

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL ALZHEIMER HASTALIĞINDA TGF- β 1'İN
PREFRONTAL KORTEKS VE HİPOKAMPUSTE A β -40
VE α - β - γ SEKRETAZ EKSPRESYONU ÜZERİNE
ETKİLERİ**

Samet KARA

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMANI
Prof. Dr. Sait POLAT**

ADANA-2023

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL ALZHEIMER HASTALIĞINDA TGF- β 1'İN
PREFRONTAL KORTEKS VE HİPOKAMPUSTE A β -40
VE α - β - γ SEKRETAZ EKSPRESYONU ÜZERİNE
ETKİLERİ**

Samet KARA

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMANI
Prof. Dr. Sait POLAT**

ADANA-2023

KABUL VE ONAY

X X X X

ETİK BEYANI



TEŞEKKÜR

Doktora eğitim sürecimin her anında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, tezimin tüm aşamalarıyla büyük bir özen ve titizlikle ilgilenen, eşsiz bilgi birikimi ve tecrübesiyle eğitim sürecimde ve hayatımın her aşamasında yol gösterici olan, cesaret meşalemi her daim canlı tutmamı sağlayan, beraber çalıştığım her saniyesine paha biçemediğim değerli danışman hocam Prof. Dr. Sait POLAT'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimimde bilgi ve değerli katkılarını içtenlikle benimle paylaşan Değerli Hocalarım Prof. Dr. Ufuk Özgü METE'ye, Prof. Dr. Özgül TAP'a, Doç. Dr. Leman SENCAR'a ve Doç. Dr. Yurdun KUYUCU'ya teşekkürü borç bilirim.

Tez çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen, çalışmalarımda yol gösteren Fakültemiz Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Kübra AKILLIOĞLU'na ve davranış testlerinin gerçekleşmesinde yardımlarını esirgemeyen Dr. Meltem Dönmez KUTLU ve Seda KÖSE'ye teşekkürlerimi sunarım. Biyokimyasal analizlerin gerçekleşmesindeki desteklerinden dolayı Sayın Prof. Dr. Abdullah TULİ'ye ve Arş. Gör. Ü. Fulden Bozkaya AYDIN'a teşekkürlerimi sunarım. Tez İzleme Komitesinde görev yapan Nöroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Ayşe Filiz KOÇ hocama da kıymetli destekleri için sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim boyunca bana karşı hep olumlu ve güler yüzlü davranan, iyi günde kötü günde birlikte bir aile sıcaklığını paylaştığım, her birisi ayrı ayrı altın kalpli olan asistan arkadaşlarım ile değerli teknik ve idari personellerimize de çok teşekkür ederim.

Bütün yaşamım boyunca bugüne gelmem için her türlü fedakarlığı gösteren, kelimelerle anlatılması mümkün olmayan büyüklükte sevgi ve saygı beslediğim sevgili babam Mahir KARA ve sevgili annem Aliye KARA ile varlıklarıyla gurur duyduğum kardeşlerim Esra ve Neslihan'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tanıştığımız günden itibaren hayatımın her aşamasında benden desteğini esirgemeyen, bilimsel çalışmalarım süresince beni her zaman destekleyen, kıymetli zamanı ve sabrını ayırarak hep yanımda olan sevgili eşim Şüheda Soylu KARA'ya ve gerçekleri hayallerinden daha güzel olan canım kızlarım Gökçe ve Alya'ya da sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Arş. Gör. Samet KARA

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL VE ONAY	ii
ETİK BEYANI	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
ÖZET	xvii
ABSTRACT	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Demans	5
2.2. Alzheimer Hastalığı	5
2.3. Alzheimer Hastalığının Tarihçesi	5
2.4. Alzheimer Hastalığının Epidemiyolojisi	7
2.5. Beyin Histolojisi	7
2.5.1. Moleküler tabaka	8
2.5.2. Dış Granüler Tabaka	9
2.5.3. Dış Piramidal Tabaka	10
2.5.4. İç Granüler Tabaka	10
2.5.5. İç Piramidal tabaka	10
2.5.6. Multiform Tabaka	10
2.5.7. Beyin Embriyolojisi	11
2.6. Hipokampus Histolojisi	12
2.6.1. Alveus Tabakası	13
2.6.2. Stratum Oriens	13
2.6.3. Stratum Piramidalis	13
2.6.4. Stratum Lusidum	13
2.6.5. Stratum Radiatum	13

2.6.6. Stratum Lakunozum	13
2.6.7. Stratum Molekölare.....	14
2.7. Amiloid Prekürsor Protein.....	14
2.8. Amiloid Beta (A β) Peptidi.....	15
2.9. Alzheimer Hastalığının Patogenezi	17
2.9.1. Amiloid Kaskad Hipotezi.....	18
2.9.2. Amiloid Beta ve Mitokondriyal Disfonksiyon.....	20
2.9.3. Amiloid Beta ve Tau İlişkisi	21
2.9.4. Tau patolojisi.....	22
2.9.5. Tau Nörotoksitesitesi	24
2.10. Alfa (α) Sekretaz.....	25
2.11. Beta (β) Sekretaz	26
2.12. Gama (γ) Sekretaz	28
2.13. TGF- β Süper Ailesi	29
2.13.1. TGF- β 'nın Yapısı.....	30
2.13.2. TGF- β Reseptör ve Sinyal Yolakları	30
2.13.3. Yetişkin Beyninde TGF- β süper Ailesinin İfadesi ve Nörojeneze Etkisi	32
2.13.4. TGF- β 1 ve Tedavi Edici Etkileri.....	33
2.14. Kaspaz-3	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	35
3.1. Deney Hayvanlarının Elde Edilmesi ve Gruplandırılması	35
3.2. Deneysel Alzheimer Hastalığı Modeli Oluşturulması ve Deneyin Yapılışı.....	37
3.3. Işık Mikroskopik Yöntemler	37
3.4. Elektron Mikroskopik Yöntemler.....	38
3.5. İmmünohistokimyasal Yöntemler	40
3.5.1. İmmünohistokimyasal Skorlama Yöntemi.....	41
3.6. Morris Su Havuzu Eğitim Denemeleri ve Testi	41
3.6.1. Morris Su Havuzu Eğitim Denemelerinde Kullanılan Ölçütler	42
3.6.2. Morris Su Havuzu Testlerde Kullanılan Ölçütler	42
3.7. Biyokimyasal Yöntemler.....	43
3.7.1. Alfa Sekretaz Tayini	43

3.7.2. Beta Sekretaz Tayini	44
3.7.3. Gamma Sekretaz Tayini	44
3.8. İstatistiksel Analiz	45
4. BULGULAR	46
4.1. Morris Su Havuzu Testi Bulguları	46
4.1.1. 28. Gün Eğitim Denemeleri	46
4.1.2. 28. Gün Test Verileri.....	49
4.1.3. 56. Gün Eğitim Denemeleri	50
4.1.4. 56. Gün Test Verileri.....	54
4.2. Işık Mikroskopik Bulgular	56
4.2.1. Hipokampus	56
4.2.1.1. Kontrol Grubu.....	56
4.2.1.2. Sham Grubu	57
4.2.1.3. TGF- β 1 Kontrol Grubu:.....	58
4.2.1.4. Deney Grubu.....	58
4.2.1.5. Tedavi-1 (TD-1) Grubu:	59
4.2.1.6. Tedavi-2 (TD-2) Grubu:	60
4.2.2. Prefrontal Korteks	61
4.2.2.1. Kontrol Grubu.....	61
4.2.2.2. Sham Grubu	61
4.2.2.3 TGF- β 1 Kontrol Grubu.....	62
4.2.2.4. Deney Grubu.....	63
4.2.2.5. Tedavi-1 Grubu.....	64
4.2.2.6. Tedavi-2 Grubu.....	65
4.3. Elektron Mikroskopik Bulgular.....	66
4.3.1. Hipokampus	66
4.3.1.1. Kontrol Grubu.....	66
4.3.1.2. Sham Grubu	67
4.3.1.3. TGF- β 1 Kontrol Grubu.....	69
4.3.1.4. Deney Grubu.....	70
4.3.1.5. Tedavi-1 Grubu.....	72
4.3.1.6. Tedavi-2 Grubu.....	74

4.3.2. Prefrontal Korteks	74
4.3.2.1. Kontrol Grubu	74
4.3.2.2. Sham Grubu	75
4.3.2.3. TGF- β 1 Kontrol Grubu	77
4.3.2.4. Deney Grubu	78
4.3.2.5. Tedavi-1 Grubu	80
4.3.2.6. Tedavi-2 Grubu	82
4.4. İmmunohistokimyasal Bulgular	84
4.4.1. Hipokampus A β -40 İmmunohistokimyası	84
4.4.1.1. Kontrol Grubu	84
4.4.1.2. Sham Grubu	85
4.4.1.3. TGF- β 1 Kontrol Grubu	86
4.4.1.4. Deney Grubu	86
4.4.1.5. Tedavi-1 Grubu	87
4.4.1.6. Tedavi-2 Grubu	88
4.4.2. Prefrontal Korteks A β -40 İmmunohistokimyası	89
4.4.2.1. Kontrol Grubu	89
4.4.2.2. Sham Grubu	90
4.4.2.3. TGF- β 1 Grubu	91
4.4.2.4. Deney Grubu	91
4.4.2.5. Tedavi-1 Grubu	92
4.4.2.6. Tedavi-2 Grubu	93
4.4.3. Hipokampus Kaspaz-3 İmmunohistokimyası	94
4.4.3.1. Kontrol Grubu	94
4.4.3.2. Sham Grubu	95
4.4.3.3. TGF- β 1 Kontrol Grubu	95
4.4.3.4. Deney Grubu	96
4.4.3.5. Tedavi-1 Grubu	96
4.4.3.6. Tedavi-2 Grubu	97
4.4.4. Prefrontal Korteks Kaspaz-3 İmmunohistokimyası	98
4.4.4.1. Kontrol Grubu	98
4.4.4.2. Sham Grubu	99

4.4.4.3. TGF- β 1 Kontrol Grubu	99
4.4.4.4. Deney Grubu	100
4.4.4.5. Tedavi-1 Grubu	100
4.4.4.6. Tedavi-2 Grubu	101
4.4.5. İmmunohistokimyasal Bulguların İstatistiksel Değerlendirmesi	102
4.5. Biyokimyasal Bulgular	103
4.5.1. Hipokampus α -(Alfa) Sekretaz Analizi	103
4.5.2. Hipokampus β -(Beta) Sekretaz Analizi	104
4.5.3. Hipokampus γ -(Gama) Sekretaz Analizi	105
4.5.4. Prefrontal Korteks α -(Alfa) Sekretaz Analizi	106
4.5.5. Prefrontal Korteks β -(Beta) Sekretaz Analizi	107
4.5.6. Prefrontal Korteks γ -(Gama) Sekretaz Analizi	108
5. TARTIŞMA	110
6. SONUÇLAR	119
KAYNAKLAR	122
ÖZGEÇMİŞ	136

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Şekil 1. Sağlıklı ve Alzheimer hastalığı olan beyin görüntüsü	6
Şekil 2. Beynin histolojik görüntüsü.....	9
Şekil 3. Amiloidojenik ve non-amiloidojenik yolun şeması	17
Şekil 4. Beyin kesitinde senil plaklar (A β) ve nörofibriler yumakların görünümü.....	18
Şekil 5. TGF- β sinyal yolunun şematik gösterimi	31
Şekil 6. Morris su havuzu deney platformu	42
Şekil 7. Morris su havuzu testinde eğitim denemelerinde platformu bulma süresi.....	47
Şekil 8. Morris su havuzu testinde eğitim denemelerinde yüzme hızı.	48
Şekil 9. Morris su havuzu testinde hedef kadranda geçirilen süre	49
Şekil 10. Morris su havuzu testinde yüzme hızı.	50
Şekil 11. Morris su havuzu testinde eğitim denemelerinde platformu bulma süresi.....	52
Şekil 12. Morris su havuzu testinde eğitim denemelerinde yüzme hızı	54
Şekil 13. Morris su havuzu testinde hedef kadranda geçirilen süre.	55
Şekil 14. Morris su havuzu testinde yüzme hızı	56
Şekil 15. Kontrol grubu deneklerine ait hipokampus doku kesitlerinin ışık mikroskopik görünümü.....	57
Şekil 16. Sham grubuna ait deneklerden alınan hipokampus doku örneklerinin ışık mikroskopik görünümü.....	57
Şekil 17. TGF- β 1 kontrol grubu hipokampus doku kesitlerinin ışık mikroskopik görünümü	58
Şekil 18. Deney grubuna ait hipokampus doku kesitlerinin ışık mikroskopik görünümü.....	59
Şekil 19. Tedavi-1 grubu deneklerine ait hipokampus doku kesitlerinin ışık mikroskopik görünümü.....	60
Şekil 20. Tedavi-2 grubuna ait deneklerden 56. günde alınan hipokampus doku kesitlerinin ışık mikroskopik görünümü.....	60
Şekil 21. Normal kontrol grubu deneklerine ait prefrontal korteks doku kesitlerinin ışık mikroskopik görünümü.....	61
Şekil 22. Sham grubuna ait deneklerde prefrontal korteks doku kesitlerinin ışık mikroskopik görünümü.....	62
Şekil 23. TGF- β 1 uygulanan deneklere ait prefrontal korteks doku kesitlerinin ışık mikroskopik görünümü.....	63
Şekil 24. Deney grubundan deneklerinden alınan prefrontal korteks doku kesitlerinin ışık mikroskopik görünümü.....	64
Şekil 25. Tedavi-1 grubunda yer alan deneklere ait prefrontal korteks doku kesitlerinin ışık mikroskopik görünümü.....	65
Şekil 26. Tedavi-2 grubunda yer alan deneklere ait prefrontal korteks doku kesitlerinin ışık mikroskopik görünümü.....	66

Şekil 27. Kontrol grubuna deneklerden alınan hipokampus doku kesitinin elektron mikroskopik görünümü.....	67
Şekil 28. Sham grubundan 28. günde alınan hipokampus dokusunun elektron mikroskopik görünümü.....	68
Şekil 29. Sham grubundan 56. günde alınan hipokampus dokusunun elektron mikroskopik görünümü.....	68
Şekil 30. TGF- β 1 kontrol grubundan 28. günde alınan hipokampus dokusunun elektron mikroskopik görünümü.....	69
Şekil 31. TGF- β 1 kontrol grubundan 56. günde alınan hipokampus dokusunun elektron mikroskopik görünümü.....	70
Şekil 32. Deney grubu 28. günde alınan hipokampus dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	71
Şekil 33. Deney grubu 56. günde alınan hipokampus dokusunun elektron mikroskopik görünümü.....	72
Şekil 34. Tedavi-1 grubundan 28. günde alınan hipokampus dokusunun elektron mikroskopik görünümü.....	73
Şekil 35. Tedavi-1 grubundan 56. günde alınan hipokampus dokusunun elektron mikroskopik görünümü.....	73
Şekil 36. Tedavi-2 grubundan 56. günde alınan hipokampus dokusunun elektron mikroskopik görünümü.....	74
Şekil 37. Kontrol grubundan alınan prefrontal korteks dokusunun elektron mikroskopik görünümü.....	75
Şekil 38. Sham grubundan 28. günde alınan prefrontal korteks dokusunun elektron mikroskopik görünümü.....	76
Şekil 39. Sham grubundan 56. günde alınan prefrontal korteks dokusunun elektron mikroskopik görünümü.....	76
Şekil 40. TGF- β 1 kontrol grubundan 28. günde alınan prefrontal korteks dokusunun elektron mikroskopik görünümü.....	77
Şekil 41. TGF- β 1 kontrol grubundan 56. günde alınan prefrontal korteks dokusunun elektron mikroskopik görünümü.....	78
Şekil 42. Deney grubundan 28. günde alınan prefrontal korteks dokusunun elektron mikroskopik görünümü.....	79
Şekil 43. Deney grubundan 56. günde alınan prefrontal korteks dokusunun elektron mikroskopik görünümü.....	80
Şekil 44. Tedavi-1 grubundan 28. günde alınan prefrontal korteks dokusunun elektron mikroskopik görünümü.....	81
Şekil 45. Tedavi-1 grubundan 56. günde alınan prefrontal korteks dokusunun elektron mikroskopik görünümü.....	82
Şekil 46. Tedavi-2 grubundan 56. günde alınan prefrontal korteks dokusunun elektron mikroskopik görünümü.....	83
Şekil 47. Hipokampus A β -40 Negatif kontrol	84

Şekil 48. Kontrol grubuna ait hipokampus dokusu kesitlerinde A β -40 immunreaktivitesi	85
Şekil 49. Sham grubu hipokampus A β -40 immunreaktivitesi	85
Şekil 50. TGF- β 1 verilen grupta hipokampus kesitlerinde A β -40 immunreaktivitesi.	86
Şekil 51. Deney grubundan elde edilen hipokampus doku kesitlerinde A β -40 immunreaktivitesi.....	87
Şekil 52. Tedavi-1 grubunda hipokampuste A β -40 immunreaktivitesi.	88
Şekil 53. Tedavi-2 grubunda hipokampuste A β -40 immunreaktivitesi	88
Şekil 54. Prefrontal Korteks A β -40 Negatif kontrol.	89
Şekil 55. Kontrol grubuna ait prefrontal korteks dokusunda A β -40 immunreaktivitesi.	90
Şekil 56. Sham grubuna ait prefrontal korteks dokusunda A β -40 immunreaktivitesi	90
Şekil 57. TGF- β 1 grubuna ait prefrontal korteks dokusunda A β -40 immunreaktivitesi.....	91
Şekil 58. Deney grubundan elde edilen prefrontal korteks dokusunda A β -40 immunreaktivitesi.	92
Şekil 59. Tedavi-1 grubuna ait prefrontal korteks dokusunda A β -40 immunreaktivitesi	93
Şekil 60. Tedavi-2 grubuna ait prefrontal korteks dokusunda A β -40 immunreaktivitesi	93
Şekil 61. Kaspaz-3 immunreaktivitesi	94
Şekil 62. Hipokampus kontrol grubu kaspaz-3 immunreaktivitesi	94
Şekil 63. Hipokampus sham grubu kaspaz-3 immunreaktivitesi.	95
Şekil 64. Hipokampus TGF- β 1 grubu kaspaz-3 immunreaktivitesi.....	95
Şekil 65. Hipokampus deney grubu kaspaz-3 immunreaktivitesi	96
Şekil 66. Hipokampus tedavi-1 grubunda kaspaz-3 immunreaktivitesi	97
Şekil 67. Hipokampus tedavi-2 grubunda kaspaz-3 immunreaktivitesi.	97
Şekil 68. Prefrontal korteks kontrol grubu kaspaz-3 immunreaktivitesi.....	98
Şekil 69. Prefrontal korteks sham grubu kaspaz-3 immunreaktivitesi	99
Şekil 70. Prefrontal korteks TGF- β 1 kontrol grubu kaspaz-3 immunreaktivitesi.	99
Şekil 71. Prefrontal korteks deney grubunda kaspaz-3 immunreaktivitesi.	100
Şekil 72. Prefrontal korteks tedavi-1 grubu kaspaz-3 immunreaktivitesi	101
Şekil 73. Prefrontal korteks tedavi-2 grubunda kaspaz-3 immunreaktivitesi.....	101
Şekil 74. A β -40 ve kaspaz-3 için immunohistokimyasal Skorlama	103
Şekil 75. Hipokampuste 28. ve 56. günlerde alfa sekretaz enzim seviyeleri	104
Şekil 76. Hipokampuste 28. ve 56. günlerde β -(Beta) Sekretaz enzim seviyeleri	105
Şekil 77. Hipokampuste 28. ve 56. günlerde γ -(gama) sekretaz enzim seviyeleri	106
Şekil 78. Prefrontal Kortekste 28. ve 56. günlerde α -(alfa) sekretaz enzim seviyeleri	107
Şekil 79. Prefrontal Kortekste 28. ve 56. günlerde β -(Beta) sekretaz enzim seviyeleri	108
Şekil 80. Prefrontal Kortekste 28. ve 56. günlerde γ -(Gama) sekretaz enzim seviyeleri	109

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Tablo 1. Işık mikroskopik doku takip işlemi	38
Tablo 2. Elektron mikroskopik doku takip aşamaları.....	39
Tablo 3. Gömme materyalinin hazırlanışı	40
Tablo 4. Morris su havuzunda kullanılan ölçütler	43



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Aβ-40	: Amiloid Beta-40
AChE	: Asetilkolinesteraz
AH	: Alzheimer hastalığı
Apoϵ4	: Apolipoprotein- ϵ
APAF-1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
APH-1	: Anterior pharynx-defective 1
APP	: Amiloid prekürsör protein
APLP	: Amiloid prekürsör benzeri protein
Arg45	: Arjinin-45
BACE-1	: Beta site klevaj enzimi-1
Bcl-2	: B cell lymphoma-2
BDNF	: Beyin kökenli büyüme faktörü
BMP	: Kemik morfogenetik protein
BOS	: Beyin-omurilik sıvısı
BRCA1	: Breast cancer-1 geni
C⁰	: Santigrat derece
CA	: Kornu amonis
C99	: Klevaj-99
Ca⁺⁺	: Kalsiyum
CD44	: Hücre farklılaşma molekülü-44
CDK-2	: Siklin bağımlı kinaz-2
CLIP	: Sınıf-II invaryant peptit
cm	: Santimetre
COX-2	: Siklooksijenaz-2
DG	: Dentat girus
DM	: Diyabetes mellitus
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EAE	: Deneysel oto-immun ensefalomiyelit
ELISA	: Enzyme-linked immuno sorbent assay
ErbB4	: Erb-B2 reseptör tirozin-kinaz-4

ERK	: Ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz
GABA	: Gama amino bütirik asit
GDF	: Büyüme ve farklılaşma faktörü
GDNF	: Gliyal hücre kökenli nörotrofik faktör
GER	: Granüllü endoplazmik retikülüm
GFAP	: Gliyal fibriler asidik protein
GPI	: Glikozil fosfatidil inositol
GSK3β	: Glikojen sentaz kinaz-3 beta
GVD	: Granülo-vaküoler dejenerasyon
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
H&E	: Hematoksilen-eozin
IL-1	: İnterlökin-1
IL-6	: İnterlökin-6
IFN-γ	: İnterferon-gama
i.p.	: İntraperitoneal
JNK	: c-jun N-terminal kinaz
kDa	: Kilodalton
Kg	: Kilogram
LAP	: Lökil amino peptidaz
LLPS	: Sıvı-sıvı faz ayırımı
LTD	: Uzun süreli depresyon
m²	: Metrekare
MAP 1/2	: Mikrotübülle ilgili protein 1-2
MAPT	: Mikrotübülle ilgili protein tau
MBP	: Miyelin bazik protein
MCAO	: Orta serebral arter tıkanıklığı
mg	: Miligram
MIF	: Makrofaj migrasyon inhibitör faktör
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
MSS	: Merkezi sinir sistemi
mtDNA	: Mitokondriyal deoksiribonükleik asit

MWM	: Morris su tankı testi
Nf-kB	: Nüklear faktör kappa-B
NFTs	: Nörofibriler tangle
ng	: Nanogram
NGF	: Sinir büyüme faktörü
NMDA	: N-metil D-aspartat
NRG1	: Nörogulin-1
NSC	: Nöral kök hücre
O₂	: Oksijen
OsO₄	: Osmiyum tetraoksit
PC	: Piramidal hücre
PEN-2	: Presenilin enhancer-2
pg	: Pikogram
PI3K	: Fosfoinositid-3 kinaz
PPAR	: Peroksizom proliferator aktive edici reseptör
PS1/2	: Presenilin 1/2
p83	: Protein-83
ROS	: Reaktif oksijen türleri
r-Smad	: Smad reseptörleri
sAPPα	: Amiloid prekürsör protein α -klevajı
SF	: Serum fizyolojik
sn	: Saniye
SPs	: Senil plaklar
SVZ	: Subventriküler zone
TGF-β1	: Dönüştürücü büyüme faktörü-1
TGN	: Trans golgi ağı
TNF-α	: Tümör nekroz faktör- α
TREM2	: Triggering receptor expressed on myeloid cells 2
TrKB	: Tropomiyosin reseptör kinaz B
μg	: Mikrogram
μg	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre

ÖZET

Deneyisel Alzheimer Hastalığında TGF- β 1'in Prefrontal Korteks ve Hipokampusta A β -40 ve α - β - γ Sekretaz Ekspresyonu Üzerine Etkileri

Alzheimer hastalığı (AH), öğrenme ve hafıza fonksiyonlarında bozulma, günlük yaşam aktivitelerinde gerileme ile karakterize kronik, kompleks nörodejeneratif bir hastalıktır. Amiloid plaklar, nörofibriller yumak oluşumu, nöron ve sinaps kaybı ile beyinde belirgin atrofi, hastalığın en önemli histopatolojik bulgularıdır. Günümüze kadar hastalığın etiyolojisi, patogenezi ve histopatolojisi ile ilgili çok sayıda faktörün varlığı öne sürülmüş olmakla birlikte, mekanizması henüz tam olarak aydınlatılmış değildir. Amiloid beta (A β) birikimi, hastalığın patogenezinden sorumlu en temel değişikliklerdir. A β -40 ve A β -42 patogenezde yer alan önemli amiloid beta türleridir. β -sekretaz ve γ -sekretaz enzimlerinin hiperaktivasyonu sonucu amiloid prekürsör proteinin (APP) anormal kesimi ile amiloid plak oluşumu meydana gelmektedir. Dönüştürücü büyüme faktörü β 1 (TGF- β 1), hücre metabolizması, doku homeostazı, nöronal gelişim ve sinaptik plastisitede kritik rollere sahip önemli bir büyüme faktörüdür. TGF- β 1'in, nörodejeneratif hastalıkların oluşumu ve ilerlemesinin önlenmesinde antienflamatuvar etkisi ile yararlı olabileceği ileri sürülmüştür. TGF- β 1'in eksitotoksiste, iskemi ve hipoksi koşullarında nöron koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Yaşlanma ve kronik enflamasyonlarda, TGF- β 1/Smad sinyalinin inaktivasyonu, mikrogliya aracılı nörodejenerasyonu uyarmaktadır. Dolayısıyla TGF- β 1 sinyalizasyonunun düzenlenmesi, AH tedavisinde yeni bir farmakolojik strateji olabilir. Literatürde TGF- β 1'in nöroprotektif etkisini gösteren çalışmalar yer alsa da Alzheimer hastalığında TGF- β 1'in A β birikiminde etkin rol olan sekretaz enzimleri üzerine etkisi ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada deneyel AH benzeri hastalık modelinde TGF- β 1'in α , β ve γ -sekretaz enzimlerinin regülasyonu, A β -40 birikimi, apoptoz ve nöronal hasar üzerine etkisinin incelenmesi amaçlandı.

Seksen sekiz adet erkek Swiss-Albino cinsi fare rastgele ayrılarak, herhangi bir uygulamanın yapılmadığı kontrol grubu, yalnızca SF uygulamasının yapıldığı sham grubu, TGF- β 1 uygulanan grup, 28 gün boyunca Skopolamin uygulanan deney grubu ve Skopolamin+TGF- β 1 uygulanan tedavi grubu olmak üzere 5 gruba bölündü. Tedavi grubunda yer alan fareler kendi içinde 2 alt gruba ayrıldı. Sham, TGF- β 1 kontrol, deney, tedavi-1 ve tedavi-2 grupları 56. güne kadar bekletilerek uygulanan yöntemlerin uzun süreli etkileri de incelendi. 28. ve 56. Günlerde Morris su havuzu testi uygulanarak hafıza ve bellek fonksiyonları incelendi. Tüm gruplardan 28. ve 56. günlerde alınan hipokampus ve prefrontal korteks dokuları ışık ve elektron mikroskopik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle incelendi.

Morris su havuzu testinde deney gruplarında, hafıza ve bellek performansının azaldığı görülürken, tedavi gruplarında hafıza ve bellek performansının tekrar yükseldiği gözlemlendi. A β -40 ve kaspaz-3 immunreaktivitesinin hipokampus ve prefrontal kortekste deney grubunda 28. ve 56. günlerde arttığı, TGF- β 1 tedavisi sonucu immunreaktivitenin azaldığı gözlemlendi. Işık ve elektron mikroskopik incelemelerde deney gruplarında nöronlarda ve gliya hücrelerinde yapısal değişikliklerin varlığı tespit edildi. TGF- β 1 tedavi gruplarında hücresel değişikliklerin nispeten azaldığı gözlemlendi. α -sekretaz ekspresyonunun deney gruplarında azaldığı görülürken, tedavi gruplarında arttığı tespit edildi. β ve γ - sekretaz enzim seviyelerinin deney gruplarında arttığı, tedavi gruplarında ise azaldığı belirlendi.

Skopolaminle oluşturulan Alzheimer benzeri hastalık modelinde TGF- β 1'in hafıza ve bellek performansını artırarak, A β -40 birikimini engellemesiyle Alzheimer hastalığı üzerine tedavi edici etkisinin olabileceği düşünüldü. Ayrıca kaspaz-3 ekspresyonunu down-regule ederek nöronal hasarın önlenmesinde etkili olabileceği belirlendi. Aynı zamanda α , β ve γ -sekretaz enzimleri üzerinde düzenleyici rolü ile hastalığın önlenmesinde etkili olabileceği gösterildi. Bütün bulgular birlikte değerlendirildiğinde, TGF- β 1'in Alzheimer hastalığında tedavi edici bir ajan olarak değerlendirilebileceği kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer hastalığı, A β -40, Işık ve Elektron Mikroskopi, TGF- β 1 ve α , β , γ -sekretaz enzimleri

ABSTRACT

Effects of TGF- β 1 on A β -40 and α - β - γ Secretase Expression in Prefrontal Cortex and Hippocampus in Experimental Alzheimer's Diseases

Alzheimer's disease (AD) is a chronic complex neurodegenerative disease characterized by impaired learning and memory functions and regression in activities of daily living. Amyloid plaques, neurofibrillary tangle formation, loss of neurons and synapses, and marked atrophy in the brain are the most important histopathological findings of the disease. Although many factors related to the etiology, pathogenesis and histopathology of the disease have been suggested to date, the exact mechanism is not yet known. Amyloid beta (A β) deposition is the most fundamental change responsible for the pathogenesis of the disease. A β -40 and A β -42 are important amyloid beta species in the pathogenesis. Amyloid plaque formation occurs with abnormal cleavage of amyloid precursor protein (APP) as a result of hyperactivation of β -secretase and γ -secretase enzymes. Transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) is an important growth factor with critical roles in cell metabolism, tissue homeostasis, neuronal development and synaptic plasticity. It has been suggested that TGF- β 1 may be beneficial in preventing the formation and progression of neurodegenerative diseases with its anti-inflammatory effect. TGF- β 1 has been shown to have neuroprotective effects in conditions of excitotoxicity, ischemia, and hypoxia. In aging and chronic inflammation, inactivation of TGF- β 1/Smad signaling induces microglia-mediated neurodegeneration. Thus, regulation of TGF- β 1 signaling may be a new pharmacological strategy in the treatment of AD. Although there are studies showing the neuroprotective effect of TGF- β 1 in the literature, no study has been found on the effect of TGF- β 1 on secretase enzymes, which have an active role in A β accumulation in Alzheimer's disease. In this study, it was aimed to examine the effect of TGF- β 1 on the regulation of α , β and γ -secretase enzymes, A β -40 accumulation, apoptosis and neuronal damage in an experimental AD-like disease model.

Eighty-eight male Swiss-Albino mice were randomly divided into 5 groups as the control group without any treatment, the sham group in which only SF was applied, the group in which TGF- β was administered, the experimental group in which Scopolamine was applied for 28 days, and the treatment group in which Scopolamine + TGF- β 1 was applied. The mice in the treatment group were also divided into 2 subgroups. In order to examine the long-term effects of the applied methods, sham, TGF- β 1 control, experiment, treatment-1 and treatment-2 groups were followed until the 56th day, and the Morris water pool test was applied on the 28th and 56th days, and memory functions were examined. Hippocampus and prefrontal cortex tissues taken from all groups on the 28th and 56th days were examined by light and electron microscopic, immunohistochemical and biochemical methods.

In the Morris water pool test, it was observed that memory performance decreased in the experimental groups, while memory performance increased again in the treatment groups. It was observed that A β -40 and caspase-3 immunoreactivity increased in the hippocampus and prefrontal cortex on the 28th and 56th days in the experimental group, and immunoreactivity was decreased as a result of TGF- β 1 treatment. Structural changes were detected in neurons and glial cells in the experimental groups in light and electron microscopic examinations. It was interesting that cellular changes were relatively decreased in TGF- β 1 treatment groups. It was found that α -secretase expression decreased in the experimental groups, while it increased in the treatment groups. It was determined that β and γ -secretase enzyme levels increased in the experimental groups and decreased in the treatment groups.

It was thought that TGF- β 1 might have a therapeutic effect on Alzheimer's disease by increasing memory performance and preventing A β -40 accumulation in the Alzheimer's-like disease model induced by scopolamine. In addition, it was determined that it may be effective in preventing neuronal damage by down-regulating caspase-3 expression. At the same time, it has been shown that it can be effective in preventing the disease with its regulatory role on α , β and γ -secretase enzymes. When all the findings were evaluated together, it was concluded that TGF- β 1 could be evaluated as a therapeutic agent in Alzheimer's disease.

Keywords: Alzheimer's disease , A β -40, Light and Electron Microscopy, TGF- β 1 and α , β , γ -secretase enzymes.

1. GİRİŞ

Alzheimer hastalığı (AH), farklı derecelerde bilişsel faaliyetlerde bozukluk, günlük yaşam aktivitelerinde azalma ve bellek değişiklikleri ile karakterize kompleks nörolojik bir hastalıktır (1). Senil plaklar (SPs), nörofibriler yumaklar (NFTs), sinaptik kayıp ve nörodejenerasyon, hastalığın temel patolojik bulgularıdır. Senil plaklar, merkezi sinir sisteminde amiloid beta ($A\beta$) adı verilen proteinin birikimiyle oluşur. Diğer yandan, hiperfosforile olmuş tau proteinlerinin nöronlarda birikimiyle oluşan nörofibriler yumaklar da AH'nda görülen önemli diğer bir patolojik süreci temsil etmektedir. En sık gözlenen nörodejeneratif hastalık olarak görülen AH'nda sinir hücrelerinde ilerleyici hasar sonucu, sinir sistemi fonksiyonlarında önemli derecede kayıp meydana gelir (2).

Günümüze kadar yapılan araştırmalarda AH'nın oluşumu ve tedavisi üzerinde çok önemli gelişmeler kaydedilmiş olmakla birlikte, hastalığın oluşumu ile ilgili patolojik süreçlerin sebepleri halen tam olarak bilinmemektedir (3). Hastalığın oluşumunda en kritik patolojik etkenlerden birisi olan amiloid beta birikimiyle oluşan senil plakların, başlıca beyin korteksinde biriktiği ve daha sonra diğer beyin bölgelerine yayıldığı rapor edilmiştir (4, 5, 6). AH'nın oluşumunda genetik mutasyonların yanında, kronik hastalıkların varlığının da etkili olduğu bilinmektedir. Bu nedenle AH'nın oluşumunda yaş, aile öyküsü, apoE4 geni, orta düzeyli bilişsel kayıp, kardiyovasküler risk faktörleri, Diyabetes Mellitus (DM), sosyal ve bilişsel yükümlülükler ile travmatik beyin hasarı gibi pek çok faktör rol almaktadır. Alzheimer hastalığının toplumlarda görülme sıklığının oldukça farklı olduğu bilinmekle beraber, genellikle 65 yaş altı bireylerde %5, 65-74 yaş grubunda %12-15, 75-84 yaş arasında %19-44, 85 ve üzeri yaşlarda ise %38-42 oranında gözlenebildiği rapor edilmiştir (7, 8, 9). Hastalarda beyin korteksi ve hipokampusta yaygın senil plakların görüldüğü ve oluşan nörodejenerasyona bağlı olarak özellikle hipokampusta % 45-55 oranında sinaptik kaybın meydana geldiği bildirilmiştir (10). Senil plakların major komponenti olan amiloid betanın ($A\beta$), nöronlar, gliya hücreleri ve kapiller endotel hücreleri üzerinde toksik etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (11). $A\beta$ peptidinin daha büyük bir transmembran protein olan amiloid prekürsör protein (APP)'den proteolitik yolla oluştuğu bilinmektedir (12). Bu peptidinin, $A\beta$ -40 ve $A\beta$ -42 formlarının Alzheimer hastalarının beyin dokuları ve

serebral damarlarda nörotoksik etkiye sahip olduğu, A β birikimine bağlı olarak nörovasküler fonksiyonların bozulduğu ve oluşan hücrel dejenerasyonun kronik hale geldiği rapor edilmiştir. Aynı zamanda, meydana gelen oksidatif stres ve kalsiyum dengesindeki değişiklikler, nöronlarda iyon kanallarının yapısına zarar vermekte ve uzun süreli elektriksel aktivitenin bozulması sonucu nöron ölümü ve fonksiyon kaybı oluşmaktadır (13, 14). A β , β -site APP ayırma enzimi-1 (BACE1) ve presenilin-1 (PS1) olarak da isimlendirilen β -sekretaz ve γ -sekretaz aracılı sıralı bölünme ile α -sekretaz enziminin aktif şekilde görevini yapamaması sonucu, amiloid prekürsör proteinden üretilmektedir (15, 16). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, A β 'nın sağlıklı bireylerin plazma ve serebrospinal sıvısında düşük seviyelerde bulunduğu ve uzun süreli Hipokampus aktivitesi, sinirsel iletim ile hafıza için gerekli olduğu vurgulanmıştır (2, 17, 18). Bununla birlikte, A β üretiminde görülen artışa bağlı olarak, nöronlarda ve ekstrasellüler alanlarda aşırı A β birikiminin meydana gelmesi, AH'nın gelişimi ve ilerleyişinde çok önemli bir aşama olarak değerlendirilmektedir (11).

A β 'nın birikimine bağlı olarak, başlıca nöronlarda ve gliya hücrelerinde apoptotik mekanizmaların aktive olması önemli diğer bir patolojik süreçtir. A β , hücrelerde mitokondriyal disfonksiyona yol açarak, reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışına yol açmaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalarda, A β 'nın anahtar enzimlerin aktivitelerini azaltarak mitokondriyal dinamikleri bozduğu, buna bağlı olarak da elektron taşıma zincirinin zarar gördüğu rapor edilmiştir. Oluşan patolojik değişiklikler sonucunda oksidatif stres, aksonal taşımada işlev bozukluğu ve mitokondriyal DNA hasarı oluşmaktadır. A β plaklarının oluşumundan önce çözünür haldeki A β , hidrojen peroksit seviyesinde değişime ve sitokrom-c oksidaz aktivitesinde azalmaya sebep olmaktadır. Mitokondriyonlarda A β birikimine bağlı olarak, mitokondriyal membranda oksidatif hasarla birlikte, lipid polaritesi ve protein hareketliliğinde bozulma ile solunum zinciri inhibe olmaktadır. Mitokondriyal membran geçirgenliği ve sitokrom-c salınımının artması sonucu apoptoz kaskadının aktive olması ile birlikte de nöronal ölüm ve enflamatuvar süreçler uyarılmaktadır (19).

Amiloid beta birikimi ve APP'nin anormal şekilde kesilmesi, AH'nın oluşumunda önde gelen sebeplerdir. Son yıllarda bilişsel ve kognitif belirtilerin önlenmesi ve oluşan patolojik değişikliklerin ortadan kaldırılmasına yönelik farklı tedavi yaklaşımları mevcuttur. Günümüzde AH'nın semptomlarını iyileştirme ve

hastalığın ilerlemesini durdurmaya yönelik tedavi seçenekleri ön plana çıkmıştır. AH'nda asetilkolinesteraz (AChE) inhibitörü ve N-metil D-aspartat (NMDA) reseptör antagonisti olan ilaçlar, semptomatik tedavi amacıyla kullanılmakla birlikte yan etkileri nedeniyle bazı sınırlamaları da beraberinde getirmektedir (20). Diğer taraftan, son yıllarda AH'nda gen tedavisi yaklaşımı da literatürde sıklıkla yer almaktadır. Gen tedavisinde ana hedef, hastalığın önlenmesinde etkili olacağı düşünülen molekülün yeterli seviyede, uzun süreli ekspresyonunu sağlamaktır (21).

Günümüzde AH'nın tedavisinde, aktif ve pasif immunoterapi yöntemi ile A β birikiminin engellenmesi düşünülmektedir. Bu amaçla geliştirilen aşılarla ileri gelişmeler kaydedilmiş ve daha çok AH'nın başlangıç döneminde tedavinin oldukça etkili olabileceği hastalık modellerinde gösterilmiştir (22). Sinir büyüme faktörü (NGF) ve Beyin kökenli nörotropik faktör (BDNF) gibi büyüme faktörleri, merkezi ve periferik sinir sisteminin gelişim ve fonksiyonunda yer alan önemli büyüme faktörleridir. Yakın zamanda yapılan araştırmalarda NGF ve BDNF gibi büyüme faktörlerindeki dengenin bozulması veya yetersizliğin AH'nın oluşumunda etken olabileceği rapor edilmiştir. Dolayısıyla AH patolojisinde, büyüme faktörlerinin yeterli düzeyde varlığına ilişkin yaklaşımlar ideal tedavi seçenekleri arasında ön plana çıkmaktadır (23, 24).

AH'nın oluşum mekanizmalarının anlaşılması ve hastalığın tedavisinde in-vivo ve in-vitro koşullarda deneysel araştırmalar yoğun olarak yürütülmektedir. Muskarinik asetilkolin reseptör antagonisti olan skopolamin uygulamasının deneysel AH modeli oluşturmada etkili bir yöntem olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir. Skopolamin'in, AH'na benzer bilişsel amneziyle birlikte, beyinde A β ve tau birikimi ile elektro-fizyolojik değişikliklere neden olduğu rapor edilmiştir (25).

Dönüştürücü büyüme faktörü β 1 (TGF- β 1), TGF- β süper ailesinin bir üyesi olup, hücre metabolizması, doku homeostazının kontrolü, nöronal gelişim ile sinaptik plastisitede kritik rolleri olan önemli bir büyüme faktörüdür. Çok yönlü etkiye sahip bir sitokin olan TGF- β 1'in, antienflamatuvar etkisi ile nörodejeneratif hastalıkların oluşumu ve ilerlemesinin önlenmesinde önemli olabileceği ileri sürülmüştür. TGF- β 'nın beyinde hipokampus ve prefrontal kortekste yoğun olarak lokalize olduğu, eksitotoksosite, iskemi ve hipoksi koşullarında nöron koruyucu etkiye sahip olduğu literatürde gösterilmiştir. Yaşlanma ve kronik enflamasyonda, TGF- β 1/smad sinyalinin inaktivasyonu, mikrogliya aracılı nörodejenerasyonu uyarmaktadır. Bu nedenle, TGF-

β 1 sinyalizasyonunun düzenlenmesi, AH tedavisinde yeni bir farmakolojik strateji olabilir. TGF- β 1 sinyalinin bozulmasının, hücrelerde A β birikimi ile nörofibriler yumak oluşumunu tetikleyebileceği rapor edilmiştir (26). TGF- β 1'in AH'nda nöroprotektif etkisinin olduğu ileri sürülse de etki mekanizması halen tam olarak aydınlatılmamıştır. Bugüne kadar yapılan araştırmalarda, TGF- β 1'in AH'nda A β birikiminde rol alan α , β ve γ -sekretaz enzim ekspresyon düzeyleri üzerine etkisini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Sunulan çalışmada deneysel AH modelinde, TGF- β 1'in, beyinde A β -40 birikimi, α , β ve γ -sekretaz enzimlerinin ekspresyonu ve apoptoz üzerine etkilerinin mikroskopik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle incelenmesi amaçlandı. TGF- β 1'in intraperitoneal yolla sistemik uygulanmasının AH üzerinde tedavi edici ve profilaktik etkisi, farklı tedavi gruplarında, öğrenme ve belleğin kritik merkezleri olan hipokampus ve prefrontal kortekste bu çalışmada ilk defa araştırıldı. Ayrıca TGF- β 1'in uzaysal öğrenme ve bellek üzerine etkisi de fizyolojik davranış testleriyle analiz edildi.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Demans

Demans (bunama), düşünme, hatırlama ve akıl yürütme gibi bilişsel işlevlerin ve davranışsal yeteneklerin, kişinin günlük yaşamını ve faaliyetlerini engelleyebilecek düzeyde kaybı olarak tanımlanır. Demansta özellikle hafıza, dil becerileri, görsel algı, problem çözme, kendi kendini yönetme, odaklanma ve dikkat etme yeteneği etkilenebilmektedir. Demans hastaları derecesi değişmekle birlikte duygularını kontrol edemezler ve kişilikleri değişebilir. Demansın şiddeti, kişinin yaşamını etkilemeye başladığı en hafif aşamadan, kişinin temel yaşam aktiviteleri için tamamen başkalarına bağımlı olması gereken en şiddetli aşamaya kadar değişir. Beyindeki nöronların hasar sonrası fonksiyon kaybı gerçekleştiğinde diğer nöronlarla bağlantıları kesilir ve yaygın nöron ölümü gerçekleştiğinde demans belirtileri ortaya çıkar. Normalde de yaşlanmaya bağlı beyinde nöron kaybı gözlenmekle birlikte, demans hastalarında sinir hücre kaybının ileri düzeyde olduğu belirlenmiştir (27). Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı ve vasküler bozukluklar gibi pek çok nörodejeneratif hastalığın demansa yol açtığı bilinmektedir. Bununla birlikte demans hastalarının yaklaşık %60-70'ini Alzheimer hastaları oluşturur. Bunun yanında, vasküler demansın %20, Lewy cisimciği demansının %10 ve frontotemporal demansın da %2 oranında görüldüğü rapor edilmiştir (28).

2.2. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı (AH), kronik ve ilerleyici bir hastalık olup, nörodejenerasyon ve hafıza kaybı ile karakterize demansın en önde gelen sebeplerinden olan kompleks bir hastalıktır (29). AH klinik olarak erken ortaya çıkan hafıza kaybıyla birlikte, bilişsel ve davranışsal bozukluklar ile karakterize edilmektedir (30, 31). Son yıllarda yaygın olarak görülen AH'nın, 2050 yılında tüm dünyada yaklaşık 135 milyon insanı etkileyeceği tahmin edilmektedir (32).

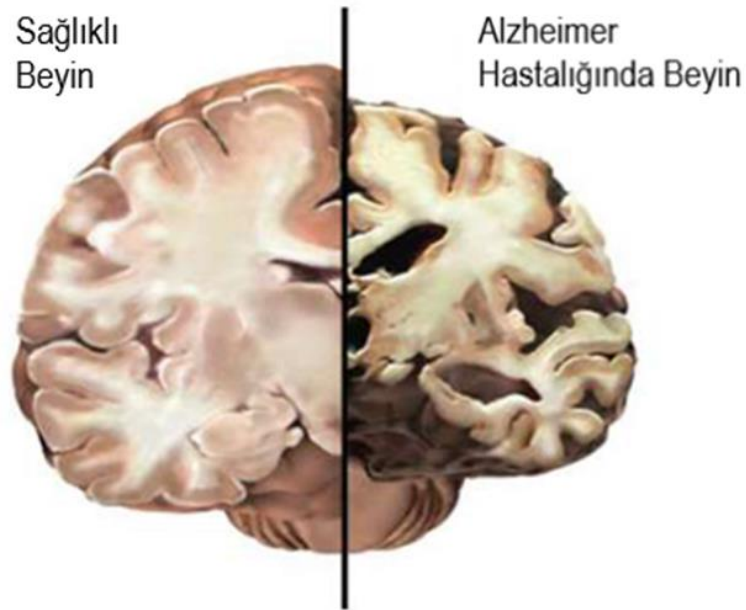
2.3. Alzheimer Hastalığının Tarihçesi

Alzheimer hastalığı, ilk kez 1906'da Alman psikiyatrist Dr. Alois Alzheimer tarafından presenil demans olarak tanımlanmıştır. Dr. Alzheimer, ilerleyici bilişsel

kayba sahip bir hastanın ölümü sonrasında yapılan beyin otopsisinde, beyin dokusunda çok sayıda miliyer odaklar tespit etmiştir. Senil demans olarak isimlendirilen bu bulgulara sahip hastaların beyin dokularında belirgin olarak atrofi geliştiği gösterilmiştir (32, 33).

Alzheimer hastalığında ortaya çıkan serebral atrofinin, kan akımının aşamalı olarak bozulmasına bağlı olarak geliştiği rapor edilmiştir. Alois Alzheimer, Bielschowsky metodu ile demansı olan 51 yaşında bir kadın hastada sıra dışı yeni bir nöronal patolojiyi tanımlamıştır. Nöron sitoplazmasında fibriler yumaklar ile presenil demansta da tanımlanan, plak benzeri yapıları tespit etmiştir (Şekil-1). Hastalığın başlangıç yaşı, hızlı ilerleyişi ve lezyonların şiddetindeki artış senil demanstan farklı olarak değerlendirilmiştir. Daha sonra yapılan araştırmalarda senil plaklar ve nörofibriler yumaklara sahip presenil demans vakalarının tespit edilmesi ile bu hastalığın "Alzheimer Hastalığı" olarak isimlendirilmesi sağlanmıştır (34).

Alzheimer hastalığının tanımlanmasından günümüze kadar yapılan çalışmalarda, hastalığın patogeneze yönelik geliştirilen hipotezlerde A β ve Tau birikimi, hastalığın gelişim sürecinde esas hedef olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte A β ve Tau birikiminin altında yatan mekanizmaların tam olarak anlaşılabilmesi için ileri çalışmalar halen günümüzde de sürdürülmektedir (35).



Şekil 1. Sağlıklı ve Alzheimer hastalığı olan beyin görüntüsü (36).

2.4. Alzheimer Hastalığının Epidemiyolojisi

AH, tüm dünyada toplumsal, sosyal ve mali yükü olan çok önemli bir halk sağlığı sorunudur. Günümüzde AH'nın dünyada gelişmiş veya gelişmekte olan birçok ülkede yaşlı ve yetişkinler arasında önde gelen ölüm nedenlerinden birisi olduğu kabul edilmektedir. Hastaların doğrudan bakımı ve tedavisi için yılda yaklaşık 200 milyar dolar harcandığı hesaplanmıştır. AH, tek bir nedene bağlı olmayan multifaktöriyel bir hastalıktır ve pek çok risk faktörünün hastalığın gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. AH'nın gelişiminde en büyük risk faktörünün yaşlanma olduğu kabul edilmektedir. AH'na yakalanma olasılığının yaşla birlikte katlanarak arttığı ve bu oranın 65 yaş ve üzerinde, her 5 yılda bir ikiye katlandığı bildirilmiştir (37). Bununla birlikte, genetik mutasyona sahip veya ailesel AH geçmişi olan bireylerde hastalığın çok daha erken başlayabildiği de rapor edilmiştir (38).

Ailesel AH geçmişi olan bireylerde, kromozom-1 ve 14'te bulunan presenilin genlerinde veya kromozom 21'de bulunan amiloid prekürsör protein (APP) geninde otozomal dominant mutasyon gözlenmektedir. Ayrıca, Down sendromlu (trizomi 21) bireylerde de erken başlangıçlı AH gelişme riskinin yüksek olduğu bildirilmiştir. AH'nın kadınlar arasında daha yüksek olduğu ve bu durumun kadınlardaki daha uzun yaşam süresi ile ilgili olduğu düşünülmektedir (39). Diğer taraftan düşük eğitim kazanımının AH görülme sıklığını arttıran risklerden biri olduğu vurgulanmıştır (40). Günümüze kadar yapılan araştırmalar serebrovasküler risk faktörlerinin AH'nın gelişmesinde ve ilerlemesinde çok önemli bir yer tuttuğunu göstermektedir. Ayrıca diyabet, hipertansiyon, obezite ve sigara öyküsü olan kişilerde AH riskinin yüksek olduğu bildirilmiştir (41). Bunlara ilaveten, birinci derece akrabalarında AH görülen bireyler ile bilinç kaybı ve kafa travması geçiren kişilerde de hastalığın oluşum riskinin yüksek olduğu kabul edilmektedir (42).

2.5. Beyin Histolojisi

İnsan beyni, yaklaşık seksen altı milyar nöron içeren, vücudun en karmaşık yapısı olarak kabul edilir. Merkezi sinir sistemi (MSS), gri ve beyaz cevherden oluşur. Gri cevher nöronlar, gliya hücreleri ve kan damarlarından oluşurken, beyaz cevher gliya hücreleri, sinir hücrelerinin aksonal uzantıları ve kan damarlarını içermektedir. Serebral korteks, nöronlardan oluşan, birbirleriyle bağlantılı çok tabakalı bir düzenlenmeye

sahiptir. Serebral kortekste yer alan sinir hücreleri piramidal hücreler, fusiform hücreler ve granüler hücreler olmak üzere sınıflandırılır. Kortekste görülen diğer hücre tipleri Cajal-Retzius hücreleri ve Martinotti hücreleridir (43, 44, 45).

Piramidal Hücreler: Korteksin hücresel bileşeninin %75'ini oluşturan nöronlardır. Piramidal nöronlar büyük çaplı nöronlar olup, farklı büyüklüklere sahip olabilmektedir. Genellikle beyin korteksinin yüzeyine doğru ilerleyen bir apikal dendrite ve çoklu bazal dendritlere sahiptir. Akson çoğunlukla beyaz cevhere uzanmaktadır (46).

Fusiform Hücreler: Korteksin derinlerinde yer alan nöronlardır. Dendritleri kortikal yüzeye doğru uzanır, aksonları ise komissural, assosiyasyon veya projeksiyon liflerine katılır.

Granüler (Stellat) Hücreler: Çoğunluğu küçük olan nöronlardır. Korteksin yüzeyinde sayıları az olmakla birlikte, diğer tabakalar daha fazla sayıda bulunan nöronlardır. Fonksiyonel olarak uyarıcı veya inhibitör nöronlar olarak kabul edilir.

Cajal-Retzius Hücreleri: Beyin korteksinin yüzeysel tabakasında yer alan, akson ve dendrite sahip, çok az sayıda bulunan nöronlardır.

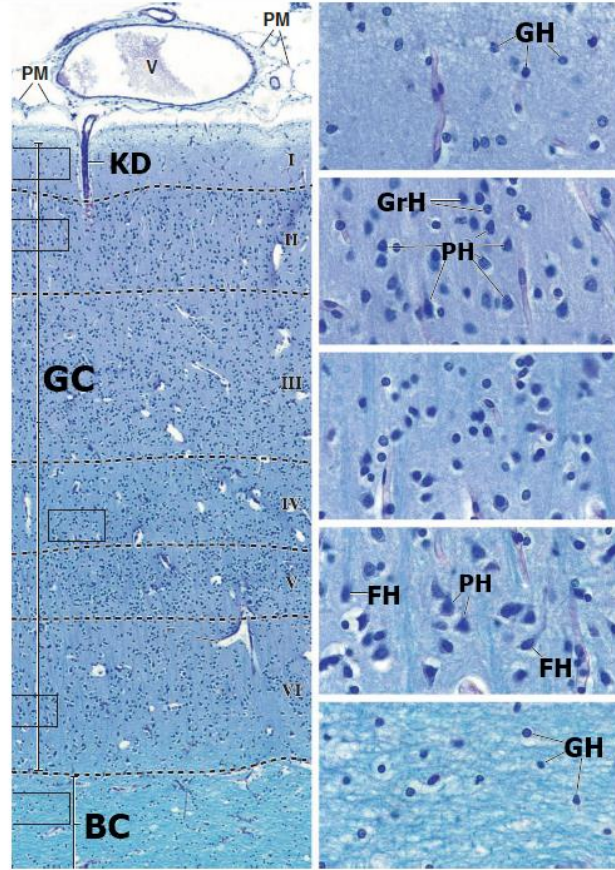
Martinotti Hücreleri: Korteksin derin tabakalarında yer alan ters piramidal nöronlardır. Aksonları korteks yüzeyine doğru uzanır (44, 47).

Beyin korteksi özel boyama teknikleri ile incelendiğinde nöronların tabakalar şeklinde düzenlendiği görülür. Beyin kesitinde nöronların perikaryonlarını belirleyen boya metodlarının uygulanmasıyla, perikaryonların yerleşim düzeni yönünden 6 korteks tabakası ayırt edilir. Bu şekilde tabakalara ayırma, hücresel yapı düzeni veya sitoarkitektür olarak adlandırılır. Buna göre beyin korteksi tabakaları; en yüzeyden beyaz cevhere doğru, moleküler tabaka, dış granüler tabaka, dış piramidal tabaka, iç granüler tabaka, iç piramidal tabaka ve multiform tabaka olarak sıralanır (Şekil 2) (48).

2.5.1. Moleküler tabaka

Pia materin hemen altında en yüzeyel kat olup, başlıca yüzeye paralel seyreden ve daha derindeki hücrelerden köken alan lifler ile küçük sinir hücresi perikaryonlarından meydana gelir. Sinir hücrelerinin perikaryonları iğ şeklinde, yassılaşmış ve çok kutupludur. Dendrit ve aksonları kısadır. Miyeloarkitektürü III. kattaki piramidal nöronların dendritleri ile yine aynı katta yer alan ters piramidal

hücrelerin (Martinotti hücreleri) aksonlarının bu kata ulaşarak yüzeye paralel dallanmalar göstermeleri ile oluşur.



Şekil 2. Beynin histolojik görüntüsü. Beyin korteksinde (gri cevherde, GC) nöronlar ve gliya hücreleri izlenmektedir. Beyaz cevherde gliya hücrelerinin (GH) varlığı görülmektedir. Gri cevherde granüler hücreler (GrH), fusiform hücreler (FH), piramidal hücreler (PH)'in varlığı ile pia mater (PM)'de yer alan geniş bir ven (V) izlenmektedir (49).

2.5.2. Dış Granüler Tabaka

Çoğunlukla küçük granüler hücrelerden oluşur. Nöronların küçük boyutta olmasından dolayı granüler bir görünüme sahiptir. Sinir hücreleri çok kutupludur, dendrit ve aksonları kısadır, bulundukları katta kalırlar. III. katta yer alan piramidal hücrelerin dendritleri I. kata geçmek için bu kattan geçer.

2.5.3. Dış Piramidal Tabaka

Dış piramidal tabakada büyük piramidal hücreler yer alır. Nöron perikaryonları piramidal şekilli olup, 20-30 mikron kadar çapa sahiptir. Dendritleri I. kata kadar uzanarak, orada yüzeye paralel olarak dallanır. Tabandan çıkan aksonlar alttaki katları geçerek demetler halinde bağlayıcı ve komissural lifler olarak beyaz cevhere girer. Bu tabakada pek çok küçük granül hücreleri de bulunur. Bunlara ilaveten bu tabakada aksonları moleküler tabakaya kadar uzanan, ters piramit şeklindeki Martinotti hücreleri de yer almaktadır.

2.5.4. İç Granüler Tabaka

Granüler hücrelerden ve az sayıda piramidal hücrelerden oluşur. Perikaryonların sıklığı buraya granüllü bir görünüm verir. Granüler hücrelerin aksonları kortekste sinaps yaparken, piramidal hücrelerin aksonları korteks içinde daha derin tabaka hücreleriyle sinaps yapar veya korteksi geçerek beyaz cevhere katılır. Bu katın genişliği korteksin çeşitli bölgelerinde birbirlerinden farklıdır. Motor ve ön motor bölgesinde oldukça kalındır.

2.5.5. İç Piramidal tabaka

Beynin en büyük çaplı nöronlarının bulunduğu tabakadır. Bu tabakada aynı zamanda orta büyüklükte piramidal hücreler de yer alır. 40-60 mikron kadar çapa sahip, büyük piramidal hücrelere Betz'in dev piramidal hücreleri denir. Nöron perikaryonundan ayrılan dendritler I. kata çıkar ve orada yüzeye paralel olarak dallanır. Büyük piramidal hücrelerin aksonları uzundur ve beyaz cevhere geçer.

2.5.6. Multiform Tabaka

Multiform tabaka çeşitli şekillerdeki hücreleri içerir. Büyük çaplı perikaryona sahip nöronların dendritleri II. ve III. katlara çıkar, aksonları ise beyaz cevhere girer. Bu tabakada ters piramidal hücreler olan Martinotti hücreleri de bulunur. Bunların aksonları I. kata çıkar. Aksonlardan ve kollateral uzantılardan oluşan yüzeye paralel uzantı demetleri de gözlenir. Bu kat motor bölgelerde kalın, duyuusal bölgelerde incedir.

Beyin korteksinin yapısal düzenlenmesi beyinin hemen her bölgesinde aynıdır ve bu yapı düzenine sahip korteks izokorteks olarak adlandırılır. Bazı alanlarda ise korteks değişik hücresel düzenlenme gösterir ve allokorteks adını alır (44, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55).

Gri cevherin altında yer alan beyaz cevher, nöroglia hücreleri ile desteklenen ve farklı yönlerde seyreden sinir lifi demetlerinden (aksonlardan) meydana gelir. Sinir lifleri, aynı hemisfere ait korteksin değişik bölgelerini birbirine bağlayan, bağlayıcı lifler (assosiyasyon lifleri), bir hemisfere ait korteks bölgelerini, karşı diğer hemisferin korteks bölgelerine bağlayan komissural lifler ile beyin korteksini daha derindeki merkezlere bağlayan projeksiyon lifleri olarak sınıflandırılır (56).

2.5.7. Beyin Embriyolojisi

Merkezi sinir sistemi, embriyoda 3. haftanın başında, primitif düğümün önünde, dorsal orta hatta nöral plak olarak adlandırılan terlik biçiminde, ektodermin kalınlaşması şeklinde ortaya çıkar. Nöral plağın yan kenarları kısa süre sonra yükselerek nöral kıvrımları oluşturur. İleri gelişim sırasında, nöral kıvrımlar yükselmeye devam ederek orta hatta birbirlerine yaklaşırlar ve nöral oluğu oluştururlar. Daha sonra uçlar birbirleriyle kaynaşarak nöral tüpü meydana getirir. Kapanma servikal bölgede başlar, sefalik ve kaudal yöne doğru ilerler. Nöral tüpün ön ve arka kısımları geçici olarak açık kalır. Nöropor olarak adlandırılan bu açıklıklar, amniyon sıvısı ile nöral tüp arasında, geçici bir süre devamlılık sağlayarak, nöral tüpün kan damarları oluşana kadar beslenmesini sağlar. Kranial nöroporun kapanması, servikal bölgedeki kapanma alanından kraniale doğru ilerler ve bu bölgeden daha sonra ön beyin gelişir. Kranial nöropor, 18-20 somitlik evrede (25. günde), kaudal nöropor ise yaklaşık 3 gün sonra, 28. günde kapanır. Nöral tüpün sefalik ucundan 3 genişleme şeklinde primer beyin vezikülleri (Prosensefalon, mezensefalon ve rombensefalon), kaudal ucundan ise medulla spinalis gelişir.

Gelişim sırasında orta beyinde sefalik fleksür, arka beyin ile spinal kord arasında da servikal fleksür şekillenir. Embriyo 5 haftalık olduğunda prosensefalonun uç kısmından gelişen telensefalon, iki primitif lateral hemisferi oluşturur. Prosensefalondan gelişen diensefalon göz veziküllerinin çıkıntısı ile karakterizedir. Derin bir hat olan rombensefalik istmus, mezensefalonu, rombensefalondan ayırır. Rhombensefalon,

gelecekte pons ve serebellumu oluşturacak metensefalon ile medulla oblangatayı oluşturan miyelensefalon bölümlerinden meydana gelir.

Serebral korteks palliumdan gelişir. Pallium, korpus striatumun hemen lateralinde yer alan paleopallium (arkikorteks) ve hipokampus ile paleopallium arasında bulunan neopallium (neokorteks) bölümünü içerir. Neopalliumda, nöroblastlar subpial bir yerleşim göstermek için dalgalar halinde kortekse doğru göç eder ve daha sonra olgun nöronlara farklanırlar. Her yeni nöroblast dalgası bölgeye ulaştığında, bu hücreler kendilerinden önce oluşmuş hücre tabakaları arasından geçerek subpial pozisyonlarını alırlar. Böylece, daha önce oluşan nöroblastlar kortekste daha derin yerleşimde kalırken, sonra meydana gelen hücreler daha yüzeyel bir pozisyon alırlar (57, 58).

2.6. Hipokampus Histolojisi

Hipokampus, uzunluğu 5 cm olan C harfi şeklinde, temporal boynuzun medial tabanı boyunca uzanan bir gri cevher bölümüdür. Makroskobik olarak baş, gövde ve kuyruk olmak üzere 3 bölümden oluşur. Kesitlerde denizatına benzemesi sebebiyle ismi Yunanca bu anlama gelen “hippo-campus” kelimelerinin (hippo: at, campus: deniz) birleşimi ile verilmiştir. Daha nceki Mısır’da yaşayan bilim insanları, ko boynuzuna benzediği için bu anlama gelen “Cornu Amonis” olarak isimlendirmişler ve hipokampusun bölümlere ayrılması bu kelimelerin baş harfleri kullanılarak “CA” şeklinde belirtilmiştir (59). Hipokampusun, hafıza, uzaysal öğrenme, heyecan uyandıran tepkiler ve heyecanın kontrolü, iç organların aktiviteleri ile beyin korteksinde nöral fonksiyonların düzenlenmesi gibi pek çok görevi bulunmaktadır (60, 61).

Hipokampus, hücre yerleşimine göre CA1, CA2, CA3 ve CA4 olmak üzere 4 bölüme ayrılır. Fonksiyonel olarak da bu bölümlerin farklı görevleri olduğu belirlenmiştir. CA1, subikulum bölümüne komşudur. CA4 ise dentat giyrusa yakın olan bölümdür. CA3, CA1 ile bağlantılı olan kısımdır. Bu bölümler içerisinde CA1, uzaysal öğrenme ve hafızadan sorumlu olan esas kısım olup, entorinal korteksten bilgileri alır ve değerlendirir. CA1 ve CA3 nöronlarının ilişkisi hafıza açısından oldukça önemlidir. CA1’den alınan çıktılar, subikulum, prefrontal korteks ve entorinal kortekse gider. CA1 bölgesi korteksten gelen bilgilerle, CA3 bölgesinden gelen bilgiler arasında bir uyumsuzluk olup olmadığını denetleyen bir kontrol merkezi olarak görev yapmaktadır (62).

Hipokampus mikroskobik olarak birbiriyle bağlantılı tabakalar şeklinde düzenlenmiştir. Buna göre hipokampusun 7 tabakadan oluştuğu belirlenmiştir.

2.6.1. Alveus Tabakası

Hipokampusun en derin tabakasıdır. Bu tabaka piramidal hücrelerin aksonlarını içermektedir. Hipokampusun en kritik çıktılarına uzanan aksonal lifler bu bölümden geçmektedir.

2.6.2. Stratum Oriens

Piramidal hücrelerin dendritleri ile ara nöronların yerleştiği tabakadır. Bu bölümdeki çoğu aksonlar aynı zamanda alveus liflerine de katılmaktadır.

2.6.3. Stratum Piramidalis

Golgi tip-II nöronlar ve büyük piramidal hücrelere sahiptir. Aynı zamanda bu tabakada, yosunsu (mossy) liflerin yaptığı sinapslar bulunur. Birçok ara nöron gövdesi bu tabakada yer almaktadır.

2.6.4. Stratum Lusidum

Mossy liflerin transvers eksende uzanıp sonlandığı bu tabaka, hipokampusun en ince tabakası olarak kabul edilir. Bu tabaka yalnızca CA3 bölümünde görülür. Hücresel yönden yoğun piramidal şekilli motor nöronları içerir.

2.6.5. Stratum Radiatum

Schaffer kollateral liflerini içeren hipokampus tabakasıdır. Aynı zamanda septal ve kommisural lifler de bu bölümde bulunur. Yapısal olarak stratum oriense benzerlik gösterir.

2.6.6. Stratum Lakunozum

Schaffer kollateral liflerinin devamını içeren oldukça ince bir tabakadır. Aynı zamanda entorinal kortekse uzanan perforan lifleri de içermektedir. Çoğu zaman bir sonraki tabaka olan moleküler tabaka ile birlikte isimlendirilir.

2.6.7. Stratum Molekölare

Perforan liflerin ve piramidal hücrelerin apikal dendritlerinin bulunduğu hipokampusun en dış tabakasıdır (63).

Hipokampus embriyolojik olarak koroid fissurun dış kısmından gelişir. Başlangıçta beyin korteksine yakın olarak anterior bölümde yerleşim gösterir, beynin ileri gelişimiyle birlikte inferio-medial yönde son pozisyonunu alır. Bu süreçte hipokampusun oluşacağı bölgeye doğru nöral progenitör hücreler göç eder. Gelişimin 13. ve 14. haftalarında temporal lobun medial yüzeyinde primitif hipokampus ortaya çıkar. 15. ve 16. haftalarda dentat gyrus ve kornu amonis adı verilen primitif hipokampus bölümlerinin katlanmaları gerçekleşir. 18-20. haftalarda hipokampus görünüm ve büyüklük açısından oldukça gelişmiş durumdadır. Hemisfer duvarlarının kalınlaşması ve ventrikülün median duvarına doğru büyüme ile hipokampusun gelişimi tamamlanır. Hipokampusun ventriküler yüzeyinin tamamı kendi hücrelerinden gelen aksonal sinir uzantılarından meydana gelir. Dolayısıyla sinir uzantılarının oluşturduğu alveus adı verilen yapıyla örtülüdür. Alveus liflerinin bant şeklini almasıyla oluşan yapıya “fimbria hippocampi” adı verilir. Bu yapının ön ucu “gyri hippocampi”, arka ucu ise alveusla birlikte “crus fornicis” olarak adlandırılır. Alveustan fimbriyaya gelen lifler, fornixin başlangıç kısmını oluşturur. Forniks miyelinli sinir liflerini içeren bölümdür. Afferent sinir lifleri hipokampusun forniks adı verilen bölümünden çıkar ve ilgili alanlara uzanır (64, 65, 66, 67).

2.7. Amiloid Prekürsor Protein

Amiloid prekürsor protein, (APP) hem ekstrasellüler hem de intrasellüler bölümlere sahip, Tip-1 transmembran protein ailesinin bir üyesidir. Memelilerde APP ve homologları hücre yüzey reseptörü, hücre adezyonu, sinaptogenez gibi kritik fonksiyonlarda görev almaktadır. APP ailesi, memeli beyinlerinde fazla miktarda eksprese edilirken, Drosophila nöronlarında, APPL ve APLP gibi APP ailesi proteinlerinin daha az eksprese edildiği bildirilmiştir. Vücuttaki farklı dokularda da bu proteinlerin varlığı rapor edilmiştir. İnsanda 21. kromozomun uzun koluna yerleşmiş olan APP geni, yaklaşık 240 kb uzunluğunda olup, 18 adet ekzon içermektedir. Amiloidojenik fragmanlar, A β alanındaki sekans değişiminden dolayı APP'den üretilmektedir. APP'nin proteolizi için birden fazla alternatif yol mevcuttur. Bu yolların

bazıları AH patogeneğinde önemli rol oynayan A β peptidinin üretimini sağlarken, diğerk yolaklar bu üretime yol açmamaktadır (68).

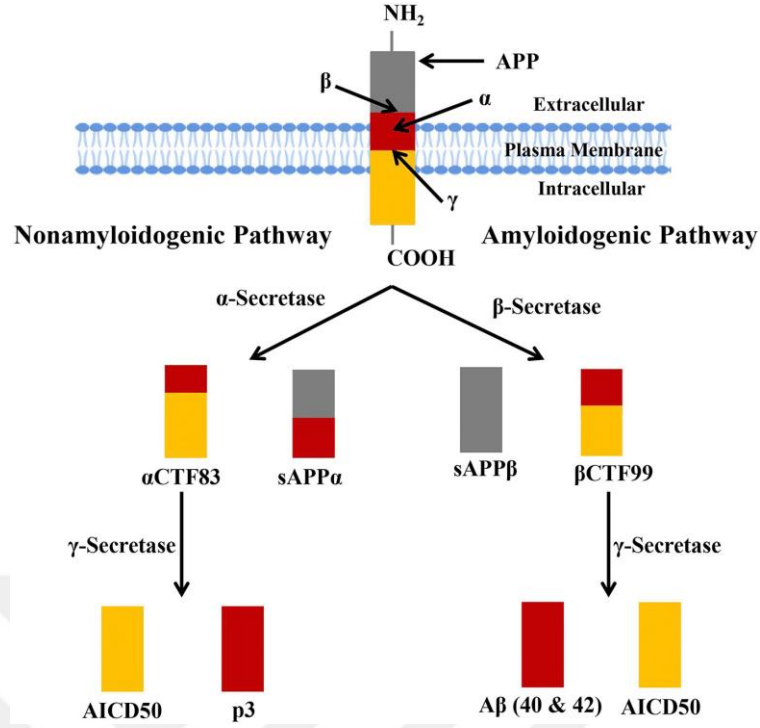
Endoplazmik retikülüm ve Golgi aygıtında sırasıyla üretimi gerçekleşen APP, nöronlarda ilgili aksonun sinaptik terminallerine kinesin-1 aracılığıyla hızlı aksonal taşıma ile iletilir. APP'nin işlenmesi için gereken diğerk önemli adımlar, hücre yüzeyinde ve trans golgi ağında (TGN) gerçekleşmektedir. APP üretildikten sonra hücre yüzeyine veya endozomal kompartmana taşınır. Klatrin bağımlı veziküller bu adımların her ikisine de aracılık eder. İlk olarak hücre yüzeyine taşınan APP, α -sekretaz ve γ -sekretaz enzimleriyle proteolize uğrar. Bir diğerk yol ise β -sekretaz ve γ -sekretaz proteazlarını içeren endozomal yoldur. Bu yollardan ikincisi amiloid beta (A β) üretimi ile sonuçlanır. APP, α -sekretaz ve γ -sekretaz ile kesime uğradığında herhangi bir patolojik amiloid beta birikimi görülmezken, β -sekretaz ve γ -sekretaz ile kesime uğradığında patolojik amiloid beta birikimi gözlenmektedir (69).

2.8. Amiloid Beta (A β) Peptidi

Amiloid beta peptidi, insan, maymun, köpek, fare gibi birçok canlının beyinde ve diğerk organlarında biriken yüksek oranda korunmuş bir protein olan APP'nin proteolizi sonucunda oluşur. A β birikim oluşturan toksik bir polipeptittir (70, 71). Amiloid beta (A β), oligomerler halinde birikir ve bu birikimin sonucunda β -yapraklar şeklinde amiloid fibrilleri oluşur. Amiloid hipotezine göre, A β biyosentezinde görev alan genlerin mutasyonuna bağılı olarak, A β klirensi ve üretimi arasında ortaya çıkan dengesizlik sonucunda A β birikimi gözlenmektedir (72).

A β peptidi, plazma membranında, kanda ve serebrospinal sıvıda (CSF) bulunabilen ve fizyolojik koşullarda çok düşük konsantrasyonlarda çözünebilen bir yapıya sahiptir (73, 74). APP iki farklı proteolitik yoldan geçer. Bu yollar, amiloidojenik yol ve non-amiloidojenik yol olmak üzere sınıflandırılır. Bu yollar ile A β peptidinin oluşup oluşmayacağı tayin edilmektedir (75). Non-amiloidojenik yolda ilk olarak α -sekretaz enzimi görev yapar. Bu enzim ile APP, önce APP- α adı verilen fragmente bölünür. Bu bölünmede, bölünme pozisyonu APP'nin orta kısmından gerçekleştiğı için toksik bir amiloid veya tam bir amiloid beta oluşumu gerçekleşmez (76). Amiloidojenik yolda ise APP, ilk olarak β -sekretaz adı verilen enzimle klevaja uğramaktadır. APP, bu bölünmeyle N-terminal fragmenti olan sAPP- β ve C-terminal

fragmenti olan C99'a klevaj edilmektedir (77). Bu bölünmeyi takip eden süreçte, bir diğer önemli sekretaz ailesi üyesi olan γ -sekretaz tarafından, daha önce oluşan C99 fragmenti tekrar bölünür ve amiloid beta peptidi üretilir (Şekil 3). Bu bölünme sonucu iki farklı kesim ve bu kesimlere ait farklı klevaj pozisyonlarından dolayı, 37 ile 46 amino asit zinciri arasında değişen formasyonlarda A β peptidinin oluşumu gözlenmektedir. A β -40 ve A β -42, en yaygın A β peptidi izoformları olarak bilinmektedir (78, 79). A β peptidi, AH'nda en çok görülen patolojik değişiklik olan senil plakları oluşturmaktadır. AH üzerine yapılan hem genetik hem de biyokimyasal çalışmalardan elde edilen bulgulara göre, bu nöropatolojik değişiklik, özellikle beyinde korteks ve hipokampusta görülmekte olup, bu birikimin nörodejenerasyona ve sinir sisteminde geri dönüşümü olmayan hasara yol açtığı bilinmektedir (70, 71). Yapılan çalışmalarda APP ve sekretaz genlerinin mutasyonunun, amiloidojenik yolağı indüklediği ve bu durumun erken başlangıçlı AH ile doğrudan ilişkili olduğu düşünülmektedir (80). Normal koşullarda A β , beyinden uzaklaştırılarak beyin dokusu korunmaktadır. A β 'nın uzaklaştırılmasında farklı mekanizmalar görev yapmaktadır. Düşük dansiteli lipoprotein reseptörü ilişkili protein-1'in A β 'nin kan-beyin bariyerini geçmesine yardımcı olduğu bildirilmiştir. Bunun yanında, bazı proteazlar, neprilizin, gümüş bağımlı metalloproteazlar, insülin azaltıcı enzim ve anjiotensin dönüştürücü enzimin, A β 'nin beyinden atılımına yardımcı olduğu rapor edilmiştir (81). A β -40 ve A β -42 benzer yapıya sahip olup, A β -42'de iki amino asit dizisi daha uzundur. A β -40, hücrede endoplazmik retikulumda üretilirken, A β -42'nin trans Golgi ağında üretimi tamamlanmaktadır. Bunların yanında, A β -40 hücreye enerji tüketimi olmadan endositotik olmayan yollarla alınabilirken, A β -42 endositotik yollar ile hücre içerisine alınmaktadır. Yapılan çalışmalarda her iki izoformun da lizozomda birikim yapabildiği bildirilmiştir. (82) Bu izoformların, Alzheimer hastalığında görülen senil plaklarda en çok biriken amiloid beta türleri olduğu ve sitotoksiteyi uyardıkları belirlenmiştir. Bu amiloid beta türlerinin AH patolojisiyle ilişkili olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir (83).



Şekil 3. Amiloidojenik ve non-amiloidojenik yolun şeması (84).

2.9. Alzheimer Hastalığının Patogenezi

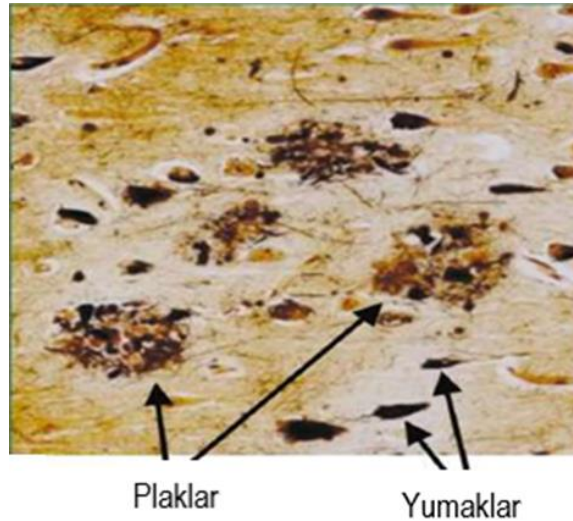
Alzheimer hastalığı üzerinde çalışan bilim insanları, hastalığın prelinik aşamasını “hücresel aşama” olarak belirtmişlerdir. Hücresel aşamada, nöronlar, astrositler ve mikroglia başta olmak üzere, hücrelerde meydana gelen değişiklikler ifade edilmektedir. Hücrelerde oluşan bu değişiklikler, bilişsel bozuklukların ortaya çıkmasından önce hastalığın sinsi ilerlediği dönemde gerçekleşmektedir (85).

Nöroenflamasyon, vasküler değişiklikler, glimfatik sistemde harabiyet ve işlev bozukluğuna paralel olarak başlayan Aβ birikimi ile hastalığın gelişimi giderek ilerler (86, 87). Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, Alzheimer hastalığının patogenezi net olarak anlaşılmassa da belirli bazı kaskadların aktive olması hastalığın patogenezinin temelini oluşturur. Alzheimer hastalığında ortaya çıkan patolojik değişikliklerle ilgili günümüze kadar birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan bu çalışmalarda sorumlu mekanizmaların çoğu iki temel hipotezden türetilmiştir. Bu hipotezlerden ilki; amiloid kaskad hipotezi iken, ikincisi ise tau patolojisi üzerine oluşturulan hipotezdir. Alzheimer hastalığının mevcut patogenezinin anlaşılabilmesi için bu hipotezlerin detaylı incelenmesi gerekmektedir. Amiloid beta, hala tam olarak bilinmeyen mekanizmayla, nöronlarda granülo-vakuoler değişikliklerle başlayan patolojik olaylar

zincirine neden olmakta, tau proteini yayılımını da indükleyerek, hastalığın patogenezinde önemli değişikliklere neden olmaktadır (88).

2.9.1. Amiloid Kaskad Hipotezi

Amiloid beta plakları, ilk olarak Paul Blocq ve George Mannesco tarafından 1892 yılında ileri yaştaki hastaların beyinlerinde yapılan çalışmalarda keşfedilmiştir. Bunu takip eden yaklaşık 100 yıllık çalışma zincirinin ardından Glenner, Alzheimer hastalarının meningeal damarlarından A β 'yı izole etmiş ve kısmen peptit dizisini tanımlamıştır (89). A β 'nın üretiminde, non-amiloidojenik yolla, α - ve γ -sekretaz enzimlerinin etkisiyle oluşan amiloid prekürsör proteinin s-APP- α domaini, çözünür bir fragment olarak oluşmaktadır. Bu yolla nörotropik ve nöroprotektif ürünler üretilir. Normal şartlarda α - ve γ -sekretaz enzimlerinin APP işleme sürecinde, A β birikimi olmadan çözünür formda üretilmektedir ve bu yolla anormal A β birikimi gerçekleşmemektedir. Diğer taraftan, amiloidojenik yolda, β ve γ sekretaz enzimleri APP'nin işlenmesinde görev almakta olup, farklı uzunlukta A β peptitlerinin birikimine sebep olmaktadır. Dolayısıyla bu yolağın, AH patogenezinde nörotoksiteyi uyaran senil plakların esas oluşum yolağı olduğu kabul edilmektedir. Senil plakların oluşumuna neden olan A β 'nın, AH için primer başlatıcı faktör olduğu düşünülmektedir (90).



Şekil 4. Beyin kesitinde senil plaklar (A β) ve nörofibriler yumakların görünümü (Gümüşleme metodu) (91).

Alzheimer hastalığında, hipokampus ve bazal gangliyonlar, amiloid beta birikiminin başladığı ve A β plaklarının olduğu primer alanlardır. A β birikimine yeni

zincirlerin eklenmesi sonucu sinir hücrelerinde mitokondriyal hasar, stabil olmayan homeostaz ve sinaptik disfonksiyon AH'nda sık görülen bozukluklardır (92). Mikroglia ve astrositlerin bu süreçte en fazla aktive olan hücreler olduğu kabul edilmektedir. Bu hücrelerin aktivasyonu sonucunda enflamatuvar yanıt ve oksidasyon mekanizmaları uyarılmakta ve sonuçta nöronal disfonksiyon ve apoptoz tetiklenmektedir. Tau protein kinaz-1, A β birikimiyle aktive edilerek anormal tau proteinin fosforilasyonu ve oluşumunu teşvik edebilmektedir. Hiperfosforile tau proteininin birikimiyle oluşan nörofibriler yumak (nörofibriler tangle) adı verilen yapıların meydana gelmesi sonucu tau patolojisi ortaya çıkar (Şekil 4) (91). Böylece AH patogenezinin sorumlu mekanizmalar tam anlamıyla aktive edilmiş olur (93). Çözülebilir A β oligomerleri, oldukça toksiktir ve AH ile ilgili patolojik değişikliklerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (94). AH'nda A β oligomerlerindeki bu artışın, serebrospinal sıvıda da tespit edilebildiği bir çok çalışmada rapor edilmiştir (95). A β oligomerlerinin, AH'nda klinik semptomlar ortaya çıkmadan uzun yıllar önce birikmeye başladığı rapor edilmiştir. Bu birikimin uzun zamanlı etkileşimi hastalarda depresyona neden olmakta ve NMDA (N-metil D-aspartat), glutamat ve nikotinik asetilkolin reseptörleri gibi birçok reseptörün fonksiyonunda da bozulmaya yol açmaktadır. A β oligomerleri reseptörün yanı sıra, sinaptik membranlara da zarar vererek oksidatif hasara ve tau patolojisinin ilerlemesine yol açmaktadır (96). Günümüzde mevcut terapötik stratejilerin hedefi, A β oluşumunu ve birikimini azaltmak ve A β klirensini artırmaktır (89). Bu amaçla, hücrelerde β ve γ sekretaz aktivitelerini kontrol ederek, A β üretiminin azaltılması hedeflenmektedir (97). Bugüne kadar deneysel olarak, A β degradasyonunu ve klirensini artırarak AH patogenezinin azaltılması üzerine pek çok araştırma yapılmıştır. Bu çalışmalarda, A β birikimini azaltmak için reseptörlerle ilişkili kullanılan kimyasal ajanlarla ilgili olumlu bazı sonuçlar elde edilse de hedeflenen etkiye ulaşamadığından dolayı faz III aşamasına geçilememiştir (98, 99).

A β birikimi, monomerlerin kararsız oligomerler halinde birleşmesiyle meydana gelir. Oligomerik A β , daha sonra kısa, esnek ve düzensiz protofibriller oluşturmak üzere toplanır ve oluşan bu protofibriller, tekrarlayan oryante düzenle, çözülmeyen fibril şekline dönüşürler. Bu dönüşüm sonucunda oluşan ekstrasellüler A β birikimleri, hidrolitik bozulmaya karşı dirençli hale gelir (100). Oluşan A β oligomerleri, ekstrasinaptik glutamat seviyelerinde anormal yükselmeye yol açar ve buna bağlı olarak,

ekstrasinaptik NMDA reseptörünün aracılık ettiği eksitotoksositeye neden olur. Buna bağlı olarak uzun süreli depresyon (LTD) ile ilgili mekanizmaların da uyarılması, postsinaptik depresyon ve dendritik çıkıntıların kaybı ile sonuçlanmaktadır. Bunların yanında, A β intrasellüler kalsiyum (Ca) dengesini bozarak, mitokondriyal fonksiyonun zarar görmesi sonucu reaktif oksijen sentezinin (ROS) üretiminin artışına sebep olur. Bütün bu değişikliklerin ortaya çıkması, nöronal hasara ve hücre ölümüne yol açar (101).

2.9.2. Amiloid Beta ve Mitokondriyal Disfonksiyon

Alzheimer hastalığı ile ilgili yapılan pek çok çalışmada mitokondriyal disfonksiyonun AH patogenezinde önemli bir role sahip olduğu vurgulanmıştır (102). Hastalık sürecinde A β beyin nöronlarında mitokondriyonlarda birikebilmektedir. Oluşan bu birikime bağlı olarak, mitokondriyal yapıda bozulma, mitokondriyal fonksiyonda ve ATP üretiminde azalma, bozulan mitokondriyal dinamiklerle ilişkili oksidatif stres ortaya çıkmaktadır. Alzheimer hastalarında ve deneysel araştırmalarda, mitokondriyal A β seviyeleri ile mitokondriyal yapı bozukluğu ve işlevindeki anormalliklerin paralel olduğu bildirilmiştir. Ayrıca A β birikiminin olduğu beyin bölgelerinde hücrelerde mitokondriyonların enerji metabolizmasında azalma görüldüğü belirlenmiştir. A β , aynı zamanda mitokondriyal dinamikleri değiştirerek, organelde şekil bozukluğu ile karakterize anormalliklere de yol açabilmektedir. A β maruziyeti, mitokondriyal fisyon ve füzyon proteinleri ile ilişkili etkileşim sorunlarına da yol açmaktadır (103, 104). Yapılan araştırmalarda oksidatif değişikliklerin AH patogenezinde önemli bir role sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Oksidatif stresin hastalığın başlangıç aşamasında ortaya çıkması, A β kaynaklı AH patogenezinin destekler niteliktedir (105).

Mitokondriyonlar, hücre içi ROS'un birincil kaynağıdır. A β peptitleri sitokrom-c ve apoptoz indükleyici faktörlerin salınmasına yol açarak, mitokondriyonlarda ROS üretimini indükler ve böylece mitokondriyal disfonksiyon ortaya çıkar, bu da hücrede apoptoza dolayısıyla nöronal kayıplara yol açabilmektedir (103, 106). Son yıllarda tanımlanan apoptosin proteininin, A β ile indüklenen nöronal hücre ölümü için önemli bir düzenleyici olduğu bildirilmiştir. Apoptosin ekspresyonunun, AH'nda arttığı ve bu proteinin down-regule edilmesinin, AH nörotoksitesine karşı koruyucu etkisinin

olduğu ileri sürülmüştür. Bunların yanında, amiloid bağlayıcı dehidrojenaz, siklofilin-D gibi diğer mitokondriyal proteinlerin de AH ile ilgili disfonksiyonlarda rol oynayabileceği rapor edilmiştir (91, 107).

2.9.3. Amiloid Beta ve Tau İlişkisi

Erken başlangıçlı AH'nda, A β oluşumunu etkileyen APP ve PS1/2 genlerinde oluşan mutasyonların etkili olduğu bildirilmiştir. Aynı zamanda MAPT (Microtubule-associated protein tau-441 human) mutasyonlarının hem AH'na bağlı hem de AH'na bağlı olmayan demansa yol açabileceği de belirtilmiştir. Ayrıca tau patogenezinin de A β birikiminin etkisi ile oluşabileceği düşünülmektedir (108, 109). Gerçekten de APP transgenik hayvan modellerinden yapılan araştırmalarda, A β 'nin tau patolojisini indüklediği gösterilmiştir. Yüksek plak yükü oluşturulan deney hayvanı modellerinde, A β plaklarını çevreleyen hiperfosforile tau içeren distrofik nöritlerin varlığı tespit edilmiştir (110). Transgenik sıçan beyinlerinde yapılan araştırmalarda, AH ile ilişkili APP/PS1 mutasyonuna bağlı A β artışını takiben, p-tau düzeyinde artış gözlenmiştir (111). Bu artışın GSK3 β (Glikojen sentaz kinaz 3 β) gibi tau kinazların aktivasyonu ile gerçekleşen tau hiperfosforilasyonundan kaynaklandığı rapor edilmiştir (112). Bunların yanında, A β kaynaklı enflamasyonlarda da tau artışı meydana gelebilmektedir. A β birikimi, doğuştan gelen birçok bağışıklık yolağını aktive ederek, enflamatuvar yanıtı neden olan interlökin-1 β gibi sitokinlerin serbest bırakılmasında rol oynamaktadır (113). Buna karşın hem APP hem de tau transgenleri ile ilişkili IL-1 sinyali yolağının bloke edilmesi, tau patolojisini azaltmaktadır (114). A β tarafından indüklenen nöronal hücre ölümü, fare ve insan tau nakavt nöronlarda A β 'nin neden olduğu nörotoksiteyi engellemektedir (115). Ayrıca taunun baskılanması, A β kaynaklı aksonal taşımada meydana gelen bozuklukları da önlemektedir (116). Deney hayvanlarında yapılan çalışmalardan elde edilen veriler, A β kaynaklı nörotoksite de taunun katkısını desteklemektedir. Taunun delesyonu aracılığıyla çeşitli APP transgenik fare modellerinde, öğrenme ve bellek bozukluğu ile eksitotoksiteye karşı koruma sağlanabilmektedir (117). Patolojik tau oligomerlerinin, A β kaynaklı toksiteyi artırdığı ve nörotoksiteye karşı kritik bir mediyatör olduğu düşünülmektedir. A β 'nin toksik etkisinin, taunun katkısıyla güçlendiği düşünülmektedir (118). Tau, A β taşınmasını sağlayarak birikimini artırmaktadır (119). Drosophilalarda yapılan çalışmalarda A β

ekspresyonu, tau fosforilasyonunu artırmış ve A β tarafından indüklenen nörodejeneratif değişiklikleri de uyarmıştır. Özellikle, nöral terminal sinapslarda hem A β hem de fosforile tau proteinlerine rastlanmıştır. Bütün bulgular birlikte değerlendirildiğinde, A β ve tau aracılı patogeneizde A β 'nın indüklemesiyle, sinerjik bir etkinin ortaya çıktığı sonucuna varılmıştır (120).

2.9.4. Tau Patolojisi

İnsan tau proteini, 16 ekzon içeren, 17. kromozom üzerindeki MAPT geni tarafından kodlanır. 2, 3 ve 10 ekzon içeren alternatif varyasyonları, insan beyninde 6 farklı tau izoformu varyantı oluşturur. Bu izoformlar, N-terminalinde 0,1 veya 2x29 amino asit ekinin ve 3R veya 4R (R: mikrotübül bağlanma tekrarı) mikrotübül bağlanma tekrarlarının eklenmesi ya da eklenmemesiyle ayırt edilmektedir (121). Normal yetişkin insan beyninde 3R ve 4R tau izoformları, 1:1 oranında bulunur. Değişmiş MAPT ve pre-mRNA eklenmesinden kaynaklanan dengesiz 3R:4R oranları, çeşitli taupatilerde gözlenmiştir. Örneğin; Pick hastalığında artan 3R:4R oranı görülürken, ilerleyici supranükleer felç ve kortikobazal dejenerasyonlarda azalan 3R:4R oranları tespit edilmiştir (122). Alzheimer hastalarının beyninde tau izoformlarının ifadesinin karmaşık olduğu halen tartışılmakla birlikte, bazı çalışmalarda beyindeki bazı bölgelerde 4R tau proteini ifadesinin arttığı ve dengenin bozulduğu rapor edilmiştir (123).

Mikrotübül bağlayıcı bileşen olarak bilinen tau proteini, mikrotübüllerin polimerizasyonunu ve stabilizasyonunu sağlayan önemli bir komponenttir (124). Tau proteini, mikrotübül bağlama alanı içindeki C-terminal tekrarları yoluyla mikrotübüllere bağlandığından, 4R tau izoformlarının 3R tau izoformlarına kıyasla mikrotübül birleşmesini teşvik etme eğilimi daha yüksektir (125). Tau proteini, memeli beynindeki nöronlarda yüksek oranda eksprese edilmekte ve aksonal taşıma düzenleyicisi olarak büyük oranda aksonlarda lokalize olmaktadır (126). Bununla birlikte tau geninde meydana gelen delesyonlara rağmen, aksonal taşımada sorun oluşmadığı görülmektedir. Bu bulgu MAP1 ve MAP2 gibi mikrotübül düzenlenmesi ile ilişkili diğer proteinlerin, tau protein eksikliğini telafi edebileceğini düşündürmektedir (116). Yapılan son çalışmalar, taunun aynı zamanda dendritlerde ve postsinaptik bölümlerde de bulunduğunu göstermiştir (127). Yapılan çalışmalarda tau nakavt farelerde, sinaptik

plastisitenin bozulduğu ve postsinaptik kayıpların olduğu rapor edilmiştir. Bu bulgular, tau proteinin fizyolojik olarak sinaptik plastisitede rol oynadığının kanıtı olarak değerlendirilmiştir (128, 129).

Nöronlardaki tau proteini dağılımı ve sinaptik fonksiyonlardaki rolü, fosforilasyon ve proteolitik bölünmenin de dahil olduğu posttranslasyonel modifikasyonlar ile düzenlenmektedir. Tau ayrıca, oligodendrosit ve astrositlerde de eksprese edilmektedir (130). Oligodendrositlerde tau proteininin, gelişim sürecinde ve miyelin izolasyonunda rol oynadığı bilinirken, astrositlerde tau fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir (131). Tau, demir metabolizmasında ve insülin sinyallerinin iletiminde de görev almaktadır (132, 133). Tau proteini üzerinde; fosforilasyon, asetilasyon, glikozilasyon ve nitrasyon gibi posttranslasyonel modifikasyonlar görülmektedir. Tau patolojisinde, bu modifikasyonlarda meydana gelen değişikliklerin etken olabileceği kabul edilmektedir. Patolojik değişiklikler tau agregatlarının birikimiyle başlar. Monomerik tau, yüksek oranda çözünürdür ve biyokimyasal olarak düzensiz olup iyi tanımlanmış ikincil bir yapıdan yoksundur (134). Belirli koşullar altında monomerik tau, oligomerler, daha sonra fibriller ve filamanlar halinde görülür. En sonunda da nörofibriler yumak (NFT) adı verilen yapılar halinde toplanırlar. Tau mikrotübül bağlanma alanı içindeki tekrarda, hekzapeptid motifleri adı verilen, tabaka şeklinde yapıların oluşumu tau birikimi için önemlidir (135, 136). Hiperfosforilasyon, MAPT genindeki mutasyonlar ve sıvı-sıvı faz ayırımı (LLPS) gibi birçok faktörün patolojik tau birikimine sebep olabileceği kabul edilmektedir. Günümüzde MAPT mutasyonu ile birçok transgenik modelde, aşırı tau proteini ekspresyonu elde edilebilmektedir. Bu mutasyonlar, genellikle 3R:4R tau oranını değiştirerek, tau fragmentasyonunu indükler ve tau hiperfosforilasyonunu ve/veya diğer mekanizmaları uyarak, tau birikimini gerçekleştirmektedir. Nitekim artan 3R:4R oranlarının tau fosforilasyonunu ve oligomerizasyonunun desteklediği ve insan tau proteininin eksprese eden fare modellerinde davranışsal değişiklikleri indüklediği gösterilmiştir (137). MSS'deki çeşitli hücre tipleri, taunun patolojik birikimini etkileyebilmektedir. Alzheimer hastalığında tau birikimini ilk görüldüğü hücreler nöronlardır. Nöronların yanında astrositlerde ve oligodendrositlerde de tau birikimi gözlenebilmektedir. Ancak, tau birikiminin araştırılan karşılaştırmalı çalışmalar, AH'daki değişimleri net olarak tanımlamamıştır (138). Tau birikimiyle oluşan NFT yapıları, ilk olarak entorinal

korteksin 2. tabakasında görülmeye başlar. NFT'ler, daha sonra nörodejeneratif ilerleme sırasında hipokampus ve neokorteks de dahil olmak üzere, beyindeki birbirine bağlı anatomik bölgelerde ortaya çıkmaktadır (139). Transgenik fare modellerinde patolojik insan tau proteininin hipokampusun dentat giyruşu gibi sinaptik olarak bağlı olduğu bölgelere yayıldığı görülmüş ve yaşlanma ile sinaptik dejenerasyonu indüklediği bildirilmiştir. Bu bulgular, hücresel çalışmalarla da desteklenmiş ve hastalardan elde edilen tau pozitif hücrelerin de sağlam hücrelere tau birikimini aktarabileceğini düşündürmüştür (140, 141).

Tau proteini nöronal kültür ortamında, naif ve transgenik fare beyinlerinin interstisyel sıvısında bulunduğu gösterilmiş olup hem fizyolojik hem de patolojik koşullar altında üretilebileceği rapor edilmiştir. Eksozomlar, nöronal aktivitenin ve geleneksel olmayan salgı yollarının tau yayılmasında rol alabileceğini gösterse de tau salınımının altında yatan mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Eksozomlar, hücrelerin endozomal bölümlerinden üretilen hücre dışı veziküller olup, olgun nöron ve mikroglia hücreleri ile Alzheimer hastalarının BOS ve kanında tau içeren eksozomlar tespit edilebilmektedir. Nöronlarda veya mikroglialarda üretilen tau içeren eksozomlar tau yayılımını desteklemektedir. Eksozomlardaki tau, fosforile edilebilir, kesilebilir ve oligomerler halinde birleştirilebilir. Eksozomla ilişkili tau seviyelerinin kontrol hastalara oranla, Alzheimer hastalarının BOS ve kanında daha yüksek olması, AH'nda bir biyolojik belirteç olabileceğini düşündürmektedir. Taunun hem presinaptik bölümde hem de post sinaptik bölümde bulunabildiği gösterilmiştir. Dolayısıyla bu bulgu tau yayılımında sinir ağlarının da önemli olabileceğini düşündürmektedir. Bunların yanında, hücrelerde plazma membranından doğrudan tau salınımının da gerçekleşebildiği, bu görevde, plazma membranı üzerindeki heparan sülfat proteoglikanlarının rol aldıkları bildirilmiştir (142).

2.9.5. Tau Nörotoksitesi

Günümüze kadar tau patolojisi üzerine yapılan araştırmalarda, taupati ile ilişkili tau mutantları, anormal yapıya sahip tau proteinleri, çözünür tau oligomerleri ve tau fibrilleri gibi birçok tau türünün nörotoksik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, tau birikimiyle oluşan nörofibriler tangle yapılarının toksik olup olmadığı halen tartışma konusudur. Patojenik etkiye sahip taunun, mikrotübül düzenlenmesi ve aksonal

taşımada hasara yol açtığı, ayrıca presinaptik ve postsinaptik fonksiyonların bozulmasına sebep olduğu ve bunlara bağlı olarak nöronal ölümü indüklediği rapor edilmiştir. Mitokondriyon-mikrotübül ilişkili proteinlerin aracılık ettiği aksonal taşıma yoluyla, sinapslarla iletişim kurulduğundan, taunun aşırı ekspresyonu ve hiperfosforilasyonu, aksonal taşıma dinamiklerini etkileyerek, nöronların canlılığına mitokondriyal disfonksiyon üzerinden de zarar verebilmektedir (143).

Yapılan deneysel çalışmalarda, AH'na sahip fare modellerinden elde edilen beyin dokularında, tau kümeleri içeren nöronlarda mitokondriyal dağılımın bozulduğu gösterilmiştir. Patojenik tau türlerinin anormal mitokondriyal dağılıma nasıl neden olduğu halen belirsizliğini korumakla birlikte, bu durumun mitokondriyal fisyon ve füzyon dengesindeki değişikliklere bağlı olabileceği ileri sürülmüştür. Taunun patolojik birikimi, hücresel işlev bozukluğuna ve hücre ölümüne neden olmaktadır. Deney hayvanlarında yapılan birçok çalışmada, taunun neden olduğu sinaptotoksisiteye neden olan çeşitli moleküler mekanizmalar ortaya konulmuştur. Diğer taraftan, hiperfosforile edilmiş tau türlerinin presinaptik bir protein olan sinaptogirin-3 ile etkileşime girerek, sinaptik vezikül kümelenmesini uyardığı da gösterilmiştir. Sinaptik vezikül kümelenmesi, veziküllerin hareketliliği ve salınma oranını azaltmakta, buna bağlı olarak da presinaptik işlevlerde bozukluğa neden olmaktadır. Dolayısıyla, sinaptogirin-3 seviyesinin azalması, tau ve sinaptik veziküller arasındaki bağlantıyı keserek, tau tarafından indüklenen presinaptik bozuklukları engellemektedir. Dolayısıyla, sinaptogirin-3, tau kaynaklı disfonksiyonda anahtar bir modülatör olarak görev yapmaktadır. İnsan vücudunda bulunan diğer hücrelerden farklı olarak yetişkinde nöronlar çoğalamaz ve farklılaşmaları da sınırlıdır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, nörotropik faktör yoksunluğu, nöronal inaktivite, DNA hasarı, oksidatif stres ve eksitotoksisite tarafından tetiklenen çok sayıda sinyal yolağının, hücre ölümüne yol açtığı rapor edilmiştir (142).

2.10. Alfa (α) Sekretaz

APP'nin, bir proteaz enzim olan α -sektretaz tarafından fizyolojik olarak bölündüğü tespit edilmiştir (70). α -sektretaz, transmembran amiloid prekürsör proteinini (APP) parçalayan proteolitik enzim ailesinin bir üyesidir. α -sektretaz ile bölünme patolojik A β oluşumunu engellemekte ve APP işlenme sürecinde, amiloidojenik

olmayan yolun temel birimi olarak görülmektedir. α -sekretaz ile APP'nin bölünmesi sonucunda oluşan APPs- α , ekstrasellüler boşluğa verilerek atılır (144). Böylece α -sekretaz tarafından nörotropik ve nöroprotektif özelliklere sahip APP formu oluşturulmaktadır (145). Uyarı sonrası Golgi kompleksinin trans yüzünden salınan α -sekretaz, plazma membranına taşınır ve APP'nin bölünmesi gerçekleşir (146). Bölünme ilk olarak A β proteininin aminoasit dizininde, lisin-16 ve lösin-17 arasında gerçekleşir daha sonra lisin-16'yı seçici olarak ayıran karboksipeptidaz aktivitesi meydana gelir (70). APP'nin α -sekretazla bölünmesi normal şekilde sürdürülmekle birlikte, aşırı uyarıların da varlığı rapor edilmiştir (147). Muskarinik asetilkolin reseptörlerinin aktivasyonu sonucu aşırı α -sekretaz uyarımının gerçekleştiği düşünülmüştür (148). Ancak α -sekretazın metalloproteinaz özelliklere de sahip olduğu belirlenmiştir. Farklı metalloproteinazların APP'den üretilen sentetik peptitleri in vitro olarak parçaladıkları gösterilmiş ve aşırı ekspresyonların APP bölünmesini artırdığı, dolayısıyla metalloproteinazların potansiyel olarak α -sekretaz gibi görev yaptıkları ileri sürülmüştür (149).

α -sekretazın yapısını oluşturan ADAM proteinleri, membran kesme, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerini düzenleme gibi çeşitli süreçlerde rol oynarlar. ADAM10 ve ADAM17, α -sekretaz aktivitesini düzenleyen önemli proteinlerdir. Araştırmalarda ADAM10'un, AH'nda APP üzerinde α -sekretaz aktivitesi ile A β seviyelerini düşürdüğü gösterilmiştir. Ayrıca, ADAM17'nin de APP'nin α -sekretaz kesimi ve A β üretimini modüle ettiği rapor edilmiştir. Bu nedenle, ADAM proteinlerinin α -sekretaz aktivitesi ile ilişkisi dolayısıyla AH'nda patolojik süreçlerin daha iyi anlaşılması ve gelecekte potansiyel terapötik hedeflerin tanımlanması açısından önemlidir. Böylece, ADAM proteinleri ve α -sekretaz arasındaki ilişkinin iyi bilinmesinin, Alzheimer hastalığı ile diğer nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde yeni etkili stratejilerin geliştirilmesine katkıda bulunabileceği bildirilmektedir (144, 150, 151).

2.11. Beta (β) Sekretaz

Beta (β)-sekretaz, insanlarda BACE1 geni tarafından kodlanan ve APP'yi β -bölgesinden ayıran bir enzimdir. A β oluşumunda kritik görev üstlenen beta (β)-sekretaz çoğunlukla nöronlarda eksprese olmaktadır. Enzim, endoplazmik retikülümde

sentezlenir ve oluşan β -sekretaz 1 (BACE1) endozomal yolla plazma membranına taşınır (152, 153). Başlangıçta BACE1, endoplazmik retikülümde olgunlaşmamış bir öncü protein (proBACE1) olarak sentezlenir (154). ProBACE1, kısa ömürlüdür ve kompleks karbonhidratların eklenmesini ve propeptit alanının çıkarılmasını içeren Golgi kompleksinde işleme sürecinin ardından hızla 70 kDa'lık şeklini alır. BACE1, dört N-bağlı bölgede glikozile edilir ve translasyon sonrası modifikasyonlara uğrar (155). Olgun N-glikozillenmiş BACE1 sülfatlanır ve BACE1'in sitozolik kuyruğundaki üç sistein kalıntısı palmitoillenir (156). BACE1 propeptit alanı, Arg45 ve Glu46 aminoasitleri arasındaki bölünme ile Golgi kompleksinden ayrılır (157). Glikozilasyon enzimatik aktivitede, palmitoilasyon ise BACE1'in taşınması ve lokalizasyonunda önemlidir. BACE1 büyük bölümü hücrede bütünleyici bir membran proteini olarak üretilmektedir (158). Bununla birlikte, BACE1'in küçük bir kısmı, palmitoilasyon tarafından baskılanan bir süreç olan, ektodomain dökülmesine uğrar. Dökülmenin inhibisyonunun APP'nin β -bölgesinde işlenmesini etkilemediği bildirilmiştir. APP ve BACE1'in çözünür ektodomainin hücrelerde birlikte ekspresyonu, A β oluşumunu uyarmaktadır. Gelişmiş BACE1'in ektodomain dökülmesi, APP'nin amiloidojenik işlenmesini artırır (152).

Propeptit alanını bölen aspartik proteazlardan farklı olarak, BACE1 propeptidi ayrı bir proteaz tarafından bölünür. Golgi kompleksinde lokalize pro-protein dönüştürücülerden furin'in, BACE1 propeptidini parçalayan ana proteaz olduğu düşünülmektedir (155). proBACE1, güçlü β -sekretaz aktivitesi sergiler ve bu durum BACE1 propeptit alanının, proteaz aktivitesini önemli ölçüde baskılamadığını göstermektedir. Elde edilen verilere göre, BACE1 propeptidinin çıkarılmasının engellenmesi, AH'nda A β seviyelerinin düşürülmesi için etkili bir terapötik strateji olamayacağını düşündürmektedir. Bununla birlikte, bazı araştırmacılar tarafından özellikle nörotoksik olduğu düşünülen A β havuzunun oluşmasına neden olan biyosentetik yolla proBACE1'in APP'yi parçalayabileceği ileri sürülmektedir (153). BACE1 enziminin aktivitesi, translasyon sonrası değişimler ve hücrede gerçekleşen biyolojik faaliyetlerden etkilenebilmektedir. Olgun BACE1, plazma membranında, büyük oranda kolesterol açısından zengin lipid raflarında lokalize olur. BACE1 transmembran alanının, bir glikozilfosfatidilinositol ile değiştirilmesi, BACE1'i lipid raflara yönlendirerek A β üretimini önemli ölçüde artırmaktadır (154, 156). Olgun

BACE1 nispeten stabildir ve hücre kültüründe dokuz saatten fazla yarı ömre sahiptir (159).

Kinesin-1'e bağlanarak aksonlara taşınan BACE1'in, doğum sonrası erken evrede yüksek seviyelerde ekspresyonunun, nörogulin-1 (NRG-1) ile miyelinizasyonda görev aldığı rapor edilmiştir (157). BACE1/- farelerinden elde edilen verilerde, BACE1 yokluğunun hem merkezi hem de periferik sinir sistemi aksonlarının hipomiyelinizasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (160). BACE1 eksikliği olan farelerin görülen sinaptik plastisite ve bilişsel işlev bozukluğu ile miyelinizasyon bozuklukları BACE1'in genetik olarak eksikliği ile ilişkilendirilmiştir (161). BACE1'in aktif çözünür formunun insanda BOS'nda tespit edilebildiği rapor edilmiştir. BACE1'in BOS'nda bulunması, AH ile ilgili gelecekteki teşhis veya prognostik uygulamalarda potansiyel kullanımı için son derece önemlidir (162). BACE1, A β biyosentezi için kritiktir ve BACE1'i yükselten faktörlerin, artan A β oluşumuna yol açtığı ve AH oluşumunu uyardığı bildirilmiştir (163). Alzheimer hastalarının beyinde biriken 40 veya 42 amino asit uzunluğunda üretilen A β peptidleri APP'nin iki ardışık bölünmesi ile gerçekleşir. APP'nin, BACE1 tarafından hücre dışı bölünmesi ile çözünür bir hücre dışı parça ve C99 olarak adlandırılan hücre zarına bağlı bir parça oluşur. Devamında γ -sekretaz tarafından transmembran alanı içinde C99'un bölünmesi ile APP'nin hücre içi alanını serbest bırakır ve bu bölünmeler sonucunda A β üretilir. Bu durum AH patolojisindeki amiloidojenik yolağın temel mekanizmasını oluşturmaktadır (164). BACE1 aktivitesinin yaşa bağlı artışı ile AH oluşumu arasında paralel bir ilişki dikkati çekmektedir. Fare ve insan beyni ile ilgili yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda, yüksek BACE1 aktivitesi ile artan A β seviyeleri arasında pozitif bir korelasyonun varlığı gösterilmiştir (165). Araştırma sonuçlarına göre nöronlarda artan BACE1 aktivasyonu ile AH'nda amiloidojenik yolağın uyarılması arasında yakın bir ilişkinin olduğu kabul edilmektedir (166).

2.12. Gama (γ) Sekretaz

Gama (γ) sekretaz ilk olarak transmembran alanı içinde APP'yi parçalayan proteolitik aktiviteye sahip enzim ailesi olarak tanımlanmıştır. γ -sekretaz kompleksinin tüm bileşenlerinin tanımlanması sonucunda, kompleksin dört temel alt birimden oluştuğu ortaya konulmuştur. γ -sekretaz kompleksi, presenilin (PS1 ve PS2 dahil),

nicastrin, APH-1 (Anterior pharynx defective-1) ve presenilin arttırıcı-2 (PEN-2)'den oluşmaktadır. γ -sekretaz ekspresyonunu kontrol eden iki lokusta, iki homolog gen belirlenmiştir. Bu genler, kromozom 14 üzerinde PSEN1 (PS1'i kodlar) ve kromozom 1 üzerinde PSEN2 (PS2'yi kodlar) olarak tanımlanmıştır. Günümüze kadar AH'na neden olan mutasyonların çoğunun PSEN1'de meydana geldiği bildirilmekle birlikte, her iki PS geninde de 150'den fazla farklı mutasyonların olduğu rapor edilmiştir (167).

γ -sekretaz esas olarak tip-I membran proteinlerinin intramembranöz proteolizinde rol oynar. Bununla birlikte, APP, Notch, E-cadherin, ErbB4, CD44, tirozinaz, TREM2 ve Alcadein gibi proteinlerin yıkımında da γ -sekretaz görev almaktadır (168, 169, 170, 171, 172). En iyi çalışılan γ -sekretaz substratları, AH'nda kritik rol oynayan APP, gelişme ve hücre kaderinin belirlenmesindeki önemi nedeniyle Notch'dur (173, 174).

APP başlangıçta α - ve β -sekretaz tarafından bölünür, geri kalan APP ise γ -sekretaz tarafından ileri bölünmeye uğrar ve sonuçta A β ve p83 oluşur. p83 hızla bozulmaya uğrarken, oluşan A β nörotoksik etkilere sahiptir. Dolayısıyla γ -sekretaz aktivitesinin patolojik A β oluşumu ve Alzheimer hastalığı gelişiminde önemli rolleri olduğu kabul edilmektedir (175). AH gelişiminde primer rol oynayan A β 40 ve A β 42'nin yanında γ -sekretaz aynı zamanda, A β 46 gibi farklı uzunluklarda A β birikimini de uyarmaktadır. A β oluşumundaki temel rolü nedeniyle γ -sekretaz, AH için ilgi çekici bir terapötik hedef olmuştur. Günümüzde AH'nda ilaç araştırmaları γ -sekretaz inhibitörlerinin geliştirilmesine odaklanmıştır. Bununla birlikte, γ -sekretazın inhibisyonuna bağlı diğer fizyolojik reaksiyonlarla ilişkili proteoliz mekanizmalarındaki bozulmalar nedeniyle tedavi alternatiflerinin geliştirilmesi de gerekmektedir (176).

2.13. TGF- β Süper Ailesi

TGF- β (Transforming growth faktör beta), ilk olarak sıçan böbrek hücrelerinde koloni oluşumunu uyaran bir protein olarak tanımlanmıştır (177). İleri araştırmalar sonucunda TGF- β ailesinin, embriyogenez, immün sistem gelişimi, ekstrasellüler matriks metabolizması ve hücre döngüsü gibi birçok fizyolojik süreçte görev alan, pleiotropik sitokinler olduğu bulunmuştur (178). TGF- β ailesi, memelilerde eksprese olan kemik morfogenetik proteinler (BMP), büyüme ve farklılaşma faktörleri (GDF), makrofaj migrasyon inhibitör faktör (MIF), aktivinler ve inhibinler gibi 40'tan fazla

düzenleyici proteinden oluşan, geniş bir ailenin alt ailesidir (179). İnsanlarda TGF- β alt ailesi, sırasıyla 19q13, 1q41 ve 14q24 kromozomlarında yer alan, yüksek homolojiye sahip, TGF- β 1, β 2 ve β 3 olarak isimlendirilen üç izoform içermektedir (180). TGF- β alt ailesi, hücre döngüsünün kontrolü, farklılaşma, erken gelişimin düzenlenmesi, anjiyogenez, hemotopoez ve immün sistemle ilişkili olmak üzere pek çok görev üstlenmektedir (181).

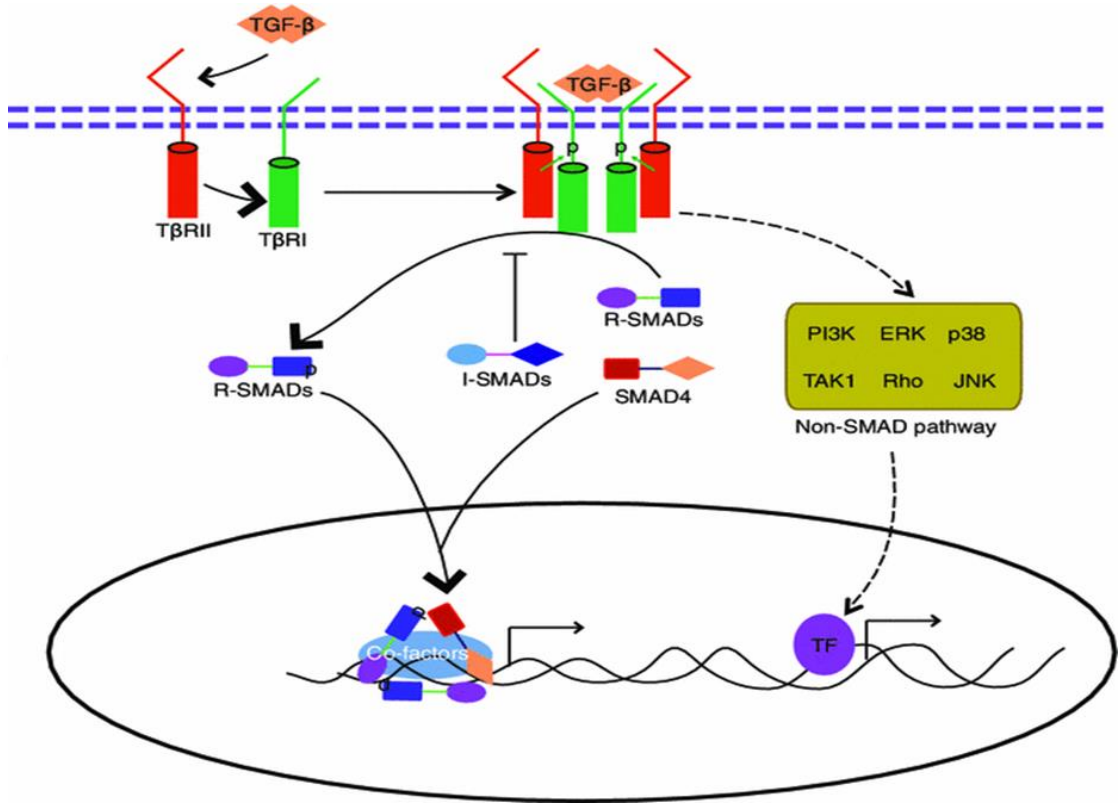
2.13.1. TGF- β 'nın Yapısı

TGF- β ailesi, yaklaşık 112 amino asit uzunluğunda ve 25 kDa moleküler ağırlığında dimerik polipeptitlerdir. Dimerler, genellikle aynı veya farklı TGF- β izoformlarından oluşan iki polipeptit zinciri arasında disülfid bağları ile birleştirilmiştir. Bu proteinler, dimerik şekilde katlanarak stabilite, sinyal iletimi ve proteolitik işleme için gereklidir. TGF- β proteinlerinin aktif formu, inaktif prekürsör kompleksin serbest bırakılmasıyla elde edilir. Bu proteolitik işlem süreci, integrinler, metalloproteinazlar ve trombospondin-1 gibi ekstrasellüler matriks bileşenlerinin etkisiyle gerçekleşmektedir. TGF- β 'nın hedef hücrelere etki etmesi için, spesifik hücre yüzeyi reseptörleri olan TGF- β reseptör tip I (T β RI) ve tip II (T β RII) aracılığıyla sinyal iletimi gerçekleşir. TGF- β 'nın T β RII'ye bağlanması, T β RI'e trans-fosforilasyonu Smad proteinlerinin fosforilasyonunu tetikler. Fosforilasyon sonucu hücre içi Smad proteinlerinin hedef gen transkriptlerini düzenleyerek hücrel yanıtın düzenlenmesi sağlanmaktadır. TGF- β sinyal yolunun, diğer sinyal yollarıyla etkileşim içerisinde olması hücrel yanıtların entegrasyonu ve çeşitliliği için gereklidir (182, 183, 184, 185, 186).

2.13.2. TGF- β Reseptör ve Sinyal Yolakları

TGF- β biyolojik etkilerini, tip I (RI) ve tip II (RII) transmembran reseptör kompleksine bağlanarak gerçekleştirir (Şekil 5) (187). RI ve RII, serin/treonin kinaz aktivitesine sahiptir. Diğer hücre yüzeyi reseptörleri olan tip III reseptör (betaglikan olarak da adlandırılır) ve endoglin, TGF- β 'yı yüksek afinite ile bağlayan proteoglikanlardır. TGF- β süper ailesinin üyelerine bağlanmak için farklı özellikler ve afiniteler gösteren yaklaşık altı adet tip II ve dört adet de tip I memeli reseptörü tespit edilmiştir (188). TGF- β ve ilgili büyüme faktörleri, hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını ve göçünü düzenleyen, temel olarak hücre homeostazında işlev gören

pleiotropik proteinler olarak salınırlar. TGF- β üyeleri, sinyal transdüsörleri olarak Smad ailesi üyeleriyle bağlantılı tip I ve tip II reseptörlerinin heteromerik kompleksleri aracılığıyla hareket ederler (189).



Şekil 5. TGF- β sinyal yolunun şematik gösterimi (190)

TGF- β süper ailesi, transmembran serin/threonin kinaz reseptörlerini aktive ederek fonksiyonlarını gerçekleştirir. Serin-treonin kinaz reseptörlerinin aktivasyonu, transkripsiyonel regülatörler olarak görev yapan Smad proteinlerini uyarır (191). Sinyal iletimi, tip II reseptörlere bağlanmış ligand kompleksinin tip I reseptörleri fosforile etmesi ile gerçekleşir. TGF- β sinyalinin iletimi için bu fosforilasyonun gerçekleşmesinden sonra çekirdeğe ilgili sinyal iletiminin ulaşması için Co-Smad'lar ve R-Smad'lar, hetero-oligomer adı verilen yapıyı oluşturur ve bu kompleks çekirdeğe girer. Çekirdek içinde transkripsiyonel faktörler yardımı ile DNA üzerindeki hedef gen bölgesine bağlanarak, TGF- β uyarımı için gerekli yanıt oluşturulur (192).

2.13.3. Yetişkin Beyninde TGF- β Süper Ailesinin İfadesi ve Nörogeneze Etkisi

Yetişkin nörogenezi, beyinde nöronal kök hücrelerin (NSC) çoğalmasını, hücre döngüsünden çıkışını, farklılaşmayı, olgunlaşmayı ve nöral devrelere entegrasyonu içerir (193). Yetişkin ön beyin subventriküler bölgesinin (SVZ) nörojenik nişi; tip-A, tip-B ve tip-C olmak üzere üç ana proliferatif hücre tipinden oluşur. Çok potansiyelli, kendi kendini yenileyen B tipi hücreler, SVZ'nin nörojenik süreçte en erken ortaya çıkan hücre tipidir ve hızla bölünen tip-C hücrelerine veya transit çoğaltıcı progenitörlere dönüşebilmektedir. Tip-A hücreler veya nöroblastlar ise tip-C hücrelerden farklılaşırlar. Bu hücreler proliferatif kapasiteye sahip nöronal progenitör hücreler olup, ara nöronlara farklılaştıktan sonra, olfaktör bulbusa göç ederler. Hipokampal dentat giyrusun subgranüler bölgesinde, tip-1 ve tip-2 yavaş bölünen progenitörler, daha hızlı bölünen ara progenitör hücrelere dönüşürler ve bunlar sırayla olgunlaşmamış nöroblastlara farklılaşırlar. Daha sonra granüler hücre tabakasına göç ederler ve olgun hücrelere dönüşürler. Bu olgun hücreler, nöronlar ve mevcut hipokampal nöronal devre ile bütünleşerek nörogenez sürecini tamamlamış olurlar (194).

MSS içinde TGF- β 'nın üç izoformunun hem nöronal hem de gliyal hücreler tarafından üretildiği bilinmektedir. Gelişim sırasında, TGF- β 2 ve TGF- β 3'ün yaygın ekspresyonunun, nöronal migrasyon, gliyal proliferasyon ve farklılaşmanın düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir (195). Yetişkin beyinde TGF- β reseptörlerinin, beyin korteksi, hipokampus, beyin sapı ve serebellumda belirgin olmak üzere varlığı gösterilmiştir. T β RI ve T β RII immünreaktivitesinin kortikal gri cevherde bulunan nöronlar, astrositler, mikrogliya ve endotel hücrelerinde saptanmış olması, MSS hücrelerinin TGF- β sinyali için potansiyel bir hedef olduklarını göstermektedir (196). TGF- β süper ailesi aynı zamanda, yetişkin beyninin nörojenik nişlerindeki kök hücrelerin ve öncül hücrelerin de proliferasyonunu, farklılaşmasını, olgunlaşmasını ve hayatta kalmasını kontrol etme yeteneğine sahiptir (197).

T β RI ve T β RII'nin, SVZ'daki nestin pozitif tip-B ve tip-C hücreleri tarafından da eksprese edildiği rapor edilmiştir. Bunun yanında, TGF- β 1, β 2 ve β 3'ün yetişkin SVZ'da yer alan nöronlarda ve dentat girusta (DG) bulunan hücrelerde mRNA ekspresyonunun varlığı gösterilmiştir (198). Nörogenezin yaşla birlikte azaldığı

bilinmektedir. Yaşlanmayla birlikte, TGF- β 'nin ekspresyon düzeyinde görülen azalma, TGF- β 'nin nörogenezin olası bir düzenleyicisi olduğunu düşündürmüştür. TGF- β 1 ekspresyonunun aynı zamanda yetişkin insan hipokampusunda de gösterilmiştir (199). Smad 2/3 sinyal yolağı ekspresyonlarının da, hipokampuste dentat girusta yüksek olması, TGF- β 'nin nörogenezin düzenlenmesinde yer aldığının göstergesi olarak değerlendirilmiştir (200). Bunların yanında, TGF- β 'nin tip-1 ve tip-2 primer NSC'ler üzerindeki doğrudan antiproliferatif etkisine bağlı olarak, aşırı eksprese edildiği koşullarda, hipokampal nörogenezin belirgin olarak inhibe edildiği de rapor edilmiştir (201).

Yapılan son çalışmalarda, nörogenezin ileri aşamalarında TGF- β sinyalinin yenidoğan DG'undaki nöronların hayatta kalması ve olgunlaşması için kritik öneme sahip olduğu vurgulanmıştır. Gerçekten de T β RI geninin immatür ve matür nöronlarda koşullu delesyonunun nörogenezin ve nöronların yaşam süresinin azalmasına yol açtığı belirlenmiştir (202).

2.13.4. TGF- β 1 ve Tedavi Edici Etkileri

TGF- β 1, iyileşmeyi destekleyen, patolojik öncüllerin çoğalmasını inhibe eden, ekstrasellüler matriks moleküllerinin upregülasyonu ile astrositleri uyarak gliyal skar oluşumunu destekleyen nöroprotektif ve antienflamatuvar bir sitokindir (203). TGF- β 1 nöroprotektif etkisi ile çeşitli yaralanma modellerinde nörogenezi destekleyerek tedavide olumlu sonuçların elde edilmesini sağlamıştır (204).

Deneyisel olarak, orta serebral arter oklüzyonunda (MCAO), intranazal TGF- β 1 tedavisi sonucu nöral progenitörlerin çoğaltılması ve SVZ'daki yeni nöronların sayısının artırılması sağlanmıştır (205). Ayrıca, mikrogliyal aktivasyon ve proliferasyonun TGF- β 1 aracılı down-regülasyonu da gösterilmiştir (206). TGF- β 1 sinyalinin düzensizliği, kronik enflamasyon için potansiyel bir kaynak olarak kabul edilmektedir. Anormal TGF- β 1 sinyali ve bunun sonucunda nörojenik bölgelerde aktive mikrogliya birikimi Alzheimer hastalığının ilerlemesi için önemlidir (207). TGF- β 1'in intranazal uygulaması sonucu beyinde korteks, talamus, olfaktör bulbus ve hipokampus bölgelerinde bu sitokinin seviyesinin arttığı bildirilmiştir. Buna bağlı olarak gen ekspresyonlarının değişebileceği ileri sürülmüştür (208). TGF- β 1 uygulamasının deneyisel inme modelinde, nöronal fonksiyonları yükselttiği ve nöronal sağ kalımı

artırdığı rapor edilmiştir (205). TGF- β 1'in aynı zamanda Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda da nöroenflamasyonu engelleyebileceği ileri sürülmüştür (209). Bunların yanında, deneysel olarak intravenöz TGF- β 1 uygulaması ve hücre kültürü çalışmalarında TGF- β 1'in oligodendrosit aktivasyonunun artmasına bağlı olarak remiyelinizasyonu uyardığı gösterilmiştir (210).

2.14. Kaspaz-3

Programlı hücre ölümü olan apoptoz kaspaz ailesi tarafından düzenlenmektedir. Apoptotik mekanizmada kritik göreve sahip kaspazlar, katalitik bölgede anahtar bir sistein amino asidini barındırmaları ve seçici olarak C-terminal bölgelerindeki aspartatlardan proteinleri kesmeleri ile karakterize proteinlerdir. Kaspaz-3 apoptozda primer etkili bir protein olarak kabul edilmektedir. Yapılan çalışmalarda, kaspaz-3'ün aktivasyonu, in vivo ve in vitro koşullarda nükleer DNA parçalanmasına yol açtığı böylece nöronal gelişim bozukluğu ve MSS hasarına neden olduğu belirtilmiştir (211, 212).

Alzheimer hastalığı ve down sendromu gibi nörodejeneratif hastalıklarda kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptotik hücrelerin sayılarında belirgin bir artışın varlığı gösterilmiştir. AH'nın ilerlemesi sırasında apoptoz sürecinin aktive olduğu ve nöronal ölümün arttığı kabul edilmektedir. Apoptotik süreçte artan kaspaz-3 aktivasyonu, ölüm sonrası hem AH hastalarının beyinde hem de AH hayvan modellerinde gösterilmiştir. Yapılan araştırmalarda kaspaz aktivasyonunun sitotoksik peptitlerin birikmesine ve sinaptik hasara yol açan amiloid öncü protein bölünmesine sebep olduğu rapor edilmiştir. Bunların dışında, kaspaz-3'ün, AH'nda taunun bölünmesini uyardığı ve tau birikimine neden olduğu bildirilmiştir (213).

Bugüne kadar AH'nda görülen hücre ölümünün engellenmesi amacıyla pek çok araştırma yapılmış ve halen de bu çalışmalar yoğun olarak sürdürülmektedir. TGF- β 1'in, iskemiye bağlı apoptotik ve eksitotoksik nöronal hücre ölümüne karşı olumlu etkileri rapor edilmiştir. Başka bir çalışmada TGF- β 1'in staurosporine bağlı apoptoza karşı nöroprotektif bir etkisi olduğunu ileri sürülmüştür. TGF- β 1'in NMDA kaynaklı eksitotoksisiteye karşı seçici nöroprotektif etkisinin olup olmadığını belirlemek için ileri çalışmaların yapılması önerilmektedir. AH'nda TGF- β 1'in hücre ölümünü engelleyerek etki gösterebileceği ileri sürülmekle birlikte, tedavi edici ajan olarak değerlendirilmesinde ayrıntılı araştırmaların yapılmasına ihtiyaç bulunmaktadır (214, 215).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanlarının Elde Edilmesi ve Gruplandırılması

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi ile Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji, Fizyoloji ve Biyokimya Anabilim Dallarının imkanları kullanılarak yürütüldü. Deney sürecindeki tüm uygulamalar ve doku örneklerinin alınması, etik kurul onayıyla gerçekleştirildi. Çalışmada, Sağlık Bilimleri Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilen ağırlığı 30-40 gram arasında değişen 88 adet yetişkin, erkek, Swiss-Albino cinsi fare kullanıldı. Ortam sıcaklığı $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de sabit tutularak, aydınlık-karanlık döngüsü otomatik ayarlayıcı bir aygıt aracılığıyla 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık olacak şekilde düzenlendi. Havalandırma, pencere tipi aspiratörle nem sabit olacak şekilde sağlandı. Fareler, paslanmaz tel kapakları olan plastik kafesler içerisinde tutuldu. Deney hayvanları için uygun zemin; farelerin dinlenme ve hareketine uygun şekilde enfeksiyona yol açmayacak materyal ile hazırlandı. Günlük altlık değişimi takip edildi. Deney hayvanları ilgili yönetmeliklere göre hazırlanmış pelet yemlerle Ad-Libitum olarak beslendi.

Çalışmamızda 88 adet erkek fare rastgele ayrılarak, normal kontrol, sham, TGF- $\beta 1$ uygulanan grup, deney ve tedavi grubu olmak üzere 5 gruba bölündü. 5. Grup tedavi grubu olup bu grupta yer alan hayvanlar kendi içinde 2 alt gruba ayrıldı.

Grup 1: Kontrol grubu (n=12): Herhangi bir hasar oluşturulmayan ve enjeksiyon uygulanmayan bu grupta yer alan deneklerin yarısı deneyin 23-28. günlerinde Morris su havuzu testi uygulanmasının ardından sakrifiye edildi. Geri kalan hayvanlara deneyin 51-56. günler arasında Morris su havuzu testi uygulandı ve 56. günde sakrifiye edildi. 28. ve 56. günlerde sakrifiye edilen deneklerden beyin hipokampus ve prefrontal korteks dokuları elde edildi.

Grup 2: Sham grubu (n=12): Bu grupta yer alan deneklerden yarısına deneyin 1. gününden itibaren 28 gün boyunca, 2 mg/kg %10'luk serum fizyolojik (SF), intraperitoneal yolla (i.p.) verilerek, uygulanan yöntemlerin etkisinin olup olmadığı araştırıldı. Deneyin 23-28. günlerinde Morris su havuzu testi uygulanmasının ardından denekler sakrifiye edildi. Bu gruba ait geri kalan hayvanlara 28 gün boyunca i.p yolla 2 mg/kg dozda SF verilmeye devam edildi ve deneyin 51-56. günler arasında Morris su

havuzu testi uygulandı. 28. ve 56. günlerde sakrifiye edilen deneklerden beyin hipokampus ve prefrontal korteks dokuları elde edildi.

Grup 3: TGF- β 1 kontrol grubu (n=12): TGF- β 1'in deney hayvanlarına herhangi bir etkisinin olup olmadığını test etmek üzere bu grupta yer alan deneklere deneyin 1. gününden itibaren 28 gün boyunca, TGF- β 1, 2 μ g/gün i.p. olarak uygulandı. Deneyin 23-28. günlerinde Morris su havuzu testi uygulanmasının ardından deneklerin yarısı sakrifiye edildi. Bu gruba ait geri kalan hayvanlara 28 gün boyunca 2 μ g/gün i.p. yolla SF uygulandı. Bu fareler, 56.günde Morris su havuzu testi uygulamasının ardından sakrifiye edildi. 28. ve 56. günlerde sakrifiye edilen deneklerden beyin hipokampus ve prefrontal korteks dokuları alındı.

Grup 4: Deney grubu (n=20): Skopolamin (SC) uygulanan grup. Deneklere 28 gün boyunca 2 mg/kg/gün SC + SF i.p. bir saat arayla uygulandı. Deneyin 23-28. günlerinde deneklerin yarısına Morris su havuzu testi uygulandıktan sonra hayvanlar sakrifiye edildi. Bu gruba ait geri kalan hayvanlara 28 gün boyunca SF i.p. olarak verildi ve deneyin 51-56. günlerinde Morris su havuzu testi uygulandıktan sonra denekler 56. günde sakrifiye edildi. 28. ve 56. günlerde sakrifiye edilen deneklerden beyin hipokampus ve prefrontal korteks dokuları alındı.

Grup 5: Bu grupta yer alan 32 deney hayvanı, Tedavi-1 grubu ve Tedavi-2 grubu olmak üzere 2 alt gruba ayrıldı.

Grup 5-A: Tedavi-1 grubu (n=20): Bu gruptaki deneklere deneyin 1. gününden itibaren 28 gün boyunca, 2 mg/kg/gün i.p. SC ile 2 μ g/gün i.p. TGF- β 1 bir saat arayla uygulandı. 28. günde deney hayvanlarından yarısı Morris su havuzu testi uygulandıktan sonra sakrifiye edildi. Bu gruba ait geri kalan hayvanlara 28 gün boyunca yalnızca i.p. SF verildi. 51-56. günler arasında Morris su havuzu testi uygulandıktan sonra bu denekler 56. günde sakrifiye edildi. 28. ve 56. günlerde sakrifiye edilen hayvanlardan beyin hipokampus ve prefrontal korteks dokuları alındı.

Grup 5-B: Tedavi-2 grubu (n=12): Bu gruptaki deneklerde, TGF- β 1'in AH modeli oluşturulduktan sonraki süreçte etkisinin incelenmesi amaçlandı. Deney hayvanlarının tamamına deneyin 1. gününden itibaren 28 gün boyunca 2 mg/kg/gün i.p. SC + i.p. SF bir saat arayla uygulandı. 28. günde SC uygulaması durdurularak, deneklere 28.-56. günler arasında TGF- β 1 2 μ g/gün i.p.+ i.p. SF bir saat arayla

uygulandı. 51-56. günler arasında Morris su havuzu testi uygulandıktan sonra denekler 56. günde sakrifiye edilerek beyin hipokampus ve prefrontal korteks dokuları alındı.

3.2. Deneysel Alzheimer Hastalığı Modeli Oluşturulması ve Deneyin Yapılışı

Deneysel Alzheimer hastalığı modeli oluşturmak üzere asetilkolinesteraz inhibitörü olan skopolamin (Sigma-Aldrich PHR-1470, USA) kullanıldı. Skopolamin, 0,10 mg/ml olacak şekilde, serum fizyolojik içerisinde sulandırılarak stok solüsyon hazırlandı. Stok solüsyon, 1ml'lik ependorflara ayrılarak -20°C'de saklandı. Enjeksiyondan önce stok solüsyon serum fizyolojik ile sulandırılıp final doz hazırlanarak, enjeksiyon günlerinde +4°C'de saklanıp soğuk zincirle muhafazası sağlandı.

Grup 4, 5A ve 5B'ye skopolamin günde bir defa (her gün saat 10:00'da) periton içine, 2 mg/kg dozda 28 gün süre ile uygulandı. Sham ve yaşlanmaya bırakılan gruplarda ise davranış değişikliğinin olmaması için, Skopolamin ile aynı hacimde günde bir defa periton içine serum fizyolojik enjeksiyonu yapıldı. Enjeksiyon günlerinde deney hayvanlarının somatik büyümelerinin takibi için vücut ağırlıkları ölçüldü.

Tedavi amacıyla TGF- β 1, (Recombinant Mouse TGF- β 1 CSB-EP023446MO, Cusabio Technology, China) daha önce literatürde belirtilen doz ve yolla periton içine 2 μ g/gün olarak grup 3, 5A ve 5B'ye uygulandı. TGF- β 1 serum fizyolojik içerisinde 0,1 ml'de 2 μ g olacak şekilde sulandırılarak hazırlandı. Hazırlanan stok solüsyon, 0,5 ml'lik ependorf tüpleri içerisinde -20°C'de saklanarak enjeksiyondan önce +4°C'de bekletilen TGF- β 1, intraperitoneal olarak uygulandı.

3.3. Işık Mikroskopik Yöntemler

Işık mikroskopik inceleme için alınan prefrontal korteks ve hipokampus doku örnekleri, % 10'luk formalin içerisine alındı ve bu solüsyonda 3 gün bekletilerek tespit edildi. Dokular ardından akar suda yıkandıktan sonra, Leica TP 1020 ototeknikon cihazı (Leica Biosystems, Germany) ile Tablo 1'de belirtilen şekilde doku takip işlemi yapıldı.

Tablo 1. Işıık mikroskobik doku takip işlemleri aşamaları

Oda Sıcaklığında	Formalin	30 dakika
Oda Sıcaklığında	% 70'lik etil alkol	1 saat
Oda Sıcaklığında	% 80'lik etil alkol	1 saat
Oda Sıcaklığında	% 90'lık etil alkol	1 saat 30 dakika
Oda Sıcaklığında	Saf alkol	1 saat
Oda Sıcaklığında	Saf alkol	1 saat
Oda Sıcaklığında	Saf alkol	1 saat 30 dakika
Oda Sıcaklığında	Saf alkol + Ksilol	1 saat
Oda Sıcaklığında	Ksilol	1 saat
Oda Sıcaklığında	Ksilol	1 saat 30 dakika
60°C'de	Parafin	1 saat
60°C'de	Parafin	1 saat 30 dakika

Doku takibinden sonra prefrontal korteks ve hipokampus doku örnekleri, parafin içerisinde bloklandı ve mikrotom (Thermo Shandon Finesse 325, USA) ile 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler Hematoksilen-Eozin (H&E) ile boyandı. Olympus BX53 ışıık mikroskobunda (Japonya) incelenerek fotoğrafları çekildi.

3.4. Elektron Mikroskobik Yöntemler

Elektron mikroskobik değeriendirme için alınan prefrontal korteks ve hipokampus dokuları, Millonig fosfat tamponu ile hazırlanmış %5'lik glutaraldehit solüsyonunda 1 saat bekletildikten sonra, üzerinde birkaç damla glutaraldehit olan dişçi mumuyla kaplı petri üzerinde jilet yardımıyla 1 mm³'lük parçalara ayrıldı. Doku parçaları tekrar glutaraldehit solüsyonuna alınarak 3 saat tespit edildi. Daha sonra dokular Millonig fosfat tamponunda iki defa 10'ar dk yıkandı ve ardından Millonig fosfat tamponu ile hazırlanmış %1'lik Osmium tetraoksit (OsO₄) solüsyonuna alındı. 2

saat OsO_4 ile tespit edildi, ardından dokular, Millonig fosfat tamponu ile iki kez 10'ar dakika daha yıkandı. Daha sonra Tablo 2'de belirtildiği şekilde doku takip işlemleri uygulandı.

Tablo 2. Elektron mikroskopik doku takip aşamaları

%50'lik etil alkol	+4°C'de	15 dakika
%70'lik etil alkol	+4°C'de	15 dakika
%86'lik etil alkol	+4°C'de	15 dakika
%96'lik etil alkol	+4°C'de	15 dakika
%100'lük etil alkol	+4°C'de	15 dakika
%100'lük etil alkol	+4°C'de	15 dakika
%100'lük etil alkol	Oda sıcaklığında	15 dakika
Propilen Oksit	Oda sıcaklığında	15 dakika
Propilen Oksit	Oda sıcaklığında	15 dakika
Propilen Oksit+ Gömme materyali	Oda sıcaklığında	30 dakika
Propilen Oksit+ Gömme materyali	Oda sıcaklığında	30 dakika

Bu işlemlerin ardından doku parçaları Tablo-3'de içeriği ve miktarı belirtilen resin solüsyonu içerisine alındı ve 1 gece rotatorda karıştırıldı. Ertesi gün doku parçaları yeni hazırlanmış gömme materyali kullanılarak beem kapsüllere gömüldü ve 60°C'de etüvde 48 saat boyunca polimerize edildi. Daha sonra bloklar etüvden çıkarılarak soğumaya bırakıldı. Bloklardan ultramikrotom (Reichert Ultracut S, Avusturya) ile 1 μm kalınlığında yarı ince kesitler alınarak toluidin mavisi ile boyandı ve doku bloklarında uygun alanların seçimi yapıldı. Belirlenen alanlardan ultramikrotom ile 50 nm kalınlığında ince kesitler alındı. Kesitler 200-300 gözenekli bakır gridlere alınarak %70'lik etil alkolde hazırlanan doymuş uranil asetat ve kurşun sitrat solüsyonları ile kontrastlandı. Boyanan kesitler JEOL-JEM 1400 Transmisyon Elektron Mikroskobu (Japonya) ile incelendi ve fotomikrograflar elde edildi.

Tablo 3. Gömme materyalinin hazırlanışı

Araldit (CY 212)	20 ml
Sertleştirici (HY 964)	20 ml
Hızlandırıcı (DY 064)	0,6 ml
Plastikleştirici-Dibütil Fitalat	1 ml

3.5. İmmünohistokimyasal Yöntemler

Amiloid beta-40 (A β -40) ve Kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi amacıyla prefrontal korteks ve hipokampustan elde edilen 5 mikron kalınlığında histolojik doku kesitleri, polilizin kaplı lamalar üzerine alındı. +4°C’de bekletilen kesitler işaretleme işlemine geçilmeden önce kurutularak, bu işlemten sonra tekrar buzdolabına alındı ve 15 dakika kadar bekletildi. Buzdolabından çıkarıldıktan sonra tekrar kurutulan kesitler, 60°C’de etüvde ksilol içerisinde 15 dakika bekletilerek deparafinize edildi. Daha sonra doku kesitleri, oda sıcaklığında ksilol serilerinden geçirildi ve derecesi giderek azalan alkol serileri içerisinde hidrate edildi ve distile su içerisine alındı. Kesitler daha sonra, sitrat solüsyonu (pH: 6) içerisine alınıp 95°C’lik su banyosunda 30 dakika süreyle bekletilerek antijenlerin açığa çıkarılması sağlandı. Oda sıcaklığında 45 dk soğutulan kesitler, distile suda yıkandı ve endojen peroksitleri engellemek amacıyla %3’lük hidrojen peroksit (H₂O₂) içerisine alınarak 10 dk bekletildi. Kesitler, saf su ve fosfat tamponundan (PBS, pH: 7,2-7,4) geçirildi. Her bir kesitin etrafı dikkatlice silinip, kurulandıktan sonra, üzerine non-spesifik bağlanmayı engellemek amacıyla blocking solüsyonu (ab93705, Abcam, USA) damlatıldı ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletildikten sonra kesitler, distile su ve fosfat tamponundan geçirildi ve dokuların etrafı kurulandı. Daha sonra 1/200 oranında dilüe edilen anti A β -40 (NBP1-44047 Novus biologicals, USA) ve 1/500 oranında dilüe edilen Kaspaz-3 (Monoclonal antibody, ab32499, Abcam, USA) primer antikoru damlatıldı. Primer antikor damlatılan tüm kesitler +4°C’de, nemli ortamda bir gece bekletildi. Negatif kontrol için alınan kesitlere, primer antikorlar yerine dilüsyon solüsyonu damlatıldı. Primer antikorla muamele edilip 1 gece +4°C’de ve ardından da 1 saat oda sıcaklığında bekletilen kesitler, daha sonra distile su ve PBS’den geçirildi ve üzerlerine Biotin (ab93705, Abcam, USA) damlatılarak 15 dk süreyle oda sıcaklığında tutuldu. 15 dk sonra distile su ve PBS’de yıkanan kesitlerin etrafı kurulanıp Avidin (ab93705, Abcam, USA)

damlatılarak, 20 dakika süreyle oda sıcaklığında bekletildi. Distile su ve PBS'den geçirilen kesitler üzerine, Aminoetilkarbozol (AEC, ab93705, Abcam, USA) solüsyonu damlatıldı ve 10 dakika bekletildi ardından çeşme suyu ile yıkandı. Doku kesitleri, zıt boyama için hematoksilen ile 30 saniye boyandı. Boyama işleminden sonra kesitler, tekrar çeşme suyunda yıkanarak kurumaya bırakıldı. Su bazlı yapıştırıcı madde damlatılarak dokular lamel ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Olympus BX53 ışık mikroskobu (Japonya) ile incelendi ve fotoğrafları çekildi.

3.5.1. İmmünohistokimyasal Skorlama Yöntemi

A β -40 ve kaspaz-3 ekspresyonunun araştırılması amacıyla fotoğrafları çekilen kesitlere immünohistokimyasal skorlama yöntemi uygulandı. İmmünohistokimyasal skorlama için 40'lık objektifte rastgele seçilen 10 alanda H Skorlama sistemi kullanıldı. H skoru, pozitif hücre yüzdesiyle birlikte 4 farklı boyama yoğunluğunun çarpımı toplanarak hesaplandı.

Bu sisteme göre;

Boyanma derecesi; = 0 (Hiç boyanma yok)
= 1 (Zayıf derecede boyanma)
= 2 (Orta derecede boyanma)
= 3 (Güçlü derecede boyanma) şeklinde değerlendirildi.

H Skor değerini hesaplamak için 'I x PC' formülü kullanıldı.

I: Intensity (Yoğunluk)

PC: Percentage of positive cells (Her derecede boyanan hücre yüzdesi)

Gruplar arasındaki ekspresyon farklılıkları 'Mann Whitney U' testi kullanılarak değerlendirildi. 0,05'ten küçük p değerleri anlamlı kabul edildi.

3.6. Morris Su Havuzu Eğitim Denemeleri ve Testi

Morris su havuzu eğitim denemeleri ve testi ile farelerin uzaysal öğrenmeleri ve bellekleri değerlendirildi (Şekil 6). Morris su havuzunda deney hayvanları 5 gün üst üste, günde 4 kez eğitim denemelerine tabi tutuldu. Her denemede, hayali olarak bölünmüş dört kadranın herhangi birinden havuza bırakılan fareler, kaçış platformunu bulmaları için 60 sn süresince yüzdürüldü. Deney hayvanları, platforma geldiklerinde burada 15 sn bekletildikten sonra havuzdan alındı. Eğitim denemeleri sırasında fareler,

platformu 60 sn süresince bulamamışlarsa el yardımı ile yönlendirilerek platformun yerini uzaysal olarak öğrenmeleri sağlandı ve 15 sn platformda bekletilerek havuzdan alındı. Platformun yeri, denemelerin hepsinde aynı kadranda sabit şekilde tutuldu. Eğitim denemeleri arasında fareler, uygun ortam sıcaklığı sağlanarak kafeslerinde 30 sn bekletildi. Test sırasında platform havuzdan uzaklaştırıldı ve deney hayvanları platformun uzaklaştırılmasından önce, bulunduğu kadranın karşısındaki kadrandan havuza bırakıldı. Fareler, test için 60 sn süresince havuzda yüzdürüldü ve platform uzaklaştırılmadan önce bulunduğu kadranda (hedef kadranda) geçirdikleri süre kamera ile kayıt altına alınarak, ETHOVISION XT (NOLDUS, sürüm 4.1) programı ile değerlendirildi.



Şekil 6. Morris su havuzu deney platformu

3.6.1. Morris Su Havuzu Eğitim Denemelerinde Kullanılan Ölçütler

Platformu bulma süresi: Eğitim denemelerinde 60 sn içinde kaçış platformunu bulma süresi (sn)

Yüzme mesafesi: Platform bulunana kadar kat edilen mesafe (cm)

Yüzme hızı: Platform bulunana kadar yüzme hızı (cm/sn)

3.6.2. Morris Su Havuzu Testlerinde Kullanılan Ölçütler

Platformun bulunduğu kadranda (hedef kadranda) geçirilen süre: Platform kaldırıldıktan sonra 60 sn süresince platformun bulunduğu kadranda geçirilen süre (sn)

Yüzme mesafesi: Platform kaldırıldıktan sonra 60 sn süresince kat edilen mesafe (cm)

Yüzme hızı: Platform kaldırıldıktan sonra 60 sn süresince yüzme hızı (cm/sn)
(Tablo 4)

Tablo 4. Morris su havuzunda kullanılan ölçütler

Testler	Platformu bulma süresi
	Yüzme mesafesi
	Yüzme hızı
	Platformun bulunduğu kadranda (hedef kadranda) geçirilen süre
	Yüzme mesafesi
	Yüzme hızı

3.7. Biyokimyasal Yöntemler

3.7.1. Alfa Sekretaz Tayini

Homojenize edilmiş örnekteki alfa sekretaz derişimi ELISA yöntemi ile tespit edildi. Bu amaçla “SunRed Biotechnology Company Mouse Alfa-Sekretase ELISA Kit” kullanıldı. 96 kuyucuklu plakalar alfa sekretaz antikoruna ile kaplanmıştır. Örneklerde bulunan alfa sekretaz, bu antikorla etkileşime girmektedir. Ardından eklenen biyotinlenmiş alfa sekretaz antikoruna da alfa sekretaz ile etkileşime girer. Streptavidin-HRP eklendikten sonra streptavidin-HRP-biyotinlenmiş alfa sekretaz antikoruna kompleksinin oluşması sağlandı. Kompleksteki HRP’ye özgün substrat eklendikten sonra meydana gelen ürünün renk şiddeti, alfa sekretaz derişimi ile doğru orantılıdır. Renk şiddeti 450 nm içerisinde ELISA okuyucuda ölçüldü. Standart çözeltilerin derişimi 0,4;0,8;1,6;3,2 ve 6,4 ng/mL’dir. Sonuçlar standart grafiğine göre lineer regresyon analizi ile hesaplandı.

3.7.2. Beta Sekretaz Tayini

Homojenize edilmiş örnekteki beta sekretaz derişimi ELISA yöntemi ile tespit edildi. Bu amaçla “Bioassay Technology Laboratory Mouse Beta-Secretase ELISA Kit” kullanıldı. 96 kuyucuklu plakalar beta sekretaz antikoru ile kaplıdır. Örneklerde bulunan beta sekretaz, bu antikorla etkileşime girmektedir. Ardından eklenen biyotinlenmiş beta sekretaz antikoru da beta sekretaz ile etkileşime girmektedir. Streptavidin-HRP eklendikten sonra streptavidin-HRP-biyotinlenmiş beta sekretaz antikoru kompleksi oluşturuldu. Kompleksteki HRP’ye özgün substrat eklendikten sonra meydana gelen ürünün renk şiddeti beta sekretaz derişimi ile doğru orantılıdır. Renk şiddeti 450 nm içerisinde ELISA okuyucuda ölçüldü. Standart çözeltilerin derişimi 50;100;200;400 ve 800 pg/mL’dir. Sonuçlar standart grafiğine göre lineer regresyon analizi ile hesaplandı.

3.7.3. Gamma Sekretaz Tayini

Homojenize edilmiş örnekteki gamma sekretaz derişimi, ELISA yöntemi ile tespit edildi. Bu amaçla “Bioassay Technology Laboratory Mouse Gamma-Secretase ELISA Kit” kullanıldı. 96 kuyucuklu plakalar gamma sekretaz antikoru ile kaplanmıştır. Örneklerde bulunan gamma sekretaz bu antikorla etkileşime girmektedir. Ardından eklenen biyotinlenmiş gamma sekretaz antikoru da gamma sekretaz ile etkileşime girer. Streptavidin-HRP eklendikten sonra streptavidin-HRP-biyotinlenmiş gamma sekretaz antikoru kompleksi oluşturuldu. Kompleksteki HRP’ye özgün substrat eklendikten sonra meydana gelen ürünün renk şiddeti gamma sekretaz derişimi ile doğru orantılıdır. Renk şiddeti 450 nm içerisinde ELISA okuyucuda ölçüldü. Standart çözeltilerin derişimi 30;60;120;240 ve 480 ng/L’dir. Sonuçlar standart grafiğine göre lineer regresyon analizi ile hesaplandı.

3.8. İstatistiksel Analiz

Çalışma verilerinin istatistiksel analizinde GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc. USA) programı kullanıldı. Verilerin normal dağılımlı olup olmadıklarını değerlendirmek amacıyla “*D’Agostino & Pearson omnibus normality test*” yapıldı. Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi 0,05 olarak alındı. Tekrarlı ölçümlerde iki yönlü ANOVA kullanıldı ve grup içi değişimde eşleştirilmiş örneklerde t-testi, gruplar arası karşılaştırmalarda ise student t-testi kullanıldı. İmmunohistokimyasal analizde ise gruplar arasındaki ekspresyon farklılıkları Mann Whitney U testi kullanılarak değerlendirildi. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

Morris su havuzu testi eğitim denemeleri normal dağılıma uymadığı için Friedman’ın ANOVA testi takiben grupların kendi içlerinde karşılaştırmasında Wilcoxon testi, gruplar arası karşılaştırmada Mann Whitney U testi kullanıldı. Morris su havuzu test günü verilerinde, normal dağılıma uyan ve parametrik verilerde ANOVA ardından ikili grup karşılaştırmalarında Tukey testi, normal dağılıma uymayan verilerde Kruskal Wallis takiben Mann Whitney U testi kullanıldı.

4. BULGULAR

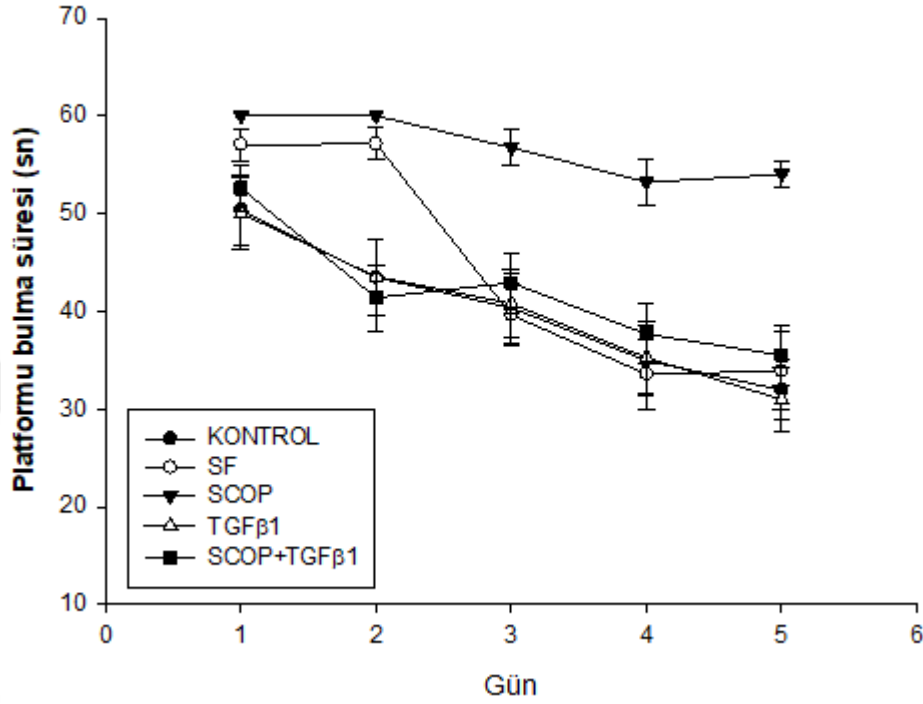
4.1. Morris Su Havuzu Testi Bulguları

4.1.1. 28. Gün Eğitim Denemeleri

Morris su havuzu testi eğitim denemelerinde gizli platformu beş gün boyunca bulma süresinde, kontrol grubunda, günler arasında anlamlı fark bulundu [$\chi^2 (4) = 12,94$ $p=0,012$]. Birinci gün ile karşılaştırıldığında, platformu bulma süresinde, üçüncü ($Z=-2,15$ $p=0,03$), dördüncü ($Z=-2,73$ $p=0,006$) ve beşinci ($Z=-2,80$ $p=0,005$) günde anlamlı azalma saptandı. Platformu bulma süresinde sham grubunda günler arasında anlamlı fark saptandı [$\chi^2 (4) = 32,05$ $p<0,001$]. Birinci gün ile karşılaştırıldığında üçüncü ($Z=-3,42$ $p=0,001$), dördüncü ($Z=-3,70$ $p<0,001$) ve beşinci ($Z=-3,54$ $p<0,001$) günde anlamlı azalma bulundu. Morris su havuzu testi eğitim denemelerinde platformu bulma süresinde deney grubunda günler arasında anlamlı fark belirlendi [$\chi^2 (4) = 35,57$ $p<0,001$]. Platformu bulma süresinde, birinci gün ile karşılaştırıldığında dördüncü ($Z=-2,52$ $p=0,012$) ve beşinci ($Z=-2,87$ $p=0,004$) günde anlamlı azalma bulundu. Platformu süresinde TGF β 1 kontrol grubunda günler arasında anlamlı fark saptadı [$\chi^2 (4) = 12,58$ $p=0,013$]. Birinci gün ile karşılaştırıldığında üçüncü, ($Z=-2,01$ $p=0,04$) dördüncü ($Z=-2,73$ $p=0,006$) ve beşinci ($Z=-2,87$ $p=0,004$) günde platformu bulma süresinde anlamlı azalma bulundu. Tedavi-1 (SCOP+ TGF β 1) grubunda platformu bulma süresinde günler arasında anlamlı fark bulundu [$\chi^2 (4) = 19,0$ $p=0,001$]. Birinci gün ile karşılaştırıldığında ikinci ($Z=-2,91$ $p=0,004$), üçüncü, ($Z=-3,23$ $p=0,001$), dördüncü ($Z=-3,64$ $p<0,001$) ve beşinci ($Z=-3,98$ $p<0,001$) günde platformu bulma süresinde anlamlı azalma saptandı.

Eğitim denemelerinde birinci [$H (4,152) = 12,20$ $p=0,016$], ikinci [$H (4,152) = 37,90$ $p<0,001$], üçüncü [$H (4,152) = 30,85$ $p<0,001$], dördüncü [$H (4,152) = 27,60$ $p<0,001$] ve beşinci [$H (4,152) = 36,04$ $p<0,001$] günlerde platformu bulma süresinde gruplar arasında anlamlı fark saptandı. Sham (SF) grubu, kontrol grubu ($U=159,5$ $p=0,002$ $z=-3,15$) ve TGF β 1 kontrol grubu ($U=160,5$ $p=0,002$ $z=-3,13$) ile karşılaştırıldığında ikinci günde platformu bulma süresinde anlamlı artış bulundu. Deney (SCOP) grubu, sham (SF) grubu ile karşılaştırıldığında platformu bulma süresinde birinci ($U=380,0$ $p=0,002$ $z=-2,98$), ikinci ($U=420,0$ $p=0,023$ $z=-2,27$),

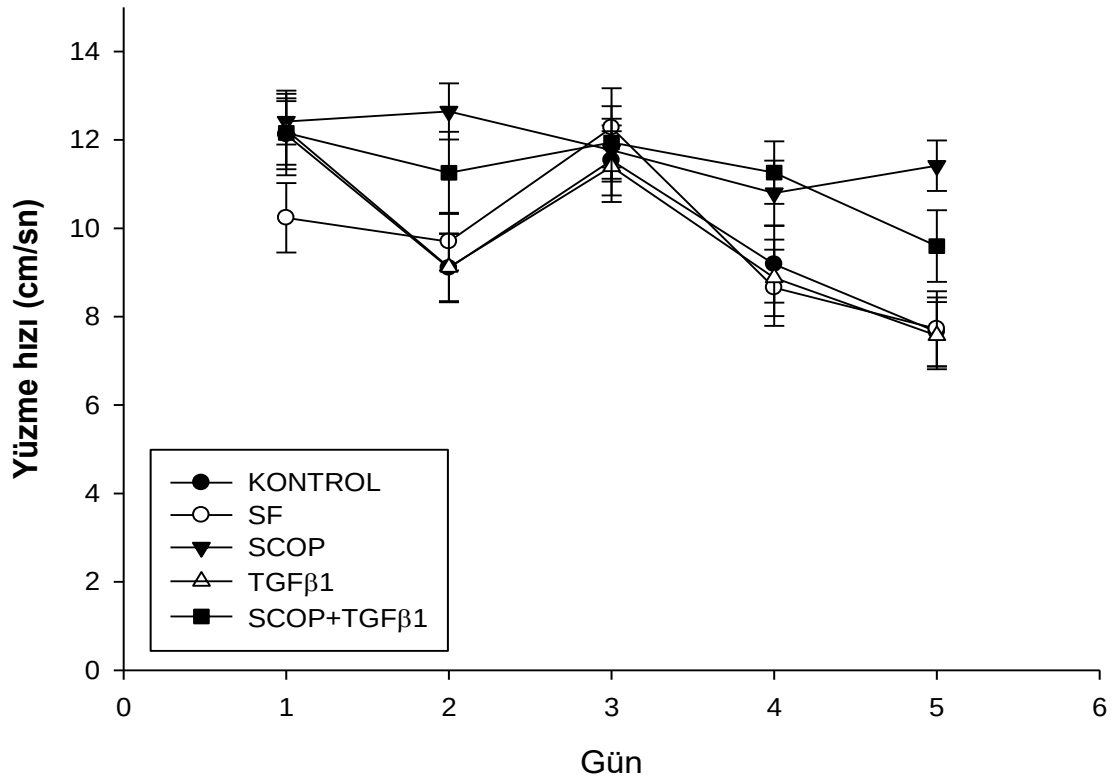
üçüncü ($U=159,5$ $p<0,001$ $z=-5,24$), dördüncü ($U=214,0$ $p<0,001$ $z=-4,14$) ve beşinci ($U=217,5$ $p<0,001$ $z=-3,84$) günde anlamlı artış saptandı (Şekil 7).



Şekil 7. Morris su havuzu testinde eğitim denemelerinde platformu bulma süresi. Veriler ortalama $\pm$ SH olarak ifade edildi. İstatistiksel analiz için bkz. Metin. Gruplarda N=6-10.

Platformu bulma süresinde, tedavi-1 (SCOP+TGFβ1) grubu, deney (SCOP) grubu ile karşılaştırıldığında birinci ($U=600,0$ $p=0,001$ $z=-3,35$), ikinci ($U=420,0$ $p<0,001$ $z=-4,90$), üçüncü ($U=450,5$ $p<0,001$ $z=-4,124$), dördüncü ($U=417,5$ $p<0,001$ $z=-4,05$) ve beşinci ($U=393,5$ $p<0,001$ $z=-4,08$) günde anlamlı azalma bulundu. TGFβ1 kontrol grubu, kontrol grubu ve tedavi-1 (SCOP+TGFβ1) grubu ile karşılaştırıldığında platformu bulma süresinde anlamlı fark saptanmadı (Şekil 7). Morris su havuzu testinde eğitim denemelerinde yüzme hızında kontrol grubunda günler arasında anlamlı fark bulundu [$\chi^2(4) = 18,33$ $p=0,001$]. Yüzme hızı, birinci gün ile karşılaştırıldığında ikinci ($Z=-2,17$ $p=0,03$), dördüncü ($Z=-2,40$ $p=0,016$) ve beşinci ($Z=-3,42$ $p=0,001$) günde anlamlı olarak azaldı. Yüzme hızında sham (SF) grubunda günler arasında anlamlı fark belirlendi [$\chi^2(4) = 12,56$ $p=0,014$]. Birinci gün ile karşılaştırıldığında yüzme hızı, üçüncü günde ($Z=-1,65$ $p=0,09$) artarken, beşinci ($Z=-2,17$ $p=0,03$) günde anlamlı

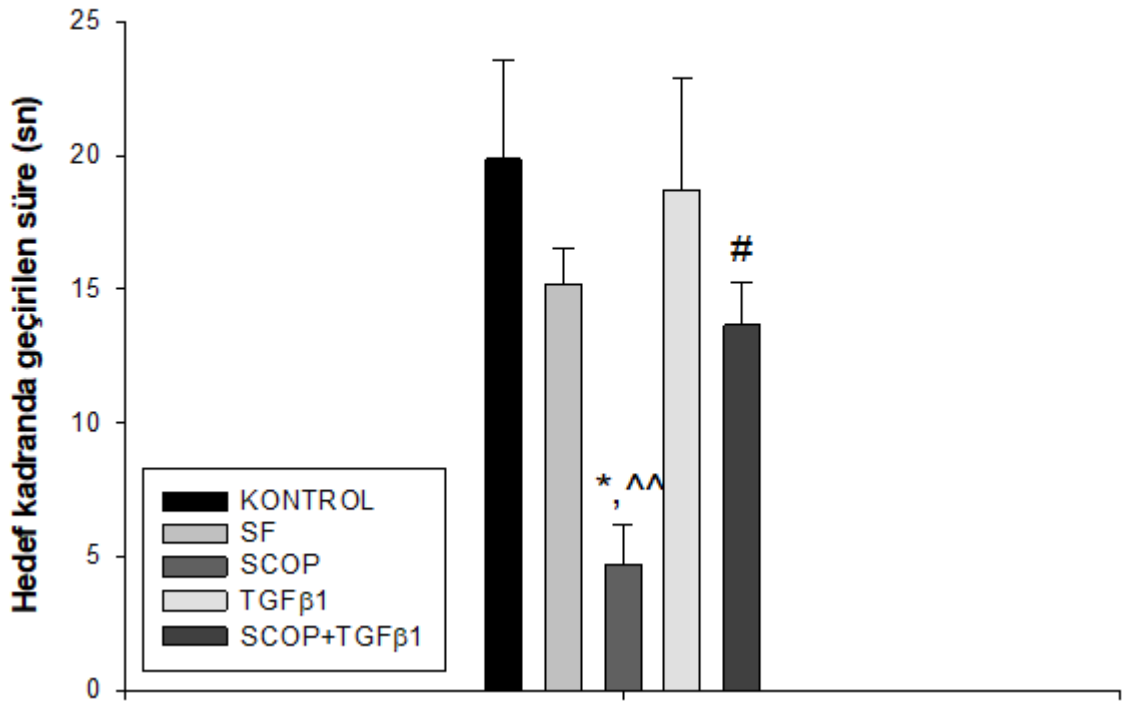
azaldı. Eğitim denemelerinde yüzme hızında TGF β 1 kontrol grubunda günler arasında anlamlı fark saptandı [χ^2 (4) =20,4 p<0,001]. Birinci gün ile karşılaştırıldığında ikinci (Z=-2,34 p=0,01), dördüncü (Z=-2,4 p=0,01) ve beşinci günde (Z=-3,57 p<0,001) yüzme hızında azalma bulundu. Deney (SCOP) [χ^2 (4) =7,9 p=0,09] grubunda ve tedavi-1 (SCOP+ TGF β 1) [χ^2 (4) =5,9 p=0,20] grubunda, yüzme hızında günler arasında anlamlı fark bulunamadı. Morris su havuzu testinde eğitim denemelerinde yüzme hızında ikinci [H (4,152) =17,95 p=0,001], dördüncü [H (4,152) =10,27 p=0,036] ve beşinci [H (4,152) =21,36 p<0,001] günlerde gruplar arasında anlamlı fark saptandı. Deney (SCOP) grubu, sham (SF) grubu ile karşılaştırıldığında ikinci (U=227,0 p<0,001 z=-3,5) ve beşinci (U=234,0 p=0,001 z=-3,4) günde yüzme hızında artış saptanırken, diğer günlerde anlamlı fark bulunamadı. Deney (SCOP) grubu, tedavi-1 (SCOP+ TGF β 1) grubu ile karşılaştırıldığında yüzme hızında beşinci (U=573,0 p=0,029 z=-2,18) günde anlamlı artış bulundu (Şekil 8).



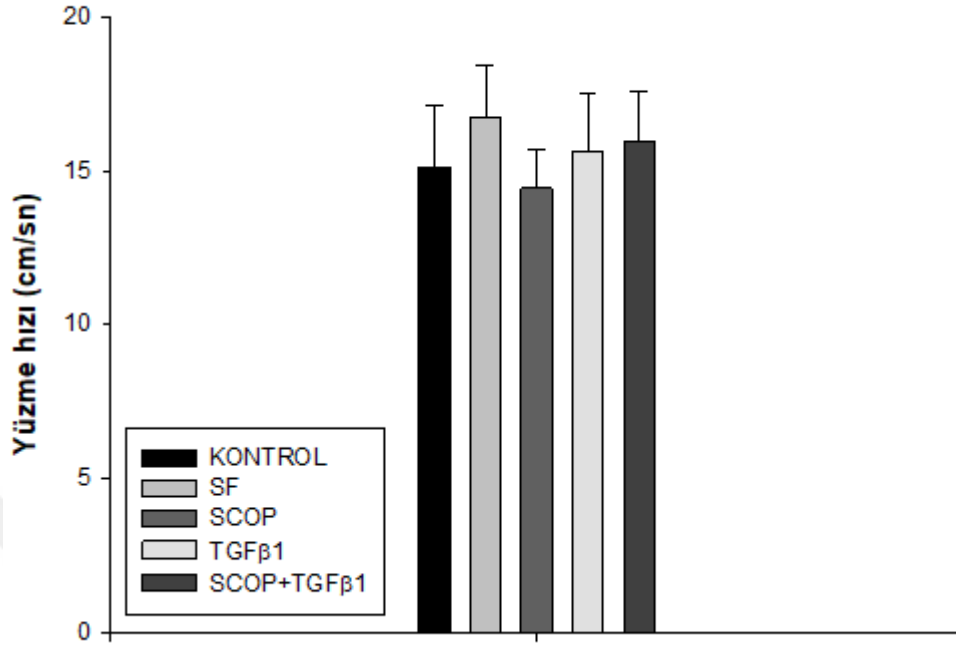
Şekil 8. Morris su havuzu testinde eğitim denemelerinde yüzme hızı (cm/sn). Veriler ortalama $\pm$ SH olarak ifade edildi. İstatistiksel analiz için bkz. Metin. Gruplarda N=6-10.

4.1.2. 28. Gün Test Verileri

Morris su havuzunda deney hayvanları, altıncı günde platform kaldırılarak, platformun bulunduğu kadranın karşı kadrından deneye alındı. Altıncı günde platformun bulunduğu kadranda geçirilen sürede, gruplar arasında anlamlı fark bulundu [F (4, 33) =7,06 p<0,001]. Deney (SCOP) grubunda, sham (SF) (p<0,05) ve kontrol (p<0,01) grubuna göre hedef kadranda geçirilen süre anlamlı olarak azaldı. Tedavi-1 (SCOP+ TGFβ1) grubunda, deney (SCOP) grubuna göre hedef kadranda geçirilen sürede anlamlı artış saptandı (p<0,05). TGFβ1 kontrol grubunda, sham (SF) ve kontrol grubuna göre hedef kadranda geçirilen sürede anlamlı fark bulunamadı (p>0,05) (Şekil 9). Morris su havuzu test gününde gruplar arasında yüzme hızında anlamlı bir fark elde edilmedi [F (4, 33) =0,28 p=0,88] (Şekil 10).



Şekil 9. Morris su havuzu testinde hedef kadranda geçirilen süre *p<0,05 SF grubuna göre, ^p<0,01 kontrol grubuna göre, #p<0,05 SCOP grubuna göre. ANOVA takiben Tukey HSD testi. Veriler ortalama ±SH olarak ifade edildi. Gruplarda N=6-10.



Şekil 10. Morris su havuzu testinde yüzme hızı (cm/sn). Veriler ortalama $\pm$ SH olarak ifade edildi. Gruplarda N=6-10.

4.1.3. 56. Gün Eğitim Denemeleri

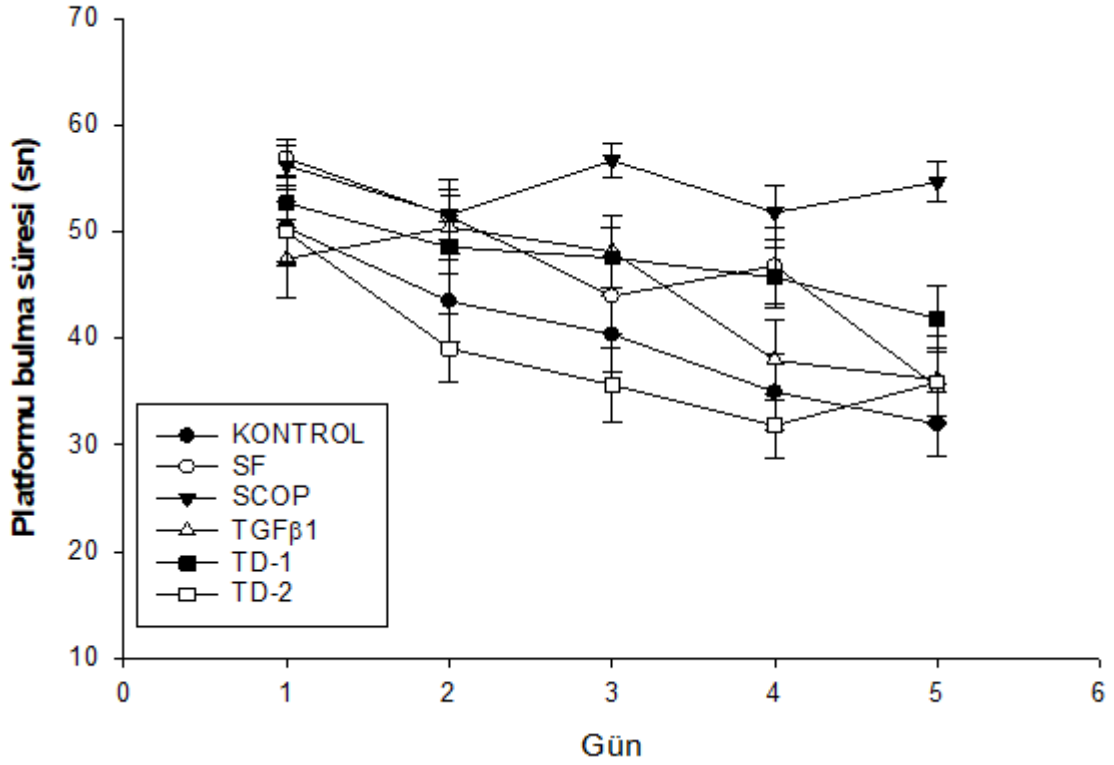
Morris su havuzu testinde beş gün boyunca süren eğitim denemelerinde gizli platformu bulma süresinde, kontrol grubunda günler arasında anlamlı fark bulundu [χ^2 (4) =12,94 p=0,012]. Birinci gün ile karşılaştırıldığında, platformu bulma süresinde, üçüncü (Z=-2,15 p=0,03), dördüncü (Z=-2,15 p=0,006) ve beşinci (Z=-2,80 p=0,005) günde anlamlı azalma saptandı. Platformu bulma süresinde, sham (SF) grubunda günler arasında anlamlı fark saptandı [χ^2 (4) =26,26 p<0,001]. Birinci gün ile karşılaştırıldığında üçüncü (Z=-2,84 p=0,005), dördüncü (Z=-2,51 p=0,012) ve beşinci (Z=-3,57 p<0,001) günlerde anlamlı azalma bulundu. Morris su havuzu testi eğitim denemelerinde platformu bulma süresinde deney (SCOP) grubunda günler arasında anlamlı fark bulunmadı [χ^2 (4) =7,95 p=0,09].

Beş gün boyunca gizli platformu bulma süresinde TGFβ1 kontrol grubunda günler arasında anlamlı fark saptandı [χ^2 (4) =12,88 p=0,012]. Birinci gün ile karşılaştırıldığında, platformu bulma süresinde, beşinci günde anlamlı azalma bulundu (Z=-1,97 p=0,04). Platformu bulma süresinde tedavi-1 (TD-1) grubunda günler arasında

anlamli fark bulundu [$\chi^2 (4) = 10,55$ $p=0,032$]. Birinci gün ile karşılaştırıldığında, platformu bulma süresinde, beşinci günde anlamli azalma belirlendi ($Z=-2,66$ $p=0,008$). Tedavi-2 (TD-2) grubunda platformu bulma süresinde günler arasında anlamli fark bulundu [$\chi^2 (4) = 20,84$ $p<0,001$]. Birinci gün ile karşılaştırıldığında ikinci ($Z=-2,42$ $p=0,015$),       , ($Z=-2,77$ $p=0,005$), d rd     ($Z=-3,77$ $p<0,001$) ve beşinci ($Z=-3,12$ $p=0,002$) günlerde platformu bulma süresinde anlamli azalma saptandı.

Eğitim denemelerinde ikinci [$H (4,192) = 13,21$ $p=0,021$],        [$H (4,152) = 31,02$ $p<0,001$], d rd     [$H (4,152) = 30,05$ $p<0,001$] ve beşinci [$H (4,152) = 33,33$ $p<0,001$] günlerde platformu bulma süresinde gruplar arasında anlamli fark saptanırken, birinci günde gruplar arasında anlamli fark bulunmadı [$H (4,152) = 8,88$ $p=0,114$]. Sham (SF) grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında d rd     günde platformu bulma süresinde anlamli artış bulundu ($U=184,5$ $p=0,02$ $z=-2,19$). Deney (SCOP) grubu, sham (SF) grubu ile karşılaştırıldığında platformu bulma süresinde        ($U=256,0$ $p<0,001$ $z=-3,91$) ve beşinci ($U=212,5$ $p<0,001$ $z=-4,17$) günde anlamli artış saptandı.

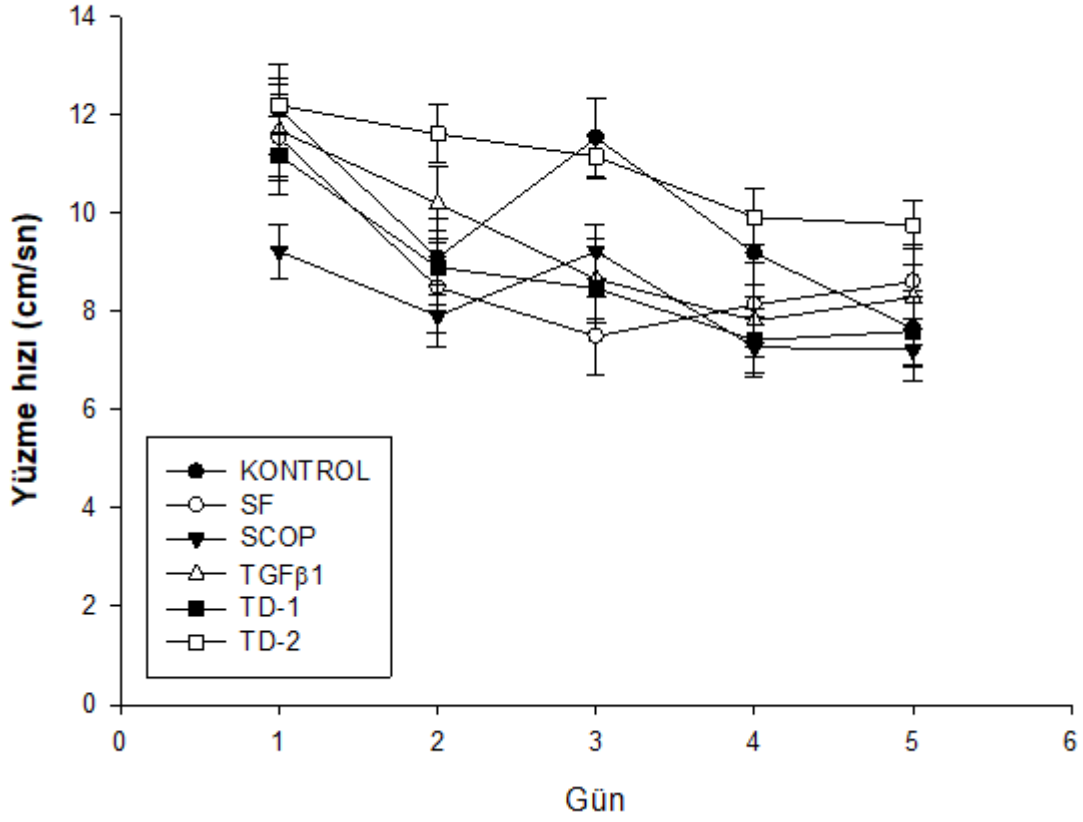
Platformu bulma süresinde, tedavi-1 (TD-1) grubu ile deney (SCOP) grubu karşılaştırıldığında,        ($U=559,0$ $p=0,002$ $z=-3,05$) ve beşinci ($U=514,5$ $p=0,002$ $z=-3,16$) günlerde anlamli azalma bulundu. Tedavi-2 (TD-2) grubu ile deney (SCOP) grubu karşılaştırıldığında, birinci ($U=660,5$ $p=0,04$ $z=-1,97$), ikinci ($U=543,5$ $p=0,007$ $z=-2,70$),        ($U=364,0$ $p<0,001$ $z=-4,87$), d rd     ($U=363,0$ $p<0,001$ $z=-4,45$) ve beşinci ($U=357,0$ $p<0,001$ $z=-4,63$) günlerde platformu bulma süresinde anlamli azalma saptandı. Tedavi-2 (TD-2) grubu ile tedavi-1 (TD-1) grubu karşılaştırıldığında, ikinci ($U=589,5$ $p=0,02$ $z=-2,17$),        ($U=552,0$ $p=0,011$ $z=-2,53$) ve d rd     ($U=482,0$ $p=0,002$ $z=-3,15$) günde platformu bulma süresinde anlamli azalma bulundu. TGF 1 kontrol grubu ile sham (SF) grubu karşılaştırıldığında, birinci günde anlamli azalma saptandı ($U=208,5$ $p=0,031$ $z=-2,15$). TGF 1 kontrol grubu, kontrol grubu ve tedavi-1 (TD-1) grubu ile karşılaştırıldığında, platformu bulma süresinde anlamli fark saptanmadı. Tedavi-2 (TD-2) grubunda, TGF 1 kontrol grubuna göre ikinci ($U=329,0$ $p=0,024$ $z=-2,25$) ve        ($U=327,0$ $p=0,026$ $z=-2,22$) günlerde, platformu bulma süresinde anlamli azalma bulundu (şekil 11).



Şekil 11. Morris su havuzu testinde eğitim denemelerinde platformu bulma süresi. Veriler ortalama $\pm$ SH olarak ifade edildi. İstatistiksel analiz için bkz. Metin. Gruplarda N=6-10.

Morris su havuzu testinde eğitim denemelerinde, yüzme hızında kontrol grubunda günler arasında anlamlı fark bulundu [$\chi^2(4) = 18,33$ $p=0,001$]. Yüzme hızı, birinci gün ile karşılaştırıldığında, ikinci ($Z=-2,17$ $p=0,03$), dördüncü ($Z=-2,40$ $p=0,016$) ve beşinci ($Z=-3,42$ $p=0,001$) günlerde anlamlı olarak azalmıştı. Eğitim denemelerinde yüzme hızında sham (SF) grubunda, günler arasında anlamlı fark belirlendi [$\chi^2(4) = 21,03$ $p<0,001$]. Birinci gün ile karşılaştırıldığında, yüzme hızı, ikinci ($Z=-2,71$ $p=0,007$), üçüncü ($Z=-3,71$ $p<0,001$), dördüncü ($Z=-3,60$ $p<0,001$) ve beşinci ($Z=-2,28$ $p=0,022$) günlerde anlamlı olarak azaldı. Eğitim denemelerinde yüzme hızında TGFβ1 kontrol grubunda, günler arasında anlamlı fark saptandı [$\chi^2(4) = 17,26$ $p<0,001$]. Birinci gün ile karşılaştırıldığında, üçüncü ($Z=-2,82$ $p=0,005$), dördüncü ($Z=-2,97$ $p=0,003$) ve beşinci günlerde ($Z=-2,97$ $p=0,003$), yüzme hızında azalma saptandı. Deney (SCOP) [$\chi^2(4) = 21,30$ $p<0,001$] grubunda, yüzme hızında günler arasında anlamlı fark bulundu. İkinci ($Z=-2,24$ $p=0,025$), dördüncü ($Z=-3,17$ $p=0,002$) ve beşinci ($Z=-3,48$ $p<0,001$) günlerde, birinci gün ile karşılaştırıldığında, yüzme hızında anlamlı azalma saptandı.

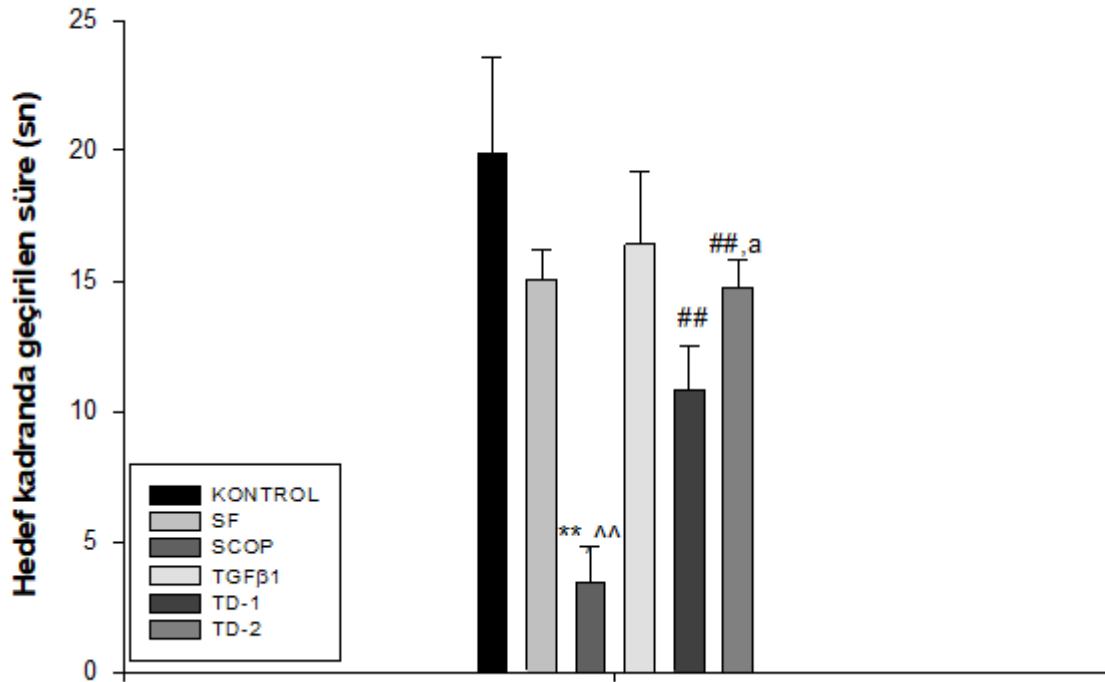
Tedavi-1 (TD-1) [χ^2 (4) =27,30 $p<0,001$] grubunda, yüzme hızında günler arasında anlamlı fark bulundu. Birinci gün ile karşılaştırıldığında yüzme hızı, ikinci ($Z=-3,11$ $p=0,002$), üçüncü ($Z=-3,41$ $p=0,001$), dördüncü ($Z=-3,92$ $p<0,001$) ve beşinci ($Z=-4,10$ $p<0,001$) günlerde anlamlı olarak azaldı. Tedavi-2 (TD-2) [χ^2 (4) =17,28 $p=0,002$] grubunda, yüzme hızında günler arasında anlamlı fark bulundu. Birinci gün ile karşılaştırıldığında, dördüncü ($Z=-2,91$ $p=0,004$) ve beşinci ($Z=-3,33$ $p=0,001$) günlerde yüzme hızı anlamlı olarak azaldı. Morris su havuzu testinde, eğitim denemelerinde yüzme hızında birinci [H (5,192) =12,21 $p=0,032$], ikinci [H (5,192) =19,88 $p=0,001$], üçüncü [H (5,192) =24,05 $p<0,001$], dördüncü [H (5,192) =13,39 $p=0,02$] ve beşinci [H (5,192) =15,25 $p=0,009$] günlerde, gruplar arasında anlamlı fark saptandı. Deney (SCOP) grubu, sham (SF) grubu ve tedavi-1 (TD-1) grubu ile karşılaştırıldığında, yüzme hızında anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$). Tedavi-2 (TD-2) grubunda, deney (SCOP) grubuna göre, birinci ($U=441,0$ $p=0,001$ $z=-3,45$), ikinci ($U=386,5$ $p<0,001$ $z=-3,97$), üçüncü ($U=536,5$ $p=0,011$ $z=-2,53$), dördüncü ($U=485,0$ $p=0,002$ $z=-3,03$) ve beşinci ($U=423,5$ $p<0,001$ $z=-3,62$) günlerde yüzme hızında artış saptandı. Tedavi-2 (TD-2) grubu, tedavi-1 (TD-1) grubu ile karşılaştırıldığında, yüzme hızında ikinci ($U=486,0$ $p=0,003$ $z=-3,02$), üçüncü ($U=486,0$ $p=0,002$ $z=-3,02$), dördüncü ($U=481,0$ $p=0,002$ $z=-3,07$) ve beşinci ($U=517,0$ $p=0,006$ $z=-2,72$) günlerde anlamlı artış bulundu. TGF β 1 kontrol grubu, kontrol ve sham (SF) grubu ile karşılaştırıldığında yüzme hızında anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$) (Şekil 12).



Şekil 12. Morris su havuzu testinde eğitim denemelerinde yüzme hızı (cm/sn). Veriler ortalama $\pm$ SH olarak ifade edildi. İstatistiksel analiz için bkz. Metin. Gruplarda N=6-10.

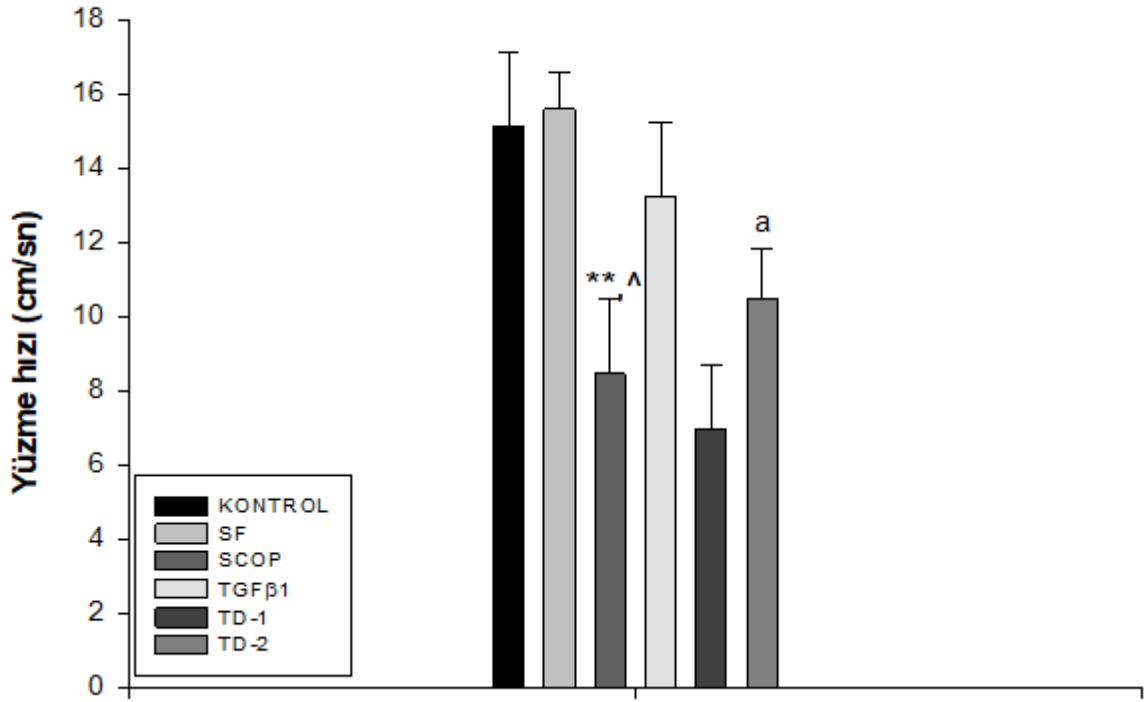
4.1.4. 56. Gün Test Verileri

Morris su havuzunda altıncı gününde, platform kaldırılarak, platformun bulunduğu kadranın karşı kadranda geçirilen süre değerlendirildi. Altıncı günde platformun bulunduğu kadranda geçirilen sürede, gruplar arasında anlamlı fark bulundu [H (5, 48) =25,25 $p<0,001$]. Deney (SCOP) grubunda, sham (SF) (U=1,0 $p=0,002$ $z=-3,16$) ve kontrol (U=0,0 $p=0,001$ $z=-3,27$) grubuna göre hedef kadranda geçirilen süre anlamlı olarak azaldı. Tedavi-1 (TD-1) grubunda, deney (SCOP) grubuna göre hedef kadranda geçirilen sürede anlamlı artış saptandı (U=12,0 $p=0,004$ $z=-2,88$). Tedavi-2 (TD-2) grubunda, deney (SCOP) grubuna göre hedef kadranda geçirilen süre anlamlı olarak yükseldi (U=3,0 $p<0,001$ $z=-3,56$). Tedavi-2 (TD-2) grubunda, tedavi-1 (TD-1) grubuna göre hedef kadranda geçirilen süre anlamlı arttı (U=24,0 $p=0,049$ $z=-1,96$). TGFβ1 kontrol grubunda, sham (SF) ve kontrol grubuna göre hedef kadranda geçirilen süre açısından anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$) (Şekil 13).



Şekil 13. Morris su havuzu testinde hedef kadranda geçirilen süre $**p<0,01$ SF grubuna göre, $^{\wedge}p<0,01$ kontrol grubuna göre, $##p<0,01$ SCOP grubuna göre, $^ap<0,05$ TD-1 grubuna göre. Kruskal Wallis takiben Mann Whitney U testi. Veriler ortalama $\pm$ SH olarak ifade edildi. Gruplarda N=6-10.

Morris su havuzu testinde gruplar arasında yüzme hızında anlamlı fark bulundu [H (5, 48) =16,72 $p=0,005$]. Deney (SCOP) grubunda, sham (SF) ($U=6,0$ $p=0,009$ $z=-2,60$) ve kontrol ($U=10,0$ $p=0,03$ $z=-2,16$) grubuna göre yüzme hızında anlamlı azalma saptandı. Tedavi-2 (TD-2) grubunda, tedavi-1 (TD-1) grubuna göre yüzme hızında anlamlı artış bulundu ($U=22,0$ $p=0,034$ $z=-2,11$). TGFβ1 kontrol grubunda, sham (SF) ve kontrol grubuna göre yüzme hızında anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$). (Şekil 14).



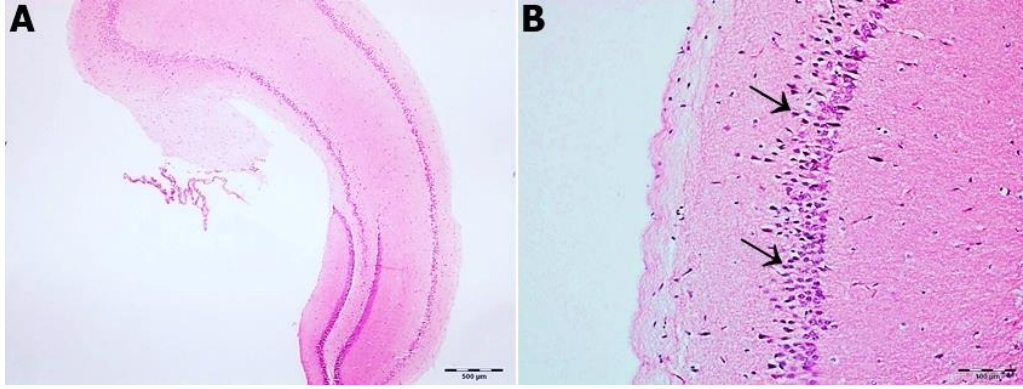
Şekil 14. Morris su havuzu testinde yüzme hızı (cm/sn) $^{**}p<0,01$ SF grubuna göre, $^{\wedge}p<0,05$ kontrol grubuna göre, $^ap<0,05$ TD-1 grubuna göre. Kruskal Wallis takiben Mann Whitney U testi. Veriler ortalama $\pm$ SH olarak ifade edildi. Gruplarda N=6-10.

4.2. Işık Mikroskopik Bulgular

4.2.1. Hipokampus

4.2.1.1. Kontrol Grubu

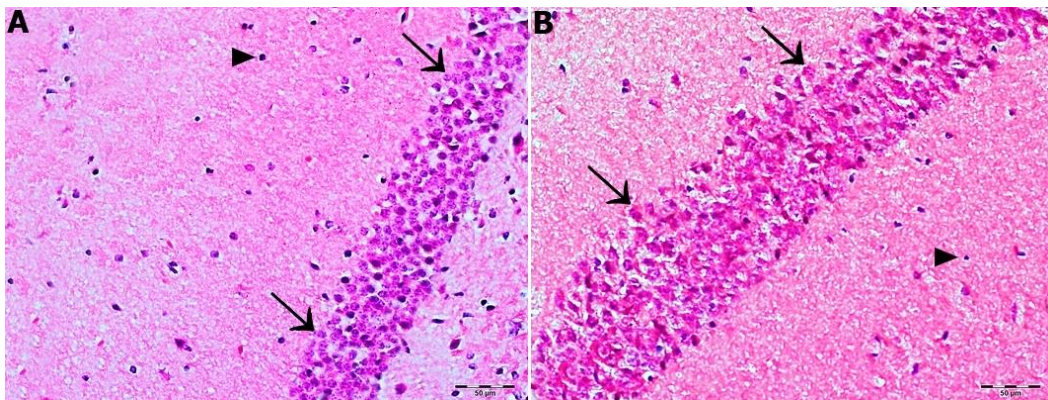
Tamamen normal kontrol grubu deneklerinden alınan doku örneklerinin, ışık mikroskopik incelemesinde, hipokampusun yatay düzlemde, serebral korteksin ventro-posterior ve ventro-lateral duvarlarında C şeklinde hacimli bir bölüm oluşturduğu görüldü (Şekil 15A). Hipokampuste yer alan nöronların diziliş ve yapısının normal olduğu izlendi. Nöronlarda ve gliya hücrelerinde çekirdek ve sitoplazmik özelliklerin normal yapıda olduğu görüldü. Nöronlarda çekirdek oldukça büyük ve yuvarlak olup, veziküler tip çekirdek özelliklerine sahip olduğu izlendi. Gliya hücreleri hiperkromatik oval çekirdekleri ile normal görünümdeydi (Şekil 15B).



Şekil 15. Kontrol grubu deneklerine ait hipokampus doku kesitlerinin ışık mikroskopik görünümü. A) Hipokampusun düşük büyütmede ‘C’ harfi şeklindeki genel görünümü izlenmektedir. H&E. Bar:500 µm. B) Yüksek büyütmede hipokampusta nöronların (oklar) normal yapı ve dağılımda oldukları gözlenmektedir. H&E. Bar:100 µm.

4.2.1.2. Sham Grubu

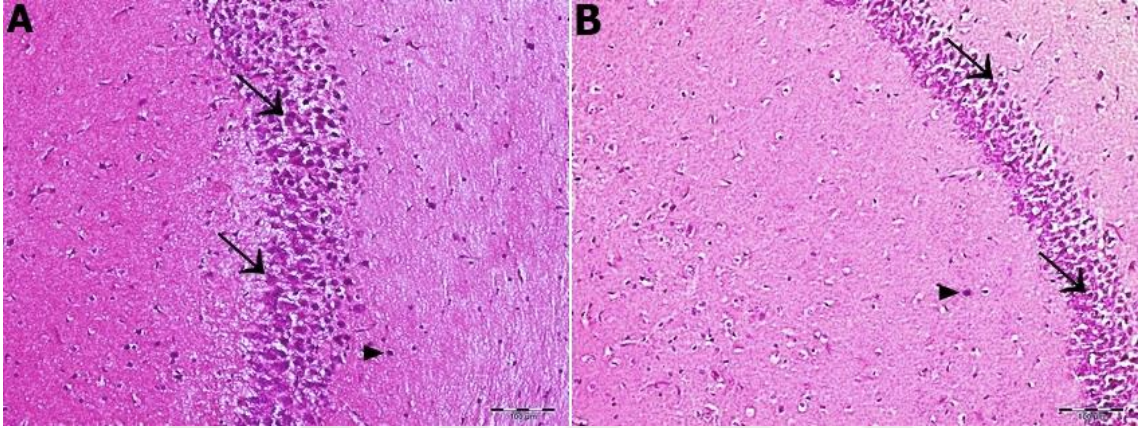
Yirmi sekiz gün boyunca i.p. olarak 2 mg/kg SF uygulanan deneklerden 28. günde alınan hipokampus doku örneklerinin ışık mikroskopik incelemesinde, nöronlar, gliya hücreleri ve sinir liflerinin yapılarının, kontrol grubuna benzer şekilde normal olduğu gözlemlendi (Şekil 16A). Bu grupta yer alan ve 56. güne kadar SF uygulandıktan sonra sakrifiye edilen deneklere ait hipokampus doku örneklerinde de benzer şekilde, sinir hücreleri, gliya hücreleri ile sinir liflerinin normal yapısını korudukları belirlendi (Şekil 16B).



Şekil 16. Sham grubuna ait deneklerden alınan hipokampus doku örneklerinin ışık mikroskopik görünümü. A) 28. günde alınan hipokampus doku kesitlerinde, nöron perikaryonları (oklar) ve gliya hücrelerinin (ok başı) normal görünümünde oldukları izlenmektedir. H&E. Bar:50 µm. B) 56. günde alınan hipokampus doku kesitlerinde nöron perikaryonlarının (oklar) ve gliya hücrelerinin (ok başı) normal yapılarını korudukları gözlenmektedir. H&E. Bar:50 µm.

4.2.1.3. TGF- β 1 Kontrol Grubu

Yirmi sekiz gün boyunca i.p. olarak 2 μ g TGF- β 1 uygulanan deneklerden 28. günde alınan hipokampus doku örneklerinin ışık mikroskopik incelemesinde, nöronların, gliya hücrelerinin ve sinir liflerinin normal yapıda oldukları gözlemlendi. (Şekil 17A). 56. günde alınan hipokampus doku örneklerinin ışık mikroskopik incelemesinde, hipokampusta nöron perikaryonları ve gliya hücrelerinin normal yapılarını korudukları izlendi. Sinir liflerinin yapılarının da normal olduğu gözlemlendi (Şekil 17B).

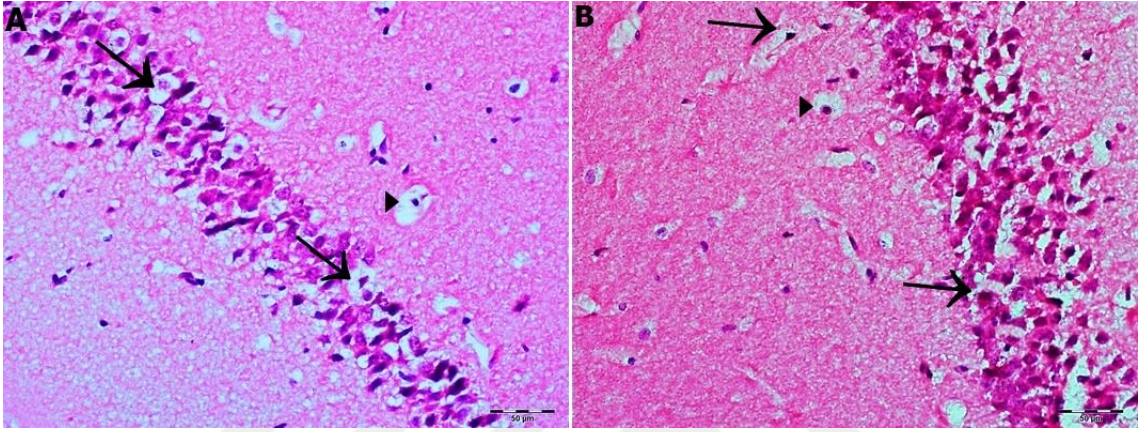


Şekil 17. TGF- β 1 verilen deneklere ait hipokampus doku kesitlerinin ışık mikroskopik görünümü. A) TGF- β 1 grubu deneklerinden 28. günde alınan hipokampus doku kesitlerinde, nöronlar (oklar) ve gliya hücrelerinin (ok başı) normal görünümünde olduğu gözlenmektedir. H&E. Bar:100 μ m. B) TGF- β 1 verilen 56. günde alınan hipokampus doku kesitlerinde nöron perikaryonlarının (oklar) ve gliya hücrelerinin (ok başı) normal görünümde oldukları izlenmektedir. H&E. Bar:100 μ m.

4.2.1.4. Deney Grubu

Deneysel Alzheimer hastalığı modeli oluşturmak üzere 28 gün boyunca 2 mg/kg dozda i.p. skopolamin uygulanan deneklerden 28. günde alınan hipokampus doku kesitlerinin ışık mikroskopik incelemesinde nöronların çekirdeklerinde kromatin yoğunlaşması ve sitoplazmada büzüşme görüldü. Bazı nöronlarda sitoplazmik vakuolizasyon gözlemlendi. Gliya hücrelerinde de çekirdekte hiperkromatin artışı ve sitoplazmada vakuolizasyon izlendi. Nöron ve gliya hücrelerinde görülen intrasitoplazmik vakuolizasyon yanında, interselüler alanlarda da ödem alanlarının varlığı dikkati çekti (Şekil 18A).

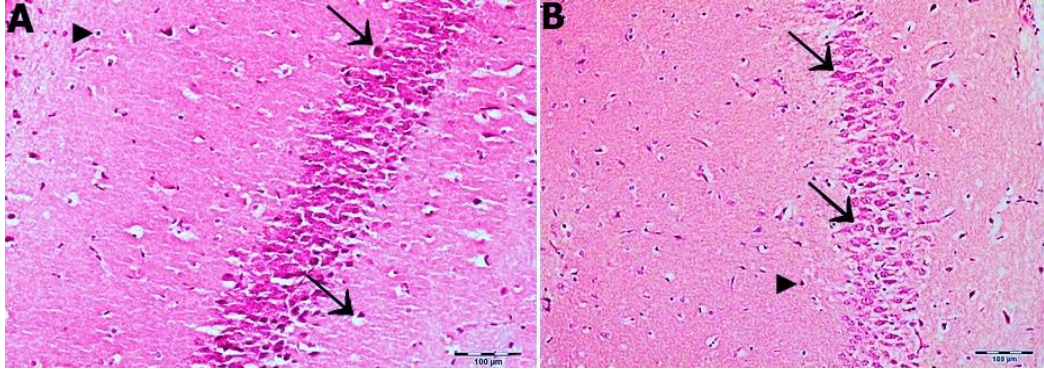
28 gün boyunca 2 mg/kg dozda i.p. skopolamin uygulanan ve 56. günde alınan hipokampus doku kesitlerinin ışık mikroskopik incelemesinde perinöronal alanlarda ve interstisyumda belirgin ödem alanlarının varlığı izlendi. Nöronlarda çekirdekte hiperkromatin artışı ve sitoplazmik vakuolizasyon gözlemlendi. Gliya hücrelerinde çekirdekte kromatin yoğunlaşması ve intersellüler ödem alanlarının varlığı gözlemlendi (Şekil 18B).



Şekil 18. Deney grubuna ait hipokampus doku kesitlerinin ışık mikroskopik görünümü. A) 28. günde alınan hipokampus doku kesitlerinde, nöronlarda (oklar) ve gliya hücrelerinde (ok başı) çekirdekte kromatin artışı ve sitoplazmada vakuolizasyon izlenmektedir. H&E. Bar:50 µm. B) 56. günde alınan hipokampus doku kesitlerinde nöronlarda (oklar) ve gliya hücrelerinde (ok başı) çekirdekte hiperkromatin artışı ve sitoplazmada vakuolizasyon gözlenmektedir. İntersellüler ödem alanları da görülmektedir. H&E. Bar:50 µm.

4.2.1.5. Tedavi-1 (TD-1) Grubu

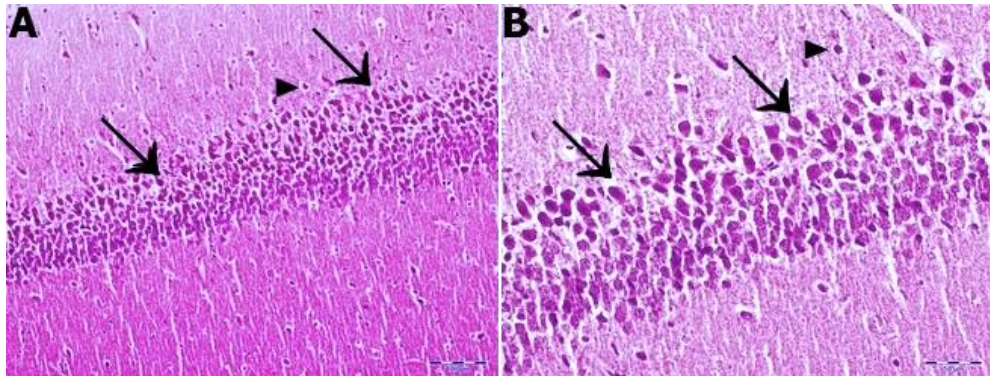
Yirmi sekiz gün boyunca 2 mg/kg skopolamin uygulamasını takiben 2 µg/gün TGF-β1 tedavisi uygulanan deneklerden 28. günde alınan hipokampus doku kesitlerinin ışık mikroskopik incelemesinde her ne kadar nöronların ve gliya hücrelerinin bazılarında, çekirdekte kromatin artışı ve sitoplazmada vakuolizasyon gözlenmekle birlikte çoğu nöron ve gliya hücrelerinde normal yapının korunduğu gözlemlendi (Şekil 19A). Bu grupta 56. günde alınan hipokampus doku kesitlerinde de minimal düzeyde hücresel değişiklikler izlenmekle birlikte, nöronlar, gliya hücreleri ve sinir liflerinin genellikle normal yapıda oldukları belirlendi (Şekil 19B).



Şekil 19. Tedavi-1 grubu deneklerine ait hipokampus doku kesitlerinin ışık mikroskopik görünümü. A) 28. günde alınan hipokampus doku kesitlerinde, bazı nöron ve gliya hücrelerinde hiperkromatik çekirdek ve sitoplazmik vakuolizasyon izlenmekle birlikte, çoğu nöron (oklar) ve gliya hücrelerinin (ok başı) normal yapılarını koruduğu izlenmektedir. H&E. Bar:100 µm. B) 56. günde alınan hipokampus doku kesitlerinde nöronlar (oklar) ve gliya hücrelerinde (ok başı) genellikle normal yapının korunduğu dikkati çekmektedir H&E. Bar:100 µm.

4.2.1.6. Tedavi-2 (TD-2) Grubu

Yirmi sekiz gün boyunca skopolamin verilen ve ardından 28-56. günler arasında 2 µg/gün TGF-β1 tedavisi uygulanan deneklerden alınan hipokampus doku örneklerinin ışık mikroskopik incelemesinde nöronların ve gliya hücrelerinin bazılarında çekirdekte kromatin artışı ve sitoplazmada vakuolizasyon izlendi. Bununla birlikte nöron ve gliya hücrelerinin bazılarında normal yapının korunduğu da dikkati çekti. Ayrıca sinir liflerinin de normal yapı ve dağılımda olduğu görüldü (Şekil 20A-20B).

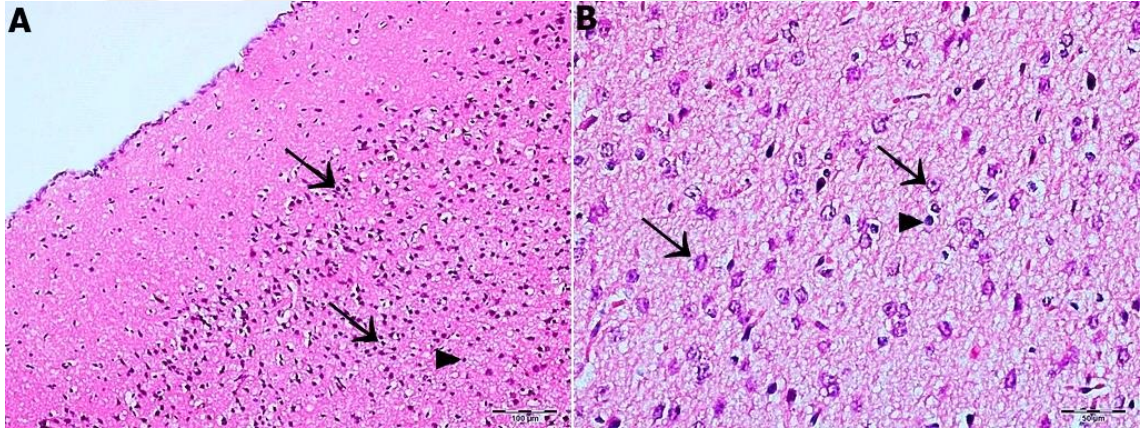


Şekil 20. Tedavi-2 grubuna ait deneklerden 56. günde alınan hipokampus doku kesitlerinin ışık mikroskopik görünümü. A) Hipokampus doku kesitinde bazı nöron perikaryonlarında (oklar) ve gliya hücrelerinin (ok başı) çekirdekte kromatin artışı ve sitoplazmada büzüşme ve vakuolizasyon izlenmektedir. H&E. Bar:100 µm. B) Hipokampusta daha yüksek büyütmede, nöronlarda hiperkromatik çekirdek ve sitoplazmik vakuolizasyon görülmektedir. Bununla birlikte bazı nöronların (oklar) ve gliya hücrelerinin (ok başı) çekirdek ve sitoplazmik özellikleriyle birlikte normal yapısını korudukları dikkati çekmektedir. H&E. Bar:50 µm.

4.2.2. Prefrontal Korteks

4.2.2.1. Kontrol Grubu

Tamamen normal kontrol grubu deneklerinden alınan prefrontal korteks doku kesitlerinin ışık mikroskopik incelemesinde, prefrontal korteksin dıştan pia mater ile sarılı olduğu görüldü. Pia materin altında beyin korteksinin altı tabakalı hücresel yapısı ayırt edildi. Kortekste bulunan nöronlar farklı şekil ve büyüklükleriyle normal yapıda izlendi. Piramidal, oval veya iğ şekilli nöron perikaryonlarında veziküler bir çekirdek ve çekirdek içinde de bir veya birden fazla çekirdekçik ayırt edildi. Gliya hücreleri de çekirdek ve sitoplazmik özellikleriyle normal yapıda izlendi. Sinir liflerinin yapı ve dağılımı normaldi (Şekil 21A-21B).

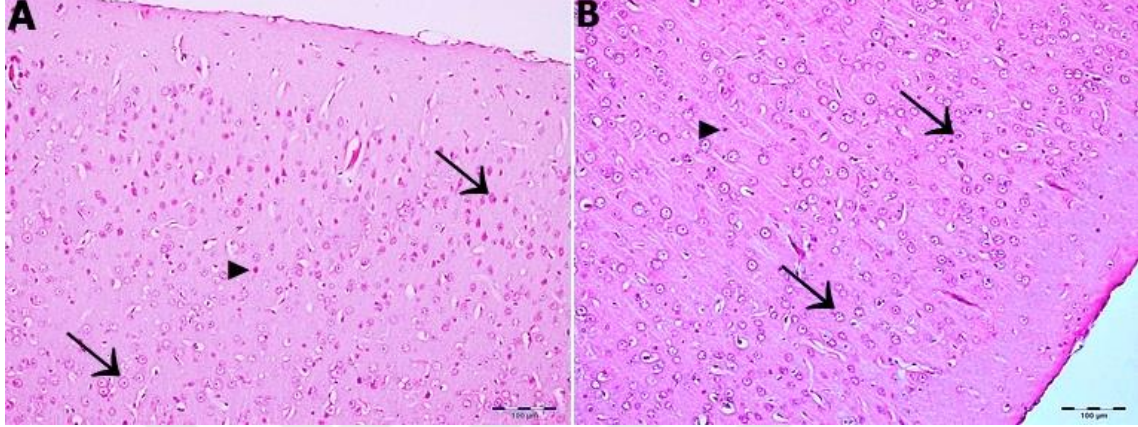


Şekil 21. Normal kontrol grubu deneklerine ait prefrontal korteks doku kesitlerinin ışık mikroskopik görünümü. A) Prefrontal korteksin dıştan pia mater ile sarılı olduğu görülmektedir. Beyin korteksinin oluşturan tabakalarda nöronların yerleşimi izlenmektedir. Nöronların farklı şekil ve büyüklükte oldukları dikkati çekmektedir. Nöronların (oklar) ve gliya hücrelerinin (ok başı) normal yapıda oldukları gözlenmektedir. H&E. Bar:100 µm. B) Yüksek büyütmede çeşitli büyüklükte ve farklı şekillerde nöronlar (oklar) ile gliya hücreleri (ok başı) izlenmektedir. H&E. Bar:50 µm.

4.2.2.2. Sham Grubu

Yirmi sekiz gün boyunca yalnızca i.p. 2 mg/kg SF uygulanan deneklerden 28. günde alınan prefrontal korteks doku kesitlerinin ışık mikroskopik incelemesinde, nöronların yapı ve dağılımının normal olduğu görüldü. Farklı şekil ve büyüklükte olan nöron perikaryonlarında veziküler bir çekirdeğe sahip oldukları izlendi. Gliya hücreleri

çekirdek ve sitoplazmik yapıları ile normal olarak değerlendirildi. Sinir liflerinin yapı ve dağılımları da normaldi (Şekil 22A). Bu grupta 56. günde alınan prefrontal doku kesitlerinde de normal yapının korunduğu izlendi. Beyin korteksinde nöronlar ve gliya hücreleri ile sinir liflerinin yapı ve dağılımı normaldi (Şekil 22B).

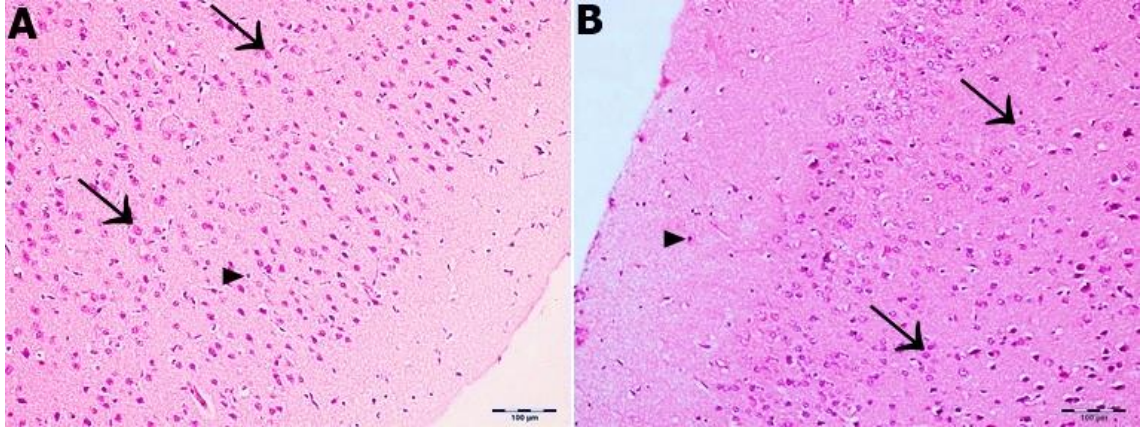


Şekil 22. Sham grubuna ait deneklerde prefrontal korteks doku kesitlerinin ışık mikroskopik görünümü.

A) 28. günde alınan kesitlerde nöron perikaryonlarının (oklar) ve gliya hücrelerinin (ok başı) normal görünümde oldukları izlenmektedir. H&E. Bar:100 µm. B) 56. günde elde edilen prefrontal korteks doku kesitlerinde nöronlar (oklar), gliya hücreleri (ok başı) ve sinir liflerinin yapı ve dağılımlarının normal olduğu görülmektedir. H&E. Bar:100 µm.

4.2.2.3 TGF-β1 Kontrol Grubu

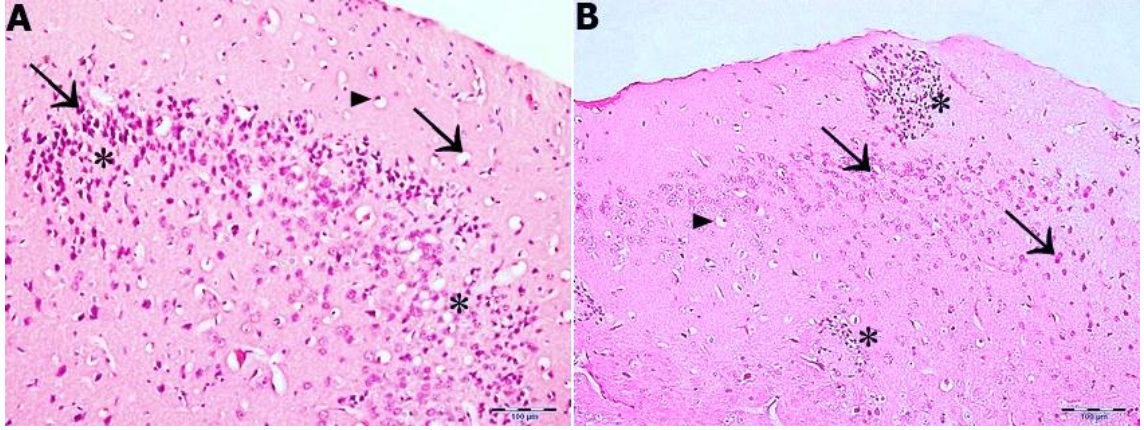
Yirmi sekiz gün boyunca i.p. 2 µg/gün TGF-β1 uygulanan deneklerden 28. günde alınan prefrontal korteks doku kesitlerinin ışık mikroskopik incelemesinde, beyin korteksinde nöronların, gliya hücrelerinin ve sinir liflerinin normal yapılarını korudukları izlendi. Bulunduğu tabakalarda farklı şekil ve büyüklükte olan nöronların, veziküler tipte, oldukça büyük bir çekirdeğe sahip oldukları görüldü. Gliya hücreleri hiperkromatik çekirdek ve dar sitoplazmaları ile ayırt edildi. Hücrelerin yapı ve dağılımları normaldi. Sinir lifleri de normal olarak değerlendirildi (Şekil 23A). 28 gün TGF-β1 uygulamasının ardından 56. güne kadar yalnızca SF verilen ve 56. günde elde edilen prefrontal korteks doku kesitlerinin ışık mikroskopik incelemesinde, nöronlar, gliya hücreleri ve sinir liflerinin yapı ve dağılımlarının normal olduğu gözlemlendi (Şekil 23B).



Şekil 23. TGF- β 1 uygulanan deneklere ait prefrontal korteks doku kesitlerinin ışık mikroskopik görünümü. A) 28. günde alınan prefrontal korteks doku kesitlerinde nöron perikaryonlarının (oklar) ve gliya hücrelerinin (ok başı) normal yapıda oldukları izlenmektedir. H&E. Bar:100 μ m. B) 56. günde elde edilen prefrontal korteks dokularında, beyin korteksinde hücresel düzenlenmenin normal olduğu, nöronlar (oklar), gliya hücreleri (ok başı) ve sinir liflerinin normal yapılarını korudukları görülmektedir. H&E. Bar:100 μ m.

4.2.2.4. Deney Grubu

Yirmi sekiz gün boyunca i.p. 2 mg/kg skopolamin uygulanan deneklerden 28. günde alınan prefrontal korteks doku örneklerinin ışık mikroskopik incelenmesinde, kortekste yer alan nöronların bazılarında çekirdekte kromatin artışı ve sitoplazmada vakuolizasyon izlendi. Ayrıca hücreler arası alanlarda ödem alanlarının varlığı gözlemlendi. Bunların yanında, prefrontal korteksin yüzeyel tabakalarında enflamasyonu temsil eden infiltrasyon alanlarına rastlandı. (Şekil 24A). 28 gün boyunca i.p. 2 mg/kg skopolamin uygulanan, ardından 56. güne kadar yalnızca SF verilen deneklerden 56. günde elde edilen prefrontal korteks doku kesitlerinin ışık mikroskopik incelemesinde, kortekste ödem ve infiltrasyon alanlarının varlığı izlendi. Ayrıca nöronların bazılarında çekirdekte kromatin artışı ve sitoplazmada vakuolizasyon gözlemlendi. (Şekil 24B).

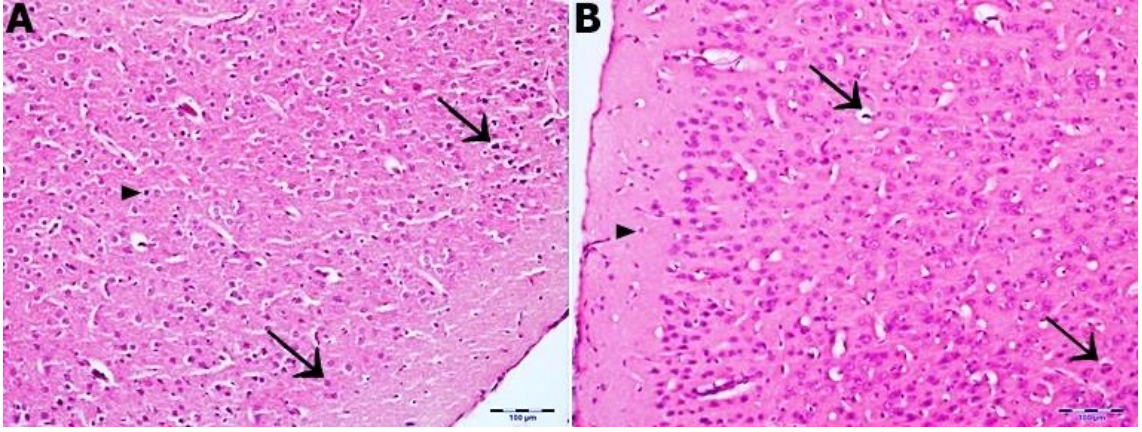


Şekil 24. Deney grubundan elde edilen prefrontal korteks doku kesitlerinin ışık mikroskopik görünümü.

A) 28. günde kortekste yer alan nöronlarda çekirdekte kromatin artışı ve sitoplazmada vakuolizasyon (oklar) izlenmektedir. H&E. Bar:100 µm. B) 56. günde alınan prefrontal korteks doku kesitlerinde nöronlarda (oklar) ve gliya hücrelerinde (ok başı) çekirdekte kromatin yoğunlaşması ve sitoplazmada vakuolizasyon gözlenmektedir. Kortekste infiltrasyon alanlarının (*) varlığı izlenmektedir. H&E. Bar:100 µm.

4.2.2.5. Tedavi-1 Grubu

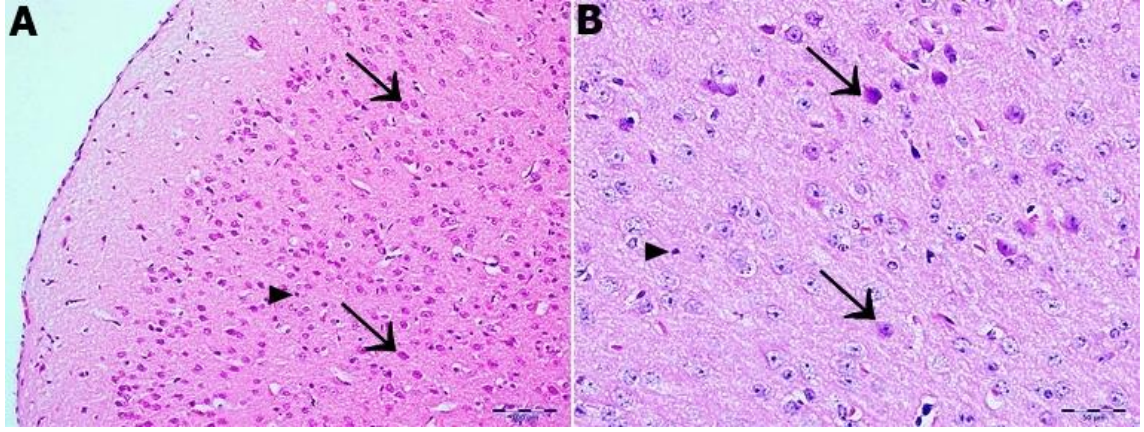
Yirmi sekiz gün boyunca i.p. 2 mg/kg skopolamin uygulamasından 1 saat sonra tedavi amacıyla i.p. 2 µg/gün TGF-β1 uygulandı. Deneyin 28. gününde alınan prefrontal korteks doku kesitlerinin ışık mikroskopik incelenmesinde, kortekste ödem ve infiltrasyon alanlarına rastlanmadı. Her ne kadar bazı nöronlarda çekirdekte hiperkromatin artışı ve sitoplazmada hafif vakuolizasyon izlense de çoğu nöronlarda ve gliya hücrelerinde normal yapının korunduğu dikkati çekti. (Şekil 25A). Bu grupta yer alan deneklerden 56. günde alınan prefrontal korteks doku kesitlerinin ışık mikroskopik incelemesinde, bazı nöronlarda çekirdekte hiperkromatin artışı ve sitoplazmada hafif vakuolizasyona rastlanmakla beraber, çoğu alanlarda, nöronların, gliya hücrelerinin ve sinir liflerinin genellikle normal yapılarını korudukları izlendi. (Şekil 25B).



Şekil 25. Tedavi-1 grubunda yer alan deneklere ait prefrontal korteks doku kesitlerinin ışık mikroskopik görünümü. A) 28. günde kortekste yer alan nöronların (oklar) bazılarında çekirdekte kromatin artışı ve sitoplazmada vakuolizasyon izlenmekle birlikte, çoğu nöronlarda ve gliya hücrelerinde (ok başı) normal yapının korunduğu gözlenmektedir. H&E. Bar:100 µm. B) 56. günde alınan prefrontal korteks doku kesitlerinde nöronların (oklar) bazılarında ve gliya hücrelerinde (ok başı) çekirdekte kromatin artışı ve sitoplazmada vakuolizasyon görülmekle birlikte, çoğu alanlarda normal yapının korunduğu dikkati çekmektedir. H&E. Bar:100 µm.

4.2.2.6. Tedavi-2 Grubu

Yirmi sekiz gün boyunca skopolamin uygulamasının ardından, 28-56. günler arasında TGF-β1 uygulanan deneklerden 56. günde alınan prefrontal korteks doku kesitlerinin ışık mikroskopik incelemesinde, kortekste yer alan nöronlardan bazılarında çekirdekte hiperkromatin artışı ve sitoplazmada vakuolizasyon izlendi. Bununla birlikte, nöronların büyük çoğunluğunda hücrenin normal yapısının korunduğu dikkati çekti. Gliya hücreleri de çekirdek ve sitoplazmik özellikleriyle normal olarak değerlendirildi. Sinir lifleri de normal yapı ve dağılıma sahipti (Şekil 26A-26B).



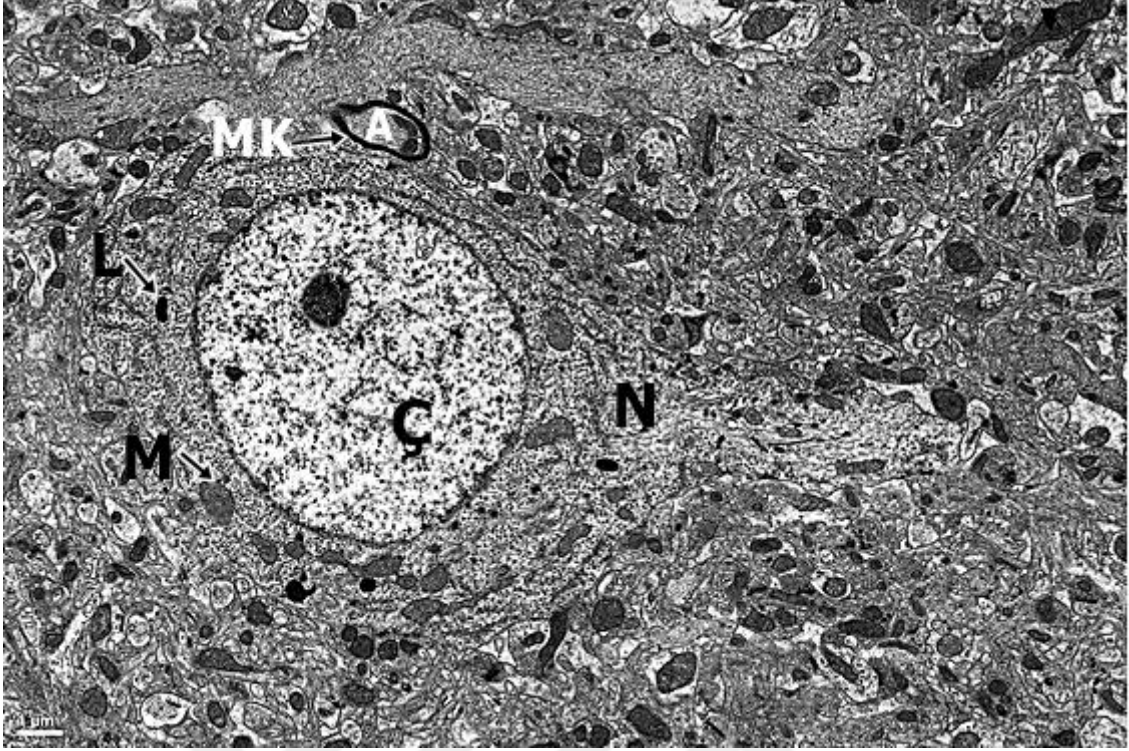
Şekil 26. Tedavi-2 grubunda yer alan deneklere ait prefrontal korteks doku kesitlerinin ışık mikroskopik görünümü. A) 56. günde alınan prefrontal korteks doku kesitinde, kortekste nöronların (oklar) ve gliya hücrelerinin (ok başı) genellikle normal yapılarını korudukları izlenmektedir. H&E. Bar:100 µm. B) Yüksek büyütmede nöronlar (oklar), gliya hücreleri (ok başı) ve sinir liflerinin yapılarının normal yapılarını korudukları dikkati çekmektedir. H&E. Bar:50 µm.

4.3. Elektron Mikroskopik Bulgular

4.3.1. Hipokampus

4.3.1.1. Kontrol Grubu

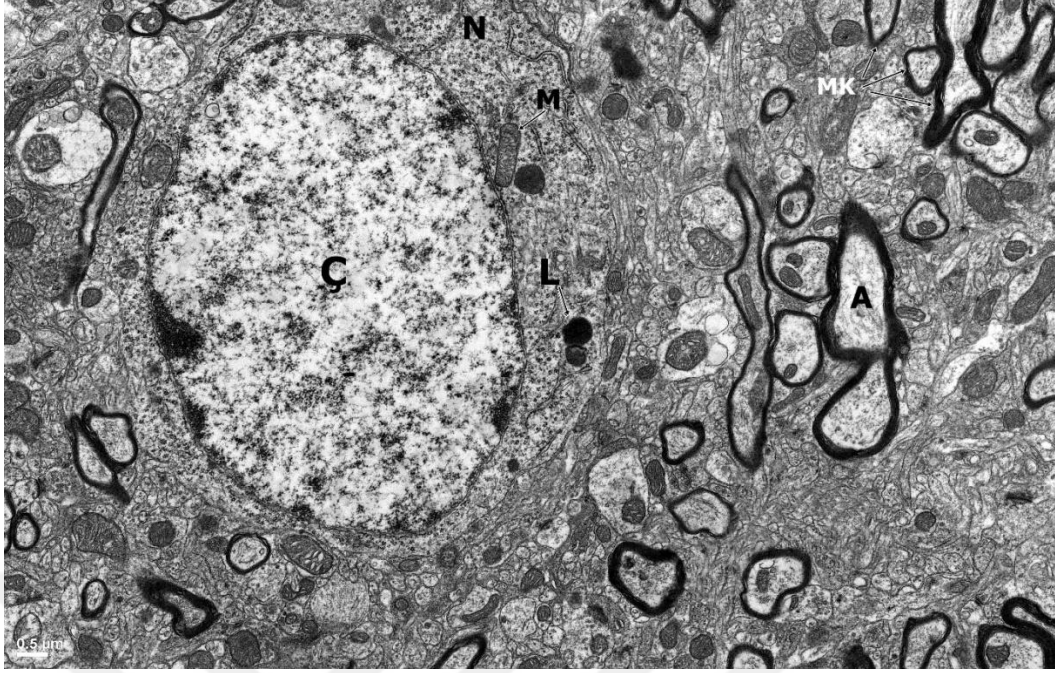
Tamamen normal kontrol grubu deneklerinden alınan hipokampus doku örneklerinin elektron mikroskopik incelemesinde nöronlar ve gliya hücreleri ile miyelinli ve miyelinsiz sinir liflerinin normal yapıda oldukları görüldü. Nöronların perikaryonları; merkezi yerleşimli oval bir çekirdek ve bunun etrafını çevreleyen perinükleer sitoplazmadan oluşmaktaydı. Veziküler tipteki çekirdeğin içerisinde bir veya birden fazla çekirdekçik yer almaktaydı. Nöroplazmada mitokondriyonlar, Golgi kompleksi, granüler endoplazmik retikülüm sisternaları, serbest ribozomlar ve lizozomlar ayırt edildi. Gliya hücreleri de çekirdek ve sitoplazmik organelleri ile normal görünümde izlendi. Miyelin kılıfa sahip sinir liflerinde akson ve miyelin kılıfın normal yapıda oldukları gözlemlendi. (Şekil 27).



Şekil 27. Normal kontrol grubuna deneklerden alınan hipokampus doku kesitinin elektron mikroskopik görünümü. Nöronun (N) çekirdek (Ç) ve sitoplazmik yapıları ile normal görünümde olduğu izlenmektedir. Nöroplazmada granüler endoplazmik retikülüm, mitokondriyonlar (M) ve lizozomlar (L) görülmektedir. Miyelinli sinir liflerinde akson (A) ve miyelin kılıfın (MK) normal yapıda olduğu izlenmektedir. Bar: 1 µm.

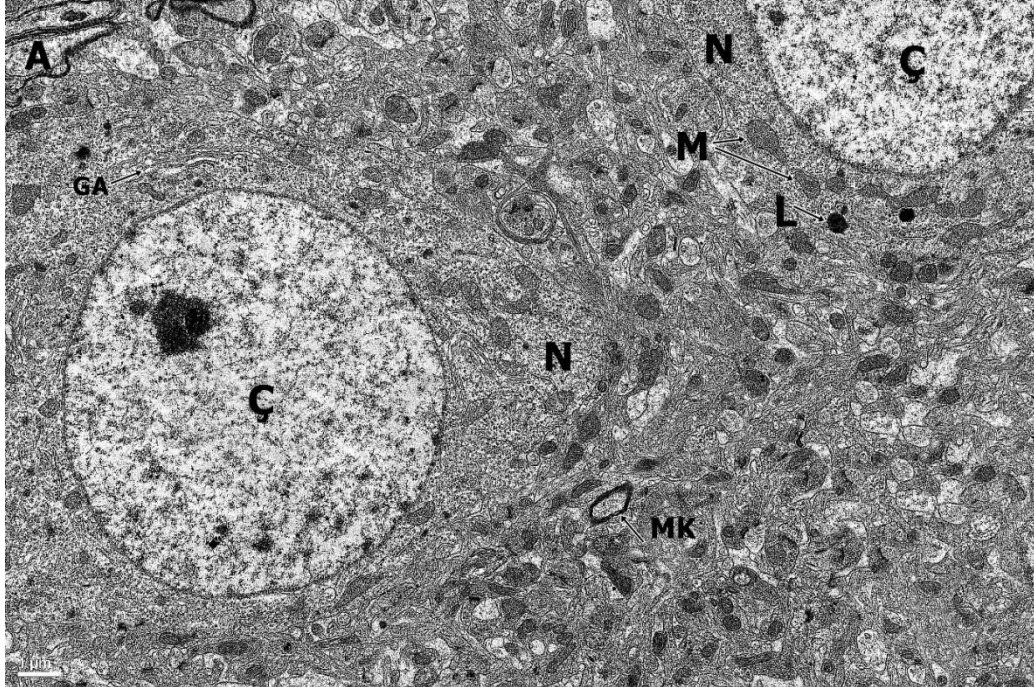
4.3.1.2. Sham Grubu

Alzheimer hastalığı modeli oluşturulmayan ve yalnızca 28 gün boyunca SF uygulanan deneklerden 28. ve 56. günlerde alınan hipokampus doku örneklerinin elektron mikroskopik incelemesinde, her iki grupta da nöronlar, gliya hücreleri ve sinir liflerinin ultrastrüktürel yapılarının normal olduğu ve kontrol grubuna benzerlik gösterdiği belirlendi (Şekil 28, Şekil 29).



Şekil 28. Sham grubundan 28. günde alınan hipokampus dokusunun elektron mikroskopik görünümü.

Nöron perikaryonunda (N) çekirdek (Ç) ve sitoplazmada yer alan organeller normal yapıda izlenmektedir. Mitokondriyonlar (M), lizozomlar (L), miyelinli akson (A) ve miyelin kılıf (MK) gösterilmiştir. Bar: 0,5 µm.

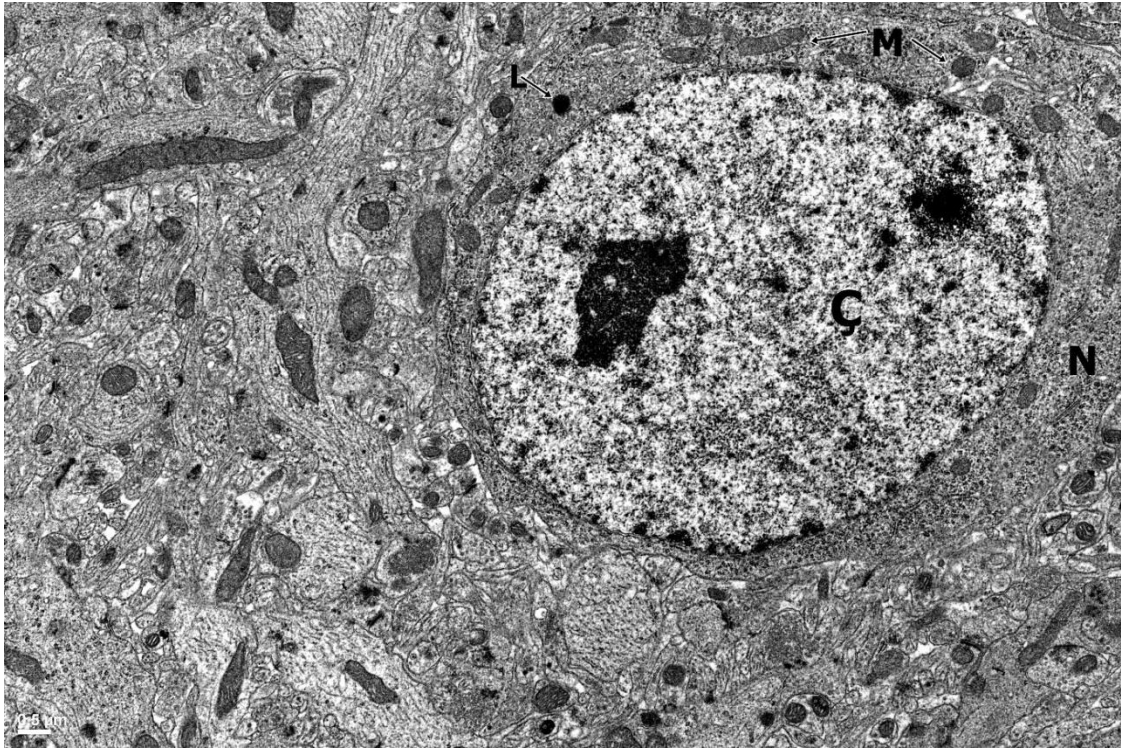


Şekil 29. Sham grubundan 56. günde alınan hipokampus dokusunun elektron mikroskopik görünümü.

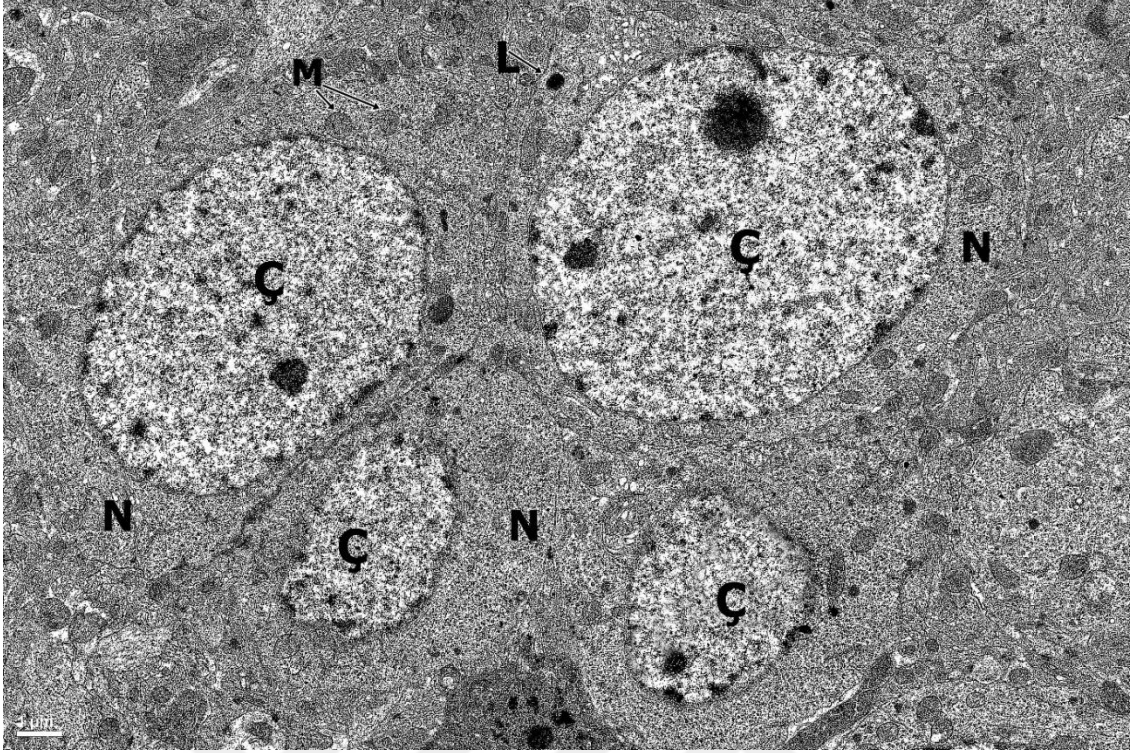
Nöronlarda (N) ve çekirdek (Ç) ve sitoplazmik organeller normal yapıda gözlenmektedir. Mitokondriyonlar (M), lizozomlar (L), Golgi kompleksi (GA) ile miyelinli akson (A) ve miyelin kılıf (MK) gösterilmiştir. Bar: 1 µm.

4.3.1.3. TGF- β 1 Kontrol Grubu

Yirmi sekiz gün boyunca i.p. olarak 2 μ g TGF- β 1 uygulanan deneklerden 28. günde alınan hipokampus doku örneklerinin elektron mikroskopik incelemesinde, nöronların, gliya hücrelerinin ve sinir liflerinin ince yapılarının normal oldukları gözlemlendi (Şekil 30). Aynı gruptan 56. günde elde edilen hipokampus doku örneklerinin elektron mikroskopik incelemesinde nöronlar, gliya hücreleri ve sinir liflerinin normal ultrastrüktürel yapıya sahip oldukları gözlemlendi (Şekil 31).



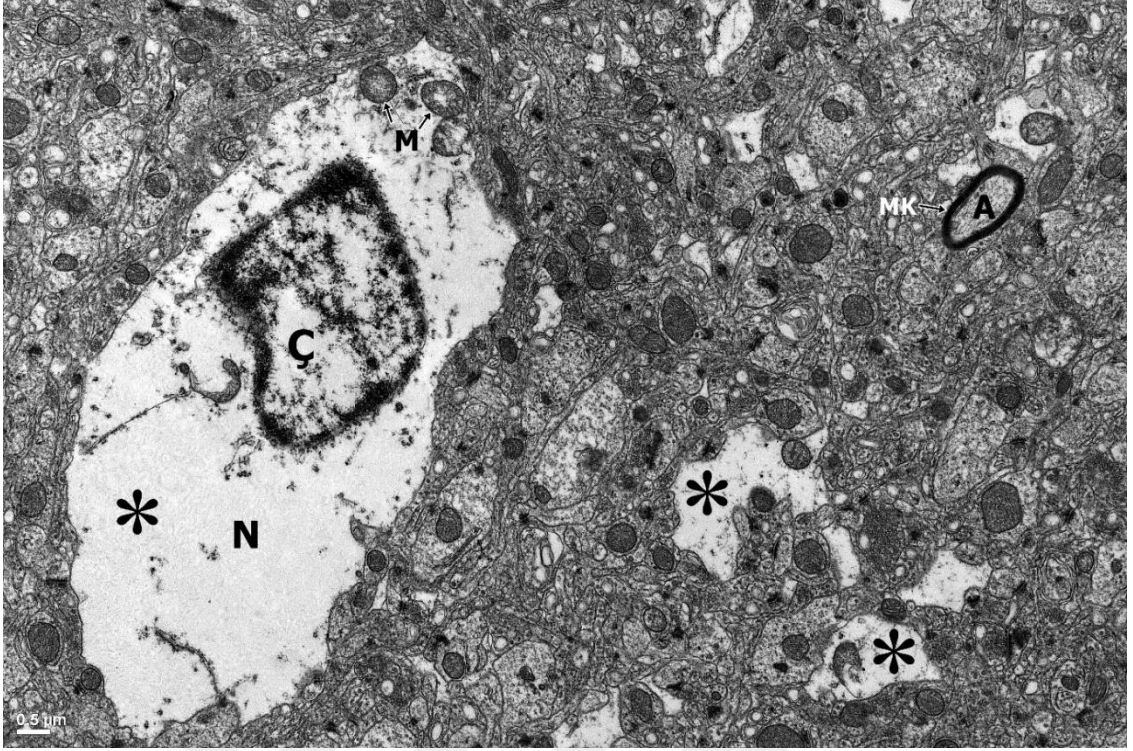
Şekil 30. TGF- β 1 kontrol grubundan 28. günde alınan hipokampus dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Nöron perikaryonunda (N) veziküler tipte çekirdek (Ç) ve içerisinde birden fazla çekirdekçik normal yapıda izlenmektedir. Nöroplazmada organeller normal yapılarını korumaktadır. Mitokondriyonlar (M), lizozomlar (L) gösterilmiştir. Bar: 0,5 μ m.



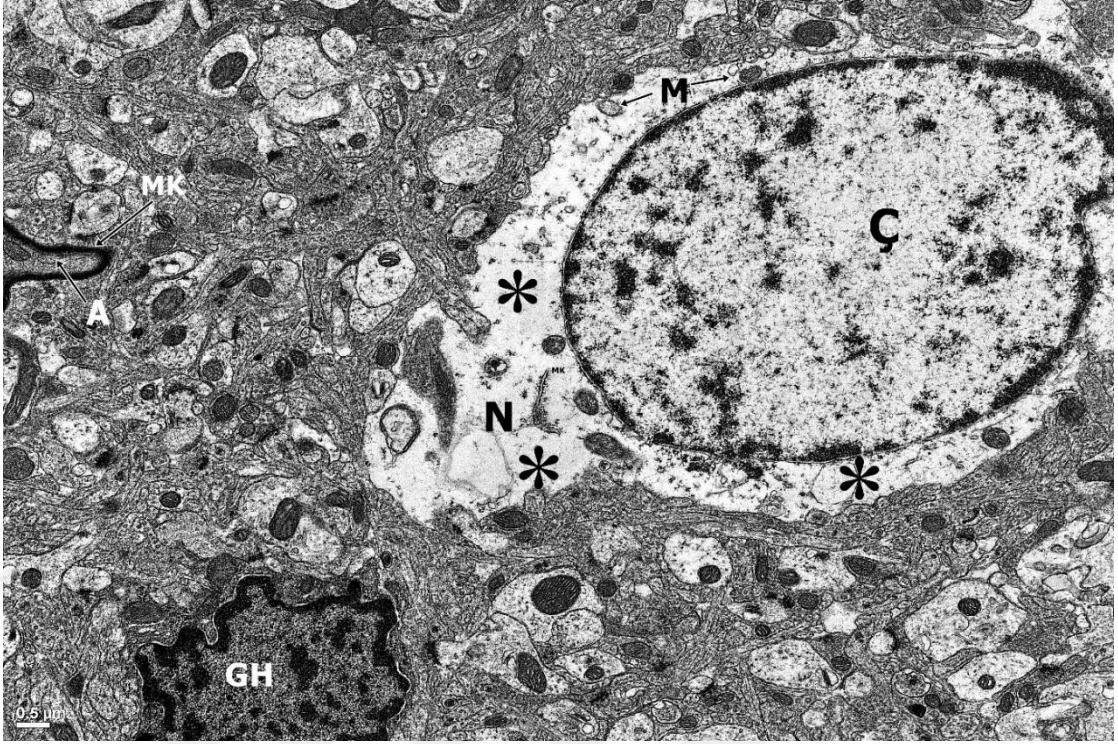
Şekil 31. TGF- β 1 kontrol grubundan 56. günde alınan hipokampus dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Nöronlarda (N) çekirdek (Ç) ve sitoplazmik organeller normal yapıda görülmektedir. Mitokondriyonlar (M), lizozomlar (L) gösterilmiştir. Bar: 1 μ m.

4.3.1.4. Deney Grubu

Deneysel Alzheimer hastalığı modeli oluşturmak üzere 28 gün boyunca 2 mg/kg dozda i.p. skopolamin uygulanan deneklerden 28. günde alınan hipokampus doku kesitlerinin elektron mikroskopik incelemesinde, nöronlarda çekirdekte kromatin artışı ve sitoplazmada yaygın ödem alanlarının varlığı dikkati çekti. Gliya hücrelerinde çekirdekte hiperkromatin artışı ve sitoplazmada ödem alanları izlendi. Sinir liflerinde hafif yapısal değişiklikler izlenmekle birlikte, çoğunlukla yapısal bütünlüğün korunduğu gözlemlendi (Şekil 32). Deneysel Alzheimer hastalığı modeli oluşturulan deneklerden 56. günde alınan hipokampus doku kesitlerinin elektron mikroskopik incelemesinde hücresel yapının nispeten korunduğu gözlenmekle beraber, nöronlar, gliya hücreleri ve sinir liflerinde 28. günde gözlenen değişikliklere benzer yapısal bozuklukların varlığı izlendi (Şekil 33).



Şekil 32. Yirmi sekiz gün boyunca 2 mg/kg dozda i.p. skopolamin uygulanan deneklerden 28. günde alınan hipokampus dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Nöron perikaryonunda (N) yer alan çekirdekte (Ç) heterokromatin artışı, sitoplazmada yaygın ödem (*) ile organel harabiyeti görülmektedir. Mitokondriyon (M), akson (A) ve miyelin kılıf (MK) gösterilmiştir. Bar: 0,5 µm.

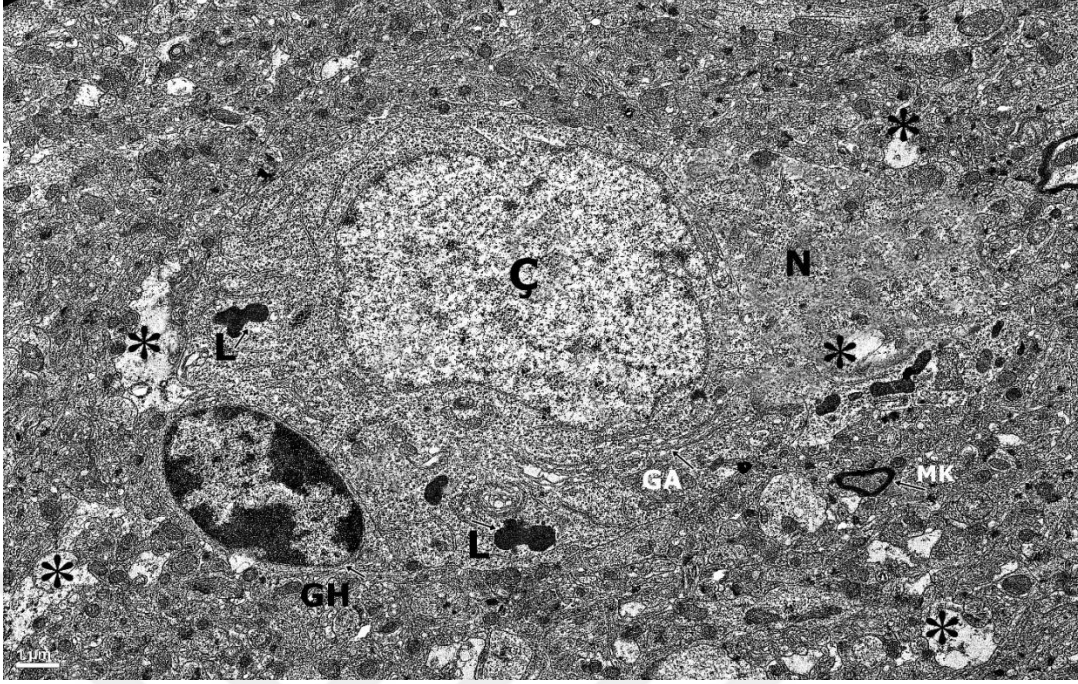


Şekil 33. Yirmi sekiz gün boyunca 2 mg/kg dozda i.p. skopolamin uygulanan deneklerden 56. günde alınan hipokampus dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Nöron sitoplazmasında (N) yaygın ödem (*) ile organel harabiyeti görülmektedir. Gliya hücresinde (GH) çekirdekte heterokromatin artışı dikkati çekmektedir. Çekirdek (Ç), miyelinli akson (A), mitokondri (M), miyelin kılıf (MK) gösterilmiştir. Bar: 0,5 µm.

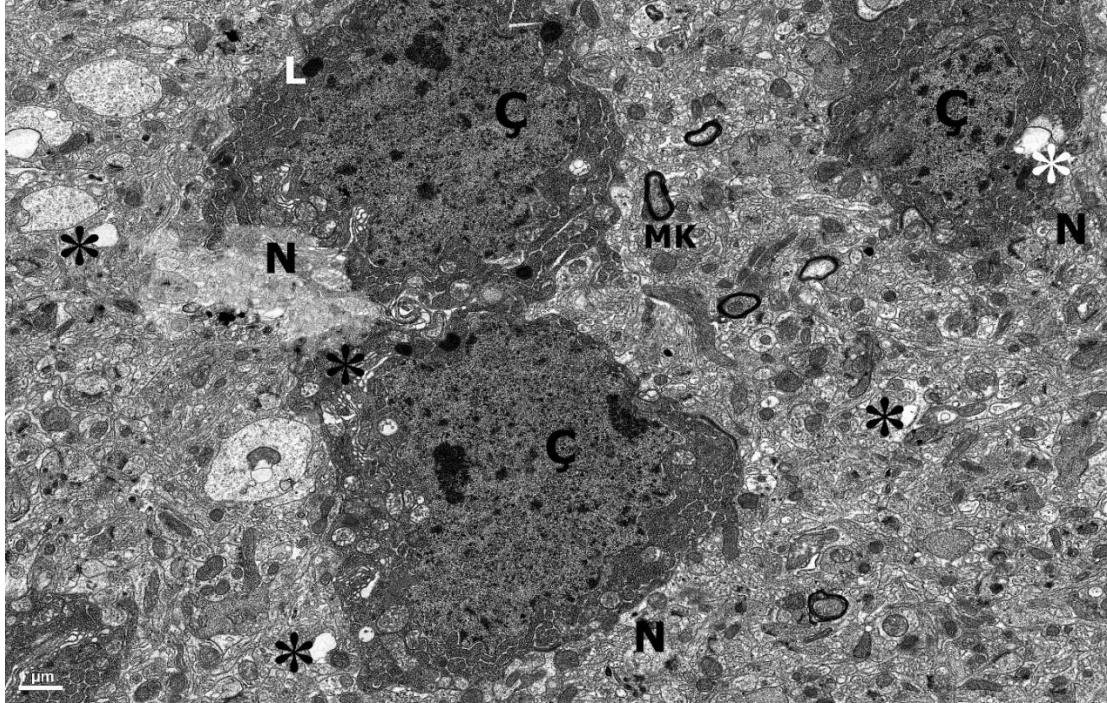
4.3.1.5. Tedavi-1 Grubu

Yirmi sekiz gün boyunca i.p. 2 mg/kg skopolamin uygulamasından 1 saat sonra tedavi amacıyla i.p. 2 µg/gün TGF-β1 uygulanan deneklerden 28. günde alınan hipokampus doku örneklerinin elektron mikroskopik incelemesinde, nöronlarda çekirdekte heterokromatin artışı, sitoplazmada hafif vakuolizasyon izlenmekle birlikte, çoğu nöronların yapısının korunduğu gözlemlendi. Gliya hücrelerinde çekirdekte kromatin artışı ve sitoplazmada hafif yapısal değişiklikler gözlenmekle beraber hücrelerin ince yapıları çoğu alanda normale yakın izlendi. Sinir liflerinde akson ve miyelin kılıf yapısı normal olarak değerlendirildi. (Şekil 34).

Deneklerden 56. günde alınan hipokampus doku örneklerinin elektron mikroskopik incelemesinde, nöronlarda çekirdekte kromatin artışı, sitoplazmada mitokondriyonlarda genişleme ve vakuolizasyon izlendi. Bununla birlikte nöronların çoğunda normal yapının korunduğu dikkati çekti. Gliya hücreleri ve sinir liflerinin yapılarının normal olduğu gözlemlendi (Şekil 35).



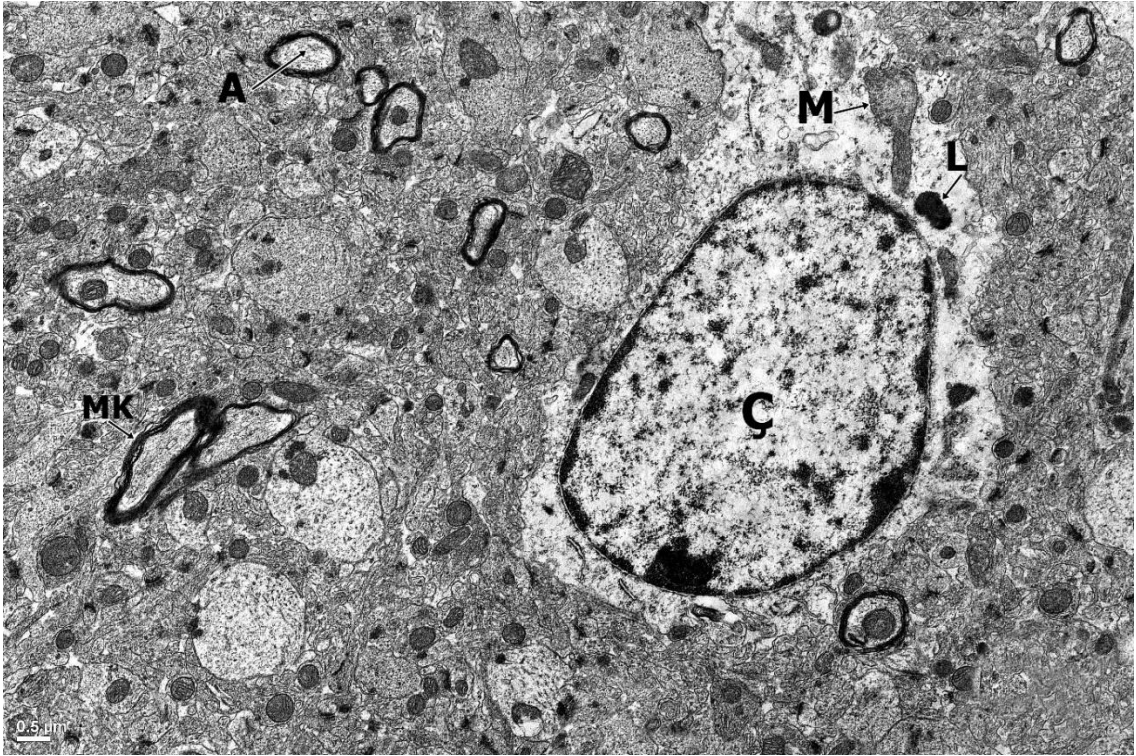
Şekil 34. Tedavi-1 grubundan 28. günde alınan hipokampus dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Nöronda sitoplazmada (N) hafif vakuolizasyon (*) izlenmektedir. Gliya hücresinde (GH) çekirdekte heterokromatin artışı gözlenmektedir. Lizozom (L) ve miyelin kılıf (MK) gösterilmiştir. Bar: 1 µm.



Şekil 35. Tedavi-1 grubundan 56. günde alınan hipokampus dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Nöronlarda (N) çekirdekte (Ç) kromatin artışı sitoplazmada organellerde hafif vakuolizasyon (siyah-beyaz*) izlenmektedir. Lizozom (L) ve miyelin kılıf (MK) gösterilmiştir. Bar: 1 µm.

4.3.1.6. Tedavi-2 Grubu

Yirmi sekiz gün boyunca skopolamin uygulamasının ardından, 28 gün boyunca TGF- β 1 uygulanan deneklerden 56. günde alınan hipokampus doku örneklerinin elektron mikroskopik incelemesinde nöronlarda çekirdek ve sitoplazmik organellerin genellikle normal yapılarını koruduğu dikkati çekti. Gliya hücreleri ve sinir liflerinde de yapısal görünümün korunduğu izlendi. (Şekil 36).



Şekil 36. Tedavi-2 grubundan 56. günde alınan hipokampus dokusunun elektron mikroskopik görünümü.

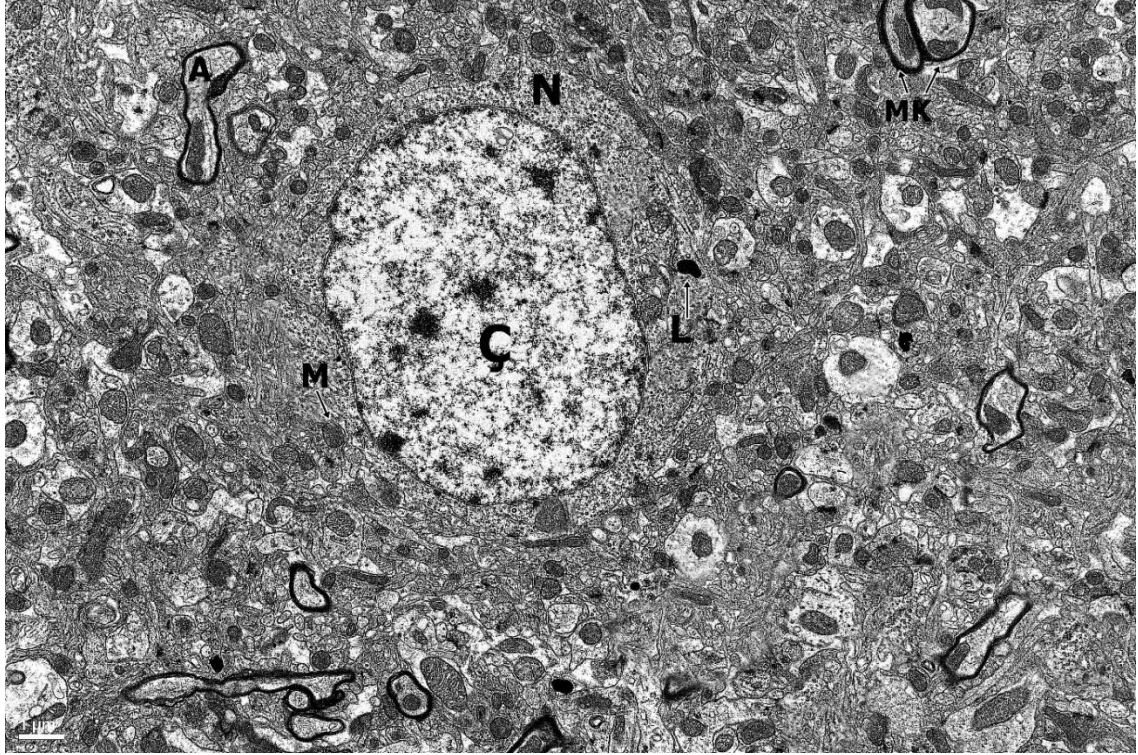
Nöronda (Ç) çekirdek (Ç) ve sitoplazmik organellerin normal yapısını koruduğu izlenmektedir. Akson (A), mitokondriyon (M), lizozom (L) ve miyelin kılıf (MK) gösterilmiştir. Bar: 0,5 µm.

4.3.2. Prefrontal Korteks

4.3.2.1. Kontrol Grubu

Herhangi bir işlem uygulanmayan normal kontrol grubu deneklerinden alınan prefrontal korteks doku örneklerinin elektron mikroskopik incelemesinde nöronlar, gliya hücreleri ve sinir liflerinin normal yapıda oldukları gözlemlendi. Nöron perikaryonunda yuvarlak veya oval veziküller bir çekirdek ve nöroplazmada yer alan granüler endoplazmik retikülüm, mitokondriyonlar, golgi kompleksi, lizozomlar ile

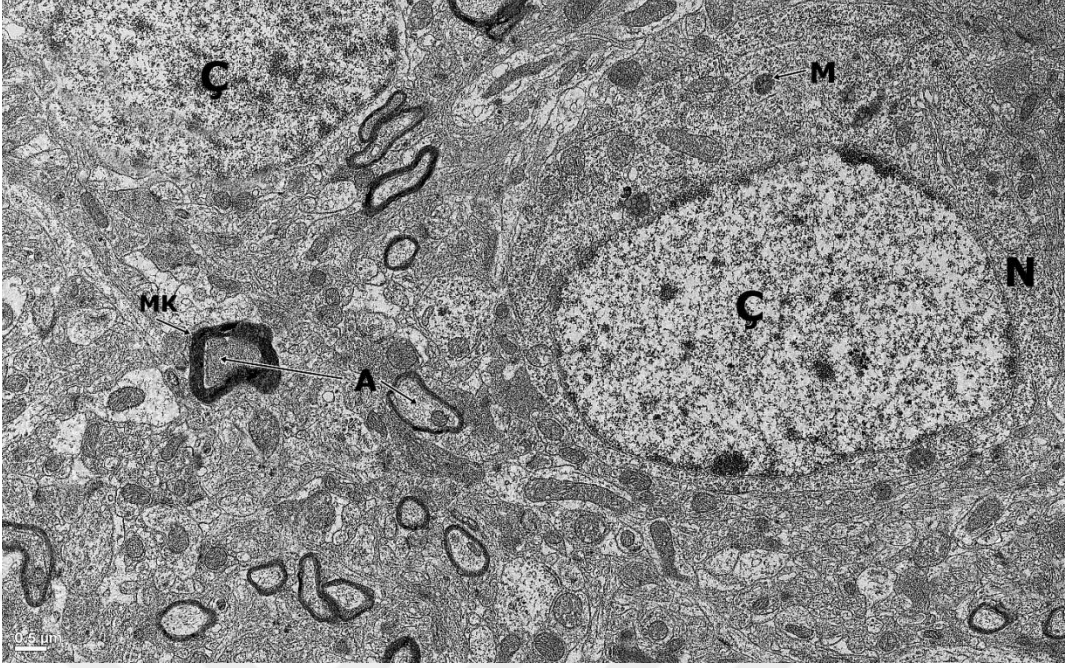
nörotübül ve nörofilamanların varlığı izlendi. Gliya hücreleri çekirdek ve sitoplazmik özellikleri ile normal yapıda görüldü. Sinir liflerinde akson ve miyelin kılıf yapısı normaldi (Şekil-37).



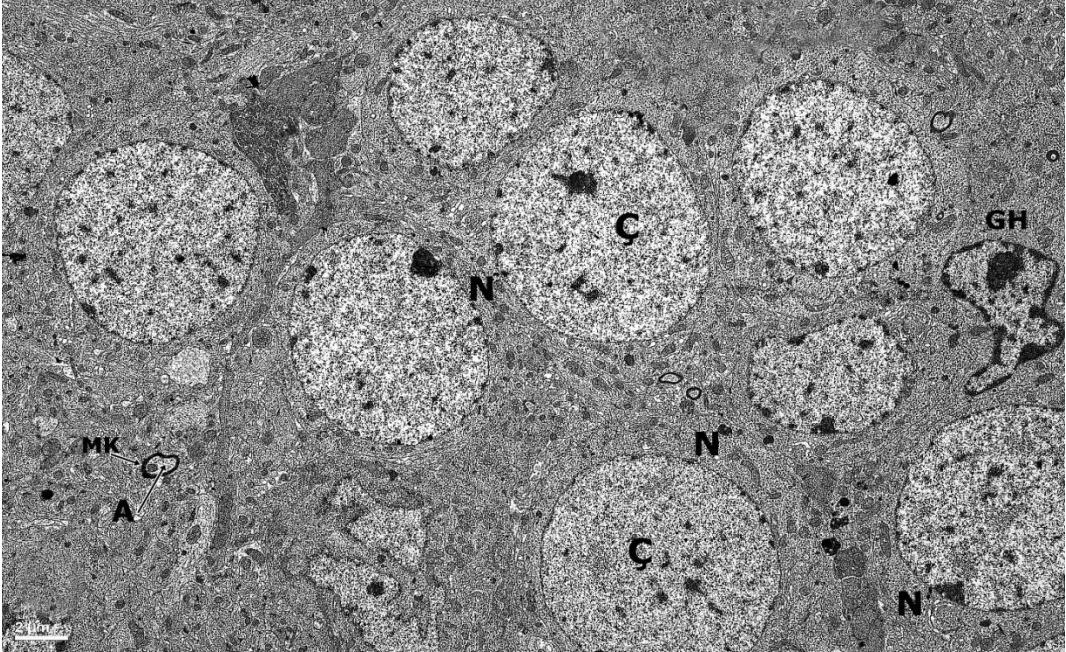
Şekil 37. Normal kontrol grubundan alınan prefrontal korteks dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Nöronun (N) çekirdek (Ç) ve sitoplazmik organellerinin normal yapıda olduğu görülmektedir. Mitokondriyon (M), lizozom (L), akson (A) ve miyelin kılıf (MK) gösterilmiştir. Bar: 1 µm.

4.3.2.2. Sham Grubu

Yirmi sekiz boyunca i.p. 2 mg/kg SF uygulanan deneklerden 28. günde alınan prefrontal korteks doku örneklerinin elektron mikroskopik incelemesinde, nöronlar, gliya hücreleri ve sinir liflerinin normal yapıda oldukları gözlemlendi (Şekil 38). 28 gün boyunca i.p. 2 mg/kg SF uygulanan deneklerden 56. günde alınan prefrontal korteks doku örneklerinin elektron mikroskopik incelemesinde hücrelerin ve sinir liflerinin normal yapılarını korudukları belirlendi (Şekil 39).



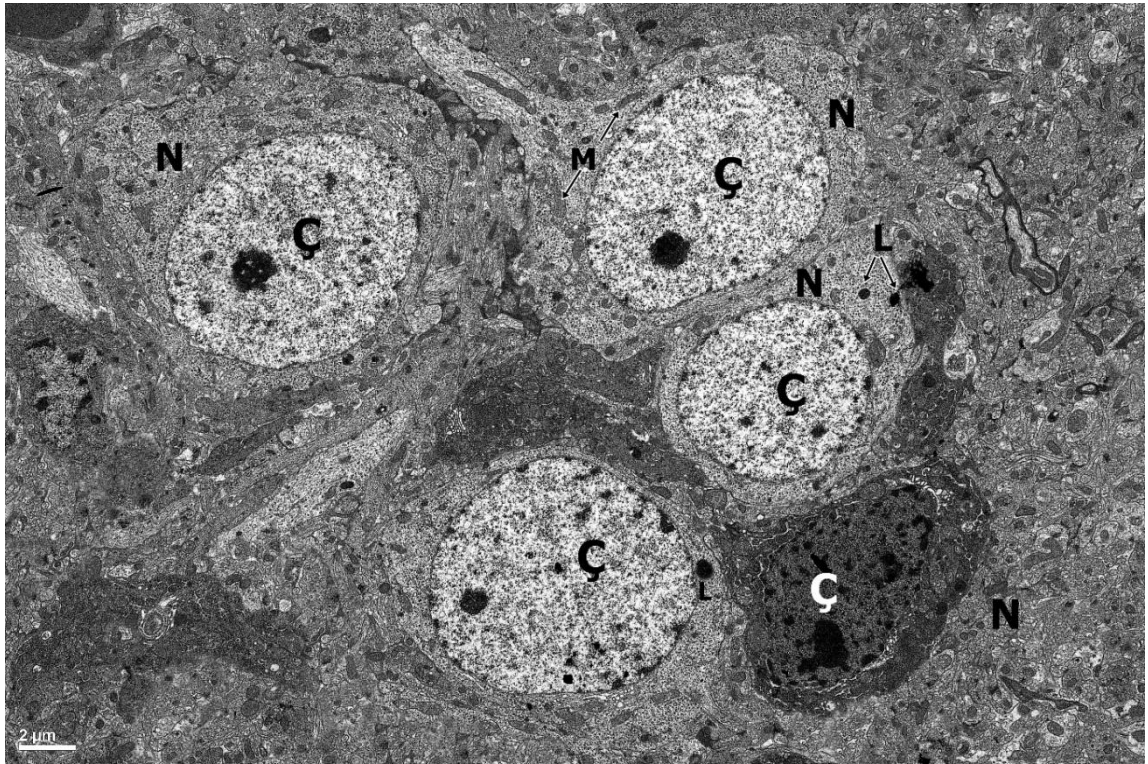
Şekil 38. Sham grubundan 28. günde alınan prefrontal korteks dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Nöron perikaryonunun (N) çekirdeğin (Ç) ve sitoplazmada mitokondriyonların (M) normal yapıda olduğu görülmektedir. Perinöronal alanlarda miyelinli sinir liflerinde akson (A) ve miyelin kılıfın (MK) normal yapıda olduğu izlenmektedir. Bar: 0,5 μ m.



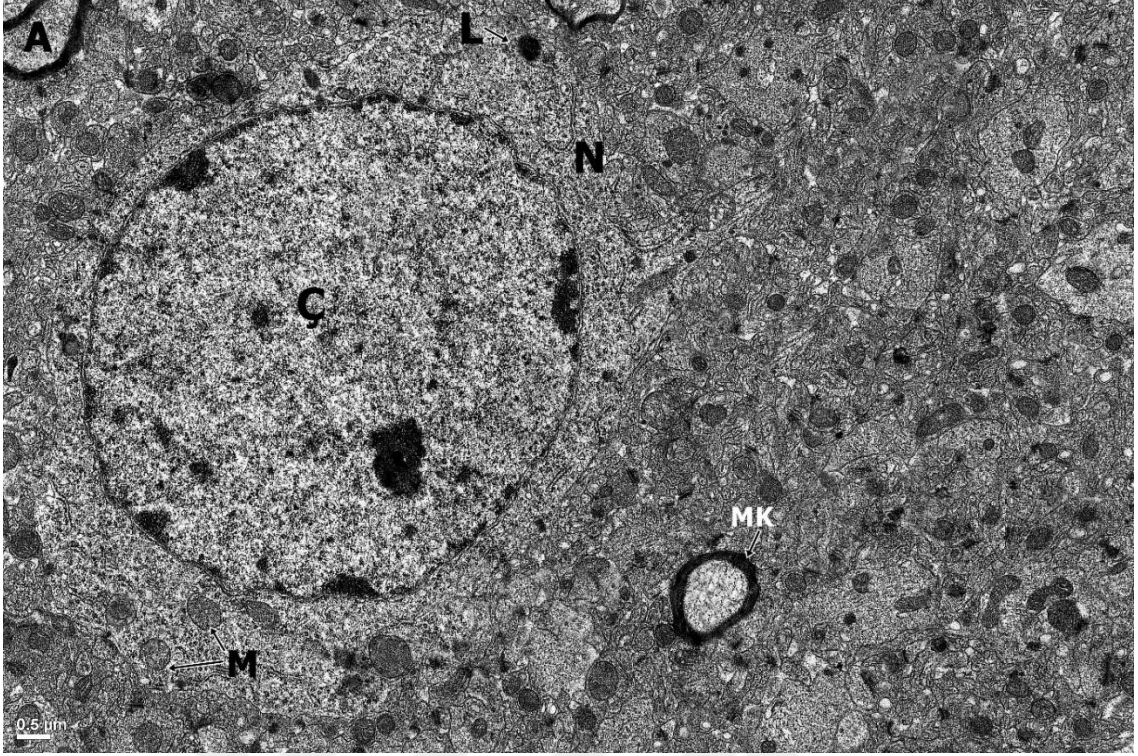
Şekil 39. Sham grubundan 56. günde alınan prefrontal korteks dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Nöron perikaryonlarında (N) ve çekirdek (Ç) ve sitoplazmik organellerin normal yapıda olduğu görülmektedir. Miyelin kılıf (MK), akson (A) ve gliya hücresi (GH) normal yapıda izlenmektedir Bar: 2 μ m.

4.3.2.3. TGF- β 1 Kontrol Grubu

Yirmi sekiz gün boyunca i.p. 2 μ g/gün TGF- β 1 uygulanan deneklerden 28. günde alınan prefrontal korteks doku örneklerinin elektron mikroskopik incelemesinde, nöronların ve gliya hücrelerinin çekirdek ve sitoplazmik organellerinin normal yapıda oldukları gözlemlendi. Miyelinli sinir liflerinde akson ve miyelin kılıfın yapısı normaldi (Şekil 40). 28 gün boyunca i.p. 2 μ g/gün TGF- β 1 uygulanan deneklerden 56. günde elde edilen prefrontal korteks doku örneklerinin elektron mikroskopik incelemesinde nöronlar, gliya hücreleri ve sinir liflerinin normal yapıda oldukları belirlendi (Şekil 41).



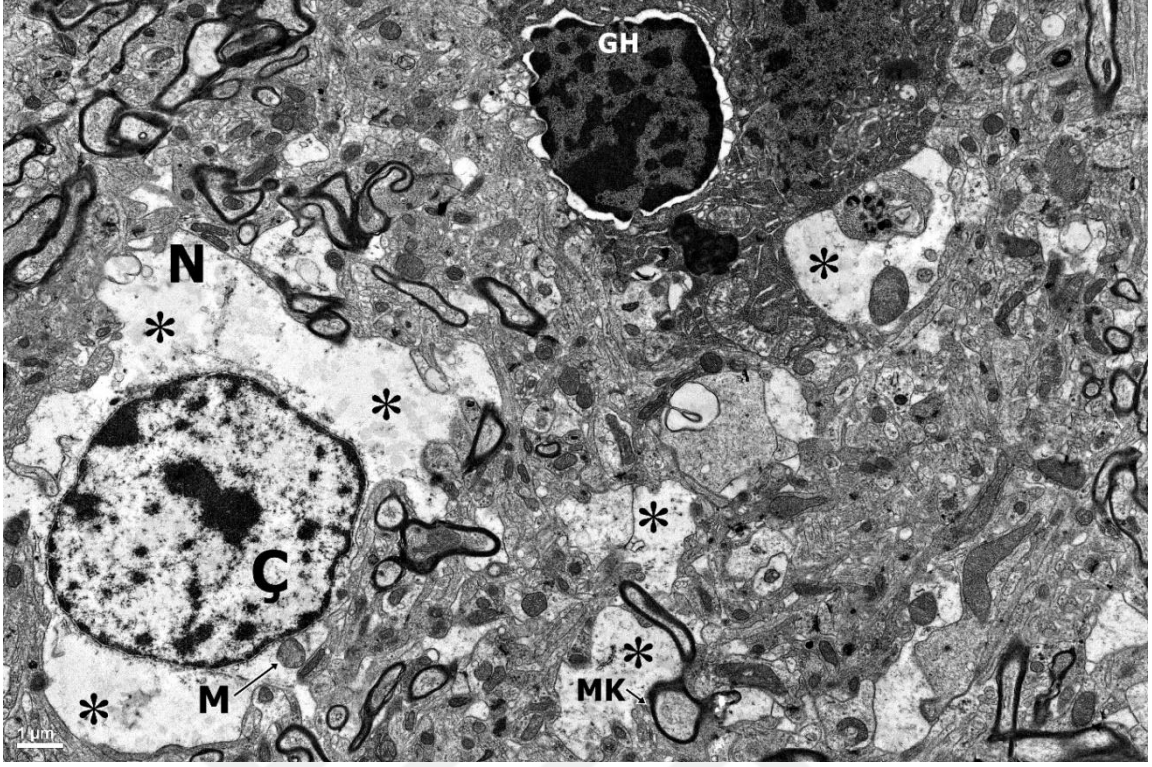
Şekil 40. TGF- β 1 kontrol grubundan 28. günde alınan prefrontal korteks dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Nöronların (N) bazılarında çekirdekte (Ç) heterokromatin artışı izlenmekle birlikte, çoğu nöronlarda çekirdek ve sitoplazmik organellerin normal yapıda oldukları görülmektedir. Mitokondriyon (M) ve lizozom (L) gösterilmektedir. Bar: 2 μ m.



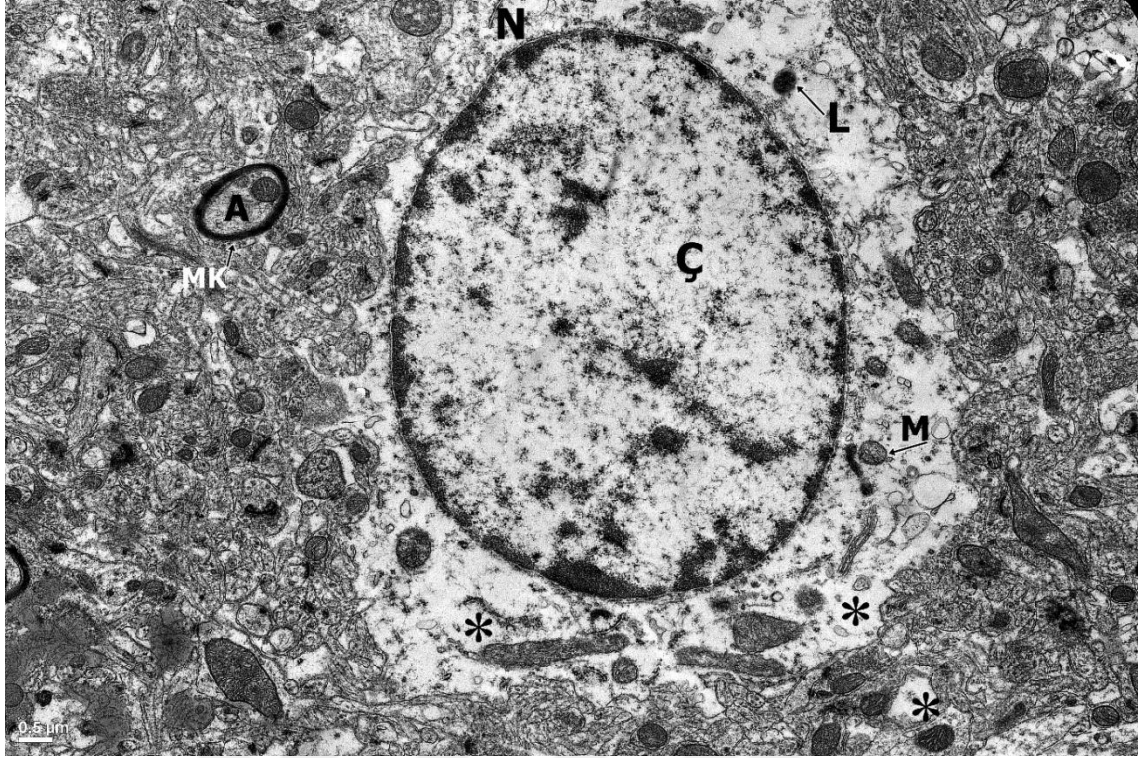
Şekil 41. TGF- β 1 kontrol grubundan 56. günde alınan prefrontal korteks dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Nöron perikaryonunda (N) çekirdek (Ç) ve sitoplazmik organellerin normal yapıda olduğu izlenmektedir. Miyelin kılıf (MK) ve akson (A) normal yapıda görülmektedir. Mitokondriyon (M) ve lizozom (L) gösterilmektedir. Bar: 0,5 μ m.

4.3.2.4. Deney Grubu

Yirmi sekiz gün boyunca i.p. 2 mg/kg skopolamin uygulamasından sonra 28. günde alınan prefrontal korteks doku örneklerinin elektron mikroskopik incelemesinde nöronlarda çekirdekte kromatin yoğunlaşması ve sitoplazmada vakuolizasyon gözlemlendi. Bazı nöronlarda intrasitoplazmik ödem varlığı da izlendi. Gliya hücreleri nispeten normal görünümünü korumaktaydı. Miyelinli sinir liflerinde hafif miyelin kılıf değişiklikleri görülmekle birlikte akson yapısının normal olduğu belirlendi (Şekil 42). 28 gün boyunca i.p. 2 mg/kg skopolamin uygulamasından sonra 56. günde alınan prefrontal doku örneklerinin elektron mikroskopik incelemesinde nöron perikaryonlarında hafif yapısal değişiklikler izlenmekle birlikte çoğu hücrelerde ultrastrüktürel yapının korunduğu dikkati çekti (Şekil 43).



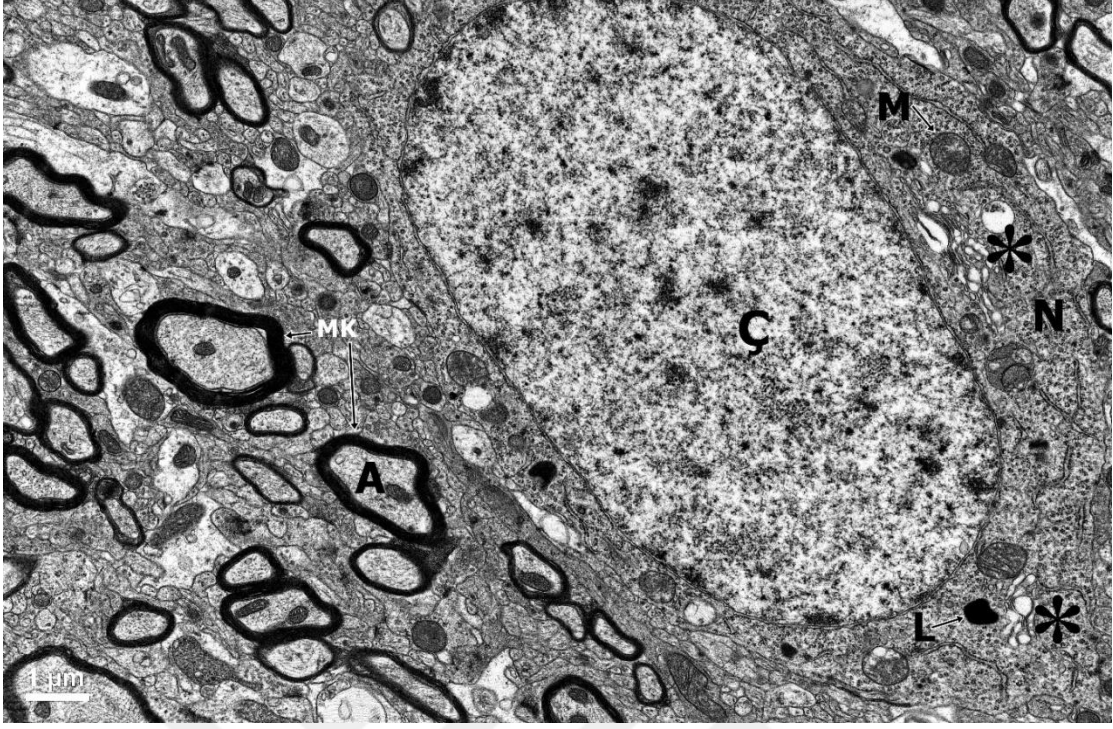
Şekil 42. Deney grubundan 28. günde alınan prefrontal korteks dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Nöron (N) sitoplazmasında ödem (*) ve organellerde hafif yapısal değişiklikler izlenmektedir. Gliya hücrelerinde (GH) çekirdekte heterokromatin artışı görülmektedir. Çekirdek (Ç), mitokondriyon (M) ve miyelin kılıf (MK) gösterilmektedir. Bar: 1 µm.



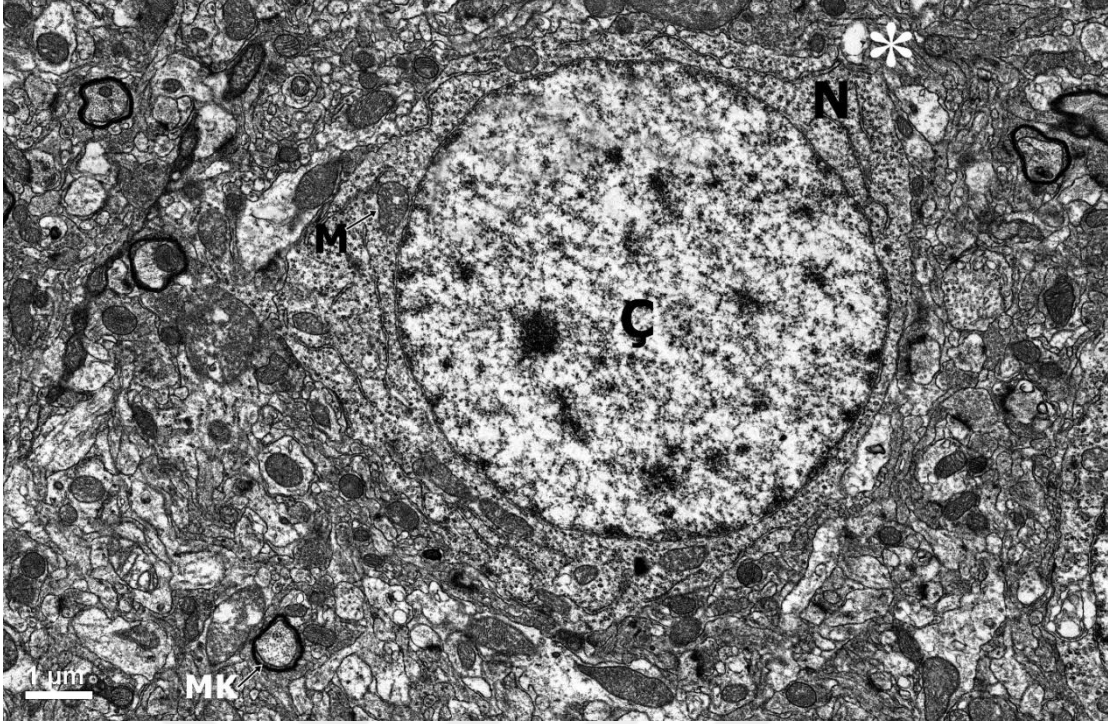
Şekil 43. Deney grubundan 56. günde alınan prefrontal korteks dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Nöronların (N) bazılarında çekirdekte (Ç) kromatin yoğunlaşması ve sitoplazmada ödem (*) izlenmekle birlikte çoğu nöronlarda normal yapının korunduğu dikkati çekmektedir. Miyelinli akson (A), lizozom (L), mitokondriyon (M) ve miyelin kılıf (MK) gösterilmektedir. Bar: 0,5 µm.

4.3.2.5. Tedavi-1 Grubu

Yirmi sekiz gün boyunca i.p. 2 mg/kg skopolamin uygulamasından 1 saat sonra i.p. 2 µg/gün TGF-β1 verilen deneklerden 28. günde alınan prefrontal korteks doku örneklerinin elektron mikroskopik incelemesinde bazı nöronlarda çekirdekte heterokromatin artışı ve sitoplazmada vakuolizasyon izlendi. Bununla birlikte çoğu nöronlarda hücrelerin yapısı normal olarak değerlendirildi. Gliya hücrelerinde çekirdek ve sitoplazmik organeller normal yapıda izlendi. Sinir liflerinin yapısı da normaldi (Şekil 44). 56. günde alınan prefrontal korteks kesitlerinde, her ne kadar bazı nöronlarda çekirdekte kromatin yoğunlaşması ve sitoplazmada organellerde hafif yapısal değişiklikler izlense de, nöronların çoğunluğunda normal yapının korunduğu gözlemlendi. Gliya hücreleri ve sinir liflerinin de normal yapıda olduğu görüldü (Şekil 45).



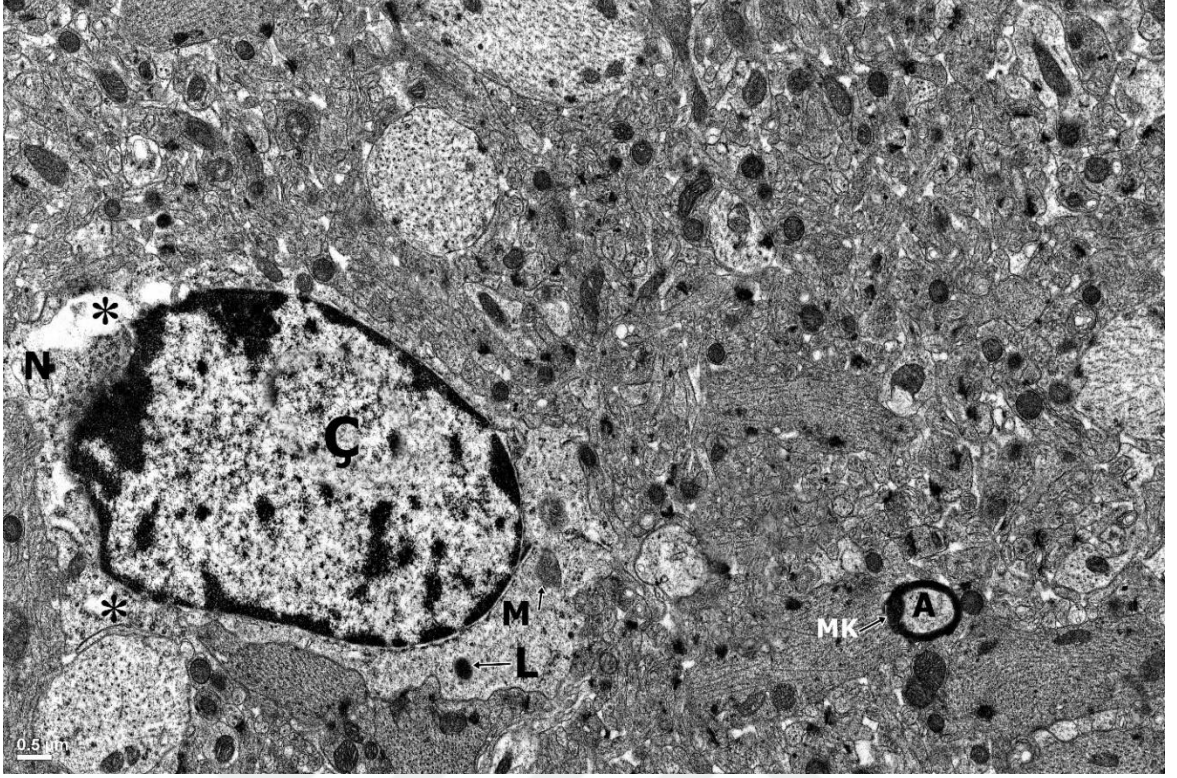
Şekil 44. Tedavi-1 grubundan 28. günde alınan prefrontal korteks dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Nöronların (N) bazılarında sitoplazmada vakuolizasyon (*) izlenmekle birlikte normal yapının korunduğu dikkati izlenmektedir. Miyelinli akson (A), miyelin kılıf (MK) ve mitokondriyon (M) gösterilmektedir. Bar: 1 µm.



Şekil 45. Tedavi-1 grubundan 56. günde alınan prefrontal korteks dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Nöronların (N) bazılarında sitoplazmada hafif derecede vakuolizasyon (*) görülmekle birlikte normal yapının korunduğu dikkati çekmektedir. Çekirdek (Ç), mitokondriyon (M) ve miyelin kılıf (MK) gösterilmektedir. Bar: 1 µm.

4.3.2.6. Tedavi-2 Grubu

Yirmi sekiz gün boyunca skopolamin uygulamasının ardından 28 gün boyunca da i.p. 2 µg/gün TGF-β1 uygulanan deneklerden 56. günde alınan prefrontal korteks doku örneklerinin elektron mikroskopik incelemesinde bazı nöronlarda çekirdekte kromatin yoğunlaşması, sitoplazmada hafif vakuolizasyon gözlenmekle beraber, nöronların çoğunda ultrastrüktürel özelliklerin normal olduğu dikkati çekti. Gliya hücreleri ve sinir lifleri de normal yapısını korumaktaydı (Şekil 46).

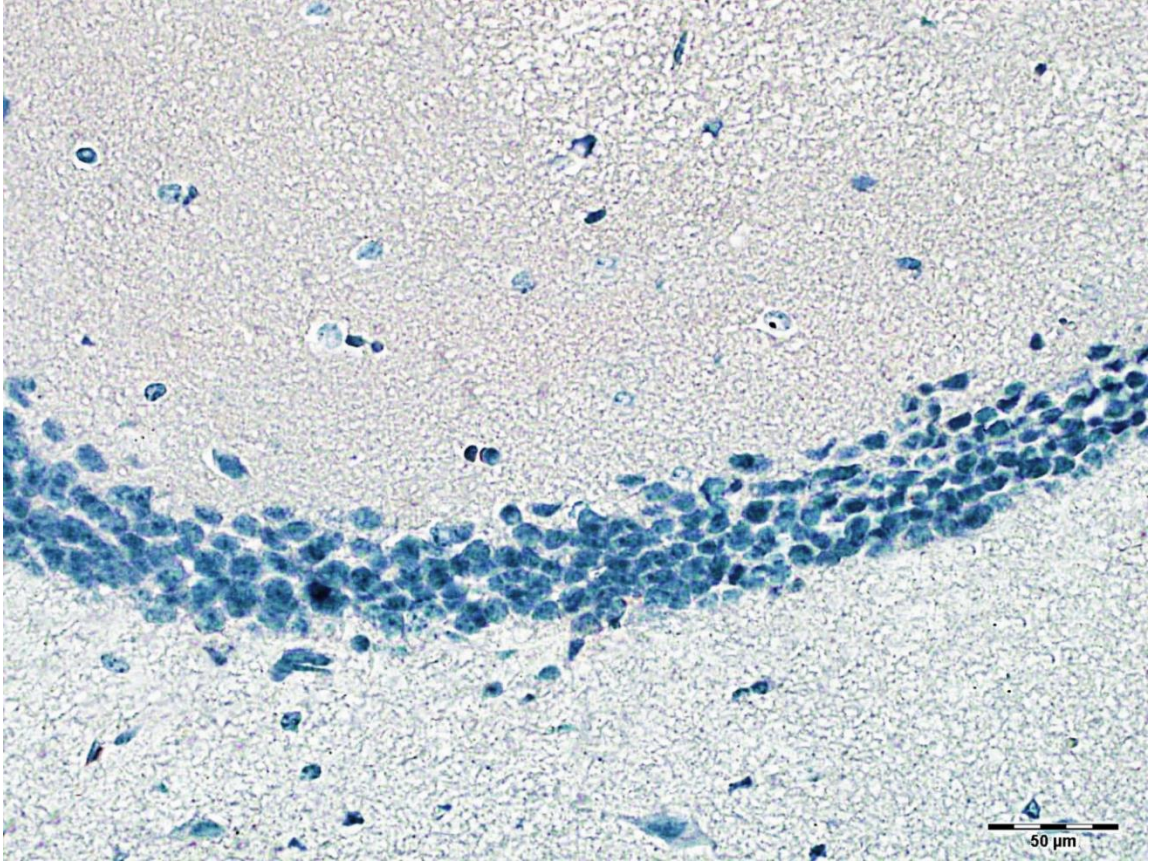


Şekil 46. Tedavi-2 grubundan 56. günde alınan prefrontal korteks dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Nöron (N) çekirdeğinde (Ç) kromatin artışı, sitoplazmada hafif vakuolizasyon (*) izlenmektedir. Miyelinli akson (A), miyelin kılıf (MK), lizozom (L) ve mitokondriyon (M) gösterilmektedir. Bar: 0,5 µm.

4.4. İmmunohistokimyasal Bulgular

4.4.1. Hipokampus A β -40 İmmunohistokimyası

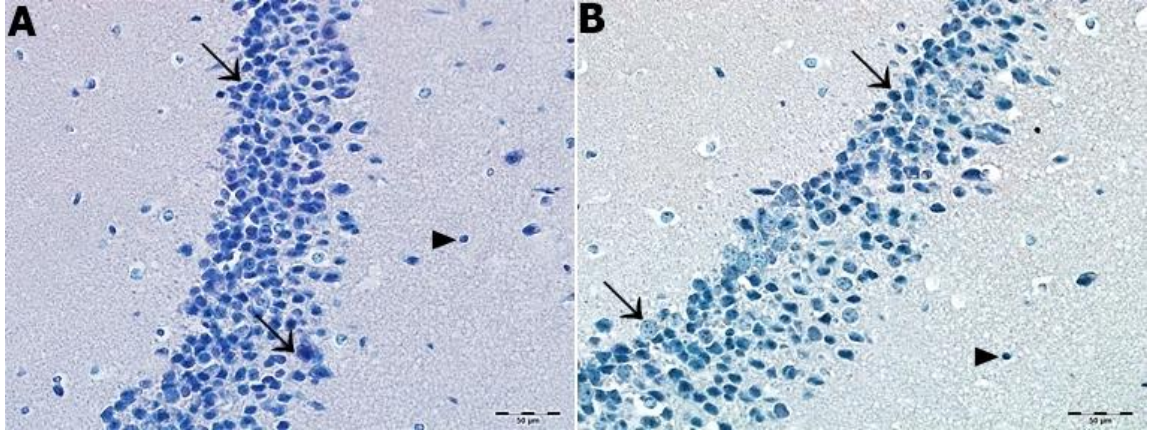
Hipokampus dokusundan alınan kesitte, negatif kontrol amacıyla primer antikor damlatılmayan kesitlerde nöronlarda, gliya hücrelerinde ve sinir liflerinde A β -40 immunreaktivitesi görülmedi (Şekil 47).



Şekil 47. Negatif kontrol. A β -40 için, primer antikor damlatılmamış hipokampus kesitinde herhangi bir işaretlemenin olmadığı görülmektedir. Bar: 50 μ m.

4.4.1.1. Kontrol Grubu

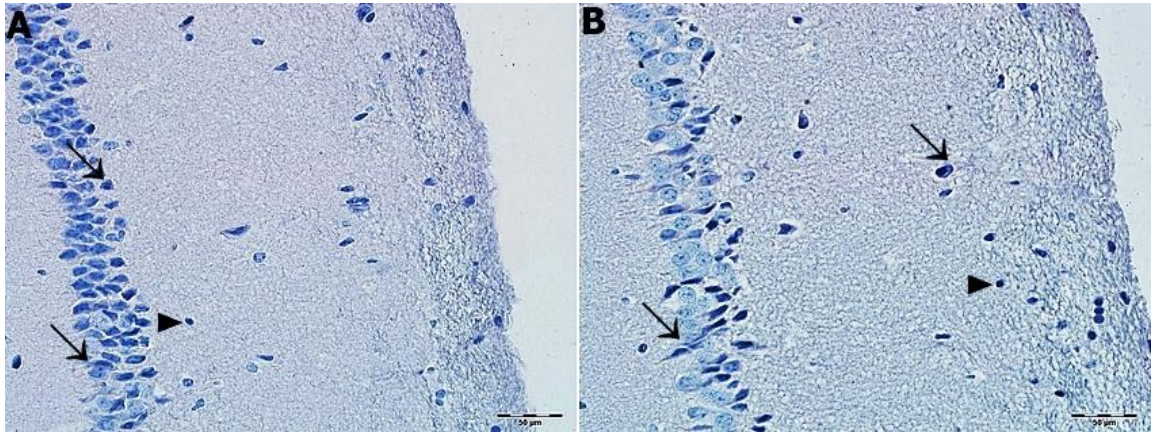
Herhangi bir uygulamanın yapılmadığı normal kontrol grubu deneklerinden elde edilen hipokampus doku kesitlerinde nöronlar, gliya hücreleri ve sinir liflerinde A β -40 immunreaktivitesi bulunmadığı tespit edildi (Şekil 48-A ve Şekil 48-B).



Şekil 48. Normal kontrol grubuna ait hipokampus dokusu kesitlerinde Aβ-40 immunreaktivitesi. A) Hipokampus doku kesitinde nöron perikaryonlarında (oklar) ve gliya hücrelerinde (ok başı) herhangi bir işaretleme görülmemektedir. Bar: 50 µm. B) Farklı denekten alınan kesitte nöron perikaryonlarında (oklar) ve gliya hücrelerinde (ok başı) herhangi bir pozitif immunreaktivite izlenmemektedir. Bar: 50 µm.

4.4.1.2. Sham Grubu

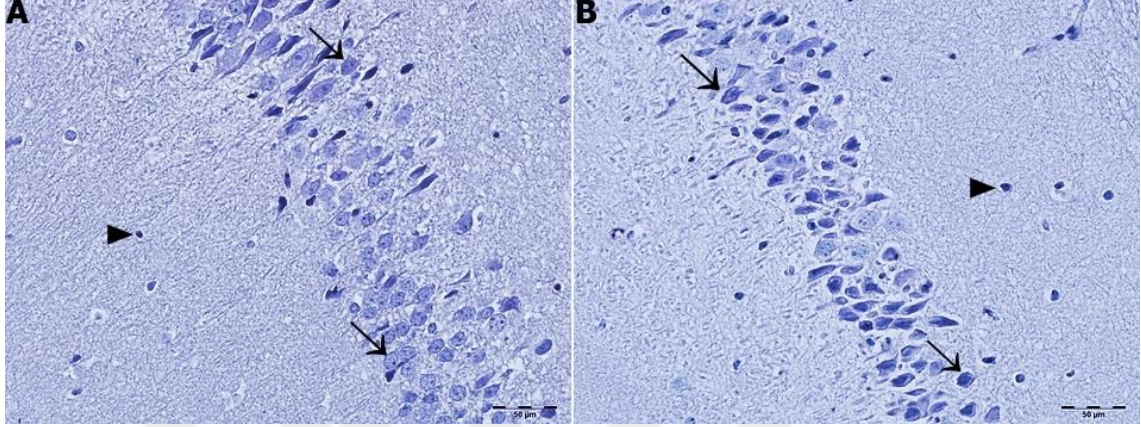
Yalnızca SF uygulanan deneklerden 28. ve 56. günlerde alınan hipokampus doku kesitlerinde nöronlarda, gliya hücrelerinde ve sinir liflerinde Aβ-40 immunreaktivitesi gözlenmedi (Şekil 49A ve Şekil 49B).



Şekil 49. Hipokampus sham grubunda Aβ-40 immunreaktivitesi. A) Hipokampusta 28. günde; nöronların perikaryonlarında (oklar) ve gliya hücrelerinde (ok başları) herhangi bir pozitif immunreaktivite görülmemektedir. Bar: 50 µm. B) Sham grubundan 56. günde alınan hipokampus kesitlerinde, 28. güne benzer şekilde nöronların perikaryonlarında ve gliya hücrelerinde Aβ-40 immunreaktivitesi izlenmemektedir. Bar: 50 µm.

4.4.1.3. TGF- β 1 Kontrol Grubu

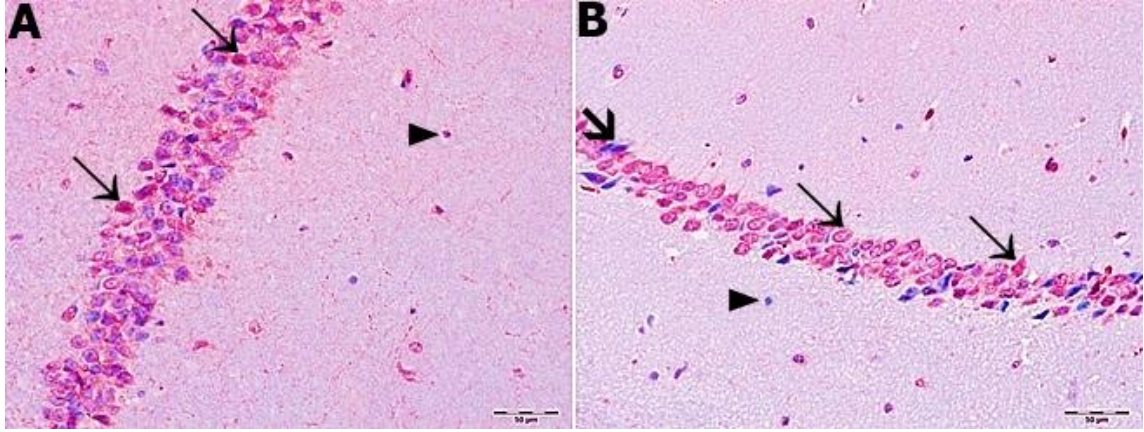
Yalnızca i.p. 2 μ g/gün TGF- β 1 uygulanan deneklerin 28. ve 56. günlerde alınan hipokampus doku kesitlerinde nöronlarda, gliya hücrelerinde ve sinir liflerinde A β -40 immunreaktivitesi gözlenmedi (Şekil 50A ve Şekil 50B).



Şekil 50. Yalnızca TGF- β 1 verilen grupta hipokampus kesitlerinde A β -40 immunreaktivitesi. A) Hipokampusta 28. günde nöronlarda (oklar) ve gliya hücrelerinde (ok başı) pozitif immunreaktivite görülmemektedir. Bar: 50 μ m. B) 56. günde alınan hipokampus doku kesitlerinde nöronlarda (oklar) ve gliya hücrelerinde (ok başı) A β -40 immunreaktivitesi gözlenmemektedir. Bar: 50 μ m.

4.4.1.4. Deney Grubu

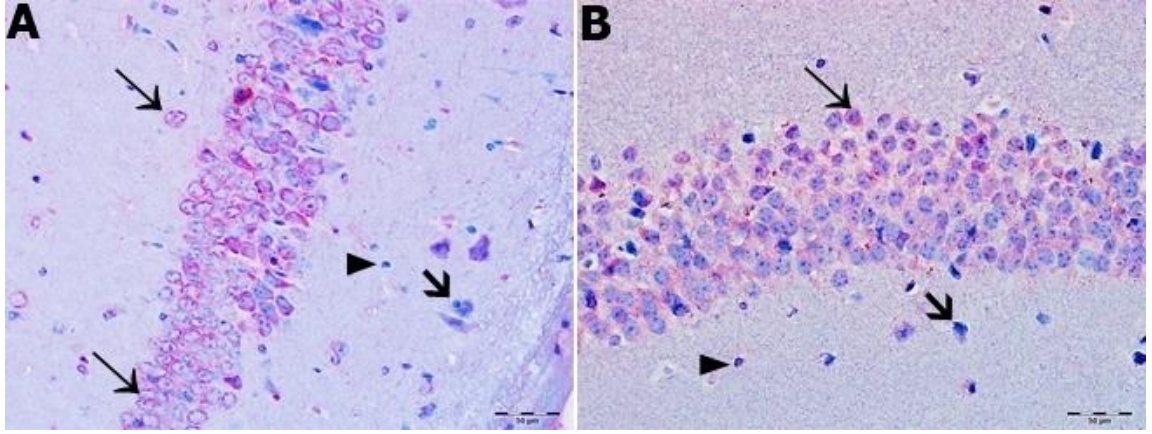
Yirmi sekiz gün boyunca i.p. 2 mg/kg skopolamin uygulanan deneklerden 28. günde alınan hipokampus doku kesitlerinde nöron perikaryonlarında güçlü A β -40 immünreaktivitesinin varlığı saptandı. Gliya hücrelerinde A β -40 işaretlenmesi zayıf olarak elde edildi. Aynı zamanda sinir liflerinde de immünreaktivite varlığı gözlemlendi (Şekil 51A). 56. günde alınan hipokampus doku kesitlerinde nöronlarda A β -40 işaretlenmesi belirgin olarak gözlemlendi. Gliya hücreleri ve sinir liflerinde A β -40 ekspresyonunun zayıf olduğu izlendi (Şekil 51B).



Şekil 51. Yirmi sekiz gün boyunca i.p. 2 mg/kg skopolamin uygulanan deney grubundan elde edilen hipokampus doku kesitlerinde Aβ-40 immunreaktivitesi. A) 28. günde nöronlarda (oklar) güçlü Aβ-40 immunreaktivitesi izlenmektedir. Gliya hücrelerinde (ok başları) zayıf immunreaktivite görülmektedir. Bar: 50 μm. B) 56. günde nöronlarda (oklar) pozitif immunreaktivite halen devam etmektedir. Ancak gliya hücrelerinde (ok başı), pozitif immunreaktivite oldukça zayıf izlenmektedir. Bazı nöronların perikaryonlarında (kalın ok) Aβ-40 immunreaktivitesinin oldukça zayıfladığı dikkati çekmektedir. Bar: 50 μm.

4.4.1.5. Tedavi-1 Grubu

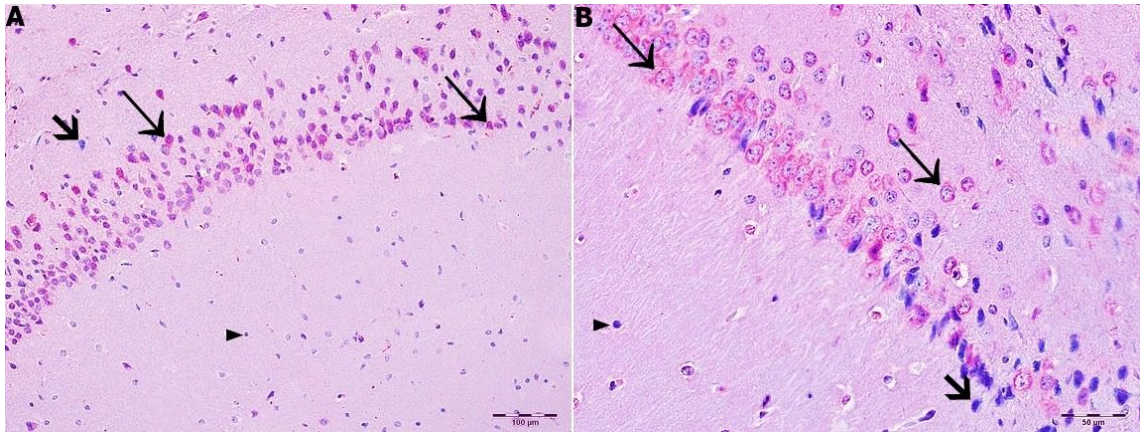
Yirmi sekiz gün boyunca 2 mg/kg skopolamin ile 2 μg/gün TGF-β1 tedavisi uygulanan deneklerden 28. günde alınan hipokampus doku kesitlerinde nöronlarda pozitif Aβ-40 immunreaktivitesi saptandı. Bununla birlikte bazı nöron perikaryonlarında Aβ-40 immunreaktivitesinin zayıf olduğu gözlemlendi. Aynı zamanda gliya hücreleri ve sinir liflerinde immunreaktivitenin minimal düzeyde olduğu izlendi (Şekil 52A). 56. günde alınan hipokampus doku kesitlerinde nöronlarda Aβ-40 işaretlenmesi zayıf pozitif olarak gözlemlendi. Aynı zamanda bazı nöronlarda immunreaktivitenin olmadığı saptandı. Gliya hücreleri ve sinir liflerinde Aβ-40 ekspresyonunun minimal düzeyde olduğu izlendi (Şekil 52B).



Şekil 52. Tedavi-1 grubunda hipoksmpute Aβ-40 immunreaktivitesi. A) 28. günde nöronlarda (oklar), immunreaktivitenin varlığı izlenmektedir. Gliya hücrelerinde (ok başı) ve bazı nöronlarda (kalın ok) immunreaktivitenin zayıfladığı görülmektedir. Bar: 50 μm. B) 56. günde bazı nöronlarda hafif immünreaktivite izlenirken (oklar), bazı nöronlarda (kalın ok) ve gliya hücrelerinde (ok başı) Aβ-40 immunreaktivitesinin azaldığı izlenmektedir. Bar: 50 μm.

4.4.1.6. Tedavi-2 Grubu

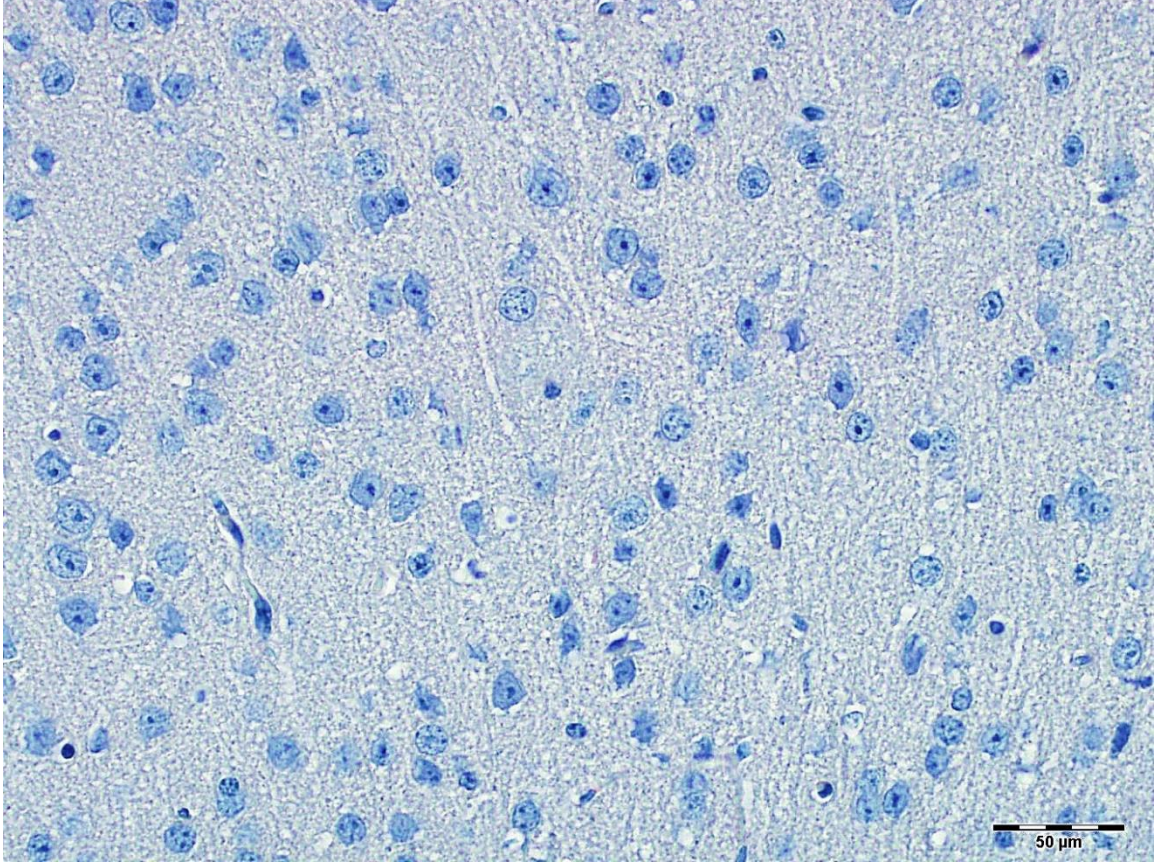
Yirmi sekiz gün boyunca skopolamin uygulamasının ardından, 28-56. günler arasında TGF-β1 uygulanan deneklerden 56. günde alınan Hipokampus doku kesitlerinde nöronlarda pozitif immunreaktivitenin varlığı gözlemlendi. Bununla birlikte bazı nöronlarda immunreaktivitenin minimal düzeyde olduğu saptandı. Gliya hücreleri ve sinir liflerinde Aβ-40 işaretlenmesinin zayıf olduğu izlendi (Şekil 53A ve Şekil 53B).



Şekil 53. Tedavi-2 grubunda hipokampuste Aβ-40 immunreaktivitesi. A) 56. günde; nöronlarda (oklar) pozitif immunreaktivitenin varlığı izlenmektedir. Ancak bazı nöronlarda (kalın ok) ve gliya hücrelerinde (ok başı) immunreaktivite oldukça zayıf görülmektedir. Bar: 100 μm. B) Yüksek büyütmede nöronlarda (kalın oklar) ve gliya hücrelerinde (ok başı), Aβ-40 immunreaktivitesinin azaldığı izlenmektedir. İnce ok: pozitif immünreaktivite. Bar: 50 μm.

4.4.2. Prefrontal Korteks A β -40 İmmunohistokimyası

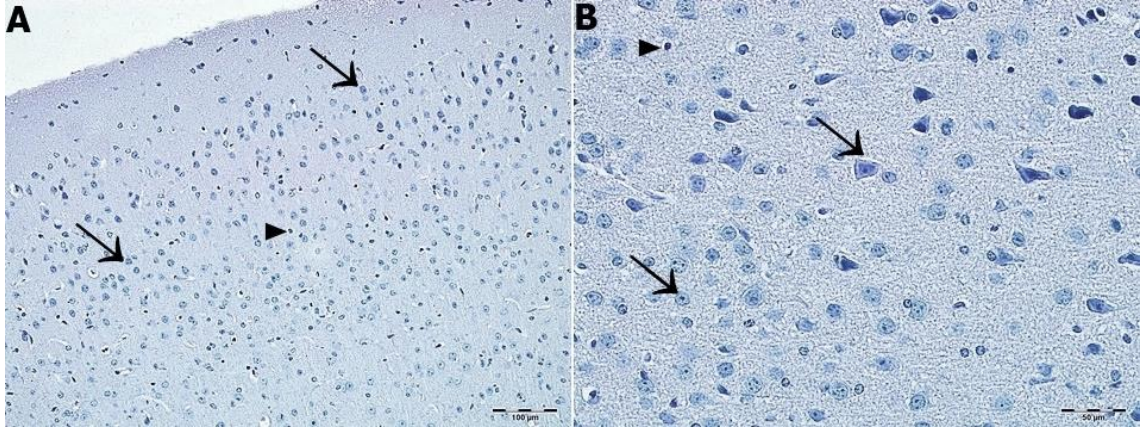
Prefrontal korteks dokusundan alınan kesitte, negatif kontrol amacıyla primer antikor damlatılmayan kesitlerde nöronlarda, gliya hücrelerinde ve sinir liflerinde A β -40 immunreaktivitesi görülmedi (Şekil 54).



Şekil 54. Negatif kontrol. A β -40 için, primer antikor damlatılmamış prefrontal korteks kesitinde herhangi bir işaretlemenin olmadığı görülmektedir. Bar: 50 μ m.

4.4.2.1. Kontrol Grubu

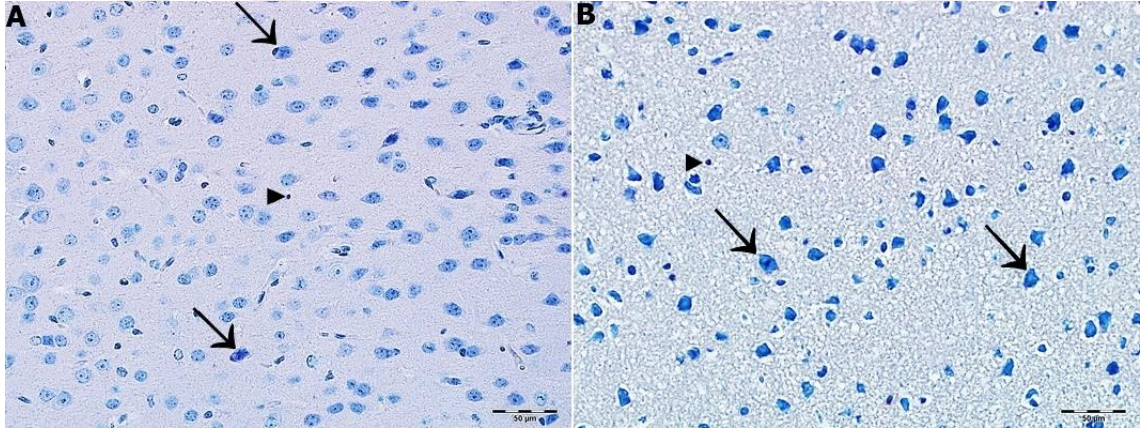
Herhangi bir uygulamanın yapılmadığı normal kontrol grubu deneklerinden elde edilen prefrontal korteks doku kesitlerinde nöronlar, gliya hücreleri ve sinir liflerinde A β -40 immunreaktivitesi bulunmadığı saptandı (Şekil 55A ve Şekil 55B).



Şekil 55. Normal kontrol grubuna ait prefrontal korteks dokusu kesitlerinde A β -40 immunreaktivitesi. A) Prefrontal korteks doku kesitinde nöron perikaryonlarında (oklar) ve gliya hücrelerinde (ok başı) herhangi bir işaretleme görülmemektedir. Bar: 100 μ m. B) Yüksek büyütmede nöron perikaryonlarında (oklar) herhangi bir pozitif immunreaktivite izlenmemektedir. Bar: 50 μ m.

4.4.2.2. Sham Grubu

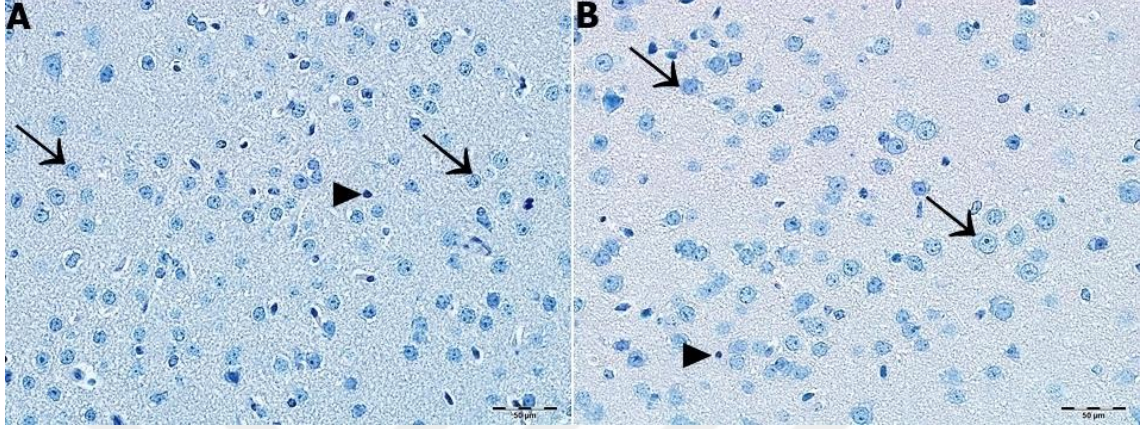
Yalnızca SF uygulanan deneklerden 28. ve 56. günlerde alınan prefrontal korteks doku kesitlerinde nöronlarda, gliya hücrelerinde ve sinir liflerinde A β -40 immunreaktivitesi tespit edilmedi (Şekil 56A ve Şekil 56B).



Şekil 56. Sham grubunda prefrontal korteks A β -40 immunreaktivitesi. A) 28. günde; nöronlarda (oklar) ve gliya hücrelerinde (ok başı) herhangi bir pozitif immunreaktivite görülmemektedir. Bar: 50 μ m. B) 56. günde nöronlarda (oklar) ve gliya hücrelerinde (ok başı) A β -40 immunreaktivitesi izlenmemektedir. Bar: 50 μ m.

4.4.2.3. TGF- β 1 Grubu

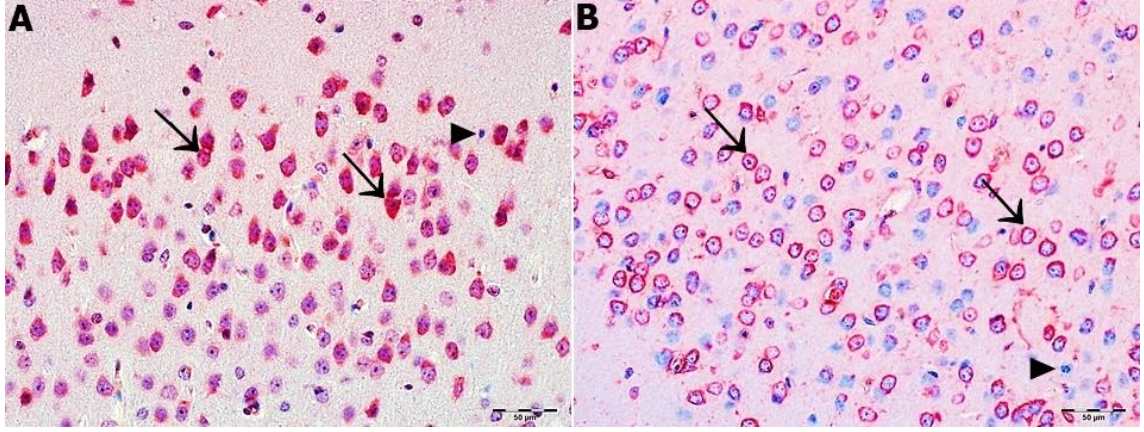
Yalnızca i.p. 2 μ g/gün TGF- β 1 uygulanan deneklerin 28. ve 56. günlerde alınan prefrontal korteks doku kesitlerinde nöronlarda, gliya hücrelerinde ve sinir liflerinde A β -40 immünreaktivitesi tespit edilmedi (Şekil 57A ve Şekil 57B).



Şekil 57. TGF- β 1 grubu prefrontal korteks A β -40 immünreaktivitesi. A) 28.günde nöronlarda (oklar) ve gliya (ok başı) hücrelerinde A β -40 pozitif immünreaktivitesi görülmemektedir. Bar: 50 μ m. B) 56. günde nöronlarda (oklar) ve gliya hücrelerinde (ok başı) herhangi bir pozitif immünreaktivite izlenmemektedir. Bar: 50 μ m.

4.4.2.4. Deney Grubu

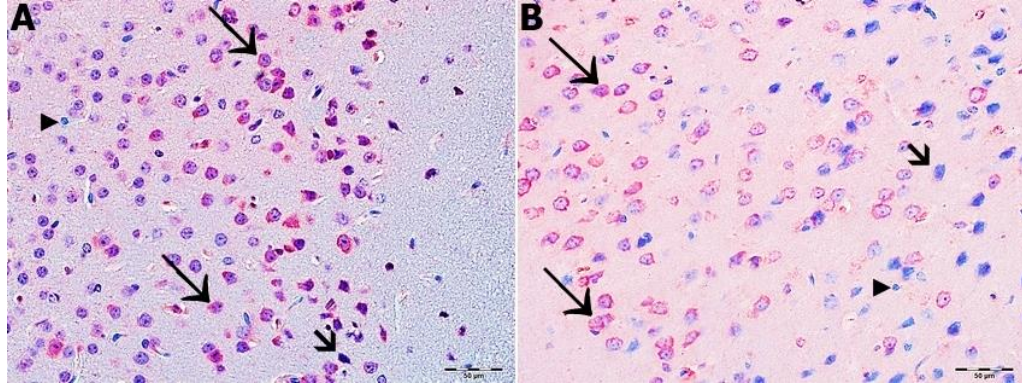
Yirmi sekiz gün boyunca i.p. 2 mg/kg skopolamin uygulanan deneklerden 28. günde alınan prefrontal korteks doku kesitlerinde nöronlarda güçlü A β -40 immünreaktivitesinin varlığı gözlemlendi. Gliya hücrelerinde A β -40 immünreaktivitesinin zayıf olduğu tespit edildi. Aynı zamanda sinir liflerinde de immünreaktivite varlığı gözlemlendi (Şekil 58A). 56. günde alınan prefrontal korteks doku kesitlerinde nöronlarda A β -40 işaretlenmesi belirgin olarak gözlemlendi. Bununla birlikte bazı nöronlarda, gliya hücreleri ve sinir liflerinde A β -40 işaretlenmesinin minimal düzeyde olduğu izlendi (Şekil 58B).



Şekil 58. Yirmi sekiz gün boyunca i.p. 2 mg/kg skopolamin uygulanan deney grubundan elde edilen prefrontal korteks doku kesitlerinde A β -40 immunreaktivitesi. A) 28. günde nöronlarda (oklar) güçlü A β -40 immunreaktivitesi izlenmektedir. Gliya hücrelerinde (ok başları) ve sinir liflerinde zayıf immunreaktivite görülmektedir. Bar: 50 μ m. B) 56. günde nöronlarda (oklar) pozitif immunreaktivite halen devam etmektedir. Ancak gliya hücrelerinde (ok başı) pozitif immunreaktivite oldukça zayıf izlenmektedir. Bar: 50 μ m.

4.4.2.5. Tedavi-1 Grubu

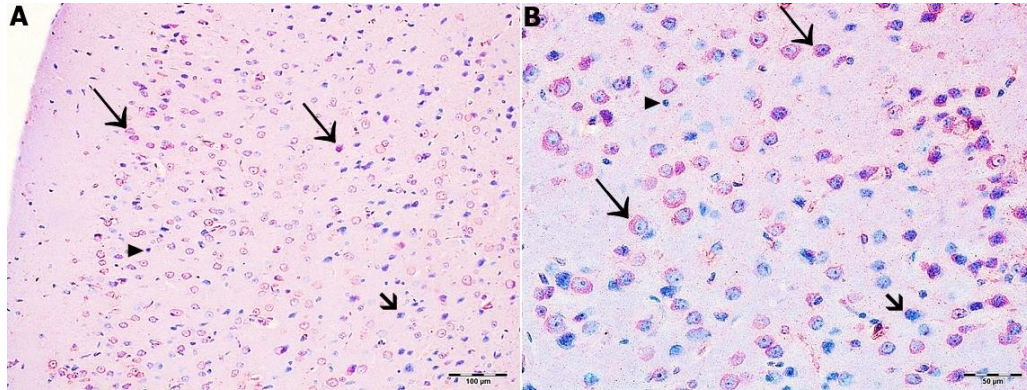
Yirmi sekiz gün boyunca 2 mg/kg skopolamin ve 2 μ g/gün TGF- β 1 tedavisi uygulanan deneklerden 28. günde alınan prefrontal korteks doku kesitlerinde nöronlarda pozitif A β -40 immunreaktivitesi gözlemlendi. Bazı nöronlarda A β -40 immunreaktivitesinin zayıf olduğu saptandı. Aynı zamanda gliya hücreleri ve sinir liflerinde immunreaktivitenin minimal düzeyde olduğu izlendi (Şekil 59A). 56. günde alınan prefrontal korteks doku kesitlerinde nöronlarda A β -40 immunreaktivitesi gözlemlendi. Bununla birlikte bazı nöronlarda immunreaktivite minimal düzeyde izlendi. Gliya hücreleri ve sinir liflerinde A β -40 immunreaktivitesinin olmadığı tespit edildi (Şekil 59B).



Şekil 59. Tedavi-1 grubunda prefrontal korteks A β -40 immunreaktivitesi. A) 28. günde; bazı nöronlarda (ince oklar) immunreaktivite belirgin olarak görülmekteyken bazı nöronlarda (kalın ok) işaretleme zayıf derecede izlenmektedir. Gliya hücrelerinde (ok başı) immunreaktivitenin zayıf olduğu izlenmektedir. Bar: 50 μ m. B) 56. günde nöronlarda (ince oklar) immunreaktivite belirginken bazı nöronlarda (kalın ok) ve gliya hücrelerinde (ok başı) A β -40 immunreaktivitesinin azaldığı görülmektedir. Bar: 50 μ m.

4.4.2.6. Tedavi-2 Grubu

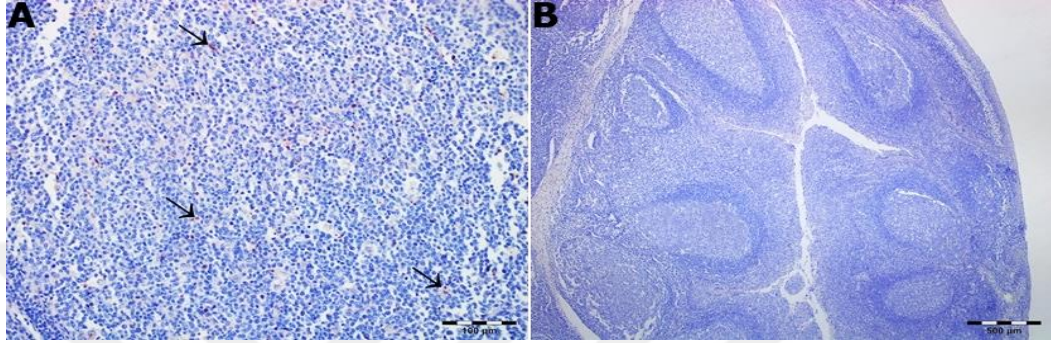
Yirmi sekiz gün boyunca skopolamin uygulamasının ardından, 28-56. günler arasında TGF- β 1 uygulanan deneklerden 56. günde alınan prefrontal korteks doku kesitlerinde nöronlarda A β -40 işaretlenmesinin varlığı tespit edildi. Aynı zamanda bazı nöronlarda immunreaktivitenin çok zayıf olduğu tespit edildi. Gliya hücreleri ve sinir liflerinde A β -40 işaretlenmesinin minimal düzeyde varlığı izlendi (Şekil 60A ve Şekil 60B).



Şekil 60. Tedavi-2 grubunda prefrontal korteks A β -40 immunreaktivitesi. A) 56. günde nöronlarda (ince oklar) pozitif immünreaktivitenin varlığı izlenmektedir. Bazı nöronlarda (kalın ok) ve gliya hücrelerinde (ok başı) immunreaktivitenin minimal düzeyde olduğu görülmektedir. Bar: 100 μ m. B) Yüksek büyütmede, bazı nöronlarda (ince oklar) pozitif immunreaktivite izlenirken, bazı nöronlarda (kalın ok) ve gliya hücrelerinde (ok başı) A β -40 immunreaktivitesinin azaldığı izlenmektedir. Bar: 50 μ m.

4.4.3. Hipokampus Kaspaz-3 İmmunohistokimyası

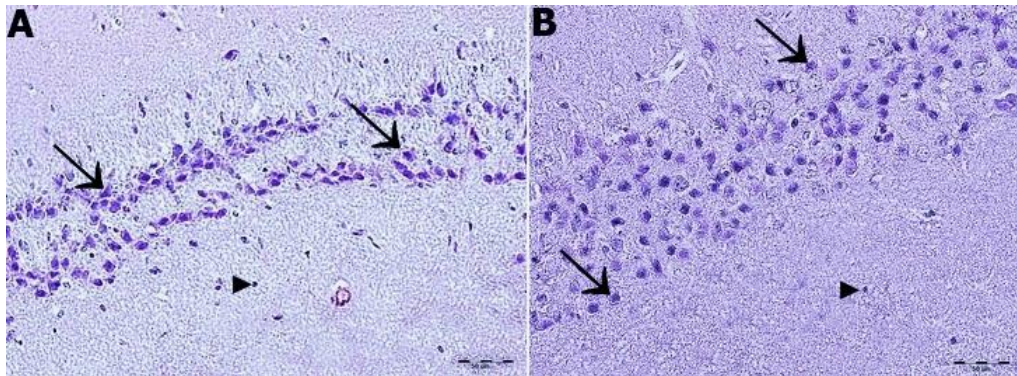
Pozitif kontrol amacıyla primer antikor damlatılan tonsilla palatina kesitinde Kaspaz-3 immünreaktivitesi saptandı (Şekil 61A). Negatif kontrol amacıyla primer antikor damlatılmayan tonsilla palatina kesitlerinde kaspaz-3 immünreaktivitesi izlenmedi (Şekil 61B).



Şekil 61. Kaspaz-3 immünreaktivitesi. A) Pozitif kontrol. Tonsilla palatinada belirgin kaspaz-3 immunoreaktivitesi görülmektedir (Oklar). Bar: 100 µm. B) Negatif kontrol. Kaspaz-3 primer antikoru damlatılmayan tonsilla palatina kesitinde herhangi bir immünreaktivitenin olmadığı görülmektedir. Bar= 500 µm.

4.4.3.1. Kontrol Grubu

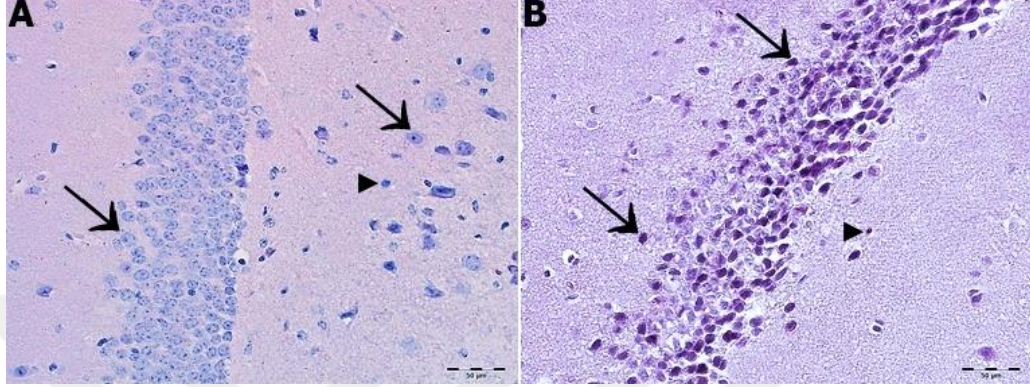
Herhangi bir uygulamanın yapılmadığı kontrol grubu deneklerinden elde edilen hipokampus doku kesitlerinde, nöronlar, gliya hücreleri ve sinir liflerinde herhangi bir kaspaz-3 pozitif immünreaktivitesi gözlenmedi (Şekil 62A ve Şekil 62B).



Şekil 62. Kontrol grubuna ait hipokampus doku kesitinde kaspaz-3 immünreaktivitesi. A) Nöronlarda (oklar) ve gliya hücrelerinde (ok başı) herhangi bir pozitif immünreaktivite görülmemektedir. Bar: 50 µm. B) Kontrol grubuna ait farklı denekten elde edilen fotomikrografta, nöronlar (oklar) ve gliya hücrelerinde (ok başı) herhangi bir kaspaz-3 immünreaktivitesi izlenmemektedir. Bar: 50 µm.

4.4.3.2. Sham Grubu

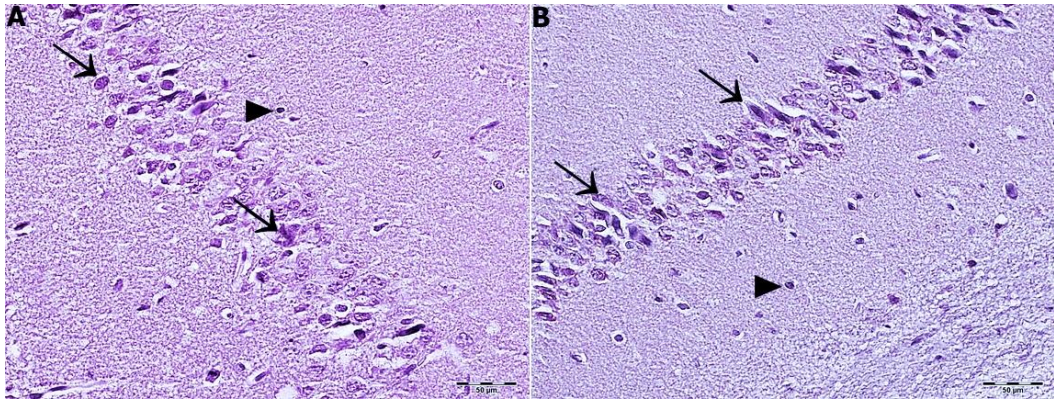
Yalnızca SF uygulanan deneklerden 28 ve 56. günlerde alınan hipokampus doku kesitlerinde nöronlarda, gliya hücrelerinde ve sinir liflerinde kaspaz-3 immunreaktivitesi tespit edilmedi (Şekil 63A ve Şekil 63B).



Şekil 63. Sham grubuna ait hipokampus doku kesitinde kaspaz-3 immunreaktivitesi. A) 28. günde nöronlarda (oklar) ve gliya hücrelerinde (ok başı) herhangi bir pozitif immunreaktivite görülmemektedir. Bar: 50 µm. B) 56. günde nöronlarda (oklar) ve gliya hücrelerinde (ok başı) kaspaz-3 immunreaktivitesi izlenmemektedir. Bar: 50 µm.

4.4.3.3. TGF-β1 Kontrol Grubu

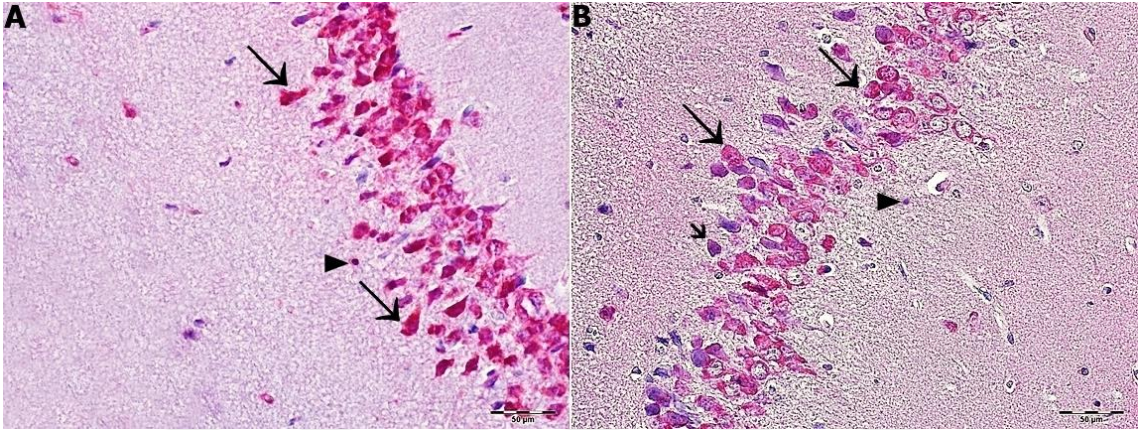
Yalnızca i.p. 2 µg/gün TGF-β1 uygulanan deneklerin 28. ve 56. günlerde alınan hipokampus doku kesitlerinde nöronlarda, gliya hücrelerinde ve sinir liflerinde kaspaz-3 immunreaktivitesi izlenmedi (Şekil 64A ve Şekil 64B).



Şekil 64. TGF-β1 grubuna ait hipokampus doku kesitinde kaspaz-3 immunreaktivitesi. A) 28. günde nöronlarda (oklar) ve gliya hücrelerinde (ok başı) immunreaktivite izlenmemektedir. Bar: 50 µm. B) 56. günde, nöronlarda (oklar) ve gliya hücrelerinde (ok başı) pozitif kaspaz-3 immunreaktivitesi görülmemektedir. Bar: 50 µm.

4.4.3.4. Deney Grubu

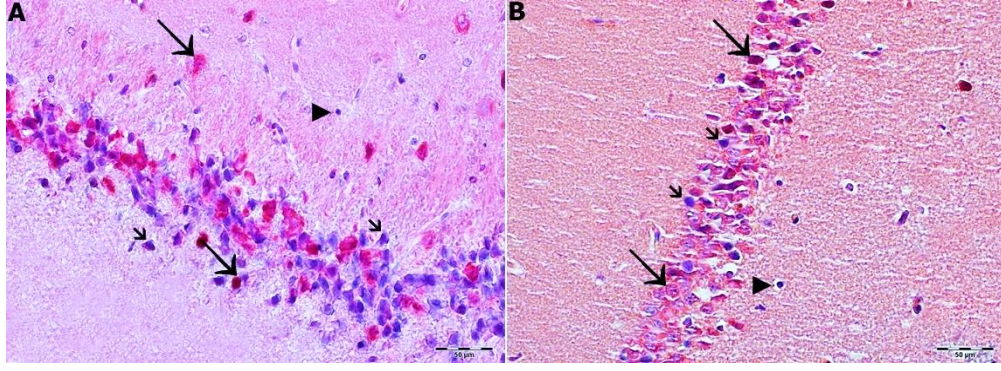
Yirmi sekiz gün boyunca i.p. 2 mg/kg skopolamin uygulanan deneklerden 28. günde alınan hipokampus doku kesitlerinde nöronlarda güçlü pozitif kaspaz-3 immünreaktivitesi gözlemlendi. Gliya hücrelerinde kaspaz-3 immünreaktivitesinin varlığı saptandı (Şekil 65A). 56. günde alınan hipokampus doku kesitlerinde nöronlarda, kaspaz-3 işaretlenmesi gözlemlendi. Bazı nöronlarda ve gliya hücrelerinde kaspaz-3 immünreaktivitesinin azaldığı tespit edildi (Şekil 65B).



Şekil 65. Deney grubuna ait hipokampus doku kesitinde kaspaz-3 immünreaktivitesi. A) 28. günde nöronlarda (oklar) güçlü pozitif kaspaz-3 immünreaktivitesi izlenmektedir. Gliya hücrelerinde (ok başı) pozitif kaspaz-3 immünreaktivitesi görülmektedir. Bar: 50 µm. B) 56. günde bazı nöronlarda (ince oklar) pozitif kaspaz-3 immünreaktivitesi görülürken, bazı nöronlarda zayıf immünreaktivite (kalın ok) gözlenmektedir. Gliya hücrelerinde (ok başı) immünreaktivitenin nispeten zayıf olduğu izlenmektedir. Bar: 50 µm.

4.4.3.5. Tedavi-1 Grubu

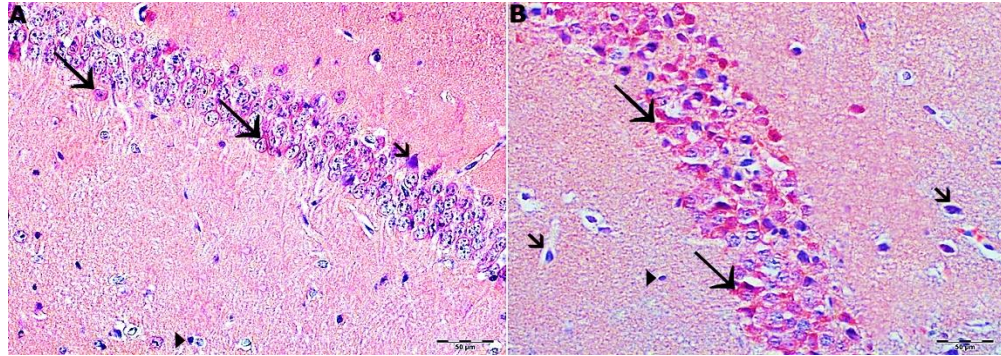
Yirmi sekiz gün boyunca 2 mg/kg skopolamin ve 2 µg/gün TGF-β1 tedavisi uygulanan deneklerden 28. günde alınan hipokampus doku kesitlerinde nöronlarda pozitif kaspaz-3 immünreaktivitesi gözlemlendi. Bazı nöronlarda kaspaz-3 immünreaktivitesinin zayıf olduğu saptandı. Gliya hücrelerinde immünreaktivitenin minimal düzeyde olduğu tespit edildi (Şekil 66A). 56. günde alınan prefrontal korteks doku kesitlerinde nöronlarda kaspaz-3 immünreaktivitesi gözlemlendi. Bazı nöronlarda immünreaktivitenin zayıf olduğu izlendi. Gliya hücrelerinde kaspaz-3 immünreaktivitesinin 28. güne benzer şekilde minimal düzeyde olduğu tespit edildi (Şekil 66B).



Şekil 66. Tedavi-1 grubuna ait hipokampus doku kesitinde kaspaz-3 immunreaktivitesi. A) 28. günde, nöronlarda (ince oklar) kaspaz-3 immunreaktivitesi gözlenmektedir. Bazı nöronlarda (kalın ok) ve gliya hücrelerinde (ok başları) immunreaktivite oldukça zayıf şekilde izlenmektedir. Bar: 50 µm. B) 56. günde, bazı nöronlarda (ince oklar) pozitif kaspaz-3 immunreaktivitesi halen görülmektedir. Bazı nöronlarda zayıf immunreaktivite (kalın oklar) izlenmektedir. Gliya hücrelerinde (ok başı), immunreaktivitenin oldukça minimal düzeyde olduğu gözlenmektedir. Bar: 50 µm

4.4.3.6. Tedavi-2 Grubu

Yirmi sekiz gün boyunca Skopolamin uygulamasının ardından, 28-56. günler arasında TGF-β1 uygulanan deneklerden 56. günde alınan hipokampus doku kesitlerinde nöronlarda pozitif kaspaz-3 immunreaktivitesinin varlığı görüldü. Bazı nöronlarda immunreaktivitenin minimal düzeyde olduğu saptandı. Gliya hücrelerinde kaspaz-3 işaretlenmesinin zayıf olduğu izlendi (Şekil 67A ve Şekil 67B).

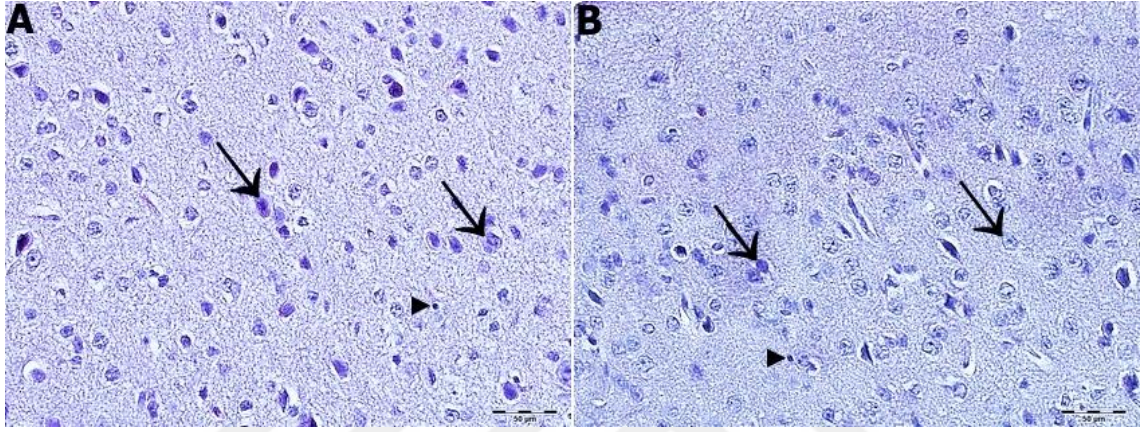


Şekil 67. Tedavi-2 grubu hipokampus doku kesitinde kaspaz-3 immunreaktivitesi. A) 56. günde nöronlarda (ince oklar) pozitif kaspaz-3 immunreaktivitesi görülürken, bazı nöronların perikaryonlarında immunreaktivite (kalın ok) oldukça zayıf izlenmektedir. Gliya hücrelerinde (ok başı) immunreaktivite oldukça düşük görülmektedir. Bar: 50 µm. B) Aynı gruptaki farklı bir denekte 56. günde nöronlarda (ince oklar) pozitif kaspaz-3 immunreaktivitesi görülürken, bazı nöron perikaryonunda zayıf immunreaktivite (kalın ok) izlenmektedir. Gliya hücrelerinde (ok başı) immunreaktivitenin oldukça zayıf olduğu gözlenmektedir. Bar: 50 µm.

4.4.4 Prefrontal Korteks Kaspaz-3 İmmunreaktivitesi

4.4.4.1. Kontrol Grubu

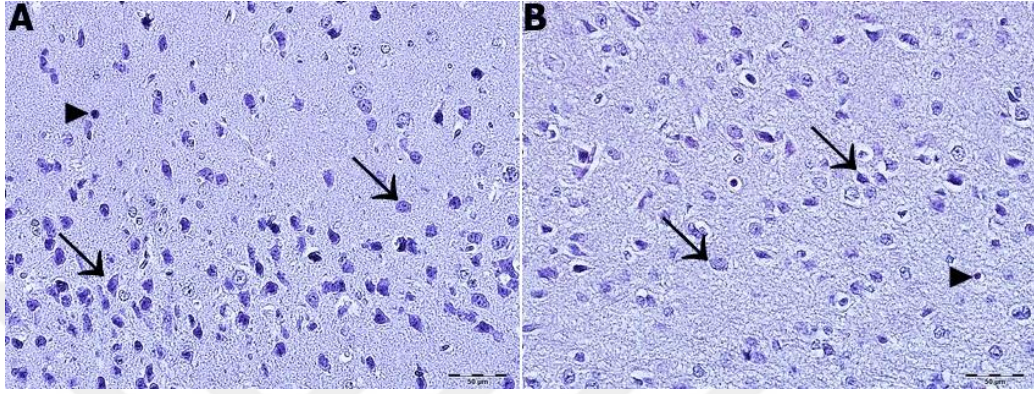
Herhangi bir uygulamanın yapılmadığı kontrol grubu deneklerinden elde edilen prefrontal korteks doku kesitlerinde, nöronlar ve gliya hücrelerinde kaspaz-3 pozitif immünreaktivitesi gözlenmedi (Şekil 68A ve Şekil 68B).



Şekil 68. Kontrol grubu prefrontal korteks kaspaz-3 immünreaktivitesi. A) Nöronlarda (oklar) ve gliya hücrelerinde (ok başı) herhangi bir pozitif immünreaktivite görülmemektedir. Bar: 50 µm. B) Kontrol grubuna ait farklı denekten elde edilen fotomikrografta, nöronlarda (oklar) ve gliya hücrelerinde (ok başı) herhangi bir kaspaz-3 immünreaktivitesi izlenmemektedir. Bar: 50 µm.

4.4.4.2. Sham Grubu

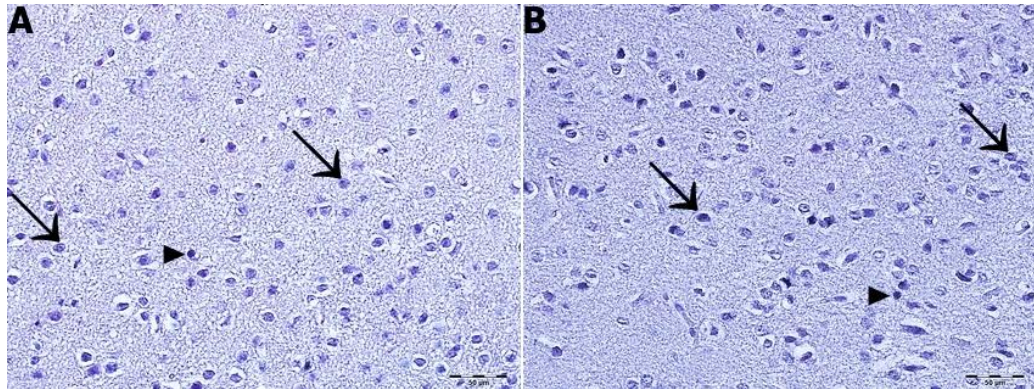
Yalnızca SF uygulanan deneklerden 28 ve 56. günlerde alınan prefrontal korteks doku kesitlerinde nöronlarda, gliya hücrelerinde ve sinir liflerinde kaspaz-3 immunreaktivitesi tespit edilmedi (Şekil 69A ve Şekil 69B).



Şekil 69. Sham grubu prefrontal korteks kaspaz-3 immunreaktivitesi. A) 28. günde nöronlarda (oklar) ve gliya hücrelerinde (ok başı) herhangi bir pozitif immunreaktivite görülmemektedir. Bar: 50 µm. B) 56. günde 28. güne benzer şekilde nöronlarda (oklar) ve gliya hücrelerinde (ok başı) pozitif kaspaz-3 immunreaktivitesi izlenmemektedir. Bar: 50 µm.

4.4.4.3. TGF-β1 Kontrol Grubu

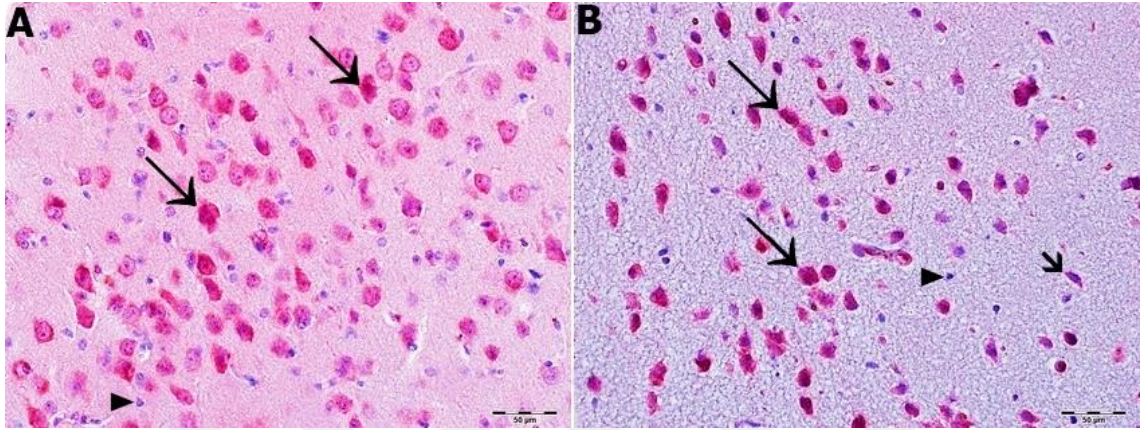
Yalnızca i.p. 2 µg/gün TGF-β1 uygulanan deneklerin 28. ve 56. günlerde alınan prefrontal korteks doku kesitlerinde nöronlarda, gliya hücrelerinde ve sinir liflerinde kaspaz-3 immunreaktivitesi izlenmedi (Şekil 70A ve Şekil 70B).



Şekil 70. TGF-β1 kontrol grubu prefrontal korteks kaspaz-3 immunreaktivitesi. A) 28. günde nöronlarda (oklar) ve gliya hücrelerinde (ok başı) herhangi bir pozitif immunreaktivite izlenmemektedir. Bar: 50 µm. B) 56. günde nöronlarda (oklar) ve gliya hücrelerinde (ok başı) pozitif kaspaz-3 immunreaktivitesi görülmemektedir. Bar: 50 µm.

4.4.4.4. Deney Grubu

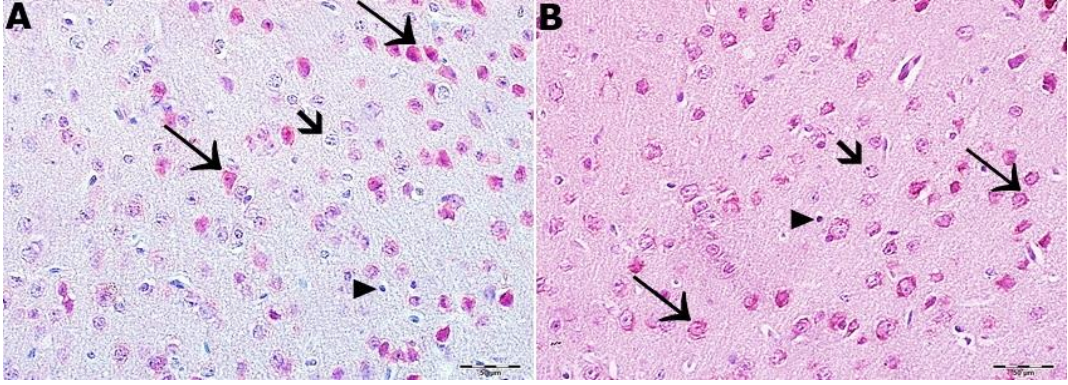
Yirmi sekiz gün boyunca i.p. 2 mg/kg skopolamin uygulanan deneklerden 28. günde alınan prefrontal korteks doku kesitlerinde nöronlarda güçlü pozitif kaspaz-3 immünreaktivitesi izlendi. Gliya hücrelerinde kaspaz-3 immünreaktivitesinin zayıf pozitif işaretlenmesi saptandı (Şekil 71A). 56. günde alınan prefrontal korteks doku kesitlerinde nöronlarda, kaspaz-3 immünreaktivitesi gözlemlendi. Gliya hücrelerinde kaspaz-3 immünreaktivitesinin azaldığı tespit edildi (Şekil 71B).



Şekil 71. Deney grubunda prefrontal korteks kaspaz-3 immünreaktivitesi. A) 28. günde; nöronlarda (ince oklar) güçlü pozitif kaspaz-3 immünreaktivitesi izlenmektedir. Gliya hücrelerinde (ok başı) nispeten daha zayıf immünreaktivite görülmektedir. Bar: 50 µm. B) 56. günde alınan nöronlarda (ince oklar) pozitif kaspaz-3 immünreaktivitesi halen görülürken, bazı nöronlarda zayıf immünreaktivite (kalın ok) izlenmektedir. Gliya hücrelerinde (ok başı), immünreaktivitenin zayıf olduğu izlenmektedir. Bar: 50 µm.

4.4.4.5. Tedavi-1 Grubu

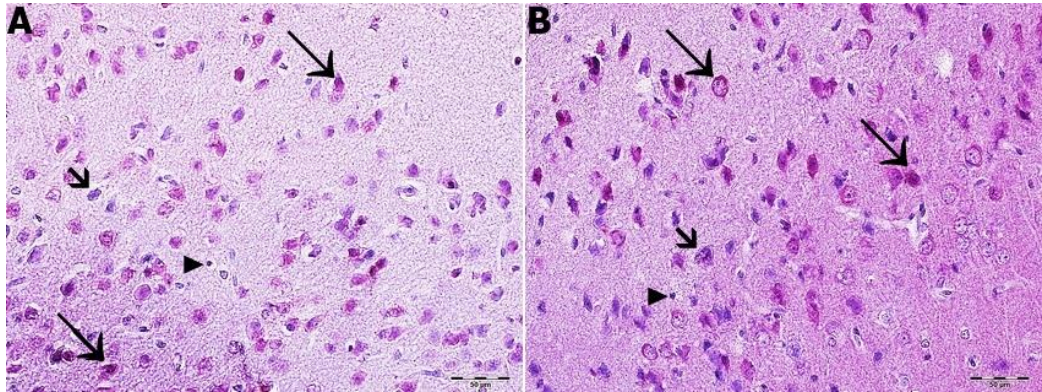
Yirmi sekiz gün boyunca 2 mg/kg skopolamin ve 2 µg/gün TGF-β1 tedavisi uygulanan deneklerden 28. günde alınan prefrontal korteks doku kesitlerinde nöronlarda pozitif kaspaz-3 immünreaktivitesi gözlemlendi. Bazı nöronlarda kaspaz-3 immünreaktivitesinin zayıf olduğu saptandı. Gliya hücrelerinde immünreaktivitenin minimal düzeyde olduğu izlendi (Şekil 72A). 56. günde alınan prefrontal korteks doku kesitlerinde nöronlarda kaspaz-3 immünreaktivitesi tespit edildi. Bazı nöronlarda ve gliya hücrelerinde kaspaz-3 immünreaktivitesinin zayıf olduğu gözlemlendi (Şekil 72B).



Şekil 72. Tedavi-1 grubu prefrontal korteks kaspaz-3 immunreaktivitesi. A) 28. günde nöronlarda (ince oklar) kaspaz-3 immunreaktivitesi izlenmektedir. Bazı nöronlarda (kalın ok) ve gliya hücrelerinde (ok başları) immunreaktivite minimal düzeyde gözlenmektedir. Bar: 50 µm. B) 56. günde nöronlarda (ince oklar) kaspaz-3 immunreaktivitesi izlenmektedir. Bazı nöronlarda zayıf immunreaktivite (kalın oklar) görülmektedir. Gliya hücrelerinde (ok başı) immunreaktivitenin oldukça zayıf olduğu izlenmektedir. Bar: 50 µm.

4.4.4.6. Tedavi-2 Grubu

Yirmi sekiz gün boyunca skopolamin uygulamasının ardından, 28-56. günler arasında TGF-β1 uygulanan deneklerden 56. günde alınan prefrontal korteks doku kesitlerinde nöronlarda pozitif kaspaz-3 immunreaktivitesinin varlığı görüldü. Bazı nöronlarda immunreaktivitenin minimal düzeyde olduğu gözlemlendi. Gliya hücrelerinde kaspaz-3 işaretlenmesinin zayıf olduğu saptandı (Şekil 73A ve Şekil 73B).

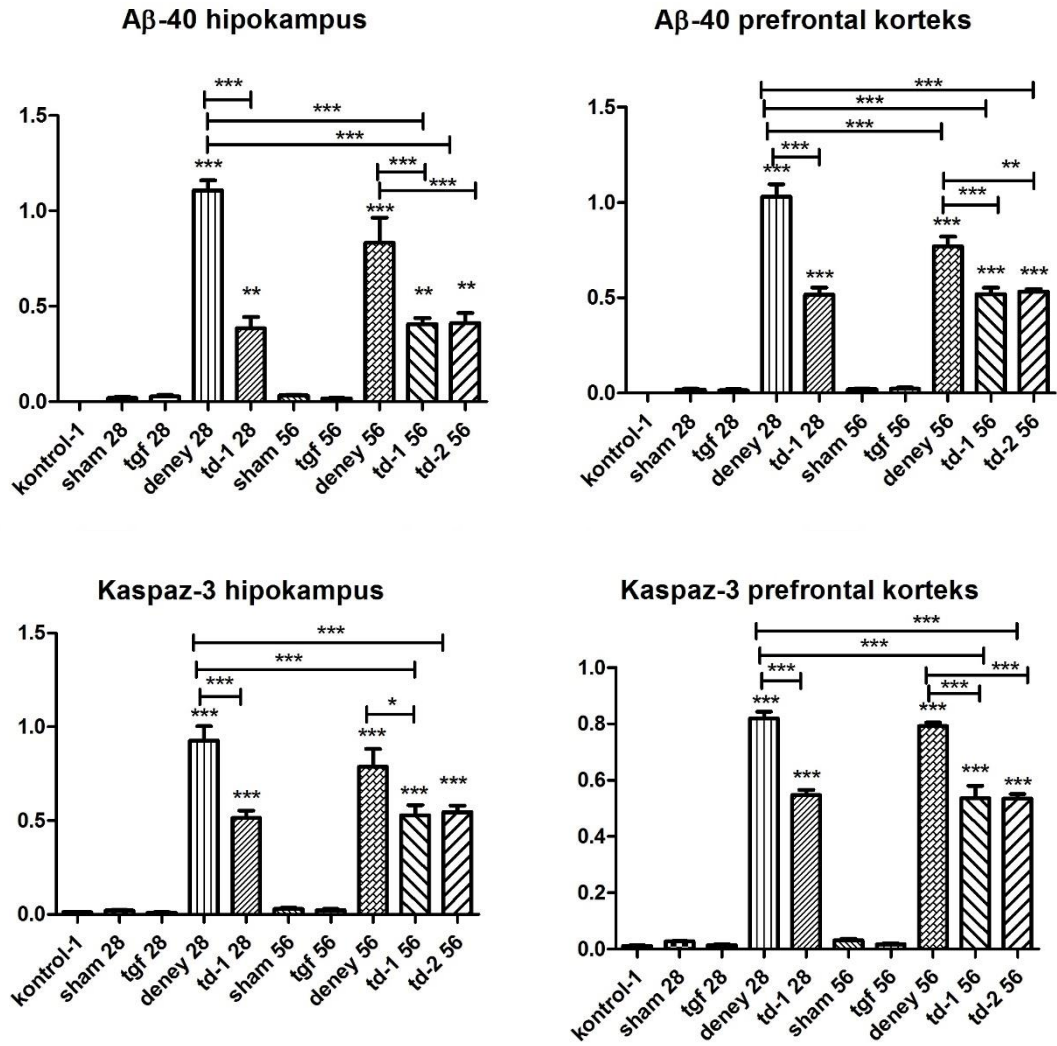


Şekil 73. Tedavi-2 grubunda prefrontal korteks kaspaz-3 immunreaktivitesi. A) 56. günde nöronlarda (ince oklar) pozitif kaspaz-3 immunreaktivitesi görülürken, bazı nöronların perikaryonlarında immunreaktivite (kalın ok) zayıf izlenmektedir. Gliya hücrelerinde (ok başı) immunreaktivite minimal düzeyde gözlenmektedir. Bar: 50 µm. B) Aynı gruptan alınan farklı denekte bazı nöronlarda (ince oklar) kaspaz-3 immunreaktivitesi izlenirken, bazı nöronlarda (kalın ok) zayıf ve gliya hücrelerinde (ok başı) immunreaktivite minimal düzeyde gözlenmektedir. Bar: 50 µm.

4.4.5. İmmunohistokimyasal Bulguların İstatistiksel Değerlendirmesi

Prefrontal korteks ve hipokampus nöronlarında A β -40 immunreaktivitesi istatistiksel olarak değerlendirildi. Yapılan değerlendirmede deney, kontrol, sham ve TGF- β 1 kontrol grupları arasında 28. günde anlamlı farkın olduğu tespit edildi. Tedavi-1 grubu ile deney grubu arasında 28. günde anlamlı farkın olduğu saptandı. 56. günde, deney grubu ile diğer tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farkın olduğu belirlendi. Deney grupları arasında 28. ve 56. günlerde ekspresyon düzeyinde azalma olmasına rağmen bu farkın anlamlı olmadığı tespit edildi. Hem hipokampus hem de prefrontal kortekste tedavi grupları açısından günler arasında anlamlı farkın olmadığı saptandı. Aynı zamanda her iki doku kesitinde tedavi-1 ve tedavi-2 grupları arasında da anlamlı farkın olmadığı belirlendi (Şekil 74).

Kaspaz-3 immunreaktivitesi açısından yapılan istatistiksel değerlendirmede prefrontal korteks ve hipokampus nöronlarında 28. günde deney grubu ile diğer tüm gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi. 56. günde hipokampus ve prefrontal korteks nöronlarında deney grubu ile diğer tüm gruplar arasında anlamlı farkın olduğu belirlendi. Her iki bölümde de deney gruplarının 28. ve 56. günleri arasında immunreeaktivitede azalma görülmesine rağmen, bu azalmanın anlamlı olmadığı tespit edildi (Şekil 74).



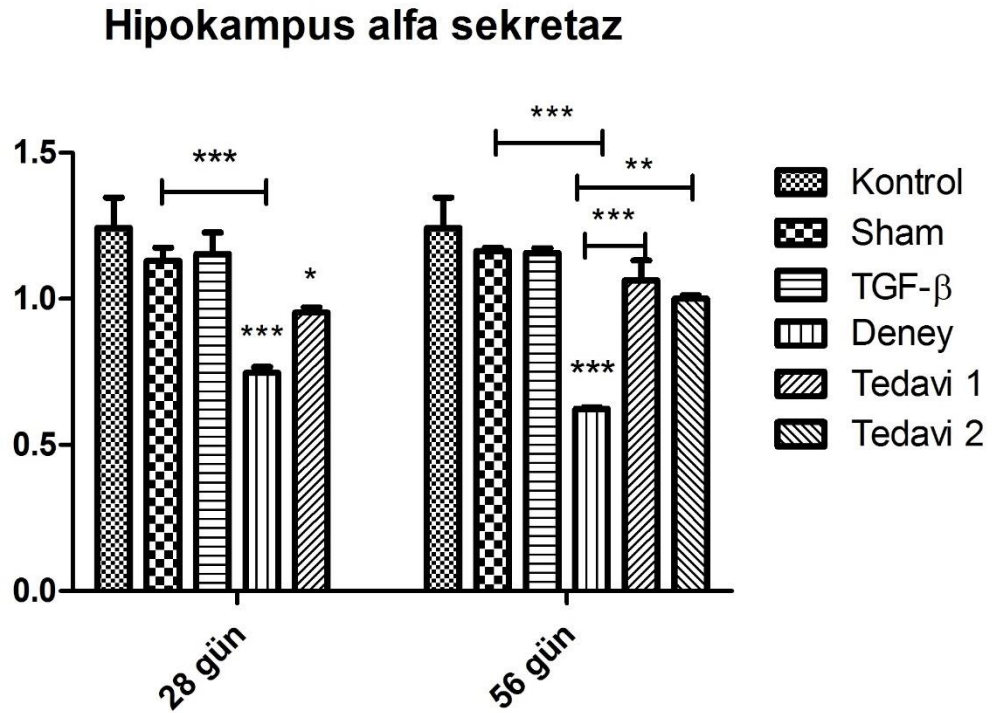
Şekil 74. Aβ-40 ve Kaspaz-3 için immunohistokimyasal Skorlama. *** P<0,0001, **P<0,001, *P<0,01

4.5. Biyokimyasal Bulgular

4.5.1. Hipokampus α-(Alfa) Sekretaz Analizi

Kontrol, sham, TGF-β1 kontrol, deney ve tedavi gruplarına ait deneklerden 28 ve 56. günlerde elde edilen hipokampus doku parçalarında, α-sekretaz enzim seviyeleri ölçüldü ve istatistiksel olarak değerlendirildi. 28. gündeki α-sekretaz enzim seviyelerine göre kontrol, sham ve TGF-β1 kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Bununla birlikte deney grubunda, kontrol, sham ve TGF-β1 kontrol gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi. Diğer taraftan kontrol ve tedavi-1 grubu arasındaki farkın anlamlı olduğu saptandı. Tedavi-1 grubu ile deney grubu arasında fark olmasına rağmen, farkın istatistiksel olarak anlamlı

olmadığı tespit edildi (Şekil 75). Yapılan değerlendirmede 56. günde de kontrol, sham ve TGF- β 1 kontrol grupları arasında α -sekretaz enzim seviyeleri açısından anlamlı bir fark bulunamazken, deney grubunun 56. günde α -sekretaz enzim seviyesinin anlamlı şekilde azaldığı görüldü. Ayrıca tedavi-1, tedavi-2, kontrol, sham ve TGF- β 1 kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmezken, deney grubu ile tedavi-1 ve tedavi-2 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farkın bulunduğu saptandı. Deney grubu ile diğer tüm gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı. Aynı zamanda hem 28. gün hem de 56. günlerde, tüm gruplar arasında yapılan ölçümlerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil 75).

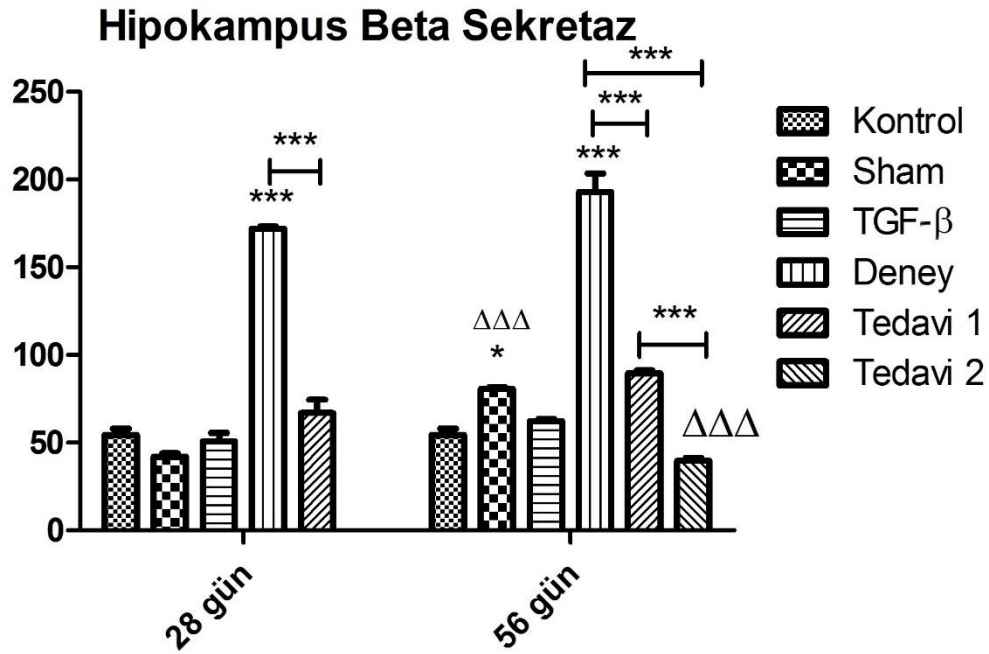


Şekil 75. Hipokampusta 28. ve 56. günlerde alfa sekretaz enzim seviyeleri. *** P<0,0001, **P<0,001, *P<0,01

4.5.2. Hipokampus β -(Beta) Sekretaz Analizi

Kontrol, sham, TGF- β 1 kontrol, deney ve tedavi gruplarına ait deneklerden 28. ve 56. günlerde elde edilen hipokampus doku parçalarında, β -sekretaz enzim seviyeleri ölçüldü ve istatistiksel olarak değerlendirildi. 28. gündeki β -sekretaz enzim seviyelerine göre kontrol, sham, TGF- β 1 kontrol ve tedavi-1 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Bununla birlikte deney grubu ile kontrol, sham, TGF- β 1

kontrol ve tedavi-1 grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı arttığı tespit edildi (Şekil 76). 56. günde kontrol ve sham grubu arasında anlamlı bir fark bulunurken, TGF- β 1 kontrol grubu ile bu gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi. 56. günde β -sekretaz enzim seviyesinin tüm diğer gruplara kıyasla anlamlı şekilde arttığı görüldü. Ayrıca tedavi-1 ve tedavi 2 gruplarında deney grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi. Tedavi-1 grubu ile tedavi-2 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu belirlendi. Tüm grupların 28. ve 56 gündeki verileri kıyaslandığında, 56. gün sham grubunun 28. güne göre anlamlı şekilde yüksek olduğu belirlendi (Şekil 76).

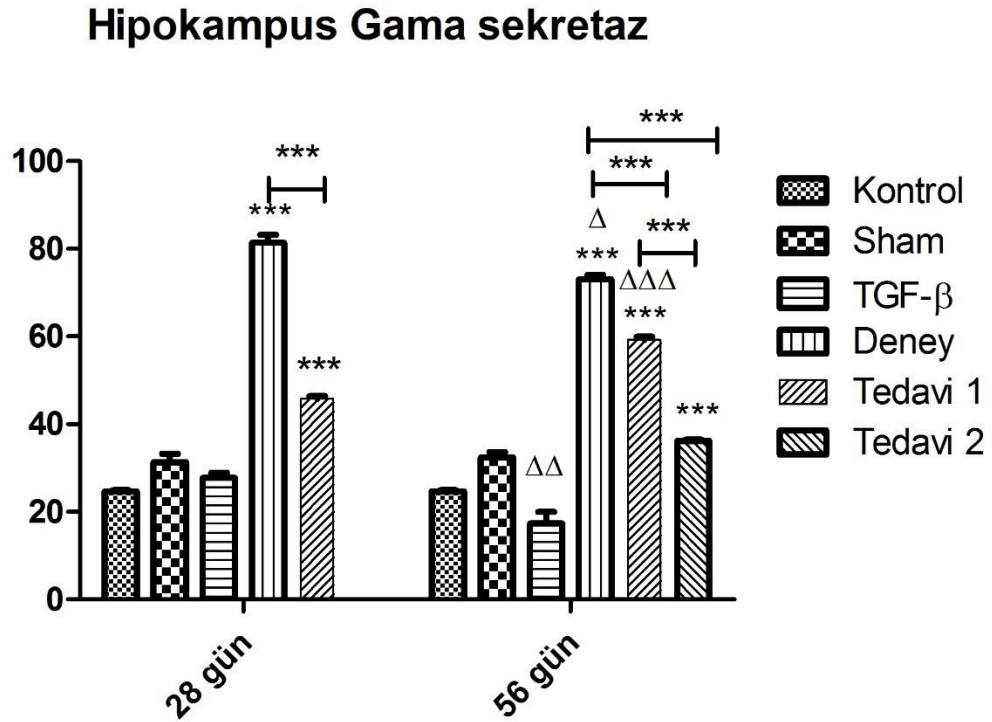


Şekil 76. Hipokampusta 28. ve 56. günlerde β -(Beta) sekretaz enzim seviyeleri. *** $P < 0,0001$, ** $P < 0,001$, * $P < 0,01$

4.5.3. Hipokampus γ -(Gama) Sekretaz Analizi

Kontrol, sham, TGF- β 1 kontrol, deney ve tedavi gruplarına ait deneklerden 28 ve 56. günlerde elde edilen hipokampus doku parçalarında, γ -sekretaz enzim seviyeleri ölçüldü ve istatistiksel olarak değerlendirildi. 28. günde alınan doku örneklerinin değerlendirmesinde, kontrol, sham ve TGF- β 1 kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Diğer taraftan, deney grubu γ -sekretaz enzim seviyesinin tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu saptandı. Bununla birlikte tedavi-1 grubunda γ -sekretaz enzim seviyesinin anlamlı şekilde kontrol

grubundan yüksek olduğu görüldü (Şekil 77). 56. günde kontrol, sham ve TGF- β 1 kontrol grupları arasında γ -sekretaz enzim seviyeleri açısından anlamlı bir fark bulunmazken, deney grubunun 56. gün γ -sekretaz enzim seviyesinin tedavi grupları da dahil olmak üzere tüm gruplarla kıyaslandığında anlamlı şekilde artış gösterdiği tespit edildi. Ayrıca tedavi-1 ve tedavi-2 grupları γ -sekretaz enzim seviyeleri de kontrol grubundan anlamlı şekilde yüksekti. 28. ve 56. gün verileri kıyaslandığında ise 56. gün TGF- β 1 kontrol, deney ve tedavi- 1 gruplarında γ -sekretaz enzim seviyeleri, 28. gündeki aynı grupların γ -sekretaz enzim seviyelerinden anlamlı şekilde düşük bulundu (Şekil 77).



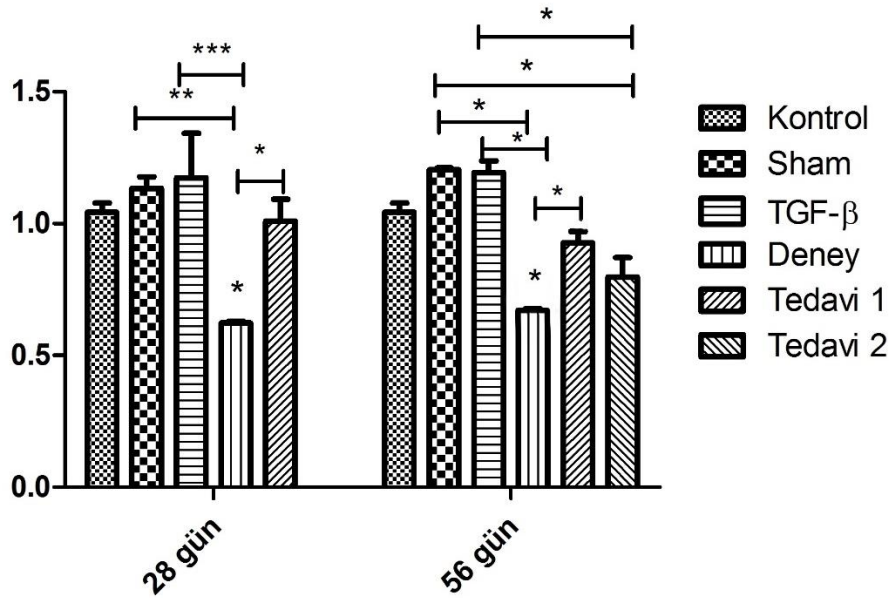
Şekil 77. Hipokampusta 28. ve 56. günlerde γ -(gama) sekretaz enzim seviyeleri. *** P<0,0001, **P<0,001, *P<0,01

4.5.4. Prefrontal Korteks α -(Alfa) Sekretaz Analizi

Deneklerden 28. ve 56. günlerde alınan prefrontal korteks dokularında α -sekretaz enzim seviyeleri ölçüldü ve istatistiksel olarak değerlendirildi. 28. günde α -sekretaz enzim seviyelerine göre kontrol, sham ve TGF- β 1 kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Bununla birlikte deney grubu enzim

seviyesinin kontrol, sham, TGF- β 1 kontrol ve tedavi-1 gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olduğu tespit edildi. Kontrol ve tedavi-1 grubu arasında α -sekretaz enzim seviyesi yönünden anlamlı farkın olmadığı saptandı (Şekil 78). 56. günde kontrol, sham ve TGF- β 1 kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Bununla birlikte deney grubunda kontrol, sham, TGF- β 1 ve tedavi-1 gruplarına göre α -sekretaz enzim seviyeleri açısından anlamlı bir azalmanın olduğu saptandı. Tedavi-2 grubu enzim seviyesinde, deney grubuna göre yükselme olmakla birlikte aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. Aynı zamanda tüm gruplarda günler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi (Şekil 78).

Prefrontal Korteks alfa sekretaz



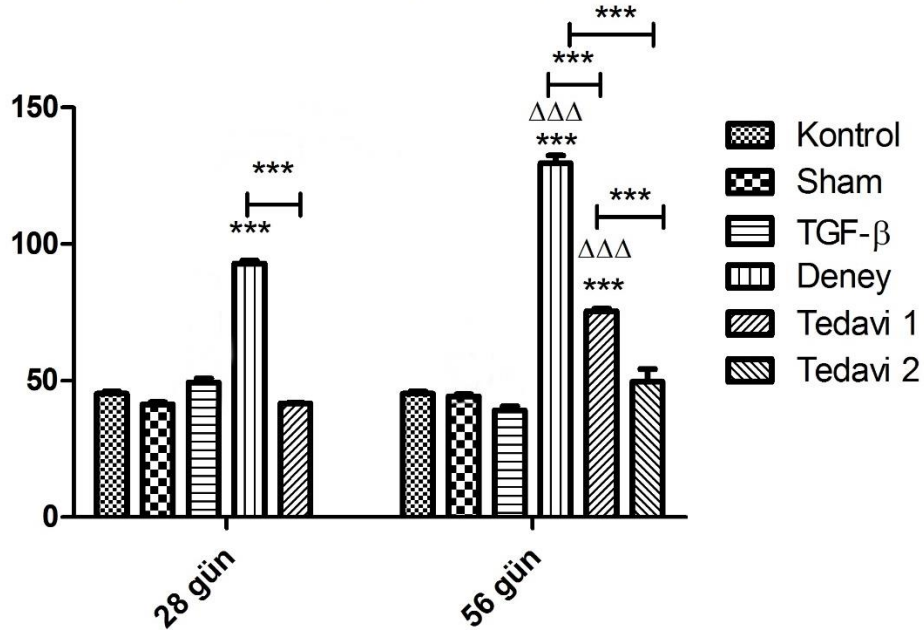
Şekil 78. Prefrontal kortekste 28. ve 56. günlerde α -(alfa) sekretaz enzim seviyeleri. *** P<0,0001, **P<0,001, *P<0,01

4.5.5. Prefrontal Korteks β -(Beta) Sekretaz Analizi

Deneklerden 28. ve 56. günlerde elde edilen prefrontal korteks dokularında, β -sekretaz enzim seviyeleri ölçüldü ve istatistiksel olarak değerlendirildi. 28. günde kontrol, sham, TGF- β 1 ve tedavi-1 grupları arasında anlamlı fark saptanmadı. Bununla birlikte deney grubu β -sekretaz enzim değerinin, tedavi-1 grubu da dahil olmak üzere diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu tespit edildi (Şekil 79). 56. günde kontrol, sham, TGF- β 1 ve tedavi-2 grupları arasında anlamlı fark

görülmezken, deney ve tedavi-1 gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı artışın olduğu saptandı. Deney grubunun 56. gün β -sekretaz enzim seviyesinin tüm diğer gruplara göre anlamlı şekilde arttığı görüldü. Aynı zamanda tedavi-1 grubu β -sekretaz enzim seviyesinin tedavi-2 grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu tespit edildi. Tüm grupların 28. ve 56. gündeki verileri kıyaslandığında, 56. gün deney ve tedavi-1 grubunun β -sekretaz enzim seviyelerinin 28. güne göre anlamlı şekilde yükseldiği belirlendi (Şekil 79).

Prefrontal Korteks Beta Sekretaz



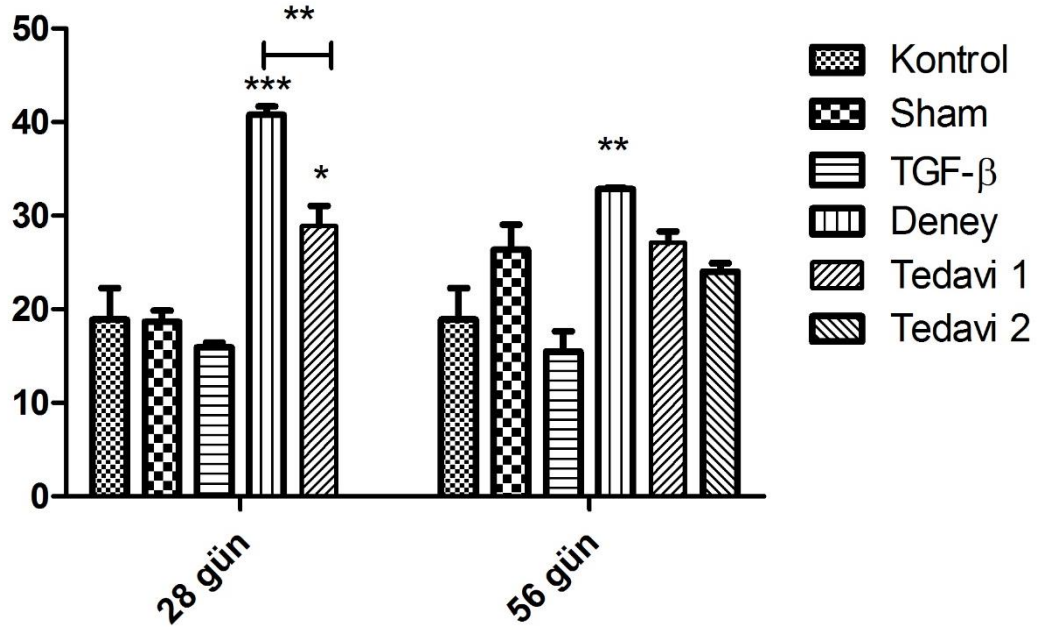
Şekil 79. Prefrontal kortekste 28. ve 56. günlerde β -(Beta) sekretaz enzim seviyeleri. *** P<0,0001, **P<0,001, *P<0,01

4.5.6. Prefrontal Korteks γ -(Gama) Sekretaz Analizi

Deneklerden 28. ve 56. günlerde elde edilen prefrontal korteks dokularında, γ -sekretaz enzim seviyeleri ölçüldü ve istatistiksel olarak değerlendirildi. 28. günde kontrol, sham ve TGF- β 1 kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Deney grubu γ -sekretaz enzim seviyesinin tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu saptandı. Bununla birlikte tedavi-1 grubunda γ -sekretaz enzim seviyesinin anlamlı şekilde kontrol grubundan yüksek olduğu görüldü (Şekil 80). 56. günde kontrol, sham ve TGF- β 1 kontrol ve tedavi grupları arasında γ -sekretaz enzim seviyeleri açısından anlamlı bir fark bulunmazken, deney grubu 56. gün γ -sekretaz

enzim seviyesi kontrol grubundan anlamlı şekilde yüksekti. 28. ve 56. gün verileri kıyaslandığında günler arasında anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil 80).

Prefrontal Korteks Gama Sekretaz



Şekil 80. Prefrontal kortekste 28. ve 56. günlerde γ -(Gama) sekretaz enzim seviyeleri. *** P<0,0001, **P<0,001, *P<0,01

5.TARTIŞMA

Deneyisel Alzheimer hastalığı benzeri model oluşturularak, hastalığın patogeneze karşı sistemik TGF- β 1 uygulamasının terapötik etkisinin, ışık ve elektron mikroskopik teknikler, immunohistokimyasal yöntemler, biyokimyasal analizlerle birlikte davranış testleriyle incelendiği bu çalışmada, 28. ve 56. günlerde farelerden alınan hipokampus ve prefrontal korteks doku örneklerinde, yapısal değişiklikler ile A β -40 ve kaspaz-3 ekspresyonları, α , β ve γ -sekretaz enzim seviyeleri değerlendirildi. AH benzeri model oluşturmak için deneklere uygulanan skopolamin (asetilkolin reseptör blokörü) enjeksiyonunu takiben, Morris su havuzu testinde, 28. ve 56. günlerde uzaysal öğrenme ve bellek performansının olumsuz etkilendiği görüldü. Hipokampus ve prefrontal korteks doku örneklerinde skopolamin uygulamasıyla birlikte hem ışık hem de elektron mikroskopik düzeyde nörodejeneratif değişikliklerle birlikte, A β -40 ve kaspaz-3 ekspresyonlarında kontrol gruplarına göre anlamlı artış gözlemlendi. AH benzeri model oluşturulan deneklerde, α -sekretaz enzim seviyesinin anlamlı olarak azaldığı, β ve γ -sekretaz enzim seviyelerinin ise arttığı bulundu. TGF- β 1 tedavisi sonrasında, davranış test performanslarının düzeldiği, hipokampus ve prefrontal korteks doku örneklerinde yapısal değişiklikler ile A β -40 ve kaspaz-3 immünreaktivitesinin anlamlı şekilde azaldığı dikkati çekti. Bunlara ilaveten, deney grubu ile karşılaştırıldığında tedavi sonrasında α -sekretaz enzim seviyesinin anlamlı olarak arttığı, β ve γ -sekretaz enzim seviyelerinin ise azaldığı tespit edildi.

Alzheimer hastalığı hem genç hem de ileri yaşlarda görülebilen, farklı bilişsel ve davranışsal bozukluklarla karakterize ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır. Dünya genelinde özellikle son yıllarda demansın en önemli nedenlerinden birisi olarak görülmektedir. Alzheimer hastalığının histopatolojisinde, beyinde bazı bölgelerde A β artışına bağlı meydana gelen senil plaklar ile tau proteini birikimi sonucu oluşan nörofibriler yumakların kritik rol oynadığı kabul edilmektedir. Patogeneze yer alan proteinlerin erken evrede tespit edilmesi hastalığın tanı ve tedavisi için oldukça önemlidir (216). AH'nın tanı ve tedavisine yönelik çalışmaların çoğunda farklı yöntemler kullanılarak geliştirilen hayvan modelleri kullanılmaktadır. Bugüne kadar AH'nın tedavisinde spesifik ilaçların geliştirilmesi ile hastalığın davranışsal ve nörodejeneratif değişiklikleri arasındaki bağlantıların araştırılması için çalışmalarda

hastalığı taklit eden hayvan modelleri oluşturulmuştur. Bu amaçla beynin korteks, hipokampus ve Mynert bazal nükleusu gibi bölgelerde stereotaksik cerrahi ile lezyon oluşturma, transgenik hayvan modeliyle genetik patoloji taklitleri, nörotoksik ajanlar ve kolinerjik ya da diğer reseptör blokörlerinin kullanılması ile oluşturulan modeller geliştirilmiştir (217). Kolinerjik sistem beyinde limbik sistem, talamus ve serebral kortekste, aktif şekilde öğrenme ve bellek işlevlerinde kritik rol oynamaktadır. Sudeep H.V. ve arkadaşları, muskarinik asetilkolin reseptörünün non-selektif blokörü olan skopolaminin, kolinerjik reseptör blokajı oluşturarak sıçan beyinde nörodejeneratif değişikliklere neden olduğunu ileri sürmüşlerdir. Gutierres J.M. ve arkadaşları da skopolaminin hipokampus ve kortekste asetilkolin aktivitesinin artmasına bağlı olarak öğrenme ve bellek fonksiyonunda bozulmaya neden olduğunu bu nedenlerle Alzheimer hastalığı benzeri model oluşturmak için uygun bir ajan olduğunu belirtmişlerdir (218, 219).

Sunulan çalışmada, uzaysal öğrenme ve bellek performansının değerlendirilmesi amacıyla Morris su havuzu testi (MWM) uygulanmıştır. Fareler eğitim denemelerinde gizli platformu bulmak amacıyla beş gün boyunca günde dört kez yüzdürülmüş ve altıncı günde gizli platformun havuzdan uzaklaştırılmasıyla test gerçekleştirilmiştir. Eğitim denemelerinde diğer gruplarla karşılaştırıldığında kontrol, TGF- β 1 kontrol ve sham gruplarında 28. günde yapılan eğitim denemelerinde platformu bulma süreleri, yüzme süresi ve hızı arasında anlamlı farkın olmadığı görülmüştür. Bununla birlikte, deney grubu 28. günü ile diğer gruplar karşılaştırıldığında, gizli platformu bulma süreleri, yüzme hızı ve sürelerinde günler arasında anlamlı bir azalmanın olmaması, uzaysal öğrenme ve bellek performansının deney grubunda azalmış olduğunu göstermiştir. Diğer taraftan çalışmamızda, tedavi-1 grubunun 28. gününde gizli platformu bulma sürelerinde deney grubuna göre anlamlı azalmanın olması, uygulanan TGF- β 1'in uzaysal öğrenme ve bellek üzerine olumlu etkisinin olabileceğini düşündürmüştür. 56. günde gruplara uygulanan MWM testinde deney grubu ile diğer tüm gruplar arasında eğitim denemelerinde, yüzme hızı ve testlerde anlamlı farkın olması hem modelin hem de tedavinin etkisinin 56. günde de devam ettiği kanaatini uyandırmıştır.

Uzaysal öğrenme; konumlandırma, etrafta hareket etme, yönünü tayin etme, çoklu kararlar alma, çevredeki imgelemelerin ve durumların ve vücudun bunlarla olan

ilişisini analiz etme kabiliyetidir. Öğrenme; yeni bilgi kaydedilmesi, bellek; öğrenilen bilginin saklanması olarak çalışmalarda tanımlanmaktadır. Beyinde her bir yetenek için farklı bölgeler görev yapmakla birlikte hipokampus ve korteksin bazı bölgeleri öğrenme ve bellek fonksiyonu için özelleşmiştir. AH'nda primer olarak etkilenen bölgelerin hipokampus ve prefrontal korteks olduğu kabul edilmektedir (220). Günümüze kadar yapılan çalışmalarda skopolaminin asetilkolin reseptör blokajına neden olarak öğrenme ve bellek üzerine olumsuz etki ettiği bildirilmiştir. Djeuzong E. ve arkadaşları yaptıkları çalışmada uyguladıkları davranış testi sonucunda i.p. yolla uygulanan skopolaminin sıçanlarda uzaysal öğrenme ve bellek fonksiyonlarını olumsuz etkilediğini ileri sürmüşlerdir (221). Yapılan bir diğer çalışmada skopolamin uygulanmasının asetilkolin reseptör blokajını gerçekleştirdiği ve bellek performansında önemli düşüşe neden olduğu gösterilmiştir (219). Sunulan bu çalışmada, skopolamin uygulan grupta uzaysal öğrenme ve bellek performansında belirgin bir azalmanın meydana geldiği, buna karşın tedavi gruplarında öğrenme ve bellek performansında anlamlı bir artışın olması TGF- β 1'in olumlu etkisi şeklinde yorumlandı. Her ne kadar TGF- β 1'in uzun süreli kronik uygulanmasının sıçanlarda öğrenme ve bellek fonksiyonu üzerine olumsuz etkisinin olabileceği birkaç çalışmada ileri sürülmüş olmakla birlikte (222), Caraci ve arkadaşları, deneysel demans modelinde TGF- β 1'in hipokampusta öğrenme ve bellek performansı üzerine olumlu etkilerini rapor etmişlerdir (223). Çalışmamızda da deneysel AH modelinde 28 gün boyunca TGF- β 1 uygulanmasının 28. ve 56. günlerde uzaysal öğrenme ve bellek performansını belirgin olarak artırdığı gösterilmiştir.

Çalışmamızda deney gruplarında hipokampus ve prefrontal kortekste perinöronal ödematoz alanların oluştuğu, aynı zamanda nöronlarda ve gliya hücrelerinde çekirdekte heterokromatin artışı ve sitoplazmada vakuolizasyon meydana geldiği görülmüştür. Ayrıca deney grubunda 56. günde alınan doku örneklerinde de nispeten azalmakla birlikte, hücresel hasarın devam ettiği gözlenmiştir. Buna karşın, hücresel değişikliklerin TGF- β 1 ile tedavi edilen gruplarda nispeten azaldığının görülmesi TGF- β 1'in antienflamatuvar etkisinin hücrelerde harabiyeti ve dejenerasyonu durdurduğunu düşündürmüştür. Aynı zamanda 56. günde, tedavi-1 ve tedavi-2 grubunda deney grubuna göre ışık ve elektron mikroskopik incelemede hücresel harabiyetin azaldığının görülmesi, TGF- β 1'in AH benzeri modelde koruyucu etkisinin, uygulanma süresinden daha uzun süreli etki edebileceğini de göstermiştir. Patel P. ve

arkadaşları yaptıkları çalışmada skopolamin uygulamasının hipokampusta nöronlarda vakuolizasyon, plastisite kaybı ve hücre harabiyete neden olduğunu, ancak D vitamini uygulamasının bu hasarı önlediğini rapor etmişlerdir (224). Upadhaya A.R ve arkadaşları da transgenik hayvan modelinde A β birikiminin hücrelerde ultrastrüktürel yapıda bozukluğa ve organel harabiyetine yol açtığı göstermişlerdir (225). Yapılan in-vitro bir çalışmada, nöronlarda ve gliya hücrelerinde rekombinant TGF- β 1 uygulamasının, AH'nda oluşan nörodejeneratif değişiklikleri ve hücre harabiyeti azalttığı ileri sürülmüştür. TGF- β 1 reseptörlerinin hem gliyal hücrelerde hem de nöronlarda eksprese edildiği ve bu nedenle TGF- β 1'in koruyucu etkilerini her iki hücre tipi üzerinde gösterebildiği bildirilmiştir (223). Yapılan diğer çalışmalarda TGF- β 1'in nörotrofinlerle sinerjistik olarak hareket ettiğini, sinir büyüme faktörünün (NGF), beyin kaynaklı nörotrofik faktörün (BDNF) ve gliyal kökenli nörotrofik faktörün (GDNF) nöron koruyucu etkisi için TGF- β 1'in gerekli olduğu vurgulanmıştır.

AH'nda beyinde BDNF ve reseptörü tropomiyozin reseptör kinaz B (TrkB) seviyeleri azalmasının ve BDNF sinyal eksikliğine sebep olduğu böylece nörodejenerasyonu ve hücre harabiyeti hızlandığı ileri sürülmüştür. İlginç bir şekilde TGF- β 1'in sıçan nöron kültürlerinde BDNF ve TrkB'nin ekspresyonunu artırdığının ortaya çıkarılması, TGF- β 1'in diğer trofik faktörlerin etkili olabilmesi için gerekli bir ajan olabileceğini düşündürmüştür. Bunların yanında TGF- β 1'in hipokampus nöronlarında ekstraselüler-düzenlenmiş kinaz (ERK) yolunu aktive edebildiği ve bu yolla nöronal sağ kalımı artırdığı ileri sürülmüştür. Aynı zamanda TGF- β 1'in PI3K/Akt ve ERK sinyal yolları aracılığıyla NF- κ B'nin transkripsiyonel aktivitesinin artırılmasını sağlayarak, nöroenflamatuvar reaksiyonların etkisini azaltarak ultrastrüktürel değişiklikleri önleyebileceği de ifade edilmiştir (223, 226, 227).

Çalışmamızda skopolaminle oluşturulan AH benzeri hastalık modelinde, hipokampus ve prefrontal korteks dokularında ışık ve elektron mikroskopik düzeyde nörodejeneratif ve nöroenflamatuvar değişikliklerin olduğu tespit edildi. Tedavi gruplarında uygulanan TGF- β 1 enjeksiyonu sonucunda 28. günde alınan doku örneklerinde yapısal değişikliklerin nispeten azaldığı dikkati çekti. TGF- β 1 sinyal iletiminin telafi edilmesiyle nöroprotektif etkinin ortaya çıktığı söylenebilir. Diğer yandan çalışmamızda deney gruplarına göre tedavi gruplarında, 56. günde elde edilen doku örneklerinde de hücre harabiyetinin azalması TGF- β 1'in nöroprotektif ve

antienflamatuvar etkisinin uzun süreli olabileceğini düşündürdü. Bunlara ilaveten, hipokampus ve prefrontal kortekse A β immunreaktivitesinin tedavi gruplarının 28. ve 56. günlerinde benzer şekilde azaldığının görülmesi, TGF- β 1'in uzun süreli tedavi edici etkisinin olabileceğini göstermektedir. Çalışmamızda 28. ve 56. günlerde deney gruplarında hipokampus ve prefrontal kortekste nöronlarda yoğun A β -40 birikiminin gözlenmesi, hastalığın erken evresinde birikimin hücre içinde daha yoğun olduğunu gösterdi. A β birikiminin nöronların perikaryonlarında yoğun olduğu izlenmekle birlikte, perinöronal alanlarda A β plakları şeklinde görülmemesi deneyin uzunluğu ile skopolamin uygulamasının doz ve süresiyle ilgili olabileceğini düşündürdü.

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, A β ile ilgili çalışmaların çoğunluğu peptidin Alzheimer hastalığındaki patolojik rolüne odaklanmıştır. Bununla birlikte, A β 'nın sinir sisteminde nörit büyümesini teşvik etme rolü ve kalsiyum salınımını düzenleyerek sinyal iletiminin artmasını sağladığı da bilinmektedir. In vivo düzeyde yapılan bir çalışmada, A β 'nın beyindeki pikomolar konsantrasyonlarının sinaptik plastisiteyi düzenleyebileceği ileri sürülmüştür. Aynı zamanda A β -40'ın hücre kültürlerinde de nörotrofik role sahip olduğu vurgulanmıştır (228). Amiloid birikiminin AH'nda görülen tau protein birikimini uyardığı bilinmektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalarda, A β ve tau proteinleri arasındaki etkileşimin AH'nın patogenezindeki sinerjistik etkileri, enflamasyon gibi diğer mekanizmalarla birlikte hastalığın oluşumuna sebep olabildiği ortaya konulmuştur (229). Syed, Z. ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, skopolamin uygulamasının hipokampus ve prefrontal kortekste A β birikimini artırdığı gösterilmiştir (230). Assi A, A. ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada da i.p yolla skopolamin uygulamasının A β birikimine neden olduğu, bellek üzerine olumsuz etkilerinin olduğu ve nöroenflamatuvar etkisinin varlığı hem hipokampus hem de prefrontal kortekste gösterilmiştir (231). A β 'nın çözünür, plak veya fibriller olmayan formda birikiminin, kortekse doğru genişlediği ve sonunda nöronal etkileşimi bozarak bilişsel gerilemeye neden olduğunu vurgulanmaktadır. AH'nın sonraki aşamalarında, kortikal bozulma ve sinaptik kayıp, beyinde yapısal hasar AH'nın ilerlemesinin bir göstergesiyken, AH'nın erken aşamalarındaki hafıza kaybının, çözünür A β 'nın etkisiyle olduğu rapor edilmiştir (228). A β 'nın bu olumsuz etkilerinin önlenmesine yönelik tedavi çalışmalarında, esas olarak beyindeki A β düzeylerinin azaltılmasına yönelik çalışmalarda olumlu sonuçlar alınmış olsa da klinik açıdan henüz

yeterli sonuca ulaşamamıştır. Uygulanan ilaçların çoğunluğu beyindeki amiloid birikimini azaltmayı hedeflemekle beraber bilişsel gerilemeyi önleyememektedir. Bunların yanında son yıllarda A β için geliştirilen monoklonal antikor tedavileri de A β 'nin farklı izoformlarının inaktivasyonu ve bunların eliminasyonunu hedeflemektedir. Ancak bu tedavi yönteminde karşılaşılan en temel sorunun, A β 'nin fizyolojik düzeylerinin de ortadan kaldırılarak, beyindeki A β seviyelerinin aşırı düşmesi sonucu normal beyin fonksiyonlarının yerine getirilememesi olduğu vurgulanmaktadır (232, 233, 234, 235). Çalışmamızda skopolamin uygulaması sonucunda A β -40 birikiminin arttığı ve muhtemelen buna bağlı olarak nörodejeneratif değişikliklerin meydana geldiği gösterilmiştir. A β -40 artışı ile birlikte deney gruplarında bilişsel kaybın meydana geldiği de belirlenmiştir. Bununla birlikte TGF- β 1 tedavisi uygulanan gruplarda, A β -40 seviyesinin azaldığı ve bilişsel yeteneklerin de geri kazanıldığı tespit edilmiştir.

AH'nda A β -40 birikimine bağlı olarak nöronlarda ve gliya hücrelerinde mitokondriyal fonksiyon kaybı sonucunda reaktif oksijen türlerinin apoptozu uyardığı yaygın olarak kabul edilmektedir. Çalışmamızda deney grubu ve tedavi gruplarında TGF- β 1'in apoptoz üzerine etkisini değerlendirmek üzere kaspaz-3 aktivitesi araştırılmıştır. Kaspaz-3 immunreaktivitesi açısından normal kontrol, sham ve TGF- β 1 tedavi grupları arasında 28. ve 56. günlerde anlamlı bir fark görülmezken, tedavi ve deney grupları arasında hem 28. günde hem de 56. günlerde belirgin bir farkın olduğu tespit edildi. Skopolamin uygulamasını takiben A β -40 birikimine bağlı olarak apoptotik mekanizmaların aktive olduğu bilinmektedir. TGF- β 1 uygulamasıyla birlikte tedavi-1 ve tedavi-2 grupları ile deney grubu arasında hem 28. hem de 56. günlerde anlamlı farkın olması TGF- β 1'in kaspaz-3 aktivitesini önemli ölçüde azaltabileceğini göstermektedir.

AH'nda nöronlarda aktif kaspaz-3'ün eksprese olduğu bilinmektedir. Bunun yanında, down sendromu ve granülovakuoler dejenerasyon (GVD) gibi diğer dejeneratif merkezi sinir sistemi hastalıklarında da kaspaz-3 aktivasyonuna bağlı apoptotik yolların uyarıldığı rapor edilmiştir (213). Klinik araştırmalarda kaspaz-3 inhibitörleri kullanılarak AH'nın ilerlemesinin engellenmesine yönelik çalışmalar sürdürülmektedir. Dhage PA. ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada Z-devd-FMK ve VX-765

kaspaz-3 inhibitörü olarak kullanılmış ancak uygulama süresinden kaynaklı dezavantajların dikkate alınmasının önemi vurgulanmıştır (236).

Literatürde TGF- β 1'in nöronlar üzerine anti-apoptotik etkisiyle ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Sunulan çalışmada in vivo koşullarda skopolamin uygulanan deney grubunda kaspaz-3 ekspresyonunun arttığı buna karşın TGF- β 1 uygulanan tedavi gruplarında ekspresyonunun azaldığı bulundu. Aynı zamanda bu etkinin 56. günde de devam etmesi TGF- β 1'in etkisinin uzun süreli olabileceğini düşündürdü. TGF- β 1'in kaspaz-3 aktivitesini azaltarak nöronal apoptozu önleyebileceği söylenebilir.

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda AH'nın patogeneğinde kritik rol oynayan A β birikiminin, APP'nin sekretaz enzimlerinin anormal klevajları sonucu meydana geldiği bilinmektedir. α -sekretazın, APP'nin fizyolojik olarak kesilerek non-amiloidojenik yolla işlenmesini sağlayan enzim olduğu gösterilmiştir. α -sekretaz ile gerçekleşen APP kesimi sonucu patolojik A β birikiminin engellendiği rapor edilmiştir (237). Brummer T. ve arkadaşları BOS'ndan izole ettikleri α -sekretazın, Alzheimer hastalığı olan bireylerde hastalığın önlenmesi amacıyla kullanılması ile A β birikiminin azaldığını ileri sürmüşlerdir (238). Alzheimer hastalığına sahip bireylerde, in-vivo ve in-vitro koşullarda elde edilen verilere göre α -sekretaz enzim seviyesinin düştüğü gösterilmiştir. Aynı zamanda deneysel olarak aktivitesi arttırılan α -sekretaz enzim seviyesinin A β birikimini azalttığı da bulunmuştur (239).

Di Fede G. ve arkadaşları da aşırı A β oluşumunun β - ve γ -sekretaz tarafından APP'nin anormal kesilmesiyle meydana geldiğini rapor etmişlerdir (240). Bununla birlikte, β -sekretazın sadece A β üretimi ile ilgili olmadığı, sinaptik plastisite ve homeostazda da önemli rolünün bulunduğu belirtilmiştir. β -sekretaz inhibitörleri üzerinde yapılan klinik çalışmalarda farklı sonuçlar alınmış olmakla birlikte A β üretimini azaltmayı hedefleyen terapötik yaklaşımların sinaptik fonksiyonları olumsuz etkileyebileceğinin göz önünde bulundurulması önerilmiştir (241).

Diğer taraftan, Jin C. ve arkadaşları, APP'nin γ -sekretaz tarafından anormal bölünmesinin, AH ile yakından ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, γ -sekretaz aktive edici proteinin (GSAP) spesifik olarak APP'nin γ -sekretaz aracılı bölünmesini desteklediğini ileri sürmüşlerdir. Araştırmacılar, tam olarak mekanizması bilinmese de GSAP aracılı γ -sekretaz aktivasyonunun inhibe edilmesinin, A β birikimini engellediğini rapor etmişler, γ -sekretaz down-regulasyonu için geliştirilen potansiyel

terapötiklerin AH tedavisi üzerine olumlu etkisinin olabileceğini öne sürmüşlerdir (242). Bununla birlikte γ -sekretaz yalnızca A β oluşumunda değil, aynı zamanda hücrel sinyal yollarının işlevi ile nöronal hücre ölümüne karşı savunmada da önemli rollere sahiptir. Bu nedenle AH tedavisi için γ -sekretaz aktivitesinin baskılanması bir strateji olarak planlanırken yan etkilerinin de göz önünde bulundurulması gerekmektedir (243, 244).

Sunulan çalışmada ilk defa deneysel AH modelinde TGF- β 1'in α , β , γ sekretaz enzim seviyeleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışmamızda non-amiloidojenik yolda görev alan α -sekretaz enzim seviyesinin deney grubunda belirgin olarak azaldığı, tedavi gruplarında ise arttığı gösterildi. Buna karşın, amiloidojenik yolda A β oluşumunun meydana gelmesinde görev alan β -sekretaz enzim seviyesinin deney grubunda arttığı, TGF- β 1 tedavisinin ise enzim seviyesini belirgin olarak azalttığı bulundu. Çalışmamızda γ -sekretaz enzim seviyesinin deney grubunda yükseldiği, tedavi grubunda ise anlamlı olarak azaldığı tespit edildi. Enzim sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, TGF- β 1 tedavisinin amiloidojenik yolağı aktivasyonu, non-amiloidojenik yolağın down-regule olmasıyla A β -40 birikimini engelleyebileceği sonucuna varıldı. Bununla birlikte TGF- β 1'in sekretaz enzimleri üzerine etkisini hangi aktivatör ve inhibitör proteinler üzerinde gerçekleştirdiği ve bu yolla A β -40 ekspresyonunu azalttığı ileri çalışmalarla aydınlatılması gereklidir.

Sonuç olarak çalışmamızın bütün bulguları birlikte değerlendirildiğinde, skopolamin ile oluşturulan deneysel AH benzeri modelde hipokampus ve prefrontal kortekste A β -40 ekspresyonunun varlığının 28. ve 56. günlerde belirgin olarak artış gösterdiği, bu bulgunun davranış testlerinde öğrenme ve bellekte oluşan gerileme ile karakterize olduğu gösterildi. TGF- β 1 tedavisinin A β -40 ekspresyonunda azalma ve bilişsel öğrenme ve bellek yeteneğinde artışa sebep olduğu bulundu. Bunlara ilaveten, TGF- β 1 tedavisinin apoptotik belirteç olan kaspaz-3'ü inhibe ettiği, anti-apoptotik bu özelliği ile nöron koruyucu bir ajan olarak değerlendirilebileceği kanaatine varıldı. Ayrıca, TGF- β 1'in AH'nda çok önemli rollere sahip sekretaz enzimlerinin seviyelerini de düzenleyerek, hastalığın oluşumunun ve ilerlemesinin engellenmesinde yararlı olabileceği düşünüldü. Deneysel AH benzeri modelde in-vivo koşullarda sistemik TGF- β 1 uygulamasının A β -40 birikimini önlediği, apoptozu engellediği, bu yolla hücrel sağ kalımı ve iyileşmeyi sağladığı, aynı zamanda α , β ve γ -sekretaz enzimleri üzerinde

düzenleyici rolü ile hastalığın önlenmesinde etkili olabileceği ve gelecekte Alzheimer hastalığında tedavi edici bir ajan olarak değerlendirilebileceği kanaatine varıldı.



6. SONUÇLAR

Deneyssel Alzheimer hastalığı benzeri model oluşturularak TGF- β 1 uygulanmasının öğrenme ve hafıza, A β -40 birikimi, apoptoz, nörodejenerasyon ve α , β , γ - sekretaz enzimlerinin ekspresyonu üzerine etkisinin fizyolojik, mikroskobik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle incelendiği bu çalışma sonucunda;

1. Alzheimer benzeri model oluşturulmayan ve herhangi bir işlem yapılmayan kontrol grubuna ait deneklerin davranış testlerinde öğrenme ve bellek performanslarında bir kaybın olmadığı gözlemlendi. Bu gruptaki deneklerden alınan dokuların ışık ve elektron mikroskobik incelenmesinde hipokampus ve prefrontal kortekste, nöronlar, gliya hücreleri ve sinir liflerinin normal yapılarını korudukları görüldü. Aynı grubun immunohistokimyasal incelemesinde A β -40 ve kaspaz-3 immunreaktivitesinin minimal seviyede olduğu izlendi. Yapılan biyokimyasal incelemede α -sekretaz enzim seviyesinin anlamlı olarak yüksek olduğu buna karşın β ve γ - sekretaz enzim ekspresyon düzeyinin düşük olduğu tespit edildi.
2. Skopolamin uygulanmayıp aynı dozda SF uygulamasıyla oluşturulan sham grubunda deneklerin davranış testlerinde kontrol grubuna benzer şekilde öğrenme ve bellek performansında kaybın olmadığı, ışık ve elektron mikroskobik incelemede 28. ve 56. günlerde nöronların, gliya hücrelerinin ve sinir liflerinin normal yapıda olduğu, immunohistokimyasal incelemede tüm günlerde hipokampus ve prefrontal kortekste A β -40 ve kaspaz-3 immunreaktivitesinin görülmediği belirlendi. Biyokimyasal incelemede sekretaz enzim seviyelerinin 28. ve 56. günlerde kontrol grubuna benzerlik gösterdiği kaydedildi.
3. Yalnızca TGF- β 1 uygulanan grupta hipokampus ve prefrontal kortekste 28. ve 56. günlerde yapılan incelemede öğrenme ve bellek performansında kaybın olmadığı, ışık ve elektron mikroskobik incelemede nöronlarda, gliya hücrelerinde ve sinir liflerinde normal yapının korunduğu izlendi. Immunohistokimyasal incelemede A β -40 ve kaspaz-3 immunreaktivitesinin

görülmediği belirlendi. Biyokimyasal incelemede sekretaz enzim ekspresyonlarının kontrol grubuna benzer olduğu tespit edildi.

4. Skopolamin uygulanarak oluşturulan AH benzeri modelde hipokampus ve prefrontal kortekste 28. günde yapılan davranış testlerinde yüzme hızı ve platformu bulma sürelerinin kontrol grubuna göre anlamlı azaldığı belirlendi. 28. günde alınan hipokampus ve prefrontal kortekste nöronlarda ve gliya hücrelerinde belirgin dejeneratif değişiklikler izlendi. Deney grubunda 56. günde yapılan incelemede ultrastrüktürel değişikliklerin 28. güne oranla bir miktar azalmakla birlikte, yapısal değişikliklerin devam ettiği görüldü. İmmunohistokimyasal değerlendirmede 28. günde nöronlarda A β -40 ve kaspaz-3 immunreaktivitesinin anlamlı olarak artış gösterdiği izlendi. A β -40 ve kaspaz-3 immunreaktivitesinde gözlenen artışın 56. günde de devam ettiği görüldü. Biyokimyasal değerlendirmede α -sekretaz ekspresyon düzeyinin hipokampus ve prefrontal kortekste 28. günde deney grubunda anlamlı olarak düştüğü saptandı. α -sekretaz ekspresyonundaki bu azalmanın 56. günde de sürdüğü belirlendi. β ve γ sekretaz ekspresyon düzeylerinin hipokampus ve prefrontal kortekste 28. ve 56. günlerde deney grubunda anlamlı yükseldiği tespit edildi.
5. Tedavi-1 grubunda hipokampus ve prefrontal korteks dokularında ışık ve elektron mikroskopik incelemede 28. ve 56. günde nöronlarda ve gliya hücrelerinde ödematöz alanların belirgin şekilde azaldığı görüldü. İmmunohistokimyasal değerlendirmede prefrontal korteks ve hipokampus dokularında A β -40 ve kaspaz-3 immunreaktivitesinin deney grubuna göre anlamlı azaldığı izlendi. Biyokimyasal değerlendirmede hipokampus ve prefrontal kortekste 28. ve 56. günlerde α -sekretaz ekspresyonunun deney grubuna göre anlamlı olarak yükseldiği, buna karşın β ve γ sekretaz enzim ekspresyonlarının deney grubuna göre her iki günde de anlamlı azaldığı tespit edildi.
6. Tedavi-2 grubunda hipokampus ve prefrontal korteks dokularında ışık ve elektron mikroskopik incelemede ödematöz alanların azaldığı, nöron ve gliya hücrelerinde yapısal bütünlüğün korunduğu gözlemlendi. İmmunohistokimyasal değerlendirmede A β -40 ve kaspaz-3 immunreaktivitesinin anlamlı olarak azaldığı belirlendi. Biyokimyasal değerlendirmede hipokampus ve prefrontal

kortekste α -sekretaz ekspresyonunun anlamlı arttığı, buna karşın β ve γ sekretaz ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığı tespit edildi.

Sonuç olarak çalışmamızın bütün bulguları birlikte değerlendirildiğinde, skopolamin ile oluşturulan deneysel AH benzeri modelde hipokampus ve prefrontal kortekste A β -40 ekspresyonunun varlığının 28. ve 56. günlerde belirgin olarak artış gösterdiği, bu bulgunun davranış testlerinde öğrenme ve bellekte oluşan gerileme ile karakterize olduğu gösterildi. TGF- β 1 tedavisinin A β -40 ekspresyonunda azalma ve bilişsel öğrenme ve bellek yeteneğinde artışa sebep olduğu bulundu. Bunlara ilaveten, TGF- β 1 tedavisinin apoptotik belirteç olan kaspaz-3'ü inhibe ettiği, anti-apoptotik bu özelliği ile nöron koruyucu bir ajan olarak değerlendirilebileceği kanaatine varıldı. Ayrıca, TGF- β 1'in AH'nda çok önemli rollere sahip sekretaz enzimlerinin seviyelerini de düzenleyerek, hastalığın oluşumunun ve ilerlemesinin engellenmesinde yararlı olabileceği düşünüldü. Deneysel AH benzeri modelde in-vivo koşullarda sistemik TGF- β 1 uygulamasının A β -40 birikimini önlediği, apoptozu engellediği, bu yolla hücrel sağ kalımı ve iyileşmeyi sağladığı, aynı zamanda α , β ve γ -sekretaz enzimleri üzerinde düzenleyici rolü ile hastalığın önlenmesinde etkili olabileceği ve gelecekte Alzheimer hastalığında tedavi edici bir ajan olarak değerlendirilebileceği kanaatine varıldı.

KAYNAKLAR

1. **Passeri E, Elkhoury K, Morsink M, Broersen K, Linder M, Tamayol A, et al.** Alzheimer's Disease: Treatment Strategies and Their Limitations. *Int J Mol Sci.* **2022**;23(22).
2. **Ferrer I.** Defining Alzheimer as a common age-related neurodegenerative process not inevitably leading to dementia. *Prog Neurobiol.* **2012**;97(1):38-51.
3. **Ogbodo JO, Agbo CP, Njoku UO, Ogugofor MO, Egba SI, Ihim SA, et al.** Alzheimer's Disease: Pathogenesis and Therapeutic Interventions. *Curr Aging Sci.* **2022**;15(1):2-25.
4. **Serý O, Povová J, Mišek I, Pešák L, Janout V.** Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: a review. *Folia Neuropathol.* **2013**;51(1):1-9.
5. **Zhang XX, Tian Y, Wang ZT, Ma YH, Tan L, Yu JT.** The Epidemiology of Alzheimer's Disease Modifiable Risk Factors and Prevention. *J Prev Alzheimers Dis.* **2021**;8(3):313-21.
6. **Ma C, Hong F, Yang S.** Amyloidosis in Alzheimer's Disease: Pathogeny, Etiology, and Related Therapeutic Directions. *Molecules.* **2022**;27(4).
7. **Chai GS, Jiang X, Ni ZF, Ma ZW, Xie AJ, Cheng XS, et al.** Betaine attenuates Alzheimer-like pathological changes and memory deficits induced by homocysteine. *J Neurochem.* **2013**;124(3):388-96.
8. **Mosher KI, Wyss-Coray T.** Microglial dysfunction in brain aging and Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol.* **2014**;88(4):594-604.
9. **Brooks LRK, Mias GI.** Data-Driven Analysis of Age, Sex, and Tissue Effects on Gene Expression Variability in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci.* **2019**;13:392.
10. **Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, Mufson EJ.** Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging.* **2006**;27(10):1372-84.
11. **Askarova S, Yang X, Lee JC.** Impacts of membrane biophysics in Alzheimer's disease: from amyloid precursor protein processing to $\alpha\beta$ Peptide-induced membrane changes. *Int J Alzheimers Dis.* **2011**;2011:134971.
12. **Rostagno AA.** Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* **2022**;24(1).
13. **Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K.** Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1985**;82(12):4245-9.
14. **Wong PT, Schauerte JA, Wissner KC, Ding H, Lee EL, Steel DG, et al.** Amyloid-beta membrane binding and permeabilization are distinct processes influenced separately by membrane charge and fluidity. *J Mol Biol.* **2009**;386(1):81-96.
15. **Song F, Liu T, Meng S, Li F, Zhang Y, Jiang L.** Insulin-Like Growth Factor-1 Alleviates Expression of $A\beta(1-40)$ and α -, β -, and γ -Secretases in the Cortex and Hippocampus of APP/PS1 Double Transgenic Mice. *J Mol Neurosci.* **2018**;66(4):595-603.
16. **Haass C.** Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *Embo j.* **2004**;23(3):483-8.
17. **Takata K, Kitamura Y.** Molecular approaches to the treatment, prophylaxis, and diagnosis of Alzheimer's disease: tangle formation, amyloid- β , and microglia in Alzheimer's disease. *J Pharmacol Sci.* **2012**;118(3):331-7.
18. **Wischik CM, Harrington CR, Storey JM.** Tau-aggregation inhibitor therapy for Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol.* **2014**;88(4):529-39.

19. **Chen Z, Zhong C.** Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurosci Bull.* **2014**;30(2):271-81.
20. **Se Thoe E, Fauzi A, Tang YQ, Chamyuang S, Chia AYY.** A review on advances of treatment modalities for Alzheimer's disease. *Life Sci.* **2021**;276:119129.
21. **Anguela XM, High KA.** Entering the Modern Era of Gene Therapy. *Annu Rev Med.* **2019**;70:273-88.
22. **Lannfelt L, Relkin NR, Siemers ER.** Amyloid- β -directed immunotherapy for Alzheimer's disease. *J Intern Med.* **2014**;275(3):284-95.
23. **Walsh EI, Smith L, Northey J, Rattray B, Cherbuin N.** Towards an understanding of the physical activity-BDNF-cognition triumvirate: A review of associations and dosage. *Ageing Res Rev.* **2020**;60:101044.
24. **Rafii MS, Tuszynski MH, Thomas RG, Barba D, Brewer JB, Rissman RA, et al.** Adeno-Associated Viral Vector (Serotype 2)-Nerve Growth Factor for Patients With Alzheimer Disease: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol.* **2018**;75(7):834-41.
25. **Ishola IO, Jacinta AA, Adeyemi OO.** Cortico-hippocampal memory enhancing activity of hesperetin on scopolamine-induced amnesia in mice: role of antioxidant defense system, cholinergic neurotransmission and expression of BDNF. *Metab Brain Dis.* **2019**;34(4):979-89.
26. **Estrada LD, Oliveira-Cruz L, Cabrera D.** Transforming Growth Factor Beta Type I Role in Neurodegeneration: Implications for Alzheimer's Disease. *Curr Protein Pept Sci.* **2018**;19(12):1180-8.
27. **Schneider JA.** Neuropathology of Dementia Disorders. *Continuum (Minneapolis Minn).* **2022**;28(3):834-51.
28. Association As. Stages of Alzheimer's **2022** [Available from: <https://www.alz.org/alzheimers-dementia/stages>].
29. **Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, Holstege H, Ch  telat G, Teunissen CE, et al.** Alzheimer's disease. *Lancet.* **2021**;397(10284):1577-90.
30. **Terry RD, Katzman R.** Senile dementia of the Alzheimer type. *Ann Neurol.* **1983**;14(5):497-506.
31. **Forman MS, Trojanowski JQ, Lee VM.** Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nat Med.* **2004**;10(10):1055-63.
32. **Prince M, Guerchet M, Prina M.** The global impact of dementia **2013-2050**. 2013.
33. **Braun B, Demling J, Loew TH.** Alzheimer's disease: history, ethics and medical humanities in the context of assisted suicide. *Philos Ethics Humanit Med.* **2022**;17(1):4.
34. **Berchtold NC, Cotman CW.** Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer's disease: Greco-Roman period to the 1960s. *Neurobiol Aging.* **1998**;19(3):173-89.
35. **Tiwari S, Atluri V, Kaushik A, Yndart A, Nair M.** Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *Int J Nanomedicine.* **2019**;14:5541-54.
36. **Kidd PM.** Alzheimer's disease, amnesic mild cognitive impairment, and age-associated memory impairment: current understanding and progress toward integrative prevention. *Altern Med Rev.* **2008**;13(2):85-115.
37. **Prince PM.** World Alzheimer Report **2009**. London, Alzheimer Disease International, 2009. Neurological disorders: public health challenges. 2009.
38. **Ott A, Breteler MM, van Harskamp F, Claus JJ, van der Cammen TJ, Grobbee DE, et al.** Prevalence of Alzheimer's disease and vascular dementia: association with education. The Rotterdam study. *Bmj.* **1995**;310(6985):970-3.

39. **Holtzman DM, Morris JC, Goate AM.** Alzheimer's disease: the challenge of the second century. *Sci Transl Med.* **2011**;3(77):77sr1.
40. **Reiman EM, Chen K, Alexander GE, Caselli RJ, Bandy D, Osborne D, et al.** Correlations between apolipoprotein E epsilon4 gene dose and brain-imaging measurements of regional hypometabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2005**;102(23):8299-302.
41. **Pasqualetti G, Thayanandan T, Edison P.** Influence of genetic and cardiometabolic risk factors in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev.* **2022**;81:101723.
42. **Stern Y.** Cognitive reserve in ageing and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* **2012**;11(11):1006-12.
43. **Eickhoff SB, Constable RT, Yeo BTT.** Topographic organization of the cerebral cortex and brain cartography. *Neuroimage.* **2018**;170:332-47.
44. **Vasković J MD.** [Available from: <https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/cytoarchitecture>.
45. **McConnell SK.** Constructing the cerebral cortex: neurogenesis and fate determination. *Neuron.* **1995**;15(4):761-8.
46. **Tjia M, Yu X, Jammu LS, Lu J, Zuo Y.** Pyramidal Neurons in Different Cortical Layers Exhibit Distinct Dynamics and Plasticity of Apical Dendritic Spines. *Front Neural Circuits.* **2017**;11:43.
47. **Frohlich F.** *Network Neuroscience.* **2016.** p. 85-95.
48. **Molyneaux BJ, Arlotta P, Menezes JR, Macklis JD.** Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci.* **2007**;8(6):427-37.
49. **Ross MH, Pawlina W.** *Histology a Text and Atlas, 6th Edition.* Wolters Kluwer, Lippincott Williams&Wilkins, London; **2011.** p. 380-2.
50. **Arslan O.** *Computational Basis of Neural Elements.* **2016.** p. 29-82.
51. **Dharani K.** A Neuronal Mechanism in the Generation of Thought—A New Molecular Model. **2015.** p. 3-29.
52. **Huttenlocher PR.** Morphometric study of human cerebral cortex development. *Neuropsychologia.* **1990**;28(6):517-27.
53. **Amunts K, Schleicher A, Zilles K.** Cytoarchitecture of the cerebral cortex—More than localization. *NeuroImage.* **2007**;37(4):1061-5.
54. **Jacobs B, Schall M, Prather M, Kapler E, Driscoll L, Baca S, et al.** Regional dendritic and spine variation in human cerebral cortex: a quantitative golgi study. *Cereb Cortex.* **2001**;11(6):558-71.
55. **Agirman G, Broix L, Nguyen L.** Cerebral cortex development: an outside-in perspective. *FEBS Lett.* **2017**;591(24):3978-92.
56. **Chenin L, Lefranc M, Velut S, Foulon P, Havet E, Peltier J.** Cortical and subcortical functional neuroanatomy for low-grade glioma surgery. *Neurochirurgie.* **2017**;63(3):117-21.
57. **Sadler TW.** *Langman's medical embryology: Lippincott Williams & Wilkins;* **2022.**
58. **Moore KL, Persaud T, Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H.** *Klinik yönleri ile insan embriyolojisi: Nobel Tıp Kitabevleri;* **2002.**
59. **Amaral D, Insausti R, Paxinos G.** *The human nervous system.* San Diego: Academic. **1990**:711-55.
60. **Moser MB, Rowland DC, Moser EI.** Place cells, grid cells, and memory. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2015**;7(2):a021808.
61. **Padurariu M, Ciobica A, Mavroudis I, Fotiou D, Baloyannis S.** Hippocampal neuronal loss in the CA1 and CA3 areas of Alzheimer's disease patients. *Psychiatr Danub.* **2012**;24(2):152-8.

62. **Suzuki M, Hagino H, Nohara S, Zhou SY, Kawasaki Y, Takahashi T**, et al. Male-specific volume expansion of the human hippocampus during adolescence. *Cereb Cortex*. **2005**;15(2):187-93.
63. **Parent A, Carpenter MB**. Carpenter's human neuroanatomy: Williams & Wilkins; **1996**.
64. **Waxman SG**. Correlative Neuroanatomy: Lange Medical Books/McGraw-Hill Education; **2002**.
65. **Afifi A, Bergman R**. Functional Neuroanatomy: Text and Atlas, 2nd Edition: Text and Atlas: Lange Medical Books/McGraw-Hill; **2005**.
66. **Sadler TW**. Langman's Medical Embryology Fourteenth Edition: Williams & Wilkins Press; **1990**.
67. **Songur A, Özen Oa, Sarsilmaz M**. Hipokampus. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri*. **2001**:427-31.
68. **Cho Y, Bae HG, Okun E, Arumugam TV, Jo DG**. Physiology and pharmacology of amyloid precursor protein. *Pharmacol Ther*. **2022**;235:108122.
69. **Arbor SC, LaFontaine M, Cumbay M**. Amyloid-beta Alzheimer targets - protein processing, lipid rafts, and amyloid-beta pores. *Yale J Biol Med*. **2016**;89(1):5-21.
70. **Esch FS, Keim PS, Beattie EC, Blacher RW, Culwell AR, Oltersdorf T**, et al. Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science*. **1990**;248(4959):1122-4.
71. **Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH**, et al. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*. **1987**;325(6106):733-6.
72. Correction to: Brain amyloid- β oligomers in ageing and Alzheimer's disease. *Brain*. **2022**;145(8):e72-e6.
73. **Selkoe DJ, Yamazaki T, Citron M, Podlisny MB, Koo EH, Teplow DB**, et al. The role of APP processing and trafficking pathways in the formation of amyloid beta-protein. *Ann N Y Acad Sci*. **1996**;777:57-64.
74. **Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H, Davis D**, et al. Isolation and quantification of soluble Alzheimer's β -peptide from biological fluids. *Nature*. **1992**;359(6393):325-7.
75. **LaFerla FM, Green KN, Oddo S**. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*. **2007**;8(7):499-509.
76. **Allinson TM, Parkin ET, Turner AJ, Hooper NM**. ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J Neurosci Res*. **2003**;74(3):342-52.
77. **Lin X, Koelsch G, Wu S, Downs D, Dashti A, Tang J**. Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2000**;97(4):1456-60.
78. **De Strooper B, Iwatsubo T, Wolfe MS**. Presenilins and γ -secretase: structure, function, and role in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. **2012**;2(1):a006304.
79. **Morishima-Kawashima M**. Molecular mechanism of the intramembrane cleavage of the β -carboxyl terminal fragment of amyloid precursor protein by γ -secretase. *Front Physiol*. **2014**;5:463.
80. **Fernandez MA, Klutkowski JA, Freret T, Wolfe MS**. Alzheimer presenilin-1 mutations dramatically reduce trimming of long amyloid β -peptides (A β) by γ -secretase to increase 42-to-40-residue A β . *J Biol Chem*. **2014**;289(45):31043-52.
81. **Sagare A, Deane R, Bell RD, Johnson B, Hamm K, Pendu R**, et al. Clearance of amyloid-beta by circulating lipoprotein receptors. *Nat Med*. **2007**;13(9):1029-31.

82. **Esbjörner EK, Chan F, Rees E, Erdelyi M, Luheshi LM, Bertoncini CW, et al.** Direct observations of amyloid β self-assembly in live cells provide insights into differences in the kinetics of A β (1-40) and A β (1-42) aggregation. *Chem Biol.* **2014**;21(6):732-42.
83. **Kuperstein I, Broersen K, Benilova I, Rozenski J, Jonckheere W, Debulpaep M, et al.** Neurotoxicity of Alzheimer's disease A β peptides is induced by small changes in the A β 42 to A β 40 ratio. *Embo j.* **2010**;29(19):3408-20.
84. **Uddin MS, Kabir MT, Tewari D, Mamun AA, Mathew B, Aleya L, et al.** Revisiting the role of brain and peripheral A β in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neurol Sci.* **2020**;416:116974.
85. **De Strooper B, Karran E.** The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell.* **2016**;164(4):603-15.
86. **Venegas C, Kumar S, Franklin BS, Dierkes T, Brinkschulte R, Tejera D, et al.** Microglia-derived ASC specks cross-seed amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nature.* **2017**;552(7685):355-61.
87. **Plog BA, Nedergaard M.** The Glymphatic System in Central Nervous System Health and Disease: Past, Present, and Future. *Annu Rev Pathol.* **2018**;13:379-94.
88. **Koper MJ, Van Schoor E, Ospitalieri S, Vandenberghe R, Vandenbulcke M, von Arnim CAF, et al.** Necrosome complex detected in granulovacuolar degeneration is associated with neuronal loss in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **2020**;139(3):463-84.
89. **Glenner GG, Wong CW.** Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun.* **1984**;120(3):885-90.
90. **Hardy JA, Higgins GA.** Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* **1992**;256(5054):184-5.
91. **Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H.** Alzheimer's disease. *The Lancet.* **2006**;368(9533):387-403.
92. **Lustbader JW, Cirilli M, Lin C, Xu HW, Takuma K, Wang N, et al.** ABAD directly links A β to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease. *Science.* **2004**;304(5669):448-52.
93. **Vergara C, Houben S, Suain V, Yilmaz Z, De Decker R, Vanden Dries V, et al.** Amyloid- β pathology enhances pathological fibrillary tau seeding induced by Alzheimer PHF in vivo. *Acta neuropathologica.* **2019**;137:397-412.
94. **Ferreira ST, Klein WL.** The A β oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease. *Neurobiology of learning and memory.* **2011**;96(4):529-43.
95. **Hölttä M, Hansson O, Andreasson U, Hertze J, Minthon L, Nägga K, et al.** Evaluating amyloid- β oligomers in cerebrospinal fluid as a biomarker for Alzheimer's disease. *PloS one.* **2013**;8(6):e66381.
96. **Butterfield DA, Boyd-Kimball D.** Oxidative stress, amyloid- β peptide, and altered key molecular pathways in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease.* **2018**;62(3):1345-67.
97. **Weerasena V, Gordon B, Devasamudram T, Bilcer G, Ghosh AK, Tang J.** In vivo inhibition of Ab production by memapsin 2 (b-secretase) inhibitors. *Journal of Neurochemistry.* **2004**;89:1409-16.
98. **Hawkes CA, Deng LH, Shaw JE, Nitz M, McLaurin J.** Small molecule β -amyloid inhibitors that stabilize protofibrillar structures in vitro improve cognition and pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *European Journal of Neuroscience.* **2010**;31(2):203-13.
99. **Burstein A, Sabbagh M, Andrews R, Valcarce C, Dunn I, Altstiel L.** Development of Azeliragon, an oral small molecule antagonist of the receptor for advanced glycation endproducts, for the potential slowing of loss of cognition in mild Alzheimer's disease. *The journal of prevention of Alzheimer's disease.* **2018**;5:149-54.

100. Aleksis R, Oleskovs F, Jaudzems K, Pahnke J, Biverstål H. Structural studies of amyloid- β peptides: Unlocking the mechanism of aggregation and the associated toxicity. *Biochimie*. **2017**;140:176-92.
101. Benilova I, De Strooper B. Promiscuous Alzheimer's amyloid: yet another partner. *Science*. **2013**;341(6152):1354-5.
102. Abolhassani N, Leon J, Sheng Z, Oka S, Hamasaki H, Iwaki T, et al. Molecular pathophysiology of impaired glucose metabolism, mitochondrial dysfunction, and oxidative DNA damage in Alzheimer's disease brain. *Mechanisms of ageing and development*. **2017**;161:95-104.
103. Ebenezer PJ, Weidner AM, LeVine III H, Markesbery WR, Murphy MP, Zhang L, et al. Neuron specific toxicity of oligomeric amyloid- β : role for JUN-kinase and oxidative stress. *Journal of Alzheimer's Disease*. **2010**;22(3):839-48.
104. Wang X, Su B, Lee H-g, Li X, Perry G, Smith MA, et al. Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *Journal of neuroscience*. **2009**;29(28):9090-103.
105. Wang X, Wang W, Li L, Perry G, Lee H-g, Zhu X. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. **2014**;1842(8):1240-7.
106. Moreira PI, Carvalho C, Zhu X, Smith MA, Perry G. Mitochondrial dysfunction is a trigger of Alzheimer's disease pathophysiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. **2010**;1802(1):2-10.
107. Du H, Guo L, Zhang W, Rydzewska M, Yan S. Cyclophilin D deficiency improves mitochondrial function and learning/memory in aging Alzheimer disease mouse model. *Neurobiology of aging*. **2011**;32(3):398-406.
108. Levin O, Vasenina E. Twenty-five years of the amyloid hypothesis of alzheimer disease: advances, failures and new perspectives. *Zhurnal Nevrologii i Psikiatrii Imeni SS Korsakova*. **2016**;116(6):3-9.
109. Lee VM-Y, Trojanowski JQ. Tau focused drug discovery for Alzheimer's disease and related Neurodegenerative Tauopathies. *Alzheimer: 100 Years and Beyond*. **2006**:333-6.
110. Holcomb L, Gordon MN, McGowan E, Yu X, Benkovic S, Jantzen P, et al. Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nature medicine*. **1998**;4(1):97-100.
111. Cohen RM, Rezai-Zadeh K, Weitz TM, Rentsendorj A, Gate D, Spivak I, et al. A transgenic Alzheimer rat with plaques, tau pathology, behavioral impairment, oligomeric $\text{A}\beta$, and frank neuronal loss. *Journal of Neuroscience*. **2013**;33(15):6245-56.
112. Vossel KA, Xu JC, Fomenko V, Miyamoto T, Suberbielle E, Knox JA, et al. Tau reduction prevents $\text{A}\beta$ -induced axonal transport deficits by blocking activation of GSK3 β . *Journal of Cell Biology*. **2015**;209(3):419-33.
113. Terrill-Usery SE, Mohan MJ, Nichols MR. Amyloid- β (1-42) protofibrils stimulate a quantum of secreted IL-1 β despite significant intracellular IL-1 β accumulation in microglia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. **2014**;1842(11):2276-85.
114. Kitazawa M, Cheng D, Tsukamoto MR, Koike MA, Wes PD, Vasilevko V, et al. Blocking IL-1 signaling rescues cognition, attenuates tau pathology, and restores neuronal β -catenin pathway function in an Alzheimer's disease model. *The Journal of Immunology*. **2011**;187(12):6539-49.
115. Rapoport M, Dawson HN, Binder LI, Vitek MP, Ferreira A. Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2002**;99(9):6364-9.
116. Vossel KA, Zhang K, Brodbeck J, Daub AC, Sharma P, Finkbeiner S, et al. Tau reduction prevents Abeta-induced defects in axonal transport. *Science*. **2010**;330(6001):198.

117. **Castillo-Carranza DL, Guerrero-Muñoz MJ, Sengupta U, Hernandez C, Barrett AD, Dineley K, et al.** Tau immunotherapy modulates both pathological tau and upstream amyloid pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *J Neurosci.* **2015**;35(12):4857-68.
118. **Bloom GS.** Amyloid- β and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *JAMA Neurol.* **2014**;71(4):505-8.
119. **Miller Y, Ma B, Nussinov R.** Synergistic interactions between repeats in tau protein and A β amyloids may be responsible for accelerated aggregation via polymorphic states. *Biochemistry.* **2011**;50(23):5172-81.
120. **Iijima K, Gatt A, Iijima-Ando K.** Tau Ser262 phosphorylation is critical for Abeta42-induced tau toxicity in a transgenic *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet.* **2010**;19(15):2947-57.
121. **Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, Ulrich J, Crowther RA.** Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *Embo j.* **1989**;8(2):393-9.
122. **Sergeant N, David JP, Lefranc D, Vermersch P, Watzel A, Delacourte A.** Different distribution of phosphorylated tau protein isoforms in Alzheimer's and Pick's diseases. *FEBS Lett.* **1997**;412(3):578-82.
123. **Ginsberg SD, Che S, Counts SE, Mufson EJ.** Shift in the ratio of three-repeat tau and four-repeat tau mRNAs in individual cholinergic basal forebrain neurons in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Neurochem.* **2006**;96(5):1401-8.
124. **Kellogg EH, Hejab NMA, Poepsel S, Downing KH, DiMaio F, Nogales E.** Near-atomic model of microtubule-tau interactions. *Science.* **2018**;360(6394):1242-6.
125. **Goedert M, Jakes R.** Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *Embo j.* **1990**;9(13):4225-30.
126. **Hirokawa N, Funakoshi T, Sato-Harada R, Kanai Y.** Selective stabilization of tau in axons and microtubule-associated protein 2C in cell bodies and dendrites contributes to polarized localization of cytoskeletal proteins in mature neurons. *J Cell Biol.* **1996**;132(4):667-79.
127. **Ittner LM, Ke YD, Delerue F, Bi M, Gladbach A, van Eersel J, et al.** Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell.* **2010**;142(3):387-97.
128. **Frandsen ML, De Seranno S, Rush T, Borel E, Elie A, Arnal I, et al.** Activity-dependent tau protein translocation to excitatory synapse is disrupted by exposure to amyloid-beta oligomers. *J Neurosci.* **2014**;34(17):6084-97.
129. **Ahmed T, Van der Jeugd A, Blum D, Galas MC, D'Hooge R, Buee L, et al.** Cognition and hippocampal synaptic plasticity in mice with a homozygous tau deletion. *Neurobiol Aging.* **2014**;35(11):2474-8.
130. **Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O'Keeffe S, et al.** An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of gliya, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci.* **2014**;34(36):11929-47.
131. **LoPresti P.** Regulation and differential expression of tau mRNA isoforms as oligodendrocytes mature in vivo: implications for myelination. *Glia.* **2002**;37(3):250-7.
132. **Lei P, Ayton S, Finkelstein DI, Spoerri L, Ciccotosto GD, Wright DK, et al.** Tau deficiency induces parkinsonism with dementia by impairing APP-mediated iron export. *Nat Med.* **2012**;18(2):291-5.
133. **Marciniak E, Leboucher A, Caron E, Ahmed T, Tailleux A, Dumont J, et al.** Tau deletion promotes brain insulin resistance. *J Exp Med.* **2017**;214(8):2257-69.

134. Avila J, Jiménez JS, Sayas CL, Bolós M, Zabala JC, Rivas G, et al. Tau Structures. *Front Aging Neurosci.* **2016**;8:262.
135. Mukrasch MD, Biernat J, von Bergen M, Griesinger C, Mandelkow E, Zweckstetter M. Sites of tau important for aggregation populate {beta}-structure and bind to microtubules and polyanions. *J Biol Chem.* **2005**;280(26):24978-86.
136. von Bergen M, Friedhoff P, Biernat J, Heberle J, Mandelkow EM, Mandelkow E. Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2000**;97(10):5129-34.
137. Schoch KM, DeVos SL, Miller RL, Chun SJ, Norrbom M, Wozniak DF, et al. Increased 4R-Tau Induces Pathological Changes in a Human-Tau Mouse Model. *Neuron.* **2016**;90(5):941-7.
138. Kahlson MA, Colodner KJ. Gliyal Tau Pathology in Tauopathies: Functional Consequences. *J Exp Neurosci.* **2015**;9(Suppl 2):43-50.
139. Braak H, Thal DR, Ghebremedhin E, Del Tredici K. Stages of the pathologic process in Alzheimer disease: age categories from 1 to 100 years. *J Neuropathol Exp Neurol.* **2011**;70(11):960-9.
140. Sanders DW, Kaufman SK, DeVos SL, Sharma AM, Mirbaha H, Li A, et al. Distinct tau prion strains propagate in cells and mice and define different tauopathies. *Neuron.* **2014**;82(6):1271-88.
141. Michel CH, Kumar S, Pinotsi D, Tunnacliffe A, St George-Hyslop P, Mandelkow E, et al. Extracellular monomeric tau protein is sufficient to initiate the spread of tau protein pathology. *J Biol Chem.* **2014**;289(2):956-67.
142. Guo T, Zhang D, Zeng Y, Huang TY, Xu H, Zhao Y. Molecular and cellular mechanisms underlying the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* **2020**;15(1):40.
143. Wang ZX, Tan L, Yu JT. Axonal transport defects in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol.* **2015**;51(3):1309-21.
144. Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, et al. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1999**;96(7):3922-7.
145. Furukawa K, Sopher BL, Rydel RE, Begley JG, Pham DG, Martin GM, et al. Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *J Neurochem.* **1996**;67(5):1882-96.
146. Skovronsky DM, Moore DB, Milla ME, Doms RW, Lee VM. Protein kinase C-dependent alpha-secretase competes with beta-secretase for cleavage of amyloid-beta precursor protein in the trans-golgi network. *J Biol Chem.* **2000**;275(4):2568-75.
147. Bandyopadhyay S, Goldstein LE, Lahiri DK, Rogers JT. Role of the APP non-amyloidogenic signaling pathway and targeting alpha-secretase as an alternative drug target for treatment of Alzheimer's disease. *Curr Med Chem.* **2007**;14(27):2848-64.
148. Nitsch RM, Slack BE, Wurtman RJ, Growdon JH. Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science.* **1992**;258(5080):304-7.
149. Roberts SB, Ripellino JA, Ingalls KM, Robakis NK, Felsenstein KM. Non-amyloidogenic cleavage of the beta-amyloid precursor protein by an integral membrane metalloendopeptidase. *J Biol Chem.* **1994**;269(4):3111-6.
150. Jorissen E, Prox J, Bernreuther C, Weber S, Schwanbeck R, Serneels L, et al. The disintegrin/metalloproteinase ADAM10 is essential for the establishment of the brain cortex. *J Neurosci.* **2010**;30(14):4833-44.

151. **Postina R, Schroeder A, Dewachter I, Bohl J, Schmitt U, Kojro E, et al.** A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest.* **2004**;113(10):1456-64.
152. **Cole SL, Vassar R.** The Alzheimer's disease beta-secretase enzyme, BACE1. *Mol Neurodegener.* **2007**;2:22.
153. **Creemers JW, Ines Dominguez D, Plets E, Serneels L, Taylor NA, Multhaup G, et al.** Processing of beta-secretase by furin and other members of the proprotein convertase family. *J Biol Chem.* **2001**;276(6):4211-7.
154. **Ehehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K.** Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol.* **2003**;160(1):113-23.
155. **Benjannet S, Elagoz A, Wickham L, Mamarbachi M, Munzer JS, Basak A, et al.** Post-translational processing of beta-secretase (beta-amyloid-converting enzyme) and its ectodomain shedding. The pro- and transmembrane/cytosolic domains affect its cellular activity and amyloid-beta production. *J Biol Chem.* **2001**;276(14):10879-87.
156. **Cordy JM, Hussain I, Dingwall C, Hooper NM, Turner AJ.** Exclusively targeting beta-secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition up-regulates beta-site processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2003**;100(20):11735-40.
157. **Willem M, Garratt AN, Novak B, Citron M, Kaufmann S, Rittger A, et al.** Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science.* **2006**;314(5799):664-6.
158. **Kamal A, Almenar-Queralt A, LeBlanc JF, Roberts EA, Goldstein LS.** Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP. *Nature.* **2001**;414(6864):643-8.
159. **Kalvodova L, Kahya N, Schwille P, Ehehalt R, Verkade P, Drechsel D, et al.** Lipids as modulators of proteolytic activity of BACE: involvement of cholesterol, glycosphingolipids, and anionic phospholipids in vitro. *J Biol Chem.* **2005**;280(44):36815-23.
160. **Ohno M.** Genetic and pharmacological basis for therapeutic inhibition of beta- and gamma-secretases in mouse models of Alzheimer's memory deficits. *Rev Neurosci.* **2006**;17(4):429-54.
161. **Laird FM, Cai H, Savonenko AV, Farah MH, He K, Melnikova T, et al.** BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-beta amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions. *J Neurosci.* **2005**;25(50):11693-709.
162. **Verheijen JH, Huisman LG, van Lent N, Neumann U, Paganetti P, Hack CE, et al.** Detection of a soluble form of BACE-1 in human cerebrospinal fluid by a sensitive activity assay. *Clin Chem.* **2006**;52(6):1168-74.
163. **Zhao J, Fu Y, Yasvoina M, Shao P, Hitt B, O'Connor T, et al.** Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 levels become elevated in neurons around amyloid plaques: implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurosci.* **2007**;27(14):3639-49.
164. **Kim DY, Carey BW, Wang H, Ingano LA, Binshtok AM, Wertz MH, et al.** BACE1 regulates voltage-gated sodium channels and neuronal activity. *Nat Cell Biol.* **2007**;9(7):755-64.
165. **Fukumoto H, Rosene DL, Moss MB, Raju S, Hyman BT, Irizarry MC.** Beta-secretase activity increases with aging in human, monkey, and mouse brain. *Am J Pathol.* **2004**;164(2):719-25.
166. **Velliquette RA, O'Connor T, Vassar R.** Energy inhibition elevates beta-secretase levels and activity and is potentially amyloidogenic in APP transgenic mice: possible early events in Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurosci.* **2005**;25(47):10874-83.
167. **Zhang X, Li Y, Xu H, Zhang YW.** The γ -secretase complex: from structure to function. *Front Cell Neurosci.* **2014**;8:427.

168. **Schedin-Weiss S, Winblad B, Tjernberg LO.** The role of protein glycosylation in Alzheimer disease. *Febs j.* **2014**;281(1):46-62.
169. **Marambaud P, Shioi J, Serban G, Georgakopoulos A, Sarner S, Nagy V, et al.** A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *Embo j.* **2002**;21(8):1948-56.
170. **Ni CY, Murphy MP, Golde TE, Carpenter G.** gamma -Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Science.* **2001**;294(5549):2179-81.
171. **Lammich S, Okochi M, Takeda M, Kaether C, Capell A, Zimmer AK, et al.** Presenilin-dependent intramembrane proteolysis of CD44 leads to the liberation of its intracellular domain and the secretion of an Abeta-like peptide. *J Biol Chem.* **2002**;277(47):44754-9.
172. **Wunderlich P, Glebov K, Kemmerling N, Tien NT, Neumann H, Walter J.** Sequential proteolytic processing of the triggering receptor expressed on myeloid cells-2 (TREM2) protein by ectodomain shedding and γ -secretase-dependent intramembraneous cleavage. *J Biol Chem.* **2013**;288(46):33027-36.
173. **Kopan R, Ilagan MX.** The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell.* **2009**;137(2):216-33.
174. **Andersson ER, Sandberg R, Lendahl U.** Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development.* **2011**;138(17):3593-612.
175. **Proctor CJ, Pienaar IS, Elson JL, Kirkwood TB.** Aggregation, impaired degradation and immunization targeting of amyloid-beta dimers in Alzheimer's disease: a stochastic modelling approach. *Mol Neurodegener.* **2012**;7:32.
176. **Imbimbo BP, Panza F, Frisardi V, Solfrizzi V, D'Onofrio G, Logroscino G, et al.** Therapeutic intervention for Alzheimer's disease with γ -secretase inhibitors: still a viable option? *Expert Opin Investig Drugs.* **2011**;20(3):325-41.
177. **Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM, Sporn MB.** New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1981**;78(9):5339-43.
178. **Roberts AB, Lamb LC, Newton DL, Sporn MB, De Larco JE, Todaro GJ.** Transforming growth factors: isolation of polypeptides from virally and chemically transformed cells by acid/ethanol extraction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1980**;77(6):3494-8.
179. **Santibañez JF, Quintanilla M, Bernabeu C.** TGF- β /TGF- β receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond).* **2011**;121(6):233-51.
180. **Attisano L, Wrana JL.** Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science.* **2002**;296(5573):1646-7.
181. **Böttner M, Kriegstein K, Unsicker K.** The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions. *J Neurochem.* **2000**;75(6):2227-40.
182. **Daopin S, Piez KA, Ogawa Y, Davies DR.** Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily. *Science.* **1992**;257(5068):369-73.
183. **Roberts AB SM.** The transforming growth factor-bs. *Peptide Growth Factors and Their Receptors—Berlin: Springer.* **1990**:419-72.
184. **Harpel JG, Metz CN, Kojima S, Rifkin DB.** Control of transforming growth factor- β activity: latency vs. activation. *Progress in growth factor research.* **1992**;4(4):321-35.
185. **Schultz-Cherry S, Murphy-Ullrich JE.** Thrombospondin causes activation of latent transforming growth factor-beta secreted by endothelial cells by a novel mechanism. *The Journal of cell biology.* **1993**;122(4):923-32.

186. **Roberts A, Sporn M.** Mechanistic interrelationships between two superfamilies: the steroid/retinoid receptors and transforming growth factor-beta. *Cancer surveys*. **1992**;14:205-20.
187. **Massagué J.** TGFbeta signaling: receptors, transducers, and Mad proteins. *Cell*. **1996**;85(7):947-50.
188. **de Caestecker MP, Hemmati P, Larisch-Bloch S, Ajmera R, Roberts AB, Lechleider RJ.** Characterization of functional domains within Smad4/DPC4. *J Biol Chem*. **1997**;272(21):13690-6.
189. **Zhang Y, Feng X, We R, Derynck R.** Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF-beta response. *Nature*. **1996**;383(6596):168-72.
190. **Zhang J, Zhang X, Xie F, Zhang Z, van Dam H, Zhang L, et al.** The regulation of TGF- β /SMAD signaling by protein deubiquitination. *Protein Cell*. **2014**;5(7):503-17.
191. **Itoh S, Itoh F, Goumans MJ, Ten Dijke P.** Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur J Biochem*. **2000**;267(24):6954-67.
192. **Clarke DC, Betterton MD, Liu X.** Systems theory of Smad signalling. *Syst Biol (Stevenage)*. **2006**;153(6):412-24.
193. **Emsley JG, Mitchell BD, Kempermann G, Macklis JD.** Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells. *Prog Neurobiol*. **2005**;75(5):321-41.
194. **Ming GL, Song H.** Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*. **2011**;70(4):687-702.
195. **Vivien D, Ali C.** Transforming growth factor-beta signalling in brain disorders. *Cytokine Growth Factor Rev*. **2006**;17(1-2):121-8.
196. **De Groot CJ, Montagne L, Barten AD, Sminia P, Van Der Valk P.** Expression of transforming growth factor (TGF)-beta1, -beta2, and -beta3 isoforms and TGF-beta type I and type II receptors in multiple sclerosis lesions and human adult astrocyte cultures. *J Neuropathol Exp Neurol*. **1999**;58(2):174-87.
197. **Moustakas A, Heldin CH.** The regulation of TGFbeta signal transduction. *Development*. **2009**;136(22):3699-714.
198. **Logan TT, Villapol S, Symes AJ.** TGF- β superfamily gene expression and induction of the Runx1 transcription factor in adult neurogenic regions after brain injury. *PLoS One*. **2013**;8(3):e59250.
199. **Werry EL, Enjeti S, Halliday GM, Sachdev PS, Double KL.** Effect of age on proliferation-regulating factors in human adult neurogenic regions. *J Neurochem*. **2010**;115(4):956-64.
200. **Luo J, Lin AH, Masliah E, Wyss-Coray T.** Bioluminescence imaging of Smad signaling in living mice shows correlation with excitotoxic neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **2006**;103(48):18326-31.
201. **Kandasamy M, Reilmann R, Winkler J, Bogdahn U, Aigner L.** Transforming growth factor-beta signaling in the neural stem cell niche: a therapeutic target for Huntington's disease. *Neurology research international*. **2011**;2011.
202. **Villapol S, Logan TT, Symes AJ.** Role of TGF- β signaling in neurogenic regions after brain injury. *Trends in cell signaling pathways in neuronal fate decision*. **2013**:3-36.
203. **Yin J, Sakamoto K, Zhang H, Ito Z, Imagama S, Kishida S, et al.** Transforming growth factor- β 1 upregulates keratan sulfate and chondroitin sulfate biosynthesis in microglia after brain injury. *Brain research*. **2009**;1263:10-22.
204. **Boche D, Cunningham C, Gauldie J, Perry VH.** Transforming growth factor- β 1-mediated neuroprotection against excitotoxic injury in vivo. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. **2003**;23(10):1174-82.

205. **Ma M, Ma Y, Yi X, Guo R, Zhu W, Fan X, et al.** Intranasal delivery of transforming growth factor-beta1 in mice after stroke reduces infarct volume and increases neurogenesis in the subventricular zone. *BMC neuroscience*. **2008**;9:1-10.
206. **Battista D, Ferrari CC, Gage FH, Pitossi FJ.** Neurogenic niche modulation by activated microglia: transforming growth factor β increases neurogenesis in the adult dentate gyrus. *European Journal of Neuroscience*. **2006**;23(1):83-93.
207. **El Khoury J, Luster AD.** Mechanisms of microglia accumulation in Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Trends in pharmacological sciences*. **2008**;29(12):626-32.
208. **Ma Y-P, Ma M-M, Ge S, Guo R-B, Zhang H-J, Frey II WH, et al.** Intranasally delivered TGF- β 1 enters brain and regulates gene expressions of its receptors in rats. *Brain research bulletin*. **2007**;74(4):271-7.
209. **Santambrogio L, Hochwald GM, Saxena B, Leu C-H, Martz J, Carlino J, et al.** Studies on the mechanisms by which transforming growth factor-beta (TGF-beta) protects against allergic encephalomyelitis. Antagonism between TGF-beta and tumor necrosis factor. *Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950)*. **1993**;151(2):1116-27.
210. **Hamaguchi M, Muramatsu R, Fujimura H, Mochizuki H, Kataoka H, Yamashita T.** Circulating transforming growth factor- β 1 facilitates remyelination in the adult central nervous system. *Elife*. **2019**;8:e41869.
211. **Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Bretscher A, et al. & Matsudaira, P.**(2008). *Molecular cell biology*.
212. **Hausmann Ob.** Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal cord*. **2003**;41(7):369-78.
213. **Stadelmann C, Deckwerth TL, Srinivasan A, Bancher C, Brück W, Jellinger K, et al.** Activation of caspase-3 in single neurons and autophagic granules of granulovacuolar degeneration in Alzheimer's disease: evidence for apoptotic cell death. *The American journal of pathology*. **1999**;155(5):1459-66.
214. **Henrich-Noack P, Prehn J, Kriegelstein J.** TGF- β 1 protects hippocampal neurons against degeneration caused by transient global ischemia: dose-response relationship and potential neuroprotective mechanisms. *Stroke*. **1996**;27(9):1609-15.
215. **Buisson A, Nicole O, Docagne F, Sartelet H, Mackenzie ET, Vivien D.** Up-regulation of a serine protease inhibitor in astrocytes mediates the neuroprotective activity of transforming growth factor β 1. *The FASEB Journal*. **1998**;12(15):1683-91.
216. **Srivastava S, Ahmad R, Khare SK.** Alzheimer's disease and its treatment by different approaches: A review. *Eur J Med Chem*. **2021**;216:113320.
217. **Chen ZY, Zhang Y.** Animal models of Alzheimer's disease: Applications, evaluation, and perspectives. *Zool Res*. **2022**;43(6):1026-40.
218. **Sudeep HV, Venkatakrishna K, Amritharaj, Gouthamchandra K, Reethi B, Naveen P, et al.** A standardized black pepper seed extract containing β -caryophyllene improves cognitive function in scopolamine-induced amnesia model mice via regulation of brain-derived neurotrophic factor and MAPK proteins. *Journal of Food Biochemistry*. **2021**;45(12):e13994.
219. **Gutierrez JM, Carvalho FB, Schetinger MR, Agostinho P, Marisco PC, Vieira JM, et al.** Neuroprotective effect of anthocyanins on acetylcholinesterase activity and attenuation of scopolamine-induced amnesia in rats. *Int J Dev Neurosci*. **2014**;33:88-97.
220. **Vorhees CV, Williams MT.** Assessing spatial learning and memory in rodents. *Ilar j*. **2014**;55(2):310-32.

221. **Djeuzong E, Kandeda AK, Djiogue S, Stéphanie L, Nguedia D, Ngueguim F, et al.** Antiamnesic and Neuroprotective Effects of an Aqueous Extract of *Ziziphus jujuba* Mill. (Rhamnaceae) on Scopolamine-Induced Cognitive Impairments in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* **2021**;2021:5577163.
222. **Nakazato F, Tada T, Sekiguchi Y, Murakami K, Yanagisawa S, Tanaka Y, et al.** Disturbed Spatial Learning of Rats After Intraventricular Administration of Transforming Growth Factor- β 1. *Neurologia medico-chirurgica.* **2002**;42(4):151-7.
223. **Caraci F, Battagliya G, Bruno V, Bosco P, Carbonaro V, Giuffrida ML, et al.** TGF- β 1 pathway as a new target for neuroprotection in Alzheimer's disease. *CNS Neurosci Ther.* **2011**;17(4):237-49.
224. **Patel P, Shah J.** Vitamin D(3) supplementation ameliorates cognitive impairment and alters neurodegenerative and inflammatory markers in scopolamine induced rat model. *Metab Brain Dis.* **2022**;37(8):2653-67.
225. **Upadhaya AR, Lungrin I, Yamaguchi H, Fändrich M, Thal DR.** High-molecular weight A β oligomers and protofibrils are the predominant A β species in the native soluble protein fraction of the AD brain. *J Cell Mol Med.* **2012**;16(2):287-95.
226. **Schober A, Peterziel H, von Bartheld CS, Simon H, Kriegelstein K, Unsicker K.** GDNF applied to the MPTP-lesioned nigrostriatal system requires TGF-beta for its neuroprotective action. *Neurobiol Dis.* **2007**;25(2):378-91.
227. **Murer MG, Yan Q, Raisman-Vozari R.** Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* **2001**;63(1):71-124.
228. **Sehar U, Rawat P, Reddy AP, Kopel J, Reddy PH.** Amyloid Beta in Aging and Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* **2022**;23(21).
229. **Gallardo G, Holtzman DM.** Amyloid- β and Tau at the Crossroads of Alzheimer's Disease. *Tau Biology.* **2019**:187-203.
230. **Syed Z, Shal B, Azhar A, Amanat S, Khan A, Ali H, et al.** Pharmacological mechanism of xanthoangelol underlying Nrf-2/TRPV1 and anti-apoptotic pathway against scopolamine-induced amnesia in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* **2022**;150:113073.
231. **Assi A-A, Abdelnabi S, Attaai A, Abd-Ellatif RB.** Effect of ivabradine on cognitive functions of rats with scopolamine-induced dementia. *Scientific Reports.* **2022**;12(1):16970.
232. **Mullane K, Williams M.** Alzheimer's disease (AD) therapeutics–1: Repeated clinical failures continue to question the amyloid hypothesis of AD and the current understanding of AD causality. *Biochemical Pharmacology.* **2018**;158:359-75.
233. **Weller RO, Subash M, Preston SD, Mazanti I, Carare RO.** Perivascular drainage of amyloid-beta peptides from the brain and its failure in cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease. *Brain pathology (Zurich, Switzerland).* **2008**;18(2):253-66.
234. **Morley JE, Farr SA.** The role of amyloid-beta in the regulation of memory. *Biochemical pharmacology.* **2014**;88(4):479-85.
235. **Mehta D, Jackson R, Paul G, Shi J, Sabbagh M.** Why do trials for Alzheimer's disease drugs keep failing? A discontinued drug perspective for 2010-2015. *Expert opinion on investigational drugs.* **2017**;26(6):735-9.
236. **Dhage PA, Sharbidre AA, Magdum SM.** Interlacing the relevance of caspase activation in the onset and progression of Alzheimer's Disease. *Brain Research Bulletin.* **2022**.
237. **Nakamura M, Li Y, Choi BR, Matas-Rico E, Troncoso J, Takahashi C, et al.** GDE2-RECK controls ADAM10 α -secretase-mediated cleavage of amyloid precursor protein. *Sci Transl Med.* **2021**;13(585).

238. **Brummer T, Müller SA, Pan-Montojo F, Yoshida F, Fellgiebel A, Tomita T, et al.** NrCAM is a marker for substrate-selective activation of ADAM10 in Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med.* **2019**;11(4).
239. **Lichtenthaler SF, Tschirner SK, Steiner H.** Secretases in Alzheimer's disease: Novel insights into proteolysis of APP and TREM2. *Curr Opin Neurobiol.* **2022**;72:101-10.
240. **Di Fede G, Catania M, Morbin M, Rossi G, Suardi S, Mazzoleni G, et al.** A recessive mutation in the APP gene with dominant-negative effect on amyloidogenesis. *Science.* **2009**;323(5920):1473-7.
241. **Hampel H, Vassar R, De Strooper B, Hardy J, Willem M, Singh N, et al.** The β -secretase BACE1 in Alzheimer's disease. *Biological psychiatry.* **2021**;89(8):745-56.
242. **Jin C, Wang J, Wang Y, Jia B, Guo X, Yang G, et al.** Modulation of amyloid precursor protein cleavage by γ -secretase activating protein through phase separation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2022**;119(12):e2122292119.
243. **Hur JY.** γ -Secretase in Alzheimer's disease. *Exp Mol Med.* **2022**;54(4):433-46.
244. **Yang G, Zhou R, Guo X, Yan C, Lei J, Shi Y.** Structural basis of γ -secretase inhibition and modulation by small molecule drugs. *Cell.* **2021**;184(2):521-33.e14.