



GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL ALZHEİMER HASTALIĞI MODELİ
OLUŞTURULAN YAŞLI SIÇANLARDA TAURİN ÖN
TAKVİYESİNİN KALP VE PLAZMA
AMİLOİDOGENİK PROTEİN DÜZEYLERİNE
(TRANSTİRETİN, A β 1-42), PLAZMA METAL
KATYON DÜZEYLERİNE VE BEYİN LRP-1
DÜZEYLERİNE ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. ESRA TEKİN

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. SİBEL DİNÇER

ANKARA

EKİM 2021



GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL ALZHEİMER HASTALIĞI MODELİ
OLUŞTURULAN YAŞLI SIÇANLARDA TAURİN ÖN
TAKVİYESİNİN KALP VE PLAZMA
AMİLOİDOGENİK PROTEİN DÜZEYLERİNE
(TRANSTİRETİN, A β 1-42), PLAZMA METAL
KATYON DÜZEYLERİNE VE BEYİN LRP-1
DÜZEYLERİNE ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. ESRA TEKİN

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. SİBEL DİNÇER

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından

01/2020-30 proje numarasıyla desteklenmiştir.

ANKARA

EKİM 2021

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Alzheimer hastalığında makroskopik atrofi.....	5
Şekil 2.2. Alzheimer hastalığının tanımlanması	6
Şekil 2.3. Amiloid prekürsör proteinin amiloidogenik yolla ve amiloidogenik olmayan yolla parçalanması.....	8
Şekil 2.4. TTR plazma düzeylerinin kadınlarda ve erkeklerde yaşa göre değişimi.....	12
Şekil 2.5. TTR taşıyıcı proteininin kan beyin bariyerinde fonksiyonları.....	13
Şekil 2.6. LRP-1 reseptörüne ligand bağlandığında aktive olan sinyal yolları.....	14
Şekil 2.7. LRP-1 reseptör proteininin yapısı.....	15
Şekil 2.8. TTR'nin monomer ve tetramer formu.....	16
Şekil 2.9: TTR proteini ilişkili amiloidoz formları.....	17
Şekil 2.10: TTR ilişkili kalp amiloidozunda yıllar içinde geliştirilen tedavi seçenekleri.....	17
Şekil 3.2.1. Stereotaksik cerrahi ile A β 1-42 enjeksiyonu.....	28
Şekil 3.2.2. Western blot deneyi jele yükleme işlemi.....	33
Şekil 3.2.3. Western blot deneyi jel elektroforezi işlemi.....	33
Şekil 3.2.4. Western blot deneyi jelden membrana transfer işlemi.....	34
Şekil 3.2.5. Western blot deneyi transfer kontrolü için membranın ponceau red boyası ile boyanması.....	35
Şekil 4.1.1. Plazma demir düzeyleri.....	37
Şekil 4.1.2. Plazma bakır düzeyleri.....	38
Şekil 4.1.3. Plazma çinko düzeyleri.....	38
Şekil 4.1.4. Plazma mangan düzeyleri.....	39

Şekil 4.1.5. Plazma A β 1-42 düzeyleri.....	39
Şekil 4.1.6. Plazma TTR düzeyleri.....	40
Şekil 4.1.7. Kalp dokusu A β 1-42 düzeyleri.....	41
Şekil 4.1.8. Kalp dokusu TTR düzeyleri.....	42
Şekil 4.1.9. Western blot yöntemiyle elde edilen beyin LRP-1 düzeyleri..	43



TABLÖLARIN LİSTESİ

Tablo	Sayfa
Tablo 3.1.1: Laboratuvar Donanımları.....	23
Tablo 3.1.2: Kimyasal Malzemeler.....	24
Tablo 3.1.3: Antikorlar.....	24
Tablo 3.1.4: Elisa Kitler.....	25
Tablo 4.1: Grupların plazma bulguları.....	40
Tablo 4.2: Grupların kalp dokusu bulguları.....	42
Tablo 4.3: Grupların total beyin dokusu bulguları.....	44

KISALTMALAR

Çalışmamızda kullanılan bazı kısaltmalar açıklamaları ile birlikte aşağıda belirtilmiştir.

Kısaltmalar

Açıklamalar

A β

Amiloid Beta

A β 1-40

Amiloid Beta 1-40

A β 1-42

Amiloid Beta 1-42

APS

Amonyum Per Sülfat

BOS

Beyin Omurilik Sıvısı

BSA

Sığır Serum Albumini

Cu

Bakır

Fe

Demir

HCL

Hidroklorik Asit

İsv

İntraserebroventriküler

LDL

Düşük Molekül Ağırlıklı Lipoprotein

LRP-1

Düşük Molekül Ağırlıklı Lipoprotein

İlişkili Protein-1

Mn

Mangan

RNA

Ribonükleik Asit

SDS

Sodyum Dodesil Sülfat

SOD

Süperoksit Dismutaz

TEMED

Tetrametil etilendiamin

TTR

Transtiretin

TUDCA

Tauro Urso Deoksikolik Asit

Zn

Çinko

İÇİNDEKİLER

Sayfa

Kabul ve Onay

Teşekkür

Şekillerin Listesi

Tabloların Listesi

Kısaltmalar

İçindekiler

1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Alzheimer Hastalığı.....	5
2.2. Transtiretin Taşıyıcı Proteini ve Alzheimer Hastalığındaki Rolü.....	11
2.3. LRP-1 Reseptör Proteini ve Alzheimer Hastalığı için Önemi.....	14
2.4. TTR İlişkili Kalp Amiloidozu.....	16
2.5. Beyin Amiloidozu ile Kalp Amiloidozu İlişkisi.....	18
2.6. Taurin Amino Asidi, Alzheimer Hastalığındaki Rolü ve TTR Proteini ile İlişkisi.....	19
2.7. Metal İyonlarının Alzheimer Hastalığı, TTR Proteini ve Taurin Amino Asidi ile İlişkisi.....	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1. Gereç.....	22
3.1.1. Deney Hayvanları.....	22
3.1.2. Kullanılan Laboratuvar Aletleri ve Cihazlar.....	22
3.1.3. Kullanılan Kimyasallar, Elisa Kitler ve Antikorlar.....	23
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler.....	25
3.2. Yöntem.....	27
3.2.1. Araştırma Planı ve Deney Grupları.....	27

3.2.2. Taurin Uygulaması.....	27
3.2.3. Stereotaksik Uygulama.....	28
3.2.4. Plazma Metal Katyon Düzeyleri Tayini.....	28
3.2.5. Elisa Kit Çalışması.....	28
3.2.6. Western Blot Yöntemi / SDS-PAGE.....	29
3.2.7. İstatistiksel Analiz.....	36
4. BULGULAR.....	37
4.1. Plazma Metal Katyon (Fe, Cu, Zn, Mn) Düzeyleri.....	37
4.2. Plazma Aβ 1-42 ve TTR Düzeyleri.....	39
4.3. Kalp Aβ 1-42 ve TTR Düzeyleri.....	40
4.4. Beyin LRP-1 Düzeyleri.....	43
5. TARTIŞMA.....	45
6. SONUÇLAR.....	57
7. KAYNAKLAR.....	59
8. ÖZET.....	68
9. SUMMARY.....	70
10. EKLER.....	72
11. ÖZGEÇMİŞ.....	73

1. GİRİŞ

En yaygın demans türü olan Alzheimer hastalığı; nihayetinde ölüme yol açan, bilişsel fonksiyonların ileri kaybıyla karakterize ve yaşam kalitesini oldukça düşüren nörodejenaratif bir hastalıktır. Alzheimer hastalığı özellikle orta yaş ve ileri yaşta bilişsel bozukluklara ve davranış değişikliklerine yol açmaktadır (1). Alzheimer hastalığının ilerlemesi sırasında amiloid beta ($A\beta$) monomerleri toplanır, polimerleşir ve bilişsel bozukluklara neden olan nörotoksik oligomerleri oluşturur (2). Alzheimer hastalığında amiloid beta 1-42 ($A\beta$ 1-42)'nin klirensinde bozulma vardır. Merkezi sinir sisteminde biriken $A\beta$ 1-42 özellikle hastalığın gelişiminden sorumlu tutulmaktadır (1).

Deneyisel Alzheimer hastalığı modeli oluşturmak için çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Bunlardan biri kemirgenlerin farklı beyin bölgelerine sentetik amiloid beta türlerinin enjekte edilmesidir (3). Uygulanan bu $A\beta$ türlerinin deneyisel modellerde hafıza kayıplarına ve davranış bozukluklarına yol açtığı gösterilmiştir (4,5). Nöronal toksisite ile ilişkisi gösterilen $A\beta$ 1-42'nin intraserebroventriküler (isv) enjeksiyonu deneyisel Alzheimer hastalığı modeli oluşturmak için tercih edilen bir yöntemdir.

Bir taşıyıcı protein olan transtiretin (TTR) özellikle tiroksin hormonu ve retinolün taşınmasındaki rolüyle bilinmektedir (6). İsmi de taşıdığı bu iki maddeden almaktadır. TTR eskiden prealbumin olarak biliniyordu. Daha sonra tiroksin bağlayan prealbumin olarak anıldı. Şimdilerde ise transtiretin olarak isimlendirilmektedir. TTR'nin $A\beta$ 1-42 için de bir taşıyıcı olduğu düşünülmektedir. Transtiretin amiloid beta peptidini bağlayarak perifere taşır ve böylece toksisitesini önler (6).

Literatürdeki bazı çalışmalarda Alzheimer hastalarında TTR düzeyi serumda ve beyin omurilik sıvısında azalmıştır. Bu da TTR'nin Alzheimer hastalığı için bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir (7,8).

Transtiretin amiloid betayı beyinden perifere taşır ancak periferden beyne tekrar taşımaz. Ancak bu taşınmanın ayrıntısı tam olarak bilinmemektedir. Bu tek yönlü taşınmanın kan beyin bariyerinin sadece beyin tarafında bulunan “düşük molekül ağırlıklı lipoprotein (LDL) ilişkili protein-1” (LRP-1) reseptör proteini aracılığıyla olduğu düşünülmektedir. LRP-1 çok yönlü bir reseptör proteindir ve pek çok ligandı bağlayabilmektedir. Bu bağlanmalar sonucunda pek çok sinyal yolağını aktive etmektedir (9).

Transtiretin aynı zamanda kardiyak transtiretin amiloidozunda kalpte primer olarak biriken amilodogenik proteindir. TTR'e bağlı kalp amiloidozunda biriken TTR formu toksik olan monomer formudur. Alzheimer hastalığında $A\beta$ 'ı taşıyarak

koruyucu olarak görev yaptığı düşünölen form ise ilk üretilen stabil form olan tetramer formdur (10).

TTR'e bağlı kalp amiloidozunda da Alzheimer hastalığı gibi küratif bir tedavi bulunmamaktadır. TTR, Alzheimer hastalığında Aβ taşıyıcısı olarak koruyucu özelliğıyle düşünölürken; kalp amiloidozunda primer olarak biriken amiloidogenik proteindir. Beyin ve kalp amiloidozu arasında ilişki bulunabileceğı düşünölmektedir (11).

Alzheimer hastalığı ile demir (Fe), bakır (Cu), çinko (Zn), mangan (Mn) gibi metal katyonlar arasında ilişki bulunmaktadır. Alzheimer hastalarında, Wilson hastalarında olduğı gibi serum bakırının yüksek olduğı görölmüştür. Ayrıca Alzheimer hastalarında idrar Cu atılımının da kontrol grubuna göre fazla olduğı belirtilmiştir (12).

Bu ilişkinin esas olarak beyindeki amiloid plaklarda metal katyonların birikiminden kaynaklandığı düşünölmektedir. Alzheimer hastalarında Aβ senil amiloid plaklarının yüksek oranda Fe, Cu, Zn içerdığı gösterilmiştir (12).

Taurin amino asidi (2-aminoetan sülfonik asit) güçlü anti-oksidan ve anti-apoptotik özellikleriyle bilinmektedir. Taurin başlıca beyin ve karaciğerde sentezlenmekte ve beyin hücrelerinin proliferasyonunu artırıcı etki göstermektedir. Taurinin kronik uygulanmasının Alzheimer hastalığı modeli oluşturulmuş deney hayvanlarında hipokampus bağımlı bilişsel bozulmayı önemli ölçüde iyileştirdiğı gösterilmiştir (13).

Taurin amino asidinin amiloid beta peptidinin kümelenmesini önleyebileceğı ve bu kümelenme için zayıf bir inhibitör olduğı vurgulanmaktadır (14). Bazı çalışmalarda ise Alzheimer hastalığı modelinde bilişsel fonksiyonlarda iyileşme sağlarken amiloid beta peptidi birikimi üzerinde değişiklik yapmadığı gözlemlenmiştir (15). Taurinin TTR'e bağlı kalp amiloidozunda Doksisiklin ile kombine edilerek kullanımı kalp amiloidozu ve nöropatinin ilerlemesini durdurmuştur. Taurin, TTR'nin toksik olan monomer formu üzerinde fibril bozucu etki göstermiştir (16,17).

Antioksidan ve antiapoptotik etkileri iyi bilinen taurin ağır metal zehirlenmesini tedavi etmek için kullanılabilir. Demir, bakır, çinko gibi metallerin oluşturduğı toksisitede taurin iyileştirici etki gösterebilmektedir (18).

Bu bilgiler doğrultusunda alışmamızda;

İntraserebroventriküler (isv) A β 1-42 uygulamasıyla Alzheimer hastalığı modeli oluşturulan yaşlı sıçanlarda plazma TTR, plazma A β 1-42, plazma metal katyon (Fe, Cu, Zn, Mn) düzeylerini tespit ederek bu parametrelerin Alzheimer hastalığı için kan bazlı bir biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılamayacağını değerlendirmek amaçlanmıştır. Beyin LRP-1 düzeyi tespiti ile TTR'nin A β 1-42 taşıma mekanizması hakkında bilgi edinmek istenmiştir. Ayrıca kalp TTR ve A β 1-42 düzeyleri de ölçülerek kalp ve beyin amiloidozu arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır. Böylece Alzheimer hastalığında karşılaşılabilen kardiyak patolojilerin kaynağı hakkında bilgi sahibi olunabileceği düşünülmektedir. Son olarak da ölçülen bütün parametreler üzerinde taurin n takviyesinin olası olumlu etkisi araştırılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

2.2. Transtiretin Taşıyıcı Proteini ve Alzheimer Hastalığındaki Rolü

2.3. LRP-1 Reseptör Proteini ve Alzheimer Hastalığı için Önemi

2.4. TTR İlişkili Kalp Amiloidozu

2.5. Beyin Amiloidozu ile Kalp Amiloidozu İlişkisi

2.6. Taurin Amino Asidi, Alzheimer Hastalığındaki Rolü ve TTR Proteini ile İlişkisi

2.7. Metal İyonlarının Alzheimer Hastalığı, TTR Proteini ve Taurin Amino Asidi ile İlişkisi

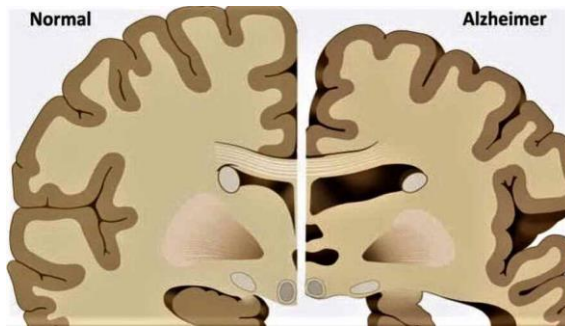
2.1. Alzheimer Hastalığı

Demans kişilerin bilişsel yeteneklerinde birkaç ay veya birkaç yıl öncesine göre kötüleşmeye neden olan, günlük yaşam aktivitelerinde de bozulmayla seyreden nöropsikiyatrik tıbbi bir durumdur. Demansı olan kişiler hafıza sorunlarının yanında dil, muhakeme, planlama, dikkat gibi pek çok bilişsel yetenek türünde zorluk yaşar (19). İnsan ömrünün uzaması ile demans görülme sıklığı artmıştır. Çeşitli demans türleri bulunmakla beraber en sık görülen formu Alzheimer hastalığıdır (20).

Alzheimer hastalığı genellikle ileri yaşta ortaya çıkan bir hastalık olmakla birlikte normal yaşlanmanın bir parçası değildir. Alzheimer hastalığı düşünme, bellek, dil fonksiyonlarında bozulma ve kişilik değişikliği gibi sonuçları olan ayrıca günlük aktiviteleri yapabilme yeteneğinin de kaybıyla sonuçlanan bir hastalıktır (19,20).

Alzheimer hastalığında başlıca patolojik bulgular hücre içi birikim gösteren nöritik plaklar ve nörofibriler yumaklar, hücre dışı amiloid beta peptit birikimi ve serebral atrofi ile karakterizedir. Ayrıca ilişkisi gösterilmiş başka yolaklar da bulunmaktadır. Kolinerjik kayıp, oksidatif stres, apoptoz ve nöroinflamasyon bunlardan bazılarıdır. Bu nedenle Alzheimer hastalığı multifaktöriyel bir hastalık olarak değerlendirilmektedir (21). Ancak patogeneizde en kabul gören yaklaşımlar amiloid kaskad hipotezi ve kolinerjik hipotezdir. Kolinerjik nöronlardan sentezlenen asetilkolin nörotransmitteri beyinde özellikle bellek, dikkat, duyusal bilginin işlenmesi, öğrenme gibi kritik fonksiyonlarla ilişkilidir. Alzheimer hastalığında meydana gelen kolinerjik nöronlarda dejenerasyon ile bilişsel fonksiyon ve bellek bozukluklarının yaşandığı düşünülmektedir (21).

Amiloid kaskad hipotezine göre A β moleküllerinin birikimi sonucu nöronlar arası iletişim bozulmakta, nöron ölümü artmakta ve meydana gelen sinaptik ve nöral kayıp makroskopik atrofi olarak da görülebilmektedir (22,23) (Şekil 2.1). Alzheimer hastalığında yaygın beyin atrofisi söz konusudur. Atrofi özellikle frontal, temporal ve pariyetal loblarda belirgindir. Beyin giruslarında daralma, sulkuslarda genişleme ve ventriküllerin hacminde artış görülmektedir (23).



Şekil 2.1: Alzheimer hastalığında makroskopik atrofi

Alzheimer hastalığı en yaygın demans türü olarak dünya genelinde pek çok insanı etkilemektedir (24). Alzheimer hastaları bilişsel fonksiyon kayıplarının yanı sıra hem kendilerini hem de bakım verenlerini pek çok yönden olumsuz etkileyen zorluklar yaşamaktadır. Alzheimer hastalarının %40 ila 50'sinde depresif semptomlar görülmektedir. Alzheimer hastalarında depresyon ve psikolojik stres sıklığı artmıştır (24). Aynı zamanda hastaların bakım verenlerinde de psikolojik sorunların sıklığı artmıştır. Ekonomik açıdan da yük getirmesi nedeniyle hastaların bakım verenleri zorluklar yaşamaktadır (25).

Alzheimer hastalığının ilk tanımlanması Alman psikiyatrist ve nöropatolog Doktor Alois Alzheimer tarafından 1906 yılında yapılmıştır. Doktor Alzheimer, ileri bilişsel ve davranışsal bozukluklar gösteren hastası Auguste Deter'in ölümünden sonra otopsisini yapmış ve Alzheimer hastalığı için karakteristik öneme sahip olan amiloid plakları ve nörofibriler yumakları tanımlamıştır. Daha sonra bu alanda çalışan bilim insanları bu hastalığı Doktor Alois Alzheimer'a ithafen Alzheimer hastalığı olarak isimlendirmişlerdir (26).



Alois Alzheimer

Auguste Deter

Şekil 2.2: Alzheimer hastalığının tanımlanması

En yaygın nörodejeneratif bozukluk olan Alzheimer hastalığı patolojisinin beyinde orta yaşta birikmeye başladığına dair artan kanıtlar olsa da ilk klinik semptomlar genellikle 65 yaşından sonra ortaya çıkmaktadır (27). Alzheimer hastalığı prevalansı hızla artmaktadır, bunun nedeninin 65 yaş ve üstü insanların oranının dünya çapında giderek artması olduğu düşünülmektedir (28).

Alzheimer hastalığında en önemli ve değiştirilmesi mümkün olmayan risk faktörü yaşıdır. Hastalığın riskinin 65 yaşından sonra her beş yılda bir iki katına çıktığı belirtilmektedir (24). İleri yaş Alzheimer hastalığı gelişimi için en büyük risk faktörü olmasına rağmen tek başına yaş, Alzheimer hastalığına neden olmak için yeterli değildir (29).

Alzheimer hastalığı için diğer önemli risk faktörleri arasında bir veya daha fazla apolipoprotein gen E4 alelinin varlığı, düşük eğitim düzeyi ve düşük mesleki başarı, ailede Alzheimer hastalığı öyküsü olması, orta veya şiddetli travmatik beyin yaralanmaları, çeşitli nörotoksinlere maruziyet ve kardiyovasküler risk faktörleri yer almaktadır (29). Aile öyküsü özellikle 70 yaşından önce başlayan Alzheimer hastalığında önemli olmakta ve birinci derece akrabalarda Alzheimer hastalığı öyküsü olması hastalığın gelişme riskini artırmaktadır (29). Literatürdeki çalışmaların çoğunluğunda erkek ve kadın cinsiyet arasında görülme sıklığı açısından bir fark bulunmamıştır (30). Ayrıca Down sendromlu bireylerde Alzheimer hastalığı sıklığı artmıştır ve hastalık daha erken yaşta gelişmektedir. İleri yaştaki çoğu Down sendromlu bireyde Alzheimer hastalığı bulunmaktadır. İki hastalıkta da etkilenen genetik bölgenin 21. kromozom olması ilginçtir. Down sendromu trizomi 21 iken Alzheimer hastalığının gelişiminde mutasyonları genetik faktör olarak rol oynayan amiloid prekürsör protein 21. kromozomda yer almaktadır (31).

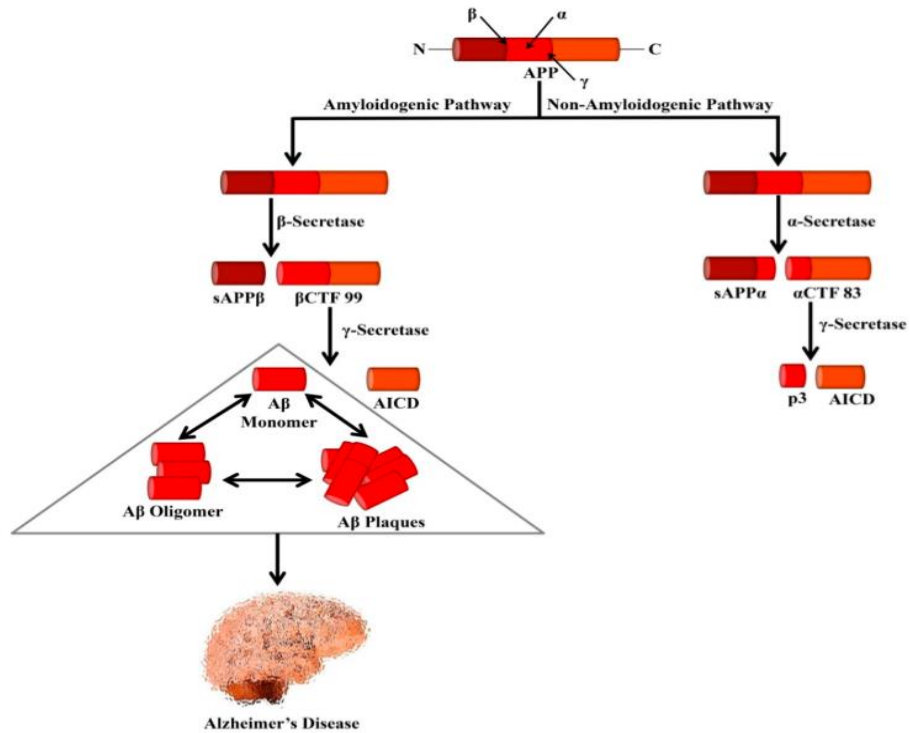
Ayrıca tip 2 diyabetes mellitus ile AH arasında bir ilişki bulunduğu kuvvetle düşünülmektedir. Diyabet amiloid- β ve taunun işlenmesini etkileyerek Alzheimer hastalığının başlıca nöropatolojik özellikleri olan senil plakların ve nörofibriler yumakların oluşum hızını artırabilir. Hiperinsülinemi, amiloid- β birikimi ile ilişkilidir ve tau fosforilasyonunu etkilemektedir. Diyabette artan oksidatif stres, inflamatuvar yolları aktive eder ve bu nedenle Alzheimer hastalığı nöropatolojisini şiddetlendirebilir. Mitokondriyal disfonksiyon ise hem tip 2 diyabet hem de Alzheimer hastalığı ile ilişkilidir ve hücre içi kalsiyum düzensizliğine ve amiloid öncü proteinin anormal işlenmesine yol açabilir (32).

Tip 2 diyabetes mellitusun serebrovasküler hastalık riskini artırdığı bilinmektedir. Aynı zamanda geç yaşamın nörodejeneratif demanslarını özellikle de Alzheimer hastalığı riskini önemli ölçüde artırır. Beyin hücrelerinin insüline normalde olduğu gibi yanıt verememesi durumu beyin insülin direnci olarak adlandırılmaktadır. Bu durum tip 2 diyabetes mellitustaki insülin direnci ile benzerlik göstermektedir. Bunun sonucunda beyinde sinaptik, metabolik ve immün yanıt işlevlerinde bozulmalar meydana gelmektedir. Dahası Tip 2 diyabetes mellitus beyin insülin direnci ile ilişkilidir ve çalışmalar beyin insülin direncinin Alzheimer hastalığının bir özelliği olduğunu ileri sürmektedir. Bu bilgiler ışığında bu iki hastalığın ilişkili olduğu düşünülmektedir (33).

Ayrıca bazı oral antidiyabetik ilaçlar Alzheimer hastalığı tedavisi için denenmekte ve Alzheimer hastalığı tedavisi için umut vadetmektedir. Özellikle thiazolidinedione bazlı nükleer peroksizom proliferator aktive edici reseptör- γ agonistleri ve glukagon benzeri peptid-1 hedefli ilaçlar beyin hücreleri üzerindeki insülin duyarlılaştırıcı etkileri ile ve diğer karmaşık sinyalleme etki mekanizmaları yoluyla Alzheimer hastalığında olumlu etkiler göstermekte ve çalışmalara konu olmaktadır (33)

Multifaktöriyel olan ve henüz tüm mekanizmalarının keşfedilememiş olduğu düşünülen Alzheimer hastalığı için en kabul gören yaklaşım amiloid kaskad hipotezidir. İnsanlarda iki baskın amiloid beta formu üretilir. Bunlar A β 1-40 ve A β 1-42'dir. Daha uzun form olan A β 1-42 kümelenmeye daha yatkındır ve Alzheimer hastalığı oluşumu açısından daha toksiktir. A β molekülleri birikerek oligomerleri ve fibrilleri oluşturur. Böylece Alzheimer hastalığı gelişimine zemin hazırlar (34).

Amiloid prekürsör protein proteolitik enzimler aracılığı ile metabolize edilir. Bu proteolitik bölünmeler α -sekretaz, β -sekretaz ve γ -sekretaz olarak adlandırılan enzimler aracılığı ile gerçekleşir. α -sekretaz tarafından gerçekleştirilen proteolitik bölünme A β oluşumunu engeller böylece agregatların ve plakların oluşum olasılığını ortadan kaldırır. Bu nedenle α -sekretaz aktivitesi amiloidojenik olmayan amiloid prekürsör protein bölünmesi olarak kabul edilir. Ayrıca α -sekretaz ile olan bölünme sırasında oluşan türevlerin bazı nöroprotektif özelliklere sahip olduğu düşünülmektedir. Amiloid prekürsör protein β -sekretaz ve γ -sekretaz ile bölündüğünde ise A β formları oluşur (Şekil 2.3) (35).



Şekil 2.3: Amiloid prekürsör proteinin amiloidojenik yolla ve amiloidojenik olmayan yolla parçalanması (35)

Alzheimer hastalığında nöron kaybı özellikle entorinal korteksin 2. tabakasında belirgindir. Nöron kaybı hipokampusa yakın parahipokampal giruslarda, amigdalada, anterior talamik çekirdeklerde görülmektedir. Alzheimer

hastalığında öğrenme ve hafıza için çok önemli olan hipokampusun CA1, CA2 ve CA3 alanlarındaki piramidal hücrelerde kayıp belirlenmiştir (36). Alzheimer hastalığında ilk etkilenen beyin bölgelerinden biri hipokampustur. Hipokampusun erken dönemlerde etkilenmesi Alzheimer hastalığında hafıza ve oryantasyon bozukluklarının erken dönemde kendini göstermesine neden olur (37). Nöron kaybı ve sinaptik kayıp ile Alzheimer hastalığının ilerlemesine neden olan nöritik plaklar, hücre içi nörofibriler yumaklar ve hücre dışı A β birikimi özellikle bilişsel işlevler için çok önemli olan neokorteks, hipokampus ve diğer subkortikal bölgelerde ortaya çıkar (35).

Tau proteini mikrotübül ile ilişkili bir protein olarak keşfedilmiştir. Alzheimer hastalığında ise hiperfosforile formlarının hücre içi birikimi patogenezin bir parçası olarak kabul edilmektedir. Beyin A β yükü ile Alzheimer hastalığı oluşumunda sinerjistik etki gösterdiği düşünülmektedir (35).

Alzheimer hastalığının günümüzde halen küratif bir tedavisi ve kan bazlı bir biyobelirteci bulunmamaktadır. Kan bazlı minimal invaziv bir biyobelirtecini varlığı Alzheimer hastalığının erken tanısını sağlayarak hastalar için oldukça yararlı olacaktır. Ayrıca bir biyobelirteç geliştirilmesi henüz tam olarak aydınlatılamamış olan Alzheimer hastalığı patogenezi konusunda fikir vererek etkili bir tedavinin geliştirilmesine de olanak sağlayabilecektir. Alzheimer hastalığı için çeşitli biyobelirteç önerileri bulunmaktadır. Bunlar direkt olarak hastalık tanısı koyamasa da tanı konusunda yardımcı olmakta ve spesifiteyi artırmaktadır (24,38).

Alzheimer hastalığının kesin tanısının konulabilmesi için otopsi veya biyopsi yapılması gerekmektedir. Patolojik tanı senil plaklar ve nörofibriler yumakların sayısı ve yerleşim yerleri göz önünde bulundurularak yapılmaktadır (39). Alzheimer hastalığının tanısında detaylı alınan hasta öyküsü ve bilişsel durum testleri klinikte kullanılmaktadır (40). Alzheimer hastalığı tanısı için geliştirilmiş çeşitli tanı kriterleri, günlük hayatı devam ettirebilme durumunu belirleyebilmek için “Günlük Yaşam Aktiviteleri Envanteri”, “Fonksiyonel Aktiviteler Ölçeği” gibi envanterler ve bilişsel durumunu değerlendirmek için “Mini Mental Durum Testi” ve “Saat Çizme Testi” gibi nöropsikiyatrik envanterler bulunmaktadır (40,41). Ayrıca Alzheimer hastalığı şüphesi olan hastalarda nörogörüntüleme teknikleri de tanı koyma aşamasında çok önemlidir. Bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans görüntüleme tetkikleri özellikle Alzheimer tipi demansı organik patolojilerden ayırmak amacıyla önerilmektedir (42). Klinik olarak şüphe bulunan hastalarda pozitron emisyon tomografisinin de fonksiyonel nörogörüntüleme yöntemi olarak kullanımı önerilmektedir (43).

Alzheimer hastalığının başlangıcı hastalarda genellikle tam olarak bilinmemektedir. Genellikle unutkanlık, isteksizlik gibi belirtiler ile başlayan hastalık temel olarak üç evrede değerlendirilmektedir. Hafif, orta ve şiddetli Alzheimer hastalığı olarak sınıflandırabileceğimiz gibi ilk dönemler olan

preseptomatik, prelinik ve olası Alzheimer hastalığı dönemlerini de sınıflandırmaya ekleyebiliriz. Hastalığın evresi ilerledikçe şiddeti ve klinikteki bozulma miktarı da artmaktadır (44). Günümüzde Alzheimer hastalığının kütatif bir tedavisi bulunmamaktadır. Alzheimer hastalığı için mevcut olan ve onayı olan ilaçlar ancak semptomatik tedavi seçeneği sağlamaktadır. Asetilkolinesteraz inhibitörleri olan donepezil, rivastigmin, galantamin ve NMDA reseptör antagonisti memantin Alzheimer hastalığı için onaylı ve kullanılan ilaçlardır (45). Amerika Gıda ve İlaç Dairesi tarafından 2021 yılında aducanumab isimli monoklonal antikor özellikli ilaç onaylanmıştır (46).

Henüz etkili bir tedavisi olmayan Alzheimer hastalığı kişilerde ağır bilişsel ve davranışsal bozukluklara yol açmakta ve hem hastanın hem de yakınlarının yaşam kalitesini oldukça düşürmektedir. Etkilenen hasta sayısı oldukça fazla olan Alzheimer hastalığında tanı ve tedavi konusundaki eksiklikler bilim insanlarını bu alanda çalışma yapmaya yönlendirmektedir. Bu hastalık ile ilgili deneysel çalışmalar da oldukça önemlidir.

Deneysel Alzheimer hastalığı modeli oluşturmak için literatürde transgenik hayvan modelleri, tau patolojisi ilişkili sıçan modelleri, virüs aracılı modeller, intraserebroventriküler streptozotosin veya A β ile uyarılan modeller bulunmaktadır. İntraserebroventriküler A β 1-42 ile indüklenen Alzheimer hastalığı modelinin sıçanlarda bilişsel işlev bozukluğuna neden olduğu, öğrenmeyi bozduğu, hipokampüste nöronal kayba yol açtığı ve nörodejeneratif süreçleri tetiklediği görülmüştür (47,48) .

2.2. Transtiretin (TTR) Taşıyıcı Proteini ve Alzheimer Hastalığındaki Rolü

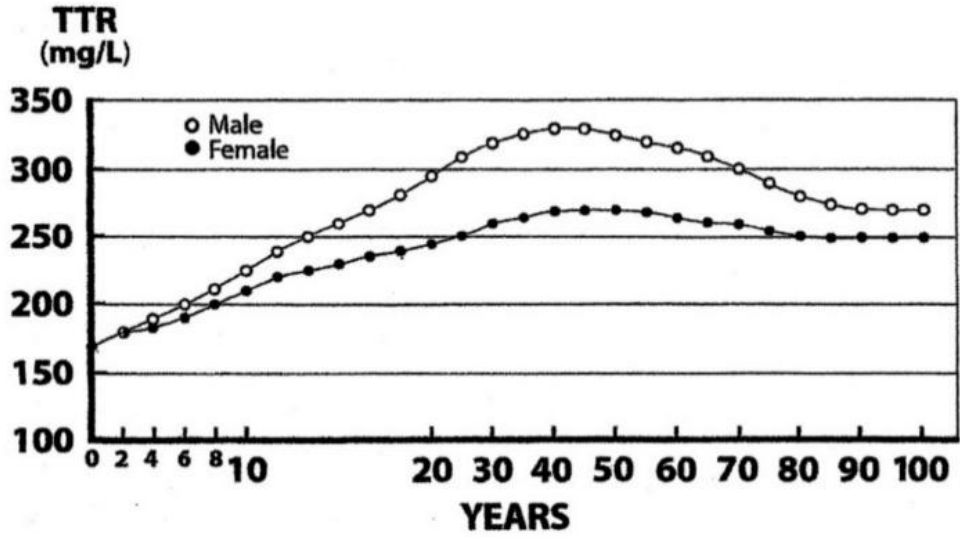
TTR, tiroksin hormonu ve retinol için bir taşıyıcı proteindir. Bu maddelerin kanda taşınmasına aracılık etmektedir. 1942 yılında insan plazma ve beyin omurilik sıvısı numunelerinin elektroforezi sırasında albuminin önüne geçmesiyle tanımlanmıştır. TTR bu özelliği ile prealbumin olarak adlandırılıyordu. Daha sonra tiroksin bağlayan prealbumin olarak adlandırılmıştır. Günümüzde transtiretin olarak adlandırılmaktadır. TTR taşıyıcı proteininin A β 1-42'i de taşıyabileceği bilinmektedir. TTR'nin A β 1-42'i sadece beyinden periferik taşıdığı gösterilmiştir (6,49). A β 1-42'i tekrar santrale taşımaması beyinde amiloid yükün azalmasına katkıda bulunabileceğini akla getirmektedir. Bu tek yönlü taşıma TTR'nin Alzheimer hastalığında en kabul gören yaklaşım olan amiloid kaskad hipotezine göre A β 1-42 yükünü beyinde azaltabileceğini düşündürmektedir.

TTR taşıyıcı proteini özellikle karaciğerde ve beyindeki koroid plexusta sentez edilmektedir. Plazma TTR'nin esas kaynağı karaciğer, beyin omurilik sıvısındaki TTR'nin esas kaynağı ise koroid plexustur. Karaciğer ve koroid plexus dışında TTR kaynakları; retinal pigment epitel, pankreas adacık hücreleri ve az miktarda üretim yapan kalp, iskelet kası, dalak ve plasental trofoblastlardır. TTR'nin metabolize edilme yerleri ise karaciğer, kas ve deridir. Ayrıca böbreklerde, yağ dokuda ve testislerde de TTR'nin degradasyonu gerçekleşmektedir. TTR'nin biyolojik yarı ömrü yaklaşık olarak insanlarda 2-3 gün, maymunlarda 23 saat ve Buffalo sıçanlarında 29 saattir (49).

Taşıyıcı özelliği yanında TTR'nin beyinde nörogenezde, sinir rejenerasyonu ve aksonal büyümede rol alabileceği düşünülmektedir (49). TTR'nin proteolitik aktivitesi de bulunmaktadır. A β klirensine aracılık etmenin yanında proteolitik aktivitesi ile fibrillerin parçalanmasında da rolü olabileceği düşünülmektedir (49). Transgenik fareler ile yapılan bir çalışmada kontrol grubuna kıyasla TTR geni içermeyen farelerde bilişsel performansın azaldığı gösterilmiştir (50). Ayrıca yaşlanma ile normal TTR geni içeren farelerde kötüleşen bilişsel performans beyin omurilik sıvısı (BOS) TTR düzeylerinin düşüklüğü ile korele bulunmuştur (51). Bu çalışmalar TTR'nin bilişsel fonksiyondaki önemini ortaya koymaktadır (50,51).

Plazma TTR seviyeleri 50 yaşından sonra düşmeye başlar (52). Bilindiği üzere Alzheimer hastalığı görülme sıklığı da ileri yaş ile artmaktadır. Alzheimer hastalığının ileri yaşta görülme sıklığındaki artışın, TTR düzeylerinin azalması ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (49).

Ayrıca sağlıklı yenidoğanlarda TTR seviyeleri yetişkinlere kıyasla daha düşüktür. TTR seviyeleri yaş dışında cinsiyete göre de farklılık göstermektedir. TTR sentezi steroid hormonlar tarafından kontrol edilmekte ve kadınlardaki seviyeler erkeklerden biraz daha düşük olmaktadır (49).



Şekil 2.4: TTR plazma düzeylerinin kadınlarda ve erkeklerde yaşa göre değişimi (52)

Literatürdeki çalışmalarda bilişsel bozukluğu olan Alzheimer hastalarında plazma TTR seviyelerinin kontrollerden anlamlı olarak daha düşük olduğu gösterilmiştir (7). Yapılan diğer çalışmalarda TTR düzeylerinin Alzheimer hastalarında BOS'ta da karşılaştırmalı kontrollerine göre daha düşük olduğu bulunmuştur (8).

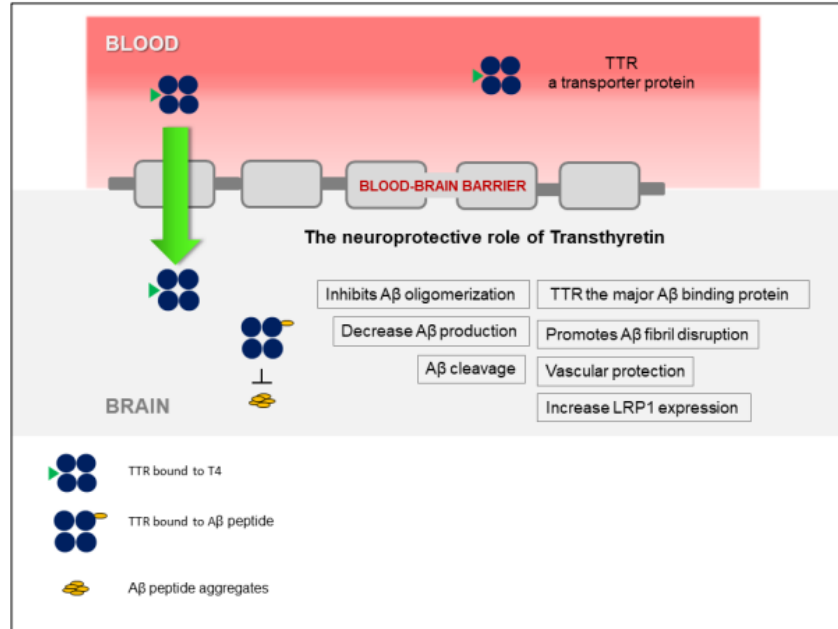
TTR'nin Alzheimer hastalığı için bir biyobelirteç olarak düşünülmesinin yanı sıra hızlı ilerleyen ve yavaş ilerleyen Alzheimer hastalığı ayrımı yapabileceği vurgulanmaktadır. Ayrıca hafif bilişsel bozukluktan Alzheimer hastalığına geçiş aşamasında TTR seviyelerinin önemli olduğu belirtilmektedir. TTR taşıyıcı proteininin aynı zamanda hastaların prognozu hakkında fikir verebileceği ve kısa zamanda hızlı bilişsel düşüş gösterebilecek hastaların tespitinde kullanılabileceği düşünülmektedir. Alzheimer hastalarında BOS ve plazma TTR düzey düşüklüğü ne kadar fazla ise hastalığın o kadar agresif seyredeceği belirtilmektedir (53).

Alzheimer hastalığının erken tanısını koyabilecek kan bazlı minimal invaziv bir biyobelirteç halen bulunmamaktadır. Alzheimer hastalığı tanısını doğrulayabilecek çeşitli biyobelirteç önerileri bulunmaktadır. Ancak bu önerilen biyobelirteçler henüz kesin ve kolay bir şekilde tanı koyamamaktadır. Alzheimer hastalığı tanısı için önerilen biyobelirteçler genomik bazlı belirteçler, plazma belirteçleri ve beyin omurilik sıvısı belirteçleri olarak sınıflandırılabilir (54). Genomik bazlı biyobelirteç olarak geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı ile ilişkilendirilen apolipoprotein E4 aleli düşünülmektedir. Ancak genetik testler rutin kullanım için kolay uygulanabilir değildir. Plazma biyobelirteçleri olarak kan lipid panelleri, mikro RNA analizleri, plazma A β 1-42 / A β 1-40 oranı

önerilmektedir. Kan bazlı bir biyobelirteç geliştirilmesi tanı kolaylığı açısından çok önemlidir. Beyin omurilik sıvısı biyobelirteci olarak ise BOS tau düzeyi, BOS A β peptit düzeyleri, BOS A β 1-42 / toplam tau oranı gibi belirteçler önerilmektedir. Ancak hastalardan BOS örneği alınması kan örneği alınmasından daha zor ve invaziv olduğu için kan bazlı bir biyobelirteç geliştirilmek istenmektedir (54). Klinik olarak faydalı bir biyobelirteç yüksek özgüllük ve duyarlılık göstermelidir. Bu şartları sağlamak için bu belirteçlerin birkaçının birlikte kullanımı önerilmektedir (54).

Alzheimer hastalığının kesin tanısını erken süreçte koyabilecek minimal invaziv bir biyobelirteç geliştirilebilmesi için konu ile ilgili daha çok insan ve hayvan çalışmasına ihtiyaç vardır. TTR seviyelerinin Alzheimer hastalarında BOS'ta ve plazmada düşük bulunması bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği fikrini doğurmuştur.

TTR'nin A β 1-42'i santralden perifere tek yönlü taşımalarının mekanizması halen tam olarak bilinmemektedir. Bu taşımının kan beyin bariyerinin sadece beyin tarafında bulunan ve böylece tek yönlü taşımaya yol açan düşük molekül ağırlıklı lipoprotein (LDL) ilişkili protein-1 (LRP-1) reseptör proteini aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir (6).

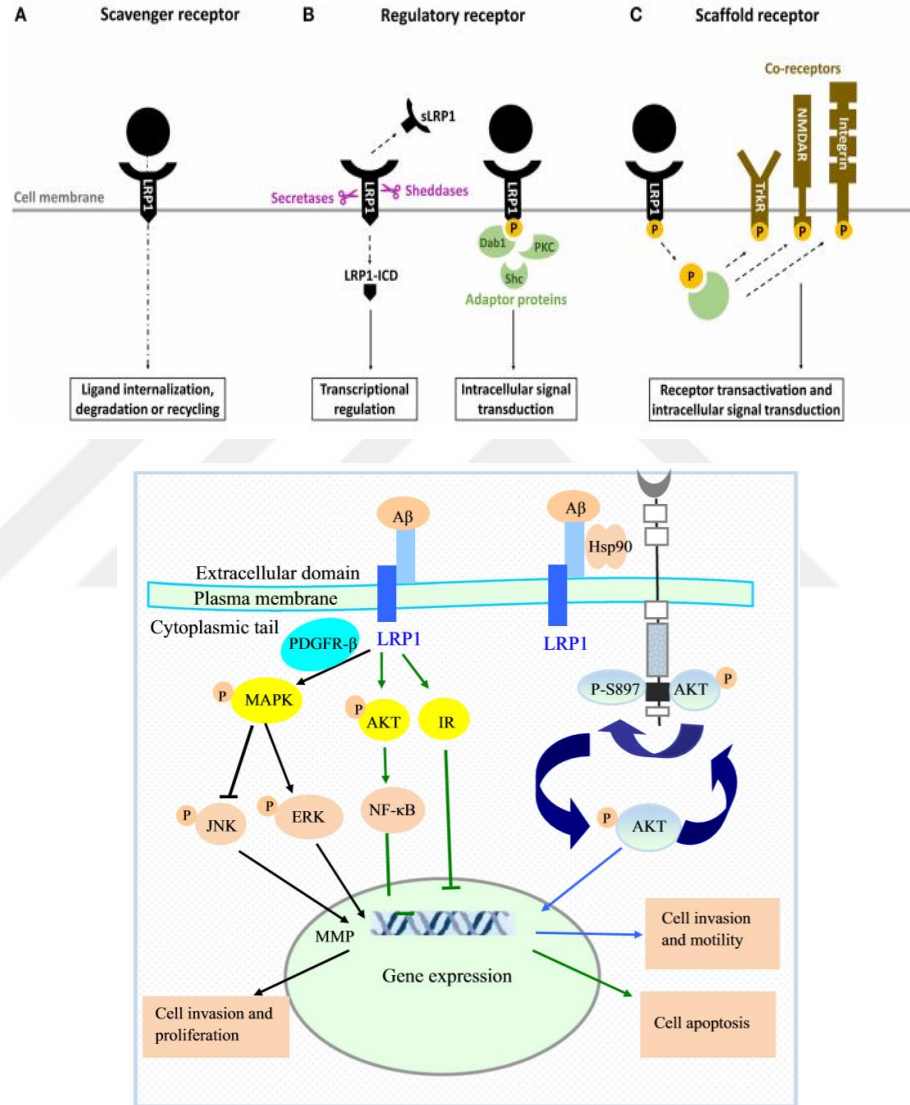


Şekil 2.5: TTR taşıyıcı proteininin kan beyin bariyerinde fonksiyonları (55)

Plazma transtiretin düzeyi aynı zamanda beslenme durumunu değerlendirmek için de bir belirteç olarak kullanılmaktadır. Malnutrisyonda prognoz göstergesi olarak TTR düzeyi değerlendirilmektedir. Yetersiz beslenme riskini göstermede tamamlayıcı bir belirteç olarak önerilmektedir (56).

2.3. LRP-1 Reseptör Proteini ve Alzheimer Hastalığı için Önemi

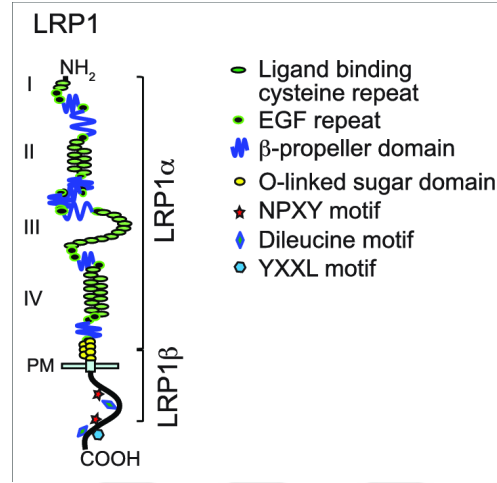
LRP-1 reseptör proteini düşük molekül ağırlıklı lipoprotein (LDL) reseptör ailesinin bir üyesidir. LRP-1 çok yönlü bir reseptör proteindir ve pek çok ligandı bağlayabilmektedir. Bu bağlanmalar sonucunda pek çok sinyal yolağını aktive etmektedir (9).



Şekil 2.6: LRP-1 reseptörüne ligand bağlandığında aktive olan sinyal yolakları (57)

LRP-1 proteini iki alt üniteden oluşmaktadır. 515 kDa ağırlığındaki α zinciri (LRP-1 α) ve 85 kDa ağırlığındaki β zinciri (LRP-1 β) bulunmaktadır (57).

Western blotting yöntemiyle LRP-1 proteini ölçümlerinde genellikle 85 kDa'luk küçük β alt ünitesinin tayini yapılmaktadır.



Şekil 2.7: LRP-1 reseptör proteininin yapısı (58)

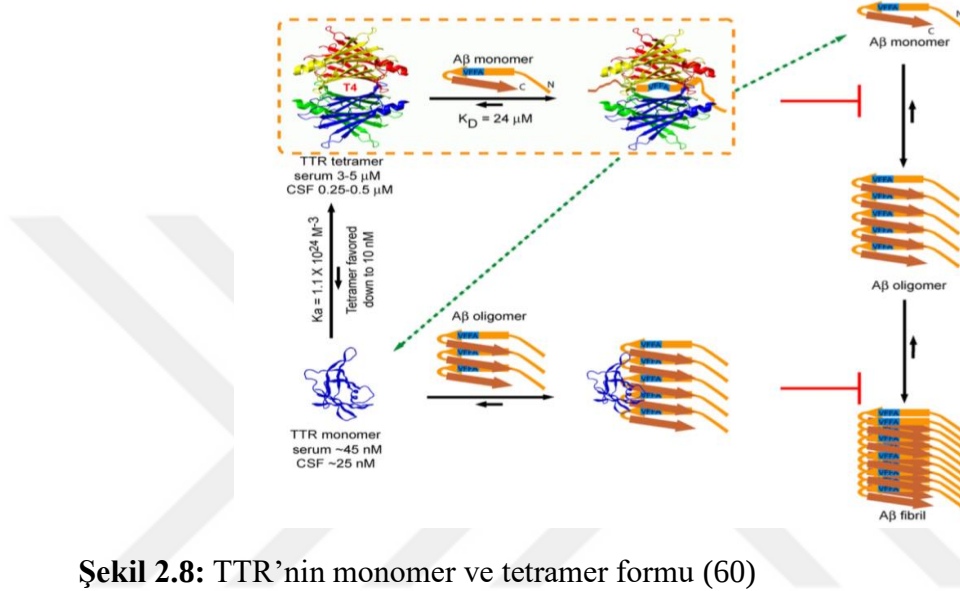
LRP-1 reseptörünün A β klirensinde görev aldığı düşünülmektedir. TTR taşıyıcı proteini A β 'ı santralden perifere taşıırken kan beyin bariyerinde bir reseptör kullanmaktadır. Bu reseptörün LRP-1 olduğu düşünülmektedir. Ayrıca çalışılan in vitro kan beyin bariyeri modellerinde bu reseptörün kan beyin bariyerinin sadece santral tarafında bulunduğu, kan tarafında bulunmadığı gösterilmiştir. TTR'nin A β 'ı tek yönlü taşımalarının bu sayede gerçekleştiği düşünülmektedir (6).

Ayrıca transgenik fareler ile yapılan çalışmalarda TTR geni içermeyen farelerde (TTR -/-) LRP-1 ekspresyonunun kontrollere göre düşük olduğu belirlenmiştir. TTR genini çift taraflı içeren transgenik farelerde (TTR +/+) ise hem beyin LRP-1 ekspresyonunun daha yüksek olduğu hem de plazma amiloid yükünün daha az olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular TTR'nin LRP reseptör proteininin ekspresyonunu da düzenlediğini düşündürmektedir (6).

Alzheimer hastalığından ölenlerin sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Araştırmalar pek çok hastalığın tanı, tedavi ve önlenmesinde ilerleme kaydetmiş olsa da Alzheimer hastalığı için aynı şeyi söylemek pek mümkün değildir. Çünkü Alzheimer hastalığının başlamasına ve daha sonra ilerlemesine yol açan patolojik süreçler hakkında henüz çok az fikir sahibiyiz. Kan beyin bariyeri maddelerin taşınmasını kontrol ederek beyin homeostazında çok önemli rol oynamaktadır. Kan beyin bariyerinde bulunan proteinlerin ekspresyonlarını modüle ederek hastalıklar için yeni tedaviler geliştirilmesi planlanmaktadır. Endositik bir reseptör olan LRP-1 kan beyin bariyeri endotelial hücrelerinde bol miktarda eksprese edilmektedir. LRP-1'in beyinden perifere A β taşınmasında rol alan reseptör olduğu düşünülmektedir. Ayrıca pek çok sinyal yolağını aktive edebilmektedir. Yapılan çalışmalar beyin LRP-1 ekspresyonunu artırmanın beyin işlevi açısından olumlu etki gösterebileceğini vurgulamaktadır (59).

2.4. TTR İlişkili Kalp Amiloidozu

Transtiretin aynı zamanda TTR ilişkili kalp amiloidozunda kalpte primer olarak biriken amilodogenik proteindir. Kalp amiloidozunda biriken TTR formu toksik olan monomer formudur. Alzheimer hastalığında A β 'ı taşıyarak koruyucu olarak görev yapan form ise ilk üretilen stabil form olan tetramer formudur (10).



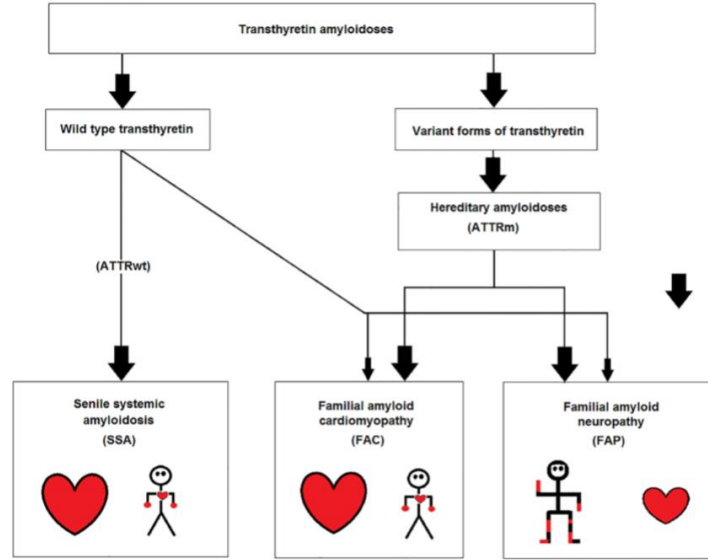
Şekil 2.8: TTR'nin monomer ve tetramer formu (60)

Tetramerik TTR'nin A β kümelenmesinin engellenmesi üzerinde esas role sahip olduğu tahmin edilmektedir. Tetramerik form, Alzheimer hastalığında esas toksik etkiden sorumlu olan A β oligomerlerinin monomerlerden oluşumunu engellemektedir (60). Yapılan bir çalışmada tüm TTR formlarının A β 'nın oligomer formuna daha iyi bağlandığı gösterilmiştir. TTR bu özelliği ile Alzheimer hastalığına esas neden olan A β oligomer formunu etkisiz hale getirebileceği için önem kazanmaktadır (60).

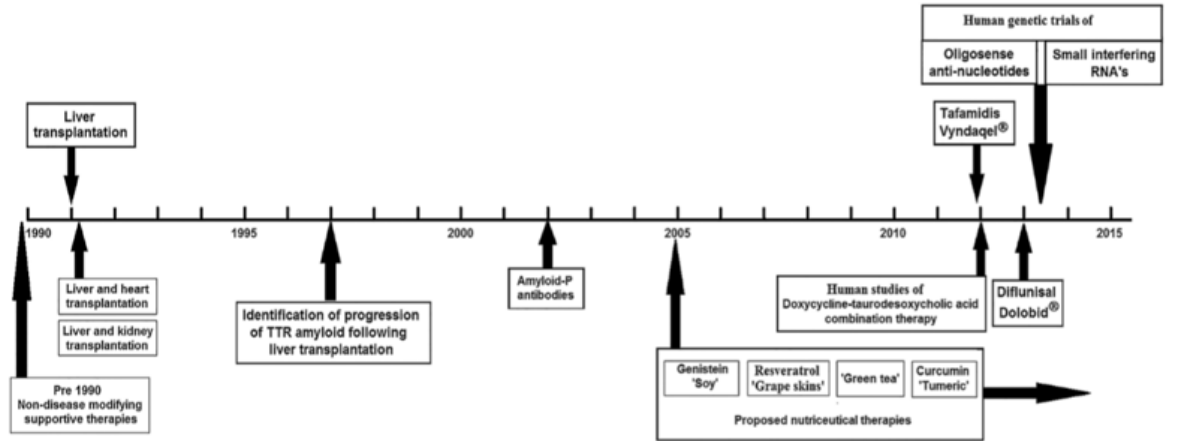
TTR ilişkili kalp amiloidozunun iki formu vardır. Kalıtsal form TTR proteininin genetik mutasyonu sonucu erken yaşta görülmektedir. Bu formda ailesel amiloid polinöropati ve ailesel amiloid kardiyomiyopati görülmektedir. Kalıtsal olmayan, ileri yaşta görülen formunda (wild-type) ise kalpte mutant olmayan TTR'nin monomer formu birikmektedir. Bu form özellikle 80 yaşın üzerindeki bireylerde görülmektedir. Bu nedenle eskiden senil sistemik kalp amiloidozu olarak adlandırılmaktaydı (49).

TTR ilişkili amiloidozda da Alzheimer hastalığı gibi küratif bir tedavi bulunmamaktadır. Tedavide endike ilaç seçenekleri geliştirilmeden önce hastalıkta tek tedavi seçeneği olarak TTR'nin en fazla üretildiği yer olduğu için karaciğer transplantasyonu düşünülüyordu. Ancak bu tedavi hem çok zordu hem de küratif değildi. Son yıllarda TTR ilişkili kalp amiloidozu için çeşitli ilaç

tedavileri geliştirilmiştir. Bunlardan bir tanesi de Taurin-Doksisiklin kombinasyon tedavisidir (10).



Şekil 2.9: TTR proteini ilişkili amiloidoz formları (49)



Şekil 2.10: TTR ilişkili kalp amiloidozunda yıllar içinde geliştirilen tedavi seçenekleri (10)

2.5. Beyin Amiloidozu ile Kalp Amiloidozu İlişkisi

TTR, Alzheimer hastalığında A β taşıyıcısı olarak koruyucu özelliğiyle düşünülürken; TTR ilişkili kalp amiloidozunda primer olarak biriken amiloidogenik proteindir. Ayrıca Alzheimer hastalarında kalp patolojileri sıklığının arttığını belirten çalışmalar vardır. Alzheimer hastalarının çeşitli aort kapak sorunları, aort yetersizliği ve sol ventrikül hipertrofisi dahil subklinik kalp hastalıkları olabilmektedir. Ancak Alzheimer hastalığında kalp hastalıklarındaki bu görülme sıklığı artışının sebebi açıklanmamıştır (11).

Alzheimer hastalarında kalpte de amiloidogenik bir birikim olabilir ancak literatürde bu biriken proteinin türü hakkında yapılmış çok az çalışma bulunmaktadır. Alzheimer hastalığı modelinin periferik bir organ olan kalpteki etkisini görmek, iki farklı amiloidoz formu arasındaki ilişkiyi araştırmak için faydalı olacaktır.

32 Alzheimer hastası ile yaş ve cinsiyet uyumlu 34 sağlıklı kontrolü karşılaştıran bir çalışmada yapısal ve fonksiyonel kalp anomalileri Alzheimer hastalığı grubunda anlamlı olarak daha fazla görülmüştür. Bu çalışmada değerlendirme elektrokardiyografi ve ekokardiyografi ile yapılmıştır (11).

TTR ilişkili kalp amiloidozunda ise klinik belirtiler kalpte TTR birikiminden yıllar sonra ortaya çıkmaktadır. 80 yaşın üzerindeki kişilerin otopsisinde kalp amiloidozu görülme sıklığı %30'dur. Yani TTR kalp amiloidozu tanısı konulmamış olsa bile 80 yaşın üzerindeki kişilerde kalpte TTR birikimi görülmektedir (11).

A β 1-40 ve A β 1-42'nin Alzheimer hastalarının kalbinde kardiyomiyositlerde ve intersitisyumda bulunduğu gösterilmiştir. A β 'nın Alzheimer hastalarında kardiyak disfonksiyonda rol oynayabileceği şeklinde yeni bir hipotez öne sürülmektedir. Bu hipotezi destekler şekilde kalpte A β formları birikiminin diyastolik ve miyokardiyal disfonksiyon ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (11).

Alzheimer hastalığı sadece beyin ile sınırlı bir hastalık değil, sistemik bir hastalıktır (4,11).

Bu bilgiler ışığında Alzheimer hastalığı konusunda çok fazla çalışma bulunmayan periferik bir organ olan kalbi incelemek değerli olacaktır.

2.6. Taurin Amino Asidi, Alzheimer Hastalığındaki Rolü ve TTR Proteini ile İlişkisi

Taurin (2-aminoetan sülfonik asit) güçlü anti-oksidan ve anti-apoptotik özellikleriyle bilinen başlıca beyin ve karaciğerde sentezlenen ve beyin hücrelerinin proliferasyonunu artırıcı etki gösteren bir amino asittir (4).

Taurin karaciğerde safra asidi konjugasyonunda rol almakta, vücutta oksidan stresi azaltıcı etki göstermektedir (61). Antioksidan özelliğinin yanında ozmoregülatör, nöromodülatör ve kalsiyumun hücreye girişini düzenleyici rolü bulunmaktadır. Alzheimer hastalarında beyin ve beyin omurilik sıvısı taurin düzeylerinin azaldığı bildirilmektedir. Taurinin Alzheimer hastalığında patogeneze sorumlu tutulan A β 'nin agregasyonunun zayıf bir inhibitörü olabileceği öne sürülmektedir (14).

Taurinin kronik uygulanmasının Alzheimer hastalığı modeli oluşturulmuş deney hayvanlarında hipokampus bağımlı bilişsel bozulmayı önemli ölçüde iyileştirdiği gösterilmiştir (4,13,62).

20 hasta ile yapılan bir çalışmada 12 ay boyunca Doksisiklin ve Tauro Urso Deoksikolik asit (TUDCA) tedavisi oral olarak uygulandığında (hastalardan 17'si kalıtsal TTR kalp amiloidozu, 2'si yaşa bağlı TTR kalp amiloidozu ve 1 hasta da domino alıcısı olmak üzere) tedaviyi tamamlayan hastalarda 1 yıl boyunca TTR amiloidozuna bağlı kardiyak tutulumun ve nöropatinin ilerlemediği görülmüştür. Doksisiklin ve TUDCA kombinasyonunun TTR amiloid birikimini önlediği düşünülmektedir (16).

Yine Doksisiklin ve TUDCA kombinasyonunun TTR ilişkili kalp amiloidozunda iyileştirici etkisini göstermek için yapılan başka bir çalışmada TTR birikiminin önlendiği ve bu kombinasyonun fibril bozucu olarak görev yaptığı gösterilmiştir. TUDCA'nın özellikle TTR'nin prefibriler formu üzerinde etkili olduğu gözlenmiştir. Antioksidan ve antiapoptotik özelliği iyi bilinen taurinin TTR birikimi nedeniyle hasar gören dokularda oksidan strese karşı da koruma sağlayabileceği düşünülmektedir (17).

2.7. Metal İyonlarının Alzheimer Hastalığı, TTR Proteini ve Taurin Amino Asidi ile İlişkisi

Alzheimer hastalarının plazma ve idrar metal katyon düzeylerinde değişiklikler çeşitli çalışmalarda tespit edilmiştir (63,64).

Alzheimer hastalarında A β senil amiloid plaklarının yüksek oranda Cu, Fe, Zn içerdiği gösterilmiştir. Wilson hastalarında ve bakır taşıyıcı defekti olan farelerde serum bakırı yüksek olduğunda serum amiloid plak ve A β 1-42 düzeylerinin düşük olduğu görülmüştür. Ayrıca Alzheimer hastalarında idrar Cu atılımının yüksek olduğu belirlenmiştir (12).

Ek olarak Alzheimer hastalığı için onayı bulunan günümüzde kullanılmakta olan asetilkolin esterase inhibitörlerinin sadece sinaptik asetilkolin düzeyini artırmadığı, çeşitli sistemleri de etkileyebildiği düşünülmektedir. Etkilediği parametrelerden bir tanesi de metal katyon düzeyleridir. Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılan asetilkolin esterase inhibitörlerinin özellikle bakır ve çinko metabolizmasını değiştirdiğine dair çalışmalar bulunmaktadır (64).

Tedavi amacı ile asetilkolin esterase inhibitörü kullanan Alzheimer hastalarında daha önce bu tedaviyi almamış hastalara göre yüksek plazma çinko ve düşük plazma bakır değerleri tespit edilmiştir (64). Hayvan modelleri ile yapılan çalışmalar asetilkolin esterase inhibitörlerinin beyin A β plak yükünü azaltarak bilişsel bozulma üzerinde olumlu etki yaptığını göstermektedir (65). Muhtemelen aradaki bu ilişkide beyin amiloid plaklarında metal katyon birikiminin de rolü bulunmaktadır.

Metal katyonların Alzheimer hastalığı üzerindeki etkisini TTR aracılığıyla gösterdiği öne sürülen hipotezlerden bir tanesidir. Metal katyonlar transtiretinin amiloid beta peptidine bağlanma afinitesini değiştirebilmektedir (63).

Transtiretin bakır, demir, çinko, mangan gibi metal katyonlarına maruz kaldığında konformasyonel bir değişikliğe uğrar. Bu metal iyonları transtiretinin A β 'a bağlanma afinitesini değiştirir. TTR, A β 'ı temizleyen bir proteaza dönüşür ve böylece A β eliminasyonu artmış olur (63).

Taurinin (2-aminoetan sülfonik asit) amino grubunun metal katyonlara bağlanması beklenir. Taurin bakır ile orta derecede kararlı kompleksler oluşturabilir. Aynı zamanda çinkoya da bağlanabilmekte ve Taurin - Çinko kompleksi oluşabilmektedir (66). Güçlü bir antioksidan olan taurin ağır metal zehirlenmesini tedavi etmek için kullanılabilir. Çinko, demir, bakır gibi metallerin oluşturduğu toksisitede taurin iyileştirici etki gösterebilmektedir (18).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Deney Hayvanları

3.1.2. Kullanılan Laboratuvar Aletleri ve Cihazlar

3.1.3. Kullanılan Kimyasallar, Elisa Kitler ve Antikorlar

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

3.2. Yöntem

3.2.1. Araştırma Planı ve Deney Grupları

3.2.2. Taurin Uygulaması

3.2.3. Stereotaksik Uygulama

3.2.4. Plazma Metal Katyon Düzeyleri Tayini

3.2.5. Elisa Kit Çalışması

3.2.6. Western Blot Yöntemi / SDS-PAGE

3.2.7. İstatistiksel Analiz

3.1. Gereç

3.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada kullanılan dokular, daha önce Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 16.08.2017 tarih ve 66332047-604.01.02-E.116581 sayılı karar ile alınan G.Ü.ET17.058 etik kurul kod numaralı onay sonrasında Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezinden (GÜDAM) temin edilmiş ve aynı merkezde uygulamaların yapılmış olduğu sıçanlardan alınmıştır. Bu sıçanların dokuları kullanılarak ilgili parametreleri araştırmak üzere planlanan çalışma için yeniden etik kurul başvurusu yapılmış ve 66332047-604.01.02-E.72419 sayılı karar ile 09.07.2020 tarihinde G.Ü.ET-20.033 kod numarası ile etik onay alınmıştır.

Çalışmada 30 adet Wistar albino cinsi erkek sıçan kullanılmıştır. Hayvanların deney süresinde bakımları GÜDAM tarafından sağlanmıştır. Hayvanlar tek tek kafeslerde tutulmuş, ad-libitum pelet yem ve musluk suyu ile beslenmiştir. Yeme ve içmeye erişim standart olarak sağlanmıştır. 12:12 saatlik aydınlık-karanlık döngüsü uygulanmıştır. Sıçanların bakımı standart laboratuvar koşulları altında yapılmıştır. Stereotaksik cerrahi GÜDAM'da gerçekleştirilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Laboratuvar Aletleri ve Cihazlar

Çalışmada kullanılan Gazi Üniversitesi Fizyoloji, Tıbbi Biyoloji ve İmmünoloji Araştırma Laboratuvarlarına ait donanımlar Tablo 3.1.1'de marka/model özellikleri ile listelenmiştir. Bu çizelgede Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalına ait kullanılan bir adet cihaz TB şeklinde ve İmmünoloji Anabilim Dalına ait kullanılan bir adet cihaz İ şeklinde gösterilmiştir. Ayrıca plazma metal katyon düzeyleri (Fe, Cu, Zn, Mn) 'Baran Medikal Limited Şirketi' tarafından hizmet alımı aracılığıyla kendi laboratuvarında bakılmıştır.

Tablo 3.1.1: Laboratuvar Donanımları

Alet/Cihaz adı	Marka/Model
Stereotaksi Cihazı	Stoelting, USA
Hamilton Enjektör (700 series. 5µl)	Hamilton
Cerrahi Malzemeler	-
Derin Dondurucu (–80°C)	WiseCryo, Simplified Freezing System
Buzdolabı	Arçelik
Soğutmalı Santrifüj	MPW-350R
Hassas Terazı	SHIMADSU, AX200
Saf Su / DI Cihazı	MES, mpMINIpure
pH metre	Eutech Instruments, Singapur
Vorteks	VELP, Scientifica, Mixer
Doku Homojenizatörü	Sonics Vibracell, VCX130FSJ
Spektrofotometre	Spektrostar nano microplate reader
Elektroforez ve Blotting Cihazı	Mini protean system, BIO-RAD, Hercules, CA, USA
Güç Kaynağı	Consort, E835, Electrophoresis Power Supply
Western Blot Görüntüleme Sistemi	Kodak Gel Logic, 2200 Pro (TB)
Isıtıcı	Eppendorf, Thermomixer Compact
Isıticılı Manyetik Karıştırıcı	Assistent, TMA 2071
Çalkalayıcı (Shaker)	Mini Rocker MR-1, BOECO
Otomatik mikropipetler	Ergo-one Star Lab Single channel pipetler ve Gilson Multichannel pipet
Otomatik pipet uçları(10, 100, 1000µl)	IsoLab ve Neptune
Falcon tüp (15, 50 ml)	İldam Kimya
Eppendorf Tüpleri (1,5 ve 2 ml)	İldam Kimya
Washer (Yıkayıcı)-Elisa kit için	(İ)

3.1.3. Kullanılan Kimyasallar, Elisa Kitler ve Antikorlar

Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler Tablo 3.1.2’de ve Western blot yöntemi için kullanılan LRP-1 antikoruna Tablo 3.1.3’te imalatçı firma, katalog numaraları gibi özellikleri ile listelenmiştir. Elisa kitler ise özellikleri ile Tablo 3.1.4’te belirtilmiştir.

Tablo 3.1.2: Kimyasal Malzemeler

Kimyasal/Malzeme Adı	Katalog No	İmalatçı Firma
Amiloid beta protein fragmenti 1-42	A9810	Sigma-Aldrich, USA
Taurin	TAU303.1	Bioshop Canada Inc.
Lizis Tamponu (RIPA Lysis Buffer)	Sc-24948	Santa Cruz Biotechnology, TX, USA
Sığır Serum Albumini (BSA)	11943.01	SERVA, Germany
PierceTm ECL Western Blotting Substrate	K820-500	Biovision Inc.
Sodyum Dodesil Sülfat	20765.01	SERVA, Germany
Acyramide-Bis Solüsyon %40, 29:1	10680.01	SERVA, Germany
Fosfat Buffer Salin (PBS) pH:7.4	15S-10-05	SNP Biyoteknoloji
BLUeye prestained protein standard	773302	BioLegend CNS Inc.
Nitroselüloz membran (0,2µm)	10600043	GE Healthcare Life Sciences, Germany
Amonyum Per Sülfat (APS)	13376.02	SERVA, Germany
Tetrametil-etilendiamin (TEMED)	35930.02	SERVA, Germany
Bradford Reagent	39222.03	SERVA, Germany
Sample (Blue Loading) Buffer	7722S	Cell Signaling Technology Inc.
Running Buffer	42529.01	SERVA, Germany
Transfer Buffer	12539S	Cell Signaling Technology Inc.
TBST Buffer	9997S	Cell Signaling Technology Inc.

Tablo 3.1.3: Antikorlar

Antikor	MA	Katalog No	İmalatçı Firma
LRP-1 (anti rabbit monoclonal)	85 kDa	64099S	Cell Signaling Technology Inc.
β Actin (anti rabbit monoclonal)	45 kDa	bsm-54638R	Bioss, USA
Goat anti rabbit IgG-HRP	-	R-05072-500	Advansta

Tablo 3.1.4: Elisa Kitler

Elisa Kit	Katalog No	İmalatçı Firma
TTR (Transtiretin)	E0295Ra	BT-Lab
Aβ 1-42	E0093Ra	BT-Lab

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

Western blot yöntemi sodyum dodesil sülfat – poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) için gerekli çözeltiler:

Jel dökümü için hazırlanan çözeltiler:

SDS %10

1,5 gram SDS 15 ml'ye distile su ile tamamlanır.

APS %10

0,1 gram APS 1 ml'ye distile su ile tamamlanır, taze olarak hazırlanıp kullanılır.

1,5 M Tris HCl (pH:8,8)

- MA: 121,14 g/mol
- 36,342 g tris base 150 ml distile su ile çözülür.
- HCl ile pH ayarı yapılır.
- Son hacim 200 ml'ye tamamlanır.

Ayrırma jeli (resolving gel) %10'luk (2 jel için 10 ml)

- 4 ml distile su
- 3,3 ml %40'lık Acrylamide/Bis solüsyonu
- 2,5 ml 1,5 M tris (pH 8.8)
- 100 µl %10'luk SDS
- 100 µl %10'luk APS
- 6 µl TEMED

Yığınlama jeli (stacking gel) %4'lük (2 jel için 5 ml)

- 3,075 ml distile su
- 0,67 ml %40'lık Acrylamide/Bis solüsyonu
- 1,25 ml 1,5 M tris (pH 8.8)
- 50 µl %10'luk SDS
- 25 µl %10'luk APS
- 5 µl TEMED

Ponceau staining solüsyon % 0,1

- 1g Ponceau red tartılır.
- Distile su ile çözündürülür.
- 50 ml asetik asit eklenir.
- Son hacim 1L'ye distile su ile tamamlanır.
- Steril filtreden geçirilir.

%3 BSA

- 0,3 gram BSA 10 ml TBST içinde çözülür.

Membran Bloklama ve Antikorlar için Tampon Çözelti:

Bloklama işlemi için BSA kullanılmıştır. Transfer işlemi sonrasında membranlar tampon çözelti içinde %3 BSA ile bloklanmıştır. Primer antikoların da uygun dilüsyonları (LRP-1 için 1:1000, Beta Aktin için 1:650) tampon çözeltide çözündürülen BSA içinde hazırlanmış ve içinde membranlar inkübe edilmiştir. LRP-1 ve Beta Aktin primer antikorları için +4°C'de gece boyu inkübasyon uygulanmıştır. Sekonder antikor için uygun dilüsyon olarak 1:10000 kullanılmıştır. Membranlar 3 kez 5'er dakika yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra oda sıcaklığında 2 saat kadar sekonder antikor ile muamele edilmiştir. Sonrasında 3 kez 5'er dakika yıkama tamponu olan TBST ile yıkanma sonrası membranlar dijital görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Araştırma Planı ve Deney Grupları

Çalışmada 28 ± 4 aylık yaşı 30 adet Wistar albino cinsi erkek sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar her grupta 6 adet olacak şekilde gruplandırılmıştır ($n=6$). Toplamda 5 grup bulunmaktadır.

Gruplar:

- 1- Kontrol grubu, sadece stereotaksik cerrahi uygulanan grup
- 2- Stereotaksik cerrahi uygulanan ve intraserebroventriküler olarak 10 mM steril PBS (pH: 7.4) (SNP Biyoteknoloji 15S-10-05) enjekte edilen grup
- 3- Stereotaksik cerrahi uygulanan ve isv olarak PBS içinde çözündürülmüş beta amiloid 1-42 (Sigma-Aldrich USA), (lateral ventriküllere, 5'er μ l) enjekte edilen grup
- 4- 6 hafta içme suyuyla 1000 mg/kg/gün oral taurin (BioShop Canada Inc.) alan (ön takviye) ve sonrasında stereotaksik cerrahi ile isv olarak PBS enjekte edilen grup
- 5- 6 hafta içme suyuyla 1000 mg/kg/gün oral taurin alan (ön takviye) ve sonrasında stereotaksik cerrahi ile isv olarak PBS'de çözündürülmüş beta amiloid (lateral ventriküllere, 5'er μ l) enjekte edilen grup

Çalışma grubunu oluşturan tüm sıçanlar laboratuvar ortamında, 12 saat aydınlıkta ve 12 saat karanlıkta olacak şekilde normal musluk suyu ve standart sıçan yemi ile beslenmiştir. Stereotaksik uygulamadan iki hafta sonra sıçanlar ketamin hidroklorür (90 mg/kg) ve xylazine hidroklorür (10 mg/kg) anestezisi altında intrakardiyak kan alma yöntemiyle feda edilerek organlar hızla çıkarılmıştır. Doku örnekleri çalışılana kadar -80°C 'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Taurin Uygulaması

Taurin (2-aminoetansülfonik asit) (BioShop Canada Inc.) içme suyuna 1000mg/kg/gün dozunda eklenerek 6 hafta verilmiştir. Taurin uygulaması 4. ve 5. gruplara yapılmıştır.

3.2.3. Stereotaksik Uygulama

Sıçanlara intraperitoneal (ip) 90mg/kg ketamin ve 10 mg/kg xylasin anestezisi sonrası stereotaksik cerrahi uygulanmıştır. Grup 3 ve 5'e toplam 10 µl (her bir lateral ventriküler 5'er µl olacak şekilde) isv Aβ 1-42 enjeksiyonu, grup 2 ve 4'e ise aynı miktarda PBS enjeksiyonu yapılmıştır. Hayvanlar tespit edildikten sonra Hamilton mikro enjektörü ile isv Aβ 1-42 enjeksiyonu yapılmıştır (Şekil 3.2.1).



Şekil 3.2.1: Stereotaksik cerrahi ile Aβ 1-42 enjeksiyonu (4)

3.2.4. Plazma Metal Katyon Düzeyleri Tayini

Plazma demir, bakır, çinko, mangan düzeyleri hizmet alımı aracılığıyla Baran Medikal Ltd. Şti. firmasının laboratuvarında bakılmıştır. Demir, bakır, çinko, mangan iyonlarının tayini için Mindray marka BS300 model tam otomatik biyokimya cihazı kullanılmış ve ICP-MS yöntemiyle kolorimetrik olarak ölçüm yapılmıştır.

3.2.5. Elisa Kit Çalışması

Tablo 3.1.4'te katalog numaraları belirtilen BT Lab markalı elisa kitler plazma ve kalp dokusunda transtiretin ve Aβ 1-42 tayini için çalışılmıştır. Hem plazmada hem de doku homejenatında çalışmaya uygun olan bu kitlerin plazma

örneklerinde çalışılması sırasında plazma örnekleri 2 kez santrifüj edilerek olası partiküllerin giderilmesi sağlanmıştır. Kalp dokusu ise önce küçük parçalara ayrılmış daha sonra oluşan fazla kanın tayin sonucunu etkilememesi için PBS (pH 7.4) ile yıkanmıştır. Fazla solüsyondan arındırılan dokudan her bir örnek için 0,2 gram tartılarak 9 kat (1,8 ml) PBS ile sonikatör aracılığıyla homojenize edilmiştir. Sonikatör %50 amplitüde ayarlı iken 15 saniye kadar buz içinde homojenizasyon yapılmıştır.

Homojenizatlar kuru buz üzerinde 15 dakika inkübe edildikten sonra +4°C'de 3000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatanlar temiz ependorflara alınarak soğuk ortama kaldırılmıştır. Uygun sıcaklıklarda muhafaza edilen kit solüsyonlarından biri olan standart solüsyonu, yine kit bileşeni olan standart seyreltici solüsyon ile seyreltilerek ölçümün standartları hazırlanmıştır. Standart konsantrasyonları plazma ve kalp TTR için 64, 32, 16, 8, 4 ng/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Plazma ve kalp A β 1-42 tayini için ise 1200, 600, 300, 150, 75 pg/ml standart konsantrasyonları hazırlanmıştır.

Kit içeriğinde bulunan önceden antikor emdirilmiş olan plate kuyucuklarına öncelikle standartlar ve örnekler yüklenmiştir. Sonrasında biyotinlenmiş antikor sadece örnek kuyucuklarına eklenmiştir. Sonrasında enzim içeren Streptavidin HRP solüsyonu blank hariç tüm kuyucuklara eklenmiştir. Bu aşamadan sonra plate üzeri kapatılarak 60 dakika 37°C'de inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda kuyucuklar kit bileşeni olan yıkama tamponu ile otomatik yıkama cihazı aracılığıyla 5 kez yıkanmıştır. Kuyucuklardaki fazla sıvı alındıktan sonra her kuyucuğa kit bileşeni olan substrat A solüsyonu ve hemen ardından substrat B solüsyonu eklenmiştir. Substrat B solüsyonu ışığa duyarlı olduğu için ışık almamasına özen gösterilmiş ve plate yükleme yapıldıktan sonra üzeri alüminyum folyo ile kapatılarak ışık alması engellenmiştir. Bu aşamada da 10 dakika karanlıkta 37°C'de inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyon sonrası kit bileşeni olan asidik durdurucu solüsyon her kuyucuğa eklenerek mavi rengin hızla sarı renge dönüştüğü gözlemlenmiştir. Vakit kaybedilmeden spektrofotometrede 450 nm'de okutulmuştur.

Aynı marka olan TTR ve A β 1-42 kitleri için önerilen aynı protokol uygulanmıştır.

3.2.6. Western Blot Yöntemi / SDS-PAGE

Western blot yöntemi dokudaki spesifik bir proteini analiz etmemizi sağlayan bir moleküler biyoloji tekniğidir. Bu yöntem aracılığıyla dokuda bulunan bir proteinin varlığı, büyüklüğü, konsantrasyonu araştırılabilir (67).

Çalışmamızda LRP-1 reseptör proteini total beyin dokusunda western blot yöntemi aracılığıyla ölçülmüştür. Yükleme kontrolü olarak β -aktin kullanılmıştır.

Proteinlerin ekspresyonları görüntüleme sonrası elde edilen bantlar aracılığıyla imagej programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Aranılan proteinin özelliklerine bağlı olarak bu yöntemin aşamaları farklılık gösterebilmektedir.

Örneklerin hazırlanması:

Total beyin LRP-1 proteini tayini için;

- Beyin dokusundan 20 mg kuru buz üzerinde tartıldı.
- Örnekler üzerine 300 μ l lizis tamponu (RIPA Lysis Buffer System, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA pH 7,4) eklendi. Bu tampon 1 ml'de 10 μ l 200 mM phenylmethanesulfonyl floride, 10 μ l 100 mM sodium orthovanadate ve 10 μ l proteaz inhibitör kokteyli içerecek şekilde hazırlanmıştır.
- Sonikatör aracılığıyla (Sonics vibracell, %50 amplitüd, 15-20 sn) beyin dokusu homojenize edildi.
- Homojenizatlar kuru buz üzerinde 15 dakika kadar inkübe edildikten sonra +4°C'de 10 dk santrifüj işlemi gerçekleştirildi.
- Temiz ependorf tüplere alınan süpernatantlar aliquotlanarak hızla -80°C'e kaldırıldı.

Bradford metodu (Total protein düzeylerinin ölçümü):

Total protein düzeylerinin ölçümü için Bradford metodu kullanılmıştır (68). Bradford tarafından geliştirilen bu yöntem organik boyaların, proteinlerin asidik ve bazik gruplarıyla etkileşerek renk oluşturması esasına dayanır. Coomassie brilliant mavisi G-250 boyası kuvvetli bir asitte çözündüğü zaman, protonlanmadan dolayı kırmızı-kahverengi arası bir renge dönüşür. Artı yüklü bir proteine bağlandığında ise renk maviye dönüşür. Yöntem bu boyanın farklı konsantrasyonlardaki protein çözeltilerinde farklı şiddette mavi renk oluşturmasından yararlanılarak geliştirilmiştir. 595 nm'de maksimum absorbans ölçülür. Protein standardı olarak sığır serum albumini (BSA) kullanılmıştır. BSA

ile elde edilen konsantrasyon absorbands eğrisi, örneklerdeki protein miktarını belirlemek için kullanılmaktadır.

Bradford metodu ile protein tayini:

- 2 mg BSA (SERVA, Germany 11943.01) tartıldı ve 1 ml PBS (SNP Biyoteknoloji 15S-10-05) (pH:7,4) içinde çözüldü. 2 mg/ml'lik stok BSA elde edildi.
- Stok BSA'nın uygun dilüsyonları hazırlanarak 8 adet standart oluşturuldu..
- Bradford metodunda kullanılan protein standartlarının konsantrasyonları: 1,5 mg/ml, 1 mg/ml, 0,75 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,375 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml ve 0,05 mg/ml olarak hazırlandı.
- Mikroplaka kuyucuklarına üçer tekrarlı olmak üzere blank (PBS), standartlar ve örneklerden 10 µl yükleme yapıldı. Total beyin dokusu örnekleri PBS ile 20 kat dilüe edilmiştir.
- Blank, standartlar ve örnekler üzerine 200 µl hazır Bradford Reagent (1:5 dilüe edildi) (SERVA, Germany, 39222.03) eklendi.
- 15 dk oda sıcaklığında inkübasyon sonrası spektrofotometrede 595 nm'de absorbands değerleri okutuldu.
- Standartların konsantrasyon-absorbands eğrisi oluşturuldu. Bu lineer eğrinin denklemi ($y_{\text{cons}} = ax_{\text{abs}} + b$) örneklerdeki protein miktarının (mg/ml) hesaplanmasında kullanıldı. Örnekler 20 kat dilüe edildiği için elde edilen sonuç dilüsyon katsayısı olan 20 ile çarpıldı.

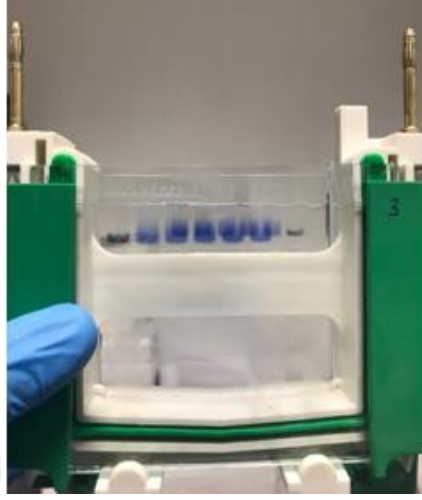
SDS-PAGE jel dökümü:

- SDS-PAGE için 10 ml %10'luk ayırma jeli (resolving gel) ve 5 ml %4'lük yığınlama jeli (stacking gel) daha önce verilen oranlarda döküldü.
- Jel döküm işlemi için BIO-RAD, Mini protean system (Hercules, CA, USA), jel dökme standları, camları, tarakları ve diğer aparatları kullanıldı.
- %10 ve %4'lük jeller, çalışmamızda kullandığımız proteinlerin moleküler ağırlıkları (Tablo 3.1.3) göz önüne alınarak tercih edildi.

- Jel döküm işleminde APS ve TEMED en son eklendi ve eklendikten sonra hızlıca temiz cam plakaların arasına döküldü.
- Ayırma jelinin polimerize olması 30 dakika beklendikten sonra ayırma jelinin üzerine yığınlama jeli için hazırlanan çözelti (2,5 ml kadar) döküldü.
- Yükleme kuyucuklarının oluşması için tarak (10 kuyulu) yerleştirildi.
- Jelin polimerizasyonu için 30 dk beklendi.

Yükleme çözeltisinin hazırlanması ve jele yüklenmesi:

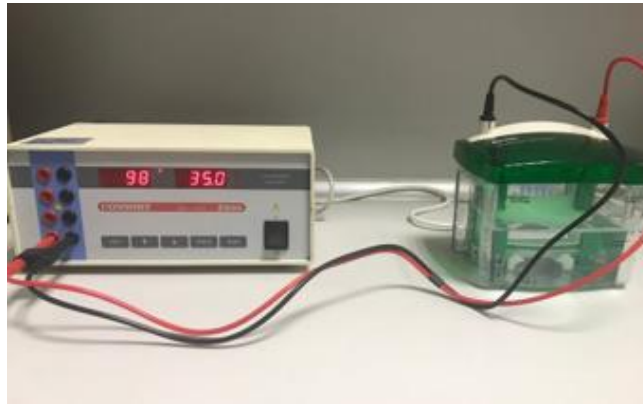
- 7 µl hazırlanan stok örnek tamponu (Blue Loading Buffer 3X, Cell Signaling Technology Inc. 7722S, 3X) 3 µl örnek, 11 µl distile su (örnek hacmi distile su ile 21 µl'e tamamlanır) olacak şekilde son hacmi 21 µl yükleme çözeltisi hazırlandı.
- Her bir örnek için 20 µg protein yüklemesi yapabilmek için yükleme çözeltisinin içeriği; hacim = 20 / protein konsantrasyonu formülü ile hesaplandı (örneğin; 3 = 20 / 6,66).
- Bu hesaplama tekniği ile her bir örnek için yükleme çözeltisi hazırlandı.
- Yükleme çözeltileri protein denatürasyonu için 95 °C'de 5 dk kaynatıldı (Eppendorf, Thermomixer Compact). Soğuyan yükleme çözeltileri (21 µl) jel kuyularına yüklendi.
- Her jelin ilk kuyusuna moleküler ağırlıkların belirlenmesinde referans olan protein standardından (BLUeye prestained protein standard, BioLegend CNS Inc. 773302) 4 µl yükleme yapıldı (Şekil 3.2.2).



Şekil 3.2.2: Western blot deneyi jele yükleme işlemi

Jel elektroforezi:

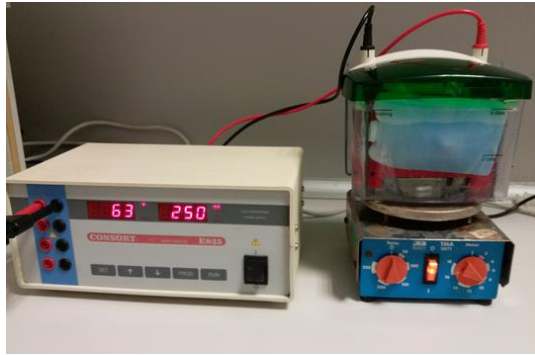
- Elektroforez tankı (BIO-RAD, Mini protean system, Hercules, CA, USA) yeterli miktarda yürütme tamponu (Running Buffer, SERVA, Germany 42529.01) (pH:8,3) ile dolduruldu.
- Güç kaynağı (Consort E835, Electrophoresis Power Supply) sabit 100 V ve 2 saat süreye ayarlandı.
- Elektroforez işlemi ile proteinlerin jelde moleküler ağırlıklarına göre ayrışması sağlandı (Şekil 3.2.3).



Şekil 3.2.3: Western blot deneyi jel elektroforezi işlemi

Proteinlerin membrana transferi:

- Jelde moleküler ağırlıklarına göre ayrıışan proteinlerin nitrosellüloz membrana transferi için ıslak transfer modülü (BIO-RAD, Mini protean system, Hercules, CA, USA) kullanıldı.
- Transfer modülüne yerleştirilecek kasetin aparatları, süngerler ve filtre kağıtları hazır transfer tamponu (Cell Signaling Technology Inc. 12539S) içinde ıslatıldı.
- 0,2 μm 'lik Nitrosellüloz membran (10600043, GE Healthcare Life Sciences, Germany) 5 dk kadar distile su içinde bekletildi.
- Elektroforez işlemi tamamlanınca cam plakalar distile sudan geçirildi. Cam plakalar ayırıcı aparat ile açıldı ve jel dikkatlice çıkarılıp transfer tamponu içine alındı.
- Transfer kasedi, artı kutuptan eksi kutba doğru sırasıyla; sünger, filtre kağıdı, membran, jel, filtre kağıdı, sünger olacak şekilde hazırlandıktan sonra kasetler transfer modülüne yerleştirildi.
- Tank uygun miktarda transfer tamponu ile dolduruldu.
- Güç kaynağı sabit 250 mA ve 2 saat süreye ayarlandı.
- Transfer işlemi ile jelden membrana proteinlerin transferi sağlandı (Şekil 3.2.4).



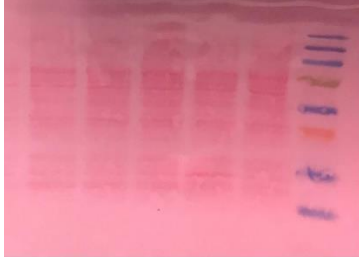
Şekil 3.2.4: Western blot deneyi jelden membrana transfer işlemi

Membranın Boyanması:

- Membran boyanmasında total protein özütünde mevcut olan tüm proteinlerin işaretlenmesi için kullanılan anyonik boyalardan biri olan

Ponceau red boyası kullanılmıştır. Bu boya ile proteinler geri dönüşümlü olarak boyanır.

- Membran, % 0,1'ik Ponceau staining solüsyonu ile 5 dk çalkalandığında yüzeyde pembe-kırmızı renkte protein bantları gözlenmiştir (Şekil 3.2.5).
- Membran aranan proteinin molekül ağırlığına bağlı olarak uygun boyutlarda kesildi.
- Boyanın membrandan uzaklaşması için yıkama tamponu (TBST, Cell Signaling Technology Inc. 9997S) kullanıldı.
- Membran yıkama tamponu ile 3 kez, 5'er dk yıkandı ve böylece boyanın membrandan uzaklaşması sağlandı.



Şekil 3.2.5: Western blot deneyi transfer kontrolü için membranın ponceau red boyası ile boyanması

Bloklama ve antikor yükleme:

- Hedef protein için membranlar üzerindeki non-spesifik bağlanma bölgelerinin engellenmesi için membranlar, %3'lük BSA ile hazırlanan bloklama tamponu içine alındı ve oda sıcaklığında 2 saat çalkalayıcı (Mini Rocker MR-1, BOECO) üzerinde inkübe edildi.
- Bloklama işleminden sonra membranlar yıkama tamponu ile 3 kez, 5'er dk yıkandı.
- Hedef proteinler için seçilen primer antikorların (LRP-1, β -aktin) uygun dilüsyonları (1:1000 ve 1:650) % 3'lük BSA ile hazırlandı. Membranlar primer antikorlar ile +4 °C'de çalkalayıcı üzerinde gece boyunca inkübe edildi.

- Primer antikorlarla inkübasyon işleminden sonra membranlar yıkama tamponu (TBST) ile 3 kez, 5'er dk yıkandı.
- Sekonder antikor HRP (horseradish peroxidase)-konjuge, % 3'lük BSA ile hazırlanan antikor tamponuyla uygun oranda dilüe edildi (1:10000) ve membranlar oda sıcaklığında, 2 saat boyunca sekonder antikor ile inkübe edildi.
- Sekonder antikorlarla inkübasyon işleminden sonra membranlar yıkama tamponu ile 3 kez, 5'er dk yıkandı.

Görüntüleme ve analiz:

- Hedef protein bantlarının görünür hale getirilmesi için kemilüminesans kit (Pierce™ ECL Western Blotting Substrate, Biovision Inc. K820-500) kullanıldı. Kit içinde bulunan iki tampon çözelti 1:1 oranında karıştırılarak hazırlandı.
- Membran yüzeyi bu karışım ile kaplandı ve kısa süreli inkübe edildi.
- Karanlık odada hızlıca görüntüleme sistemi (Kodak Gel Logic, 2200 Pro) kullanılarak hedef protein bantları görüntülendi.
- Bant yoğunluklarının hesaplanmasında Image J (Windows version of NIH image) programı kullanıldı.
- Hedef proteinlerin bant yoğunlukları yükleme kontrolü olarak seçilen β -aktine oranlanarak hesaplandı.

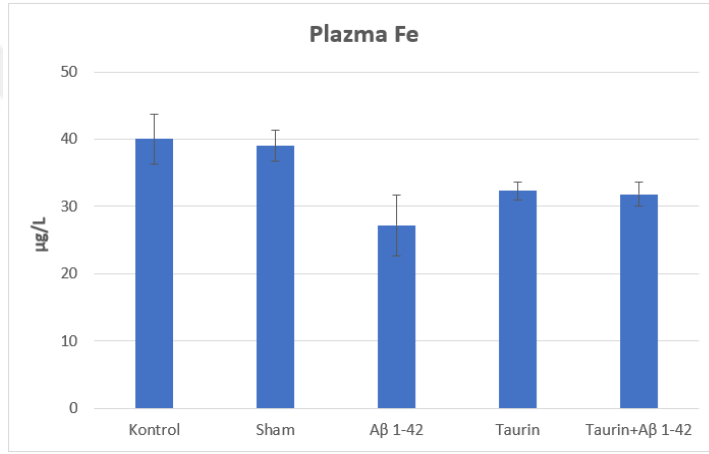
3.2.7. İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi için Kruskal Wallis testi ve sonrasında post-hoc Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanılmış, $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Plazma Metal Katyon (Fe, Cu, Zn, Mn) Düzeyleri

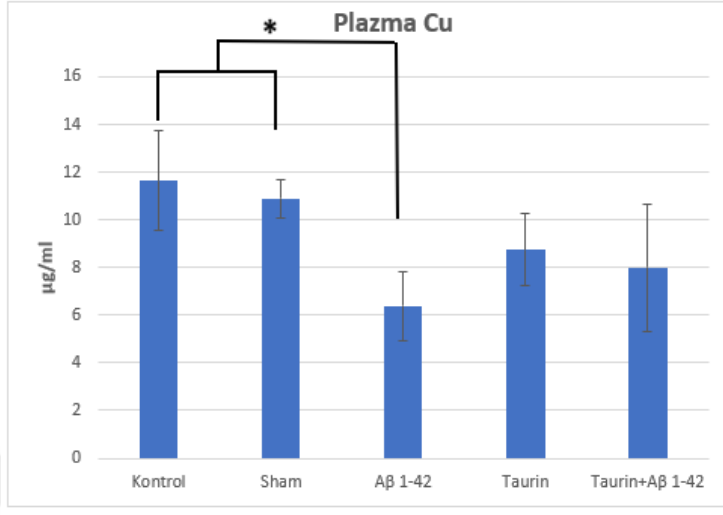
Plazma demir düzeyleri A β 1-42 grubunda azalmış olmakla beraber bu azalma istatistiksel olarak anlamlı farklılığa erişmemiştir ($p>0.05$). İsv A β 1-42 uygulaması plazma demir düzeyini düşürmüş, taurin ön takviyesi ise bu düşüşü bir miktar normal düzeye getirmiş gibi görünmektedir (Şekil 4.1.1).



Şekil 4.1.1: Plazma demir düzeyleri

Plazma bakır düzeyleri A β 1-42 grubunda kontrol ve sham gruplarına göre anlamlı olarak ($p<0.05$) daha düşük saptanmıştır (Şekil 4.1.2).

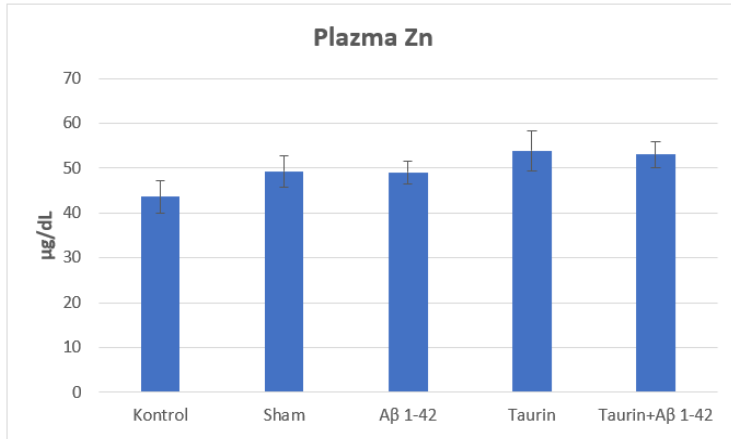
A β 1-42 enjeksiyonu deney hayvanlarında plazma bakırını azaltıcı etki göstermiştir. Taurin uygulaması ise bu azalmayı bir miktar normal düzeye getirmiş olsa da Taurin + A β 1-42 grubundaki plazma bakır düzeyi ile A β 1-42 grubunun plazma bakır düzeyi arasında istatistiksel olarak fark saptanmamıştır ($p>0.05$). Deneysel Alzheimer hastalığı modelinde plazma bakır düzeyinin değişmiş olması metal katyonlar ile Alzheimer hastalığı gelişimi arasında bir ilişki olduğunu doğrular niteliktedir.



Şekil 4.1.2: Plazma bakır düzeyleri

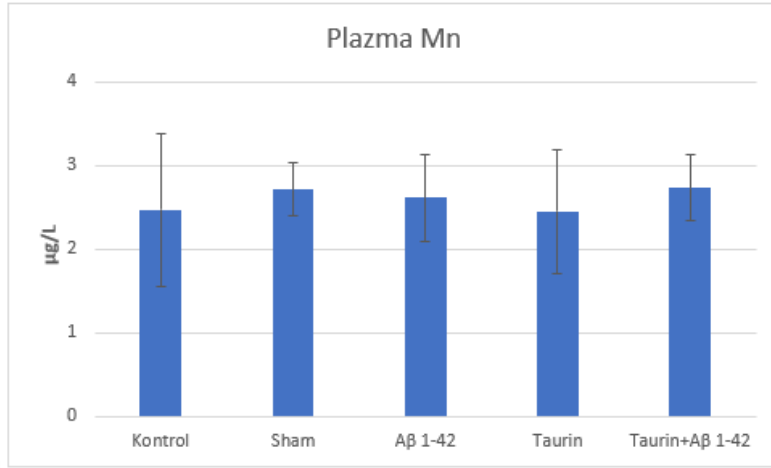
* $p < 0.05$

Plazma çinko düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel fark bulunmamıştır ($p > 0.05$) (Şekil 4.1.3).



Şekil 4.1.3: Plazma çinko düzeyleri

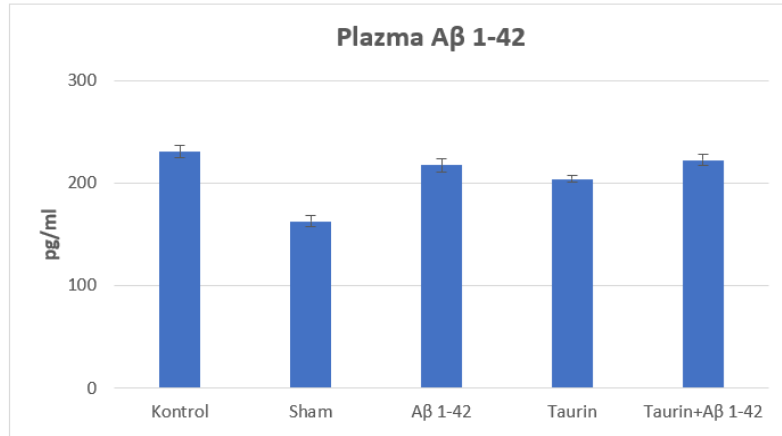
Plazma mangan düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel fark bulunmamıştır ($p > 0.05$) (Şekil 4.1.4).



Şekil 4.1.4: Plazma mangan düzeyleri

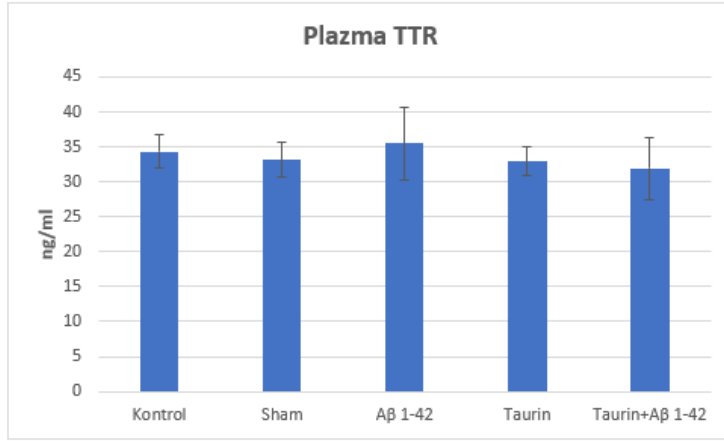
4.2. Plazma Aβ 1-42 ve TTR Düzeyleri

Plazma Aβ 1-42 düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.1.5).



Şekil 4.1.5: Plazma Aβ 1-42 düzeyleri

Plazma TTR düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.1.6).



Şekil 4.1.6: Plazma TTR düzeyleri

Tablo 4.1: Grupların plazma bulguları

PLAZMA					
	Kontrol	Sham	Aβ1-42	Taurin	Taurin+Aβ1-42
Demir µg/L	40.02±3.72	39±2.28	27.20±4.55	32.30±1.32	31.81±1.79
Bakır µg/dL	11.66±2.10	10.89±0.82	6.39±1.43 #&	8.75±1.51	8±2.68
Çinko µg/dL	43.57±3.62	49.33±3.51	49±2.61	53.83±4.40	53±2.82
Mangan µg/L	2.47±0.92	2.72±0.31	2.62±0.52	2.45±0.74	2.73±0.40
Aβ1-42 pg/mL	230.58±6.13	162.88±5.41	217.29±6.63	204.06±3.23	222.28±5.53
TTR ng/mL	34.33±2.33	33.15±2.53	35.53±5.19	32.89±2.07	31.90±4.40

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

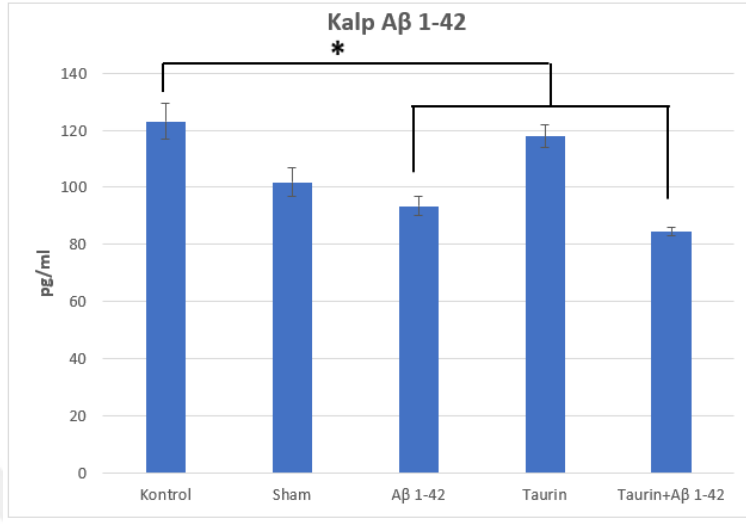
Kontrol grubuna göre anlamlı farkı ifade etmektedir ($p<0.05$).

& Sham grubuna göre anlamlı farkı ifade etmektedir ($p<0.05$).

4.3. Kalp Aβ 1-42 ve TTR Düzeyleri

Kalp Aβ 1-42 düzeyleri; Aβ 1-42 grubunda ve Taurin + Aβ 1-42 grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ($p<0.05$). (Şekil 4.1.7)

Periferik bir organ olan kalpte Aβ 1-42 düzeyi Alzheimer hastalığı modeli oluşturulan grupta daha düşük tespit edilmiştir. Alzheimer hastalığı modelinde amiloid birikiminin merkezi dokularda yoğunlaşması nedeniyle Aβ 1-42 düzeyinin kalpte azalması olasıdır. İsv Aβ 1-42 enjeksiyonu yapılan Taurin + Aβ 1-42 grubunda da bu azalmanın görülmesi bu düşüncüyü desteklemektedir.

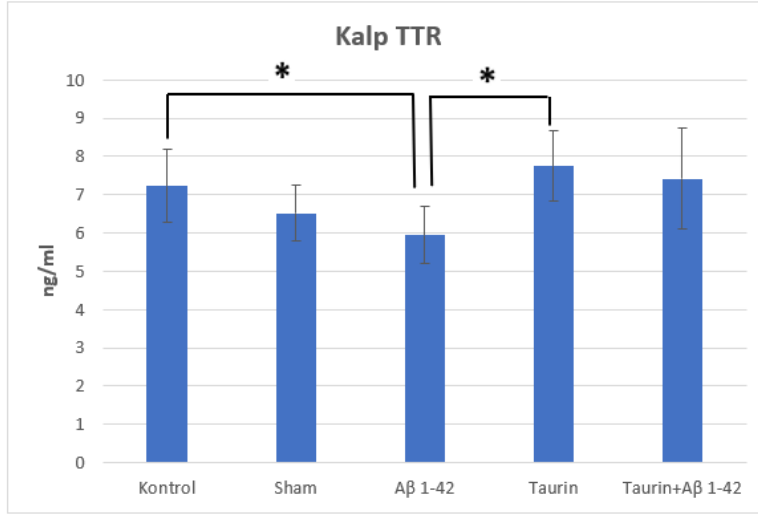


Şekil 4.1.7: Kalp dokusu Aβ 1-42 düzeyleri

* $p < 0.05$

Kalp TTR düzeyleri; Aβ 1-42 grubunda kontrol ve taurin grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ($p < 0.05$). Kalp dokusunda TTR düzeyi Aβ 1-42 enjeksiyonu ile Alzheimer hastalığı modeli oluşturulan grupta daha düşük tespit edilmiştir (Şekil 4.1.8).

Aβ 1-42'nin taşınmasına aracılık eden TTR'nin Alzheimer hastalığı modelinde kullanımının artmasıyla kalp dokusunda düzeyi azalmış gibi görünmektedir.



Şekil 4.1.8: Kalp dokusu TTR düzeyleri

* $p < 0.05$

Tablo 4.2: Grupların kalp dokusu bulguları

KALP					
	Kontrol	Sham	Aβ1-42	Taurin	Taurin+Aβ1-42
Aβ1-42 pg/mL	123.09±6.31	101.70±5.01	93.40±3.32 #	117.89±4.05	84.47±1.34 #
TTR ng/mL	7.22±0.95	6.50±0.72	5.95±0.76 #▲	7.74±0.91	7.40±1.32

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

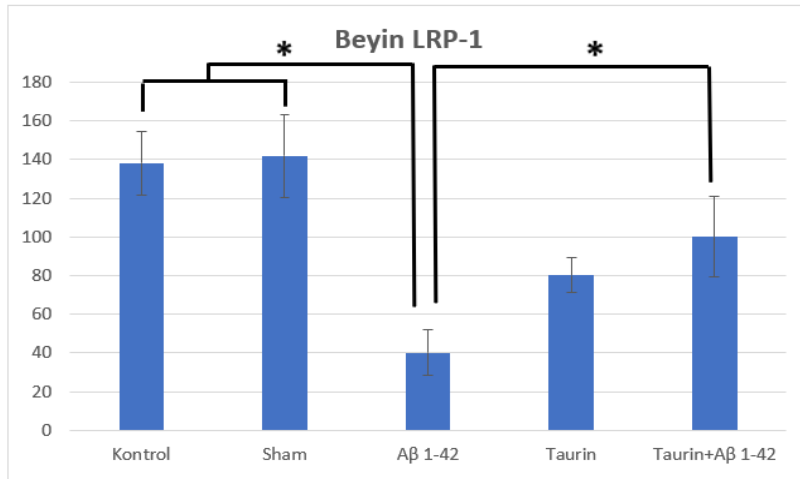
Kontrol grubuna göre anlamlı farkı ifade etmektedir ($p < 0.05$).

▲ Taurin grubuna göre anlamlı farkı ifade etmektedir ($p < 0.05$).

4.4. Beyin LRP-1 Düzeyleri

Western blot analizi ile elde edilen sonuçlara göre total beyin dokusunda LRP-1 düzeyi A β 1-42 grubunda kontrol, sham ve Taurin + A β 1-42 grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ($p < 0.05$) (Şekil 4.1.9).

A β 1-42 grubundaki LRP-1 düzeyleri, literatürdeki LRP-1 düzey düşüklüğü ile Alzheimer hastalığı ilişkisini doğrular niteliktedir. Taurin + A β 1-42 grubunda A β 1-42 grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek LRP-1 düzeyleri olması, taurin ön takviyesinin olumlu etkisini göstermektedir. Taurin, Alzheimer hastalığı modelinde LRP-1 düzeylerini artırıcı etki göstermiştir.



Şekil 4.1.9: Western blot yöntemiyle elde edilen total beyin LRP-1 düzeyleri

Bant yoğunlukları yükleme kontrolü olan β -aktine oranlanarak (LRP-1/ β -aktin) standardize edilmiştir.

* $p < 0.05$

Tablo 4.3: Grupların total beyin dokusu bulguları

BEYİN					
	Kontrol	Sham	Aβ1-42	Taurin	Taurin+Aβ1-42
LRP-1/ β-aktin	138.03 $\pm$ 6.60	141.82 $\pm$ 4.02	40.10 $\pm$ 1.79 #& Δ	79.97 $\pm$ 1.42	100.14 $\pm$ 3.49

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

Kontrol grubuna göre anlamlı farkı ifade etmektedir (p<0.05).

& Sham grubuna göre anlamlı farkı ifade etmektedir (p<0.05).

Δ Taurin + A β 1-42 grubuna göre anlamlı farkı ifade etmektedir (p<0.05).

5. TARTIŞMA

Günümüzde en büyük sağlık problemlerinden biri olan Alzheimer hastalığında halen tanı, tedavi ve korunmada kesin kriterler ortaya konamamıştır. Literatürde yer alan birçok çalışma bu kriterleri belirlemeye yöneliktir. Özellikle tanı aşamasında invaziv olmayan yöntemlerle ölçülebilecek kan bazlı bir biyobelirteç belirlenmesi konusunda gittikçe artan sayıda çalışma yapılmaktadır. Alzheimer hastalarında ve deneysel Alzheimer hastalığı modellerinde plazma metal katyon düzeyleri, plazma A β 1-42 düzeyleri ve plazma TTR düzeyleri olası biyobelirteçler olarak değerlendirilmektedir (53,69,70).

Bu çalışmamızda isv A β 1-42 enjeksiyonu ile sıçanlarda oluşturduğumuz deneysel Alzheimer hastalığı modelinde plazma metal katyon (demir, bakır, çinko, mangan) düzeyleri ile plazma TTR ve plazma A β 1-42 düzeylerini belirlemek ve bu parametreler üzerinde 6 hafta süreyle ve 1000 mg/kg/gün dozda uyguladığımız taurin ön takviyesinin etkilerini araştırmak amaçlanmıştır.

Çalışmamızda plazma düzeylerinin yanı sıra, kalp dokusunda da TTR ve A β 1-42 düzeyi tayinleri ile Alzheimer hastalığı modelinde bu biyobelirteçlerin kalpte de değişip değişmediği ve taurin uygulamasının bu düzeyler üzerinde bir etkisinin olup olmadığı belirlenmek istenmiştir.

Son olarak da Alzheimer hastalığında beyinden perifere TTR aracılı A β 1-42 taşınmasında rolü olduğu bilinen LRP-1 protein düzeylerinin total beyin dokusunda tayini ile taurin ön takviyesinin bu protein düzeyleri üzerinde etkisi hakkında da fikir sahibi olmak istenmiştir.

Alzheimer hastalarında plazma ve idrar metal katyon düzeylerinde kontrol gruplarına göre değişiklikler olduğu saptanmıştır (12). 336 sağlıklı kontrol, 385 Alzheimer hastası ve 9 Wilson hastası ile yapılan bir çalışmada plazma bakır düzeyi Alzheimer hastalarında Wilson hastalarına benzer şekilde daha yüksek bulunmuştur. Bu bulgu Alzheimer hastalığında bakır homeostazında bozulmanın göstergesi olarak yorumlanmıştır. Aynı çalışmada 24 saatlik idrar ölçümünde sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında Alzheimer hastalarında idrar bakır atılımı daha fazla bulunmuştur (12).

Literatürde Alzheimer hastalarında plazma bakır düzeyleri yanı sıra çinko ve demir düzeylerinde değişiklikler tespit eden çalışmalar da bulunmaktadır (69,71). 50 Alzheimer hastası ve 50 sağlıklı kontrol ile yapılan bir çalışmada plazma demir, bakır ve çinko seviyeleri Alzheimer hastalarında anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Metal iyonlardaki bu düzey değişikliklerinin Alzheimer hastalığında enzimatik süreçleri etkileyebileceği vurgulanmıştır (69). Bu çalışmada ayrıca metal katyonların kofaktör olarak rol aldığı antioksidan enzimler olan superoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz ve katalaz düzeyleri de ölçülmüş ve

Alzheimer hastalarında daha düşük bulunmuştur. Antioksidan süreçlerde rol alan enzimlerin yapısına katılan metal katyon seviyelerinin Alzheimer hastalığında azalabileceği belirtilmektedir (69).

Oksidatif stresin ön planda olduğu Alzheimer hastalığında taurin antioksidan etkisiyle iyileştirici etkiler göstermektedir (62). Taurinin kronik uygulanmasının Alzheimer hastalığı modeli oluşturulmuş deney hayvanlarında hipokampus bağımlı bilişsel bozulmayı önemli ölçüde iyileştirdiği gösterilmiştir (62). Bölümümüzde daha önce yapılan bir çalışmada isv A β 1-42 enjeksiyonu ile Alzheimer hastalığı modeli oluşturulan sıçanlarda uzaysal öğrenmenin ve hafızanın bozulduğu morris su tankı testi ile gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada A β 1-42 enjekte edilen grupta korteks ve hipokampus Malondialdehit (MDA) seviyeleri yüksek bulunurken korteks Katalaz ve hipokampus Glutasyon (GSH) seviyeleri düşük bulunmuştur. Taurin grubunda ise GSH anlamlı olarak daha yüksek tespit edilmiştir. Taurin antioksidan kapasiteyi artırıcı etki göstermiştir (4).

Metal katyonlar ile Alzheimer hastalığı ilişkisi henüz tam olarak bilinmemekle beraber literatürdeki bazı çalışmalarda A β klirensinde görev aldığı düşünülen TTR'nin etkinliğinin metal katyonların varlığında değiştiği gösterilmiştir. TTR in-vitro ortamda bu metal katyonlara maruz bırakıldığında A β 'a bağlanma afinitesi artmakta, hatta A β 'ı perifere taşımanın yanında onu temizleyebilen bir proteaz görevi yapmaktadır (63).

Alzheimer hastalığında senil plakların yüksek oranda bakır, demir ve çinko içerdiği ve bu iyonların A β birikimini tetikleyebileceği belirtilmektedir (63). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda deneysel Alzheimer hastalığı modelinde plazma metal katyon (demir, bakır, çinko, mangan) düzeyleri ölçülmüştür.

Çalışmamızda plazma demir, çinko ve mangan düzeylerinde gruplar arasında herhangi bir anlamlı değişiklik saptanmamıştır ($p>0.05$). Bulgularımızda plazma demirinin deneysel Alzheimer hastalığı modeli oluşturulan grupta daha düşük olduğu dikkat çekmektedir. Ancak bu düzey düşüklüğü istatistiksel anlamlılığa erişmemiştir ($p>0.05$).

Plazma çinko düşüklüğünün enfeksiyon, kanser veya inflamasyon durumlarında olabileceği ve Alzheimer hastalığında da inflamasyon ve oksidatif stres artışı nedeniyle plazma çinko düzeyinin düşük beklendiği belirtilmektedir (71).

Literatürde Alzheimer hastalığı olan insanlarda veya Alzheimer hastalığı modeli oluşturulan deney hayvanlarında plazma çinko düzeylerinde (72,73), plazma demir düzeylerinde (72) ve plazma mangan düzeylerinde (72) anlamlı değişiklik saptanmayan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. 26 Alzheimer hastası ve 28 sağlıklı kontrol ile yapılan bir çalışmada hem beyin omurilik sıvısı hem de plazma çinko, demir ve mangan düzeyleri ölçülmüştür. Plazma çinko, demir ve mangan düzeyleri Alzheimer hastalarında anlamlı farklılık göstermemiştir (72).

Bir çalışmada hafif-orta kliniğe sahip 18 Alzheimer hastası, 19 hafif bilişsel bozukluğu olan hasta ve 16 kontrol arasında plazma çinko düzeyleri karşılaştırılmıştır. Ancak bu gruplar arasında plazma çinko düzeyleri açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır (73).

Plazma metal katyon düzeylerinde anlamlı fark tespit edilen ve edilmeyen çalışmalarda farklı sonuçların nedeni olarak öncelikle bu iyonların Alzheimer hastalığındaki rolünün tam olarak anlaşılamamış olması vurgulanmaktadır (73,74).

Beyin ve plazma metal katyon seviyeleri ile Alzheimer hastalığı gelişimi arasında bir bağlantı olduğuna dair kanıtlar olsa da muhtemelen ilgili yolların karmaşıklığından dolayı epidemiyolojik ilişki kesin olarak ortaya konulamamıştır. Metallerin nörodejenerasyonu etkilediği mekanizmalar olmasına rağmen bugüne kadar yapılan çalışmaların çoğu A β ve metal iyonları arasındaki etkileşime odaklanmıştır. Muhtemelen Alzheimer hastalığı ile metal iyonlar arasında ortak enzimatik süreçler nedeniyle bir etkilenim söz konusudur. Ancak henüz moleküler temeller açıklığa kavuşturulamamıştır (74).

Plazma metal katyon düzeylerinde değişiklik bulunması bazı lokal faktörlere bağlı gibi görünmektedir. Özellikle hastaların plazma metal iyon düzeyi ölçüldüğünde Alzheimer hastalığı şiddetinin ve başlangıcından itibaren geçen zamanın önemli olması olasıdır.

Literatürde plazma demir, çinko ve mangan düzeylerinde anlamlı fark tespit etmeyen çalışmalar olduğu gibi Alzheimer hastalarında bu metallerin plazma düzeylerinde anlamlı fark tespit eden çalışmalar da bulunmaktadır (69,71,75). Metal iyon fonksiyon bozukluğunun bu iyonların kan beyin bariyerinden geçişini bozacağı belirtilmektedir. Sonuç olarak beyinde birikerek hasara neden olan metal iyonların Alzheimer hastalığı gelişiminde ve ilerlemesinde etkili olabileceği vurgulanmaktadır (75).

Metal katyonlar ile Alzheimer hastalığının ilişkisinin anlaşılmasını zorlaştıran faktörlerden biri de hiç şüphesiz Alzheimer hastalığı gelişimine yol açan yolların henüz tam olarak aydınlatılamamış olmasıdır. Ancak literatürdeki çalışmalar Alzheimer hastalığı ile metal iyonlar arasında kesin bir ilişkinin olduğunu göstermektedir. Alzheimer hastalarının beyindeki metal iyonların yanlış lokalizasyonu, hastalığın gelişiminde metallerin fazlalığı veya eksikliğinden daha önemli bir rol oynuyor gibi görünmektedir (74). Merkezi sinir sistemindeki amiloid plaklarda metal iyonların birikiminin gösterilmesi de bu ilişkiyi doğrular niteliktedir.

Metal iyon homeostazının düzeltilerek Alzheimer hastalığının tedavisinin gerçekleştirilebilmesi veya plazma ve idrar metal iyon değişiklikleri ile Alzheimer hastalığının erken tanısının konulabilmesi gelecekteki hedefler arasındadır.

Çalışmamızda A β 1-42 enjeksiyonu ile oluşturulan Alzheimer hastalığı modeli grubunda plazma bakır düzeyleri kontrol ve sham gruplarına göre anlamlı olarak düşük tespit edilmiştir ($p<0.05$). A β 1-42 enjeksiyonu deney hayvanlarında plazma bakırını azaltıcı etki göstermiştir. Taurin tedavisi ise bu azalmayı bir miktar normal düzeye getirmiş olsa da Taurin + A β 1-42 grubundaki plazma bakır düzeyi ile A β 1-42 grubundaki plazma bakır düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0.05$).

Son yıllarda metal düzey değişiklikleri ile Alzheimer hastalığı ilişkisi yakından takip edilmektedir. Plazma düzeylerinin olası bir biyobelirteç olarak kullanılma ihtimali olması bu çalışmalara hız kazandırmıştır.

Literatürde plazma bakırını ölçen çalışmalarda sonuçlar Alzheimer hastalarındaki ölçümler ve deneysel Alzheimer hastalığı modeli oluşturulan hayvanlardaki ölçümler şeklindedir. Literatürde genel olarak Alzheimer hastalarında plazma bakır düzeyi analizlerinde kontrol grubuna göre daha yüksek değerler elde edilmiştir (76,77). 50 Alzheimer hastası, 24 vasküler demans hastası ve 30 sağlıklı kontrol ile yapılan bir çalışmada plazma bakır düzeyleri Alzheimer hastalarında ve vasküler demans grubunda anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (76). Oksidatif stresin periferik belirteci olarak kullanılabilen plazma bakırını Alzheimer hastalığında yüksek bulan bir çalışma, bakır toksisitesinin A β kümelenmesine katkıda bulunduğunu belirtmektedir (76). 79 Alzheimer hastası ve 76 sağlıklı kontrol ile yapılan başka bir çalışmada plazma bakır Alzheimer hastalığı grubunda yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada Alzheimer hastalığının karakteristiği olan senil plaklarda ve nörofibriler yumaklarda bakır birikimi vurgulanmakta ve bakırın oksidatif süreçlerdeki rolü belirtilmektedir (77). Bu metallerle ilgili en önemli olan konu dengedir ve dengenin iki yöne de bozulması hastalıklar ile ilişkili gibi görünmektedir.

Literatürde plazma bakırını Alzheimer hastalarında düşük bulan bir çalışmada ise SOD gibi antioksidan enzimlerin yapısına katılan bakırın düzeyinin düşebileceği vurgulanmıştır (69).

Alzheimer hastalarındaki çalışmalar göz önüne alındığında plazma bakır bilişsel bozulma arttıkça yükselme eğilimi gösterirken, demir ve çinko hastalığın ilerlemesiyle düşme eğilimi gösterir. Araştırmalara göre Alzheimer hastalığındaki metal iyon dengesizlikleri esas olarak metallerin değişmiş dengesi ve bunların kan beyin bariyerinden geçişi ile beyne alınması, sonrasında da beyinde oksidatif süreçler ve glikoz metabolizmasında bozukluklara yol açmasıyla ilişkili gibi görünmektedir (75).

Demir, bakır, çinko, mangan gibi metaller, hafif bilişsel bozukluktan Alzheimer hastalığına kadarki süreçte ve Alzheimer hastalığının ilerleme süreçleri boyunca nörodejenerasyonun ilerlemesi ile düzeylerinde değişiklikler gösterirler. Nörodejenerasyon sürecindeki bu düzey değişikliklerinin bilişsel bozukluklar ile

ilişkili olabileceği düşünülmüştür (75). Bu nedenle plazma metal katyon düzeylerinin deneysel modellerde Alzheimer hastalığının gelişimi ve şiddetine göre belirli zaman aralıklarında ölçümünün yapılabileceği çalışmalara ihtiyaç vardır.

Demir, bakır, çinko ve mangan, diğer birçok eser element gibi kan beyin bariyerini rahatlıkla geçebilmektedir. Metaller bu geçiş esnasında genel olarak çeşitli reseptörleri ve taşıyıcıları kullanmaktadır ancak bazılarının geçiş mekanizmaları henüz netleşmemiştir. Metal iyonlarının kan-beyin bariyerini geçiş özellikleri (78–80) Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif süreçlerde sıklıkla araştırılmaktadır (80).

Günümüzde Alzheimer hastalığı tedavisi için onayı bulunan asetilkolin esterase inhibitörlerinin çeşitli yollarla etki ettiği gösterilmiştir. Bunlardan bir tanesi de metal katyon düzeyleridir. Bu ilaçlar bakır ve çinko metabolizmasını değiştirebilmektedir. Tedavi amacı ile asetilkolin esterase inhibitörü kullanan Alzheimer hastalarında daha önce bu tedaviyi almamış hastalara göre yüksek plazma çinko ve düşük plazma bakır değerleri tespit edilmiştir. Aynı zamanda asetilkolin esterase inhibitörlerinin beyin amiloid plak yükünü azaltabileceğine dair çalışmalar vardır. Beyin amiloid plaklarının da metal iyonlarını içerdiği bilinmektedir (64,65). Bu nedenle asetilkolin esterase inhibitörleri ile metal iyon düzey değişiklikleri ilişkili görünmektedir.

Transgenik fare modeli ile yapılan bir çalışmada beyin amiloid plaklarının bakır içerdiği ve bakırın bu plaklarda birikerek plazmada azalabileceği hipotezi ile Alzheimer hastalığı transgenik fare modelinde ve kontrol grubunda beyin ve plazma bakır düzeyleri ölçülmüştür. Sonuçlar istatistiksel anlamlılığa erişmemiş olsa bile 3,6,9 ve 12. aylarda yapılan ölçümlerde plazma bakır düzeyi kontrol grubuna göre düşme eğilimi göstermiştir (81). Ayrıca bu çalışmada fare plazma bakır izotopu ile insan plazma bakır izotopu arasında farklılık olabileceği ve parametrelerin insana bakır izotopu benzerliği açısından gelişimsel olarak daha yakın olan deney hayvanlarında tekrarlanmasının faydalı olacağı belirtilmiştir (81). Aβ plaklarının oluşumunun beyinde serbest bakır üretimini artırdığı ve bu nedenle oksidatif hasarı indüklediği bilinmektedir. Beyin amiloid plaklarındaki bakır artışının plak dışı beyin dokusunda bakırın azalmasına neden olabileceği savunulmaktadır (81,82).

Ayrıca bakır, superoksit dismutaz gibi antioksidan savunma mekanizmasına katılmaktadır. Alzheimer hastalarının beyinde artan oksidatif stres etkisiyle kullanılan antioksidan mekanizmalar ile de beyin bakırının tükendiği savunulmaktadır (82).

Çalışmamızda Aβ 1-42 enjeksiyonu ile Alzheimer hastalığı modeli oluşturulan sıçanlarda beyin amiloid plak oluşumunun indüklendiğini ve bu

plaklarda bakır birikmesi nedeniyle plazma bakırının düşük tespit edildiğini düşünmekteyiz.

Taurin ön takviyesi Alzheimer hastalığı deney modeli grubunda plazma bakır düzeyindeki azalmayı bir miktar artırsa da Taurin + A β 1-42 grubunun plazma bakır düzeyi ile A β 1-42 grubunun plazma bakır düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0.05$). Taurin uygulanan grupların plazma bakır düzeyinin kontrol grubuyla benzer olması, taurinin plazma bakır iyon dengesizliği konusunda olumlu etki yapabileceğini düşündürmektedir.

Plazma A β 1-42 düzeyi de Alzheimer hastalığı için olası bir biyobelirteç olarak değerlendirilmektedir. Erken tanı konulması için saptanması kolay bir biyobelirteç bulunması, hastaların daha iyi klinik seyrinde olduğu erken evrelerde yakalanmasını sağlayabilecektir. Plazma bazlı biyobelirteçlerin avantajı ise biyopsi ya da lomber ponksiyon gibi invaziv işlemler gerektirmeden tanı olanağı sağlamasıdır. Alzheimer hastalığı gelişiminde en kabul gören yaklaşım olan amiloid kaskad hipotezi doğrultusunda BOS A β 1-42 düzeyi, BOS A β 1-42 / toplam tau oranı ve ayrıca BOS tau proteini düzeyi ölçümleri Alzheimer hastalığı tanısı koymak amacıyla denetlenmektedir. Bu biyobelirteçler için hem örnek alımı göreceli olarak zor olmakta hem de tek bir parametre için yeterli özgüllük ve duyarlılık sağlanamamaktadır. Bu parametrelerden birkaçının birlikte kullanımının yeterli özgüllük ve duyarlılık düzeyine erişebileceği ifade edilmektedir (83).

Alzheimer hastalığı biyobelirteci olarak plazma A β 1-42 düzeyi ve plazma A β 1-42 / A β 1-40 oranı yine ölçülen parametreler arasındadır. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda plazma A β 1-42 düzeyi ölçülmüştür. Çalışmamızda plazma A β 1-42 düzeyi gruplar arasında anlamlı farklılığa erişmemiştir ($p>0.05$).

Literatürde bu konuda yapılan bazı çalışmalarda plazma A β 1-42 düzeyinin Alzheimer hastalarında arttığı gösterilmiştir (70,84). Diğer bir grup çalışmada ise Alzheimer hastalarında ve Alzheimer hastalığı modeli deney grubunda plazma A β 1-42 düzeyi açısından herhangi bir değişiklik bulunmamıştır (85,86). Literatürde bazı çalışmalarda plazma A β 1-42 düzeyinin ve plazma A β 1-42 / A β 1-40 oranının beyin A β yükü ve BOS A β 1-42 düzeyi ile korele olduğu bulunmuştur. Ayrıca plazma A β 1-42 düzeyinin ICP-MS kütle spektrometrisi ile değerlendirilmesinin daha doğru sonuçlar verebileceği vurgulanmaktadır (70). Bazı çalışmalarda Alzheimer hastalarında BOS A β 1-42 düzeylerinde artış tespit edilmiş, ancak bunun plazma A β 1-42 düzeyi ile korelasyon göstermediği vurgulanmıştır (85,86).

Alzheimer hastalığı bulunmayan sağlıklı yaşlılarda da plazma A β 1-42 düzeyinin yaş ile arttığı tespit edilmiştir (87).

Ayrıca ilginç bir şekilde bazı çalışmalarda düşük plazma A β 1-42 düzeyinin Alzheimer hastalığı gelişimi için bir risk faktörü olduğu tespit edilmiştir (88). Bir

çalışmada da sağlıklı yaşı insanlarda düşük plazma A β 1-42 düzeyinin hafif bilişsel bozukluk ve Alzheimer hastalığı için risk faktörü olabileceği vurgulanmıştır (88). Bu konudaki ilk düşüncelerde Alzheimer hastalarında plazma ve BOS A β 1-42 düzeylerinin yüksek olması beklenmiştir. Ancak düşük plazma ve BOS A β 1-42 düzeyinin Alzheimer hastalığı için risk faktörü olduğunu belirten çalışmalarda beyinde meydana gelen A β formlarının kümelenmesinin BOS ve plazmada A β 1-42 seviyelerini düşürdüğü öne sürülmektedir (88).

Literatürde Alzheimer hastalığında plazma A β 1-42 seviyeleri değişimi için farklı sonuçlar bulan çalışmalar bulunmaktadır. Plazma A β 1-42 düzeyini sağlıklı yaşlılarda, Alzheimer hastalığı gelişiminden önce, hafif bilişsel bozukluk evresinde ve erken-orta-geç Alzheimer hastalığı evrelerinde inceleyebilecek daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Plazma TTR seviyelerinin ileri yaş ile düşmeye başladığı bilinmektedir (52). Literatürdeki çalışmalarda bilişsel bozukluğu olan Alzheimer hastalarında plazma TTR seviyelerinin kontrollerden anlamlı olarak daha düşük olduğu gösterilmiştir (7). Alzheimer hastalığındaki TTR düzeylerindeki değişiklik ilk olarak BOS örneklerinde çalışılmıştır. Alzheimer hastalarında BOS TTR düzeyleri kontrollere göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur (8). Alzheimer hastalığında TTR taşıyıcı proteininin BOS ve plazma düzeylerinin değişiklik göstermesi bu parametrenin erken tanı konulmasını sağlayabilecek bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği düşüncesini akla getirmiştir.

TTR, A β 'nın merkezi sinir sisteminden tek yönlü çıkışına aracılık etmektedir. TTR'nin Alzheimer hastalığı için önemi sadece A β taşıyıcısı olması değildir. Bunun yanı sıra hızlı ilerleyen ve yavaş ilerleyen Alzheimer hastalığı ayrımı yapabilecek prognostik bir belirteç olarak da düşünülmektedir. Plazma ve BOS TTR düzeyleri ne kadar düşük ise Alzheimer hastalığının da o kadar şiddetli olduğu belirtilmektedir (53).

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda isv A β 1-42 enjeksiyonu ile Alzheimer hastalığı modeli oluşturulan yaşlı sıçanlarda plazma TTR düzeylerini ölçerek literatüre katkı sağlamak amaçlanmıştır. Ancak gruplar arasında plazma TTR düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

Literatürdeki bir grup çalışmada da Alzheimer hastalarında kontrollere göre TTR seviyelerinde anlamlı fark saptanmamıştır. 59 Alzheimer hastası ve bunların sağlıklı kontrolleri ile yapılan bir çalışmada Alzheimer hastalığı grubunda beyin omurilik sıvısı TTR düzeylerinde anlamlı farklılık bulunmazken ilginç bir şekilde asetilkolin esterase inhibitörü tedavisi alan Alzheimer hastalarında almayanlara kıyasla BOS TTR düzeylerinin anlamlı olarak daha düşük olduğu tespit edilmiştir (89). Asetilkolin esterase inhibitörleri daha önce de belirtildiği üzere çeşitli yollarla etkileyebilmektedir. Metal katyon metabolizmasını değiştirebileceği gibi bu iyonlarla ilişkili olduğu düşünülen TTR düzeylerini de etkilemektedir.

Literatürde Alzheimer hastalığında TTR düzeyleri konusunda farklı sonuçlar bulan çalışmalar bulunmaktadır.

Çalışmamızda isv Aβ 1-42 uygulamasının ardından 2 hafta sonra anestezi altında kan ve doku alımı gerçekleştirilmiştir. Plazma TTR düzeylerinde gruplar arasında anlamlı fark saptanmamasının nedeni iki hafta sonra yapılan tek bir ölçüm ile bu süreçteki değişikliklerin tespit edilememiş olması olabilir.

Hayvanların feda edilip kan ve dokularının alındığı dönem plazma TTR gibi biyobelirteç olarak kullanılabilen parametrelerin henüz değişiklik göstermediği bir kompansement dönemi olabilir veya parametrelerin değişip daha sonra dengelendiği bir dönem yaşanmış olabilir. Bu nedenle belirli aralıklarla hayvanlardan kan alınarak plazma TTR düzeylerinin değerlendirilebileceği bir model ile değerlendirmek uygun olacaktır. Ayrıca TTR düzeylerinin BOS'ta da bakılarak değerlendirilmesi bulguların yorumlanması açısından fikir verici olacaktır.

Alzheimer hastalığında daha çok merkezi sinir sistemi hasarlarına yoğunlaşmaktadır. Ancak periferik organ tutulumları da görülmektedir. Alzheimer hastalarında normal kontrollere göre kalp patolojilerinin sıklığının arttığı bildirilmiştir. Kalp yetmezliği, koroner arter hastalığı, atriyal fibrilasyon ve vaskülopati gibi kalp hastalıklarının Alzheimer hastalığı ile ilişkili olduğu savunulmaktadır. Ayrıca periferik organların da Alzheimer hastalığından etkilendiği ve Alzheimer hastalarının otopsilerinde bu organlarda da amiloid birikiminin gözlemlendiği vurgulanmaktadır (90).

Kalp yetmezliği ile Alzheimer hastalığının ortak genetik patern olarak Apo E polimorfizmi gösterdiği belirtilmektedir. Kalp hastalıkları ile Alzheimer hastalığı ilişkisi ile ilgili olarak öne sürülen bir hipotez, özellikle kalp yetmezliğinde serebral perfüzyonun bozulması ile Alzheimer hastalığı gelişiminin indüklenmesidir (91). Literatürdeki çalışmalarda beyin kan akımının bozulmasına neden olarak kalp hastalıklarının Alzheimer hastalığı için bir risk faktörü olabileceği ve aynı zamanda Alzheimer hastalarının otopsilerinde kalp Aβ birikiminin gösterilmesiyle Alzheimer hastalığının da kalp hastalıkları için bir risk faktörü olabileceği vurgulanmaktadır (90,91).

Biz de bu nedenle çalışmamızda isv Aβ 1-42 enjeksiyonu ile Alzheimer hastalığı modeli oluşturulan yaşlı sıçanlarda kalp dokusunda Aβ 1-42 düzeylerine bakarak amiloid birikimi olup olmadığını görmek istedik.

Kalp Aβ 1-42 düzeyleri; Alzheimer hastalığı modeli grubunda ve Taurin + Aβ 1-42 grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ($p<0.05$).

Periferik bir organ olan kalpte A β 1-42 düzeyi Alzheimer hastalığı modeli oluşturulan grupta daha düşük tespit edilmiştir. Alzheimer hastalığı modelinde A β 1-42 birikimi temel olarak merkezi dokularda gerçekleşiyor gibi görünmektedir.

Alzheimer hastalarında süreç ile ilişkili olarak kalp A β 1-42 birikimi görülmekle birlikte Alzheimer hastalığı modeli oluşturulan deney hayvanlarında bu konuda yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bizim çalışmamızda kalp dokusunda A β 1-42 düzeyleri; Alzheimer hastalığı modeli grubunda ve Taurin + A β 1-42 grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ($p < 0.05$). Alzheimer hastalığı modeli oluşturmak için isv olarak enjekte edilen A β 1-42 muhtemelen beyinde amiloid plak oluşumunu başlatmıştır. Bu plak oluşumu sırasında santral A β 1-42 yükü artarken periferik dokularda azalmış gibi görünmektedir.

Beyinde A β amiloid plaklarda yoğun olarak birikmektedir (92). Plak dışı beyin dokusunda olduğu gibi periferde de başlangıçta düşük A β 1-42 düzeyleri beklenebilmektedir. Plazma A β 1-42 düzeyleri tartışılırken belirtildiği gibi Alzheimer hastalarında yüksek plazma A β 1-42 düzeyi beklenirken bazı çalışmalarda düşük bulunmuştur. Periferik A β 1-42 düzeylerinin Alzheimer hastalarındaki düşüklüğü beyinde amiloid plaklarda yoğun olarak A β birikimiyle açıklanmaktadır (88). Benzer bir mekanizma ile Alzheimer hastalığı modeli oluşturulmuş deney hayvanlarında kalp A β 1-42 düzeyinin kontrol grubuna göre bu nedenle düşük saptandığını düşünmekteyiz.

Kalp A β 1-42 düzeyleri; A β 1-42 grubunun yanı sıra Taurin + A β 1-42 grubunda da kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ($p < 0.05$). Taurin + A β 1-42 grubuna da isv A β 1-42 enjeksiyonu yapıldığı için bu grupta da beyin amiloid plak oluşumunun tetiklenmesiyle periferik A β 1-42 düzeyinin düşük tespit edildiğini düşünmekteyiz. Taurin ön takviyesi uygulanan grupta ise kalp A β 1-42 düzeyleri kontrol grubuyla benzer çıkmıştır. Taurin ön takviye grubunda beyinde amiloid plak birikimini tetikleyici bir faktör olmadığı için kontrol grubu ile benzer kalp A β 1-42 düzeylerine sahip gibi görünmektedir.

Bu bilgiler ışığında kalp A β 1-42 düzeylerinin Alzheimer hastalığı deney modeli oluşturulmuş hayvanlarda belirli aralıklarla ölçülmesini sağlayabilecek birkaç basamaktan oluşan bir deney modeli oluşturulması uygun olacaktır. Özellikle henüz preklinik evrede ve sonrasında erken-orta-geç Alzheimer hastalığı evrelerinde periferik A β 1-42 düzey ölçümü daha sağlıklı sonuç verecektir.

TTR, Alzheimer hastalığı için önleyici bir protein olarak düşünülürken aynı zamanda TTR ilişkili kalp amiloidozunda kalpte primer olarak biriken amilodogenik proteindir. Bu iki hastalıkta etkili olan TTR formu farklıdır. Alzheimer hastalığında koruyucu rolü ile ön plana çıkan TTR formu tetramer formudur. Kalp amiloidozunda amilodogenik protein olarak biriken form ise monomer formudur (10).

TTR ilişkili amiloidozda da Alzheimer hastalığı gibi kûratif bir tedavi bulunmamaktadır. Ayrıca TTR ilişkili kalp amiloidozu da Alzheimer hastalığı da ileri yaş ile sıklığı artan hastalıklardır (10).

Bu nedenler ile biz de çalışmamızda isv Aβ 1-42 enjeksiyonu ile Alzheimer hastalığı modeli oluşturduğumuz yaşlı sıçanlarda TTR'nin kalp dokusunda birikip birikmediğini görmek ve taurin ön takviyesinin kalp TTR düzeylerine etkisini incelemek istedik.

Literatürde taurin uygulamasının kalp amiloidozuna etkilerini inceleyen kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır.

20 hasta ile yapılan bir çalışmada 12 ay boyunca Doksisiklin ve TUDCA (Tauro Urso Deoksikolik asit) tedavisi oral olarak uygulandığında (hastalardan 17'si kalıtsal ATTR, 2'si yaşa bağlı ATTR ve 1 hasta da domino alıcısı olmak üzere) tedaviyi tamamlayan hastalarda 1 yıl boyunca TTR amiloidozuna bağlı kardiyak tutulumun ve nöropatinin ilerlemediği görülmüştür. Doksisiklin ve TUDCA kombinasyonunun TTR amiloid birikimini önlediği düşünülmektedir (16).

Yine Doksisiklin ve TUDCA kombinasyonunun ATTR'deki iyileştirici etkisini göstermek için yapılan başka bir çalışmada TTR birikiminin önlendiği ve bu kombinasyonun fibril bozucu olarak görev yaptığı gösterilmiştir. TUDCA'nın özellikle TTR'nin prefibriler formu üzerinde etkili olduğu gözlenmiştir. Antioksidan ve antiapoptotik özelliği iyi bilinen taurinin TTR birikimi nedeniyle hasar gören dokularda oksidan strese karşı da koruma sağlayabileceği düşünülmektedir (17).

Çalışmamızda kalp dokusu TTR düzeyleri; Aβ 1-42 grubunda kontrol ve taurin gruplarına göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ($p<0.05$).

Literatürde çeşitli çalışmalarda Alzheimer hastalarında ve Alzheimer hastalığı deney modelinde BOS ve plazma TTR düzeylerinde düşüklük tespit edilmiştir (7,8,53). Alzheimer hastalığının TTR düzeylerini düşürücü etkisi, hastalığın koroid pleksus yapısını bozmasıyla TTR üretiminin azalması ve amiloid birikimi sırasında TTR düzeylerinin tükenmesi olarak açıklanmaktadır (93,94). Literatürdeki çeşitli çalışmalarda TTR'nin Alzheimer hastalığı üzerindeki esas etkisinin Aβ'nin karaciğerde yıkılmak üzere merkezi sinir sisteminden taşınması olduğu vurgulanmaktadır (6,49).

Biz de bu bilgiler ışığında isv Aβ 1-42 enjeksiyonu ile beyin amiloid plak oluşumu indüklenen sıçanlarda Aβ 1-42'nin taşınmasına aracılık eden TTR'nin kullanımının arttığını ve bu nedenle kalp dokusunda düzeylerinin azaldığını düşünmekteyiz. Literatürde Alzheimer hastalığında ve Alzheimer hastalığı deney modelinde BOS ve plazma TTR düzey düşüklüğü gösterilmiştir (7,8). Biz de

periferik bir organ olan kalpte Alzheimer hastalığı modelinin etkisiyle TTR düzeyinin azaldığını bu çalışma ile göstermiş bulunmaktayız.

Taurin grubunda A β 1-42 grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek kalp TTR düzeyi tespit edilmesi taurin grubunda TTR'nin tükenmesine yol açacak A β yükünün az olmasından kaynaklanıyor gibi görünmektedir.

Etkileri genellikle merkezi sinir sistemi üzerinde araştırılan Alzheimer hastalığı multisistemik bir hastalıktır ve periferik organları da etkilemektedir. Alzheimer hastalığının periferik etkileri ile ilgili, özellikle de kalp tutulumundaki mekanizmanın açıklığa kavuşturulması konusunda daha çok çalışmaya gereksinim duyulmaktadır.

Alzheimer hastalığı gelişiminde nörotoksin olan beta amiloidin birikimi temel faktördür. Bu yolakta A β 'nin homeostazı, üretimi ve beyinden çıkarılması olmak üzere üç önemli basamak bulunmaktadır. A β 'nin kan beyin bariyeri aracılığı ile beyinden çıkarılmasında LRP-1 reseptör proteininin görev aldığı düşünülmektedir. Endotelial hücre yüzey reseptörü olan LRP-1 farklı biyolojik süreçlerde pek çok yolağı aktive etmektedir. Bu süreçlerden bazıları; hücre sinyali yolları, lizozomal enzimlerin aktivasyonu, lipoprotein metabolizması ve hücre dışı ligandlar aracılığıyla bakteriyel toksinlerin ve/veya virüslerin endositozudur. LRP-1, beyin hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilir. Kan beyin bariyerinden LRP-1 aracılı A β çıkışı görülmektedir. LRP-1 aynı APP gibi sekretaz enzimleri aracılığıyla bölünebilir. LRP-1'deki sekretaz enzimleri aracılı bu işlemin A β taşınmasını etkileyebileceği düşünülmektedir (59).

Literatürde çeşitli çalışmalarda Alzheimer hastalarında LRP-1'in oksitlenerek işlevini kaybettiği gösterilmiştir (95). Çeşitli çalışmalarda da sağlıklı yaşlılarda ve Alzheimer hastalarında total beyin dokusunda ve beyin kapillerlerinde LRP-1 düzeyinin azaldığı gösterilmiştir (95-98). Literatürde çoğu çalışmada Alzheimer hastalığında LRP-1 seviyelerinin azaldığı gösterilmişse de ilginç bir şekilde arttığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (99). Literatürde Alzheimer hastalığının hayvan modellerinde LRP-1 protein miktarının azaldığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (95,96,100).

Bu nedenler ile çalışmamızda beyin dokusu LRP-1 düzeylerine bakılmıştır. Western blot analizi ile elde edilen sonuçlara göre total beyin dokusunda LRP-1 protein düzeyi A β 1-42 grubunda kontrol, sham ve Taurin + A β 1-42 gruplarına göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ($p < 0.05$).

Çalışmamızda A β 1-42 grubundaki LRP-1 düzeylerinin düşüklüğü, literatürdeki LRP-1 miktar azlığı ile Alzheimer hastalığı ilişkisini doğrular niteliktedir. Taurin takviyesi ise Alzheimer hastalığı modeline göre LRP-1 miktarını Taurin + A β 1-42 grubunda anlamlı olarak artırmıştır. Taurinin A β 'nin beyinden uzaklaştırılmasında rol alan reseptör olan LRP-1'i artırması Alzheimer hastalığı üzerindeki olumlu etkilerini açıklayıcı mekanizmalardan biri olarak

düşünülebilir. Literatürde Alzheimer hastalığında taurin amino asidi ile LRP-1 düzeyi ilişkisini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle de çalışmamız özgün bir değer taşımaktadır. Taurin amino asidinin ortamda hasar yapıcı herhangi bir ajan bulunmadığı durumlarda profilaktik olarak uygulanmasının olumsuz etkileri olabileceği de ayrıca vurgulanmaktadır (101, 102). Taurin grubunda kontrol grubuna göre azalmış olarak görünen LRP-1 seviyeleri de buna kanıt olarak gösterilebilir. Burada taurin ön takviyesinin dozunun ve uygulama süresinin de çok önemli olduğunu belirtmek gerekir. Taurinin yüksek dozlarda uzun süre uygulanmasının pro-oksidan özellik gösterebileceği belirtilmektedir (103).

Alzheimer hastalığında LRP-1 seviyelerinde daha büyük bir grup çalışmada azalma bulunurken diğer bir grup çalışmada artış bulunması diğer pek çok parametre gibi numune alma zamanındaki Alzheimer hastalığının evresine bağlı gibi görünmektedir. Alzheimer hastalığının gelişim evresine, lokal ve zamansal faktörlere bağlı olarak sonuçların farklılık göstermiş olması olasıdır.

Tüm bu bulgular LRP-1'in Alzheimer hastalığında A β 'nın TTR aracılı beyinden uzaklaştırılmasında rol aldığını doğrular niteliktedir. Bu taşınımındaki mekanizmaların daha ayrıntılı anlaşılabilmesi için ilgili konuda çalışmaların artması gerekmektedir.

Ayrıca bu bilgiler doğrultusunda Alzheimer hastalarında kan beyin bariyeri LRP-1 düzeyini artırmak bir tedavi hedefi olarak karşımıza çıkmaktadır (59). Böylece miktarı artan LRP-1'in A β birikimine karşı koyabileceği ve bilişsel düşüşü engelleyebileceği düşünülmektedir (59).

Sonuç olarak çalışmamızda Alzheimer hastalığı için olası biyobelirteçler olan plazma metal katyon (demir, bakır, çinko, mangan) düzeyleri, plazma TTR düzeyleri, plazma A β 1-42 düzeyleri tayin edilmiştir. Özellikle plazma bakır düzeyinin Alzheimer hastalığı modelinde düşük bulunması Alzheimer hastalığında bakır metabolizmasında bozukluk olduğunu desteklemektedir. Kalp dokusu TTR ve A β 1-42 tayinleri ile Alzheimer hastalığının kalp üzerindeki etkileri araştırılarak multisistemik olan bu hastalığın periferik etkileri görülmeye çalışılmıştır. Kalpte TTR düzeyi farklılığı ilginçtir ve Alzheimer hastalığında A β birikimi sırasında TTR'nin taşıyıcı protein olarak kullanımı hipotezini desteklemektedir. Kalp A β 1-42 düzeylerinin periferik düşüklüğü hem literatürdeki bir grup çalışma ile benzerlik göstermekte hem de Alzheimer hastalığında A β 1-42 birikiminin deney modelimizde santral olarak gerçekleştiğini desteklemektedir. Son parametre olarak total beyin dokusu LRP-1 reseptör tayini ile literatür bulgularının büyük kısmına benzer olarak Alzheimer hastalığı deney modelinde düşük LRP-1 düzeyleri tespit edilmiştir. Bu da Alzheimer hastalığında LRP-1'in A β 'nın TTR aracılı beyinden uzaklaştırılmasına aracılık ettiği hipotezini destekler niteliktedir.

Taurin amino asidi ise kalp TTR düzeyini korumakta, kalp A β 1-42 düzeyini düşürmekte ve beyin LRP-1 düzeyini artırmaktadır. Ayrıca plazma bakır dengesizliğini de bir miktar normal düzeye getirmiştir. Taurinin bilişsel bozulma üzerindeki ve oksidatif stres üzerindeki olumlu etkilerinin yanı sıra bu etkilerinin de Alzheimer hastalığı üzerindeki olumlu etkilerinden olduğu düşünülebilir.



6. SONUÇLAR

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulardan çıkardığımız sonuçlar:

- Plazma bakır düzeyinin Alzheimer hastalığı modelinde düşük bulunması Alzheimer hastalığında bakır metabolizmasında bozukluk olduğunu desteklemektedir. Bu bulgumuz Alzheimer hastalarında metal katyon düzeylerinde dengesizlik olabileceği sonucuna varmamıza neden olmuştur. Plazma metal katyon düzeyleri özellikle de bakır düzeyi Alzheimer hastalığı için bir biyobelirteç olarak kullanım potansiyeline sahiptir ancak bir standardizasyon gereklidir. Bakılacak bakırın serbest halinin, bağlı halinin, bizim ölçtüğümüz gibi total formunun, farklı izotoplarının hatta seruloplazmin ile oranlarının kullanıldığı çeşitli çalışmalar vardır. Bu nedenle Alzheimer hastalığı için bir biyobelirteç olarak kullanılabilmesi için standardize edilmesi gerekmektedir.
- Plazma TTR açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmamasının stereotaksik uygulamadan 2 hafta sonraki tek bir ölçüm ile düzey değişikliklerini saptayamamış olmamızdan kaynaklandığını düşünmekteyiz. Bu nedenle farklı Alzheimer hastalığı dönemlerinde plazma TTR düzeylerinin ölçülebileceği basamaklı bir modelin uygun olabileceği ve bu durumda anlamlı sonuçlar bulunabileceği kanaatindeyiz.
- Plazma A β 1-42'nin Alzheimer hastalığı için biyobelirteç olarak kullanımı güven vermemektedir. Ancak belirli yaş aralıklarında belirli referans değerler belirlenip standardize edilerek kullanımı veya diğer biyobelirteçler ile birlikte kullanımı önerilebilir.
- Çalışmamızda periferik bir organ olan kalpte A β 1-42 düzeyinin Alzheimer hastalığı modeli oluşturulan gruplarda daha düşük tespit edilmesi A β 1-42 birikiminin merkezi sinir sisteminde yoğunlaştığını düşündürmektedir. Beyin amiloid plak oluşumu sırasında merkezi A β 1-42 yükü artarken periferik dokularda azalmış gibi görünmektedir.
- TTR, Alzheimer hastalığı için önleyici bir protein olarak düşünülürken aynı zamanda monomer formuyla TTR ilişkili kalp amiloidozunda kalpte primer olarak biriken amilodogenik proteindir. Kalp TTR düzeylerinin azalması, Alzheimer hastalığı modelinde koroid pleksus yapısının bozulmasıyla TTR üretiminin azaldığı ve artan amiloid yükün taşınması esnasında TTR düzeylerinde tükenme yaşandığı hipotezini desteklemektedir.

- Total beyin LRP-1 reseptör düzeylerinin azalması ise A β türevlerinin beyinden periferik taşınırken bu reseptörün görev aldığı hipotezini desteklemektedir. Bu bulgu Alzheimer hastalığı mekanizmasının açıklanmasına yardımcı olmaktadır. Aynı zamanda Alzheimer hastalığı için kan beyin bariyeri yapısının modüle edilmesi konusunda çalışmalar bulunmaktadır. Kan beyin bariyeri LRP-1 reseptör proteini ekspresyonunu artırma temelli tedaviler Alzheimer hastalığı için gelecekte düşünülebilir.
- Taurin amino asidi ise kalp TTR düzeyini korumakta, kalp A β 1-42 düzeyini düşürmekte ve beyin LRP-1 düzeyini artırmaktadır. Ayrıca plazma bakır dengesizliğini de bir miktar normal düzeye getirmiştir.
- Taurin, bu parametrelere olumlu etkileri ile Alzheimer hastalığında ve benzeri nörodejeneratif süreçlerde profilaktik bir destek olma potansiyeli taşıyor gibi görünmektedir. Ancak uygulanan taurin takviyesinde oksidan ve beklenmedik olumsuz etkilerin görülmemesi için dozun ve kullanım süresinin belirlenmesi açısından daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır. Taurinin profilaktik kullanımının sağlıklı genç erişkinlerden ziyade Alzheimer hastalığı açısından yüksek riskli kişiler için uygun olabileceği kanaatindeyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Zvěřová M. Clinical aspects of Alzheimer's disease. *Clinical Biochemistry* 2019; 72: 3-6.
2. Choi YJ, Chae S, Kim JH, Barald KF, Park JY, & Lee SH. Neurotoxic amyloid beta oligomeric assemblies recreated in microfluidic platform with interstitial level of slow flow. *Scientific Reports* 2013; 3(1): 1-7.
3. Cetin F, & Dincer S. The effect of intrahippocampal beta amyloid (1-42) peptide injection on oxidant and antioxidant status in rat brain. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2007; 1100(1): 510-517.
4. Aslan Karakelle N, Dinçer S, & Yar Sağlam AS. The effect of intracerebroventricular amyloid beta 1-42 application on cognitive functions in aged rats supplemented with taurine and the change of peroxisomal proteins in this process. *Brain Research Bulletin* 2021; 172: 89-97.
5. Sharma S, Verma S, Kapoor M, Saini A, & Nehru B. Alzheimer's disease like pathology induced six weeks after aggregated amyloid-beta injection in rats: increased oxidative stress and impaired long-term memory with anxiety-like behavior. *Neurological Research* 2016; 38(9): 838-850.
6. Alemi M, Gaiteiro C, Ribeiro CA, Santos LM, Gomes JR, Oliveira SM et al. Transthyretin participates in beta-amyloid transport from the brain to the liver-involvement of the low-density lipoprotein receptor-related protein 1?. *Scientific Reports* 2016; 6(1): 1-15.
7. Velayudhan L, Killick R, Hye A, Kinsey A, Güntert A, Lynham S et al. Plasma transthyretin as a candidate marker for Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 2012; 28(2): 369-375.
8. Serot JM, Christmann D, Dubost T, & Couturier M. Cerebrospinal fluid transthyretin: aging and late onset Alzheimer's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 1997; 63(4): 506-508.
9. Xing P, Liao Z, Ren Z, Zhao J, Song F, Wang G et al. Roles of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 in tumors. *Chinese Journal of Cancer* 2016; 35(1): 1-8.
10. Dubrey S, Ackermann E, & Gillmore J. The transthyretin amyloidoses: advances in therapy. *Postgraduate Medical Journal* 2015; 91(1078): 439-448.
11. Schaich CL, Maurer MS, & Nadkarni NK. Amyloidosis of the Brain and Heart: Two Sides of the Same Coin?. *Journal of the American College of Cardiology* 2019; 7(2): 129-131.

12. Squitti R, Ghidoni R, Simonelli I, Ivanova ID, Colabufo NA, Zuin M et al. Copper dyshomeostasis in Wilson disease and Alzheimer's disease as shown by serum and urine copper indicators. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2018; 45: 181-188.
13. Chen C, Xia S, He J, Lu G, Xie Z, & Han H. Roles of taurine in cognitive function of physiology, pathologies and toxication. *Life Sciences* 2019; 231: 116584.
14. Santa-María I, Hernández F, Moreno FJ, & Avila J. Taurine, an inducer for tau polymerization and a weak inhibitor for amyloid- β -peptide aggregation. *Neuroscience Letters* 2007; 429(2-3): 91-94.
15. Oh SJ, Lee HJ, Jeong YJ, Nam KR, Kang KJ, Han SJ et al. Evaluation of the neuroprotective effect of taurine in Alzheimer's disease using functional molecular imaging. *Scientific Reports* 2020; 10(1): 1-9.
16. Obici L, Cortese A, Lozza A, Lucchetti J, Gobbi M, Palladini G et al. Doxycycline plus tauroursodeoxycholic acid for transthyretin amyloidosis: a phase II study. *Amyloid* 2012; 19(sup1): 34-36.
17. Cardoso I, Martins D, Ribeiro T, Merlini G, & Saraiva MJ. Synergy of combined doxycycline/TUDCA treatment in lowering Transthyretin deposition and associated biomarkers: studies in FAP mouse models. *Journal of Translational Medicine* 2010; 8(1): 1-11.
18. Yeh YH, Lee YT, Hsieh YL, & Hwang DF. Dietary Taurine Reduces Zinc-Induced Toxicity in Male Wistar Rats. *Journal of Food Science* 2011; 76(4): T90-T98.
19. Arvanitakis Z, Shah RC, & Bennett DA. Diagnosis and management of dementia. *Journal of the American Medical Association* 2019; 322(16): 1589-1599.
20. Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, & Jones E. Alzheimer's disease. *Lancet (London, England)* 2011; 377(9770): 1019–1031.
21. Breijyeh Z, & Karaman R. Comprehensive review on Alzheimer's disease: Causes and treatment. *Molecules* 2020; 25(24): 5789.
22. Chételat G, Villemagne VL, Bourgeat P, Pike KE, Jones G, Ames D & Australian Imaging Biomarkers and Lifestyle Research Group. Relationship between atrophy and β -amyloid deposition in Alzheimer disease. *Annals of Neurology* 2010; 67(3): 317-324.
23. Chung SH. Aberrant phosphorylation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry and Molecular Biology Reports* 2009; 42(8): 467-474.

24. Reitz C, Brayne C, & Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology* 2011; 7(3): 137-152.
25. Gubrium JF. Family responsibility and caregiving in the qualitative analysis of the Alzheimer's disease experience. *Journal of Marriage and the Family* 1988; 197-207.
26. Maurer K, Volk S, & Gerbaldo H. Auguste D and Alzheimer's disease. *The Lancet* 1997; 349(9064): 1546-1549.
27. Villemagne VL, Burnham S, Bourgeat P, Brown B, Ellis KA, Salvado O et al. Amyloid β deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study. *The Lancet Neurology* 2013; 12(4): 357-367.
28. Weiner MF, & Lipton AM (Eds.). Clinical manual of Alzheimer disease and other dementias. *American Psychiatric Pub.* 2012.
29. Ridge PG, Hoyt KB, Boehme K, Mukherjee S, Crane PK, Haines JL et al. Assessment of the genetic variance of late-onset Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 2016; 41: 200-e13.
30. Yoshitake T, Kiyohara Y, Kato I, Ohmura T, Iwamoto H, Nakayama K et al. Incidence and risk factors of vascular dementia and Alzheimer's disease in a defined elderly Japanese population: the Hisayama Study. *Neurology* 1995; 45(6): 1161-1168.
31. Heininger K. A unifying hypothesis of Alzheimer's disease. IV. Causation and sequence of events. *Reviews in the Neurosciences* 2000; 11(Supplement): 213-328.
32. Sims-Robinson C, Kim B, Rosko A, & Feldman EL. How does diabetes accelerate Alzheimer disease pathology?. *Nature Reviews Neurology* 2010; 6(10): 551-559.
33. Arnold SE, Arvanitakis Z, Macauley-Rambach SL, Koenig AM, Wang HY, Ahima RS et al. Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: concepts and conundrums. *Nature Reviews Neurology* 2018; 14(3): 168-181.
34. Yasumoto T, Takamura Y, Tsuji M, Watanabe-Nakayama T, Imamura K, Inoue H et al. High molecular weight amyloid β 1-42 oligomers induce neurotoxicity via plasma membrane damage. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 2019; 33(8): 9220-9234.
35. Uddin M, Kabir M, Rahman M, Behl T, Jeandet P, Ashraf GM et al. Revisiting the amyloid cascade hypothesis: from anti-A β therapeutics to auspicious new ways for Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Sciences* 2020; 21(16): 5858.

36. İzci Y, & Erbaş YC. Hipokampus: yapısı ve fonksiyonları. *Türk Nöroşir Derg* 2015; 25(3): 287-95.
37. Padurariu M, Ciobica A, Mavroudis I, Fotiou D, & Baloyannis S. Hippocampal neuronal loss in the CA1 and CA3 areas of Alzheimer's disease patients. *Psychiatria Danubina* 2012; 24(2.): 152-158.
38. Henley SM, Bates GP, & Tabrizi SJ. Biomarkers for neurodegenerative diseases. *Current Opinion in Neurology* 2005; 18(6): 698-705.
39. Consensus Recommendations for the Postmortem Diagnosis of Alzheimer's Disease. The National Institute on Aging, and Reagan Institute Working Group on diagnostic criteria for the neuropathological assessment of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1997; 18(4 Suppl): S1-S2.
40. Small GW, Rabins PV, Barry PP, Buckholtz NS, DeKosky ST, Ferris SH et al. Diagnosis and treatment of Alzheimer disease and related disorders: consensus statement of the American Association for Geriatric Psychiatry, the Alzheimer's Association, and the American Geriatrics Society. *Journal of the American Medical Association* 1997; 278(16): 1363-1371.
41. Weller J, & Budson A. Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. *F1000Research* 2018; 7.
42. Frisoni GB, Scheltens P, Galluzzi S, Nobili FM, Fox NC, Robert PH et al. Neuroimaging tools to rate regional atrophy, subcortical cerebrovascular disease, and regional cerebral blood flow and metabolism: consensus paper of the EADC. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 2003; 74(10): 1371-1381.
43. Knopman DS, DeKosky ST, Cummings JL, Chui H, Corey-Bloom J, Relkin N et al. Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2001; 56(9): 1143-1153.
44. Baysal Aİ, & Yeşilbudak Z. Alzheimer Hastalığı'nın klinik bulguları. *Türkiye Klinikleri J Neurol* 2003; 1: 1-5.
45. Long JM, & Holtzman DM. Alzheimer disease: an update on pathobiology and treatment strategies. *Cell* 2019; 179(2): 312-339.
46. Walsh S, Merrick R, Milne R, & Brayne C. Aducanumab for Alzheimer's disease?. *The British Medical Journal* 2021; 374: 1682.
47. Zussy C, Brureau A, Keller E, Marchal S, Blayo C, Delair B et al. Alzheimer's disease related markers, cellular toxicity and behavioral deficits induced six weeks after oligomeric amyloid- β peptide injection in rats. *PloS One* 2013; 8(1): e53117.

48. Rezaeiasl Z, Salami M, & Sepehri G. The effects of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains on memory and learning behavior, long-term potentiation (LTP), and some biochemical parameters in β -amyloid-induced rat's model of Alzheimer's disease. *Preventive Nutrition and Food Science* 2019; 24(3): 265.
49. Vieira M, & Saraiva MJ. Transthyretin: a multifaceted protein. *Biomolecular Concepts* 2014; 5(1): 45-54.
50. Buxbaum JN, Ye Z, Reixach N, Friske L, Levy C, Das P et al. Transthyretin protects Alzheimer's mice from the behavioral and biochemical effects of A β toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008; 105(7): 2681-2686.
51. Sousa JC, Marques F, Dias-Ferreira E, Cerqueira JJ, Sousa N, & Palha JA. Transthyretin influences spatial reference memory. *Neurobiology of Learning and Memory* 2007; 88(3): 381-385.
52. Ingenbleek Y. Plasma transthyretin as a biomarker of sarcopenia in elderly subjects. *Nutrients* .2019; 11(4): 895.
53. Tien YT, Lee WJ, Liao YC, Wang WF, Jhang KM, Wang SJ et al. Plasma transthyretin as a predictor of amnesic mild cognitive impairment conversion to Dementia. *Scientific Reports* 2019; 9(1): 1-7.
54. Huynh RA, & Mohan C. Alzheimer's disease: biomarkers in the genome, blood, and cerebrospinal fluid. *Frontiers in Neurology* 2017; 8: 102.
55. Gião T, Saavedra J, Cotrina E, Quintana J, Llop J, Arsequell G et al. Undiscovered roles for transthyretin: from a transporter protein to a new therapeutic target for Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Sciences* 2020; 21(6): 2075.
56. Dellière S, & Cynober L. Is transthyretin a good marker of nutritional status?. *Clinical Nutrition* 2017; 36(2): 364-370.
57. Potere N, Del Buono MG, Mauro AG, Abbate A, & Toldo S. Low density lipoprotein receptor-related protein-1 in cardiac inflammation and infarct healing. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* (2019); 6: 51.
58. Mao H, Xie L, & Pi X. Low-density lipoprotein receptor-related protein-1 signaling in angiogenesis. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 2017;4: 34.
59. Storck SE, & Pietrzik CU. Endothelial LRP1—a potential target for the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmaceutical Research* 2017; 34(12): 2637-2651.

60. Li X, Zhang X, Ladiwala ARA, Du D, Yadav JK, Tessier PM et al. Mechanisms of transthyretin inhibition of β -amyloid aggregation in vitro. *Journal of Neuroscience* 2013; 33(50): 19423-19433.
61. El Idrissi A. Taurine regulation of neuroendocrine function. *Taurine* 11 2019; 977-985.
62. Jang H, Lee S, Choi SL, Kim HY, Baek S, & Kim Y. Taurine directly binds to oligomeric amyloid- β and recovers cognitive deficits in Alzheimer model mice. In *Taurine 10 Springer, Dordrecht*.2017; 233-241.
63. Ciccone L, Fruchart-Gaillard C, Mourier G, Savko M, Nencetti S, Orlandini E et al. Copper mediated amyloid- β binding to Transthyretin. *Scientific Reports* 2018; 8(1): 1-11.
64. Giacconi R, Giuli C, Casoli T, Baliotti M, Costarelli L, Provinciali M et al. Acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease influence Zinc and Copper homeostasis. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2019; 55:58-63.
65. Kim HG, Moon M, Choi JG, Park G, Kim AJ, Hur J et al. Donepezil inhibits the amyloid-beta oligomer-induced microglial activation in vitro and in vivo. *Neurotoxicology* 2014; 40: 23-32.
66. O'Brien EC, Farkas E, & Nolan KB. Interaction of taurine with metal ions. In *Taurine 4 Springer, Boston, MA* 2002; 345-354.
67. Mahmood T, & Yang PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences* 2012; 4(9): 429.
68. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 72(1-2): 248-254.
69. Vural H, Demirin H, Kara Y, Eren I, & Delibas N. Alterations of plasma magnesium, copper, zinc, iron and selenium concentrations and some related erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with Alzheimer's disease. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2010; 24(3):169-173.
70. Nakamura A, Kaneko N, Villemagne VL, Kato T, Doecke J, Doré V at al. High performance plasma amyloid- β biomarkers for Alzheimer's disease. *Nature* 2018; 554(7691): 249-254.
71. Brewer GJ, Kanzer SH, Zimmerman EA, Molho ES, Celmins DF, Heckman SM et al. Subclinical zinc deficiency in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias®* 2010; 25(7): 572-575.

72. Molina JA, Jimenez-Jimenez FJ, Aguilar MV, Meseguer I, Mateos-Vega CJ, Gonzalez-Munoz MJ et al. Cerebrospinal fluid levels of transition metals in patients with Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission* 1998; 105(4-5): 479-488.
73. Dong J, Robertson JD, Markesbery WR, & Lovell MA. Serum zinc in the progression of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 2008; 15(3): 443-450.
74. Hajji N, Calvert C, Ritchie CW, & Sastre M. The Role of Metals in Alzheimer's Disease. In *Mechanisms and Metal Involvement in Neurodegenerative Diseases* 2013; 80-97.
75. González-Domínguez R, García-Barrera T, & Gómez-Ariza JL. Characterization of metal profiles in serum during the progression of Alzheimer's disease. *Metallomics* 2014; 6(2): 292-300.
76. Agarwal R, Kushwaha SS, Tripathi CB, Singh N, & Chhillar N. Serum copper in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 2008; 23(4): 369-374.
77. Squitti R, Lupoi D, Pasqualetti P, Dal Forno G, Vernieri F, Chioyenda P et al. Elevation of serum copper levels in Alzheimer's disease. *Neurology* 2002; 59(8): 1153-1161.
78. Qian ZM, & Ke Y. Brain iron transport. *Biological Reviews* 2019; 94(5): 1672-1684.
79. Aschner M. The transport of manganese across the blood-brain barrier. *Neurotoxicology* 2006; 27(3): 311-314.
80. Yokel RA. Blood-brain barrier flux of aluminum, manganese, iron and other metals suspected to contribute to metal-induced neurodegeneration. *Journal of Alzheimer's Disease* 2006; 10(2-3): 223-253.
81. Moynier F, Creech J, Dallas J, & Le Borgne M. Serum and brain natural copper stable isotopes in a mouse model of Alzheimer's disease. *Scientific Reports* 2019; 9(1): 1-7.
82. Xu J, Church SJ, Patassini S, Begley P, Waldvogel HJ, Curtis MA et al. Evidence for widespread, severe brain copper deficiency in Alzheimer's dementia. *Metallomics* 2017; 9(8): 1106-1119.
83. Huynh RA, & Mohan C. Alzheimer's disease: biomarkers in the genome, blood, and cerebrospinal fluid. *Frontiers in Neurology* 2017; 8: 102.
84. Blasko I, Jellinger K, Kemmler G, Krampla W, Jungwirth S, Wichart I et al. Conversion from cognitive health to mild cognitive impairment and Alzheimer's

disease: prediction by plasma amyloid beta 42, medial temporal lobe atrophy and homocysteine. *Neurobiology of Aging* 2008; 29(1): 1-11.

85. Hansson O, Zetterberg H, Vanmechelen E, Vanderstichele H, Andreasson U, Londos E et al. Evaluation of plasma A β 40 and A β 42 as predictors of conversion to Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment. *Neurobiology of Aging* 2010; 31(3): 357-367.

86. Hansson O, Zetterberg H, Buchhave P, Londos E, Blennow K, & Minthon L. Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study. *The Lancet Neurology* 2006; 5(3): 228-234.

87. 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. *Archives of Neurology* 2003; 60(7): 958-964.

88. Sundelöf J, Giedraitis V, Irizarry MC, Sundström J, Ingelsson E, Rönnekaa E et al. Plasma β amyloid and the risk of Alzheimer disease and dementia in elderly men: a prospective, population-based cohort study. *Archives of Neurology* 2008; 65(2): 256-263.

89. Schultz K, Nilsson K, Nielsen JE, Lindquist SG, Hjerlind LE, Andersen BB et al. Transthyretin as a potential CSF biomarker for Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies: effects of treatment with cholinesterase inhibitors. *European Journal of Neurology* 2010; 17(3): 456-460.

90. Tublin JM, Adelstein JM, Del Monte F, Combs CK, & Wold LE. Getting to the heart of Alzheimer disease. *Circulation Research* 2019; 124(1): 142-149.

91. Cermakova P, Eriksson M, Lund LH, Winblad B, Religa P, & Religa D. Heart failure and Alzheimer's disease. *Journal of Internal Medicine* 2015; 277(4): 406-425.

92. Huang LK, Chao SP, & Hu CJ. Clinical trials of new drugs for Alzheimer disease. *Journal of Biomedical Science* 2020; 27(1): 1-13.

93. Han SH, Jung ES, Sohn JH, Hong HJ, Hong HS, Kim JW et al. Human serum transthyretin levels correlate inversely with Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 2011; 25(1): 77-84.

94. Biroccio A, Del Boccio P, Panella M, Bernardini S, Di Ilio C, Gambi D et al. Differential post-translational modifications of transthyretin in Alzheimer's disease: a study of the cerebral spinal fluid. *Proteomics* 2006; 6(7): 2305-2313.

95. Shibata M, Yamada S, Kumar SR, Calero M, Bading J, Frangione B et al. Clearance of Alzheimer's amyloid- β 1-40 peptide from brain by LDL receptor-

related protein-1 at the blood-brain barrier. *The Journal of Clinical Investigation* 2000; 106(12): 1489-1499.

96. Osgood D, Miller MC, Messier AA, Gonzalez L, & Silverberg GD. Aging alters mRNA expression of amyloid transporter genes at the blood-brain barrier. *Neurobiology of Aging* 2017; 57: 178-185.

97. Kang DE, Pietrzik CU, Baum L, Chevallier N, Merriam DE, Kounnas MZ et al. Modulation of amyloid β -protein clearance and Alzheimer's disease susceptibility by the LDL receptor-related protein pathway. *The Journal of Clinical Investigation* 2000; 106(9): 1159-1166.

98. Silverberg GD, Miller MC, Messier AA, Majmudar S, Machan JT, Donahue JE et al. Amyloid deposition and influx transporter expression at the blood-brain barrier increase in normal aging. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 2010; 69(1): 98-108.

99. Arélin K, Kinoshita A, Whelan CM, Irizarry MC, Rebeck GW, Strickland DK et al. LRP and senile plaques in Alzheimer's disease: colocalization with apolipoprotein E and with activated astrocytes. *Molecular Brain Research* 2002; 104(1): 38-46.

100. Bouter Y, Kacprowski T, Weissmann R, Dietrich K, Borgers H, Brauß A et al. Deciphering the molecular profile of plaques, memory decline and neuron loss in two mouse models for Alzheimer's disease by deep sequencing. *Frontiers in Aging Neuroscience* 2014; 6: 75.

101. Rivas-Arancibia S, Dorado-Martínez C, Borgonio-Pérez G, HiriartUrdanivia M, Verdugo-Díaz L, Durán-Vázquez A et al. Effects of Taurine on Ozon-Induced Memory Deficits and Lipid Peroxidation Levels in Brains of Young, Mature, and Old Rats. *Environmental Research* 2000; 82:7-17.

102. Ozan G, Turkozkan N, Bircan FS, & Balabanlı B. Effect of taurine on brain 8-hydroxydeoxyguanosine and 3-nitrotyrosine levels in endotoxemia. *Inflammation* 2012; 35(2): 665-670.

103. Dinçer S, & Aslan Karakelle N. Santral Sinir Sisteminde Taurinin Rolü ve Dozun Önemi. *Gazi Medical Journal* 2019; 30: 227-230.

8. ÖZET

DENEYSEL ALZHEİMER HASTALIĞI MODELİ OLUŞTURULAN YAŞLI SIÇANLARDA TAURİN ÖN TAKVİYESİNİN KALP VE PLAZMA AMİLOİDOGENİK PROTEİN DÜZEYLERİNE (TRANSTİRETİN, A β 1-42), PLAZMA METAL KATYON DÜZEYLERİNE VE BEYİN LRP-1 DÜZEYLERİNE ETKİSİ

(Tıpta Uzmanlık Tezi)

Esra TEKİN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

Ekim 2021

ÖZET

Bu çalışmada intraserebroventriküler A β 1-42 uygulamasıyla Alzheimer hastalığı modeli oluşturulan yaşlı sıçanlarda plazma TTR, A β 1-42 ve metal katyon (Fe, Cu, Zn, Mn) düzeylerini tespit ederek bu parametrelerin Alzheimer hastalığı için kan bazlı bir biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılamayacağını değerlendirmek amaçlanmıştır. Beyin LRP-1 düzeyi tespiti ile TTR'nin A β 1-42 taşıma mekanizması hakkında bilgi edinmek istenmiştir. Ayrıca kalp TTR ve A β 1-42 düzeyleri de ölçülerek kalp ve beyin amiloidozu arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca ölçülen bütün parametreler üzerinde taurin ön takviyesinin olası olumlu etkisi görülmek istenmiştir. Çalışmamızda 30 adet 28 $\pm$ 2 aylık Wistar albino cinsi erkek sıçan kontrol, sham, A β 1-42, taurin ve taurin + A β 1-42 olmak üzere n=6 olacak şekilde 5 gruba ayrılmıştır. Taurin ve taurin + A β 1-42 gruplarındaki sıçanlara içme suyuna karıştırılarak 1000 mg/kg/gün taurin ön takviyesi yapılmıştır. Daha sonra A β 1-42 ve taurin + A β 1-42 gruplarına isv A β 1-42 enjeksiyonu yapılarak Alzheimer hastalığı modeli oluşturulmuştur. 2 haftalık bekleme sürecinin ardından hayvanlar anestezi altında feda edilmiştir. Çalışmamızda plazma metal katyon düzeyleri ICP-MS yöntemiyle, plazma ve kalp TTR ile A β 1-42 düzeyleri elisa kit aracılığı ile spektrofotometrik yöntem kullanılarak, beyin dokusu LRP-1 düzeyleri ise western blot deneyi ile tespit edilmiştir. Verilerin analizi için Kruskal Wallis testi ve sonrasında post-hoc Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi kullanılmış, p<0.05 anlamlı kabul

edilmiştir. Bulgularımıza göre plazma bakır, kalp A β 1-42, kalp TTR ve beyin LRP-1 düzeyleri Alzheimer hastalığı modeli oluşturulan A β 1-42 grubunda azalmış olarak tespit edilmiştir ($p<0.05$). Plazma demir, çinko, mangan düzeyleri açısından ve plazma TTR ile A β 1-42 düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır. Değerlendirilen bu parametrelerin Alzheimer hastalığı için biyobelirteç olarak kullanım potansiyelinin olduğu ancak standardize edilmesi için bu konuda daha çok çalışmaya ihtiyaç olduğu sonucuna varılmıştır. Taurin amino asidi ise kalp TTR düzeyini koruyarak, kalp A β 1-42 düzeyini düşürerek, beyin LRP-1 düzeyini artırarak ayrıca plazma bakır dengesizliğini de bir miktar normal düzeye getirerek Alzheimer hastalığı üzerinde olumlu etkiler göstermiştir.



Anahtar Kelimeler: Alzheimer hastalığı, taurin, transtiretin, LRP-1, metal katyonlar

9. SUMMARY

THE EFFECT OF TAURINE PRE-SUPPLEMENTATION ON HEART AND PLASMA AMYLOIDOGENIC PROTEIN LEVELS (TRANSTHYRETIN, A β 1-42), PLASMA METAL CATION LEVELS AND BRAIN LRP-1 LEVELS IN ELDERLY RATS WITH EXPERIMENTAL ALZHEIMER'S DISEASE MODEL

(Thesis in Medicine)

Esra TEKİN

GAZI UNIVERSITY FACULTY OF MEDICINE

October 2021

SUMMARY

In this study, it was aimed to determine the plasma TTR, A β 1-42 and metal cation (Fe, Cu, Zn, Mn) levels in aged rats in which Alzheimer's disease model was created by intracerebroventricular A β 1-42 administration and to evaluate whether these parameters can be used as a blood-based biomarker for Alzheimer's disease. With the detection of brain LRP-1 level, it was desired to obtain information about the A β 1-42 transport mechanism of TTR. In addition, it was aimed to investigate the relationship between heart and brain amyloidosis by measuring cardiac TTR and A β 1-42 levels. In addition, it was desired to see the possible positive effect of taurine pre-supplementation on all measured parameters. In our study, 30 male Wistar albino rats, aged 28 $\pm$ 2 months, were divided into 5 groups as control, sham, A β 1-42, taurine and taurine + A β 1-42, n=6. Rats in taurine and taurine + A β 1-42 groups were pre-supplemented with 1000 mg/kg/day taurine by mixing them with drinking water. Then, an Alzheimer's disease model was created by injecting intracerebroventricular A β 1-42 to A β 1-42 and taurine + A β 1-42 groups. After a 2-week waiting period, the animals were sacrificed under anesthesia. In our study, plasma metal cation levels were determined by ICP-MS method, plasma and cardiac TTR and A β 1-42 levels were determined by elisa kit using spectrophotometric method, and brain tissue LRP-1 levels were determined by western blot experiment. The Kruskal Wallis test and then the post-hoc Mann Whitney U test with Bonferroni correction were

used for the analysis of the data and $p < 0.05$ was considered significant. According to our findings, plasma copper, cardiac A β 1-42, cardiac TTR and brain LRP-1 levels were found to be decreased in the Alzheimer's disease model A β 1-42 group ($p < 0.05$). There was no significant difference between the groups in terms of plasma iron, zinc, manganese levels, and plasma TTR and A β 1-42 levels. It was concluded that these evaluated parameters have the potential to be used as a biomarker for Alzheimer's disease, but more studies are needed to standardize them. The amino acid taurine, on the other hand, showed positive effects on Alzheimer's disease by protecting the cardiac TTR level, decreasing the cardiac A β 1-42 level, increasing the brain LRP-1 level and also bringing the plasma copper imbalance to a normal level.

Keywords: Alzheimer's disease, taurine, transthyretin, LRP-1, metal cations