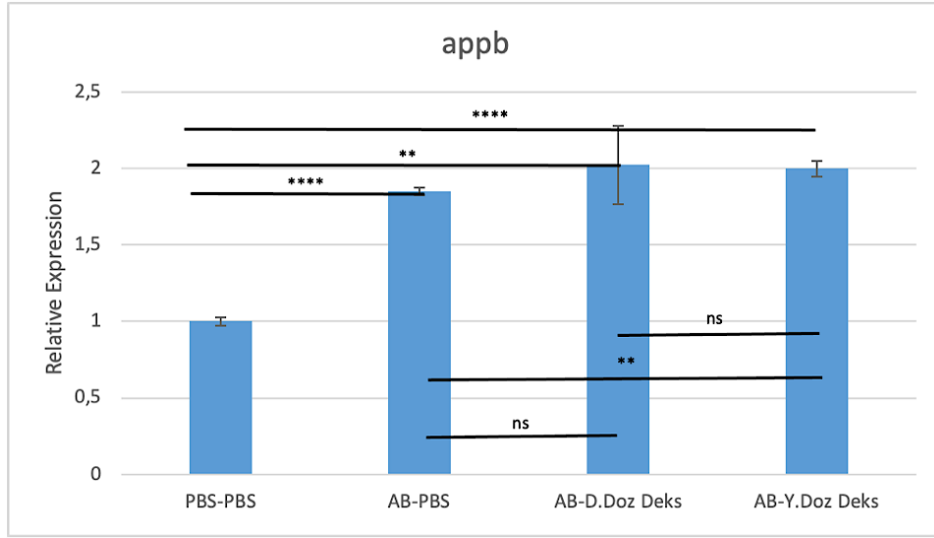
Oluşturulan zebra balığı Alzheimer modelinde, hipokside ekspresyonu artan ve amiloid beta toksisitesi sonucu işlevlerinde bozulma meydana gelen *psen1*, *psen2*, *appa*, *appb* ve *bace1* genleri ile; toksisiteye cevaben savunma mekanizması olarak proliferasyon belirteci olan *pcna* ve glial hücrelerin belirteci olan *gfap* genlerinin ekspresyonları “PBS-PBS”, “Aβ-PBS”, “Aβ-Düşük Doz Deks” ve “Aβ-Yüksek Doz Deks” deney gruplarında kantitatif gerçek zamanlı PCR ile değerlendirilmiştir. Deney sonuçları Tablo-7, Grafik-4, Grafik-5, Grafik-6, Grafik-7, Grafik-8, Grafik-9 ve Grafik-10’da sunulmuştur.

Tablo-7: Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR ile Değerlendirilen Genlerin Kontrol Grubuna Göre Rölatif Ekspresyonları (Değerler ortalama $\pm$ SS olarak sunuldu)

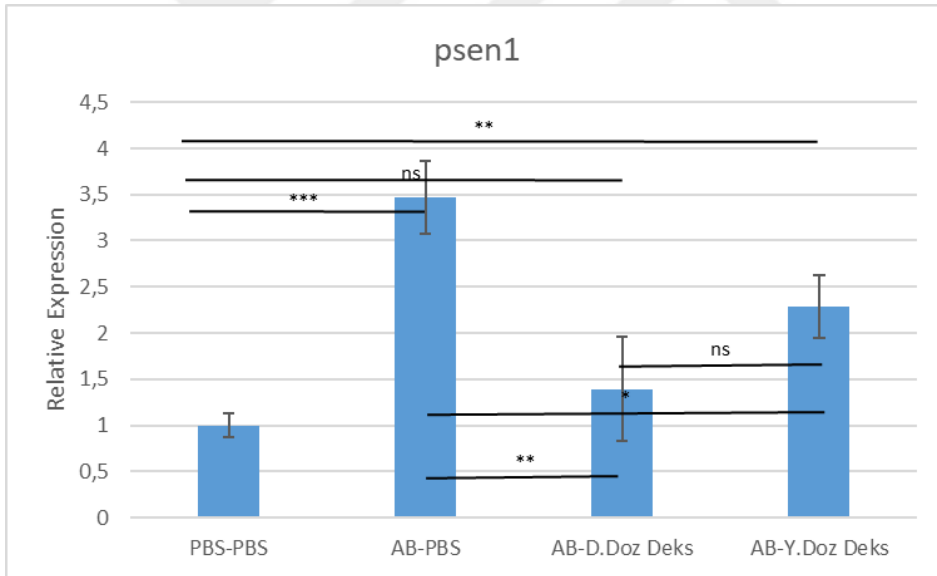
	PBS-PBS ($\pm$ SS)	A β -PBS ($\pm$ SS)	A β -Düşük Doz Deks ($\pm$ SS)	A β -Yüksek Doz Deks ($\pm$ SS)
<i>appa</i>	1 $\pm$ 0,09	2,35 $\pm$ 0,19	1,80 $\pm$ 0,19	1,95 $\pm$ 0,09
<i>appb</i>	1 $\pm$ 0,02	1,84 $\pm$ 0,02	2,02 $\pm$ 0,25	2,00 $\pm$ 0,04
<i>psen1</i>	1 $\pm$ 0,13	3,46 $\pm$ 0,39	1,39 $\pm$ 0,56	2,28 $\pm$ 0,34
<i>psen2</i>	1 $\pm$ 0,04	2,90 $\pm$ 0,11	1,37 $\pm$ 0,20	1,36 $\pm$ 0,18
<i>bace1</i>	1 $\pm$ 0,19	1,87 $\pm$ 0,41	2,81 $\pm$ 0,64	2,59 $\pm$ 0,36
<i>pcna</i>	1 $\pm$ 0,11	1,18 $\pm$ 0,07	1,42 $\pm$ 0,16	1,57 $\pm$ 0,21
<i>gfap</i>	1 $\pm$ 0,18	2,11 $\pm$ 0,30	2,25 $\pm$ 0,26	2,42 $\pm$ 0,54



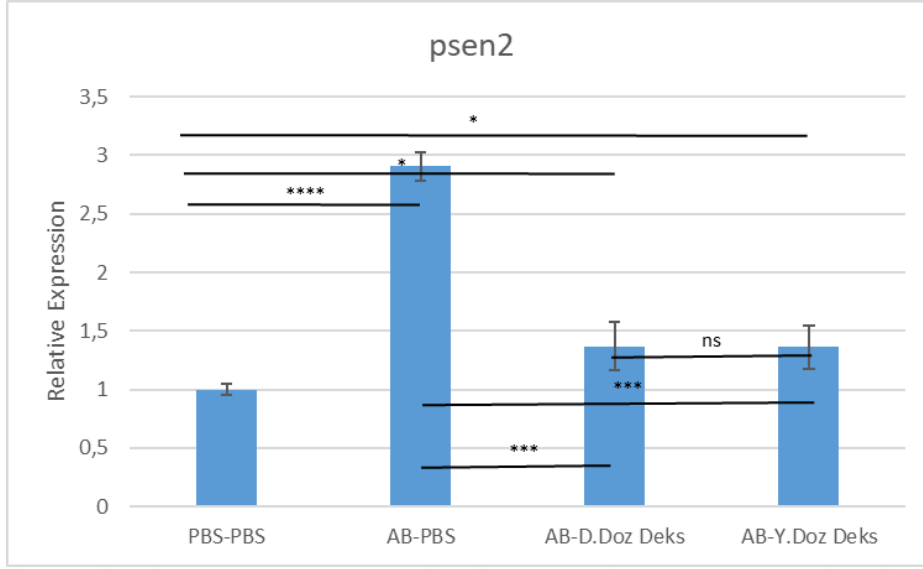
Grafik-4: *appa* Geninin Kontrol Grubuna Göre Rölatif Ekspresyonları (Hata çubukları $\pm$ standart sapmayı göstermektedir. ns: anlamlı değil; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.005$; ****, $P < 0.001$).



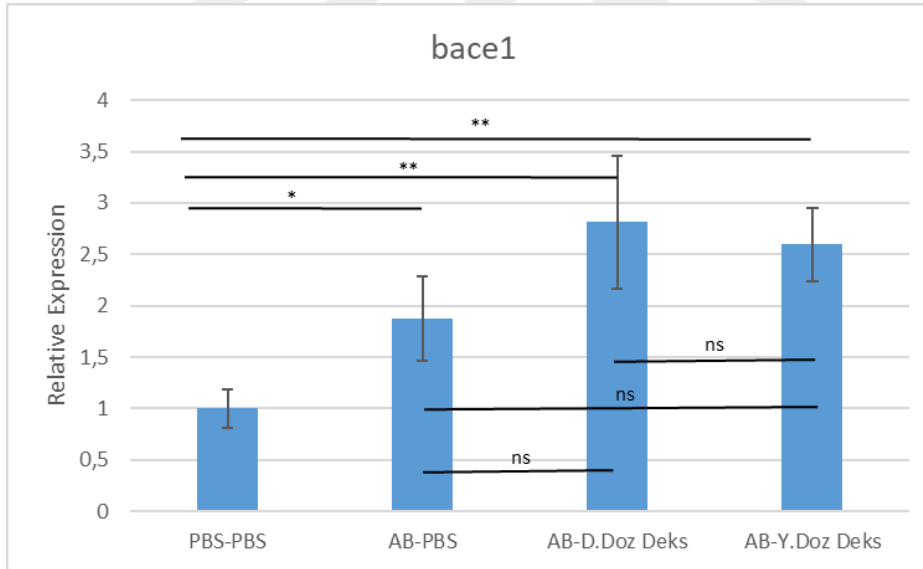
Grafik-5: *appb* Geninin Kontrol Grubuna Göre Rölafif Ekspresyonları (Hata çubukları $\pm$ standart sapmayı göstermektedir. ns: anlamlı değil; *, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.005$; ****, $P<0.001$).



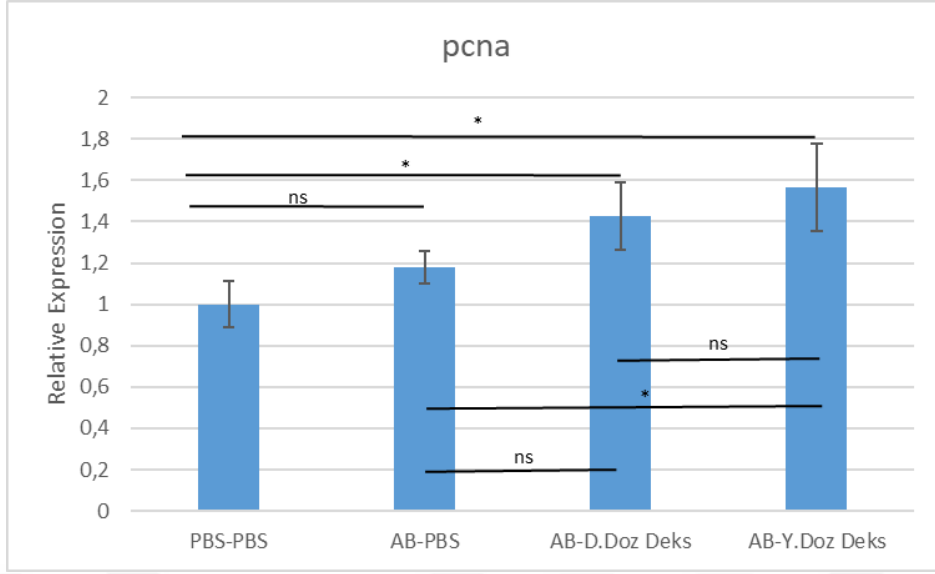
Grafik-6: *psen1* Geninin Kontrol Grubuna Göre Rölafif Ekspresyonları (Hata çubukları $\pm$ standart sapmayı göstermektedir. ns: anlamlı değil; *, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.005$; ****, $P<0.001$).



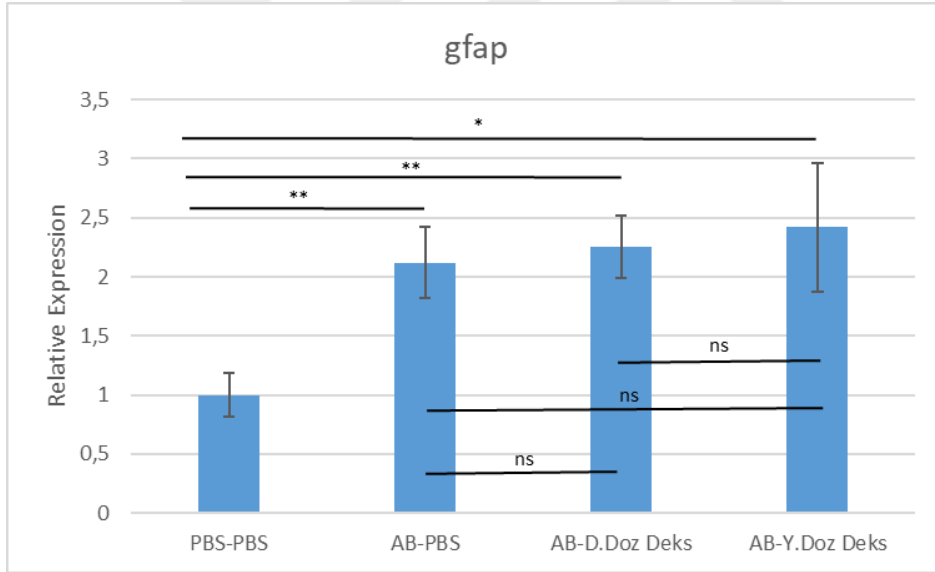
Grafik-7: *psen2* Geninin Kontrol Grubuna Göre Rölatif Ekspresyonları (Hata çubukları $\pm$ standart sapmayı göstermektedir. ns: anlamlı değil; *, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.005$; ****, $P<0.001$).



Grafik-8: *bace1* Geninin Kontrol Grubuna Göre Rölatif Ekspresyonları (Hata çubukları $\pm$ standart sapmayı göstermektedir. ns: anlamlı değil; *, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.005$; ****, $P<0.001$).



Grafik-9: *pcna* Geninin Kontrol Grubuna Göre Rölâtif Ekspresyonlar (Hata çubukları $\pm$ standart sapmayı göstermektedir. ns: anlamlı değil; *, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.005$; ****, $P<0.001$).



Grafik-10: *gfap* Geninin Kontrol Grubuna Göre Rölâtif Ekspresyonları (Hata çubukları $\pm$ standart sapmayı göstermektedir. ns: anlamlı değil; *, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.005$; ****, $P<0.001$).

appa geninin ekspresyon değerleri açısından karşılaştırıldığında “PBS-PBS” grubuna kıyasla, “A β -PBS”, “A β -Düşük Doz Deks” ve “A β -Yüksek Doz Deks” deney gruplarında istatistiksel olarak önemli bir artış gözlemlendi. “A β -Düşük Doz Deks” ve “A β -Yüksek Doz

Deks” deney gruplarında ise “A β -PBS” grubuna göre anlamlı bir azalış görüldü. Fakat “A β -Düşük Doz Deks” ve “A β -Yüksek Doz Deks” grupları arasında anlamlı bir fark görülmedi.

apbb geninin ekspresyon değerleri açısından karşılaştırıldığında “PBS-PBS” grubuna kıyasla, “A β -PBS”, “A β -Düşük Doz Deks” ve “A β -Yüksek Doz Deks” deney gruplarında istatistiksel olarak önemli bir artış gözlemlendi. “A β -PBS” grubuyla kıyaslandığında “A β -Yüksek Doz Deks” grubunda anlamlı bir artış görülürken, “A β -Düşük Doz Deks” grubunda anlamlı bir fark görülmedi. “A β -Düşük Doz Deks” ve “A β -Yüksek Doz Deks” grupları arasında da yine anlamlı bir fark yoktu.

psen1 geninin ekspresyon değerleri açısından karşılaştırıldığında “PBS-PBS” grubuna kıyasla, “A β -PBS” ve “A β -Yüksek Doz Deks” deney gruplarında istatistiksel olarak önemli bir artış gözlenirken “A β -Düşük Doz Deks” grubunda anlamlı bir fark görülmedi. “A β -PBS” grubuna göre kıyaslandığında ise “A β -Düşük Doz Deks” ve “A β -Yüksek Doz Deks” deney gruplarında istatistiksel olarak önemli bir azalış gözlemlendi. Bunun yanında “A β -Düşük Doz Deks” ve “A β -Yüksek Doz Deks” grupları arasında anlamlı fark yoktu.

psen2 geninin ekspresyon değerleri açısından karşılaştırıldığında “PBS-PBS” grubuna kıyasla, “A β -PBS”, “A β -Düşük Doz Deks” ve “A β -Yüksek Doz Deks” deney gruplarında istatistiksel olarak önemli bir artış gözlemlendi ve bu artış en fazla “A β -PBS” grubundaydı. “A β -PBS” grubuna göre kıyaslandığında ise “A β -Düşük Doz Deks” ve “A β -Yüksek Doz Deks” gruplarında anlamlı bir azalış olduğu görülürken, bu azalışın “A β -Düşük Doz Deks” ve “A β -Yüksek Doz Deks” grupları arasında anlamlı bir farkı yoktu.

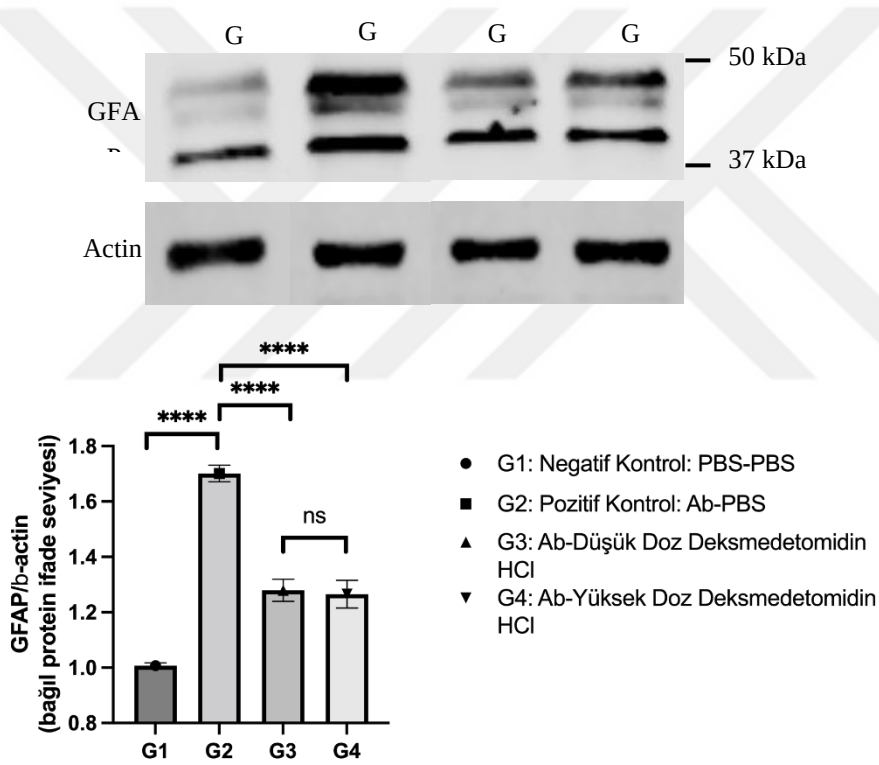
bace1 geninin ekspresyon değerleri açısından karşılaştırıldığında “PBS-PBS” grubuna kıyasla, “A β -PBS”, “A β -Düşük Doz Deks” ve “A β -Yüksek Doz Deks” deney gruplarında istatistiksel olarak önemli bir artış gözlemlendi. Fakat “A β -PBS”, “A β -Düşük Doz Deks” ve “A β -Yüksek Doz Deks” deney grupları arasında anlamlı bir fark görülmedi.

pcna geninin ekspresyon değerleri açısından karşılaştırıldığında “PBS-PBS” grubuna kıyasla, “A β -Düşük Doz Deks” ve “A β -Yüksek Doz Deks” deney gruplarında istatistiksel olarak önemli bir artış gözlemlenirken “A β -PBS” grubunda anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. Bu artış “A β -PBS” deney grubuna göre kıyaslandığında “A β -Yüksek Doz Deks”

grubunda istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunurken, “A β -Düşük Doz Deks” grubunda anlamlı bir farklılık görülmedi.

gfap geninin ekspresyon değerleri açısından karşılaştırıldığında “PBS-PBS” grubuna kıyasla, “A β -PBS”, “A β -Düşük Doz Deks” ve “A β -Yüksek Doz Deks” deney gruplarında istatistiksel olarak önemli bir artış gözlemlendi. “A β -PBS” grubuna göre kıyaslandığında “A β -Düşük Doz Deks” ve “A β -Yüksek Doz Deks” gruplarında anlamlı bir değişiklik görülmedi.

4.2.2. Western Blot ile GFAP Validasyonu



Grafik-11: Western Blot Yöntemi ile GFAP/B-Actin Bağlı Protein İfade Seviyeleri (Hata çubukları $\pm$ standart sapmayı göstermektedir. ns: anlamlı değil; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.005$; ****, $P < 0.001$).

Deksmedetomidinin, daha önce yapılan çalışmalarda nöroprotektif bir etkisi olduğu saptanmış olup, bilişsel disfonksiyona sebep olan diğer anesteziyelere göre AH’nda operasyon gerektiren vakalarda kullanılmasının diğer anesteziyelere göre daha uygun olabileceği öne sürülmüştür. Ancak bu konuda yeteri kadar çalışma bulunmamaktadır. Bu hipotezi test etmek

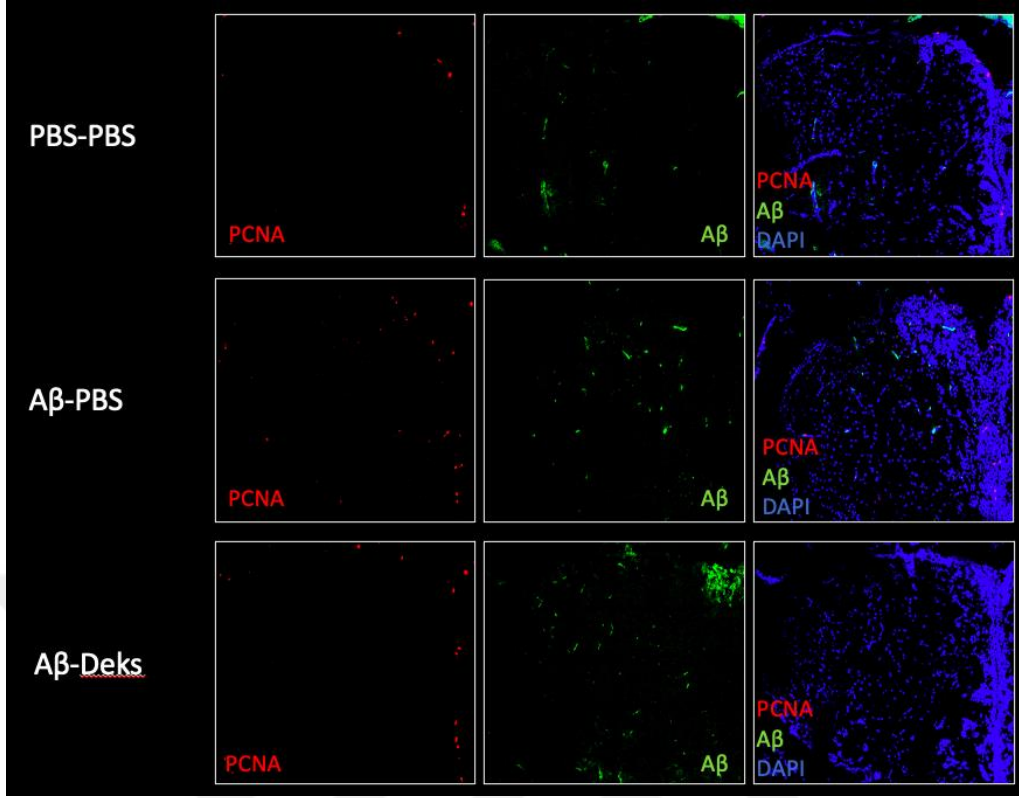
adına, zebra balığı amiloid beta toksisite modelinde bu etkinin araştırılması adına Glial Fibriler Asidik Proteinin (GFAP'in) ifadesindeki değişime Western Blot (WB) yöntemi ile bakılmıştır. GFAP bir glial aktivasyon belirteci olup, ifadesinin artışı zebra balığı rejeneratif yanıt oluşumunda önemli rol almaktadır.

Bu deneyde toplam 4 grup bulunmaktadır ve bu gruplar sırasıyla; G1: Negatif kontrol, G2; Pozitif kontrol, G3; AH-Düşük doz deksmedetomidin ve son olarak G4: AH-Yüksek doz deksmedetomidindir. Yapılan WB analizlerine göre G2'nin GFAP bağlı ifadesinde G1'e kıyasla istatistiksel olarak önemli derecede artış gözlenmiştir. İlaç verilen G3 ve G4 deney grubu G2 ile kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli olarak GFAP ifadesinde düşüş gözlenmiştir. Aynı zamanda yüksek doz deksmedetomidin ve düşük doz deksmedetomidin verilen gruplar arasında GFAP ifadesinde istatistiksel olarak önemli bir fark gözlenmemiştir.

4.2.3. İmmünohistokimya ve Görüntüleme

Zebra balığı beyninden 14 mikronluk kriyokesitler alındı ve alınan kesitler üzerinde PCNA ve A β immünfloresan boyaması yapıldı.

Elde edilen sonuçlara göre “PBS-PBS” grubuna kıyasla A β 42 enjeksiyonu yapılan “A β -PBS” ve “A β -Yüksek Doz Deks” deney gruplarında belirgin A β birikimi gözlemlendi. Bu sonuç hastalık modelinin başarıyla oluştuğunu gösterdi. Fakat “A β -PBS” ve “A β -Yüksek Doz Deks” grupları arasında bariz bir fark görülmedi. Bu da deksmedetomidinin A β 'yı çözme yeteneği olmadığı şeklinde yorumlandı. Buna ek olarak “A β -PBS” ve “A β -Yüksek Doz Deks” deney gruplarında “PBS-PBS” grubuna kıyasla *pcna* geninin ifadesinin arttığı görüldü. “A β -PBS” ve “A β -Yüksek Doz Deks” grupları arasında *pcna* ifadesinde belirgin fark görülmedi (Şekil-6).



Şekil-6: Zebra balığı telensefalon bölgesinden alınan kesitler. Proliferasyon belirteci olan PCNA (Kırmızı), amiloid beta plaklarının belirteci olan Aβ (Yeşil) ve hücre nükleus belirteci olan DAPI (Mavi) ile gerçekleştirilen immünfloresan boyamaların konfokal mikroskop görüntüleri.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda, kullandığımız zebra balığı amiloid beta toksisitesi modelinde, yoğun bakım ünitesi, premedikasyon, perioperatif dönem gibi çeşitli alanlarda kullanımı gittikçe yaygınlaşan ve son yıllarda klinik araştırmalarda sıkça yer bulan deksmedetomidinin etkinliğinin araştırıldığı bu deneysel çalışmada, yapılan qPCR ve western blot yöntemlerinde deksmedetomidinin nöroprotektif etkisinin olduğu görülmüştür.

Alzheimer hastalığı küratif bir tedavisi olmayan, patofizyolojisi üzerine araştırma yapılması ve yeni ilaçların test edilmesi zorunlu olan bir hastalıktır. Bu amaçlar doğrultusunda hayvan modelleri değerli bir araçtır. Bunun için de transgenik modeller oluşturulmaktadır. Literatürde, AH'nın kemirgen modelleri kapsamlı bir şekilde kullanılmıştır ve bu hastalık hakkında önemli bilgiler vermiştir (125,126). Bununla birlikte şimdiye kadar zebra balığı modelini kullanan araştırmalar, diğer hayvan modellerinde gözlemlenmesi zor olan AH'da rol oynayan çeşitli genlerin belirli özelliklerini ortaya çıkarmıştır (127,128). Tüm beyin fonksiyonlarına sahip yetişkin balıklar, omurgalıların karmaşık beyin fonksiyonları özelliklerinin analizinde önemli bir avantaja sahiptir. Gerçekten de zebra balığı hafıza, koşullu tepkiler ve eğitim gibi sosyal davranışlar dahil olmak üzere birçok üst düzey davranış sergiler (129). Tüm bu özellikler, SSS bozuklukları dahil olmak üzere insan hastalıklarını incelemek için ideal bir model olarak zebra balığını güçlendirir. Biz de bu nedenlerden dolayı çalışmamızda zebra balığı modelini seçtik.

Diğer bir yandan, zebra balığının AH gibi geç başlangıçlı bir hastalığı modellemek için kullanılıp kullanılamayacağı tartışmalıdır, çünkü zebra balığı derin bir rejenerasyon kapasitesine sahiptir ve bu, nörodejeneratif fenotiplerin gelişimini etkilemektedir. Yetişkin zebra balığı beynindeki nöroenez, memelilerde gözlenenden çok daha fazladır, dolayısıyla nöronal kaybın analizini zorlaştırır (130). Bu sınırlamalara rağmen, genom düzenleme teknolojilerini kullanmanın son zamanlardaki uygulanabilirliği, AH gibi nörodejeneratif hastalıkların zebra balığı genetik modellerini geliştirme imkanı sunup yeni araştırmalar için uygun kılmıştır (131).

İnsanlarda gözlemlenene benzer şekilde hipoksi , zebra balığı yetişkin beyinde ve larvalarda *psen1*, *psen2*, *appa*, *appb* ve *bacel*'i upregüle eder (132). Biz de bu nedenle

çalışmamızda bu genlerin ekspresyon değerlerini qPCR ile değerlendirdik. Hipokside ekspresyon artışı beklenen genlerden *psen1*, *psen2*, *appa* genlerinde “A β -PBS” grubuna kıyasla “A β -Düşük Doz Deks” ve/veya “A β -Yüksek Doz Deks” gruplarında genel anlamda hipotezimizi destekler şekilde anlamlı bir azalış görülmüştür. Yine hipokside ekspresyon artışı olan *appb* ve *bace1* genlerinde beklenenin aksine ekspresyon değerleri azalmamıştır. Hatta *appb* geninde “A β -PBS” grubuna kıyasla “A β -Düşük Doz Deks” grubunda anlamlı değişiklik olmazken, “A β -Yüksek Doz Deks” grubunda azalmanın aksine artış olduğu görülmüştür. *bace1* geninde de “A β -PBS” grubuna kıyasla “A β -PBS” anlamlı herhangi bir artış ya da azalış görülmemiştir. Bu genlerde beklediğimiz ekspresyon artışının olmaması amiloid β yolağındaki mekanizmalarıyla ilgili olabileceği düşünülüp ileri araştırmalara gerek vardır.

Proliferatif hücre nükleer antijeni (*pcna*), replikasyondaki rolü göz önüne alındığında, proliferasyon için moleküler bir belirteç olarak bilinir (133). Zebra balığı model organizmasının bir avantajı da organizmadaki herhangi bir yaralanma, hastalık gibi patolojik bir durum varlığında *pcna* upregülasyonu ile organizmanın yüksek onarım kapasitesine sahip olmasıdır. Yapılan qPCR’da *pcna* geninin ekspresyon değerleri karşılaştırıldığında “PBS-PBS” grubuna göre kıyaslandığında “A β -PBS” grubunda anlamlı bir artış olmazken “A β -Düşük Doz Deks” ve “A β -Yüksek Doz Deks” gruplarının ikisinde de anlamlı artış görülmüştür. “A β -PBS” grubuyla kıyaslandığında ise “A β -Düşük Doz Deks” grubunda anlamlı artış yokken “A β -Yüksek Doz Deks” grubunda anlamlı artış görülmüştür. Bu veriler de bize deksmedetomidinin proliferasyonu artırdığını göstermektedir. *gfap* geni de bir glial aktivasyon belirteci olup, ifadesinin artışı yine zebra balığı rejeneratif yanıt oluşumunda önemli rol almaktadır. *gfap* geninin ekspresyon değerleri açısından karşılaştırıldığında “PBS-PBS” grubuna kıyasla, “A β -PBS” grubunda olduğu gibi “A β -Düşük Doz Deks” ve “A β -Yüksek Doz Deks” deney gruplarında da istatistiksel olarak önemli bir artış gözlemlendi fakat bu artış açısından bu üç grup arasında anlamlı bir fark görülmedi.

gfap aktivasyonu yukarıda da belirtildiği üzere zebra balığı rejenerasyonunda önemli bir role sahiptir ancak fazla glial aktivasyonun nöronlara zarar verdiği gözlenmiştir. Western blot yöntemi ile *gfap* geni ürünü olan GFAP validasyonu yapıldığında G3 ve G4’teki GFAP ifadesindeki düşüş deksmedetomidin’in nöroprotektif etkisinden kaynaklı olduğu düşünülse

de halihazırda bulunan verilerle kesin bir yorum yapılması mümkün değildir ve böyle bir çıktıya ulaşmak için gelecek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Yaşlanmayla birlikte ameliyatlardan sonra Postoperatif Deliryum (POD) veya Postoperatif bilişsel işlev bozukluğu görülebilir. Bunlar cerrahi ve anesteziye bağlı olabilir. Postoperatif deliryum, ameliyattan hemen sonra ortaya çıkan, dikkat ve bilinçte dalgalanma ile karakterize edilen bilişsel durumdaki akut değişiktir. Postoperatif bilişsel işlev bozukluğu ise hafıza ve dikkat sorunlarının yanı sıra yürütücü işlev bozukluğu da dahil olmak üzere daha kalıcı bilişsel zorluklarla karakterize edilir ve genellikle ameliyattan sonra ortaya çıkar (134).

Genel anestezi uygulaması AH gelişimi için bir risk faktörüdür. Volatil anesteziklerden yaygın olarak kullanılan izofluran sıçanlarda hipokampal hücre hasarına neden olmuştur ve bilişsel işlev kaybını artırmıştır (135). Yapılan başka bir çalışmada, izofluranın APP mRNA'yı artırarak APP tüketimini artırdığı ve A β ₄₂ seviyesi ile A β plak birikimini arttığı gösterilmiştir (136). Ayrıca izofluranın kaspazları aktive etmesi sonrası BACE aktivasyonunun artmasına ve buna bağlı olarak A β plak artışına neden olur (137). Buna bağlı olarak ameliyat sonrası bilişsel işlev bozukluğu görülme riski de artar. Başka bir retrospektif çalışmada anestezi alan hastalarda demans riskini iki kat artırdığı bulunmuştur (138). Diğer bir inhaler anestezik olan sevofluranın da, A β üretimini artırdığı gösterilmiştir (139). Desfluran ise izofluran ve sevofluranın aksine A β üretimini azaltır (140). Bu tür genel anesteziklerin, AH'li hastalarda kullanımının, hastalığın şiddetini artırdığının varsayımı yapılabilir.

Genel anestezi, teorik olarak nikotinik ve muskarinik reseptörler yoluyla merkezi kolinerjik iletimi değiştirerek bilişsel eksikliklere de katkıda bulunabilir. Asetilkolin nörotransmisyonundaki bir azalma, analjezi, amnezi, hareketsizlik ve hipnoz dahil olmak üzere genel anestezinin istenen bazı etkilerini kolaylaştırır (141). Asetilkolin, öğrenme, hafıza ve dikkat gibi bilişsel süreçler için önemlidir. Normal yaşlanma, sıçanlarda ve insanlarda bazal ön beyindeki kolinerjik nöronların sayısındaki azalma ile ilişkilidir. Yaşlanmaya ayrıca serebral kortekste kolinerjik afferentlerin azalması eşlik eder, en şiddetli azalma temporal lob kortikal asosiasyon alanlarında ve entorinal kortekste bulunur. Yaygın bir demans olan AH, bazal ön beyin kolinerjik nöronlarında erken patoloji gösterir (142). Halotan, izofluran,

enfluran ve ketaminin medial pontin retiküler formasyonda asetilkolin salınımını önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (142). Bu tür anestezipler, AH'yi daha da şiddetlendirebilir.

Yapılan hayvan çalışmaları ve *in vitro* çalışmalarda anesteziplerin ve cerrahinin AH riskini ve şiddetini arttırdığı gösterilmiştir (143). İzofluran gibi inhaler anesteziplerin propofole göre AH üzerinde daha büyük etkisinin olduğu varsayılmıştır (144); ancak bazı çalışmalarda izofluranın propofolden daha büyük bir etkisinin olmadığı da gösterilmiştir (143).

Propofolün, APP proteini ve mRNA seviyeleri üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir (145). Ayrıca propofolün, izofluran kaynaklı artan A β ₄₂ oligomerizasyonunu azalttığı gösterilmiştir (145). Yapılan çeşitli çalışmalarda propofolün, hayvan ve insanlarda demans insidansında ve A β seviyelerinde azalma, artma ya da hiçbir değişikliğin görülmemesi gibi çok farklı sonuçlar ortaya çıkmıştır (146). Yapılan son çalışmalar farelerde, propofolün AH'de plak birikimini veya sinaps değişikliklerini alevlendirmesinin olası olmadığını göstermektedir (146).

AH'li hastalarda ilk adım olarak, kaspaz aktivasyonunu, apoptozu, A β birikimini ve bilişsel işlev bozukluğunu artırmayacak (veya daha az derecede artıracak) anesteziplerin kullanılması gerekir.

Son zamanlarda popüler hale gelen α 2-agonisti olan deksmedetomidin, köklü nöroprotektif etkileri nedeniyle öne çıkmaktadır. Tipik olarak sedatif, adjuvan anestezipler ve opioid koruyucu ilaç olarak kullanılan deksmedetomidinin nöroproteksiyonunun kesin mekanizmaları çoğunlukla belirsizdir (147). Deksmetomidinin nöroprotektif etkileri, iskemik beyin hasarı, travmatik beyin hasarı, nörodejeneratif hastalıklar ve postoperatif bilişsel bozukluklar gibi beyin hasarı oluşturulan birçok hayvan modelinde tespit edilmiştir (147). Deksmetomidinin α 2-agonisti olarak intrinsik sempatotik aktivitesinden kaynaklanan ana nöroprotektif mekanizma, *locus coeruleus*'ta α 2 reseptörünün aktivasyonu ile katekolamin salınımının negatif düzenlenmesinden oluşur; böylece serebral vasküler spazmları ve beyin hasarını engeller. Yapılan çalışmalar, deksmedetomidinin IL1- β ve IL-6 gibi proinflamatuar sitokinleri azalttığını kanıtlamıştır (148). Deksmetomidin ayrıca kolinerjik antiinflamatuar yolak yoluyla nöroinflamasyonu azaltır, servikal vagusun

boşalmasını arttırır, böylece sistemik sitokin seviyelerini azaltır (149). Nöroprotektif birçok daha mekanizması bulunan deksmedetomidinin, hem olgunlaşmamış hem de yetişkin beyinlerinde sevofluran, ketamin ve izofluran'ın çoklu toksisite modellerinde anesteziyelerin neden olduğu nörotoksisiteye karşı nöron apoptozunu düzenlediği gösterilmiştir (147).



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, son yıllarda klinik ve deneysel çalışmalarda popülaritesi artan bir klinik anestezi ajan türü olan, sedatif, anksiyolitik, sempatolitik, hipnotik, analjezik ve anti-inflamatuar gibi birçok etkisi olan deksmedetomidinin, nöroprotektif etkilerinin de bulunduğunu ve bu etkilerinin moleküler yöntemlerle de gösterilebilir olduğunu söyleyebiliriz. Elde ettiğimiz verilerin geneline bakıldığında, düşük doz (250 μ M) ile yüksek doz deksmedetomidin (500 μ M) arasında anlamlı bir fark görülmemiştir.

Nöroprotektif etkisi gösterilen deksmedetomidin ile yaptığımız bu çalışma Alzheimer benzeri nörodejeneratif hastalıkları daha iyi tedavi etmemizi sağlayacak alternatif terapötik yaklaşımlar tasarlamamıza olanak sağlayabilir. Ancak bunun için etki mekanizmalarının, insandaki doz ve sürelerinin belirleneceği daha ayrıntılı ileri çalışmalara gereksinim vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Stelzmann RA, Norman Schnitzlein H, Reed Murtagh F. An english translation of alzheimer's 1907 paper, "über eine eigenartige erkankung der hirnrinde." Clin Anat. 1995;8(6):429–31.
2. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis. Science (80-). 1992;256(5054):184–5.
3. Howard R, McShane R, Lindesay J, Ritchie C, Baldwin A, Barber R, et al. Donepezil and Memantine for Moderate-to-Severe Alzheimer's Disease. N Engl J Med. 2012 Mar 8;366(10):893–903.
4. Bird TD. Genetic aspects of Alzheimer disease. Genet Med. 2008;10(4):231–9.
5. Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Alzheimer's disease, a multifactorial disorder seeking multitherapies. Alzheimer's Dement. 2010;6(5):420–4.
6. Kazim SF, Iqbal K. Neurotrophic factor small-molecule mimetics mediated neuroregeneration and synaptic repair: emerging therapeutic modality for Alzheimer's disease. Mol Neurodegener 2016 11. 2016 Jul 11;11(1):1–16.
7. Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Opportunities and challenges in developing Alzheimer disease therapeutics. Acta Neuropathol. 2011 Nov;122(5):543–9.
8. Iqbal K, Kazim SF, Bolognin S, Blanchard J. Shifting balance from neurodegeneration to regeneration of the brain: a novel therapeutic approach to Alzheimer's disease and related neurodegenerative conditions. Neural Regen Res. 2014 Aug 15;9(16):1518–9.
9. Briggs R, Kennelly SP, O'Neill D. Drug treatments in Alzheimer's disease. Clin Med. 2016 Jun 1;16(3):247–53.
10. Manning FC. Tacrine therapy for the dementia of Alzheimer's disease. Am Fam Physician 1994;50(4):819–23.
11. Robinson DM, Keating GM. Memantine: a review of its use in Alzheimer's disease. Drugs. 2006;66(11):1515–34.
12. Ghezzi L, Scarpini E, Galimberti D. Disease-modifying drugs in Alzheimer's disease. Drug Des Devel Ther. 2013 Dec 6;7:1471–9.
13. Loeffler DA. Intravenous immunoglobulin and Alzheimer's disease: what now? J Neuroinflammation. 2013 Jun 5;10.
14. Prins ND, Scheltens P. Treating Alzheimer's disease with monoclonal antibodies: current status and outlook for the future. Alzheimers Res Ther. 2013;5(6).

15. Salloway S, Sperling R, Fox NC, Blennow K, Klunk W, Raskind M, et al. Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2014 Jan 23;370(4):322–33.
16. Doody RS, Thomas RG, Farlow M, Iwatsubo T, Vellas B, Joffe S, et al. Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2014 Jan 23;370(4):311–21.
17. Belleville JP, Ward DS, Bloor BC, Maze M. Effects of intravenous dexmedetomidine in humans. I. Sedation, ventilation, and metabolic rate. *Anesthesiology*. 1992;77(6):1125–33.
18. Nelson L, Maze M. Neural substrates for behavior. In: Evers A, Maze M, editors. *Anesthetic Pharmacology*. Burlington: Elsevier; 2004. p. 227–43.
19. Martin E, Ramsay G, Mantz J, Sum-Ping STJ. The role of the alpha2-adrenoceptor agonist dexmedetomidine in postsurgical sedation in the intensive care unit. *J Intensive Care Med*. 2003;18(1):29–41.
20. Zhou C, Zhu Y, Liu Z, Ruan L. Effect of dexmedetomidine on postoperative cognitive dysfunction in elderly patients after general anaesthesia: A meta-analysis. *J Int Med Res*. 2016 Dec 1;44(6):1182–90.
21. Liu YJ, Wang DY, Yang YJ, Lei WF. Effects and mechanism of dexmedetomidine on neuronal cell injury induced by hypoxia-ischemia. *BMC Anesthesiol*. 2017 Aug 30;17(1).
22. Yamanaka D, Kawano T, Nishigaki A, Aoyama B, Tateiwa H, Shigematsu-Locatelli M, et al. Preventive effects of dexmedetomidine on the development of cognitive dysfunction following systemic inflammation in aged rats. *J Anesth*. 2017 Feb 1;31(1):25–35.
23. Wang X, Shan Y, Tang Z, Gao L, Liu H. Neuroprotective effects of dexmedetomidine against isoflurane-induced neuronal injury via glutamate regulation in neonatal rats. *Drug Des Devel Ther*. 2018;13:153–60.
24. Sanders RD, Xu J, Shu Y, Januszewski A, Halder S, Fidalgo A, et al. Dexmedetomidine attenuates isoflurane-induced neurocognitive impairment in neonatal rats. *Anesthesiology*. 2009;110(5):1077–85.
25. MacMillan LB, Hein L, Smith MS, Piascik MT, Limbird LE. Central hypotensive effects of the alpha2a-adrenergic receptor subtype. *Science*. 1996;273(5276):801–3.
26. Ebert TJ, Hall JE, Barney JA, Uhrich TD, Colino MD. The effects of increasing plasma concentrations of dexmedetomidine in humans. *Anesthesiology*. 2000;93(2):382–94.

27. Dutta S, Lal R, Karol MD, Cohen T, Ebert T. Influence of cardiac output on Dexmedetomidine pharmacokinetics. *J Pharm Sci.* 2000;89(4):519–27.
28. Dexmedetomidine HCl PRECEDEX™ DEXMEDETOMIDINE HYDROCHLORIDE Injection. 1999.
29. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002268/WC500115631.pdf. European Medicines Agency. European Public Assessment Report. 2016.
30. Karol MD, Maze M. Pharmacokinetics and interaction pharmacodynamics of dexmedetomidine in humans. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2000 Jun 1;14(2):261–9.
31. Newman M, Ebrahimie E, Lardelli M. Using the zebrafish model for Alzheimer’s disease research. *Front Genet.* 2014;5(JUN).
32. Gerlai R. Zebra fish: an uncharted behavior genetic model. *Behav Genet.* 2003 Sep;33(5):461–8.
33. Guo S. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish? *Genes Brain Behav.* 2004 Apr;3(2):63–74.
34. Caramillo EM, Echevarria DJ. Alzheimer’s disease in the zebrafish: where can we take it? *Behav Pharmacol.* 2017 Feb 7;28(2 and 3-Spec Issue):179–86.
35. 2021 Alzheimer’s disease facts and figures. *Alzheimer’s Dement.* 2021;17(3):327–406.
36. Golde TE. Disease-Modifying Therapies for Alzheimer’s Disease: More Questions than Answers. *Neurotherapeutics.* 2022.
37. Gong CX, Dai CL, Liu F, Iqbal K. Multi-Targets: An Unconventional Drug Development Strategy for Alzheimer’s Disease. *Front Aging Neurosci.* 2022;14(February):1–7.
38. Rajan KB, Weuve J, Barnes LL, McAninch EA, Wilson RS, Evans DA. Population estimate of people with clinical Alzheimer’s disease and mild cognitive impairment in the United States (2020–2060). *Alzheimer’s Dement.* 2021;17(12):1966–75.
39. Rajan KB, Weuve J, Barnes LL, Wilson RS, Evans DA. Prevalence and incidence of clinically diagnosed Alzheimer’s disease dementia from 1994 to 2012 in a population study. *Alzheimer’s Dement.* 2019;15(1):1–7.
40. Özpak L, Pazarbaşı A, Keser N. Alzheimer Hastalığının Genetiği ve Epigenetiği. *Arşiv Kaynak Tarama Derg.* 2017;26(1):35–35.
41. Jahn H. Memory loss in alzheimer’s disease. *Dialogues Clin Neurosci.* 2013;15(4):445–54.

42. Weintraub S, Wicklund AH, Salmon DP. The neuropsychological profile of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(4).
43. Alonso Vilatela ME, López-López M, Yescas-Gómez P. Genetics of Alzheimer's Disease. *Arch Med Res.* 2012;43(8):622–31.
44. Ma C, Hong F, Yang S. Amyloidosis in Alzheimer's Disease: Pathogeny, Etiology, and Related Therapeutic Directions. *Molecules.* 2022;27(4).
45. Ewers M, Zhong Z, Bürger K, Wallin A, Blennow K, Teipel SJ, et al. Increased CSF-BACE 1 activity is associated with ApoE- ϵ 4 genotype in subjects with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Brain.* 2008;131(5):1252–8.
46. Grupe A, Abraham R, Li Y, Rowland C, Hollingworth P, Morgan A, et al. Evidence for novel susceptibility genes for late-onset Alzheimer's disease from a genome-wide association study of putative functional variants. *Hum Mol Genet.* 2007;16(8):865–73.
47. Shir D, Graff-Radford J, Hofrenning EI, Lesnick TG, Przybelski SA, Lowe VJ, et al. Association of plasma glial fibrillary acidic protein (GFAP) with neuroimaging of Alzheimer's disease and vascular pathology. *Alzheimer's Dement Diagnosis, Assess Dis Monit.* 2022;14(1):1–9.
48. Kamphuis W, Middelorp J, Kooijman L, Sluijs JA, Kooi EJ, Moeton M, et al. Glial fibrillary acidic protein isoform expression in plaque related astrogliosis in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2014;35(3):492–510.
49. Cicognola C, Janelidze S, Hertze J, Zetterberg H, Blennow K, Mattsson-Carlsson N, et al. Plasma glial fibrillary acidic protein detects Alzheimer pathology and predicts future conversion to Alzheimer dementia in patients with mild cognitive impairment.
50. Elahi FM, Casaletto KB, Joie R La, Walters SM, Harvey D, Wolf A, et al. Plasma biomarkers of astrocytic and neuronal dysfunction in early-and late-onset Alzheimer's disease.
51. Pereira JB, Janelidze S, Smith R, Mattsson-Carlsson N, Palmqvist S, Teunissen CE, et al. Plasma GFAP is an early marker of amyloid- β but not tau pathology in Alzheimer's disease.
52. Gaugler J, James B, Johnson T, Scholz K, Weuve J. 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement.* 2016;12(4):459–509.
53. Reitz C, Mayeux R. Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol.* 2014;88(4):640–51.
54. Fukumoto H, Tennis M, Locascio JJ, Hyman BT, Growdon JH, Irizarry MC. Age but not diagnosis is the main predictor of plasma amyloid β -protein levels. *Arch Neurol.*

- 2003;60(7):958–64.
55. Johnson NA, Jahng GH, Weiner MW, Miller BL, Chui HC, Jagust WJ, et al. Pattern of cerebral hypoperfusion in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment measured with arterial spin-labeling MR imaging: Initial experience. *Int Congr Ser.* 2006;1290:108–22.
 56. Sperling R. The potential of functional MRI as a biomarker in early Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2011;32(SUPPL. 1):S37–43.
 57. Golby A, Silverberg G, Race E, Gabrieli S, O'Shea J, Knierim K, et al. Memory encoding in Alzheimer's disease: An fMRI study of explicit and implicit memory. *Brain.* 2005;128(4):773–87.
 58. Wolinsky D, Drake K, Bostwick J. Diagnosis and Management of Neuropsychiatric Symptoms in Alzheimer's Disease. *Curr Psychiatry Rep.* 2018;20(12).
 59. Herholz K. Imaging Clinical Subtypes and Associated Brain Networks in Alzheimer's Disease. *Brain Sci.* 2022;12(2).
 60. Cummings JL, Henchcliffe C, Schaier S, Simuni T, Waxman A, Kemp P. The role of dopaminergic imaging in patients with symptoms of dopaminergic system neurodegeneration. *Brain.* 2011;134(11):3146–66.
 61. Colloby SJ, Perry EK, Pakrasi S, Pimlott SL, Wyper DJ, McKeith IG, et al. Nicotinic 123I-5IA-85380 single photon emission computed tomography as a predictor of cognitive progression in alzheimer's disease and dementia with lewy Bodies. *Am J Geriatr Psychiatry.* 2010;18(1):86–90.
 62. Colloby SJ, McParland S, O'Brien JT, Attems J. Neuropathological correlates of dopaminergic imaging in Alzheimer's disease and Lewy body dementias. *Brain.* 2012;135(9):2798–808.
 63. Haake A, Nguyen K, Friedman L, Chakkamparambil B, Grossberg GT. An update on the utility and safety of cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opin Drug Saf.* 2020;19(2):147–57.
 64. Conway ME. Alzheimer's disease: targeting the glutamatergic system. *Biogerontology.* 2020;21(3):257–74.
 65. Kishi T, Matsunaga S, Oya K, Nomura I, Ikuta T, Iwata N. Memantine for Alzheimer's Disease: An Updated Systematic Review and Meta-analysis. *J Alzheimer's Dis.* 2017;60(2):401–25.
 66. Pritam P, Deka R, Bhardwaj A, Srivastava R, Kumar D, Jha AK, et al. Antioxidants in Alzheimer's Disease: Current Therapeutic Significance and Future Prospects. *Biology (Basel).*

- 2022;11(2).
67. Guo J, Wang Z, Liu R, Huang Y, Zhang N, Zhang R. Memantine, Donepezil, or Combination Therapy—What is the best therapy for Alzheimer’s Disease? A Network Meta-Analysis. *Brain Behav.* 2020;10(11):1–13.
 68. Sano M, Ernesto C, Thomas RG, Klauber MR, Schafer K, Grundman M, et al. A Controlled Trial of Selegiline, Alpha-Tocopherol, or Both as Treatment for Alzheimer’s Disease. *N Engl J Med.* 1997;336(17):1216–22.
 69. Chiong W, Tolchin BD, Bonnie RJ, Busl KM, Cruz-Flores S, Epstein LG, et al. Decisions With Patients and Families Regarding Aducanumab in Alzheimer Disease, With Recommendations for Consent: AAN Position Statement. *Neurology.* 2022;98(4):154–9.
 70. Withington CG, Turner RS. Amyloid-Related Imaging Abnormalities With Anti-amyloid Antibodies for the Treatment of Dementia Due to Alzheimer’s Disease. *Front Neurol.* 2022;13(March).
 71. Riker RR, Shehabi Y, Bokesch PM, Ceraso D, Wisemandle W, Koura F, et al. Dexmedetomidine vs midazolam for sedation of critically ill patients A randomized trial. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2009;301(5):489–99.
 72. Buckley MS, Smithburger PL, Wong A, Fraser GL, Reade MC, Klein-Fedyshin M, et al. Dexmedetomidine for Facilitating Mechanical Ventilation Extubation in Difficult-to-Wean ICU Patients: Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials. *J Intensive Care Med.* 2021;36(8):925–36.
 73. Katzung BG. *Basic & Clinical Pharmacology.*
 74. Panzer O, Moitra V, Sladen RN. Pharmacology of Sedative-Analgesic Agents: Dexmedetomidine, Remifentanyl, Ketamine, Volatile Anesthetics, and the Role of Peripheral Mu Antagonists. *Crit Care Clin.* 2009;25(3):451–69.
 75. Li BL, Zhang N, Huang JX, Qiu QQ, Tian H, Ni J, et al. A comparison of intranasal dexmedetomidine for sedation in children administered either by atomiser or by drops. *Anaesthesia.* 2016;71(5):522–8.
 76. Smith H, Elliott J. Alpha2 receptors and agonists in pain management. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2001;14(5):513–8.
 77. Kamibayashi T, Maze M. Clinical uses of alpha2 -adrenergic agonists. *Anesthesiology.* 2000;93(5):1345–9.

78. Naaz S, Ozair E. Dexmedetomidine in current anaesthesia practice- a review. *J Clin Diagnostic Res.* 2014;8(10):GE01–4.
79. Ebert TJ, Hall JE, Barney JA, Uhrich TD, Colinco MD. The effects of increasing plasma concentrations of dexmedetomidine in humans. *Anesthesiology.* 2000;93(2):382–94.
80. Brummett CM, Wagner DS. The use of alpha-2 agonists in peripheral nerve blocks: a review of the history of clonidine and a look at a possible future for dexmedetomidine. *Semin Anesth Perioper Med Pain.* 2006;25(2):84–92.
81. Reid K, Hayashi Y, Guo TS, Correa-Sales C, Nacif-Coelho C, Maze M. Chronic administration of an $\alpha 2$ adrenergic agonist desensitizes rats to the anesthetic effects of dexmedetomidine. *Pharmacol Biochem Behav.* 1994;47(1):171–5.
82. Prielipp RC, Wall MH, Tobin JR, Groban L, Cannon MA, Fahey FH, et al. Dexmedetomidine-induced sedation in volunteers decreases regional and global cerebral blood flow. *Anesth Analg.* 2002;95(4):1052–9.
83. Akpinar H, Naziroğlu M, Övey IS, Çiğ B, Akpinar O. The neuroprotective action of dexmedetomidine on apoptosis, calcium entry and oxidative stress in cerebral ischemia-induced rats: Contribution of TRPM2 and TRPV1 channels. *Sci Rep.* 2016;6(September):1–13.
84. Wang D, Xu X, Wu YG, Lyu L, Zhou ZW, Zhang JN. Dexmedetomidine attenuates traumatic brain injury: Action pathway and mechanisms. *Neural Regen Res.* 2018;13(5):819–26.
85. Venn RM, Hell J, Grounds RM, George S. Venn RM, Hell J, Grounds RM. Respiratory effects of dexmedetomidine in the surgical patient requiring intensive care. *Critical Care.* 2000;4(5):302–8.
86. Groeben H, Mitzner W, Brown RH. Effects of the $\alpha 2$ -Adrenoceptor Agonist Dexmedetomidine on Bronchoconstriction in Dogs. *Anesthesiology.* 2004;100(2):359–63.
87. Xia R, Yin H, Xia Z yuan, Mao Q jun, Chen G da, Xu W. Effect of Intravenous Infusion of Dexmedetomidine Combined with Inhalation of Isoflurane on Arterial Oxygenation and Intrapulmonary Shunt During Single-Lung Ventilation. *Cell Biochem Biophys.* 2013;67(3):1547–50.
88. Shinohara H, Hirota K, Sato M, Kakuyama M, Fukuda K. Monitored anesthesia care with dexmedetomidine of a patient with severe pulmonary arterial hypertension for inguinal hernioplasty. *J Anesth.* 2010;24(4):611–3.
89. But AK, Ozgul U, Erdil F, Gulhas N, Toprak HI, Durmus M, et al. The effects of pre-operative dexmedetomidine infusion on hemodynamics in patients with pulmonary hypertension

- undergoing mitral valve replacement surgery. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2006;50(10):1207–12.
90. Lee SH, Kim N, Lee CY, Ban MG, Oh YJ. Effects of dexmedetomidine on oxygenation and lung mechanics in patients with moderate chronic obstructive pulmonary disease undergoing lung cancer surgery. *Eur J Anaesthesiol*. 2016;33(4):275–82.
 91. Lakhani PP, Macmillan LB, Guo TZ, Mccool BA, Lovinger DM, Maze M, et al. Substitution of a mutant $\alpha 2a$ -adrenergic receptor via “hit and run” gene targeting reveals the role of this subtype in sedative, analgesic, and anesthetic-sparing responses in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(18):9950–5.
 92. Shutes BL, Gee SW, Sargel CL, Fink KA, Tobias JD. Dexmedetomidine as single continuous sedative during noninvasive ventilation: Typical usage, hemodynamic effects, and withdrawal. *Pediatr Crit Care Med*. 2018;19(4):287–97.
 93. Maldonado JR, Wysong A, Van Der Starre PJA, Block T, Miller C, Reitz BA. Dexmedetomidine and the reduction of postoperative delirium after cardiac surgery. *Psychosomatics*. 2009;50(3):206–17.
 94. Hall JE, Uhrich TD, Barney JA, Arain SR, Ebert TJ. Sedative, amnestic, and analgesic properties of small-dose dexmedetomidine infusions. *Anesth Analg*. 2000;90(3):699–705.
 95. Fragen RJ, Fitzgerald PC. Effect of dexmedetomidine on the minimum alveolar concentration (MAC) of sevoflurane in adults age 55 to 70 years. *J Clin Anesth*. 1999;11(6):466–70.
 96. Hood R, Budd A, Sorond FA, Hogue CW. Peri-operative neurological complications. *Anaesthesia*. 2018;73:67–75.
 97. Feinkohl I, Winterer G, Spies CD, Pischon T. Cognitive reserve and the risk of postoperative cognitive dysfunction - A systematic review and meta-analysis. *Dtsch Arztebl Int*. 2017;114(7):110–7.
 98. Yang W, Kong LS, Zhu XX, Wang RX, Liu Y, Chen LR. Effect of dexmedetomidine on postoperative cognitive dysfunction and inflammation in patients after general anaesthesia: A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis. *Med (United States)*. 2019;98(18).
 99. Wang X, Zhao B, Li X. Dexmedetomidine attenuates isoflurane-induced cognitive impairment through antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptosis in aging rat. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(10):17281–8.
 100. Meyers JR. Zebrafish: Development of a Vertebrate Model Organism. *Curr Protoc Essent Lab Tech*. 2018;16(1):1–26.

101. Teame T, Zhang Z, Ran C, Zhang H, Yang Y, Ding Q, et al. The use of zebrafish (*Danio rerio*) as biomedical models. *Anim Front*. 2019;9(3):68–77.
102. Wixon J. Featured organism: *Danio rerio*, the zebrafish. *Yeast*. 2000;17(3):225–31.
103. Lambert JGD. The ovary of the guppy *Poecilia reticulata*. *Gen Comp Endocrinol*. 1970;15(3):464–76.
104. Selman K, Wallace RA, Sarka A, Qi X. Stages of oocyte development in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *J Morphol*. 1993 Nov 1;218(2):203–24.
105. Kanungo J, Cuevas E, Ali S, Paule M. Zebrafish model in drug safety assessment. *Curr Pharm Des*. 2014 May 29;20(34):5416–29.
106. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. 2013 Apr 4;496(7446):498.
107. Tierney KB. Behavioural assessments of neurotoxic effects and neurodegeneration in zebrafish. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2011 Mar 1;1812(3):381–9.
108. Kalueff A V., Stewart AM, Gerlai R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends Pharmacol Sci*. 2014 Feb;35(2):63.
109. Min TJ, Kim WY, Ha YR, Jeong IY, Yoo JY. Dexmedetomidine preconditioning attenuates Cisplatin-induced ototoxicity in zebrafish. *Clin Exp Otorhinolaryngol*. 2014 Dec 1;7(4):275–80.
110. Ruuskanen JO, Peitsaro N, Kaslin JVM, Panula P, Scheinin M. Expression and function of alpha-adrenoceptors in zebrafish: drug effects, mRNA and receptor distributions. *J Neurochem*. 2005 Sep;94(6):1559–69.
111. Yang X, Jounaidi Y, Mukherjee K, Fantasia RJ, Liao EC, Yu B, et al. Drug-selective Anesthetic Insensitivity of Zebrafish Lacking γ -Aminobutyric Acid Type A Receptor $\beta 3$ Subunits. *Anesthesiology*. 2019 Dec 1;131(6):1276–91.
112. Domarecka E, Skarzynska M, Szczepek AJ, Hatzopoulos S. Use of zebrafish larvae lateral line to study protection against cisplatin-induced ototoxicity: A scoping review. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2020;34.
113. Rizzo LY, Golombek SK, Mertens ME, Pan Y, Laaf D, Broda J, et al. In Vivo Nanotoxicity Testing using the Zebrafish Embryo Assay. *J Mater Chem B*. 2013 Aug 28;1(32):3918–25.
114. Papadimitriou C, Celikkaya H, Cosacak MI, Mashkaryan V, Bray L, Bhattarai P, et al. 3D Culture Method for Alzheimer's Disease Modeling Reveals Interleukin-4 Rescues A β 42-

- Induced Loss of Human Neural Stem Cell Plasticity. *Dev Cell*. 2018 Jul 2;46(1):85-101.e8.
115. Bhattarai P, Thomas AK, Cosacak MI, Papadimitriou C, Mashkaryan V, Froc C, et al. IL4/STAT6 Signaling Activates Neural Stem Cell Proliferation and Neurogenesis upon Amyloid- β 42 Aggregation in Adult Zebrafish Brain. *Cell Rep*. 2016 Oct 18;17(4):941–8.
 116. Kizil C, Brand M. Cerebroventricular microinjection (CVMI) into adult zebrafish brain is an efficient misexpression method for forebrain ventricular cells. *PLoS One*. 2011 Nov 4;6(11).
 117. Pugach EK, Li P, White R, Zon L. Retro-orbital injection in adult zebrafish. *J Vis Exp*. 2009;(34).
 118. Audira G, Anh NTN, Hieu BTN, Malhotra N, Siregar P, Villalobos O, et al. Evaluation of the Adverse Effects of Chronic Exposure to Donepezil (An Acetylcholinesterase Inhibitor) in Adult Zebrafish by Behavioral and Biochemical Assessments. *Biomolecules*. 2020 Sep 1;10(9):1–24.
 119. Audira G, Sampurna BP, Juniardi S, Liang ST, Lai YH, Hsiao C Der. A Versatile Setup for Measuring Multiple Behavior Endpoints in Zebrafish. *Invent* 2018, Vol 3, Page 75. 2018 Nov 7;3(4):75.
 120. Pham M, Raymond J, Hester J, Kyzar E, Gaikwad S, Bruce I, et al. Assessing Social Behavior Phenotypes in Adult Zebrafish: Shoaling, Social Preference, and Mirror Biting Tests. 2012;231–46.
 121. Liu X, Zhang R, Jin Y. Differential responses of larval zebrafish to the fungicide propamocarb: Endpoints at development, locomotor behavior and oxidative stress. *Sci Total Environ*. 2020 Aug 20;731.
 122. Parker MO, Annan L V., Kanellopoulos AH, Brock AJ, Combe FJ, Baiamonte M, et al. The utility of zebrafish to study the mechanisms by which ethanol affects social behavior and anxiety during early brain development. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2014 Dec 3;55:94–100.
 123. Egan RJ, Bergner CL, Hart PC, Cachat JM, Canavello PR, Elegante MF, et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav Brain Res*. 2009 Dec 14;205(1):38–44.
 124. Demirci Y, Cucun G, Poyraz YK, Mohammed S, Heger G, Papatheodorou I, et al. Comparative Transcriptome Analysis of the Regenerating Zebrafish Telencephalon Unravels a Resource With Key Pathways During Two Early Stages and Activation of Wnt/ β -Catenin Signaling at the Early Wound Healing Stage. *Front Cell Dev Biol*. 2020 Oct 9;8.
 125. Puzzo D, Gulisano W, Palmeri A, Arancio O. Rodent models for Alzheimer’s disease drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*. 2015 Jul 1;10(7):703.

126. Nazem A, Sankowski R, Bacher M, Al-Abed Y. Rodent models of neuroinflammation for Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*. 2015 Apr 17;12(1).
127. Liao HK, Wang Y, Noack Watt KE, Wen Q, Breitbach J, Kemmet CK, et al. Tol2 Gene Trap Integrations in the Zebrafish Amyloid Precursor Protein Genes *appa* and *aplp2* Reveal Accumulation of Secreted APP at the Embryonic Veins. *Dev Dyn*. 2012 Feb;241(2):415.
128. Newman M, Nornes S, Martins RN, Lardelli MT. Robust homeostasis of Presenilin1 protein levels by transcript regulation. *Neurosci Lett*. 2012 Jun 21;519(1):14–9.
129. Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet*. 2007 May;8(5):353–67.
130. Kizil C, Kaslin J, Kroehne V, Brand M. Adult neurogenesis and brain regeneration in zebrafish. *Dev Neurobiol*. 2012 Mar;72(3):429–61.
131. Kiper K, Freeman JL. Use of Zebrafish Genetic Models to Study Etiology of the Amyloid-Beta and Neurofibrillary Tangle Pathways in Alzheimer's Disease. 2021 May 25;20(3):524–39.
132. Moussavi Nik SH, Wilson L, Newman M, Croft K, Mori TA, Musgrave I, et al. The BACE1-PSEN-A β PP regulatory axis has an ancient role in response to low oxygen/oxidative stress. *J Alzheimers Dis*. 2012;28(3):515–30.
133. Wang SC. PCNA: a silent housekeeper or a potential therapeutic target? *Trends Pharmacol Sci*. 2014;35(4):178–86.
134. Lin X, Chen Y, Zhang P, Chen G, Zhou Y, Yu X. The potential mechanism of postoperative cognitive dysfunction in older people. *Exp Gerontol*. 2020;130(November 2019):110791.
135. Lin D, Zuo Z. Isoflurane induces hippocampal cell injury and cognitive impairments in adult rats. *Neuropharmacology*. 2011 Dec;61(8):1354–9.
136. Zhang S, Hu X, Guan W, Luan L, Li B, Tang Q, et al. Isoflurane anesthesia promotes cognitive impairment by inducing expression of β -amyloid protein-related factors in the hippocampus of aged rats. *PLoS One*. 2017 Apr;12(4).
137. Zhang G, Dong Y, Zhang B, Ichinose F, Wu X, Culley DJ, et al. Isoflurane-induced caspase-3 activation is dependent on cytosolic calcium and can be attenuated by memantine. *J Neurosci*. 2008 Apr;28(17):4551–60.
138. Chen PL, Yang CW, Tseng YK, Sun WZ, Wang JL, Wang SJ, et al. Risk of dementia after anaesthesia and surgery. *Br J Psychiatry*. 2014;204(3):188.
139. Jiang J, Jiang H. Effect of the inhaled anesthetics isoflurane, sevoflurane and desflurane on the

- neuropathogenesis of Alzheimer's disease (Review). *Mol Med Rep*. 2015 Jul;12(1):3.
140. Zhang B, Dong Y, Zhang G, Moir RD, Xia W, Yue Y, et al. The inhalation anesthetic desflurane induces caspase activation and increases amyloid β -protein levels under hypoxic conditions. *J Biol Chem*. 2008 May;283(18):11866–75.
 141. Hussain M, Berger M, Eckenhoff RG, Seitz DP. General anesthetic and the risk of dementia in elderly patients: Current insights. *Clin Interv Aging*. 2014 Sep;9:1619–28.
 142. Leung L-WS, Luo T. Cholinergic Modulation of General Anesthesia. *Curr Neuropharmacol*. 2021 Nov;19(11):1925.
 143. Berger M, Nadler JW, Friedman A, McDonagh DL, Bennett ER, Cooter M, et al. The Effect of Propofol Versus Isoflurane Anesthesia on Human Cerebrospinal Fluid Markers of Alzheimer's Disease: Results of a Randomized Trial. *J Alzheimers Dis*. 2016 Apr;52(4):1299.
 144. Zhang Y, Zhen Y, Dong Y, Xu Z, Yue Y, Golde TE, et al. Anesthetic Propofol Attenuates the Isoflurane-Induced Caspase-3 Activation and A β Oligomerization. *PLoS One*. 2011 Nov;6(11):27019.
 145. Xie Z, Xu Z. General anesthetics and β -amyloid protein. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*. 2013 Dec;47:140–6.
 146. Woodhouse A, Fernandez-Martos CM, Atkinson RAK, Hanson KA, Collins JM, O'Mara AR, et al. Repeat propofol anesthesia does not exacerbate plaque deposition or synapse loss in APP/PS1 Alzheimer's disease mice. *BMC Anesthesiol*. 2018 Apr;18(1).
 147. Burlacu C-C, Neag M-A, Mitre A-O, Sirbu A-C, Badulescu A-V, Buzoianu A-D. The Role of miRNAs in Dexmedetomidine's Neuroprotective Effects against Brain Disorders. *Int J Mol Sci*. 2022 May;23(10):5452.
 148. Tanabe K, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Iida H. Dexmedetomidine suppresses interleukin-1 β -induced interleukin-6 synthesis in rat glial cells. *Int J Mol Med*. 2014 Oct;34(4):1032–8.
 149. Zhu YJ, Peng K, Meng XW, Ji FH. Attenuation of neuroinflammation by dexmedetomidine is associated with activation of a cholinergic anti-inflammatory pathway in a rat tibial fracture model. *Brain Res*. 2016 Aug;1644:1–8.