

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Biyofizik Anabilim Dalı**

**DENEYSEL ALZHEİMER MODELİNDE OLUŞAN
KOMPLİKASYONLARA ROSMARİNİK ASİDİN
ETKİSİ**

Deniz KANTAR

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2009

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Biyofizik Anabilim Dalı**

DENEYSEL ALZHEİMER MODELİNDE OLUŞAN KOMPLİKASYONLARA ROSMARİNİK ASİDİN ETKİSİ

Deniz KANTAR

Yüksek Lisans Tezi

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Piraye YARGIÇOĞLU**

**Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2008.02.0122.004)**

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

Antalya, 2009

ÖZET

Alzheimer hastalığı bilişsel fonksiyonlarda ve davranışlarda ilerleyici bozukluk ile karakterize edilen yaygın bir demans türüdür. Çalışmamızda antioksidan ve anti-inflammatuar özellikleri olan rosmarinik asidin Alzheimer hastalığında oluşan komplikasyonlara etkisi öğrenme parametreleri, histolojik ve biyokimyasal analizler yardımıyla araştırılmıştır. Deneysel Alzheimer modeli, ovaryektomi yapılmış dişi sıçanlara uzun süreli D-galaktoz uygulamasıyla oksidatif stresin ve östrojen azalmasının sinerjik çalışması sağlanarak kurulmuştur.

Çalışmamızda 100 adet 5 aylık Wistar dişi sıçan, her grupta 20 hayvan olacak şekilde rastgele bölünerek kontrol(K), sham(Sh), ovaryektomi+galaktoz(OD), ovaryektomi+Rosmarinik(R) ve ovaryektomi+galaktoz+rosmarinik(ODR) grupları oluşturulmuştur. Altmış günlük deney süresi boyunca OD ve ODR gruplarına ovaryektomi ardından enjeksiyon yoluyla 80 mg/kg/gün D-galaktoz, ODR ve R gruplarına gavaj yoluyla 50 mg/kg/gün rosmarinik asit verilmiştir. Deney süresinin sonunda Y labirent ve lokomotor aktivite testleri uygulandıktan sonra, sıçanların beyin dokuları çıkarılarak lipid peroksidasyon için TBARS, PGE2 düzeylerini değerlendirmek için ELİSA testleri yapılmıştır.

Alzheimer grubunda TBARS değerlerinin K, S, ODR ve R gruplarına göre anlamlı düzeyde arttığı ve ODR grubunda rosmarinik asitin lipid peroksidasyonu azaltarak bilişsel fonksiyonlarda düzelme sağladığı görülmüştür. Ayrıca, inflamasyonun göstergesi olan PGE2 düzeyinin OD grubunda anlamlı şekilde arttığı, tedavi uygulanan ODR grubunda ise bu artışın önlendiği izlenmiştir. Histolojik incelemeler sonucu OD grubundan alınan hücrelerde yapısal bozukluklar gözlenirken, immunboyamalar ile hipokampusta A β birikimleri saptanmıştır. Tedavi uygulanan ODR grubunda hücre yapılarının normale döndüğü ve A β birikimlerinin azaldığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda, Alzheimer grubunda lipid peroksidasyonun, inflamasyonun ve hafıza bozukluğunun arttığı, rosmarinik asitin bu parametrelerde düzelme sağladığı saptanırken, kurulan Alzheimer modelinin hastalıkla ilgili başka çalışmalarda kullanılabileceği ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Rosmarinik asit, Lipid peroksidasyon, İnflamasyon, Öğrenme ve Hafıza

ABSTRACT

Alzheimer's Disease(AD) is a common type of dementia characterized as a progressive defectiveness in cognition and behaviour. The aim of this study was to assess the effects of antioxidant and antiinflammatory properties of rosmarinic acid to the complications of AD by cognitive and biochemical parameters. Alzheimer model induced with administration of D-galactose to ovariectomized rats by using synergistic effects of estrogen deprivation and oxidative stress.

In our work, 100 wistar rats are divided randomly into five groups; Control(C), Sham(Sh),rosmarinic(R),ovariectomy+D-galactose+rosmarinic(ODR), ovariectomy+D-galactose(OD) groups. OD and ODR groups were ovariectomised and administered 80 mg/kg/day D-galactose by injection, ODR and R groups were received 50mg/kg/day rosmarinic acid(RA) via gavage for 60 days. At the end of the experimental period behavioral tests were carried out and brain tissues were extracted. Then TBARS test for lipid peroxidation and ELISA test for PGE2 was employed.

Increased TBARS values was detected in Alzheimer group compared to other groups and RA improved the cognitive functions in ODR group by attenuating the lipid peroxidation. PGE2 levels were higher in OD group than in other groups and rosmarinic acid treatment inhibited this elevation in ODR rats. Histopathological alterations and A β depositions were observed in the OD group. Normal cell structure and lower A β depositions were observed in the ODR group.

In conclusion, our study clearly showed that lipid peroxidation, inflammation and cognitive deficit increased in OD group and rosmarinic acid had curative effect on this parameters. And also, this new Alzheimer model can be use for other researches about AD.

Key words: Rosmarinic acid, Lipid peroxidation, Inflammation, Learning and Memory

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın gerçekleşmesinde yol gösteren ve araştırmanın her aşamasında destek olan hocam Prof. Dr. Piraye YARGIÇOĞLU'na, özverili çalışmalarından dolayı Prof. Dr. Aysel AĞAR'a, bana her aşamada yardımcı olan, Prof. Dr. Necdet DEMİR ve Araş. Gör. Nihal ÖZTÜRK'e, teknik olanakları ile bu çalışmanın belirli basamaklarının gerçekleşmesini sağlayan Yrd. Doç. Dr. Ayhan TOPUZ ve Merkez Araştırma Laboratuvarı ve Deney Hayvanları Ünitesi çalışanlarına teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xiii
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	6
2.1. Alzheimer Hastalığı	6
2.1.1. Alzheimer Hastalığının Epidemiyolojisi	6
2.1.2. Alzheimer Hastalığının Patogenezi	7
2.1.3. Oksidatif Stres ve Alzheimer Hastalığı	8
2.1.4. Alzheimer Hastalığı ve İnflamasyon	11
2.2. Alzheimer Hastalığının Tedavisi	14
2.2.1. Transmitter yerine koyma tedavisi	15
2.2.2. Nörotrofik faktörler, östrojen terapisi	15
2.2.3. Amiloid İşlemine Etkilemesi Beklenen İlaçlar	15
2.2.4. Kolesterol Sentez İnhibitörleri (Statinler)	16
2.2.5. Aşılama	16
2.2.6. Antioksidanlar	16
2.2.7. Antiinflatuar ilaçlar	17
2.3. Rosmarinik Asit	17
2.3.1. Rosmarinik asitin anti-inflatuar etkileri	17
2.3.2. Rosmarinik asit ve Alzheimer Hastalığı	18
2.4. Alzheimer Hayvan Modelleri	18
2.4.1. Alüminyum indüklü model	19
2.4.2. Beynin Belli Bölgelerinde Lezyon Oluşturulması	19
2.4.3. Amiloid Beta Enjeksiyonu ile Oluşturulan Modeller	19
2.4.4. Transjenik Hayvan Modelleri	19

2.5. Ovaryektomi ve D-Galaktoz ile Kurulan Alzheimer Modeli	21
2.5.1. Dendritik Sinaps Oluşumuna Östrojenin Etkisi	21
2.5.2. Sinaptik İletim	22
2.5.3. Östrojenin Nörokoruyucu Etkisi	22
2.5.4. D-Galaktozun Beynimize Etkisi	23
2.6. Öğrenme ve Hafızı	25
2.6.1. Uzun Süreli Güçlenme	28
2.6.2. LTP'nin Hücresel Mekanizması	29
2.6.3. Öğrenme Deneyleri	31
GEREÇLER VE YÖNTEMLER	35
3.1. Gruplandırma ve Deney Protokolü	35
3.2. Öğrenme Parametrelerinin Tayini	36
3.2.1. Y-labirent Testi	36
3.2.2. Lokomotor Aktivite Testi	37
3.3. Biyokimyasal Parametrelerin Tayini	37
3.3.1. Doku Tiyobarbitürik Asit Reaktif Ürünlerinin Ölçümleri	37
3.3.2. Protein Tayini	38
3.3.3. PGE2 Tayini	38
3.4. İmmunohistokimyasal Parametrelerin Tayini	39
3.5. Elektron mikroskobu incelemesi	39
3.6. Sonuçların Değerlendirilmesi	40
BULGULAR	41
4.1. Genel Görünüm	41
4.2. Besin Tüketimi	41
4.3. Ağırlık Değişimi	41
4.4. Doku Tiyobarbitürik Asit Reaktif Ürünleri (TBARS) Sonuçları	43
4.5. Y-maze Testi Sonuçları	43
4.6. Lokomotor Aktivite Testi Sonuçları	45
4.7. PGE2 Tayini Sonuçları	47
4.8. İmmunohistokimya Sonuçları	49
4.9. Elektron mikroskop Analizi Sonuçları	52
TARTIŞMA	58
SONUÇLAR	65
KAYNAKLAR	66
ÖZGEÇMİŞ	87

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AH	: Alzheimer
4HNE	: 4-hidroksi-2-nonenal
NFT	: nörofilament kümeleri
COX	: siklooksijenaz
PGE2	: prostaglandin E 2
A β	: amiloid beta
RA	: rosmarinik asit
APP	: amiloid prekürsör protein
SOD	: süperoksit dismutaz
AGE	: ileri glikolizasyon son ürünleri
ROS	: reaktif oksijen türleri
NSAIDS	: non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar
TPA	: 12-O-tetradekanoilforbol 13-asetat
ICV	: intraserebroventriküler
LTP	: uzun süreli potansiyasyon
İNOS	: indüklenabilir nitrik oksit sentaz
OD	: ovaryektomi D-galaktoz grubu
ODR	: ovaryektomi D-galaktoz rosmarinik asit grubu
SH	: sham grubu
R	: rosmarinik grubu
K	: kontrol grubu
GSH	: glutasyon
CAT	: katalaz
GSH-Px	: glutasyon peroksidaz
MDA	: malondialdehit
NO	: nitrik oksit
PUFA:	: poliansatüre yağ asitleri
TBA	: 2- thiobarbitürik asit
TBARS	: tiobarbitürik asit reaktif ürünleri
PHF	: çiftlenmiş helikal filamentler
sAPP	: çözülebilir amiloid prekürsör proteini
GFAP	: glial fibriller asidik protein
IL	: interlökin
TNF α	: tümör nekrozis faktör alfa
TGF	: transforming büyüme faktörü
NGF	: sinir büyüme faktörü
CVF	: kobra zehiri faktörü
IgA	: immünglobulin A
QN	: kuinolinik asit
QA	: kuiskualik asit
İBO	: ibotenik asit
KA	: kainik asit
NMDA	: N-metil D- aspartat

PDGF	: trombosit kökenli büyüme faktörü
Prp	: prion prekürsör protein
EGF	: epitelial büyüme faktörü
IGF	: insülin benzeri büyüme faktörü
BDGF	: beyin kökenli büyüme faktörü
AMPA	: a-amino-3 hidroksi 5-metil- 4 isoxazole propionik asit
Ca ⁺	: kalsiyum
Na	: sodyum
K	: potasyum
CA1	: CA1 piramidal hücreleri
IP3	: 1, 4, 5, trifosfat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
2.1.	Alzheimer Hastalığında gözlenen diffüz atrofi	6
2.2.	Amiloid Prekürsör Proteinin kesilmesi	7
2.3.	Oksidatif stres ve Alzheimer Hastalığı	10
2.4.	Astrosit ve mikroglia aktivasyonu	12
2.5.	Araşidonik asit yolağı	13
2.6.	D-galaktoz metabolizması	23
2.7.	Hipokampüsün anatomik organizasyonu	27
2.8.	LTP mekanizması	30
2.9.	Radyal kollu labirent	31
2.10.	Morris su tankı	31
2.11.	Barnes labirenti	32
2.12.	T labirenti	32
2.13.	Y labirenti	33
2.14.	Lokomotor aktivite kafesi	34
3.1.	Y labirenti	36
3.2.	Lokomotor aktivite kafesi	37
4.1.	Y-maze testi sonuçlarının gruplara göre dağılımı	44
4.2.	Ambulatuvar hareket sonuçları	46
4.3.	Dinleme oranları sonuçları	46
4.4.	Katedilen toplam mesafe analizi	47
4.5.	PGE2 tayini sonuçları	48
4.6.	Kontrol ve Sham grubuna ait immunohistokimyasal sonuçlar	50
4.7.	ROS grubuna ait immunohistokimyasal sonuçlar	50
4.8.	OD grubuna ait immunohistokimyasal sonuçlar	51
4.9.	ODR grubuna ait immunohistokimyasal sonuçlar	51
4.10.	Kontrol grubuna ait elektron mikroskopi sonucu (Piramidal nöron)	52
4.11.	Kontrol grubuna ait elektron mikroskopi sonucu (Hipokampus CA1 bölgesi)	52

4.12.	Kontrol grubuna ait elektron mikroskopi sonucu (Dentat girus)	53
4.13.	Kontrol grubuna ait elektron mikroskopi sonucu (Granül hücre)	53
4.14.	Rosmarinik asit grubuna ait elektron mikroskopi sonucu	54
4.15.	OD grubuna ait elektron mikroskopi sonucu	54
4.16.	OD grubuna ait elektron mikroskopi sonucu	55
4.17.	OD grubuna ait elektron mikroskopi sonucu	55
4.18.	ODR grubuna ait elektron mikroskopi sonucu	56
4.19.	ODR grubuna ait elektron mikroskopi sonucu	56
4.20.	ODR grubuna ait elektron mikroskopi sonucu	57

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
2.1. İçeriğine göre hafızanın sınıflandırılması	26
4.1. Yem tüketimi ve ağırlık değişimi	42
4.2. Kontrol ve deney gruplarındaki beyin TBARS değerleri	43
4.3. Lokomotor aktivite testi sonuçları	45
4.4. Hipokampus PGE2 değerleri	48

GİRİŞ

Yaşın ilerlemesine paralel olarak insanların tanıma, kavrama gibi bilişsel ve fiziksel yeteneklerini kaybettiği uzun süredir bilinen bir gerçektir. Ortalama yaşam süresi ondokuzuncu yüzyılda 50 yıl civarındayken, günümüzde mortalite hızının azalması ile 80 yıla yaklaşmıştır. Dolayısıyla, yirminci yüzyılda tıptaki gelişmelere paralel olarak yaşlı popülasyonun artması toplumda demansı önemli bir sağlık problemi haline getirmiş, hafıza kaybına yol açan bilişsel hastalıkların tanısının konulabilmesi ve birbirinden ayırt edilebilmesi için bir çok araştırma yapılması gerekmiştir. Bu incelemelerin sonucunda Alzheimer (AH) hastalığının, yaşlı popülasyonu oluşturan 65 yaş üzeri kişilerde tüm demans vakalarının %50-70'ini, 85 yaş üzerindeki kişilerde ise %20-47'sini oluşturduğu saptanmıştır (1).

Alzheimer hastalığı ilk kez 1907'de Alois Alzheimer tarafından ilerleyici bilişsel ve kognitif bozulma ile başlayan ve ölümle sonuçlanan nörodejeneratif bir hastalık olarak tanımlanmıştır (2). İlk yıllarda hastalıkla ilgili değişikliklerin tek bir nedene bağlı olduğu düşünülüyordu. Ancak daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalar, AH hastalığının klinik ve patolojik açıdan heterojen bir hastalık olduğuna dair önemli kanıtlar elde edilmesini sağlamıştır. Alzheimer hastalığı primer olarak gri cevheri ve buradaki hücreleri etkileyen dejeneratif bir hastalık olup, bilişsel fonksiyonlarda ve davranışlarda ilerleyici bozukluk ile karakterize edilen bir demans türüdür (3). Makroskopik patoloji bulgusu, özellikle korteks ve hipokampusta tespit edilen diffüz atrofidir. Buna ilave patolojik veriler hücre içinde biriken nörofibriller yumaklar, ekstrasellüler yerleşimli amiloid plaklar, granülovakuoler dejenerasyon, sinaps sayısında azalma, hipokampus, asosiyasyon korteksi ve Meynert'in bazal nükleusunda oluşan kolinerjik hücre kayıplarıdır (4).

Hastalığın patogenezi en iyi açıklayan hipotezde, anahtar rol oynayan amiloid betanın ($A\beta$) artması ve amiloid fibrillerinin uzamasıyla ilişkili çeşitli fizyolojik basamakların tetiklenmesi sonucu AH hastalığının geliştiği öne sürülmüştür (5). Amiloid β peptidi, amiloid prekürsör proteininin (APP) sekretazlarla kopartılması sonucu oluşmaktadır (6). Amiloid prekürsör protein hemen her hücrede eksprese olan tek transmembran bölgesi olan bir proteindir. Bu proteinin α sekretaz yoluyla kesilmesi solübl APP (sAPP), ardı ardına β ve gamma sekretaz yoluyla kesilmesi ise $A\beta$ proteinlerinin oluşmasına yol açar (6). Solübl APP'nin trofik etkilerle dendritik spin büyümesi ve sinaptik kontakt oluşumuna yol açtığı, hücre içi kalsiyum regülasyonu gibi önemli fizyolojik fonksiyonlarda da işlev gördüğü düşünülmektedir (5, 7). Alzheimer hastalığında, β yolunun daha aktif duruma geçmesiyle $A\beta$ proteinlerinin artmasına paralel olarak sAPP'nin de oluşmaması patolojik süreçlerin hızlanmasında kritik bir rol oynar (7). Ayrıca, amiloid plakların kümelenmesinde $A\beta$ 42 peptidinin $A\beta$ 40' dan daha fazla etkili olduğu saptanmıştır (5). Amiloid β artışını takiben senil plaklar, nörofibriller yumaklar ve nöron kaybı gelişmektedir. Amiloid beta'nın fibriller oluşturup lokal mikroglia ve astrositleri aktive ettiği, bu hücrelerden salınan moleküllerin nöronlarda nörotoksik ve nörotrofik etkiler yarattığı bilinmektedir (5). Bu nörotoksik etkilere maruz kalan nöronlarda dejeneratif

değişiklikler ortaya çıkmaktadır. Örneğin mikrotübüllerde bulunan tau proteini hiperfosforilize olarak "paired helical filament"leri (PHF) oluşturmaktadır. Böylece nöron soma ve dendritlerinde gelişen yapısal ve fonksiyonel değişiklikler, nöron kaybına, birçok nörotransmitterin eksikliğine ve biyokimyasal değişikliklere neden olmaktadır. Özet olarak, A β peptidleri ya doğrudan hücre yüzeyi bileşenleri ile etkileşip apoptotik sinyali tetikleyerek ya da dolaylı olarak astrosit ve mikrogliya aktivasyonu ile fazla miktarda inflamatuvar sitokinler üreterek nörodejeneratif değişiklikleri tetiklemektedir (5, 8). Ayrıca A β 'nın kalsiyum ve sodyum kanallarını etkileyerek sitotoksisteye neden olduğu düşünülmektedir (9). Neticede tüm bu basamaklar nöronların programlanmış hücre ölümü apoptoz ile sonlanmaktadır.

Alzheimer hastalığında erken olgularla ilintili olarak inflamasyonun ve oksidatif stresin merkezi rolleri olduğu kuvvetli kanıtlarla gösterilmiştir (5,8,10). İnflamasyon bakteri, travma, kimyasal maddeler, sıcaklık ve herhangi diğer bir olay nedeniyle, doku yaralanması olduğunda, yaralanan dokuda ve çevre dokuda meydana gelen kompleks değişikliklerdir (11). Beyinde glialar, özellikle astrositler ve mikroglialar yaralanma yada enfeksiyon gibi bir uyarıya cevap olarak aktive olduklarında inflamatuvar sitokinlerin üretimini artırır ve beyindeki tehdidi nötralize eder (10). Bu nöroinflamasyon, hasarlı dokuyu ya da istenmeyen maddeyi yok ederek beynin çevresindeki değişimlere cevabını sağlayan faydalı bir işlemdir. Ancak, kimi zaman bu faydalı işlevin dengesinin bozulması ve kontrolden çıkması nörodejeneratif hastalıklarda hasarın artmasında önemli rol oynamaktadır. Alzheimer hastalığından etkilenen beyinde nörofilament kümeleri (neurofilament tangles :NFT) ve A β patolojik inklüzyonları ile ilişkili aktive olmuş mikrogliaların, reaktif astrositlerin, kompleman proteinlerin ve proinflamatuvar sitokinlerin yaygın görünüşü beynin nöroinflamasyonun kronik evresinde olduğunun bir işaretidir (10). Sonuç olarak, hastalıkta oluşan inflamasyonla ilgili şu anki yaklaşım, bunun lokal doku hasarı ve yüksek derecede çözünür olmayan, anormal bir maddenin kronik depolanması sonucu lokalize olmuş bir reaksiyon olduğudur (10,12).

Alzheimer hastalığında temel pro-inflamatuvar araçların yanında, nöronal sinyal basamaklarında yer alan biyoaktif lipidlerin de normal beyne göre yüksek düzeyde oldukları tespit edilmiştir (10, 12, 13). Araşidonik asit metabolizması sonucu üretilen biyoaktif lipidlerin önemli pek çok fizyolojik ve patolojik olayda yer alması, bu lipidlerin son yıllarda gittikçe artan bir ilgi kazanmasına yol açmıştır. Fosfolipaz A₂'nin membran lipidlerini katalizi sonucu oluşan araşidonik asitin major metabolizma yollarından biri de siklooksijenaz enziminin yer aldığı metabolik yolaktır. Prostaglandinlerin ve diğer inflamatuvar faktörlerin sentezini sağlayan basamaklar da yer alan bu enzimin AH hastalığının gelişiminde temel bir role sahip olduğu çeşitli yayınlarda ifade edilmiştir (14, 15). Siklooksijenaz enziminin periferde ve beyinde COX-1 ve COX-2 olmak üzere iki izoformu vardır. Siklooksijenaz-1 enzimi çoğu hücre tipinde devamlı olarak eksprese olurken COX-2 sadece inflamasyon bölgelerinde indüklenir ve pro-inflamatuvar prostaglandinlerin üretilmesine yardımcı olur (13). Prostaglandinler diğer inflamatuvar mekanizmalarla iç içe olduğundan COX-2'nin ve buna bağlı olarak prostaglandinlerin inhibisyonu AH hastalığında popüler bir terapötik (tedavi edici) hedef olarak kabul edilmektedir (13, 16, 17). Siklooksijenaz-2 'nin aktivasyonu sonucu pro-inflamatuvar bir molekül olan prostaglandin E₂ (PGE₂) üretilir (18, 19). Araştırmalar COX-2 ekspresyonu ve

aktivitesi sonucu üretilen PGE2'nin γ -sekretaz aktivitesini arttırdığı ve böylece A β peptid oluşumunun gerçekleştiğini ortaya koymuştur (15, 20). Buna ek olarak, PGE2'nin Alzheimer hastalarında yüksek düzeyde olması bu hastalığın gelişmesinde PGE2'nin rolü olduğunu ortaya koymaktadır (21).

Klinik tedavi yaklaşımlarının gelişmesi ve yaşam koşullarının iyileşmesi yaşlı popülasyonunu arttırdığı için, AH hastalığının görülme sıklığının önümüzdeki yıllarda belirgin bir şekilde yükseleceği öngörülmektedir (12). Bu nedenle, erken tanı ve hastalığın önlenmesi için stratejiler geliştirmek kritik bir önem taşımaktadır. Zira, yaşlılık sonucu motor ve bilişsel yetenekleri önemli ölçüde azalan AH hastalarının kendilerini yönetmeleri oldukça zorlaştığından bakımlarını yakınları üstlenir ve kalan yaşamlarını yakınlarının koruması altında sürdürürler. Bu durumda, hastalığın sebep olduğu sosyal ve ekonomik sorunlar nedeniyle, durdurulması yada en azından yavaşlatılmasına yönelik çalışmalar (15, 16) son yıllarda önem kazanmıştır. Ancak, AH hastalığı halen nöropatolojisi ve etiyolojisi net olarak ortaya konamamış ve tedavisi mümkün olmayan hastalıklar arasında yer aldığından, bu noktada hastalığın özellikle farmakolojik tedavisi önem kazanmaktadır. Dolayısıyla, artmış proinflatuvar sitokinlerin baskılanmasının hastalığın tedavisine katkı sağlayacağı düşünüldüğü için hastalığı yavaşlatan yada durduran yeni ilaçların geliştirilmesi için faydalı etkileri olan toksisitesi düşük bitkilere odaklanılmıştır.

Medikal bitkilerle ilgili eski referans kitaplarında adı geçen *Salvia officinalis* (adaçayı)'ın hafıza geliştiren özellikleri ve kolinerjik aktivitesi olduğu son zamanlarda yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (22, 23). Yüzyıllardır bitkisel ilaç olarak kullanılan *Salvia officinalis*'in yeni bir tedavi potansiyeli sağlayacağı önceki çalışmalarda gösterilmiştir (23, 24). *Salvia Officinalis*'in ticari ekstraktları yaklaşık % 10 rosmarinik asit (RA) içermektedir. Rosmarinik asit *Rosemary officinalis* (biberiye), *Salvia officinalis*, *Perilla* bitkisi, Sweet basil (fesleğen) gibi bitkilerde oldukça fazla miktarda bulunan doğal fenolik bir bileşik olup, kafeik asit ve 3,4 – dihidroksifenillaktik asidin bir esteridir (23). Daha önce yapılan bir çalışmada (25) RA'nın feokromasitoma (PC12) hücrelerinde A β peptidinin indüklediği reaktif oksijen türleri (ROS)'nin oluşmasını, lipid peroksidasyonu, DNA fragmentasyonunu, kaspaz 3 aktivasyonunu ve tau proteininin hiperfosforilasyonunu azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca RA'nın ROS ve malondialdehid (MDA) miktarını düşürerek oksidatif strese karşı koruma sağladığı, H₂O₂'nin indüklediği hücre hasarını önlediği tespit edilmiştir (26). Bunlara ek olarak RA'nın glomerülonefrit ve romatoid artrit hastalıklarında uygulandığı dokuda COX–2 ekspresyonunu önemli derecede azaltarak anti-inflatuvar etki oluşturduğu da gösterilmiştir (27, 28). Bu özellikleri göz önüne alındığında, RA'nın AH hastalığında COX–2 üzerine etki ederek baskılayıcı etki gösterebileceği ve bu yol ile PGE2'nin sentezindeki artışın önüne geçebileceği hipotezi öne sürülebilir. Literatürde bu konu ile ilgili herhangi bir bilginin olmaması nedeniyle planlanan çalışmamızda, ölçülen PGE2' düzeylerinin değerlendirilmesiyle RA'nın AH hastalığı komplikasyonları üzerine olan etkileri incelenerek koruyucu etkisinin olup olmadığı belirlenecektir.

Alzheimer hastalığıyla ilgili birçok model olmakla birlikte bu hayvan modellerinin hiçbirisi hastalıkta gözlenen biyokimyasal, histopatolojik ve bilişsel anormallikleri tam olarak temsil etmemektedir (29). Bu sebepten ideal bir AH

hastalığı modeli geliştirilmesi hastalığın patolojisini tam olarak anlamak için hayati öneme sahiptir. Yakın tarihte yapılmış bir çalışmada ovaryektomi (oofektomi) yoluyla overleri alınarak östrojen hormon miktarı azaltılan dişi sıçanlara uzun süreli D-galaktoz uygulaması ile bu iki bileşenin sinerjik çalışması sağlanarak, yeni bir AH hastalığı modeli sunulmuştur (30). Endojen östrojen azalması ile AH hastalığı patolojik bulguları arasındaki yakın ilişki son on yılda yapılan birçok çalışmanın konusu olmuştur. Beyinle ilgili yapılan çalışmalar östrojenin hücrel, metabolik ve nörotransmitter seviyelerinde koruyucu bir etkisinin olduğunu göstermiştir (31, 32, 33). Diğer yandan, AH hastalığında aşırı miktarda yükselen serbest radikallerin zararlı etkileri ve patofizyolojik rolleri iyi bilinmektedir (34, 35, 36). Bu konu ile ilgili araştırmalar, pro-inflamatuar moleküllerin ekspresyonu sonucu salınan araziidonik asitle birlikte nöronal membranlarla direkt olarak etkileşen A β fibrillerinin de artan lipid peroksidasyonda rolleri olduğunu ortaya koymuştur (8, 37). Bu bilgilerin ışığında, östrojen azalması ve oksidatif stresin AH hastalığının patolojik gelişimini etkileyen iki ana faktör olduğu görülmektedir. Alzheimer hastalığındaki patolojik, nörokimyasal ve davranışsal değişimlerin tam taklit edilebilmesi nedeniyle, projemizde bu yeni modelin kurulması planlanmıştır. Hastalıkla ilgili tedavi seçeneklerinin oldukça sınırlı olduğu dikkate alındığında, yeni geliştirilen ilaçların terapotik etkinliklerinin ya da toksik etkilerinin anlaşılması için hastalığın tam olarak taklit edilebildiği bir Alzheimer modelinin kurulması AH hastalığının mekanizması ile ilişkili araştırmalar yönünden oldukça önemlidir. Sonuç olarak, AH hastalığının mekanizmasına ışık tutacak bu projemiz, belirtilen modelin kurulması ve hastalığın patojenezinin aydınlatılması yanında, bu yıkıcı nörodejeneratif hastalığın tedavisi ile ilgili başka projelere de basamak teşkil edecektir.

Hafif bilişsel bozukluktan daha ciddi seyreden vakalara kadar tüm AH hastalarında MDA seviyelerinin yükselmesi (38), hastalığın gelişiminde lipid peroksidasyonun önemli bir etkisi olduğunu düşündürmektedir. Buna dayanarak, RA'nın koruyucu etkisini incelemek ve AH hastalığında artan serbest radikallerin rolünü değerlendirmek için çalışmamızda thiobarbitürik asit reaktif ürünleri (TBARS) düzeyleri ölçülmüştür. Serbest radikallerin in-vivo şartlarda ölçülmesi yarı ömürlerinin kısa, konsantrasyonlarının düşük ve reaktif olmaları nedeniyle zordur. Dolayısıyla oksidatif stresin oluşturduğu ikincil ürünlerin ölçüldüğü yöntemler geliştirilmiştir. Lipid peroksidasyon indeksi olarak TBARS kabul edilmekle birlikte, thiobarbitürik asitin MDA dışında diğer bileşiklerle de etkileşime girmesi nedeniyle son yıllarda daha duyarlı olduğu kabul edilen bazı yöntemler geliştirilerek TBARS yerine bunların lipid peroksidasyon indeksi olarak kullanılması önerilmektedir. Ancak, daha özel yöntemler geliştirilmesine karşın, çok basit ve hızlı olması, ölçülen ürünlerin çoğunluğunu MDA'nın teşkil etmesi nedeniyle, TBARS halen bir çok araştırmada tercih edilmekte ve kullanılmaktadır (39, 40).

Son yıllarda yapılan çok sayıda çalışmada serbest radikallerin ve oluşturduğu oksidatif stresin öğrenme ve hafızayı etkileyen önemli bir faktör olduğu ileri sürülmektedir (41, 42). Nitekim, kognisyon bozuklukları görülen bir çok hastalığın etyopatogenezinde artan serbest radikallerin rollerinin olması nedeniyle antioksidan içeren tedavi yöntemlerinin uygulanması bu görüşü desteklemektedir (43). Bilindiği gibi, AH hastalığının en önemli etkilerinden biri de öğrenme ve hafızanın azalmasıdır. Hastalarda gözlenen en ciddi semptomatik sorunlar erken oluşan hafıza

kaybında hızlı bir ilerleme, konuşma bozukluğu, yön bulma eksikliği, insanları tanıma sorunu gibi ilerleyici bilişsel ve duyuşsal problemlerdir. Alzheimer transjenik fareler kullanılarak yapılan çeşitli çalışmalarda öğrenme ve hafıza fonksiyonlarındaki değişiklikler farklı labirent testleri kullanılarak saptanmış, bu değişikliklerin kronik antioksidan kullanımıyla düzeldiği ifade edilmiştir (43). Bileşiminde antioksidan RA içeren *Salvia officinalis* kullanılarak yapılan klinik çalışmalarda ADAS-cog ve CDR-SB testlerinin yapılarak hastaların bilişsel fonksiyonlarında iyileşme olduğu saptanmıştır. Çeşitli bitkilerin hafıza ve bilişsel fonksiyonlar üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada da özellikle bu bitkinin AH hastalığında terapotik bir potansiyeli olabileceği ileri sürülmüştür (24). Rosmarinik asidin belli bir dozun üstünde lokomotor aktiviteyi ve motivasyonu arttırdığı daha önceki bazı yayınlarda (44, 45) belirtildiğinden, çalışmamızda bu asitin öğrenme ve hafıza üzerindeki olası iyileştirici etkisi aydınlatılmaya çalışılacaktır. Bu amaçla da, Y-maze ve lokomotor aktivite testi uygulanarak sıçanların aktiviteleri, öğrenme, ve hafıza yetenekleri değerlendirilecektir.

Çalışmamızda anti-inflamatuar ve antioksidan özellikleri olan RA'nın giderek artan yaşlı nüfus nedeniyle her geçen yıl daha büyük bir sağlık problemine dönüşen AH hastalığındaki rolü ortaya konarak ve öğrenme ve hafıza üzerindeki etkileri açıklığa kavuşturularak literatüre yeni ve kapsamlı bilgiler katılacaktır. Ayrıca, AH hastalığının mekanizmasına ışık tutacak bu projemiz, RA'nın insan sağlığı üzerine olan etkilerini de açıklığa kavuşturarak çevre ve halk sağlığı açısından da yararlı ve kapsamlı bilgiler elde edilmesini sağlayacaktır. Dolayısıyla, projemiz toksik özelliği oldukça düşük bu bileşiğin hastalığa etkisinin aydınlatılmasına katkı getirerek tedavi yolunda önemli bir adım oluşturacaktır. Aynı zamanda, projemiz bu konu ile ilgili ilk çalışma olması nedeniyle yeni ufuklar açarak, daha ayrıntılı çalışmaların yapılması için basamak oluşturacaktır.

Sonuç olarak, projenin amaçları şöylece özetlenebilir;

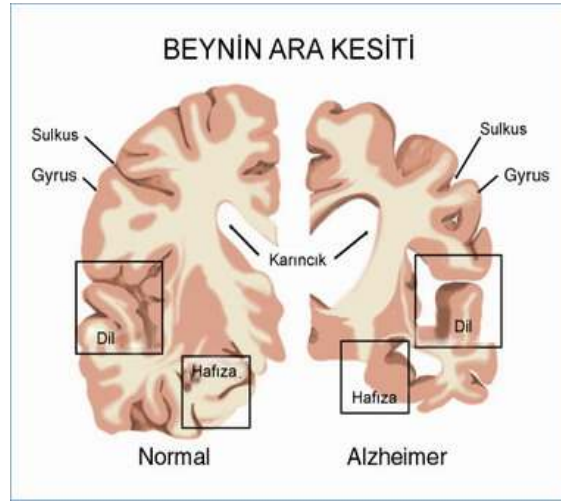
1. Hastalığın tam olarak taklit edilebildiği bir modelin kurulması ve yeni tedavi stratejisi ile çalışmamız AH hastalığının etyopatolojisi ve tedavisine yönelik bilimsel araştırmalara ışık tutacaktır.
2. Çalışmamızda, PGE2, COX-2 düzeyleri, amiloid plaklar ve oksidan hasarın belirlenmesiyle RA'nın koruyucu etkisinin olup olmadığı saptanacaktır.
3. Rosmarinik asidin öğrenme ve hafıza üzerindeki etkileri açıklığa kavuşturularak ve AH hastalığındaki rolü ortaya konularak literatüre yeni ve kapsamlı bilgiler katılacaktır.

GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

2.1.1 Alzheimer Hastalığının Epidemiyolojisi

Alzheimer hastalığı bilişsel fonksiyonlarda ve davranışlarda ilerleyici bozukluk ile karakterize edilen en yaygın demans türüdür. (Şekil 2.1).



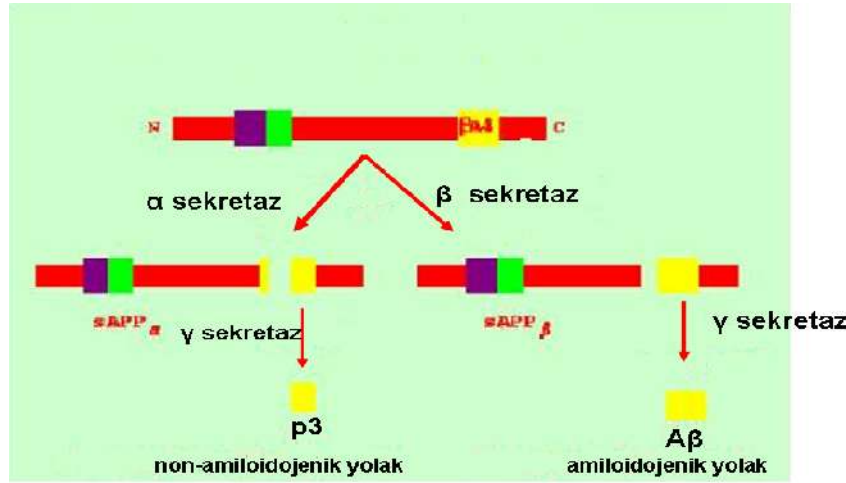
Şekil 2.1. Alzheimer Hastalığında gözlenen diffüz atrofi.

Batı Avrupa ve Birleşik Amerika'da yapılan çalışmalar demansların %50-70' inin AH hastalığına bağlı olduğunu göstermektedir (1). Alzheimer hastalığı gelişiminde ortaya konan kesin risk faktörleri yaş, aile öyküsü ve kişinin apolipoprotein E (ApoE) s4 aleline sahip olmasıdır (46, 47, 48). Bunlardan yaş en önemli risk faktörü olup hastalığın prevalansı, 65-85 yaşları arasında her beş senede bir iki katına çıkmaktadır. Aile öyküsünde hastalığın olması durumunda özellikle birinci derecede akrabalarda risk dört kat artmaktadır (48). Kolesterol transportunda görevli bir protein olan ApoE'nin e4 aleli; normal beyaz popülasyonda %16, AH hastalarında ise %35-50 sıklıkta bulunması nedeniyle hastalığın majör faktörlerinden sayılmaktadır (49). Hastalığın diğer olası risk faktörleri ise; kadın cinsiyeti, düşük eğitim seviyesi ve fazla bilişsel aktivite gerektirmeyen işlerde çalışma, Down Sendromu, bilinç kaybına neden olan kafa travması, miyokard infarktüs öyküsü, atherosklerotik damar hastalığı, hipertansiyon, atrial fibrilasyon ve insüline bağımlı diyabet hastalığıdır (1, 50, 51). Bazı çalışmalarda, ileri anne yaşı, alkol kullanımı ve depresyon öyküsünün de AH hastalığı risk faktörleri arasında olduğu belirtilse de, bunların hastalık ile ilişkileri tartışmalıdır. Alzheimer hastalığının oluşma riskini azalttığı düşünülen faktörler ise östrojen kullanımı ve non-steroid antiinflatuar ilaçlardır.

2.1.2. Alzheimer Hastalığının Patogenezi

Alzheimer hastalığı ile ilgili araştırmalara hastalardan elde edilen patoloji bulguları yol göstermiştir. Makroskopik patoloji bulguları, özellikle korteks ve hipokampusta yaygın neokortikal atrofidir. Hastalığın histopatolojik bulguları ise, Meynert'in bazal nükleusu, hipokampus ve asosiyasyon korteksi alanlarında kolinerjik nöron kaybı, hücre içinde biriken NFT, ekstrasellüler yerleşimli amiloid plaklar, granülovakuolar dejenerasyon ve sinaptik kayıplar olarak belirlenmiştir (4). Hücre dışı amiloid birikimi olarak tanımlanan amiloid plaklar hastalığın temel ayırt edici bulgusunu oluşturur (5).

Hastalığın patogenezinin en iyi açıklayan hipotez olan amiloid kaskad hipotezinde temel nokta APP'nin belirli sekretazlarla kesilmesi sonucu fibriller A β peptidinin oluşmasıdır. Tip I membran proteini olan APP ilk basamakta α - veya β -sekretaz enzimlerinden biri ile koparılır. Alfa-sekretaz APP'nin A β bölgesini etkileyerek 83 amino asit dizilimli C83 ile alfa sekretuvar amiloid prekürsör proteinini (α -APPs) oluşturur (6). Normal bir beyinde α -yolunda α -sekretaz aktivitesi hakim olup α -APPs salınımı daha fazladır. Beta-sekretaz enzimi ise APP'nin amino terminalini etkileyerek 99 amino asit dizilimli C99 ile beta amiloid prekürsör proteinini (β APPs) oluşturur. Daha sonra devreye giren γ -sekretaz birçok alt ünitelerden oluşan bir proteaz kompleksi olup tam olarak karakterize edilememiştir fakat temel olarak dört önemli proteinden oluştuğu bilinmektedir (52). Bunlar presenilin1, presenilin 2, nikastrin ve A β -1 (anterior pharynx-defective 1) proteinleridir. Bu enzim hem C83'ü hem de C99'u etkileyerek, C83'ten P3 isimli peptidi ve C99'dan A β 'yı oluşturur. A β peptidleri 38, 40 ve 42 amino asit dizilimli olabilir ve "beta sheet" konformasyonu ile birikirler (53). (Şekil 2.2)



Şekil 2.2. Amiloid prekürsör proteininin kesilmesi

Amiloid plaklarda tespit edilen ve çökme eğilimi olan A β 42'nin, A β nörotoksitesinde gerekli olan fibril oluşumuna A β 40'dan daha fazla sebep olduğu görülmüştür (53). Hastalığın patogenezinde β -yol aktivitesinin artışı sonucu A β seviyesinin yükselmesinin patolojik süreçlere neden olduğu düşünülmektedir. Bunu takiben AH hastalığının histopatolojik bulgularını oluşturan senil plaklar,

nörofibrillar yumaklar ve nöron kaybı ikincil olarak gelişmektedir. Amiloid β 'nın fibriller oluşturarak lokal mikrogliya ve astrositleri aktive ettiği, bu hücrelerden salınan moleküllerin nöronlarda nörotoksik ve nörotropik etkiler oluşturduğu düşünülmektedir. Bu nörotoksik etkilere maruz kalan nöronlarda dejeneratif değişiklikler oluşmakta örneğin, mikrotübülle ilişkili tau proteini hiperfosforilize olarak PHF'leri oluşturmaktadır (54). Böylece nöron soma ve dendritlerinde gelişen yapısal ve fonksiyonel değişiklikler (örneğin sinaptik disfonksiyon), nöron kaybı, bir çok nörotransmitter eksikliğine ve biyokimyasal değişikliklere neden olmaktadır. Sonuçta tüm kaskad nöronların programlanmış hücre ölümü apoptozis ile sonlanmaktadır (5).

2.1.3. Oksidatif Stres ve Alzheimer Hastalığı

Amiloidojenesis ile nörofibril kümelerinin gelişimi arasındaki ilişki henüz bilinmediğinden, amiloid hipotezi akla yatkın olsa da hastalığın etyopatolojisini tam olarak açıklayamamaktadır. Bu nedenle, AH hastalığında oluşan nörodejenerasyonun ve nöronal ölümün mekanizmasını aydınlatmak için oksidan stres gibi diğer faktörler de dikkate alınmalıdır. Bilindiği gibi, oksidan strese yol açan serbest radikaller hücrenin yapı taşları olan lipidler, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitlere zarar verip fonksiyonlarını bozmaktadır. Diğer yandan, yaşa bağlı olarak serbest radikallerin artması ve yaşlılığın AH hastalığı gibi birçok nörodejeneratif bozuklukların patogenezisinde bir risk faktörü olarak kabul edilmesi (38), serbest radikallerin etkilerinin dikkate alınması gereğini vurgulamaktadır.

Beyin dokusu aşağıda belirtilen nedenlerden dolayı serbest radikallere daha duyarlıdır.

1. Önemli doğal bir antioksidan olan glutatyon miktarı nöronlarda düşüktür (55).
2. Nöron membranları yüksek oranda poliansatüre yağ asiti içerir (56).
3. Beyin metabolizması yüksek miktarda oksijene gereksinim duyar (57).

Alzheimer hastalığındaki nörodejenerasyonda ve nöronal ölümde serbest radikallerin önemli rollerinin olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Özellikle Fenton reaksiyonu sonucu oluşan oldukça güçlü toksik etkiye sahip hidroksil radikalının AH hastalığında etkili olduğu bilinmektedir (58). Ayrıca, indüklenen nitrik oksit sentaz aracılığıyla oluşan nitrik oksidin süperoksit ile birleşmesi sonucu ortaya çıkan peroksinitritin de AH komplikasyonlarında önemli etkisinin olduğu bildirilmiştir (59). Zira peroksinitritin bir çok biyolojik molekülü tahrip edebilen ve metal katalizinden bağımsız olarak hidroksil radikallerine ayrışabilen güçlü bir oksidan olduğu ifade edilmektedir. Nitekim, Smith ve ark. (59) yaptığı çalışmada peroksinitritin AH hastalarının beyninde oluşturduğu oksidatif modifikasyonların izlerini gözlemlemiştir.

Alzheimer hastalığında nöronlarda oksijen radikallerinin temel kaynağı mitokondridir. Mitokondride moleküler oksijenin indirgenmesi sırasında serbest radikaller üretilir. Yüksek oksijen metabolizması nedeniyle nöronlarda radikal üretimi daha fazladır. (60). Alzheimer hastalığında spesifik mitokondriyal enzimlerin aktivitesinin azaldığı ya da enzim yapılarının değişerek fonksiyonlarının bozulduğu gösterilmiştir (61, 62). Bu enzimlerdeki değişimler ROS oluşumunu indüklemekte

böylece mitokondri sitoplazmaya serbest radikaller salarak hasara yol açmaktadır. Bu hasarda etkili olan hidrojen peroksit mitokondrinin dış membranından kolayca diffüze olarak sitoplazmada diğer organellere zarar verir. Hidrojenperoksit fazla reaktif değildir ancak sitoplazmadaki demir iyonları ile etkileşerek Fenton reaksiyonu sonucunda hidroksil radikalının oluşmasına yol açar (8).

Alzheimer hastalığındaki diğer bir temel ROS kaynağı lezyonlardaki A β peptididir. Oksidatif işlemler kümelenme özelliği olmayan A β 'yı kümeleşen A β 'ya çevirirken, A β 'nın kendisinde serbest radikal kaynağıdır (63). Amiloid β vasküler endotelyal hücrelerle etkileşerek çok miktarda serbest süperoksit radikalleri üretilmesini sağlar. Bunlar lipid peroksidasyona sebep olarak okside edici ajanlar üretirler. Bu olay nöronlarla değil endotelyum ile ilişkili olsa da bu bilgiler A β 'nın serbest radikal üreterek etki ettiği ve böylece nörodejenerasyon işleminde rol aldığı düşüncesini destekler (64). McDonald ve ark. (65) A β fibrillerinin protein tirozin kinaz bağımlı sinyal yollarıyla mikroglialarda süperoksit üretimini aktive ettiğini göstermiştir. Bu araştırma A β 'nın mikroglialarda ROS üretimini stimüle ettiğini bulan diğer çalışmaların sonucunu doğrulamıştır (66, 38).

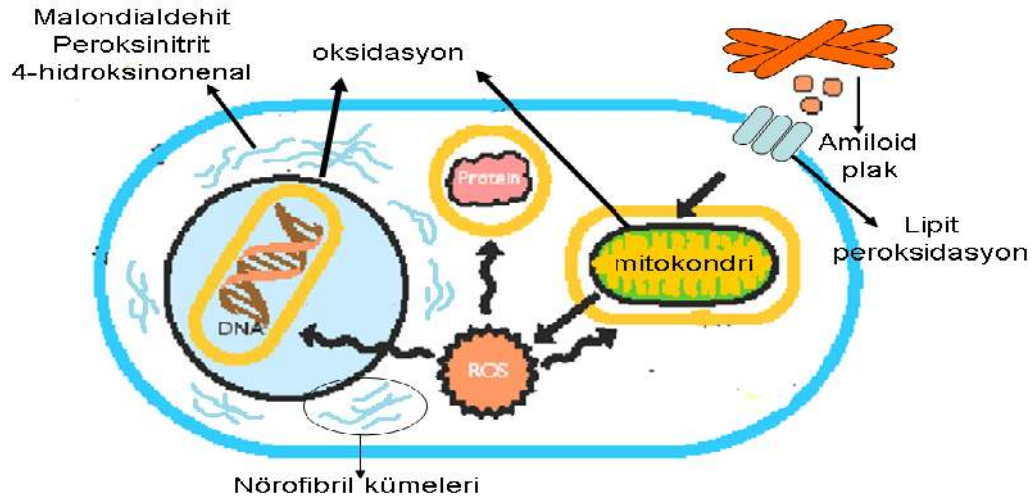
Yapılan çalışmalar sonunda A β toksisitesinin yalnızca spesifik bir membran reseptörü etkileşmesinden kaynaklanmadığı fikrine ulaşılmıştır (8, 66, 67). Amiloid β birikimleri ve NFT'ler yüksek konsantrasyonda demir iyonu içerdiklerinden ROS üretimine katkı sağlarlar. Birçok çalışmada nöron kültürlerinde ya da hücre dizilerinde A β 'nın direk toksik etkisi izlenmiştir. Behl ve ark. (68) bu A β toksisitesinin PC12 hücre dizisinde antioksidan uygulaması ile önlendiğini göstermişlerdir.

Alzheimer hastalarının beyinde demir konsantrasyonunun yüksek oluşu ile ilgili birçok gözlem, demir metabolizmasının da AH hastalığında etkili olduğunu göstermiştir. Smith ve ark. (58) çeşitli histokimyasal metodlarla demirin AH hastalarındaki dağılımını incelemiş ve demir dağılımının senil plaklar ve NFT'lerin dağılımı ile eşleştiğini bulmuştur. Bu lezyonlarla ilişkili demir iyonları bir oksidatif stres işleminin parçası olabilir.

Hastalarda en ciddi histopatolojik değişimlerin olduğu bölgelerde serbest radikallerin proteinlere etki ederek protein oksidasyonuna da neden olduğu bulunmuştur (69). Alzheimer hastalığında artan protein karbonil seviyesi ve tirozin rezidülerinin nitrasyonu proteinlerin oksidatif modifikasyonunu göstermektedir. ATP üretiminde yada glikolizde görev yapan enzimlerin yapısında yer alan proteinlerin oksidasyonu AH hastalığında gözlenen metabolik bozukluklara yol açmaktadır. Diğer yandan, yaşlıların ve AH hastalarının parietal korteks bölgelerinde mitokondriyal DNA ve nükleer DNA'nın oksidasyonu gözlenmiştir (70, 71). DNA ve RNA oksidasyonunu incelemek amacıyla ölçülen 8 hidroksiguanozin (8OHG) seviyesinin AH hastalığında belirgin şekilde yükseldiği bulunmuştur (61). Aynı zamanda AH hastalarında DNA tamir bozukluğunun işareti olan DNA kırıkları ve fragmantasyonunun miktarının arttığı tespit edilmiştir (71).

Histopatolojik çalışmalar sonucu hastaların temporal lob bölgelerinde artan lipid peroksidasyon izlerinin bulunması, bu etkinin AH hastalığında temel bir faktör

olabileceği görüşünü destekleyen bir bulgudur (37, 72). Ayrıca, AH oluşturulan transjenik farelerde yapılan bir çalışmada 7 aylık farelerde A β birikiminden önce lipid peroksidasyonun gözlenmesi hastalığın gelişiminde lipidlerin oksidasyonunun önemine işaret etmektedir (73). Yapılan deneylerde lipid peroksidasyonun seviyesi yükselen MDA, 4-hidroksinonenal (4-HNE) ve izoprostan miktarı ve değişen fosfolipid kompozisyonu ile belirlenmiştir. Lipid peroksidasyon ürünlerinden biri olan 4-HNE'nin hipokampal hücre kültürlerinde toksik olduğu kanıtlanmıştır (74). Bu oldukça reaktif olan 4-HNE'nin iyon transferinde ve kalsiyum homeostazisinde görev alan ATPaz'ı etkileyerek nöronal ölüme sebep olduğu düşünülmektedir (75). Buna ilaveten, A β 'nin indüklediği lipid peroksidasyon sonucu artan MDA ve 4-HNE gibi reaktif aldehydlerin membran proteinlerini modifiye edip fonksiyonlarını değiştirerek nöronlara hasar verdiği ortaya konmuştur. Lipid peroksidasyonla ilişkili membran anormallikleri olan dendritik spinlerde PHF'lere daha sık rastlanmakta, AH hastalarının beyinde nörofibriller kümelerde peroksidasyon son ürünü olan MDA bulunmaktadır (76). (Şekil 2.3)



Şekil 2.3. Oksidatif stres ve Alzheimer Hastalığı

Buscigli ve Yanker (77) AH hastalığına çok benzeyen bir nörodejenerasyonun gözlemlendiği Down sendromunda nöronal ölümün lipid peroksidasyonun artmasına bağlı oluşan apoptozis neticesinde gerçekleştiğini ve serbest radikal önleyiciler ile katalazın bu süreci durdurduğunu gözlemlemişlerdir.

Serbest radikaller AH hastalığında görülen glikolizasyon işleminde de rol oynar. Glikolizasyon fenomeni yıllardır yaşlanmayla ilişkili patolojilerle ilişkilendirilmiştir. Proteinlerin glikolizasyonu nonenzimatik bir işlem olarak başlar ve ileri glikolizasyon ürünlerinin (advanced glycation end products-AGE) oluşmasıyla sonuçlanır (75). Bu ürünler dönüşümsüz olarak çapraz bağlarla bağlanmış heterojen protein kümelerinden oluşur. Alzheimer hastalarında A β ve tau proteinleri ile ilişkili olan AGE'lerin varlığı gösterilmiştir (76, 78). Bu gözlem AGE'lerin AH hastalığı patolojisine dahil olduğunu desteklemektedir. Serbest radikallerin yol açtığı glikolizasyon A β 'nin çapraz bağlarının oluşmasında tetikleyici olabilir. Mattson ve ark. (79) A β glikolizasyonunun AH hastalığı gelişimindeki geç olaylarla ilişkili

olduğunu, Yan ve ark.(80) ise AGE reseptörlerinin aynı zamanda bir A β reseptörü olduğunu göstermiştir. Bu yayınlar AH hastalığında serbest radikal üretimi ve AGE arasındaki ilişkinin önemini destekler niteliktedir (81).

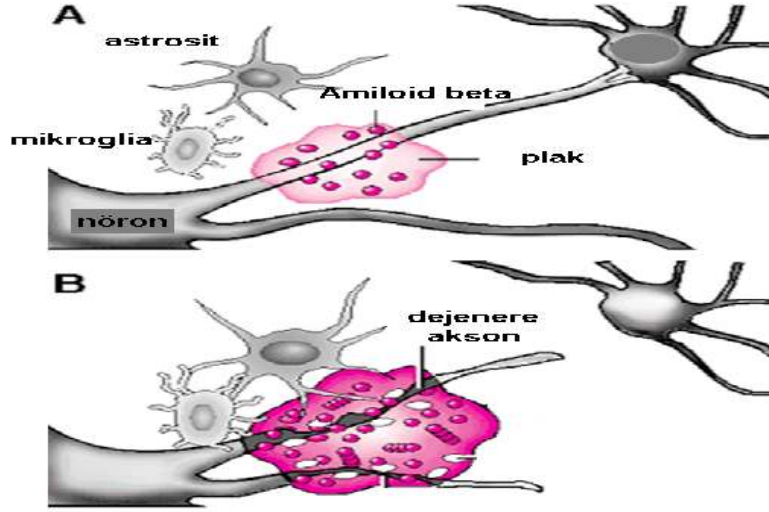
2.1.4. Alzheimer Hastalığı ve İnflamasyon

Son yıllarda AH hastalığında etkin rol oynayan bir çok inflamatuvar molekül belirlenmiştir (82). Alzheimer hastalığında inflamasyon lokal bir doku hasarı ve yüksek oranda çözünemeyen anormal bir materyale karşı endojen olarak oluşan lokalize bir reaksiyondur (83). Temelde makrofaj aracılı reaksiyonlar inflamasyon olarak tanımlanmakta, beyinde glialar bu reaksiyonların aracısı olmaktadır. Lokalize bir doku hasarı neticesinde olduğu için inflamasyon hastalığın etiyolojisinde bir neden değil sonuçtur. Ancak bunun ikincil bir etken olması önemsiz olduğunu göstermez. Örneğin kafa travmasına bağlı beyin hasarında ikincil inflamatuvar cevap travmanın kendisinden daha büyük hasara sebep olmaktadır (10). Alzheimer hastalığında nörodejenerasyona sebep olan A β peptid birikimi ve nörofibriller kümeler gibi temel etmenlere bir çözüm getirene kadar ikincil inflamatuvar hasarın başlamasının önlenmesi önemli bir terapotik hedeftir.

Alzheimer Hastalığında İnflamasyona Aracılık Eden Hücreler

Astrositler:

Astrositler çeşitli yaralanmalara karşı immunolojik olarak aktive olabilen hücrelerdir. Çeşitli adhezyon molekülleri, sitokinler, eikosanoidler ve diğer sitotoksik moleküllerin ekspresyonunu gerçekleştirirler (84). Aktive olduklarında glial fibriller asidik protein (GFAP)'in ekspresyonu artar. Astrositler inflamasyon koşullarında şişer, aşırı gelişir ve çoğalır (85, 86). Bu inflamatuvar cevaba astrositozis denir. Alzheimer hastalarının beyinde lokal ve diffüz olarak astrositozis gözlenmiş ve ileri aşamalarda astrosit sayısı dört kat kadar artmıştır (87). Astrositler A β tarafından harap edilen damarların ve nöronların çevresinde toplanmışlardır (88, 89). Lokal ekstrasellüler A β birikimlerinin çevresinde aşırı büyümüş astrositler görülürken, en yoğun birikimler nöritik plakların çevresinde bulunmuştur. Astrositlerin somaları bir daire oluşturarak nöritik plağın çevresini sarar. Bu nöritik bölge astrosit işlemleri ile örtülür.



Şekil 2.4. Astrosit ve mikrogliaların aktivasyonu

Mikroglialar:

Mikrogliyal hücreler beyindeki hücrelerin %10 ila 15'ini oluşturur (90). Mikroglialar monosit ve mezodermal kökenli hücrelerdir ve makrofaj benzeri fagositik kapasiteye sahiptirler (91). Normal bir beyinde mikroglialar nörotrofik role sahip olsa da, nörotoksik etkileri AH hastalığı araştırmalarında gösterilmiştir. Mikroglialar diğer nöropatolojik koşullarda aktive olduğu gibi AH hastalığında da aktive olur (92, 93). Bu mikrogliya aktivasyonu sonucunda morfolojik değişimlerin yanı sıra sitokinlerin, kemokinlerin, akut faz proteinlerinin ve potansiyel nörotoksinlerin ekspresyonu artar (94, 95). Astrositler gibi aktive olan mikroglialar da A β birikimlerinin yanında kümelenmekte ancak astrositlerin tersine mikroglialar senil plakların merkezine daha yakın noktalarda bulunmaktadır. (96). Bu eş lokalizasyon astrositlerle mikrogliaların arasındaki inflamatuvar sinyallere imkan sağlar. Amiloid β 'nın fagositozu faydalı olsa da mikroglialar ile etkileşmesi sinyal iletim yollarının aşırı aktivasyonu nedeniyle birçok pro-inflamatuvar, nörotoksin ve ekzitotoksik molekülün oluşmasına yol açmaktadır (97). (Şekil 2.4)

Alzheimer Hastalığında Beyinde Etkili İnflamatuvar Moleküller

Kompleman sistemi:

Kompleman sistemi 30'dan fazla proteinden oluşur. Bunların birçoğu serin proteazdır ve basamak basamak aktive olurlar. Alzheimer hastalarının beyinde bu sistemde rol alan proteinlerle birlikte bu sistemi düzenlemekle görevli olan proteinlerin ekspresyonunun yüksek olduğu bulunmuştur (98). Amiloid β ve nörofibriler kümeler, dejenere olan DNA ve nörofilamentler kompleman sistemi aktive eder (99).

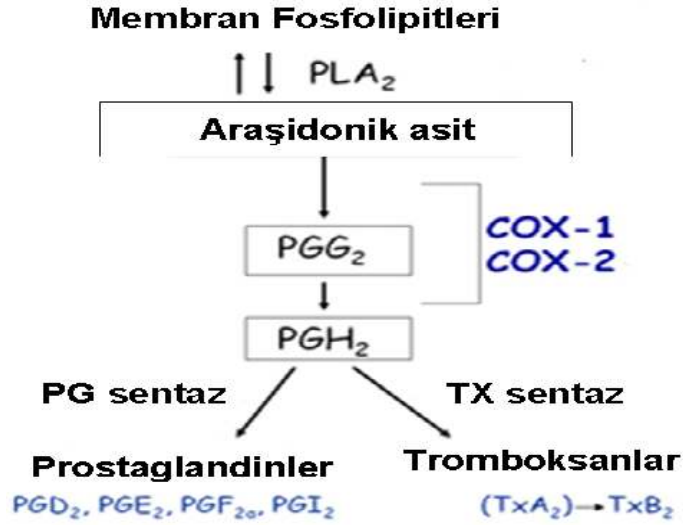
Sitokinler ve kemokinler:

Alzheimer hastalığında hemen hemen tüm sitokinler ve kemokinler özellikle pro-inflamatuvar aracı olanların seviyeleri incelenmiştir. Bunlardan interlökin 1 (IL-1), IL-6, tümör nekrozis faktör alfa (TNF α), IL-8 ve transforming büyüme faktörü

beta (TGF- β)'nin miktarının AH hastalığında yükseldiği bulunmuştur (100). Amiloid β astrositler, mikrogialar ve nöronlarda bu sitokin ve kemokinlerin ekspresyonunu indüklerken aynı zamana bu pro-inflamatuar moleküllerin varlığı A β plaklarında tespit edilebilmektedir (10).

Siklooksijenaz:

Siklooksijenaz, membran fosfolipidlerinden oluşturulan araşidonik asitten prostaglandinlerin sentezlendiği yolakta önemli rol oynayan bir enzimdir. Siklooksijenaz prostaglandinlerin ve diğer inflammatuar faktörlerin üretilmesine yardım ederken kendisi de indüklediği bazı pro-inflamatuar araçlarla yüksek seviyede tutulur (101, 102). Periferde ve beyinde COX'un COX-1 ve COX-2 olmak üzere iki izoformu vardır. Siklooksijenaz-2 devamlı olarak eksprese edilen COX-1'in 9q32 numaralı insan kromozomuna yerleşmiş olan genetik eşidir (103). Siklooksijenaz-2 tipik olarak devamlı eksprese edilmez, yalnız inflamasyon olan bölgelerde indüklenir ve pro-inflamatuar prostaglandinlerin üretilmesini sağlar. Prostaglandinler diğer inflammatuar mekanizmalarla ilişkili olduğu için COX inhibisyonu yoluyla miktarlarının azaltılması AH hastalığında önemli bir terapötik hedefdir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Araşidonik asit yolağı

Aşırı miktarda COX-2 eksprese eden transjenik farelerin uzaysal ve uzaysal olmayan hafızalarında bozukluk olduğu gözlenmiştir. Artan COX-2 enzimatik aktivitesi APP^{sw} (sweden mutasyonu) transjenik farelerde hastalığın gelişimini hızlandırmış, bilişsel bozukluğu arttırmıştır (73, 104). Başka bir çalışmada nöronlarda insan COX-2 genini aşırı eksprese eden Alzheimer transjenik farelerde amiloidojenik A β peptidinin üretiminin arttığı bulunmuştur (105, 106).

Alzheimer hastalığında sitokinlerin uyardığı COX seviyesindeki artış aynı zamanda sitokin stimülasyonunu sağlayan sinyal mekanizmalarını da etkiler.

Sitokinler mikroglia ve astrositlerde PGE2 üretilmesini tetiklerken, ortaya çıkan PGE2 tekrar sitokin ve inflamatuvar moleküllerin eksprese olmasına yol açar (10). Alzheimer hastalarının beyinde COX-2 ekspresyonunu etkileyen IL-1 β ve TNF- α gibi sitokinler AH hastalığındaki temel nöropatolojiyi arttıran inflamatuvar reaksiyonların oluşmasında anahtar rol oynamaktadır (107,108). Elde edilen deliller COX-2 protein seviyelerinin artışının A β ve plak yoğunluğu ile orantılı olduğunu, COX-2 ekspresyonunun A β 42 üretimi, kümelenmesi, birikimi ve temizlenmesini etkileyen faktörleri modüle ettiğini göstermektedir. Aynı zamanda A β peptidi de COX-2 ekspresyonuna etki etmektedir (109).

Siklooksijenaz enzim aktivitesinin temel proinflamatuvar ürünü olan PGE2 seviyesinin hastalıkta belirgin bir şekilde artması, AH hastalığının gelişmesinde önemli bir fonksiyonunun olduğunu gösterir. Yapılan çalışmalar primer sıçan astrositlerinde A β 25-35 peptidinin COX-2 protein sentezini ve PGE2 salınımını protein kinaz C (PKC) aracılığı ile indüklediğini göstermektedir (109). Prostaglandin E2 E-prostanoid 1-4 (EP1-4) şeklinde tanımlanmış her biri cAMP üretimi üstünde ve fosfoinozitol döngüsünde farklı etkilere sahip dört G-proteini ile eşleşmiş reseptöre sahiptir (110). Bunlardan EP-2 reseptörünün (PGE2 reseptörü) hastalığın komplikasyonlarından belirgin bir şekilde etkilenen serebral korteks ve hipokampusta oldukça fazla miktarda eksprese edildiği bulunmuştur (111). Prostaglandin E2 EP2 reseptörü aracılığı ile nöronlara etki ederek apoptozisde rol oynarken, EP2 reseptörü aracılığıyla mikroglialara etki ederek inflamatuvar sitokinleri indükleyerek ve fagositik aktiviteyi azaltarak A β 'nın fagositozunu önler (112). Bu bilgilere ek olarak, yakın zamanda COX tarafından A β peptidinin üretilmesinde PGE2 aracılı γ -sekretaz aktivitesi artışının etkili olduğu ortaya konmuştur (18). Böylece, araşidonik asitten PGE2 oluşmasını katalize eden COX1 ve COX2 enzimlerinin aktivasyonunu inhibe eden non-steroid anti inflamatuvar ilaçların (NSAIDs) uzun süreli kullanımı hastalığın gelişimini yavaşlatmaktadır (113, 15).

2.2. Alzheimer Hastalığının Tedavisi

Alzheimer hastalığının tedavisinde birçok farmakolojik yaklaşım değerlendirilmiştir. Hastalığın şu andaki primer tedavisinde, hafıza ve bilişsel semptomlara odaklanılmış olup, tedavi semptomatiktir. İkincil tedavisi ise hastalığın seyri sırasında ortaya çıkan depresyon, sanrılar, bunaltı, ajitasyon ve uyku bozukluğu gibi bulguların giderilmesini amaçlayıp, hastanın yaşam kalitesini artırıcı, bakımını destekleyici özelliktedir. Primer demans tedavisinde amaç hastalığın bilişsel semptomlarında iyileşme ya da düzelme sağlamak, hastalığın gidişatını durdurmak ya da en azından ilerlemesini yavaşlatmaktır. Alzheimer hastalığı tedavisinde son yıllarda bu alanda birçok terapotik ajanlar denenmiş ancak hiç birinden büyük yarar sağlanamamıştır. Primer AH hastalığı tedavisinde kullanılan ya da geliştirilen tedavi stratejileri şu ana başlıklarda incelenebilir;

- 1- Transmitter yerine koyma tedavisi
- 2- Nörotrofik faktörler, östrojen tedavisi
- 3- Amiloid prosesini etkileyen ilaçlar
- 4- Kolesterol sentez inhibitörleri
- 5- Aşılama
- 6- Antioksidan tedavi

7- Antiinflamatuvar ilaçlar

2.2.1. Transmitter Yerine Koyma Tedavisi

Kolinerjik iletimin farmakolojik olarak arttırılması bilişsel fonksiyonlarda düzelme sağladığından, günümüzde hastalığın tedavisinde en temel yaklaşım beyinde kolinerjik iletimi arttırmaktır. Bunun için asetilkolin prekürsörleri ilavesi, asetilkolin yıkımını azaltmaya yönelik asetilkolinesteraz inhibitörleri, nikotinik ve muskarinik reseptör agonistleri ve kolinomimetik aktiviteye sahip diğer ilaçlar da kullanılmaktadır. Alzheimer hastalığının semptomatik tedavisi için kolinesteraz inhibitörü ilaçlar olarak takrin, donepezil, galantamin ve rivastigmin yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu ilaçların yarı ömürlerinin kısa, etkilerinin zayıf olması ve klinik kullanımda bazen şiddetli yan tesirler gözlenmesi tedavide kullanımlarını kısıtlamaktadır (114). Selektif muskarinik reseptör agonisti olan Xanomoline orta ve hafif şiddette Alzheimer hastalarında denenmiş ve hastalarda hem bilişsel testlerde, hem de klinik skorlarda artış olduğu gözlenmiştir (115). Ancak hastalarda ilaca bağlı gelişen senkop atakları ve gastro-intestinal yan etkiler ilacın kullanımını zorlaştırmaktadır.

2.2.2. Nörotrofik faktörler, östrojen tedavisi

"Nerve growth factor" (NGF), ilk olarak intratekal, daha sonra ise nazal sprey olarak kullanılmıştır. İntratekal kullanımda meninks kalınlaşması, nazal kullanımda şiddetli ekstremitte ağrısı gibi yan etkiler göstermiştir. Propentofilin ve idebenone gibi antioksidan maddelerin NGF'yi uyarıcı etkilerinden dolayı AH hastalığında yararlı olabileceği düşünülmektedir (116).

Yapılan çeşitli çalışmalarda östrojen seviyesini arttıran tedavilerin AH hastalığının riskini azalttığı ve hastalıkla ilişkili semptomları hafiflettiği bulunmuştur. Son zamanlarda AH hastalarında yapılan incelemelerde çelişkili sonuçlar elde edilmesine rağmen östrojen terapisiyle ilişkili klinik çalışmalar sürmektedir (116).

2.2.3. Amiloid Prosesini Etkilemesi Beklenen İlaçlar:

β-Sekretaz İnhibitörleri:

Alzheimer hastalığını tedavi etmek için en temel yaklaşım fibriller yapıdaki Aβ 42'nin neden olduğu amiloid plak oluşumunu inhibe etmek veya bu birikimi azaltmaktır. Kümeleşerek çöken ve bu yolla plak oluşumuna neden olan Aβ peptidinin sentezinde rol oynayan β sekretaz enzimini inhibe etmek, tedavi için üzerinde en çok çalışılan temel farmakolojik yaklaşımlardan biridir. (117).

α-Sekretaz Aktivatörleri:

Amiloid prekürsör protein, β-sekretaz yolu dışında alternatif olarak α-sekretaz yolu ile enzimatik reaksiyon sonucu olarak kesilir. α-sekretaz enzim aktivitesinin arttırılması Aβ yapımını engelleyen bir başka terapotik çözüm olarak düşünülmüştür. α-sekretaz forbol esteri gibi PKC aktivatörleri tarafından indüklenebilir (118, 119). Protein kinaz C üzerinden etki gösteren reseptörlerin uyarılması ile α-sekretaz sentezi

artırılabilir. Ancak, bu tür kimyasal ajanların şiddetli muskarinik yan etkileri klinikte kullanımlarını şimdilik olanaksız kılmaktadır (120).

γ-Sekretaz İnhibitörleri:

Gama-sekretaz enzimi diğer sekretazlara göre daha karmaşık yapılı bir enzimdir. Presenilin içeren karmaşık bir membran proteini yapısındadır. Gama-sekretaz enziminin hücre membranından geçebilen inhibitörleri sentezlenmiş ve bunların AH hastalığı tedavisindeki yeri araştırma konusu olmuştur. Aspartil proteaz içeren benzodiazepin benzeri yapıya sahip bazı bileşikler de presenilin bölgesi tanıyıcısı olarak kullanılmakta ve in vitro olarak inhibitör etki de göstermektedir (121, 122)

2.2.4. Kolesterol Sentez İnhibitörleri (Statinler)

Yapılan çalışmalarda kolesterol yüksekliği ile AH hastalığı arasında pozitif bir ilişki olduğu saptanmıştır. Kolesterolün Aβ sentezini arttırarak hastalığın oluşmasına katkıda bulunurken, kolesterol düşürücü ilaçların AH hastalığının ilerlemesini yavaşlattığı görülmüştür (123, 124).

2.2.5. Aşılama

Alzheimer hastalarının beyinlerinden Aβ'ları uzaklaştırmak için araştırmacılar immün sistemden de yararlanmak istemişler ve buna paralel olarak aşılama bir tedavi stratejisi olarak denenmiştir. Bu amaçla hastalara subkutan yada intravenöz enjeksiyon yoluyla farklı Aβ fragmanlarını içeren aşılar uygulanmıştır. Ancak çalışmalarda hastaların %5'inde aşılama sonrası aseptik meningoensefalit gelişmiştir (125). Bu beklenmedik komplikasyon çalışmaların hızını azaltmamış, ancak aşılamanın güvenilirliğinin sorgulanmasına neden olmuştur.

2.2.6. Antioksidanlar

Alzheimer hastalığının patogeneğinde oksidatif hasarın nöronlar üzerine etkisi oldukça önemli olduğundan, oksidatif stresi azaltmak ve antioksidan korumayı arttırmak hastalığın başlamasını ve ilerlemesini azaltmaktadır. Nitekim, 52 haftalık bir klinik çalışmada antioksidan ajan Ginko biloba ekstresi (Eg761)'nin hastalığın bazı semptomlarında belirgin düzelme sağladığı görülmüştür. Özellikle bu ekstrenin hidrojen peroksit bağli hasardan nöronları koruduğu gözlenmiştir (126). Diğer bir çalışmada Vitamin E ve idebenon gibi antioksidan bileşiklerin Aβ'ya bağli nörotoksisiteyi azalttığı ve bilişsel fonksiyonlardaki bozulmaları düzelttiği saptanmıştır (127, 128).

İleri yaşlarda beyinde bakır, alüminyum, demir ve çinko gibi metal iyonlarının konsantrasyonlarında artış olmaktadır (129). Bu metal iyonlarının, Aβ agregasyonunu indüklediği ve AH oluşumuna katkıda bulunduğu düşünülmüştür. Alzheimer hastalığında yüksek konsantrasyonlarda olduğu saptanan bu metal iyonların azaltılması ile tedavide başarı elde edilmiştir. Dezferroksamin isimli şelatör ile metal iyonlarının uzaklaştırılması, beyinde oluşan senil plaklarda çözülme başlatmaktadır (130). Diğer taraftan, Aβ ile metal iyonların kombinasyonu beyinde hidrojen peroksit oluşumunu indüklemekte, oksidatif hasara neden olmakta ve bu hasar metal şelatörler ile azaltılabilmektedir (131).

2.2.7. Antiinflatuvar İlaçlar

Epidemiyolojik çalışmalarda romatoid artritli hastalarda AH görülme sıklığının az olmasının, romatoid artritte antiinflatuvar ilaçların kronik kullanımına bağlanmıştır, çünkü AH hastalığının patogeneğinde inflamatuvar olaylarda yer almaktadır (5). Retrospektif çalışmalarda indometazin gibi steroid olmayan antiinflatuvar ilaç kullanan kişilerde AH hastalığının daha ileri yaşlarda başladığı ve daha hafif seyrettiğini ortaya koymuştur (132). Bununla beraber, steroid olmayan antiinflatuvar ilaçların kullanımı ile AH hastalığı arasında herhangi bir ilişki bulunmayan çalışmalar da yayınlanmıştır (133). İbuprofenin Aβ ve plak oluşumunu azaltarak AH üzerinde olumlu etkiler oluşturduğu ileri sürülmüştür (134). Postmortem incelemelerin sonuçları da steroid olmayan ilaçları uzun süre kullananların beyinde aktive edilmiş mikrogial hücre sayısının azaldığını göstermiştir (135, 136). Steroid olmayan ilaçlar özellikle indüklenbilir nitrikoksit sentazı inhibe ederek nitrik oksit metabolitleri olan nitrit ve nitratın hücrelerde birikimini azaltabilirler (137). Bu gözlem steroid olmayan antiinflatuvar ilaçların AH üzerine olan olumlu etkilerinin nitrikoksit inhibisyonu ile ilişkili olabileceğini düşündürmekle beraber, bu konuda kesin konuşabilmek için nitrik oksit ile AH hastalığının ilişkisini de ortaya koyan daha ileri çalışmalara gereksinim vardır.

2.3. Rosmarinik Asit

Rosmarinik asit lamiasae bitki familyasında bulunan doğal polifenol bir bileşiktir (138). Rosmarinik asitin çeşitli hastalıklardaki antiinflatuvar, antioksidan etkisi incelenmiştir. Ancak RA'nın merkezi sinir sistemi üstündeki aktivitesine ilişkin çalışmalar oldukça nadirdir.

2.3.1. Rosmarinik asitin anti-inflatuvar etkileri

Literatürde RA'nın antioksidan etkisi ve anti-inflatuvar etkileriyle ilgili çeşitli çalışmalar yayınlanmıştır. Bu araştırmalarda RA'nın kobra zehiri faktörü (CVF) ile indüklenen hücrelerin lizisini ve sıçanların pençe ödemi azalttığı, kompleman sisteminin alternatif ve klasik yollarının aktivasyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir (27). Kronik glomerülofritin en sık rastlanan formu olan immunglobulin A (IgA) nefropatisi mezanjial IgA birikimi ve mezanjial hücre proliferasyonu ile karakterize edilir. Bu hastalıkla ilgili çalışmalarda temel bileşeni RA olan Perilla dekoksasyonunun mürin mezanjial hücre kültüründeki proliferasyonu inhibe ettiği, yüksek serum IgA seviyesine sahip HIGA farelerde serum IgA seviyelerini, glomerüler IgA birikimini ve glomerüler hücre proliferasyonunu baskılayarak anti-nefritik aktivite gösterdiği saptanmıştır (28). Bu araştırmaların yanı sıra, RA'nın terapotik potansiyeli inflamatuvar otoimmün artrit modelinde de test edilmiştir. Farelerde oluşturulan kollajen indüklü artrit takiben RA kullanımının etkilenen pençe sayısını, artrit indeksini ve sinovyal dokuda COX-2 eksprese eden hücre sayısını dramatik şekilde düşürdüğü görülmüştür (28).

Karsinogenezis ile ilgili bir çalışmada, 12-O-tetradekanoilforbol 13-asetat (TPA) ile tümör oluşumu sağlandıktan sonra, topikal uygulanan RA'nın tümör gelişimini belirgin şekilde inhibe ettiği izlenmiştir. 12-O-tetradekanoilforbol 13-asetat uygulanmasından 5 saat sonra RA'nın anti-inflatuvar aktivite gösterdiği azalan PGE2 ve lökotrien B4 seviyesi ile tespit edilmiştir (139). Rosmarinik asit

uygulamasının COX-2 mRNA ekspresyonunu, ROS üretimini ve lipid peroksidasyon artışını önlediği, karsinogenezde rol oynayan PGE2'nin sentezini düşürdüğü gösterilmiştir (140).

2.3.2. Rosmarinik asit ve Alzheimer Hastalığı

Yapılan kapsamlı çalışmalar (22, 23, 24) bitkilerden elde edilen bazı kimyasalların ve geleneksel doğu bitkilerinin kognisyon artırıcı özelliklere sahip olduğunu göstermektedir. Bazı toksik olmayan bitki türlerinin yaşlanmaya ve bilişsel bozukluklara faydası olduğu geçmişten bu yana söylenmekle birlikte, şu ana kadar bu bitkilerle ilişkili ayrıntılı bilimsel bir inceleme yapılmamıştır. Araştırılması düşünülen bitkiler arasında *Salvia officinalis*, *Melissa officinalis* ve *Rosmarinus officinalis* bulunmaktadır (22, 23). *Salvia officinalis* ekstraktı uygulanan AH hastalarında bilişsel fonksiyonların düzeldiği ADAS-cog ve CDR-SB testlerinin kullanıldığı bir klinik çalışma ile ortaya konurken, hafıza ve bilişsel fonksiyonlar üzerine çeşitli bitkilerin etkilerinin incelendiği bir çalışmada da özellikle bu bitkinin AH hastalığında terapotik bir potansiyeli olabileceği ileri sürülmüştür (141). Buna ek olarak, hastalardan elde edilen klinik bulgulara *Salvia officinalis* ekstraktının herhangi bir yan etkisinin olmadığı vurgulanmaktadır. *Salvia officinalis* ekstraktının antioksidan, antiinflamatuvar ve östrojen benzeri etkilerinin AH hastalığı tedavisinde etkili olduğunu gösteren klinik gözlemlere rağmen, bu bitkinin etki mekanizması halen tam olarak bilinmemektedir. Ancak, bu bitkinin tedavi edici etkilerinde bileşiminde bulunan RA'nın sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Nitekim, *Salvia officinalis* ekstraktının etken maddesi olan RA'nın A β 42 indüklü ROS oluşumunu ve lipid peroksidasyonu doz bağımlı olarak azaltması bu fikri desteklemenin yanı sıra, bu doğal bileşiğin A β kaynaklı oksidatif hasara karşı temel nöroprotektif ajan olarak tedavi amacıyla kullanılabileceğini ortaya koymuştur (142).

Diğer yandan, RA p38 MAP kinaz yolağını inhibe ederek tau hiperfosforilasyonunu, kaspaz 3 aktivasyonunu ve DNA fragmentasyonunu inhibe etmiştir (143). Rosmarinik asitin anti-amiloidojenik aktivitesi ile ilgili çalışmalar bu molekülün kısa bir karbonhidrat zinciriyle bağlı iki fenol halkasının serbest A β 'ya bağlanarak, A β 'nın fibriller A β (fA β)'ya polimerizasyonunu inhibe ettiğini, ya da bu yapının fA β 'ya bağlanarak fA β 'daki A β moleküllerinin β -sheet konformasyonunu destabilize ettiğini öne sürmektedirler (25). Böylece RA AH hastalığı gelişimini sadece ROS'u temizleyerek değil, beyinde fA β birikimini önleyerek de durdurmaktadır.

2.4. Alzheimer Hayvan Modelleri

Alzheimer hastalığının etiyolojisinin araştırılması ve olası ilaç tedavilerinin geliştirilmesi için çok çeşitli deneysel çalışmalar düzenlenmiştir (43, 127, 144). Deneysel Alzheimer modelleri AH hastalarının beyinde bulunan bir dizi nöropatolojik, biyokimyasal ve davranışsal değişimleri oluşturmak amacıyla geliştirilmiştir. Alzheimer hastalığı ile ilişkili tüm patolojik ve biyokimyasal değişimlerin hepsi birden oluşmadığı için bu modellerin hiçbiri tam olarak kabul edilmemiştir. Ancak her bir model hastalığın spesifik bir durumunu araştırmak için yararlıdır. Alzheimer hastalığı tüm merkezi sinir sisteminde yaygın bir etkiye sahip olmasına rağmen, sadece bazı nöronal sistemler özellikle etkilenir ve önemli

patolojik değişimler oluşur. En son deliller (145, 146) AH hastalığı ile ilişkili ilerleyici nörodejeneratif bozukluklara belirli nöronal sistemlerin daha duyarlı olduğunu gösterdiğinden, uygun bir AH hastalığı modelinde özellikle hipokampus ve neokorteks bölgelerindeki morfolojik ve biyokimyasal değişimler oluşmalıdır. Alzheimer'da neokorteks ve hipokampusu innerve eden bazal önbeyin kolinerjik hücrelerinin dejenerasyonu ile ilişkili bilişsel bozuklukların ortaya çıkması nedeniyle (146), deneysel AH modellerinde bu beyin bölgelerindeki lezyonlarla ilişkili davranışsal değişikliklere odaklanılmıştır.

2.4.1. Alüminyum İndüklü Model

Alzheimer hastalarının beyinde alüminyum seviyesinin aynı yaştaki kontrollere göre daha yüksek bulunması AH hastalığının etiyolojisinde alüminyumun önemli rolü olabileceğini ortaya koymuştur. Bu nedenle yapılan üç çalışmada alüminyum uygulanmasını takiben nörofibriller değişimlerin izlendiği, hafıza ve bilişsel fonksiyonların olumsuz etkilendiği saptanmıştır (147, 148, 149).

2.4.2. Beynin Belli Bölgelerinde Lezyon Oluşturulması

Genel olarak lezyon oluşturmak için nörotoksik etkileri olan ve nörotransmitter olarak bilinen glutamatın belirli analogları kullanılmaktadır. Bu bileşikler hücre gövdesine hasar verirler, fakat fiber geçitleri ve enjeksiyon bölgesindeki efferent terminallerde hasara neden olmazlar. Kullanılan toksinler ibotenik (IBO), kainik (KA), kuinolinik (QN) ve kuiskualik (QA) asitler ve n-metil d-aspartat (NMDA)'tır (150). Bu beş eksitator aminoasit AH hastalığı ile ilişkili patolojinin belirli bileşenlerini yaratmak için kullanılır. Her toksinin etkisi enjekte edildiği bölgedeki nöronlarda bulunan reseptör tipleriyle ilişkilidir.

2.4.3. Amiloid beta Enjeksiyonu ile Oluşturulan Modeller

Amiloid β 40, A β 42 yada A β 25-35 peptidlerinin beyin çeşitli kısımlarında oluşturduğu etkiyi incelemek amacıyla bu peptidler mikroenjeksiyon yoluyla beyne enjekte edilerek model oluşturulmaktadır. Yapılması planlanan araştırmanın niteliğine göre beyin çeşitli bölgeleri seçilmektedir (151). Bunlar arasında sol nükleus bazalis, entorhinal korteks, bilateral intraserebroventriküler bölge, hipokampusun CA1 bölgesi ve lateral ventriküller yer alır. Bu yolla A β peptidlerinin toksik etkileri ve bu peptidlerin etkilediği sinyal yolları incelenebilmektedir (151, 152).

2.4.4. Transjenik Hayvan Modelleri

Çeşitli transjenik hayvan modellerinde A β peptidinin hücre dışında birikmesi ve hücre içinde tau proteininin kümelenmesi gibi lezyonların kısmen oluşturulabildiği saptanmıştır. Mutant insan APP transgeninin farelere transfeksiyonu insandaki senil plaklara benzer bir A β birikimine sebep olur (153). Amiloid β birikiminin yanında akson distrofisi ve dendritlerde farklılaşma gözlenmiştir. APP x mutant PS1 gibi double transjenik farelerde lezyonlar daha erken yaşlarda gözlenmeye başlamaktadır. β -sekretaz proteininin knock-out olduğu veya aşırı eksprese edildiği transjenik fareler yanında A β 'yı yıkan nepsilisin enziminin ekspresyonunun değiştirildiği fareler üretilmiştir (154). Amiloid prekürsör protein transjenik farelerde nöronal kayıp,

nöron gövdesinde A β birikimi, inflamasyon, gliosis ve dendritik değişimler gibi konularda yeni sorular ortaya çıkmıştır. Bu hayvanlar oluşan değişimlerin kinetiğinin daha iyi anlaşılmamasını sağlamıştır. Nörofibril kümeleri yalnızca mutant tau ya da mürin tau +/- arka planında insan tau proteinini aşırı eksprese eden farelerde gözlenmektedir (153).

Amiloid Beta Birikimi ile İlgili Transjenik Modeller:

Alzheimer hastalığında çeşitli mutasyonların hastalığa sebep olabileceği görülmüştür. Bu mutasyonlar sadece APP geninde değil aynı zamanda APP'den A β oluşmasından sorumlu presenilin 1 ve 2 genlerinde de mevcuttur. Amiloid β dizisinindeki Arctic mutasyonu dışında test edilen tüm mutasyonlar hücresel modellere transfekte edildiği zaman A β 42/A β 40 oranında bir artışa sebep olmaktadır. Amiloid prekürsör protein geninin transfeksiyonu bu proteinin aşırı üretimini indükler ve böylece salınan A β peptidinin miktarı artar. Ancak farkedilir değişimler yaratacak miktarda A β üretilmesi için APP mutasyona uğramış olmalıdır. Tau genindeki mutasyonlar AH hastalığı ile ilişkili değildir fakat fronto-temporal bunama ile bağlantılıdır (155).

APP Tek Gen Transjenik Fareler:

1. PDAPP transjenik DNA dizisi

PDAPP transjenik DNA dizisi belirgin patolojik A β birikimi gözlenen ilk fare DNA dizisidir. Bu DNA dizisinde Indiana mutasyonu (V717F) taşıyan hAPP eksprese edilir. Amiloid prekürsör protein ekspresyonu PDGF promotörü tarafından sağlanırken (156), altı aylıktan itibaren heterozigot farelerde hipokampusta belirgin ekstrasellüler A β birikimleri gelişir ve birikimler 8 aylıkken izokorteksde de gözlenir (156, 157).

2. Tg2576 fare DNA dizisi

Tg2576 fare DNA dizisi hamstır prion promotörü kontrolünde 'swedish double' mutasyonu taşıyan (K670N/M671L) hAPP'nin 695 izoformunu aşırı eksprese eder (158). 9-11 aylık heterozigot hayvanlarda fokal veya diffüz A β birikimleri bulunur.

3. APP23 fare DNA dizisi

İlaç firmaları tarafından geliştirilen APP23 fare DNA dizisinde 'swedish double' mutasyonu taşıyan hAPP 751 izoformu fare Thy-1.2 promotörü kontrolünde eksprese edilir (159). Altı aylıktan başlayarak parankim ve damarlarda, diffüz ve kongofilik A β peptidi birikimi başlar.

4. Presenilin transjenik fare

Mutasyona uğratılmış insan PS1 yada PS2 geni tek başına eksprese olduğunda fark edilebilir bir lezyon indüklemese de A β peptidinin seviyesi artmıştır (160, 161, 162). Mutant PS1 transgeni endoplazmik retikulumdaki kalsiyum homeostazisini bozmuştur. Buna ilaveten son zamanlarda, mutant PS1 transgeninin hızlı aksonal taşımayı farklılaştırdığı ve tau hiperfosforilasyonunu indüklediği gösterilmiştir (163).

2.5. Ovaryektomi ve D-galaktoz ile Kurulan AH Modeli

Amiloid β , NFT ve presenilin gibi AH patolojisinin bazı spesifik özelliklerini taklit etmek için çok çeşitli hayvan modelleri geliştirilmiş olsa da bu hayvan modellerinin hiçbiri tam olarak bilişsel ve hafıza bozukluğunu ya da AH hastalarında gözlenen biyokimyasal ve histopatolojik anormallikleri temsil etmemektedir (164). Bu nedenle ideal bir AH modeli geliştirilmesi hastalığın patolojisini tam olarak anlamak için hayati öneme sahiptir. Yapılan çalışmalarda menapozda östrojen ve progesteronun azalması kadınlarda AH hastalığı gelişmesi için belirgin bir risk faktörü olarak saptanmıştır (165, 166). Down sendromu olan kadınlarda, erken menapoza girenlerde ve menapoz sonrası östrojen seviyesi düşük olanlarda AH hastalığı gözlenme yaşının daha erken olduğu gösterilmiştir (167). Bu durum menapoz sonrası östrojen miktarının azalmasının AH hastalığına yol açan patolojik işlemlerin basamaklarına katkısı olabileceğini düşündürmüştür. Alzheimer hastalığının önemli iki biyokimyasal işareti olan fosforile tau proteini ve A β peptidi ile östrojen seviyesinin ters orantılı olduğu, beynin belli bölgelerinde A β birikimlerinin yoğunluğu ile bu metabolitlerin oluşumu arasında negatif bir ilişki bulunduğu saptanmıştır (168). Schonknecht ve ark.(168) AH hastalarının serebral spinal sıvısında östrojen seviyesinin aynı yaşdaki kontrollere göre daha düşük olduğunu göstermişlerdir (169). Klinik uygulamalarda bazı çelişkili sonuçlar gözlenmesine rağmen menapoz sonrası kadınlarda östrojen yerine koyma terapisinin AH hastalığına karşı koruma sağladığı ve bilişsel fonksiyonları geliştirdiği yaygın olarak kabul edilmiştir (170). Bu gözlemlerden yola çıkılarak östrojen azalmasının fizyolojik etkilerinden yaralanılan yeni bir AH modeli geliştirilmiştir. Bu AH modelinde östrojeni azaltmak için dişi sıçanlara ovaryektomi uygulamaktadır. Ovaryektomi overlerin cerrahi olarak çıkarılması işlemi olarak tanımlanmaktadır. Bu yöntem ile endojen östrojenin azaltılması fare ve kobay beyinlerindeki A β seviyesini belirgin bir şekilde artırırken, bu hormonun AH fare modelinde A β birikimini azalttığı izlenmiştir (171). Bu bulgu ile uyumlu olarak çeşitli hücre kültürü çalışmaları östrojenin A β üretimini APP'nin α sekretaz ile non-amiloidojenik kesilmesini arttırarak azalttığını ortaya koymuştur (169, 172). Bunlara ilaveten, ovaryektomi ile uzun süreli östrojen azalması dişi sıçanlarda bazal önbeyindeki kolinerjik nöron sayısının azalmasıyla ilişkili olarak hafıza ve öğrenme sorunlarına yol açmıştır (173).

2.5.1. Dendritik Sinaps Oluşumuna Östrojenin Etkisi

Ovaryan steroid hormonu östrojen, üremenin kontrolü, göğüs ve uterus büyümesi ve kemik yoğunluğunun korunması gibi fonksiyonlara sahiptir. Otuz yıldır yapılan çalışmalar östrojenin özellikle hipokampustaki nöronal yapı ve fonksiyonlar üstünde çok çeşitli etkilere sahip olduğunu göstermiştir (174). Hipokampus ve korteks dahil hipotalamusla ilişkili birçok merkez östrojenin hedefidir (175, 176).

Hipokampal piramidal nöronlarda dendritik sinaps oluşumuna östrojenin etkisi literatürde geniş bir şekilde anlatılmıştır. Epidermal büyüme faktörü (EGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ve transforming büyüme faktörü (TGF)'ne benzer şekilde beyindeki beyin kökenli nörotrofik faktör (BDNF) de östrojen seviyesi ile pozitif, yaşla negatif bir ilişki gösterir (177, 178, 179). Östrojen dişi sıçanlarda beyinde BDNF, nörotropin 3 ve NGF gibi büyüme faktörlerini indüklemektedir. Buna bağlı olarak östrojenin, hipokampus CA1 bölgesinde spin yoğunluğunu sinaps

sayısında bir değişiklik oluşturmadan arttırdığı (180), ovaryektomi sonucu östrojen azalmasının dendritik spin yoğunluğunu azalttığı tespit edilmiştir (181).

2.5.2. Sinaptik iletim

Elektrofizyolojik alışmalarda E'nin hipokampusun CA1 bölgesinde sinaptik iletimi ve plastisiteyi, NMDA ve AMPA reseptör aktivitesini artırarak yükselttiği gösterilmiştir (182, 183). Bu artış nöronal eksitasyonla sonuçlanmaktadır. Hipokampusun CA1 bölgesinde östrojenin etkisinin fonksiyonel önemini anlamak için yapılan elektrofizyolojik çalışmalarda ovaryektomi yapılmış sıçanlara östrojen uygulanmasının CA1 nöronlarında NMDA aracılı sinaptik iletimin gecikmiş fasilitasyonuna sebep olduğunu ve voltaj kapılı kalsiyum akımlarının artışına yol açtığı tespit edilmiştir (184). Östrojen uygulanması sonucu NMDA akımlarının artmasının yanı sıra uyarılma eşiğinin düşmesi, hipokampusta LTP'nin artması hipokampus bağımlı öğrenme ve hafızada östrojenin rolü olduğunu göstermektedir (185).

2.5.3. Nöroprotektif Etki

Östrojenin fizyolojik konsantrasyonu birçok hücre tipini içeren doku kültürlerinde nöroprotektif etki göstermiştir (180). Özellikle elde edilen kanıtlar östrojenin AH, Parkinson, iskemik inme gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıklara karşı nöroprotektif bir rolü olduğunu, oksidatif stres, A β ve glutamat eksitotoksitesi gibi zararlı etkilerden nöronları koruduğunu göstermiştir (186, 187).

Östrojen etkilerinden birçoğunu çeşitli dokulardaki nükleer reseptörlerin aktivasyonu ile gerçekleştirir. Östrojenin hipokampus, bazal önbeyin ve amigdala gibi AH hastalığından etkilenen beyin bölgelerinde ER- α (östrojen reseptörü alfa) ve ER- β (östrojen reseptörü beta) olmak üzere iki östrojen reseptörü belirlenmiştir. Bunlardan hem ER- α hem de ER- β reseptörlerinin kolinerjik aktivitenin korunmasında önemli role sahip oldukları, diğer yandan, östrojenin ER- α aracılığı ile A β indüklü toksisiteye karşı koruma sağlarken, A β indüklü apoptosizi de bloke ettiği gösterilmiştir (188).

Nükleer reseptörler aracılığı ile gösterdiği uzun süreli geçikmiş etkilerinin yanında östrojen hipokampus ve diğer nöronlar üstünde hızlı bir etkiye de sahiptir. Artan kanıtlar beyindeki hücre sinyal yolaklarının hızlı indüksiyonunun östrojenin nöroprotektif etkisinde önemli rolü olduğunu vurgulamaktadır.

Östrojenin dahil olduğu nöroprotektif etkide iki sinyal yolu etkilidir:

1. Ekstrasellüler-regülatör protein kinaz yolu (ERK)

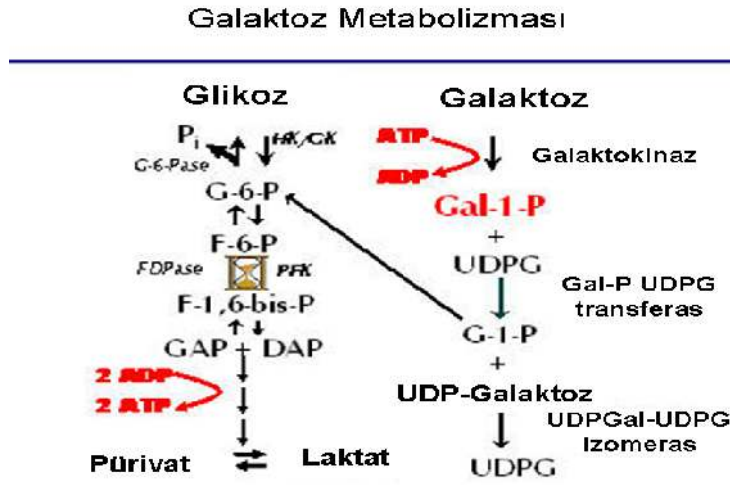
Ekstrasellüler regülatör protein kinaz yolu ile cAMP response element binding protein (CREB)'in fosforilasyonu anti-apoptotik bir protein olan bcl-2 ekspresyonunu arttırmıştır. Ekstrasellüler regülatör protein kinaz yolağının inhibisyonu E'nin nörokoruyucu etkisini bloke etmiştir (189).

2. Fosfotidilinositol 3-kinaz PI3-K/protein kinaz B yolu (AKT)

Hücre kültürü çalışmaları E'nin hızla PI3 kinaz/ Akt yolağını aktive ederek CREB fosforilasyonuna yol açtığını rapor etmektedir (190). Bu bulgu östrojenin hipokampal piramidal nöronların hücre çekirdeğinde fosforile CREB immunoreaktivitesini 15 dakikada arttığını gösteren çalışmalarla desteklenmiştir (191, 192, 193). Östrojen Akt yolağını aktive ederek nöronların hayatta kalımını arttırmıştır (189).

2.5.4. D-Galaktozun Beyne Etkisi

D-Galaktoz vücudumuzda normal olarak bulunan indirgeyici şekerlerden biridir. Normal koşullarda galaktokinaz (Galk) ile galaktoz-1-fosfata sonrada galaktoz-1-fosfat üridil transferaz (Galt) ile glukoz-1-fosfata dönüştürülür (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. D-galaktoz metabolizması

Yaşlanmanın mekanizmasını anlamak ve antiaging ilaçlar seçmek için çeşitli hayvan modelleri kurulmuştur. Bunların arasında D-galaktoz indüklü yaşlanma modeli yaşlanma mekanizması çalışmalarında ve nörokoruyucu ilaçların denenmesinde yaygın şekilde kullanılmaktadır (194, 195, 196, 197). D-galaktozun kronik kullanımı sonucu oluşan hızlanmış yaşlanma modeli ilk kez 1985'de rapor edilmiştir. Bazı araştırmalar D-galaktozun dozuna odaklanmış ve efektif dozlar 50 mg/kg'dan 1250 mg/kg'a kadar geniş bir aralıkta seçilmiştir (198, 199, 200). Uygulamaya başlanma yaşı bir aylık ile 12 aylık arasında değişmektedir ancak optimal bir yaş tam olarak belirlenmiş değildir (201).

Kronik sistemik D-galaktoz uygulaması sıçanlarda bilişsel fonksiyonlarda azalmaya, metabolik anormalliklere neden olmakta, ayrıca nörodejenerasyonu ve oksidatif hasarı indüklemektedir (202, 194, 203, 204). D-galaktozun 100 mg/kg dozunda 7 hafta kullanımı uzaysal hafızayı bozmuş, hipokampustaki nöronlarda apoptozisi, karyopiknozu ve kaspas-3 enzim seviyesini arttırmış, dentat gyrus'daki subgranüler bölgedeki yeni doğan nöronların sayısını düşürmüş, nöronal progenitör hücrelerin göçünü azaltmış ve granüler hücre katmanında yeni doğan nöronlarda

ölüm oranını arttırmıştır (205). Altı ila on hafta boyunca 60 mg/kg dozunda D-galaktoz uygulanan sıçanların öğrenme ve hafıza kapasitelerinde ilerleyen bir bozulmanın olduğu izlenirken, beyinde serbest radikallerin arttığı, aynı zamanda bazal forebrain ve hipokampusdeki kolinerjik nöronların azaldığı tespit edilmiştir (30). Bunlara ek olarak, D-galaktozun kalsiyum homeostazisinin bozulmasına ve mitokondri disfonksiyonuna sebep olduğu gözlenmiştir (206, 207).

Bazı çalışmalar D-galaktozun gen transkripsiyonunu farklılaştırdığına işaret etmektedir. D-galaktoz uygulanan farelerdeki hafıza ve öğrenme bozukluğunun hipokampustaki bazı genlerin ekspresyonunun baskılanmasıyla ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (208, 209). Örneğin sinaptik plastisiteyi, öğrenme ve hafıza yeteneklerini düzenleyen Na^+/K^+ ATPaz hipokampusta yaygın olarak bulunur ve bu enzimin disfonksiyonu membran dinlenim potansiyelinde azalmaya ve çoklu aksiyon potansiyeli oluşmasına neden olur (210). Dolayısıyla, D-galaktoz uygulanan farelerde Na^+/K^+ ATPaz ile ilişkili gen ekspresyonunun baskılanması sonucu hipokampusde Na^+/K^+ ATPaz aktivitesinin azalması (211), membran fonksiyonlarında değişikliklere yol açarak hafıza ve öğrenmeyi etkiler (212). Buna ek olarak, spektrin alfa 1 geninin baskılanması sinapslarda patolojik değişimlere katkıda bulunur ve hipokampus öğrenme modeli olarak kabul edilen LTP'yi düşürür. D-Galaktoz merkezi sinir sistemindeki nöron sinapslarında bulunan ve sinaptik plastisitede rol oynayan protein fosfataz 2 (PP2) genini baskılayarak ve fosfolipitlerin fonksiyonlarını değiştirirerek de (213) sinaptik iletimin ve LTP'nin azalmasına yol açar.

D-galaktozun aşırı oksidatif strese neden olarak zararlı etkilerini oluşturduğu düşünülmektedir. Zira beyin dokusunun oksidatif strese karşı çok hassas olması nedeniyle serbest radikallerin birikimi yapısına ve fonksiyonlarına zarar verir. Galaktoz-1-fosfat, galaktitol ve galaktonat gibi zararlı bileşiklerin seviyelerinin yükselmesi hasara sebep olurken, bu moleküllerin anormal birikimi süperoksit anyonu ve serbest oksijen radikallerinin oluşumuna yol açar (214). Ayrıca, D-galaktozun indüklediği oksidan stresin astrositlerde sadece nöronal dejenerasyona değil, aynı zamanda astrositlerin normal fonksiyonlarının bozulmasına da sebep olduğu bulunmuştur (215). En yaygın glial hücre tipi olan ve kandaki ROS'a karşı ilk savunma hattını oluşturan astrositlerin sinaptik ağ oluşumunun düzenlenmesinde, nöronal elektriksel aktivitede ve kan beyin bariyerinin korunmasında önemli rolleri söz konusudur (216). Herhangi bir patolojik faktör nedeniyle aktive olan astrositlerin GSH üretimini artırdıkları izlenirken, ekstraselüler ortamdaki fazla glutamati alarak nöronları nörotoksisiteden korudukları görülmüştür (216). D-Galaktoz uygulandığında astrositlerde perivasküler astrositik son ayakta şişme ve GSH seviyesinde azalma gibi zararlı etkiler tespit edilmiştir. Ayrıca, D-Galaktozun hayvanlarda süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon (GSH) gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini azaltması sonucu (194) antioksidan savunma sisteminin zayıflaması serbest radikal artışına yol açan diğer önemli bir faktördür.

Bu bilgilerin ışığı altında, ovaryektomi yapılan sıçanlara uzun süreli uygulanan D-galaktozun etkilerinden yararlanarak yeni bir AH modelinin geliştirilmesi mümkündür. Nitekim, oksidatif stres ve E azalmasının AH hastalığının patolojik

gelişimiyle yakından ilişkili iki temel risk faktörü olduğunu dikkate alan Hua ve ark. (30), oluşturdukları HA modelinde öğrenme ve hafıza fonksiyonlarının belirgin bir şekilde azaldığını, hastalık ile ilişkili tipik nörokimyasal ve histopatolojik değişimlerin oluştuğunu gözlemişlerdir. Ovaryektomi D-galaktoz grubu sıçanlardaki temel nörokimyasal ve yapısal değişimler hücre içi A β birikimi, intrasellüler NFT'ler, mitokondriyal ve nükleer hasar, kolinerjik eksiklik ve hipokampusta ve serebral kortekste yaygın sinaptik değişimlerdir. Bu grupta görülen fonksiyonel ve yapısal bozuklukların ovaryektomi sonrası azalan E'in antioksidan nöroprotektif etkisinin yokluğundan kaynaklandığı düşünülmektedir.

2.6. Öğrenme ve Hafıza

Memelilerde davranışın belirlenmesinde en önemli etken çevresel şartlar hakkında yeni bilgiler öğrenilmesi ve bu bilgilerin saklanmasıdır. Öğrenme, çevre hakkında bilgi edinilmesi işlemi, hafıza ise öğrenilen bilgilerin tekrar hatırlanabilecek bir şekilde şifrelenerek depolanmasıdır. Hafıza değişik yollarla sınıflandırılabilir (217).

1-) Kalıcılık süresine göre: Öğrenilen bilgilerin ne kadar süre ile hafızada tutulduğuna göre hafıza türleri uzun süreli hafıza ve kısa süreli hafıza olarak ikiye ayrılabilir.

A- *Uzun süreli hafıza (LTM):* Öğrenildikten ya da diğer bir deyişle kazanıldıktan 24 saat ve daha uzun süreler sonrasında hatırlanabilen hafıza türüdür. Bu tür hafızanın kazanılması uzun sürer.

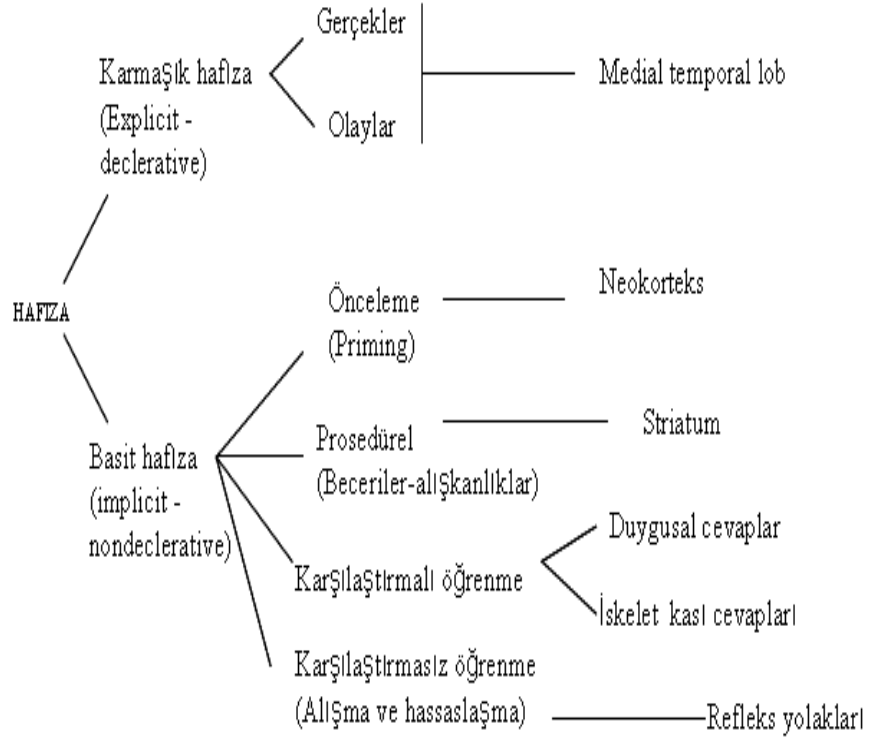
B- *Kısa süreli hafıza (STM):* Birkaç dakika içinde kazanılan ve 2-3 saate kadar hatırlanabilen hafızadır (217, 218).

2-) Doğasına göre:

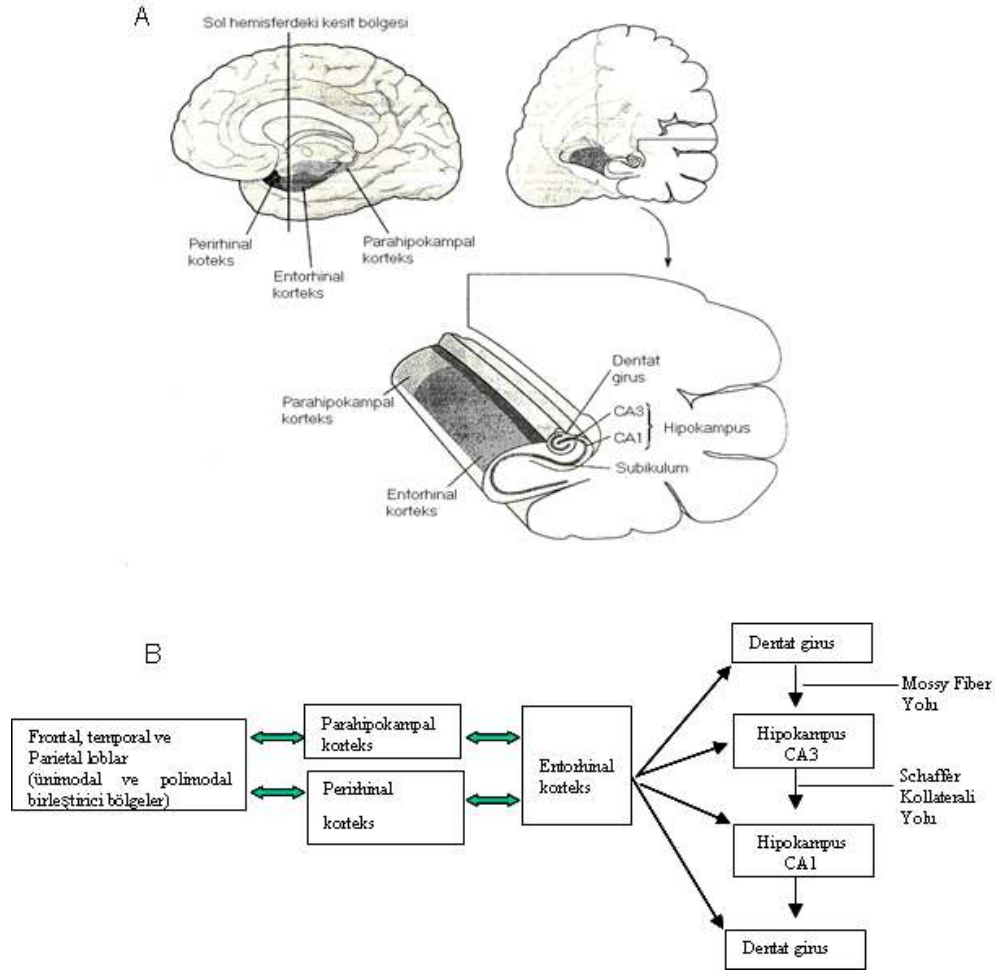
A- *Arşivsel Hafıza:* Gerektiğinde kullanılmak üzere bilginin depolanması arşivsel hafıza olarak tanımlanır.

B- *Geçici Hafıza:* Sadece bilgi kullanıldığı sürece varlığı devam eden hafızadır (218, 219).

3-) İçeriğine göre: İçeriğine göre hafıza ikiye ayrılarak incelenir. Tablo 2.1' de içeriğine göre hafızanın sınıflandırılması ve beyindeki ilgili bölgeler verilmiştir.



Tablo 2.1. İçeriğine göre hafızanın sınıflandırılması (217)



Şekil 2.7. Hipokampusun anatomik organizasyonu (217).

A. Hafıza için önemli olan medial temporal lobun bileşenleri

B. Karmaşık hafızanın kazanılması sırasındaki bilginin beyinde işlenmesi.

Bilginin hipokampusa giriş ve çıkış yolları

Karmaşık hafızanın ilk olarak kortekste görsel, işitsel veya duyuşal bilgilerin birleştirildiği bölgelerin bir ya da daha fazlasında işlenerek kazanıldığı insan ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bilgi buradan parahippokampal ve perihippokampal bölgelere, daha sonra da entorhinal kortekse, dentat girusa, hipokampusa, subikuluma ve tekrar entorhinal kortekse taşınır (Şekil 2.7). Bilgi entorhinal korteksten parahippokampal ve perihippokampal bölgeler üzerinden korteksteki polimodal bilgi işlem bölgelerine geri döner. Bilginin izlediği bu yol Şekil 2.7. B’de şematik olarak gösterilmiştir. Dolayısıyla karmaşık hafıza oluşumu sırasındaki bilgi işlemede entorhinal korteksin iki yönlü fonksiyonu vardır. Birincisi, hipokampusa bilgi girişi işlevidir. Entorhinal korteksten kalkan aksonlar perforant yol üzerinden dentat girusa gider. İkincisi, hipokampustan bilgi çıkışı entorhinal korteks ile olur. Korteksteki polimodal birleştirici bölgelerden hipokampusa gelen ve hipokampustan geri aynı bölgelere giden bilgi entorhinal kortekste birleşir. Özellikle entorhinal korteksinde hasar olan hastalarda hafıza kaybı ileri seviyededir ve bir tek

değil bütün duyu modaliteleri bu hasardan etkilenir. Karmaşık hafızayı bozan en önemli dejeneratif hastalık AH'dır. Alzheimer'da erken patolojik değişimler entorhinal kortekste olur (217).

Beynin bir çok bölgesi kognitif işlemlerde rol almakla birlikte, hipokampus bazı öğrenme ve hafıza türlerinde kilit rol oynar (220, 221, 222). Özellikle kısa süreli hafızanın uzun süreli hafızaya dönüşümünde, yani pekiştirmede gerekli olduğu ileri sürülmüştür. Diğer yandan hipokampusun önemli rol oynadığı hafıza çeşitlerinden biri de uzaysal hafızadır. Uzaysal hafıza yer, yön ve uzaysal ipuçlarının öğrenilmesi ve daha sonra hatırlanmasını gerektiren bir tür karmaşık hafızadır (220).

Maymun ve insanlarda hipokampus veya bağlantılarındaki (forniks gibi) lezyonlar, nesne-yer hafıza testlerinde performansı bozmuştur. Köpek ve sıçanlarda oluşturulan hipokampal lezyonlar uzaysal hafızayı bozmuştur (223). Dolayısıyla hipokampus veya bağlantılarındaki lezyonların uzaysal hafızayı bozması, hipokampusun uzaysal hafızanın kodlanmasında ve kullanılmasında anahtar rol oynadığını ortaya koymuştur. AH'da hipokampustaki amiloid plakların nöronlarda dejenerasyona sebep olarak öğrenme ve hafıza fonksiyonlarını bozduğu bilinmektedir (220).

2.6.1. Uzun Süreli Güçlenme (Long Term Potentiation – LTP)

Hipokampustaki yolların yüksek frekanslı (100 Hz) uyarılması (tetanize edilmesi) sinaptik etkinlikte uzun süreli artışa neden olur. Bu elektrofizyolojik olaya LTP denir ve hafıza oluşumunda rol oynadığı ileri sürülmektedir. LTP sıçan ve kedinin görsel sisteminde, kedi motor korteksinde, sıçanda piriform korteksinin servikal gangliyonlarında, amigdalada, dorsal ve ventral omurilikte gözlenmiştir. Beynin birçok bölgesindeki ve periferel sinir sistemindeki sinapslarda da varlığı gösterilmiş olsa da, öğrenme ve hafızada önemli rol oynayan hipokampusta en belirgindir. Sinaptik güçlenmenin yüksek frekanslı uyarıdan hemen sonra değil, birkaç dakika sonra maksimuma ulaşması, güçlenmenin bir takım karmaşık işlemler sonrasında ortaya çıktığını göstermektedir. (217)

Keşfedilmesinden bugüne kadar yapılan çalışmalarda, LTP bir çok canlı türünde gösterilmiştir. Ayrıca beynin bir çok bölgesinde LTP'nin varlığı bilinmektedir. Bu bölgeler arasında belli hafıza türlerinin (yetenek ve beceriler gibi) depolandığı serebral korteks de bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda LTP'nin iki türü gözlenmiştir:

Homosinaptik LTP: Sinaptik güçlenme uyarıyı alan sinapslarla sınırlıdır.

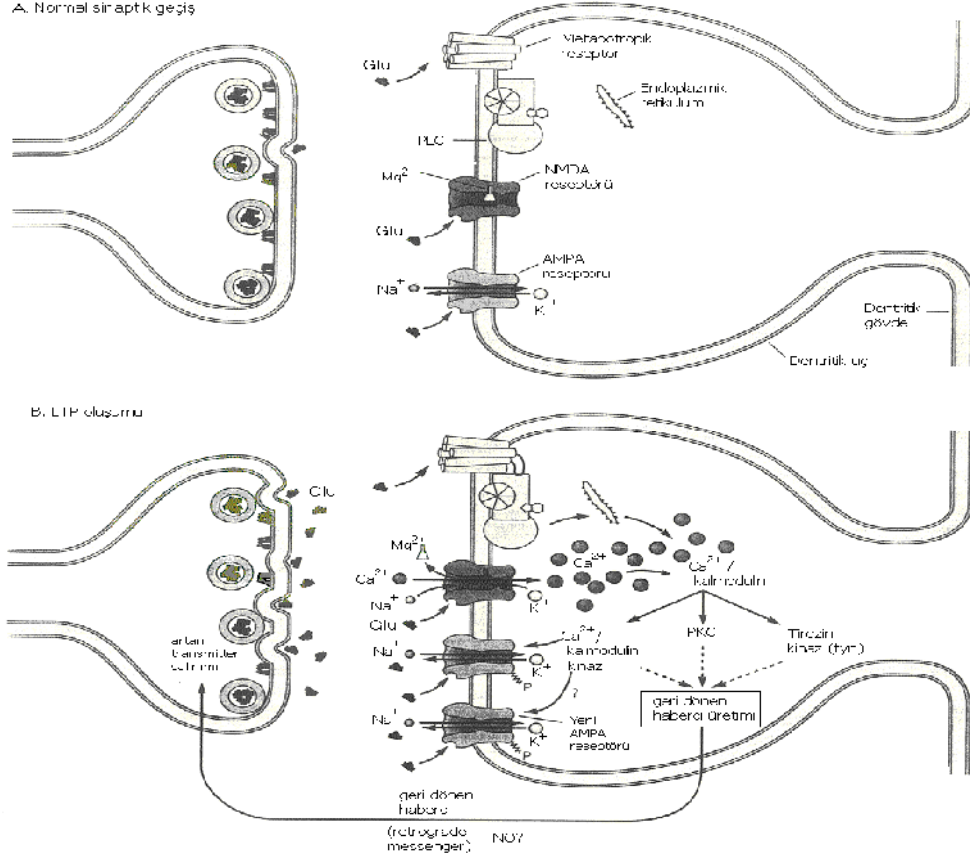
Heterosinaptik LTP: Sinaptik güçlenme aynı nöronda uyarı almayan sinapslarda da görülür.

2.6.2. LTP'nin Hücresel Mekanizması

LTP, memeli beyinde hafıza oluşumu için gereklidir. Hafıza oluşumu kalıcı sinaptik değişimler sayesinde gerçekleşir. LTP, sinaptik geçişin güçlendiği bir erken faz ve bu güçlenmenin devam ettirildiği bir geç faz olarak iki etapta incelenebilir. Geç faz protein sentezi ve yeni RNA transkripsiyonu ile karakterize edilir. LTP'nin hücresel mekanizmaları bu iki faz dikkate alınarak incelenmiştir.

LTP'nin erken fazı (kısa süreli güçlenme): Sinapsın normal aktivitesi sırasında presinaptik terminalden salınan glutamat hem NMDA hem de AMPA (non-NMDA) reseptörlerine etki eder. Bu durumda AMPA reseptörlerinden hücre içine Na ve K akımı devam eder. Fakat NMDA reseptörü Mg^{+2} iyonunun blokajı nedeniyle kapalı durumdadır. Yüksek frekanslı uyarıda olduğu gibi postsinaptik membran AMPA reseptör-kanalları aracılığıyla depolarize olduğu zaman NMDA reseptör-kanalındaki magnezyum (Mg^{+2}) blokajı kalkar ve NMDA reseptöründen hücre içine kalsiyum (Ca^{+2}) akımı gerçekleşir. Dentritik uçtaki Ca^{+2} artışı Ca^{+2} 'a bağlı kinazları (Ca-Kalmodulin kinaz II ve PKC) ve tirozin kinazı aktive eder. Aktive olan Ca-kalmodulin kinaz, AMPA reseptör-kanallarını fosforile ederek glutamata olan hassaslığını artırır. Ayrıca normal durumda pasif olan AMPA reseptörlerini de aktive eder (Şekil 2.8). Bu değişimler postsinaptikte LTP'nin devamına katkıda bulunur. LTP oluşuktan sonra postsinaptik hücre bazı haberci moleküller salar. Presinaptik hücreye geri dönen bu haberci (retrograd messenger) presinaptik terminalde protein kinazları aktive ederek nörotransmitter salınımını artırır. Bu haberci moleküllerden nitrik oksit presinaptik terminalde cGMP aracılığı ile PKG'yi (protein kinaz G) aktive ettiği ve bu yolla nörotransmitter salınımını arttırdığı gösterilmiştir. Bu durumdan sonra bütün bu zincirleme olayları başlatan uyarı ortadan kalksa bile sinaptik geçiş güçlenmiş olarak devam eder. Yani LTP bir kez oluşunca kendi kendini devam ettirir (217).

LTP'nin geç fazı (uzun süreli güçlenme): LTP'nin erken fazını oluşturan uyarı devam ederse (100 Hz'lik uyarı 1 saniye boyunca 5-10 dakika aryla 3-4 defa uygulanırsa) postsinaptikte artan Ca^{+2} adenilat siklazı da aktive eder. Adenilat siklaz cAMP miktarını arttırarak cAMP'ye bağlı protein kinazı (cAMP kinaz) aktive eder. Aktive olan cAMP kinaz hücre çekirdeğine girer ve CREB (cAMP cevap elementi bağlayan protein – cAMP response element binding protein) proteinini fosforile eder. CREB de yapısal değişiklikleri başlatan hedefleri aktive eder. LTP'nin geç fazında protein ve RNA sentezi ile karakterize edilen yapısal değişiklikler olur ve erken fazından en belirgin olarak bu özelliği ile ayrılır (217).



Şekil 2.8. A) Bazal aktivite sırasında (düşük frekanslı uyarı) presinaptik membrandan salınan Glutamat NMDA ve non-NMDA reseptörlerine etki eder. Bu durumda NMDA reseptörleri Mg^{+2} blokajı nedeniyle aktif değildir. **B)** Postsinaptik membranı depolarize edici bir uyarı (yüksek frekanslı uyarı) Mg^{+2} iyonunu NMDA reseptöründen uzaklaştırır ve aktif duruma geçen reseptör-kanal açılır ve hücre içine Ca^{+2} girişi olur. Artan Ca^{+2} miktarı Ca/kalmodulin kinaz'ı, protein kinaz C'yi ve tirozin kinaz fyn'i aktive eder. Postsinaptikte LTP oluştuktan sonra, postsinaptikte sentezlenen ve presinaptik hücreye geri dönen ve protein kinazları aktive ederek daha fazla glutamat salınımını başlatan bir mesajcı (retrograd messenger) salınır. Bu haberci molekülün NO olduğu düşünölmektedir. Ancak CO, araşidonic asit ve bazı nörotrofinlerin de retrograd haberci olarak rol oynuyor olabileceği ileri sürölmüştür (217).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda öğrenme ve hafızayı etkileyen önemli faktörlerin başında serbest radikaller ve oluşturduğu oksidatif stresin olduğu ileri sürölmektedir (224, 225, 226). Nitekim, kognisyon bozuklukları görölen bir çok hastalığın etyopatogeneğinde artan serbest radikallerin rollerinin olması nedeniyle antioksidan içeren tedavi yöntemlerinin uygulanması bu görüşü desteklemektedir.

Bilindiği gibi, AH hastalığının en önemli etkilerinden biri de öğrenme ve hafızanın azalmasıdır (227). Daha önceki bazı yayınlarda RA'nın belli bir dozun üstünde lokomotor aktiviteyi ve motivasyonu arttırdığı belirtildiğinden, çalışmamızda bu asitin öğrenme ve hafıza üzerindeki olası iyileştirici etkisi aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla da, Y labirent, lokomotor aktivite testi uygulanarak sıçanların öğrenme, hafıza yetenekleri ve lokomotor aktiviteleri değerlendirilmiştir.

2.6.3. Öğrenme Deneyleri

Yirminci yüzyılın başlarından bu yana uzaysal öğrenme ve hafıza ile ilgili çalışmalarda çok çeşitli labirent düzenekleri kullanılmıştır. Bu düzeneklerde birçok farklı protokol uygulanarak kısa ve uzun süreli uzaysal hafıza, yer ve yön öğrenme becerisi ölçülmüştür. Öğrenme ve hafıza deneylerinde tercih edilen ve en çok kullanılanlar aşağıda sırasıyla özetlenmiştir.

Radial Kollu Labirent:

Radial kollu labirent daha çok uzaysal öğrenme ve hafızanın belirlenmesi amacıyla kullanılır (227). Dairesel bir alanı çevreleyen sekiz veya daha fazla eş koldan oluşur. Seçilen protokole göre istenen sayıdaki kollara ödül olarak yem konur. Hayvan labirentteki ve odadaki uzaysal ipuçlarına göre yemin bulunduğu kol veya kolları bulmaya çalışır. Hayvanların bir kolda ödül olup olmadığını kontrol ettikten sonra yeni bir kolu incelemek için her seferinde merkez platforma dönmek zorunda olmaları öğrenmeyi zorlaştıran bir faktördür.



Şekil 2.9. Radial kollu labirent

Morris Su Tankı:

Morris su tankı uzaysal öğrenmeyi test etmek için dizayn edilmiştir (228). Uzaysal öğrenme ile ilişkili diğer düzeneklerle karşılaştırıldığında koku izlerinin olmaması ve farklı kaçış yollarının olması gibi avantajları vardır.



Şekil 2.10. Morris su tankı

Bu düzenekte koyu renkli plastik bir malzemeden yapılmış ortalama 40 cm derinliğinde bir havuz kullanılır. Havuz içerisindeki suya küçük bir miktar allerjik olmayan ve suda çözünabilen siyah boya eklenerek beyaz sıçanlarla su arasında bir kontrast farkı elde edilmesi sağlanır. Bu kontrast farkı yardımıyla sıçanın hareketleri video sistemi ile kaydedilebilir. Havuz duvarlarına yada düzeneğin içinde bulunduğu odanın duvarlarına uzaysal ipuçları yerleştirilir. 10x10 cm boyutlarındaki siyah renkli, metalden yapılmış platform suyun altında sabitlenir.

Barnes Labirenti:

Barnes labirenti radyal kollu labirent ve morris su tankına çok benzemekle birlikte, radyal kol testindeki yem kısıtlaması ve suyla ilişkili stresin etkileri bu yöntemde elimine edilmiştir. Barnes labirenti de uzaysal öğrenme ve hafızanın test edilmesi için geliştirilmiştir. Bir platformdan ibaret olan labirentte bir çok delik bulunmakta olup, sadece bir tanesi kafese giden yola bağlıdır. Hayvanlar parlak ışıqla aydınlatılmış platformdan daha güvenli olan küçük karanlık deliklere kaçmak ve kafese ulaşmak eğilimi içindedirler. Dolayısıyla doğru deliği bulmak için platform üzerindeki ve odadaki görsel işaretleri kullanmaları gerekir. Bu da uzaysal öğrenmenin ölçülmesine olanak sağlamaktadır (229).



Şekil 2.11. Barnes labirenti

T Labirent Testi:

T labirenti uzun süreli uzaysal hafızanın ve öğrenmenin ölçüldüğü deneylerde kullanılır. Hayvanlar hafızalarını kullanarak ödül olan kolu yada bir önce girdiği kolu hatırlayarak diğer kolu tercih etmeyi öğrenmek zorundadır.



Şekil 2.12. T labirenti

Yapılan bir deneyde çalışan hafızayı ölçmek için t-labirent testi kullanılmıştır. Bu deneyde çalışma hafızası T-labirentinde gecikmiş alternasyon testi ile saptanmıştır (230, 231). Sıçanların yemeğe karşı motivasyonlarını arttırmak amacıyla deney sonuna kadar optimum ağırlıklarının altında tutulmuşlardır. Başlangıçta sıçanlar 5 gün boyunca 5-10 dakika süreyle labirente bırakılmış, kolların sonundaki yemleri yemelerine izin verilmiştir (230). Sıçanlara günlük olarak 11 devamlı deneme uygulanmış, ödül olan yeme ulaşmak için sol ve sağ kol arasında dönüşüm yapmaları gerekmiştir. Üç gün boyunca yapılan doğru denemelerin ortalaması > 90 ise sıçanlar başarılı kabul edilmiş, bu kritere ulaşınca uzaysal gecikmiş alternasyonu ölçmek için denemeler arasında 30 yada 60 saniyelik zaman bırakılarak iki gün boyunca yemi bulmak için geçen süre ve yapılan hataların sayısı kaydedilmiştir. Uzaysal hafızayının göstergesi olarak yapılan hata sayısı ve başarı kriterine ulaşma süresi ölçülürken, motor bozuklukları belirlemek için sıçanın yeme ulaşmak için harcadığı süre kaydedilmiştir (230, 231).

Y Labirent Testi:

Y labirenti T labirenti gibi üç eş kolda oluşur ancak keskin dönüşler yoktur. Bu yumuşak dönüşler öğrenme süresinin azalmasını sağlamaktadır. Y labirent testi 1976 yılında deney hayvanlarının uzaysal hafıza performanslarını ölçmek için geliştirilmiş ve daha sonra sıçanlarda ve diğer kemirgenlerde uzaysal öğrenme çalışmalarında popüler hale gelmiş bir davranış testidir (232). Simetrik Y labirenti Dellu (232) tarafından hipokampusla ilişkili uzaysal hafızanın tayini amacıyla kullanılmıştır.

Yapılan bir incelemede kronik antioksidan terapinin transjenik farelerde gözlenen bilişsel değişimlere etkisi Y labirent (227) kullanılarak analiz edilmiştir. Tüm testler aynı odada aynı saatlerde gerçekleştirilerek koşulların sabit kalması sağlanmıştır. Y labirentin kolları a, b, c şeklinde adlandırılmıştır. Her hayvan Y labirentin merkezine yerleştirilerek herbir kola giriş sayıları kaydedilmiştir. Peşpeşe (abc) ya da (bca) gibi üç farklı kola giriş bir alternasyon olarak tanımlanmış, bu alternasyon skorları yüzde olarak hesaplanmıştır. Dahası kola girişlerin toplam sayısı hayvanın genel aktivitesinin bir ölçüsü olarak kullanılmıştır.



Şekil 2.13. Y-labirenti

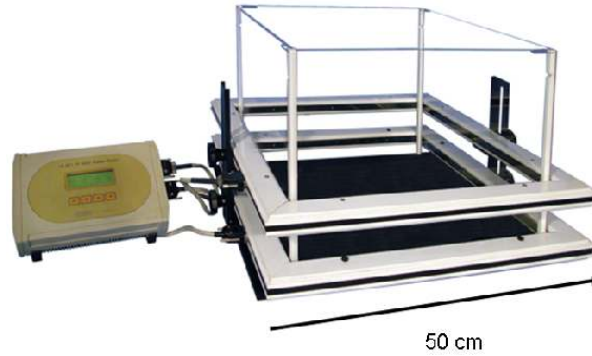
Bir diğer çalışmada Y labirentin kolları 'start', 'other' ve 'novel' kol olarak adlandırılmış, deneyin ilk kısmında 'novel' kol tamamen kapalı iken sıçan 'start' kolunun bir ucuna bırakılarak labirenti 10 dakika boyunca incelemesine izin verilmiştir. İki saat aradan sonra kapalı olan 'novel' kol açılarak sıçan 5 dakika boyunca labirente bırakılmıştır (233). Bu süre zarfında davranışları kaydedilmiş ve her bir kola giriş sayıları, her kolda geçirdikleri toplam süre video takip sistemi

kullanılarak analiz edilmiştir. Bu testin amacı sıçanın kolları yeterince inceleyip incelemediğini görmek, yeni kolumu yoksa önceden gezdiği kolumu tercih ettiklerini saptamaktır. Hafıza fonksiyonlarını bozan ya da düzelten ilaçların etkisi bu yolla ölçülebilir. Bilişsel fonksiyonları normal bir deneğin yeni kolu inceleme isteğinin daha fazla olduğu yapılan çalışmalarda gözlenmiştir. Y labirent testi kullanılarak yapılan bir çalışmada kronik stresin uzaysal hafıza ve öğrenmeyi bozduğu, labirent içerisine ipucu olarak yerleştirilen çeşitli şekillerin ise bu bozulmayı düzelttiği görülmüştür.

Deney hayvanlarının aç veya susuz kalmaması ya da acı verici bir uygulamanın olmaması nedeniyle, Y labirent testinin deneysel çalışmalar için avantajlı olduğu ileri sürülmüştür (42).

Lokomotor Aktivite Testi:

Lokomotor aktivite testi ise 1923 yılından bu yana hayvanların araştırmacı yetenekleri ve hareket performansını ölçmek için kullanılmaktadır (234). Deney parlak ışıkla aydınlatılmış kare yada dairel bir alanda yapılmaktadır. Bu alan hayvanın çeşitli hareketlerini ölçebilen sensörlerle çevrelenmektedir.



Şekil 2.14. Lokomotor aktivite kafesi

Yapılan çalışmalarda farklı deney protokolleri oluşturulmuştur (235). Bilişsel fonksiyonlara dopamin reseptörünün etkisinin incelendiği bir çalışmada lokomotor aktivitenin ölçülmesi için kare şeklindeki alan eşit parçalara ayrılmış, belli bir süre boyunca bu parçalar arası geçiş sayısı, katedilen toplam mesafe, hareketsiz durma yüzdesi kaydedilmiştir.

Açık alan testi hayvanların aktivitesi yanısıra endişe ile ilişkili davranışlarını test etmek içinde kullanılır (236). Bu amaçla yapılan bir çalışmada lokomotor aktivite alanı 10x10 cm'lik karelere bölünür. Beş dakika boyunca sıçanların geçtiği kare sayısı ve alanın merkezindeki karelerde geçirdikleri süre kaydedilmiştir. Endişe içindeki sıçanlar daha çok kenardaki karelerde gezmeyi tercih etmektedir. Böylece merkez karelerde geçirilen süre hayvanların endişe seviyesi ile ilişkili bilgi sağlamıştır.

GEREÇLER VE YÖNTEMLER

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarları ve Deney Hayvanları Ünitesinde gerçekleştirilen bu çalışmada 100 adet 5 aylık, ortalama 250 g ağırlığında dişi Wistar sıçanlar kullanılmıştır.

3.1. Gruplandırma ve Deney Protokolü

Çalışmamızda 100 adet 5 aylık Wistar dişi sıçan her grupta 20 hayvan bulunmak üzere rastgele bölünerek 5 grup oluşturulmuştur.

Gruplandırma:

Deney Hayvanları Ünitesinden birer hafta ara ile rastgele alınan toplam 100 adet sıçan her grupta 20 hayvan olacak şekilde beş gruba bölünerek,

Grup 1: Kontrol grubu (K)

Grup 2: Sham grubu (SH)

Grup 3: Rosmarinik asit grubu (R)

Grup 4: Ovaryektomi+ D-galaktoz grubu (OD)

Grup 5: Ovaryektomi+ D-galaktoz + rosmarinik asit grubu (ODR)
grupları oluşturulmuştur.

Deney protokolü:

Altmış günlük deney süresi boyunca, hayvanlar her kafeste 4 hayvan olacak şekilde, 12 saatlik karanlık/aydınlık siklusunda tutulmuşlardır. Bu süre içinde hayvanlar, ticari sıçan yemi ve musluk suyu ile beslenmiştir. Yem tüketimleri günlük olarak, ağırlık değişimleri ise haftada bir kez ölçülerek takip edilmiştir.

Deney süresince;

i) K grubuna herhangi bir işlem uygulanmamıştır.

ii) R grubuna 2 ay boyunca gavaj yoluyla hergün 50 mg/kg RA verilmiştir. Rosmarinik asitin 0,05 g'ı 1 ml serum fizyolojik içinde çözölmüştür.

iii) OD grubuna ovaryektomi yapılmıştır. Ameliyat sonrası bir haftalık iyileşme döneminden sonra 2 ay boyunca intraperitonel olarak 80 mg/kg dozda D-Galaktoz uygulanmıştır. D-Galaktozun 0,08 g'ı 1 ml serum fizyolojik içinde çözölmüştür.

iv) ODR grubuna ovaryektomi yapılmıştır. Ameliyat sonrası bir haftalık iyileşme döneminden sonra 2 ay boyunca intraperitonel olarak 80 mg/kg dozda D-Galaktoz ve gavaj yoluyla 50 mg/kg dozda RA uygulanmıştır.

v) S grubuna sham ameliyat yapılmıştır. Ameliyat sonrası bir haftalık iyileşme döneminden sonra 2 ay boyunca olarak 1 ml/kg dozda salin intraperitonel ve gavajla uygulanmıştır.

Deneylerde;

- D-Galaktoz (Sigma): Nöronlarda hasar oluşturmak için nörotoksik ajan olarak kullanılmıştır.
- Rosmarinik asit (Carbosynth): Nöronları koruyucu etki gösteren antioksidan ve anti-inflamatuar ajan olarak kullanılmıştır.

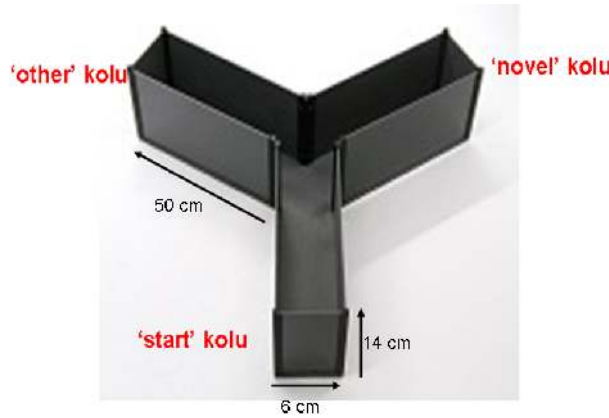
Öğrenme deneylerini takiben, ürethan anestezi altında sıçanların aortlarından perfüzyon yapıldıktan sonra beyin dokuları çıkarılmıştır. Beyin dokularının bir kısmı paraformaldehit içinde, kalan beyin dokuları sıvı nitrojen içinde saklanmıştır.

3.2.Öğrenme Parametrelerin Tayini

Projemizde, öğrenme parametreleri için Y labirenti testi ve lokomotor aktivite testi kullanılmıştır.

3.2.1. Y-Labirent Testi

Çalışmamızda Y labirentin kolları 'start', 'other' ve 'novel' kol olarak adlandırılmıştır.

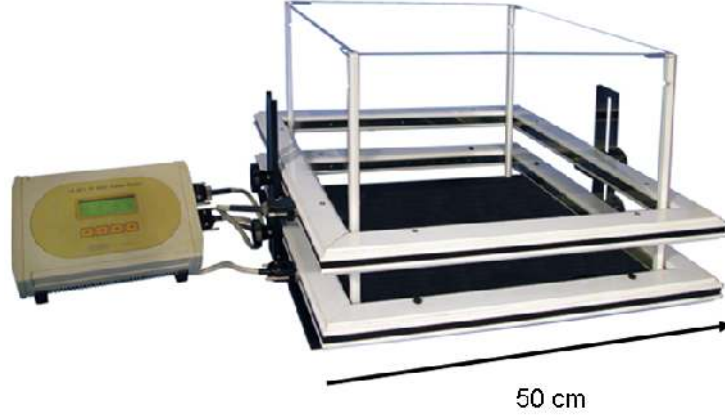


Şekil 3.1 Y labirenti

Deneyin ilk kısmında sıçanlar 'start' kolunun bir ucuna bırakılmışlardır. Her bir sıçana 'novel' kol tamamen kapalı iken, diğer kolları serbestçe inceleyebilmeleri için 10 dakika zaman verilmiştir. İki saat aradan sonra kapalı olan 'novel' kol açılarak sıçanlar Y labirente 5 dakika bırakılarak davranışları video ile kaydedilmiş ve her bir kola giriş sayıları, her kolda geçirdikleri toplam süre video takip sistemi kullanılarak analiz edilmiştir.

3.2.2. Lokomotor aktivite Testi

Deney parlak ışıqla aydınlatılmış kenar uzunluğu 0.5 m olan 0.45 m yükseklikteki bir duvarla çevrili kare bir alanda yapılmıştır. Bu alan hayvanın yürüyüş ve iki ayak üstüne kalkış gibi hareketlerini ölçebilen sensörlerle çevrelenmiştir. Deneyin başlangıcında deney hayvanı bu alanın merkezine bırakılmış ve 5 dakika boyunca hareketleri lokomotor aktivitenin değerlendirilmesi için dijital olarak kaydedilmiştir. Sıçanın katettiği toplam mesafe, ambulator hareket miktarı ve hareketsiz kaldığı süre ölçülmüştür.



Şekil 3.2. Lokomotor aktivite kafesi

3.3. Biyokimyasal Parametrelerin Tayini

3.3.1. Doku Tiobarbitürik Asit Reaktif Ürünlerinin (TBARS) Ölçümleri

Beyin ve retina dokularında TBARS ölçümleri, Wasowicz ve arkadaşlarının (237) yöntemine göre yapılmıştır.

Prensip:

Bu metodun temel prensibi, lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA'nın, 2-tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girmesi ve oluşan bileşiğin bütanol fazına ekstrakte edilerek 525 nm eksitasyon ve 547 nm emisyon dalga boyunda spektrofotometrik olarak okunması esasına dayanır.

Reaktifler:

29 mM tiobarbitürik asit (Sigma-T5500): 0.418 g TBA, 50 ml distile su ve 50 ml glacial asetik asit(Acetic acid glacial extra pure, Merck-56) içinde çözülmüştür.

5 M HCl (Hydrochloric acid, Merck-314)

n-bütanol (n-Butanol, Merck-329)

Standart solüsyonu: Tetraetoksipropen (1,1,3,3-tetraethoxy-propane, Sigma-T9889 stok solüsyonundan distile su ile sulandırılarak hazırlanmıştır.

İşlemler: 1 ml distile su içeren tüpe 50 µl doku süpernatantı konulduktan sonra, 1 ml tiobarbitürik asit (TBA, 29 mmol/L) eklenmiştir. Tüp iyice karıştırıldıktan sonra, 1

saat süreyle 95-100 derece arasında kaynatılmıştır. Numuneler soğutulduktan sonra 25 µl HCl (5 mol/L) ve 3.5 ml n-bütanol eklenerek vortekslenmiş ve bu işlemi takiben 3000xg'de 10 dakika santrifüj edilerek, bütanol fazı ayrılmıştır. Bütanol ekstraktının floresansı, eksitasyon dalga boyu 525 nm, emisyon dalga boyu 547 nm olarak spektrofourometrede (Perkin Elmer Luminescence spectrometer, LS50B) okunmuştur.

TBARS Miktarının Hesaplanması: 1,1,3,3,-tetra-metoksi-propan standardı numune gibi çalışılarak standart grafiği oluşturulmuştur. Dokuların TBARS miktarı bu grafik yardımıyla hesaplandıktan sonra nmol/g protein olarak saptanmıştır.

3.3.2. Protein Tayini

Beyin ve retina dokularında protein tayini modifiye Bredford yöntemine dayanan bir kit ile yapılmıştır (238).

Reaktifler:

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

İşlemler: 1 µl doku süpernatantı 999 µl distile su ile sulandırıldıktan (1:1000) sonra üzerine 1 ml CPPA reaktifi eklenmiş ve 595 nm'de absorbans spektrofotometrik olarak okunmuştur. Standart çalışması ise, numune yerine artan konsantrasyonlarda 1:1000 sulandırmaya sahip BSA kullanılarak yapılmıştır.

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

3.3.3. PGE₂ Tayini

Prostaglandin E₂ (PGE₂) miktarının analizi dokuya uyumlu EIA kiti kullanılarak yapılmıştır.

Reaktifler ve Kimyasallar:

- 1) PGE₂ Enzymeimmunoassay kiti (PGE₂ Enzymeimmunoassay System, Cayman)
- 2) Homojenizasyon Tamponu (pH: 7.5)
50 mM Tris HCl (Tris[hydroxymethyl]aminomethane hydrochloride, Sigma, T-6666)
0.02 M EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid, Sigma, ED2P) 5 mg/ml
İndometazin (Indomethacin, Sigma, I-7378) kullanılarak hazırlanmıştır.
- 3) 1:4 oranında hazırlanmış Etanol:su) Solüsyonu (C₂H₅OH, % 99.5'lik Absolü alkol
- 4) Glasiyel asetik asit (Glacial Acetic acid, % 99-100)
- 5) Hekzan (Hexane, Merck, 4368)
- 6) Etil asetat (Ethyl Acetate)

İşlemler: PGE₂ miktarı tayini için buz üzerinde hipokampus dokusundan alınan parçalar 5 mg/ml indometazin ilave edilmiş homojenizasyon tamponu içinde homojenize edilmişlerdir. 0.5 ml homojenat üzerine sırasıyla, 0.5 ml 1:4 su:Etanol

solüsyonu, 10 µl Glasiyal asetik asit eklenip, yavaşça çalkalanarak, 5 dk oda ısısında bekletilmiş ve bekleme süresinin sonunda, 2500 g'de 2 dk süresince santrifüj edilmiştir. Oluşan süpernatant, 2 hacim % 10'luk Etanol ile yıkanmış olan 100 mg Amprep C2 mikrokolonuna uygulanmıştır. Uygulama sonrasında aynı kolon önce 1 hacim distile su ile ardından 1 hacim hekzan ile yıkanmıştır. Son olarak, 0.75 ml etil asetat 2 defa kolona uygulanmış ve kolondaki PGE₂ temiz ependorf tüplere toplanmıştır. 1.5 ml hacmindeki Etil asetat yaklaşık 2 saat liyofilize edilmiş ve numunedeki PGE₂ EIA kiti ile analiz edilmek üzere hazır hale getirilerek -20 °C'de saklanmıştır. EIA kiti ile yapılan ölçüm sonrasında örnekteki PGE₂ miktarı pg/ml doku olarak hesaplanmıştır.

3.4. İmmunohistokimyasal Parametrelerin Tayini

Beyin dokusundan alınan 5 mikron kalınlığındaki parafin kesitler, Poly-L-Lizin kaplı lamalar üzerine alınarak bir gece 56 derecelik etüvde bekletilmiştir. Deparafinasyon için iki kere onar dakika ksilollerden geçirilen kesitler her birinde beşer dakika olmak kaydıyla %100, %90, %80 ve %70'lik alçalan alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edilmişlerdir. Daha sonra, distile suda çalkalanmış ve fosfat tuzu tamponunda (PBS, Ph: 7.2 -7.4) üç kere beşer dakika yıkanmışlardır. Kesitler, antijenik maskenin giderilmesi için 200 ml sitrat tamponuna (pH:6.0) konularak mikrodalga fırında iki kere beşer dakika muamele edilmiş daha sonra fırın dışında yirmi dakika soğumaya bırakılmışlardır.

Bunu takiben çevresi hidrofobik kalemle çizilen kesitler, distile sudan ve PBS 'ten geçirildikten sonra endojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi için % 3'lük hidrojen peroksit ile yarım saat oda ısısında inkübe edilmişlerdir. Distile suda çalkalanıp PBS 'te yıkanan kesitler oda sıcaklığında ve nemli ortamda özgül olmayan immünoglobulin bağlanmalarını önlemek amacıyla bloklayıcı serumu ile yedi dakika muamele edilmiş ve serumun fazlası alınarak kesitler, fare monoklonal anti-Amiloid beta antikoruyla bir saat süreyle oda ısısında nemli ortamda inkübe edilmişlerdir. Kontrol kesitlerine primer antikor yerine normal fare immünoglobulinleri uygulanmıştır. İnkübasyon sonunda PBS ile üç defa beşer dakika yıkanan kesitler oda sıcaklığında bir buçuk saat biyotinli sekonder antikor ve streptavidin – peroksidaz kompleksi ile inkübe edilmişlerdir. Tekrar PBS'le üç kere beşer dakika yıkama uygulandıktan sonra sinyali geliştirmek için dokular 3' Diamino benzidin (DAB) kromojeni ile muamele edilmiş ve musluk suyunda yıkanmışlardır. Kesitler, Mayer'in Hematoksilin'inde onbeş saniye zıt boyama yapıldıktan sonra tekrar artan alkol serilerinde dehidrate edilip ksilole alınmış ve ardından kapatma solüsyonu ile kapatılmışlardır. Bütün gruplar aynı gün içerisinde aynı muamelelerden geçirilerek boyanmışlardır. Boyanmış kesitler ışık mikroskopunda değerlendirilmiş ve fotoğraflandırılmıştır.

3.5. Elektron mikroskobu incelemesi

Herhangi bir sıçan rasgele seçilerek hipokampus dokusundan alınan parçalar glutaraldehid ile fikse edilmiştir. Daha sonra dokular osmium tetra oksit içerisinde iki saat bekletilmiştir. Artan alkol serilerinden geçirilen dokular araldit içerisinde gömülmüştür. Hipokampus CA1 ve dentat girus bölgesinde ultra yapısal analizler yapılmıştır. Nükleus ve mitokondrideki morfolojik değişimler , lipofüsin birikimi ve

sinaptik dejenerasyon incelenmiştir. Bölgeler 6000 x büyültme gücü ile analiz edilmiştir.

3.6. Sonuçların Değerlendirilmesi

İstatistiksel değerlendirme SPSS paket programı kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. Her değişken için normallik testi uygulanmıştır, Normal dağılıma uyan veriler için parametrik olan Wilcoxon Eş Testi ile Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve onu takiben Tukey Post Hoc Testi, uymayanlarda ise nonparametrik olan Kruskal Wallis Varyans Analizi ve onu takiben Mann-Whitney U Testi kullanılmıştır. $P<0.05$ 'i sağlayan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

4.1. Genel Görünüm

Deney süresince hayvanların genel görünüm ve davranışlarında herhangi bir değişiklik görülmemiştir.

4.2. Besin Tüketimi

Grupların 8 haftalık deney süreleri boyunca günlük yem tüketimleri takip edilmiş ve bulgular 100 gram vücut ağırlığı başına g/gün olarak hesaplanmıştır.

Grupların besin tüketimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (Tablo 4.1).

4.3. Ağırlık Değişimi

Deney gruplarının haftalara göre ağırlık değişimleri Tablo 4.1’de verilmiştir. Deney süresi boyunca tüm deney gruplarındaki hayvanların haftalık vücut ağırlıkları takip edilmiş, grup içinde ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Tablo 4.1. Kontrol ve deney grubu hayvanların günlük yem tüketimleri ve ağırlık değişimleri

Gruplar	1.hafta (g)	2. hafta (g)	3. hafta (g)	4. hafta (g)	5. hafta (g)	6. hafta (g)	7. hafta (g)	8. hafta (g)	yem tüketimi (g/gün/100 gr)
K	268.00 ± 10.33	285.00 ± 11.33	290.00 ± 8.94	292.00 ± 10.71	295.00 ± 11.87	297.00 ± 12.87	300.5 ± 10.83	302.00 ± 16.14	30.50 ± 2.26
SH	235.0 ± 16.79	242.50 ± 17.90	245.50 ± 18.09	247.00 ± 18.74	250.00 ± 17.32	252.00 ± 18.74	263.00 ± 22.26	264.00 ± 11.76	27.70 ± 1.97
R	212.00 ± 12.18	216.50 ± 11.41	217.00 ± 13.43	219.00 ± 8.04	222.00 ± 14.49	228.00 ± 12.73	230.00 ± 13.24	234.00 ± 11.64	24.00 ± 1.54
OD	295.00 ± 17.45	308.20 ± 12.50	317.30 ± 13.11	272.00 ± 18.74	330.00 ± 17.23	322.00 ± 13.87	334.10 ± 17.00	337.00 ± 10.70	33.91± 2.80
ODR	255.00 ± 23.80	263.00 ± 25.30	272.00 ± 18.74	275.00 ± 16.14	277.30 ± 21.72	282.00 ± 22.04	290.00 ± 21.79	294.00 ± 19.15	29.80 ± 2.05

4.4. Doku Tiobarbitürik Asit Reaktif Ürünleri (TBARS) Sonuçları

Beyin TBARS sonuçları Tablo 4.2’de gösterilmiştir. OD grubunda beyin TBARS değerlerinin diğer gruplara göre anlamlı düzeyde arttığı tespit edilmiştir. Rosmarinik asit verilen ODR grubunda ise beyin TBARS değerlerinin OD grubuna göre azaldığı, hatta bu değerlerin kontrol grubuna yaklaştığı dikkati çekmiştir.

Tablo 4.2. Kontrol ve deney grubu hayvanlarının beyin TBARS değerleri.

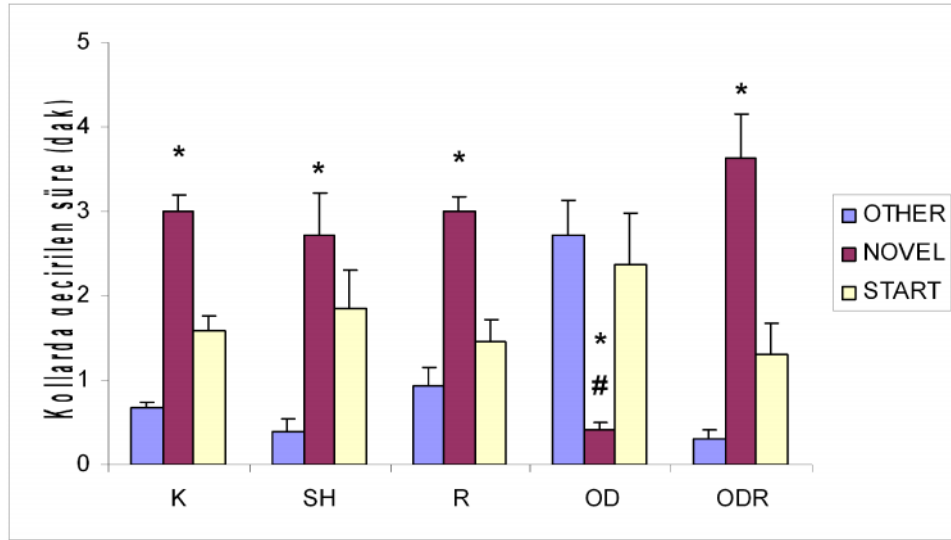
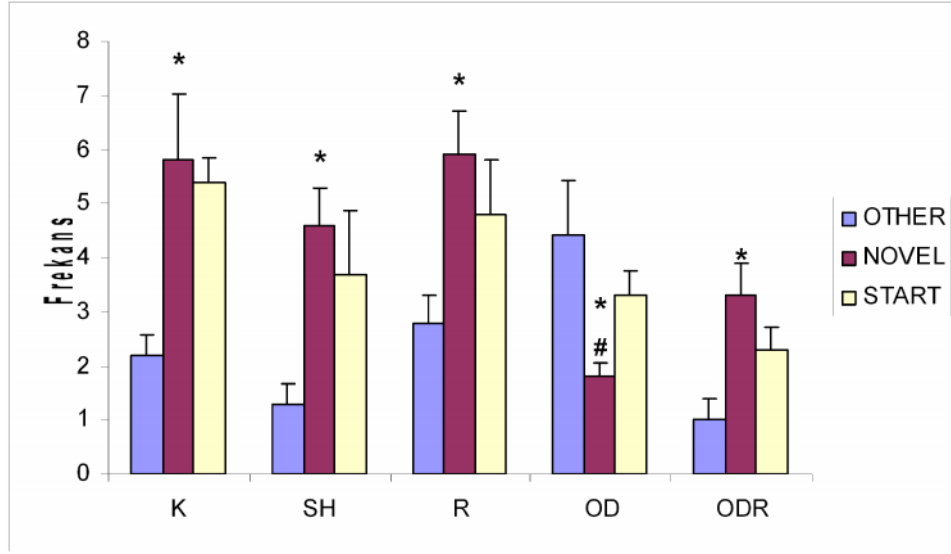
*p<0.05; Kontrol grubundan fark, #p<0.05; Sham grubundan fark, †p<0.05; R grubundan fark, **p<0.05; OD grubundan fark. Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

GRUPLAR	BEYİN TBARS nmol/g protein
K	0.17 ± 0.07
SH	0.28 ± 0.11 *
R	0.17 ± 0.08 #
OD	0.40 ± 0.13 *, #, †
ODR	0.20 ± 0.07 **

4.5. Y- labirent Testi Sonuçları

Kontrol ve deney grupları Y labirent testi sonuçları Şekil 4.1’de gösterilmiştir. Bulguların istatistiksel analizi sonucunda OD Alzheimer grubunun ‘novel’ kolda geçirdiği sürenin ODR, SH, K ve R gruplarına kıyasla belirgin şekilde azaldığı, buna ilaveten OD Alzheimer grubunda ‘other’ kolda geçirilen sürenin ‘novel’ kolda geçirilen süreye göre belirgin şekilde arttığı bulunmuştur.

Kola giriş frekansı incelendiğinde ODR, SH, K ve R gruplarında ‘novel’ kola giriş frekansının ‘other’ kola giriş frekansına göre belirgin şekilde yüksek olduğu gözlenmektedir. Ayrıca, OD Alzheimer grubunun ‘novel’ kola giriş frekansının ODR, SH, K ve R gruplarına kıyasla belirgin şekilde azaldığı dikkati çekmektedir.



Şekil 4.1. Y- labirent testi sonuçlarının gruplara göre dağılımı. * $p < 0.05$; tüm gruplarda novel kol skoru ve other kol skoru arasındaki fark. # $p < 0.05$; OD grubunun novel kol skorunun diğer grupların novel kol skorundan farkı. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

4.6. Lokomotor Aktivite Testi Sonuçları

Lokomotor aktivite testi sonuçları Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4’de gösterilmiştir. Lokomotor aktivite testi için Kruskal Wallis testi yapılmıştır. Buna göre OD grubunda ambulatuvar hareketin (öne adım atma) diğer gruplara göre anlamlı olarak azaldığı, diğer grupların ambulatuvar hareketleri arasında istatistiksel yönden anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur. Diğer gruplarla karşılaştırıldığında dinlenme oranının OD grubunda anlamlı olarak arttığı, R grubunda önemli düzeyde azaldığı, alınan toplam mesafenin ise OD grubunda belirgin bir şekilde azalırken, R grubunda anlamlı bir şekilde yükseldiği saptanmıştır.

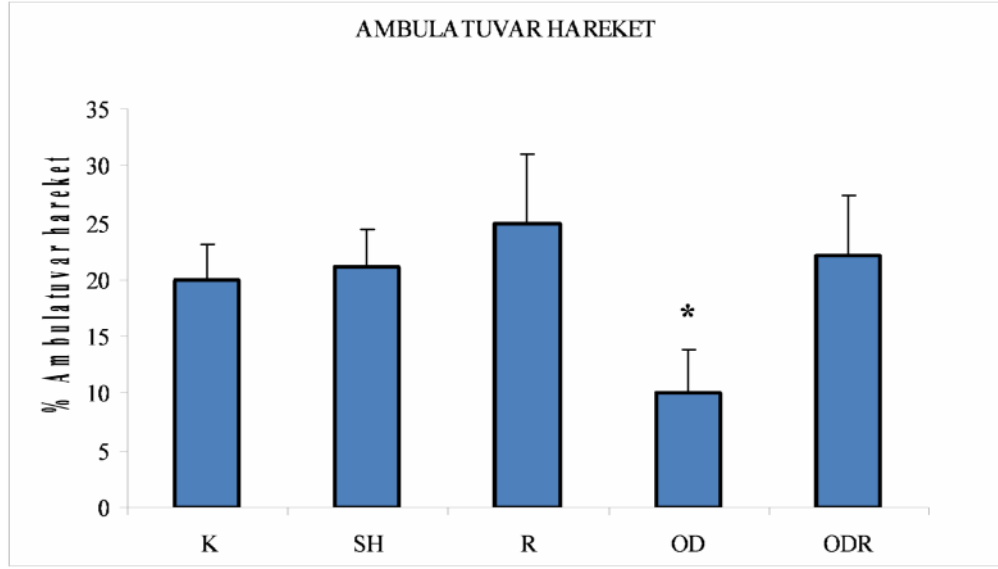
Tablo 4.3. Lokomotor aktivite testi sonuçları.

Ambulatuvar hareket: *p<0.001; OD grubunun diğer gruplardan farkı.

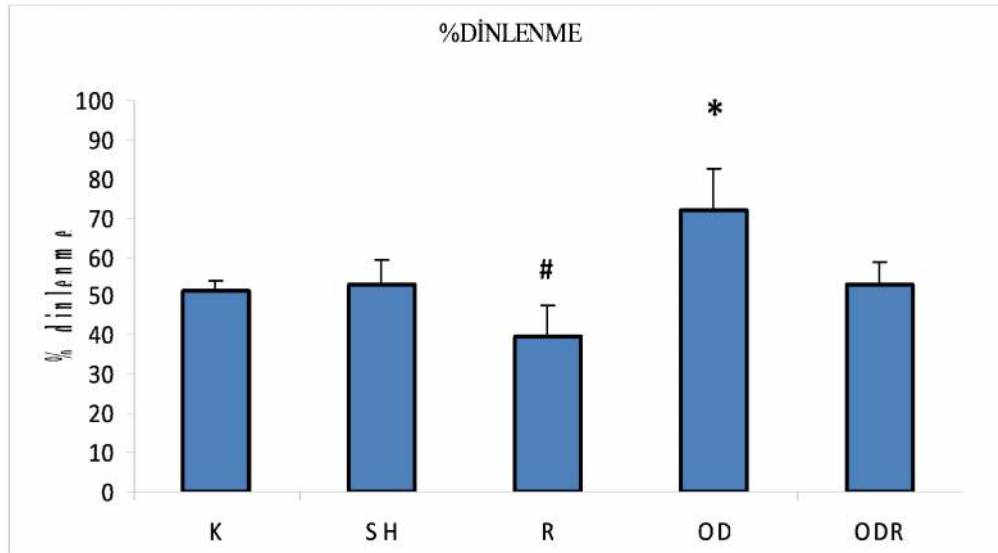
% Dinlenme: #p< 0.001; R grubunun diğer gruplardan farkı. *p< 0.001; OD grubunun diğer gruplardan farkı.

Katedilen mesafe: #p< 0.001; R grubunun diğer gruplardan farkı. *p< 0.001; OD grubunun diğer gruplardan farkı.

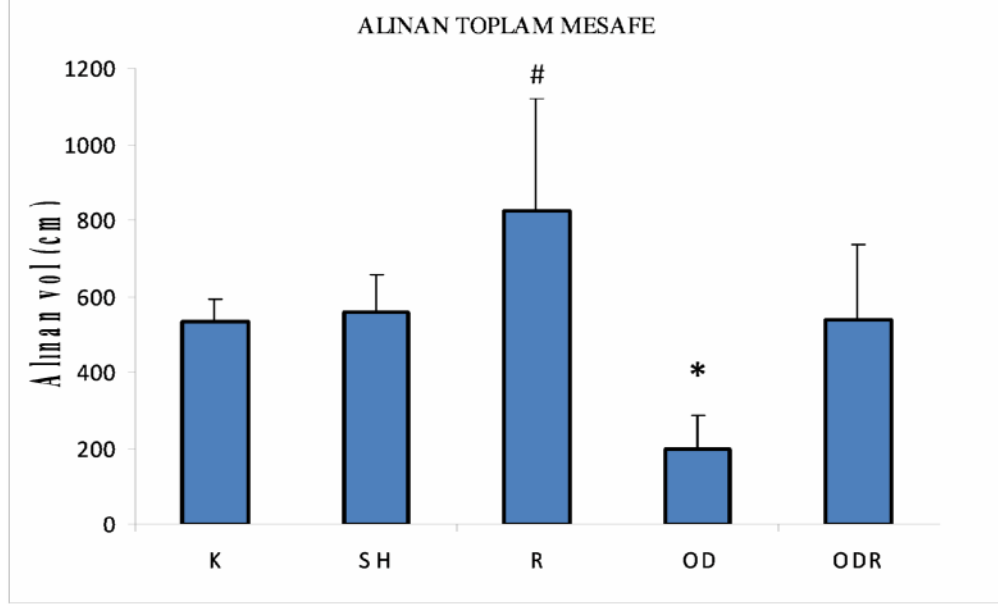
	MESAFE (cm)	AMBULATUVAR (%)	DİNLENME (%)
K	531.9 ± 61.03	20 ± 3.05	51.5 ± 2.67
SH	556.8 ± 97.8	21.2 ± 3.29	53.1 ± 6.0
R	825.1 ± 96,08 #	25 ± 6.01	39.9 ± 7.51#
OD	198.4 ± 25.9*	10 ± 3.88*	72 ± 10.6*
ODR	538.2 ± 96.2	22.2 ± 5.15	53 ± 5.83



Şekil 4.2. Ambulatuvar hareketlerin analizi. * $p < 0.001$; OD grubu ile diğer gruplar arasındaki fark. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.



Şekil 4.3. Dinlenme oranının analizi. # $p < 0.001$; R grubu ile diğer gruplar arasındaki fark. * $p < 0.001$; OD grubu ile diğer gruplar arasındaki fark. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.



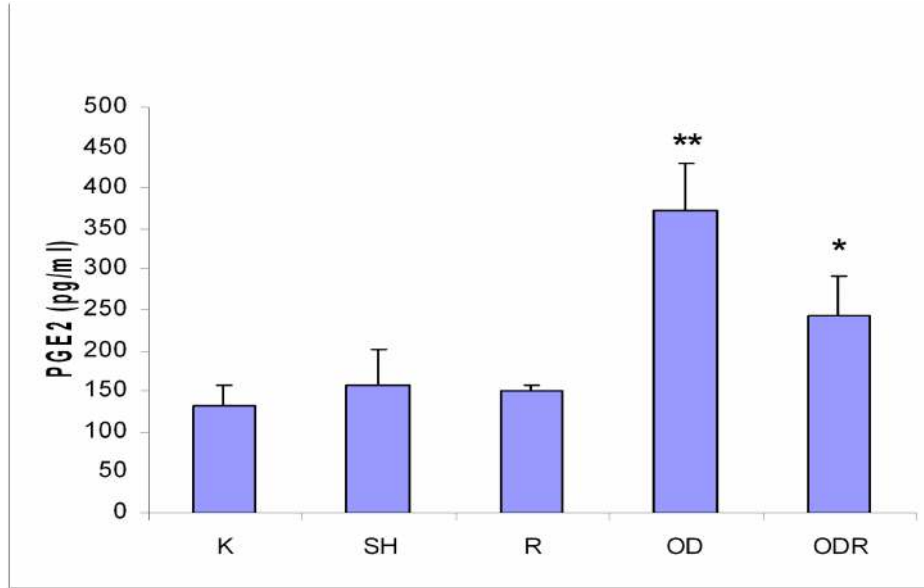
Şekil 4.4. Katedilen toplam mesafenin analizi. # $p < 0.001$; R grubu ile diğer gruplar arasındaki fark. * $p < 0.001$; OD grubu ile diğer gruplar arasındaki fark. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

4.7. PGE2 Tayini Sonuçları

Hipokampus PGE2 tayiniyle ilgili sonuçlar Tablo 4.3'de gösterilmiştir. Buna göre OD grubunda hipokampus PGE2 değerlerinin diğer gruplara göre anlamlı düzeyde arttığı görülmüştür. Rosmarinik asit verilen ODR grubunda ise hipokampus PGE2 değerlerinin OD grubuna göre azaldığı, ancak bu değerlerin kontrol grubuna göre yüksek olduğu dikkati çekmiştir.

Tablo 4.4. Kontrol ve deney grubu hayvanlarının hipokampus PGE2 değerleri.
 *p<0.05; Kontrol grubundan fark, #p<0.05; Sham grubundan fark,
 **p<0.05; R grubundan fark, ##p<0.05; OD grubundan fark.

GRUPLAR	PGE2 pg/ml
K	132.375 ± 24.6
SH	157.612 ± 44.85
R	151.55 ± 6.35
OD	371.65 ± 47.85 *, #, **
ODR	242.76 ± 59.85 *, #, **, ##

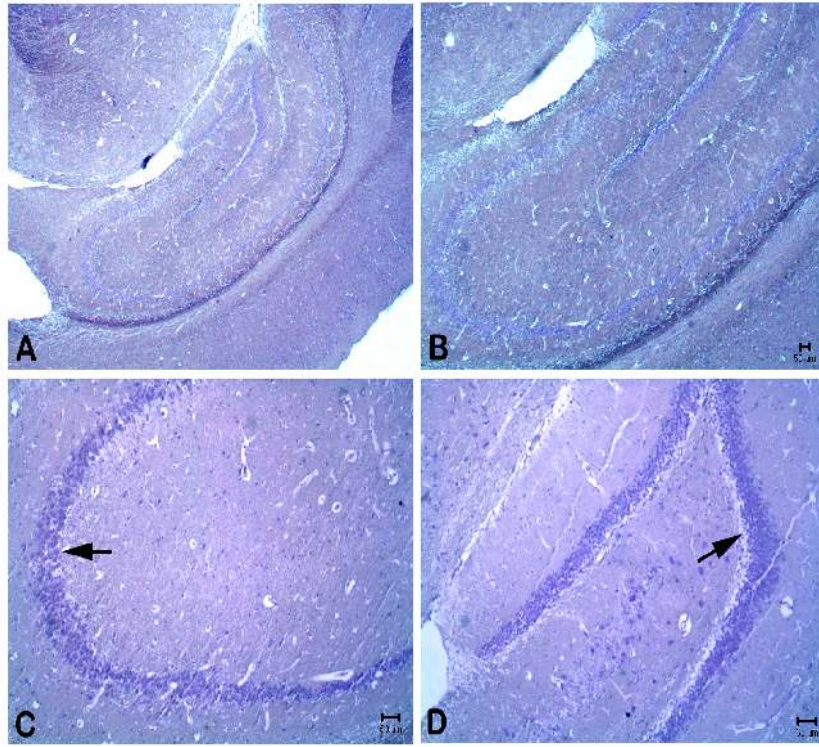


Şekil 4.5. PGE2 tayini sonuçları. **p < 0.05; OD grubu ile diğer gruplar arasındaki fark, * p < 0.05; ODR grubu ile diğer gruplar arasındaki fark. Değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir.

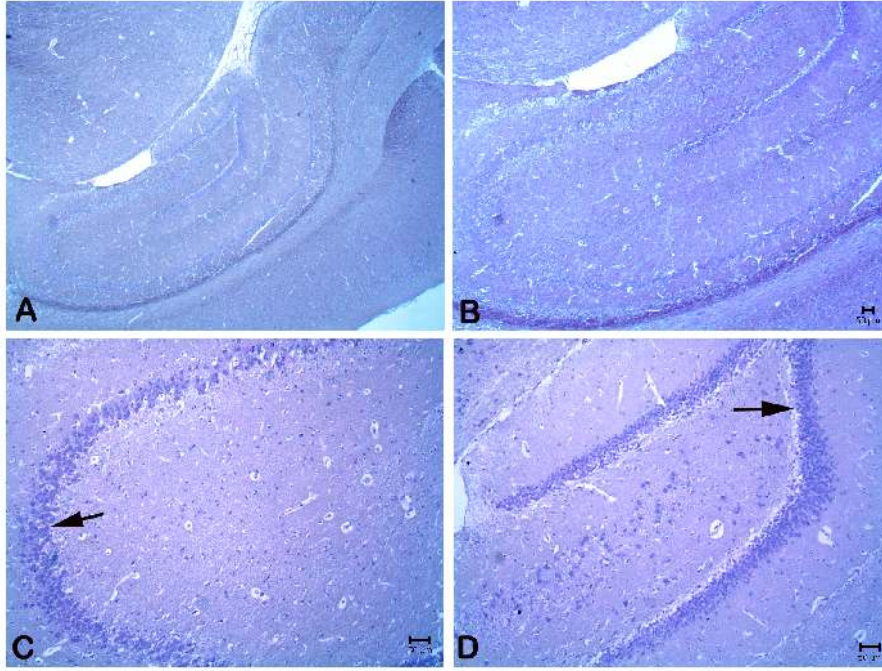
4.8. İmmünohistokimya Sonuçları

Uzun süreli ovaryektomi ve D-galaktoz enjeksiyonunun hipokampustaki A β birikimine etkisi immünohistokimyasal olarak belirlenmiştir. Kontrol, SH (Şekil 4.6.) ve R (Şekil 4.7) gruplarında yapılan A β immunboyanmalarında hipokampal alanda herhangi bir reaksiyona rastlanmazken, OD (Şekil 4.8) ve ODR (Şekil 4.9) gruplarında A β immunlokalizasyonu dikkat çekmiştir. OD gruplarında yapılan immunboyanmalarda A β proteininin daha çok nöropil içerisinde ve glial hücrelerde biriktiği gözlemlenmiştir. Özellikle hipokampusun CA1 ve CA4 alanları ile dentat girus yakınlarında A β birikimleri saptanmıştır. ODR gruplarında da eser miktarda A β birikimleri hipokampal alanda işaretlenmiştir (Şekil 4.9).

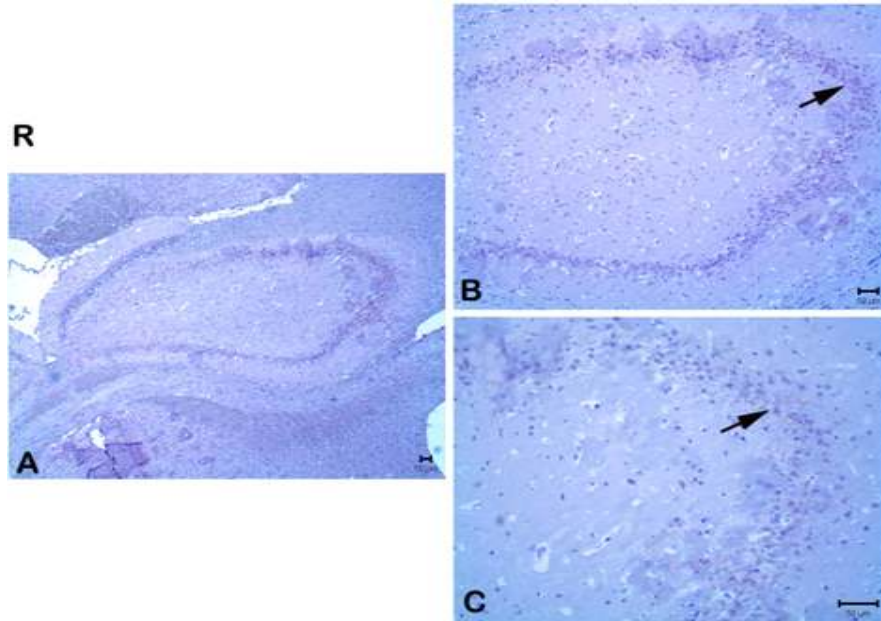
KONTROL



SHAM

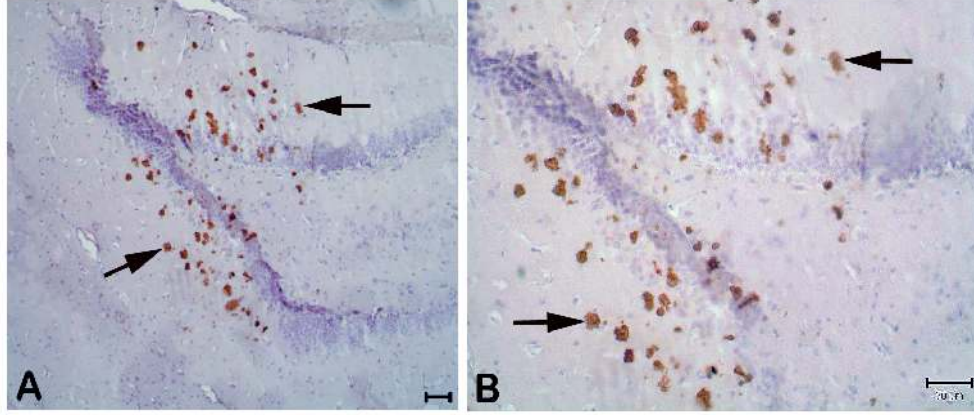


Şekil 4.6. Kontrol (A,B,C,D) ve Sham (A,B,C,D) grubuna ait immunohistokimyasal sonuçlar. A β proteinine ait herhangi bir immunreaksiyona total beyin preparatlarında da hipokampal alanda da rastlanılmamıştır. C; ok hipokampusu, D; ok dentat gyrusu göstermektedir. Ölçek: 50 μ m



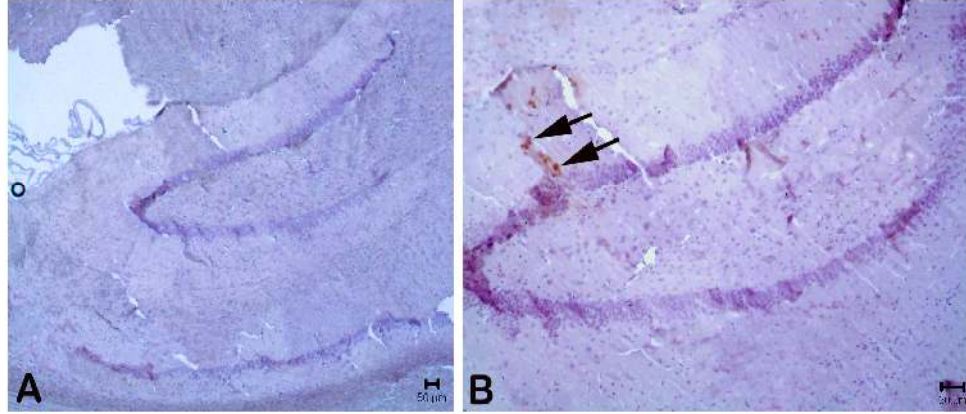
Şekil 4.7. R grubuna ait A β proteininin immunohistokimyasal boyaması. Bu grupta da A β proteinine ait herhangi bir immunreaksiyona rastlanılmamaktadır. Oklar, hipokampusdaki nöronları işaret etmekte ve herhangi bir reaksiyon görülmemektedir. Ölçek: 50 μ m

OD Grubu



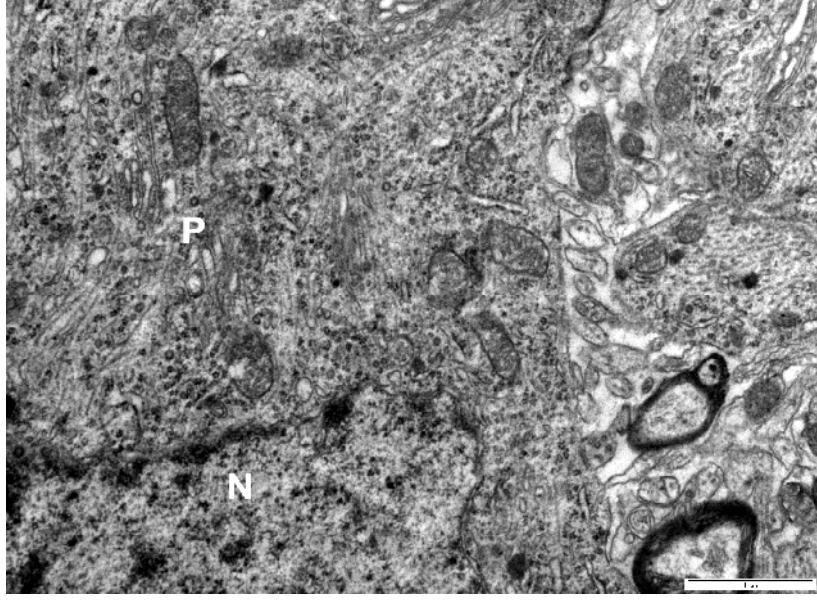
Şekil 4.8. OD grubuna ait A β proteininin immunohistokimyasal reaksiyonu gösterilmektedir. Bu grupta özellikle hipokampus alanında, A β proteininin biriktiği gözlenmektedir. Yer yer CA1 ve CA4 nöronları üzerinde de izlenen bu A β birikimleri yoğun olarak nöropil içerisinde ve glial hücrelerde dikkati çekmektedir. Oklar: A β birikimlerini işaret etmektedir. Ölçek: 50 μ m

ODR

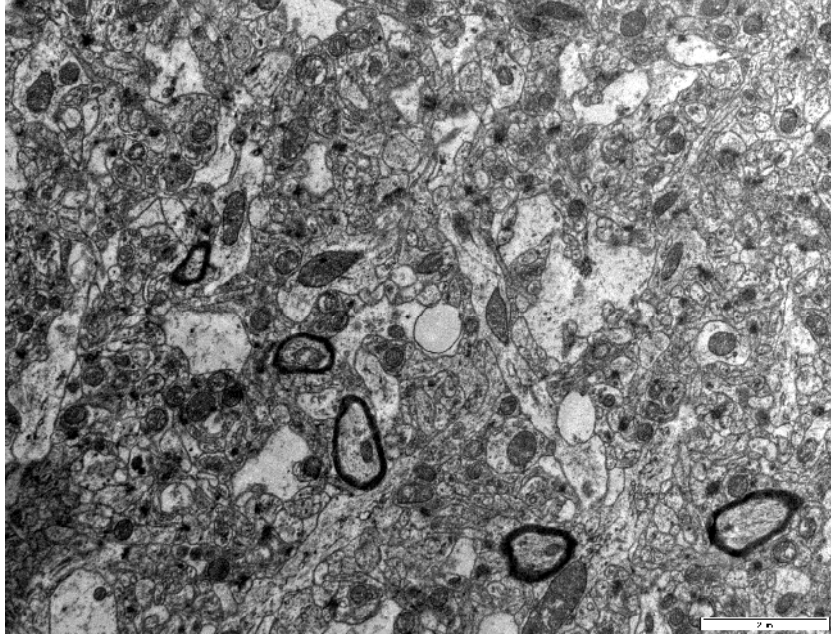


Şekil 4.9. ODR grubuna ait immunohistokimyasal boyanmalar. Bu grupta ODR grubunda olduğu gibi yoğun bir A β proteinine ait plak birikimi gözlenmemektedir. Ancak yer yer hipokampusda bu A β birikimlerine rastlanmıştır. Oklar: Eser miktardaki A β birikimlerini işaret etmektedir. Ölçek: 50 μ m

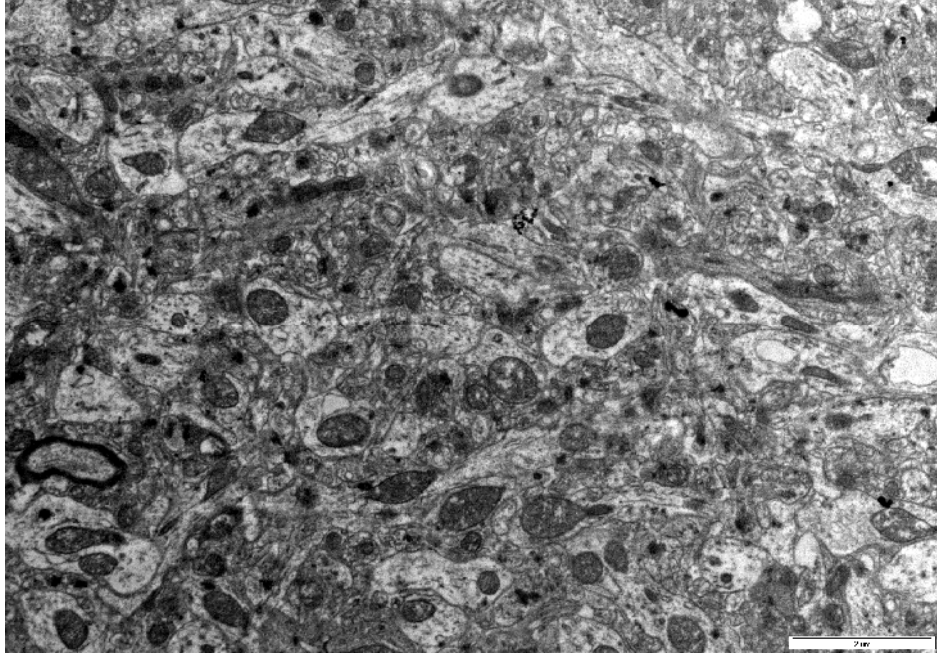
4.9. Elektron mikroskop Analizi Sonuçları



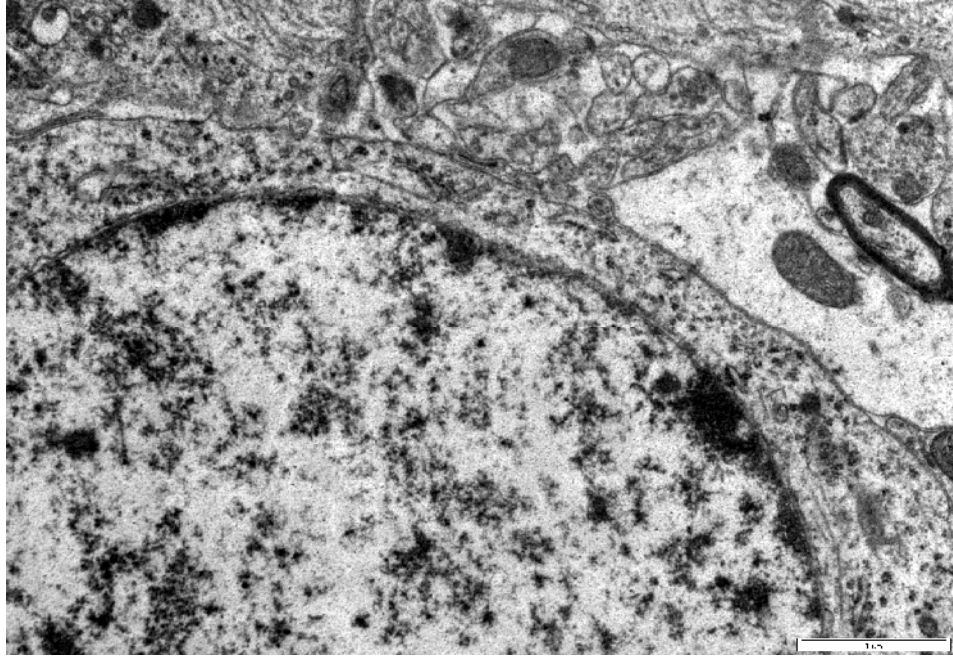
Şekil 4.10. Kontrol grubunda piramidal nöron nükleus (N) ve perikaryon (P) normal yapısı izlenmektedir. Ölçek: 1 µm



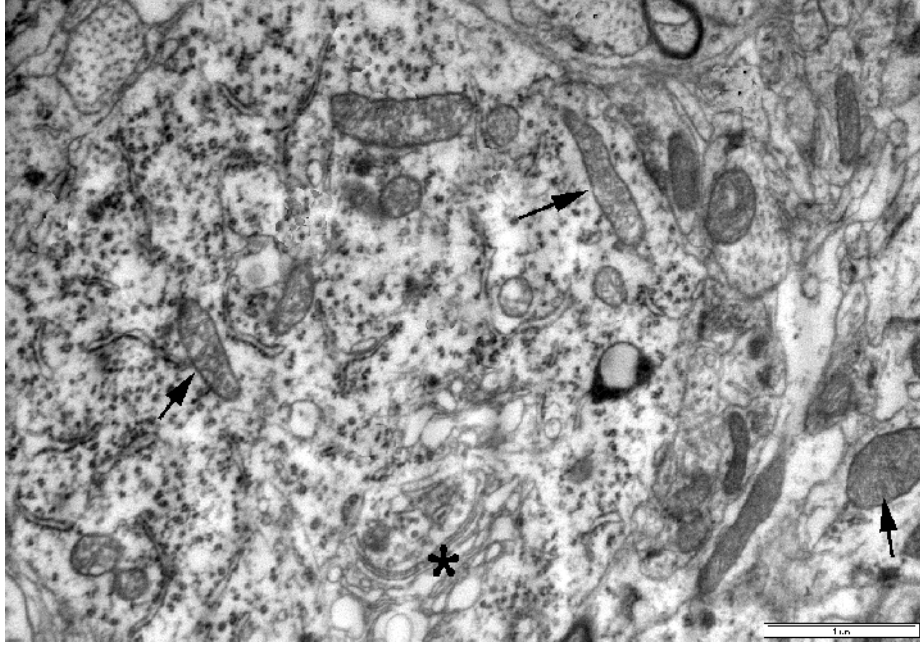
Şekil 4.11. Kontrol grubuna ait hipokampal CA1 bölgesinde nöropil yapısı. Ölçek: 2 µm



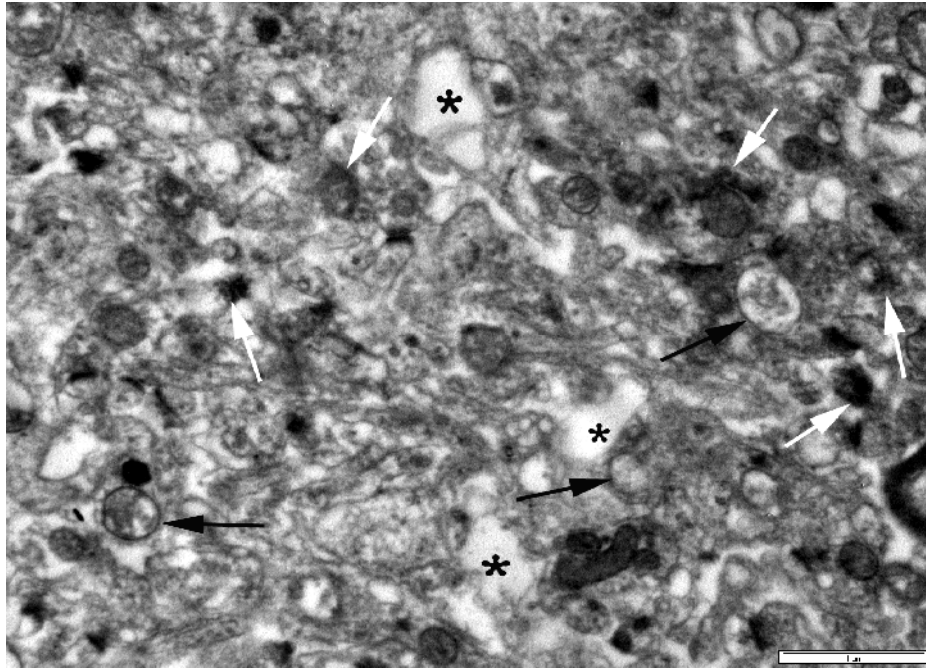
Şekil 4.12. Kontrol grubu dentat girus nöropil görünümü. Ölçek: 2 μ m



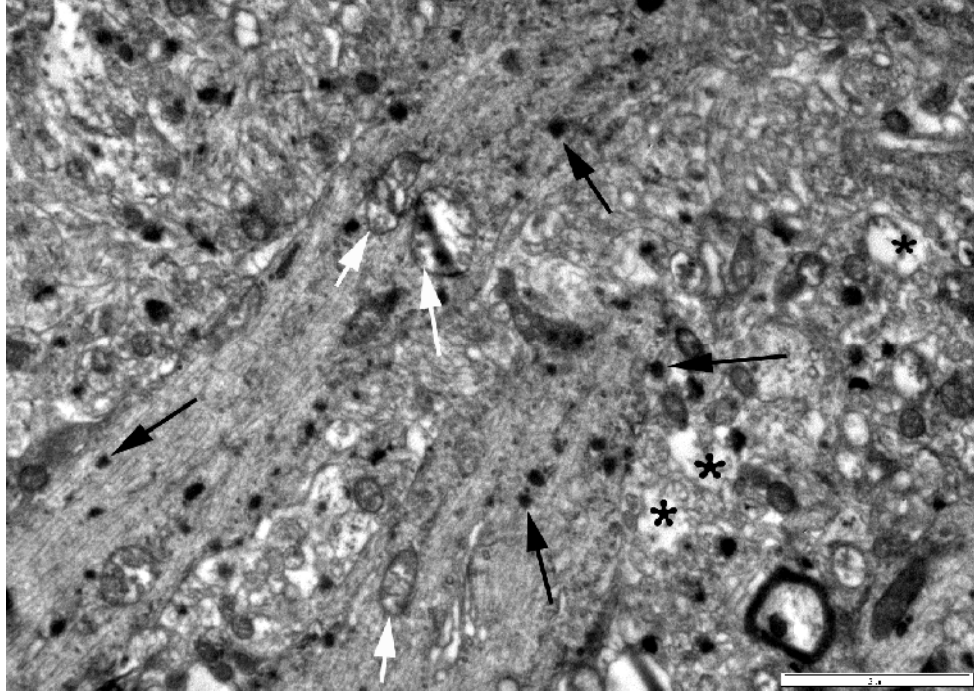
Şekil 4.13. Kontrol grubunda granül hücre ve çevre nöropil izlenmektedir. Ölçek: 1 μ m



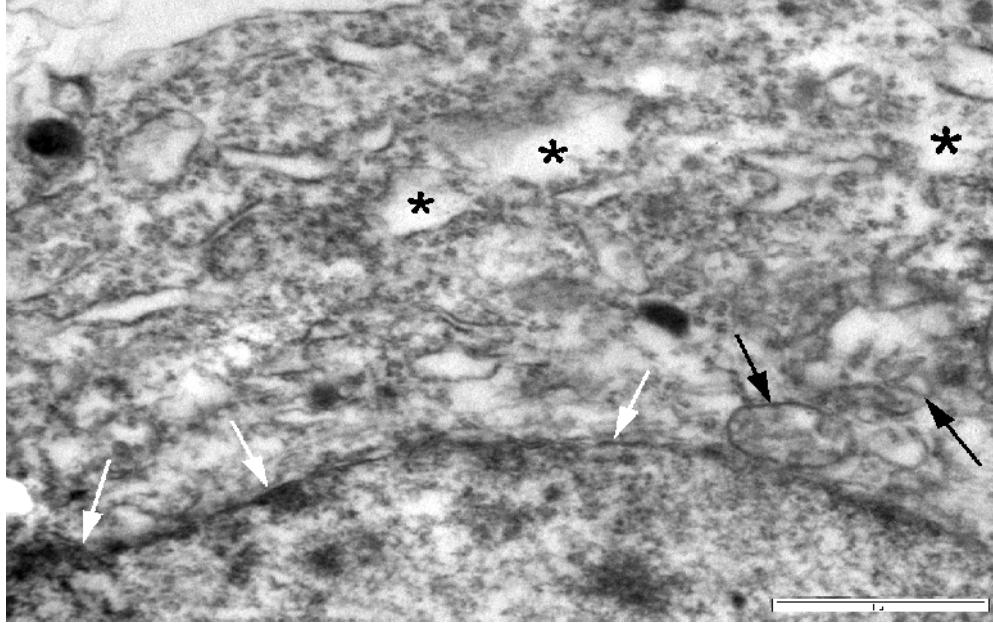
Şekil 4.14. Rosmarik asit uygulanan normal grupta Alzheimer grubunda izlenen deformasyonlar gözlenmemekte, normal sitoplazma ve organel yapıları izlenmektedir. Mitokondriyonlar (oklar) ve golgi (yıldız) membran bütünlüğünü korumuş, bu organellerin yapısı bozulmamıştır. Ölçek 1 µm



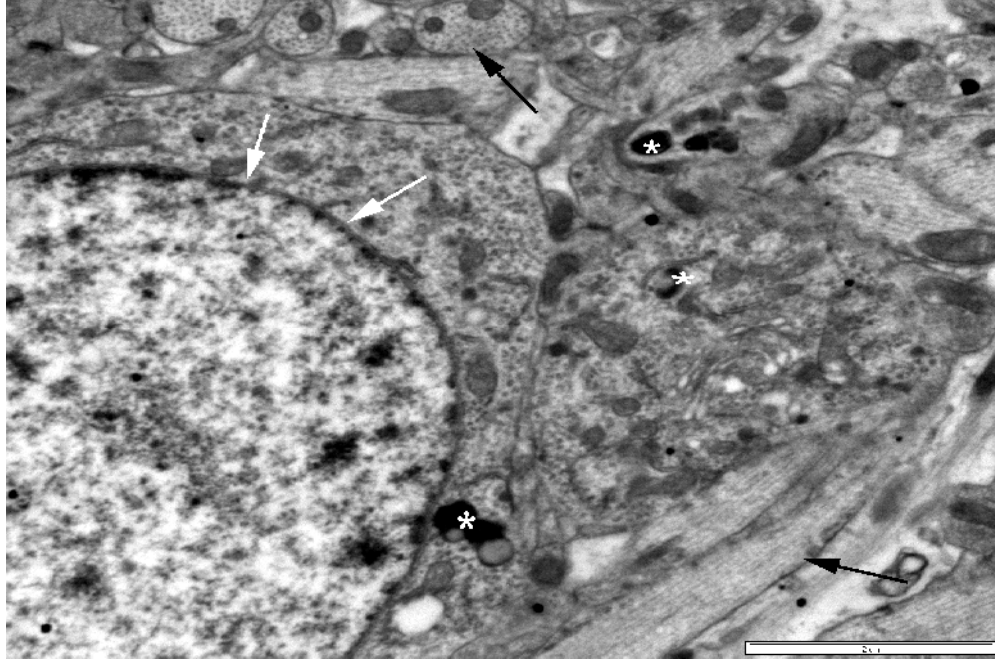
Şekil 4.15. Alzheimer grubuna ait dentat girus nöropilinde elektron dens birikimler (beyaz oklar) ve deformatif mitokondriyonlar (siyah oklar); Nöropilde yaygın membran deformasyonu ve içeriksiz ödeme bağlı boşluklar izlenmektedir (yıldızlar). Ölçek: 1 µm



Şekil 4.16. Alzheimer grubunda hipokampus CA1 bölgesinde aksoplazma içerisinde elektron dens birikimler (siyah oklar) ve şiddetli mitokondri deformasyonu (beyaz oklar) görülmektedir. Mitokondri krista yapısı bozulmuş, matriks ödem nedeniyle elektron densitesini kaybetmiştir. Nöropil de geniş açıklıklar (yıldızlar) izlenmektedir. Ölçek: 2 μ m



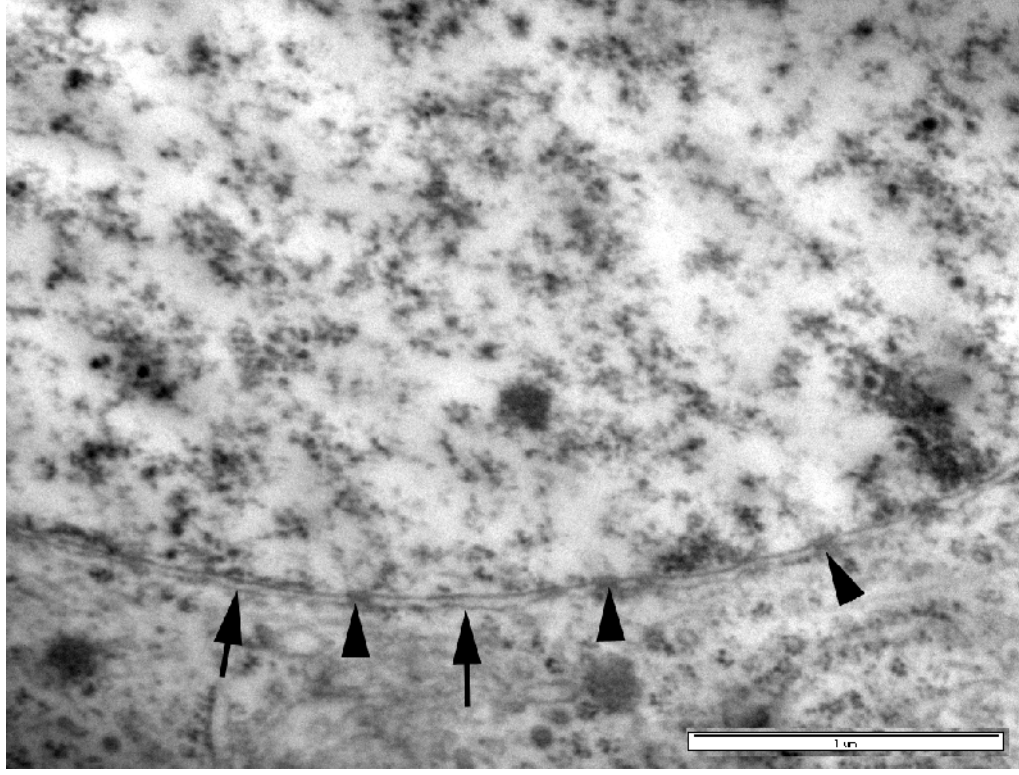
Şekil 4.17. Alzheimer grubu hipokampus CA1 piramidal hücrelerinde nükleer membran deformasyonu (beyaz oklar) görülmektedir. İkili zar yapısı bozulmuş, yer yer nükleoplazma ile sitoplazma karışımı izlenmektedir. Şiddetli mitokondri deformasyonu (siyah oklar) ve ödemöz GER ve sitoplazmik erimeler (yıldızlar) dikkat çekmektedir. Ölçek: 1 μ m



Şekil 4.18. Tedavi grubunda dentat girus granüle hücreleri sitoplazmasında, dendritte ve nöropilde çok az miktarda elektron dens birikimler (yıldızlar) izlenmektedir. Nükleus membranının bütünlüğünün bozulmadığı ve perinükleer aralığın normal olduğu (beyaz oklar) görülmektedir. Aksonların normal yapı gösterdiği ve elektron dens birikimler içermediği gözlenmektedir (siyah oklar). Ölçek: 2 μ m



Şekil 4.19. Tedavi grubu hipokampus CA1 piramidal hücre aksonları normal nörotübül yapısı göstermektedir (beyaz yıldızlar). Dendrit (siyah yıldız) ödemli ve normal yapı sergilemektedir. Ölçek: 1 μ m



Şekil 4.20. Tedavi grubunda hipokampus CA1 piramidal nöronlarında normal çift zar yapısında nüklear membran (oklar) ve normal boyutlarda nükleer porlar (ok başları) izlenmektedir. Ölçek: 1 µm

TARTIŞMA

Bunamanın en bilinen tiplerinden biri olan AH hastalığı özellikle yaşlı kişileri etkileyen nörodejeneratif bir hastalık olup iki temel protein kümesinin oluşumu ile karakterize edilmektedir. Bunlar nöronal dejenerasyon ve nöronal ölüme sebep olan süreçlerde etkili olan amiloid plaklar ve nörofibriller kümelerdir. Amiloid plaklar APP'nin proteolitik olarak kesilmesiyle serbestlenen A β peptidinin fibriller şeklinde insan beyninin çeşitli lokalizasyonlarında birikmesiyle oluşur (5). Nörofibriller kümeler ise temel bileşeni olan tau proteininin hiperfosforile olarak PHF'ler şeklinde hücre içinde birikimiyle meydana gelir.

Alzheimer hastalığında gözlenen öğrenme ve hafıza bozukluğunun yanı sıra, bu hastalığın patolojisinde yer alan A β ve NFT birikimleri gibi histopatolojik anormallikleri taklit etmek için çeşitli hayvan modelleri geliştirilmiştir. Ancak bu hayvan modellerinin hiçbiri hastalıkta gözlenen bilişsel bozukluğu ya da biyokimyasal ve patolojik değişiklikleri tam olarak temsil etmemektedir (164). Bu sebepten ideal bir AH modeli geliştirilmesi hastalığın patolojisini tam olarak anlamak için hayati öneme sahiptir. Araştırmamızda kullanılan AH modeli ilk kez Hua ve ark.(30) tarafından uygulanmış olup bu model AH hastalığı için iki temel risk faktörü olan östrojenin azaltılması ve oksidatif stresin oluşturulmasını amaçlamaktadır. Bu modelde östrojen azaltılması ovaryektomi yoluyla, oksidatif stres uzun süreli D-galaktoz enjeksiyonu ile gerçekleştirilmiştir.

Projemizde uygulanan modelde, ovaryektomi sonrası sıçanlarda gözlenen fonksiyonel ve yapısal bozuklukların birinci nedeni azalan östrojenin nöroprotektif etkisinin ortadan kalkmasıdır. Östrojenin A β peptidi ve glutamat indüklü toksite ile hidrojen peroksit, oksijen-glukoz tükenmesi gibi oksidatif stres oluşturan faktörleri engelleyerek ve hipokampusta nöronların hayatta kalmasını sağlayan ERK ve AKT sinyal yollarını aktive ederek koruyucu etki oluşturduğu gösterilmiştir (186, 187, 189, 190). Ayrıca, östrojenler antioksidan özellikleri olan maddeler olduklarından mitokondriye hasar veren ROS'un üretimini baskılayarak oksidatif fosforilasyonu korurken, fenolik halkası ile membrana ilave olarak fosfolipidlerdeki doymamış bağların oksidasyonunu engelleyerek lipid peroksidasyonu önlemektedirler (239). Diğer yandan, östrojen beyinde NGF ve BDGF gibi büyüme faktörlerinin seviyesini yükselterek hipokampus CA1 nöronlarının dendritlerindeki spin sayısını arttırmaktadır. Bunlara ilaveten, NMDA akımlarını arttırarak ve uyarı eşiğini düşürerek, LTP artışına yol açmaktadır (182, 183, 184). Dolayısıyla, tüm verilerin ışığında östrojenin hipokampus bağımlı öğrenme ve hafızada rolü olması ve bu hormonun azaltılmasının bilişsel parametreleri etkilemesi en doğal beklentidir.

Alzheimer modelinin kurulmasını sağlayan ikinci etken ise kronik D-galaktoz enjeksiyonudur. Bilindiği gibi, D-galaktoz normal koşullarda glukoz-1-fosfata dönüşürken yüksek seviyede serbest D-galaktoz birikimi ikincil bir yolak ile galaktitol (aldoz redüktaz) yada galaktonat (oksidasyon) oluşmasına sebep olur. Galaktoz-1-fosfat, galaktitol ve galaktonat gibi zararlı bileşiklerin seviyesinin

yükselmesi süperoksit anyonu ve ROS oluşumuna neden olmaktadır (214). D-galaktozun aynı zamanda periferde oksidatif stresi arttırdığı, total-SOD ve GSH-Px aktivitelerini düşürerek toplam antioksidan kapasiteyi azalttığı tespit edilmiştir (194). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda D-galaktozun, hipokampustaki nöronlarda apoptozisi ve karyopiknozu arttırdığı, dentat girus'daki subgranüler bölgedeki yeni doğan nöronların sayısını düşürdüğü ve nöronal progenitör hücrelerin göçünü azalttığı bulunmuştur (205). D-Galaktozun hipokampus bölgesinde öğrenme ile ilişkili protein biyosentezini, transportunu, sinyal iletimini etkileyen genlerin regülasyonunu azaltarak sinaptik bozukluğa neden olduğu ve LTP'yi azaltarak uzaysal öğrenme ve hafızada olumsuz etkiler oluşturduğu saptanmıştır (240).

Projemizdeki AH modeli oksidatif stres ve östrojen azalmasının bu hastalıkta iki temel risk faktörü olduğunu gösteren kanıtlar ışığında, ilk kez Hua ve ark.(30) tarafından oluşturulan model esas alınarak geliştirilmiştir. Araştırmacılar elektron mikroskobu kullanarak yaptıkları histolojik incelemede AH modeli kurulan sıçanların hipokampus bölgelerinde hücre içinde biriken NFT'ler, sinaptik dejenerasyon, lipofüsin birikimi, nükleus ve mitokondride morfolojik değişiklikler tespit etmişlerdir (30). Ayrıca, araştırmacılar immünohistokimyasal yöntemle hipokampus CA1 bölgesinde A β pozitif hücreler gözlemlemiş ancak ekstrasellüler A β birikimi oluşmadığını saptamışlardır (30). Bu sonuçlar dikkate alınarak, 6 haftalık D-galaktoz enjeksiyonunun ekstrasellüler A β birikimini oluşturmak için yetersiz olabileceği düşünülerek, çalışmamızda D-galaktoz enjeksiyonu için 8 haftalık bir süre seçilmiştir. Diğer yandan, bugüne kadar yapılan yaşlanma ile ilgili çalışmalarda hayvanlara enjeksiyon yoluyla 50, 60, 100, 200 ve 500 mg/kg D-galaktoz dozları uygulanmış (194, 195, 196), kurulan AH modelinde ise D-galaktozun dozu 80 mg/kg olarak seçildiği için projemizde bu doz kullanılmıştır (30).

Kurduğumuz AH modelinin histolojik parametrelerle desteklenmesi için elektron mikroskobu ile incelemeler yapılmıştır. Bu incelemelerde AH grubunda dentat girusda ve hipokampus CA1 bölgesinde özellikle nöropilde sınırları belirsiz elektron dens birikimler dikkati çekmiş, lipofüsin granüllerine rastlanmamasına rağmen mitokondriyal membranlarda elektron dens kalınlaşmalar belirgin olarak izlenmiştir. Bu grupta belirgin bir membran deformasyonu göze çarpmış, mitokondri kristalarında erimeler ve mitokondriyal matriksde ödem oldukça belirgin şekilde gözlenmiştir. Nükleus membranının bütünlüğü bozulmuş, membranda elektron dens partiküler birikimler meydana gelmiştir. Bu bulgular kurulan modelde AH benzeri histopatolojik değişimlerin sağlandığına işaret etmektedir. Rosmarinik asit ile tedavi edilen AH grubunda ise benzer elektron dens birikintilerine rastlanmakla birlikte, bunların miktarının AH grubuna göre oldukça azaldığı tespit edilmiştir. Membran yapılarının normal görünümde olduğu, mitokondriyal ödemin ortadan kalkması sonucu mitokondriyal matriksin normal elektron dens yapıda olduğu izlenmiştir. Aksonlar, dendritler ve mikrotübüllerin yapısının bozulmadığı, nükleer membranın çift zar yapısının ve nükleer porların net olarak tespit edilebildiği görülmüştür. Sadece RA verilen grupta membran bütünlüğünün korunduğu, herhangi bir elektron dens birikim olmadığı saptanmıştır. Buna ilaveten, bu grupta mitokondri membran bütünlüğü, krista yapıları ve matriks densitesinin normal özellikler gösterdiği bulunmuştur.

Elektron mikroskobu ile yapılan histolojik incelemelere ek olarak hipokampusta A β birikimlerinin belirlenmesi amacıyla immünohistokimyasal analiz yapılmıştır. Yapılan immünohistokimyasal inceleme sonucu K, SH ve R gruplarında hipokampal alanda herhangi bir A β pozitif hücreye rastlanmazken OD ve ODR gruplarında A β immunolokalizasyonu dikkat çekmiştir. OD grubunda A β proteininin daha çok nöropil içerisinde ve glial hücrelerde biriktiği gözlemlenmiştir. Özellikle hipokampus CA1 ve CA4 alanları ile dentat girus yakınlarında biriken plaklar bu alandaki nöronların dejenerasyon yoluna gireceğinin bir ifadesi olabilir. Elde edilen bu veriler sekiz haftalık enjeksiyon sürenin ekstraselüler plak birikimini oluşturmak için uygun olduğunu teyit etmektedir. ODR grubunda da eser miktarda amiloid plaklar hipokampal alanda işaretlenmiştir. OD grubuna kıyasla ODR gruplarında immunreaksiyonun oldukça azalması ve histolojik yapıda gözlenen bahsedilen düzelmeler tedavinin olumlu yanıt verdiğini ve oluşan plak sayısının da giderek azaldığını göstermektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmaların çoğu bir çok hastalıkta olduğu gibi, AH hastalığında da oksidatif stres mekanizmalarına ve bunların hastalığın patogenezisindeki önemine odaklanmıştır (38). Bu hastalığın etiolojisinde oksidatif stres ve serbest radikal hasarının etken olduğuna dair birçok delil elde edilmiştir (8, 38). Alzheimer hastalarında yapılan histopatolojik çalışmalar sonucu temporal lob bölgelerinde ve A β 25-35 peptidinin direkt olarak etkileştiği membranlarda artan lipid peroksidasyonun izleri tespit edilmiştir (37, 38). Bunun yanı sıra, A β 40 ve A β 42 peptidlerinin çeşitli membran reseptörleri aracılığıyla hücre içi sinyal yollarını tetikleyerek lipid peoksidasyona yol açtığı bulunmuştur (67). Ayrıca, Alzheimer hastası transjenik farelerde yapılan bir çalışmada 7 aylık farelerde A β birikiminden önce lipid peroksidasyonun gözlenmesi, hastalığın gelişiminde lipidlerin oksidasyonunun önemine işaret etmektedir (73). Nitekim, AH modeli oluşturulan grupta (OD) lipid peroksidasyon seviyelerinin kontrol ve sham grubuna göre anlamlı şekilde artması, AH komplikasyonlarında lipid peroksidasyonun önemli bir faktör olduğunu vurgulayan çalışmaları destekler niteliktedir.

Alzheimer hastalığına çok benzeyen bir nörodejenerasyonun gözlemlendiği Down sendromunda lipid peroksidasyonun artması sonucu gerçekleşen apoptozisin serbest radikal önleyicilerin kullanılmasıyla durdurulduğu gözlenmiştir (77). Bunlara paralel olarak 52 haftalık bir klinik çalışmada Ginko biloba ekstresi (Eg761)'nin hastalığın bazı semptomlarında belirgin bir düzelme sağladığı, Vitamin E ve melatonin gibi diğer antioksidanların A β 'ya bağlı nörotoksitesiteyi lipid peroksidasyonu azaltarak önlediği saptanmıştır (127). Dolayısıyla, literatürde yer alan çeşitli çalışmalarda antioksidan ajanların AH hastalığının ilerlemesini azalttığı ve A β toksisitesine karşı koruma sağladığı geniş bir şekilde vurgulanmaktadır. Bu bilgiler doğrultusunda AH hastalığında oluşan komplikasyonların azaltılması ve lipid peroksidasyon ile ilişkisini incelemek amacıyla lamiae sınıfı bitkilerde oldukça fazla miktarda bulunan RA'nın çalışmamızda antioksidan bir bileşik olarak kullanılması düşünülmüştür. Daha önce yapılan bir AH çalışmasında RA'nın PC12 hücre kültüründe A β peptidinin indüklediği reaktif oksijen türlerinin oluşmasını, lipid peroksidasyonu, DNA fragmentasyonunu, kaspaz 3 aktivasyonunu ve tau proteininin hiperfosforilasyonunu azalttığı gösterilmiştir (25). Ayrıca RA'nın astrosit

kültüründe üretilen ROS ve MDA miktarını düşürerek oksidatif strese karşı koruma sağladığı, H_2O_2 'nin indüklediği hücre hasarını önlediği tespit edilmiştir (26). Bu bulgular RA'nın A β kaynaklı oksidatif hasara karşı temel nöroprotektif ajan olarak tedavi amacıyla kullanılabileceğini ortaya koymakla birlikte, literatürde RA'nın AH hastalığındaki antioksidan özelliklerini dikkate alan herhangi bir invivo çalışma bulunmamaktadır. Bu amaçla RA'nın koruyucu etkisini incelemek ve AH hastalığında artan serbest radikallerin rolünü değerlendirmek için lipid peroksidasyon indeksi olarak kabul edilen TBARS düzeyleri ölçülmüştür. Elde edilen veriler analiz edildiğinde, RA ile tedavi uygulanan ODR grubunda lipid peroksidasyon seviyesinin kontrol grubu ile aynı seviyeye düşmesi, AH hastalığı ile ilişkili serbest radikal hipotezini desteklemenin yanı sıra, RA'nın antioksidan özelliğini vurgulamış ve bu hastalığın tedavisi için kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

Alzheimer hastalığında erken olgularla ilişkili olarak inflamasyonun merkezi rolü olduğu kuvvetli kanıtlarla gösterilmiştir (10). Beyinde oluşan nöroinflamasyon, hasarlı dokuyu ya da istenmeyen maddeyi yok ederek beyin fonksiyonlarının devamını sağlayan faydalı bir işlem iken, nöroinflamatuvar olayların kontrolden çıkarak sürekli hale gelmesi doku hasarının artmasına yol açar. Alzheimer hastalığından etkilenen beyinde NFT'ler ve A β patolojik inklüzyonları ile ilişkili aktive olmuş mikrogliaların, reaktif astrositlerin, kompleman proteinlerinin ve proinflamatuvar sitokinlerin yaygın görünüşü beyin nöroinflamasyonunun kronik evresinde olduğunun bir işaretidir. Yapılan incelemelerde AH hastalığında pro-inflamatuvar moleküllerin prekürsörü olan biyoaktif lipidlerin normal beyin dokusuyla karşılaştırıldığında yüksek düzeyde olduğu tespit edilmiştir (10, 12, 13). Araşidonik asit metabolizması sonucu üretilen biyoaktif lipidlerin önemli pek çok fizyolojik ve patolojik olayda yer alması, bu yolağın son yıllarda gittikçe artan bir ilgi kazanmasına yol açmıştır. Fosfolipaz A $_2$ 'nin membran lipidlerini katalizi sonucu oluşan araşidonik asitin major metabolizma yollarından biri de siklooksijenaz enziminin yer aldığı metabolik yoldur. Prostaglandinlerin ve diğer inflamatuvar faktörlerin sentezini sağlayan basamaklarda yer alan bu enzimin AH hastalığının gelişiminde temel bir role sahip olduğu çeşitli yayınlarda ifade edilmiştir (14, 15). Yapılan çalışmalar primer sıçan astrositlerinde A β 25-35 peptidinin COX-2 protein sentezini ve PGE2 salınımını PKC aracılığı ile indüklediğini göstermektedir (109). Prostaglandin E2 reseptörlerinden EP-2 reseptörünün AH hastalığının komplikasyonlarından belirgin bir şekilde etkilenen serebral korteks ve hipokampusta oldukça fazla miktarda eksprese edildiği bulunmuştur (111). Prostaglandin E2'nin EP2 reseptörü aracılığı ile nöronlarda apoptoza yol açtığı, mikroglialarda inflamatuvar sitokinlerin üretimini indüklediği ve fagositik aktiviteyi azaltarak A β 'nin fagositozunu önlediği gösterilmiştir (112). Ayrıca, COX tarafından A β peptidinin üretilmesinde PGE2 aracılı γ -sekretaz aktivitesindeki artışın etkili olduğu ortaya konmuştur (18). Çalışmamızda, Alzheimer modeli oluşturulan grupta (OD) PGE2 seviyelerinin kontrol ve sham grubuna göre anlamlı şekilde artması, AH komplikasyonlarında bu inflamatuvar molekülün önemli bir faktör olduğunu belirten bu bulgularla paralellik göstermektedir.

Pro-inflamatuvar moleküller diğer inflamatuvar mekanizmaları tetikleyerek hastalığın gelişiminde rol oynadığından, PGE2 gibi prostaglandinlerin inhibisyonu AH hastalığında önemli bir terapötik hedeftir (113). Literatürde RA'nın

antiinflamatuvar etkisine işaret eden çeşitli araştırmalar vardır. Bu araştırmalarda RA'nın kobra zehiri faktörü (CVF) ile indüklenen kırmızı hücrelerin lizisini ve sıçanların pençe ödemi azalttığı, kompleman sistemin alternatif ve klasik yollarla aktivasyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir (27). Bu etkilerine ek olarak, glomerülonefrit ve romatoid artrit anti inflamatuvar etkisi yanında, uygulandığı dokuda COX-2 ekspresyonunu dikkate alarak azalttığı görülmüştür. Karsinogenez ile ilgili bir çalışmada RA'nın PGE2 sentezindeki artışı önlediği, COX-2 mRNA ekspresyonunu elemine ettiği tespit edilmiştir (139). Bu bilgiler ışığında, RA'nın, inflamasyondaki rolünün araştırılması ve AH hastalığındaki tedavi edici potansiyelinin ortaya konması amacı da diğer bir tercih nedeni olmuştur. Rosmarinik asidin AH hastalığındaki antiinflamatuvar etkisini inceleyen herhangi bir *in vivo* araştırma bulunmadığı da dikkate alındığında, projemiz bu yönüyle de orijinal bir çalışmadır. Rosmarinik asidin immünglobulin A nefropatisi olan sıçanlarda 50 mg/kg dozunda antiinflamatuvar etki gösterdiği belirtildiğinden projemizde bu dozun uygulanmasına karar verilmiştir.

Çalışmamızda AH modelindeki nöroinflamasyonun ve RA'nın bu nöroinflamatuvar sürece etkisinin incelenmesi amacıyla hipokampus dokusunda PGE2 miktarı ELİSA yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. Alzheimer modeli oluşturulan grupta (OD) PGE2 seviyeleri diğer gruplara göre anlamlı şekilde artmıştır. Bu sonucumuz AH komplikasyonlarında araşidonik asit COX-2 yolağının önemli bir faktör olduğunu öne süren yayınları (14, 15) desteklemektedir. Diğer yandan RA ile tedavi uygulanan 'ODR' grubunda PGE2 seviyesi OD grubuna göre anlamlı şekilde azalmıştır. Bu bulgular ışığında RA'nın AH'da gözlenen PGE2 artışının önüne geçebileceği ortaya konmuştur. Böylece RA'nın antioksidan özelliğine ilaveten PGE2 sentezini baskılamak yoluyla antiinflamatuvar etki göstererek de AH hastalığının tedavisinde fayda sağlayabileceği şeklindeki hipotezimiz desteklenmiştir.

Alzheimer hastalığının en önemli etkilerinden biri öğrenme ve hafızanın bozulmasıdır. Hastalıkta gözlenen en ciddi semptomatik sorunlar erken oluşan hafıza kaybında hızlı bir ilerleme, konuşma bozukluğu, yön bulma eksikliği, insanları tanıma sorunu gibi ilerleyici bilişsel ve duyuşsal problemlerdir (43). Alzheimer transjenik fareler kullanılarak yapılan çeşitli çalışmalarda hayvanların araştırıcı davranışlarının ve hareket yeteneklerinin göstergesi olan lokomotor aktivitelerinin azaldığı açık alan testleri ile gösterilmiştir (43, 227, 229). Daha önceki yayınların sonuçlarıyla uygunluk gösteren bulgularımız AH modeli uygulanan OD grubunda dinlenme oranının anlamlı olarak arttığını ve alınan toplam mesafenin önemli düzeyde azaldığını teyit etmiştir. Diğer yandan, AH transjenik farelerde gözlenen öğrenme ve hafıza fonksiyonlarındaki değişiklikler farklı labirent testleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Örneğin radyal kollu labirent kullanılarak yapılan öğrenme deneyinde AH transjenik farelerin (Tg2576) hafıza fonksiyonlarında ciddi bir bozulma olduğu (241), Morris su tankı ile gerçekleştirilen bir başka incelemede (242) Aβ infüzyonu yapılan farelerde gizli platformun bulunma latensinin arttığı, AH transjenik farelere uygulanan Y labirent testinde ise spontan kol değiştirme skorlarının azaldığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda, AH hastalığında oluşan bilişsel fonksiyon değişikliklerinin belirlenmesi amacıyla kısa süreli uzaysal hafıza ile ilgili incelemelerde yaygın olarak tercih edilen Y labirent testi kullanılmıştır. Elde edilen

öğrenme verileri istatistiksel olarak analiz edildiğinde K grubu sıçanların 'novel' kolda geçirdikleri sürenin ve bu kola giriş frekanslarının 'other' kola göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu bulgu hafıza fonksiyonlarında herhangi bir sorun olmayan hayvanların daha önce incelemedikleri 'novel' kolu tercih ettiklerini bildiren daha önceki yayınları destekler niteliktedir (233, 243, 244). Diğer yandan, Alzheimer grubu (OD) ile yapılan Y labirent testinde bu hayvanların 'novel' kolda geçirdikleri sürenin ve bu kola giriş frekanslarının ODR, SH, K ve R gruplarına kıyasla belirgin şekilde azaldığı, buna ilaveten 'other' kolda geçirdikleri sürenin ve bu kola giriş frekanslarının 'novel' kola göre belirgin şekilde arttığı tespit edilmiştir. Novel kolda geçirilen sürenin ve bu kola giriş frekanslarının azalması daha önceki yayınlarda (245, 246) kısa süreli hafıza bozukluğu şeklinde yorumlandığından, bu sonucumuz AH sıçanların kısa süreli uzaysal hafızalarının belirgin şekilde bozulduğunu ortaya koymuştur. Bu bulgular ışığında, projemizde gerçekleştirilen AH modeli yardımıyla öğrenme ve hafıza bozukluklarının azaltılmasına ilişkin çalışmaların yapılabileceği ve hastalıkta gözlenen bilişsel değişikliklerin mekanizmasının aydınlatılabileceği düşünülmektedir.

Alzheimer hastalığında gözlenen bilişsel bozukluk neticesinde hastalar kendi yaşamlarını idare edemeyerek yatağa bağımlı hale gelmekte ve yakınlarının bakımına muhtaç kalmaktadırlar. Yapılan klinik çalışmaların ilk hedefi günlük temel işlevleri yerine getirme yeteneğinin artırılması (IADLs: instrumental activities of the daily living) ve kurumsal bakım masraflarının azaltılması amacıyla bunamaya bağlı davranışsal, psikolojik semptomların düzeltilmesi yanında kognisyonun ve fonksiyonel aktivitenin geliştirilmesidir. Bugüne kadar kullanılan ilaçların bu semptomları tedavi edici etkileri oldukça yetersiz olduğundan alternatif tedavi yollarının geliştirilmesi oldukça önem kazanmıştır (22). Alzheimer hastalığı gibi kognisyon bozuklukları görülen bir çok hastalığın etyopatogenezinde artan serbest radikallerin rolü olduğu belirtildiği için antioksidan özelliği bilinen birçok madde tedavi amacıyla denenmiştir. Bileşiminde antioksidan RA içeren *Salvia officinalis* kullanılarak yapılan klinik çalışmalarda ADAS-cog ve CDR-SB testlerinin yapılarak hastaların bilişsel fonksiyonlarında iyileşme olduğu saptanmıştır (141). Çeşitli bitkilerin hafıza ve bilişsel fonksiyonlar üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada da özellikle bu bitkinin AH hastalığında terapotik bir potansiyeli olabileceği ileri sürülmüştür (141). Rosmarinik asidin belli bir dozun üstünde lokomotor aktiviteyi ve motivasyonu arttırdığı daha önceki bazı yayınlarda belirtildiğinden (44, 45), AH hastalığında oluşan öğrenme ve hafıza değişiklikleri üzerine etkileri Y labirent ve lokomotor aktivite testleri yardımıyla incelenmiştir. Çalışmamızda OD grubu ile karşılaştırıldığında, RA'nın ODR grubunda kısa süreli uzaysal hafızayı anlamlı şekilde düzelttiği bulunmuştur. Buna ek olarak, diğer gruplarla karşılaştırıldığında lokomotor aktivitenin OD grubunda belirgin şekilde azaldığı, RA ile tedavi edilen ODR grubunda ise anlamlı şekilde arttığı gözlenmiştir. Rosmarinik asitin bilişsel aktivite üzerinde olumlu etkilerinin olduğunu bildiren Pereira ve ark. daha önce yaptıkları çalışmayla (44) aynı paralellikte olan bulgularımız, bu bileşiğin antioksidan etki ile lipid peroksidasyonu ve antiinflamatuvar özelliği ile PGE 2 miktarını azaltarak öğrenme ve hafıza fonksiyonları üzerinde olumlu etkileri olduğunu ortaya koymuştur.

Sonuç olarak, bu hastalıkla ilgili tedavi seçeneklerinin oldukça sınırlı olduğu dikkate alındığında, yeni geliştirilen ilaçların terapotik etkinliklerinin ya da toksik

etkilerinin anlaşılması için hastalığın tam olarak taklit edilebildiği bir AH modelinin kurulması AH mekanizması ile ilişkili araştırmalar yönünden oldukça önemlidir. Ayrıca projemizde, AH modelinin kurulması ve hastalığın patojenezisinin aydınlatılması yanında, bu yıkıcı nörodejeneratif hastalığın tedavisi ile ilgili başka projelere de basamak teşkil edecek bilgilere ulaşılmıştır.

SONUÇLAR

Çalışmamızın sonuçları şöylece özetlenebilir:

1. Alzheimer modeli grubunda oksidatif stresin göstergesi olan lipid peroksidasyonun belirgin şekilde arttığı izlenmiştir.
2. Alzheimer modeli grubunda inflamasyonla ilişkili PGE2 seviyesinin belirgin şekilde arttığı izlenmiştir.
3. Alzheimer hastalığında lipid peroksidasyonun ve proinflamatuvar moleküllerin anlamlı düzeyde arttığını bildiren çalışmalar desteklenmiştir.
4. Oksidatif stresin ve östrojen tükenmesinin AH hastalığında gözlenen öğrenme ve hafıza sorununa benzer bir bozukluğu indüklediği saptanmıştır.
5. Alzheimer hastalığının patogenezinde rol oynayan lipid peroksidasyon, inflamasyon, histopatlojik değişimler ve hücre dışı A β birikimi geliştirilen yeni modelde de gözlenmiştir.
6. Rosmarinik asitin antioksidan ve antiinflamatuvar etki göstererek AH tedavisinde fayda sağlayabileceği ortaya konmuştur.
7. Rosmarinik asitin AH'da görülen öğrenme ve hafıza bozukluklarını azaltabileceği gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Kawas CH: Epidemiology of Alzheimer's Disease. in: Dementia Update. American Academy of Neurology Press, USA, 23-38, 1997.
2. Brun A, Gustafson L, Englund E. Subcortical pathology of Alzheimer's disease. Adv Neurol. 51:73–77, 1990.
3. Özbabalık D. Alzheimer ve serebral iskemi. Journal of Turkish Cerebrovascular Diseases. 13:2; 33-35, 2007.
4. Braak H, Braak E: Pathology of Alzheimer's disease, Calne DB (Ed): Neurodegenerative Diseases. 585-613, 1994.
5. Selekler K, Topçuoğlu E. Alzheimer Hastalığı. Turkish Journal of Geriatrics. 1: 63-67, 1998
6. Esch FS, Keim PS, Beattie EC. Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. Science. 248:1122-1124, 1990.
7. Hardy J: Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. Trend Neurosci. 20(4): 154-159, 1997.
8. Zhu X, Raina A, Lee H, Casadesus G, Smith M, Perry G. Oxidative stress signalling in Alzheimer's disease. Brain Research. 1000: 32–39, 2004.
9. Fraser SP, Suh YH, Djamgoz MBA: Ionic effects of the Alzheimer's disease B-amyloid precursor protein and its metabolic fragments. Trends Neurosci. 117; 20:67-72, 1997.
10. Strohmeyer R, Rogers J. Molecular and cellular mediators of Alzheimer's disease inflammation. Journal of Alzheimer's Disease. 3; 131–157, 2001.
11. Guyton A, Hall J. Textbook of Medical Physiology, 11th Edition, 434-436, 2006.
12. Bazan NG, Colangelo V, Lukiw WJ. Prostaglandins and other lipid mediators in Alzheimer's disease. Prostaglandins & Other Lipid Mediators. 69:197-210, 2002.
13. Montine TJ, Sidell KR, Crews BC, Markesbery WR, Marnett LJ, Roberts LJ, Morrow JD. Elevated CSF prostaglandin E2 levels in patients with probable AD. Neurology. 22;53:1495-8, 1999.
14. Liang X, Wang Q, Hand T, Wu L, Breyer R, Montine T, Andreasson K. Deletion of the Prostaglandin E2 EP2 Receptor Reduces Oxidative Damage and Amyloid Burden in a Model of Alzheimer's Disease. The Journal of Neuroscience. 25(44):10180 –10187, 2005.

15. Hoshino T, Nakaya T, Homan T, Tanaka K, Sugimoto Y, Araki W, Narita M, Narumiya S, Suzuki T, Mizushima T. Involvement of Prostaglandin E2 in Production of Amyloid- β Peptides Both in Vitro and in Vivo. *The Journal of Biological Chemistry*. 282:32676–32688, 2007
16. Yan Q, Zhang J, Liu H, Babu-Khan S, Vassar R, Biere AL, Citron M, Landreth G: Anti-inflammatory drug therapy alters beta-amyloid processing and deposition in an animal model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 23:7504-7509, 2003.
17. Lukiw W, Bazan N. Neuroinflammatory Signaling Upregulation in Alzheimer's Disease. *Neurochemical Research*. 25:1173-1184, 2000.
18. Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid Receptors: Structures, Properties and Functions. *Physiol. Rev*. 79: 1193–1226, 1999.
19. Pairet M, Engelhardt G. Distinct isoforms (COX-1 and COX-2) of cyclooxygenase: possible physiological and therapeutic implications. *Fundam. Clin. Pharmacol*. 10:1–17, 1996.
20. Vane R, Bakhle S, Botting M. Cyclooxygenases 1 and 2. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 38:97–120, 1998.
21. Scali C, Prosperi C, Bracco L, Piccini C, Baronti R, Ginestroni A, Sorbi S, Pepeu G, Casamenti F. Neutrophils CD11b and fibroblasts PGE2 are elevated in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. 23:523-530, 2002.
22. Santos-Neto L, Toledo M, Medeiros-Souza P, Almeida de Souza G. The Use of Herbal Medicine in Alzheimer's Disease. *Advance Access Publication*. 3(4):441–445, 2006.
23. Kennedy DO, Scholey AB. The Psychopharmacology of European Herbs with Cognition-Enhancing Properties. *Current Pharmaceutical Design*. 12:4613-4623, 2006.
24. Akhondzadeh S, Abbasi S. Herbal medicine in the treatment of Alzheimer's disease. *American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias*. 21:113-118, 2006
25. Iuvone T, Filippis D, Esposito G, D'Amico A, Izzo A. The Spice Sage and Its Active Ingredient Rosmarinic Acid Protect PC12 Cells from Amyloid- β Peptide-Induced Neurotoxicity. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 317:1143- 1149, 2006.
26. Gao LP, Wei HL, Zhao HS, Xiao SY, Zheng RL. Antiapoptotic and antioxidant effects of rosmarinic acid in astrocytes. *Pharmazie*. 60:62-5, 2005.

27. Proctor LM, Strachan AJ, Woodruff TM, Mahadevan IB, Williams HM, Shiels IA, Taylor SM. Complement inhibitors selectively attenuate injury following administration of cobra venom factor to rats. *International Immunopharmacology* 6: 1224-1232, 2006.
28. Makino T, Ono T, Liu N, Nakamura T, Muso E, Honda G. Suppressive effects of rosmarinic acid on mesangioproliferative glomerulonephritis in rats. *Nephron*. 92: 898-904, 2002.
29. Götz J, Streffer JR, David D, Schild A, Hoernkli F, Pennanen L, Kurosinski P, Chen F. Transgenic animal models of Alzheimer's disease and related disorders: histopathology and therapy. *Molecular Psychiatry*. 9:664-683, 2004.
30. Hua X, Lei M, Zhang Y, Ding J, Han Q, Hu G, Xiao M. Long-term D-galactose injection combined with ovariectomy serves as a new rodent model for Alzheimer's disease. *Life Sci*. 80:1897–1905, 2007.
31. Gibbs RB. Impairment of basal forebrain cholinergic neurons associated with aging and long-term loss of ovarian function. *Experimental Neurology* 151:289–302, 1998.
32. Mufson EJ, Cai WJ, Jaffar S, Chen E, Stebbins G, Sendera T, Kordower JH. Estrogen receptor immunoreactivity within subregions of the rat forebrain: neuronal distribution and association with perikarya containing choline acetyltransferase. *Brain Research*. 849:253–274, 1999.
33. Bao J, Cao C, Zhang X, Jiang F, Nicosia SV, Bai W. Suppression of β -Amyloid Precursor Protein Signaling into the Nucleus by Estrogens Mediated through Complex Formation between the Estrogen Receptor and Fe65. *Molecular and Cellular Biology*. 27: 1321-1333, 2007.
34. Good PF, Werner P, Hsu A, Olanow CW, Perl DP. Evidence for neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease. *The American Journal of Pathology*. 149: 21–28, 1996.
35. Schippling S, Kontush A, Arlt S, Buhmann C, Sturenburg HJ, Mann U, Thomsen TM, Beisiegel U. Increased lipoprotein oxidation in Alzheimer's disease. *Free Radical Biology & Medicine*. 28:351–360, 2000.
36. Smith MA, Perry G, Richey PL, Sayre LM, Anderson VE, Beal MF, Kowall N. Oxidative damage in Alzheimer's. *Nature*. 382:120–121, 1996.
37. Palmer AM, Burns MA. Selective increase in lipid peroxidation in the inferior temporal cortex in Alzheimer's disease. *Brain Res*. 645:338–42, 1994.

38. Christen Y. Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr.* 7:621–9, 2000.
39. Esterbauer H, Cheesemon K. Determination of aldehydic lipid-peroxidation products malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods. Enzymol.* 186:407-421, 1990.
40. Holley AE, Cheeseman KH. Measuring free radical reactions in vivo. *Br. Med. Bull.* 49:494-505, 1990.
41. Markesbery WR. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.* 23:134–147, 1997.
42. Perry G, Castellani RJ, Hirai K, Smith MA. Reactive oxygen species mediate cellular damage in Alzheimer disease. *J Alzheimers Dis.* 1:45–55, 1998.
43. Siedlak SL, Casadesus G, Webber KM, Pappolla MA, Atwood CS, Smith MA, Perry G. Chronic antioxidant therapy reduces oxidative stress in a mouse model of Alzheimer's disease. *Free Radic Res.* 43(2): 156–164, 2009.
44. Pereira P, Tysca D, Oliveira P, Brum L, Picada JN, Ardenghi P. Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid. *Pharmacological Research* 52:199-203, 2005.
45. Takeda H, Tsuji M, Inazu M, Egashira T, Matsumiya T. Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice. *European Journal of Pharmacology.* 449:261– 267, 2002.
46. Amaducci L, Falchini M, Lippi A: Descriptive epidemiology and risk factors for Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand.* 139:21-25, 1992.
47. Van CM, Stijnen T, Hofman A. Risk factors for Alzheimer's disease: Overview of the EURODEM collaborative re-analysis of case-control studies. *International Journal of Epidemiology.* 20:4-12, 1991.
48. Hofman A, Schulte W, Tanja TA. History of dementia and Parkinson's disease in 1 st-degree relatives of patients with Alzheimer's disease. *Neurology.* 39:1589-1592, 1989.
49. Relkin NR. The clinical utility of Apolipoprotein E genotyping in neurological practice. *American Academy of Neurology Press, USA,* 1997:63-75, 1997.
50. La F, Williams RS. A prospective study of Alzheimer disease in Down Syndrome. *Arch Neurol.* 46:849-853, 1989.
51. Mendez MF, Underwood KL, Zander BA. Risk factors in Alzheimer's disease; A clinicopathologic study. *Neurology.* 42:770-775, 1992.

52. Suzuki N, Cheung TT, Cai XD ve ark. An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta proteinprecursor (beta APP717) mutants. *Science*. 264:1336-1340, 1994.
53. Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry*. 32:4693-4697, 1993.
54. Selkoe DJ. *Neuropathology and molecular biology of Alzheimer Disease*. American Academy of Neurology Press, USA. 39-61, 1997.
55. Cooper AJL. Glutathione in the brain: disorders of glutathione metabolism. In: Rosenberg RN, Prusiner SB, DiMauro S, Barchi RL, Klunk LM, eds. *The molecular and genetic basis of neurological disease*. Boston: Butterworth-Heinemann. 1242–5, 1997.
56. Hazel JR, Williams EE. The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Prog Lipid Res*, 29:167–227, 1990.
57. Smith MA, Rudnicka-Nawrot M, Richey PL. Carbonyl-related posttranslational modification of neurofilament protein in the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 64:2660–6, 1995.
58. Smith MA, Richey Harris PL, Sayre L, Perry G. Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. *Proc Natl Acad Sci*. 94:9866–8, 1997.
59. Smith MA, Richey Harris PL, Sayre LM, Beckman JS, Perry G. Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 17:2653–7, 1997.
60. Beal MF, Howell N, Bodis-Wollner IB, eds. *Mitochondria and free radicals in neurodegenerative diseases*. *Curr Opin Neurobiol*. 6:661-6, 1996.
61. Mecocci P, MacGarvey U, Beal MF. Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 36:747–51, 1994.
62. Chandrasekaran K, Giordano T, Brady DR, Stoll J, Martin LJ, Rapoport SI. Impairment in mitochondrial cytochrome oxidase gene expression in Alzheimer disease. *Brain Res. Mol. Brain Res*. 24:336– 340, 1994.
63. Dyrks T, Dyrks E, Harmann R, Masters C, Beyreuther K. Amyloidogenicity of β A4 and β A4-bearing amyloid protein precursor fragments by metal-catalyzed oxidation. *J Biol Chem*. 267:18210–7, 1992.

64. Thomas T, Thomas G, McLendon C, Sutton T, Mullan M. β -amyloid-mediated vasoactivity and vascular endothelial damage. *Nature*. 380:168–71, 1996.
65. McDonald DR, Brunden KR, Landreth GE. Amyloid fibrils activate tyrosine kinase-dependent signaling and superoxide production in microglia. *J Neurosci*. 17:2284–94, 1997.
66. Meda L, Cassatella MA, Szendrei GI. Activation of microglial cells by β -amyloid protein and interferon gamma. *Nature*. 374:647–50, 1995.
67. Butterfield DA, Hensley K, Harris M, Mattson M, Carney J. β -amyloid peptide free radical fragments initiate synaptosomal lipoperoxidation in a sequence-specific fashion: implications to Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 200:710–5, 1994.
68. Behl C, Davis J, Cole GM, Schubert D. Vitamin E protects nerve cells from amyloid β protein toxicity. *Biochem Biophys Res Commun*. 86:944–52, 1992.
69. Hensey K, Hall N, Subramaniam R. Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *J Neurochem*. 65:2146–56, 1995.
70. Mecocci P, Beal MF, Cecchetti R, Polidori MC, Cherubini A, Chionne F, Avellini L, Romano G, Senin U. Mitochondrial membrane fluidity and oxidative damage to mitochondrial DNA in aged and AD human brain. *Mol. Chem. Neuropathol*. 31:53– 64, 1997.
71. Nunomura A, Perry G, Pappolla MA, Wade R, Hirai K, Chiba S, Smith MA. RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *J. Neurosci*. 19:1959– 1964, 1999.
72. Marcus DL, Thomas C, Rodriguez C. Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 150:40–4, 1998.
73. Pratico D, Uryu K, Leight S, Trojanoswki JQ, Lee VM. Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. *J Neurosci* 21:4183– 4187, 2001.
74. Mark RJ, Lovell MA, Markesbery WR, Uchida K, Mattson MP. A role for 4-hydroxy nonenal, an aldehydic product of lipid peroxidation, in disruption of ion homeostasis and neuronal death induced by amyloid β -peptide. *J Neurochem*. 68:255–64, 1997.

75. Markesbery WR, Lovell MA. Four-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, is increased in the brain in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 19:33–6, 1998
76. Yan SD, Chen X, Schmidt AM. Glycated tau protein in Alzheimer disease: a mechanism for induction of oxidant stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:7787–91, 1994.
77. Busciglio J, Yankner BA. Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons in vitro. *Nature*. 378:776–9, 1995.
78. Smith MA, Taneda S, Richey PL. Advanced Maillard reaction end products are associated with Alzheimer disease pathology. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:5710–4, 1994
79. Mattson MP, Carney JW, Butterfield DA. A tombstone in Alzheimer's? *Nature*. 373:481, 1995.
80. Yan SD, Chen X, Fu J, et al. RAGE and amyloid- β peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature*. 382:685–91, 1996.
81. Vitek MP, Bhattacharya K, Glendening JM. Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:4766–70, 1994.
82. McGeer PL, McGeer EG. The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res. Rev.* 21:195–218, 1995.
83. Rogers J, Griffin WST, Wood PL. Inflammatory mechanisms of Alzheimer's disease, in: *Neuroinflammation: Mechanisms and Management*. 177–193, 1998.
84. Eddleston M, Mucke L. Molecular profile of reactive astrocytes – implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience*. 54:15–36, 1993.
85. Malhotra SK, Shnitka TK, Elbrink J. Reactive astrocytes – a review. *Cytobios*. 61:133–160, 1990.
86. Montgomery DL. Astrocytes: form, functions, and roles in disease. *Vet. Pathol*. 31:145–167, 1994.
87. Schechter R, Yen SH, Terry RD. Fibrous Astrocytes in senile dementia of the Alzheimer type. *J. Neuropathol. Exp Neurol*. 40:95–101, 1981.

88. Dickson DW, Farlo J, Davies P, Crystal H, Fuld P, Yen SH. Alzheimer's disease. A double-labeling immunohistochemical study of senile plaques. *Am. J. Pathol.* 132: 86–101, 1988.
89. Mandybur TI. Cerebral amyloid angiopathy and astrocytic gliosis in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 78:329–331, 1989.
90. Chao CC, Hu S, Sheng WS, Kravitz FH, Peterson PK. Inflammation-mediated neuronal cell injury, in: *Inflammatory cells and mediators in CNS diseases*. Ruffolo RR, Feuerstein GZ, Hunter AJ, Poste G, Metcalf BW. Harwood Academic Publishers. 483–495, 1999.
91. Ramón Y, Cajal S. *Histology of the Nervous System of Man and Vertebrates*. New York: Oxford Univ. Press. 1: 2-10, 1995.
92. Morioka T, Baba T, Black KL, Streit WJ. Immunophenotypic analysis of infiltrating leukocytes and microglia in an experimental rat glioma. *Acta Neuropathol.* 83:590–597, 1992.
93. Streit WJ, Sparks DL. Activation of microglia in the brains of humans with heart disease and hypercholesterolemic rabbits. *J. Mol. Med.* 75:130–138, 1997.
94. Barron KD. The microglial cell. A historical review. *J. Neurol Sci.* 134:57–68, 1995.
95. Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 21:383–421, 2000.
96. Griffin WS, Sheng JG, Royston MC. Glial neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a 'cytokine cycle' in disease progression. *Brain Pathol.* 8:65–72, 1998.
97. Della-Bianca V, Dusi S, Bianchini E, Dal-Pra I, Rossi F. β amyloid activates the O₂ forming NADPH oxidase in microglia, monocytes and neutrophils. A possible inflammatory mechanism of neuronal damage in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 274:15493–15499, 1999.
98. Johnson SA, Lampert-Etchells M, Pasinetti GM, Rozovsky I, Finch CE. Complement mRNA in the mammalian brain: responses to Alzheimer's disease and experimental brain lesioning. *Neurobiol. Aging.* 13:641–648, 1992.

99. Chen S, Frederickson RC, Brunden KR. Neuroglialmediated immunoinflammatory responses in Alzheimer's disease: complement activation and therapeutic approaches. *Neurobiol. Aging.* 17:781–787, 1996.
100. Xia MQ, Hyman BT. Chemokines/chemokine receptors in the central nervous system and Alzheimer's disease. *J. Neurovirol.* 5:32–41, 1999.
101. Feng L, Xia Y, Garcia GE, Hwang D, Wilson CB. Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide, *J. Clin. Invest.* 95:1669–1675, 1995.
102. Blom MA, Twillert MG, Vries SC. NSAIDS inhibit the IL-1 beta-induced IL-6 release from human post-mortem astrocytes: the involvement of prostaglandin E2. *Brain Res.* 777:210-218, 1997.
103. O'Banion MK. Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology. *Crit. Rev. Neurobiol.* 13:45–82, 1999.
104. Jankowsky JL, Slunt HH, Ratovitski T, Jenkins NA, Copeland NG, Borchelt DR. Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: a comparison of strategies. *Biomol Eng.* 17:157–165, 2001.
105. Ho L, Pieroni C, Winger D, Purohit DP, Aisen SP, Pasinetti GM. Regional distribution of cyclooxygenase-2 in the hippocampal formation in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.Res.* 57:295–303, 1999.
106. Kitamura Y, Shimohama S, Koike H. Increased expression of cyclooxygenases and peroxisome proliferatoractivated receptor-gamma in Alzheimer's disease brains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254:582–586, 1999.
107. Bauer MK, Lieb K, Schulze-Osthoff K. Expression and regulation of cyclooxygenase-2 in rat microglia. *Eur. J. Biochem.* 243:726–731, 1997.
108. O'Banion MK, Miller JC, Chang JW, Kaplan MD, Coleman PD. Interleukin-1 beta induces prostaglandin G/H synthase-2 (cyclooxygenase- 2) in primary murine astrocyte cultures. *J. Neurochem.* 66:2532–2540, 1996.
109. Hüll M, Müksch B, Akundi RS, Waschbisch A, Hoozemans J, Veerhuis R, Fiebich BL. Amlloid β peptide (25-35) activates protein kinase C leading to cyclooxygenase-2 induction and prostaglandin E2 release in primary midbrain astrocytes. *Neurochemistry International.* 48:663 – 672, 2006.
110. Coleman RA, Smith WL, Narumiya S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol. Rev.* 46:205–229, 1994.

111. McCullough L, Wu L, Haughey N, Liang X, Hand T, Wang Q, Breyer R, Andreasson K. Neuroprotective function of the PGE₂ EP₂ receptor in cerebral ischemia. *J Neurosci.* 24:257–268, 2004.
112. Aronoff DM, Canetti C, Peters-Golden M. Prostaglandin E₂ inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptormediated increase in intracellular cyclic AMP. *J. Immunol.* 173:559–565, 2004.
113. in t’Veld BA, Ruitenbergh A, Hofman A, Launer LJ, Van Duijn, CM, Stijnen T, Breteler MM, Stricker BH. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 345:1515–1521, 2001.
114. Forsyth DR, Wilcock GK, Morgan RA. Pharmacokinetics of tacrine hydrochloride in Alzheimer's disease. *Clin Pharmacol Ther.* 46:634-641, 1989.
115. Sano M. Update on treatment of cognitive symptoms in dementia. In: *Dementia Update.* American Academy of Neurology Press, USA, 1997: 107-115.
116. Knopman DS, Morris JC: An update on primary drug therapies for Alzheimer Disease? *Arch Neurol.* 54:1406-1409, 1997.
117. Hussain I, Powell D, Howlett DR. Identification of a novel aspartic protease (asp2) as beta- secretase. *Mol Cell Neurosci.* 14:419-427, 1999.
118. Hung A, Haass AC, Nitsch RM. Activation of protein kinase C inhibits cellular production of the amyloid β -protein. *J Biol Chem,* 268:22959-22962, 1993.
119. Jacobsen JS, Spruyt MA, Brown AM. The release of Alzheimer's disease β -amyloid peptide is reduced by phorbol treatment. *J Biol Chem,* 269: 8376-8382, 1994.
120. Çelik T, Uzbay T. Alzheimer Hastalığının Farmakolojik Tedavisinde Yeni Gelişmeler. *Demans Dergisi.* 3:48-58, 2003.
121. Handland BK, Menley NR, Su D. Beta-secretase inhibitors repress thymocyte development. *Proc Natl Acad Sci USA,* 98:7487-7491, 2001.
122. Doerfler P, Shearman MS, Perlmutter RM. Presenilin-dependent beta-secretase activity modulates thymocyte development. *Proc Natl Acad Sci USA,* 98:9312-9317, 2001.
123. Simons M, Keller P, De Strooper B. Cholesterol depletion inhibits the generation of β -amyloid in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA,* 95:6460-6464, 1998.

124. Wolozin B, Kellman W, Rousseau P. Decrease prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3 methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol*, 57:1439-1443, 2000.
125. Schenk D, Barbour R, Dunn W. Immunization with amyloid- β attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*. 400:173-177, 1999.
126. Le Bars PL, Katz MM, Berman N. A placebo-controlled, double-blind randomized trial of an extract of ginkgo biloba for dementia. *JAMA*. 278:1327-1332, 1997.
127. Yamada K, Tanaka T, Han D. Protective effects of idebenone and alpha -tocopherol on beta-amyloid (1-42)- induced learning and memory deficits in rats: implication of oxidative stress in beta-amyloid-induced neurotoxicity in vivo. *Eur J Neurosci*. 11:83-90, 1999.
128. Gutzman H, Hadler D. Sustained efficacy and safety of idebenone in the treatment of Alzheimer's disease: update on a 2-year double-blind multicentre study. *J Neural Transm Suppl*. 54:301-310, 1998.
129. Bush AI, Pettingel WH, Paradis MD. Modulation of A beta adhesiveness and secretase site cleavage by zinc. *J Biol Chem*. 269:12152-12158, 1994.
130. Murayama H, Shin RW, Higuchi J. Interaction of aluminum with PHFtau in Alzheimer's disease neurofibrillary degeneration evidenced by desferrioxamine- assisted chelating autoclave method. *Am J Pathol*. 155:877-885, 1999.
131. Flaten TP. Aluminium as a risk factor in Alzheimer's disease, with emphasis on drinking water. *Brain Res Bull*. 55:187- 196, 2001.
132. Broe GA, Henderson AS, Creasey H. A case-control study of Alzheimer's disease in Australia. *Neurology*. 40:1698-1707, 1990.
133. Rich JB, Rasmusson DX, Folstein MF. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in Alzheimer's disease. *Neurology*. 45:51-55.112, 1995.
134. Lim GP, Yang F, Chu P. Ibuprofen suppresses plaque pathology and inflammation in a mouse model for Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 20: 5709-5714, 2000.
135. Mackenzie IR, Munoz DG. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs use and Alzheimer-type pathology in aging. *Neurology*. 50:986-990, 1998.
136. Murrell J, Farlow M, Ghetti B. A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary. *Alzheimer's Disease*. *Science*. 254:97-99, 1991.

137. Ignarro LJ, Aeberhard EE, Henderson VW. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs prevent transcriptional expression of the inducible NO synthase gene in macrophages by interference with NF- κ B activation. *Biol Nitric Oxide*. 5:5, 1996.
138. Baba S, Osakabe N, Natsume M, Yasuda A, Muto Y, Hiyoshi K, Takano H, Yoshikawa T, Terao J. Absorption, metabolism, degradation and urinary excretion of rosmarinic acid after intake of *Perilla frutescens* extract in humans. *Europe Journal Nutrient*. 44:1-9, 2005.
139. Shanlou Q, Weihua LI, Ryoko T, Miyako H, Keiko M, Fumio T, Yukio N, & Masataka Y. Rosmarinic acid inhibits the formation of reactive oxygen and nitrogen species in RAW264.7 macrophages. *Free Radical Research*. 39:995–1003, 2005.
140. Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Yoshikawa T. Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: anticarcinogenic effect of *Perilla frutescens* extract in the murine two-stage skin model. *Carcinogenesis*. 25:549-557, 2004.
141. Perry EK, Pickering AT, Wang WW, Houghton PJ and Perry NS. Medicinal plants and Alzheimer's disease: from ethnobotany to phytotherapy. *J Pharm Pharmacol*. 51:527-534, 1999.
142. Cash AD, Perry G, and Smith MA. Therapeutic potential in Alzheimer disease. *Curr Med Chem*. 9:1605-1610, 2002.
143. Pearl-Yafe M, Halperin D, Scheuerman O, and Fabian I. The p38 pathway partially mediates caspase-3 activation induced by reactive oxygen species in Fanconi anemia C cells. *Biochem Pharmacol*. 67:539-546, 2004.
144. Boulton A, Baker GB, Butterworth RF. *Animal Models of Neurological Disease*. 1:29-53, 1992.
145. Aigner TG, Mitchell SJ, Aggleton JP, DeLong MR, Struble RG, Price DL, Wenk GL, Mishkin M. Effects of scopolamine and physostigmine on recognition memory in monkeys with ibotenic-acid lesions of nucleus basalis of Meynert. *Psychopharmacology*. 92:292-300, 1987
146. Mesulam MM, Mufson EJ, Levey AI, Wainer BH. Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, nuclei basalis (substantia innominata) and hypothalamus in rhesus monkey. *J. Comp. Neurol*. 214:170-197, 1983.
147. Pendlebury WW, Beal MF, Kowall NW, Soloman PR. Neuropathologic, neurochemical and immunocytochemical characteristics of aluminum-induced neurofilamentous degeneration. *Neurotoxicology*. 9:503-510, 1998.

148. Terry RD, Davies P. Dementia of the Alzheimer type. *Ann. Rev. Neurosci.* 3: 77-95, 1980.
149. Terry RD, Pena C. Experimental production of neurofibrillary degeneration. *Neuropathol. Exp. Neurol.* 24:200-210, 1965.
150. Coyle JT, Schwarcz R. The use of excitatory amino acids as selective neurotoxins, in *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. 508-527, 1983.
151. Stepanichev MY, Onufriev MV, Yakovlev AA, Khrenov AI, Peregud DI, Vorontsova ON, Lazareva NA, Gulyaeva NV. Amyloid- β (25–35) increases activity of neuronal NO-synthase in rat brain. *Neurochemistry International*. 52:1114–1124, 2008.
152. Giovannini MG, Scali C, Prosperi C, Bellucci A, Vannucchi MG, Rosi S, Pepeu G, Casamenti F. Amyloid β Induced Inflammation and Cholinergic Hypofunction in the Rat Brain in Vivo: Involvement of the p38MAPK Pathway. *Neurobiology of Disease*. 11:257–274, 2002.
153. Duyckaerts C, Potier MC, Delatour B. Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol.* 115:5–38, 2008.
154. Madani R, Poirier R, Wolfer DP, Welzl H, Groscurth P, Lipp HP, Lu B, El Mouedden M, Mercken M, Nitsch RM, Mohajeri MH. Lack of neprilysin suices to generate murine amyloid like deposits in the brain and behavioral deficit in vivo. *J Neurosci Res.* 84:1871–1878, 2006.
155. Spillantini MG, Murrell JR, Goedert M, Farlow MR, Klug A, Ghetti B. Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:7737–7741, 1998.
156. Gomez-Isla T, Hollister R, West H, Mui S, Growdon JH, Petersen RC, Parisi JE, Hyman BT. Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 41:17–24, 1997.
157. Irizarry MC, Soriano F, McNamara M, Page KJ, Schenk D, Games D, Hyman BT. Abeta deposition is associated with neuropil changes, but not with overt neuronal loss in the human amyloid precursor protein V717F (PDAPP) transgenic mouse. *J Neurosci.* 17:7053–7059, 1997.
158. Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, YounKin S, Yang F, Cole G. Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*. 274:99–102, 1996.

159. Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Bürki K, Frey P, Paganetti PA, Waridel C, Calhoun ME, Jucker M, Probst A, Staufenbiel M, Sommer B. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:13287–13292, 1997.
160. Mattson MP, Gary DS, Chan SL, Duan W. Perturbed endoplasmic reticulum function, synaptic apoptosis and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochem Soc Symp.* 67:151–162, 2001.
161. Oyama F, Sawamura N, Kobayashi K, Morishima-Kawashima M, Kuramochi T, Ito M, Tomita T, Maruyama K, Saido TC, Iwatsubo T, Capell A, Walter J, Grunberg J, Ueyama Y, Haass C, Ihara Y. Mutant presenilin 2 transgenic mouse: effect on an age-dependent increase of amyloid beta-protein 42 in the brain. *J Neurochem* 71:313–322, 1998.
162. Sawamura N, Morishima-Kawashima M, Waki H, Kobayashi K, Kuramochi T, Frosch MP, Ding K, Ito M, Kim TW, Tanzi RE, Oyama F, Tabira T, Ando S, Ihara Y. Mutant presenilin 2 transgenic mice. A large increase in the levels of Abeta 42 is presumably associated with the low density membrane domain that contains decreased levels of glycerophospholipids and sphingomyelin. *J Biol Chem* 275:27901–27908, 2000.
163. Lazarov O, MorWni GA, Pigino G, Gadadhar A, Chen X, Robinson J, Ho H, Brady ST, Sisodia SS. Impairments in fast axonal transport and motor neuron deficits in transgenic mice expressing familial Alzheimer's disease-linked mutant presenilin 1. *J Neurosci.* 27:7011–7020, 2007.
164. Van Groen, T., Kadish, I. Transgenic AD model mice, effects of potential anti-AD treatments on inflammation and pathology. *Brain Research. Brain Research Reviews* 48 (2), 370–378, 2005
165. Green PS, Bales K, Paul S, Bu G. Estrogen therapy fails to alter amyloid deposition in the PDAPP model of Alzheimer's disease. *Endocrinology.* 146:2774–2781, 2005.
166. Heikkinen T, Kalesnykas G, Rissanen A, Tapiola T, Iivonen S, Wang J, Chaudhuri J, Tanila H, Miettinen R, Puolivali J. Estrogen treatment improves spatial learning in APP + PS1 mice but does not affect beta amyloid accumulation and plaque formation. *Exp Neurol.* 187:105–17, 2004.
167. Schupf N, Lee JH, Wei M, Pang D, Chace C, Rong BC, Zigman WB, Tycko B, Silverman W. Estrogen Receptor- α variants increase risk of Alzheimer's Disease in women with Down syndrome. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 25: 476–482, 2008.

168. Schonknecht P, Pantel J, Klinga K, Jensen M, Hartmann T, Salbach B, Schroder J. Reduced cerebrospinal fluid estradiol levels are associated with increased beta-amyloid levels in female patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 307:122–4, 2001.
169. Vincent B, Smith JD. Effect of estradiol on neuronal Swedish-mutated beta-amyloid precursor protein metabolism: reversal by astrocytic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 271:82–5, 2000.
170. Dykens JA, Moos WH, Howell N. Development of 17alpha-estradiol as a neuroprotective therapeutic agent: rationale and results from a phase clinical study. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1052:116–135, 2005.
171. Petanceska SS, Nagy V, Frail D, Gandy S. Ovariectomy and 17beta-estradiol modulate the levels of Alzheimer's amyloid beta peptides in brain. *Experimental Gerontology.* 35:1317–25, 2000.
172. Greenfield JP, Leung LW, Cai D, Kaasik K, Gross RS, Rodriguez-Boulan E, Greengard P, Xu H. Estrogen lowers Alzheimer beta-amyloid generation by stimulating trans-Golgi network vesicle biogenesis. *J Biol Chem.* 277:12128–12136, 2002.
173. Simpkins JW, Green PS., Gridley, K.E., Singh, M., de Fiebre, N.C., Rajakumar, G. Role of estrogen replacement therapy in memory enhancement and the prevention of neuronal loss associated with Alzheimer's disease. *The American Journal of Medicine* 103:19–2, 1997.
174. Brinton RD, Thompson RF, Foy MR, Baudry M, Wang J, Finch CE, Morgan TE, Stanczyk FZ, Pike CJ, Nilsen J. Progesterone Receptors: Form and Function in Brain. *Front Neuroendocrinol.* 29: 313–339, 2008.
175. Kiss R, Paridaens RJ, Heuson JC, Danguy AJ. Effect of progesterone on cell proliferation in the MXT mouse hormone-sensitive mammary neoplasm. *J Natl Cancer Ins.* 77:173–8, 1986.
176. Pike MC, Ross RK. Progestins and menopause: epidemiological studies of risks of endometrial and breast cancer. *Steroids.* 65:659–64, 2000.
177. Gerstenberg C, Allen WR, Stewart F. Factors controlling epidermal growth factor (EGF) gene expression in the endometrium of the mare. *Mol Reprod Dev.* 53:255–65, 1999.
178. Lennard SN, Gerstenberg C, Allen WR, Stewart F. Expression of epidermal growth factor and its receptor in equine placental tissues. *J Reprod Fertil.* 112:49–57, 1998.

179. Begliuomini S, Casarosa E, Pluchino N, Lenzi E, Centofanti M, Freschi L, Pieri M, Genazzani AD, Luisi S, Genazzani AR. Influence of endogenous and exogenous sex hormones on plasma brain derived neurotrophic factor. *Hum Reprod* 22:995–1002, 2007.
180. Wilson ME, Dubal DB, Wise PM. Estradiol protects against injury-induced cell death in cortical explant cultures: a role for estrogen receptors. *Brain Res.* 873:235–242, 2000.
181. Woolley C, McEwen BS. Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. *J. Neurosci.* 12:2549–2554, 1992.
182. Teyler TJ, Vardaris RM, Lewis D, Rawitch AB. Gonadal steroids: Effect on excitability of hippocampal pyramidal cells. *Science.* 209:1017–1019, 1980.
183. Foy MR, Xu J, Xie X, Brinton RD, Thompson RF, Berger TW. 17 β -estradiol enhances NMDA receptor-mediated EPSPs and long-term potentiation. *Journal of Neurophysiology.* 81:925–929, 1999.
184. Grover LM, Teyler TJ. Two components of long-term potentiation induced by different patterns of afferent activation. *Nature.* 347:477–479, 1990.
185. Bi GQ, Poo MM. Synaptic modification by correlated activity: Hebb's postulate revisited. *Annual Review of Neuroscience.* 24:139–166, 2001.
186. Callier S, Morissette M, Grandbois M, Pelaprat D, Di Paolo T. Neuroprotective properties of 17 β estradiol, progesterone, and raloxifene in MPTP C57Bl/6 mice. *Synapse.* 41:131–8, 2001.
187. Gonzalez Deniselle MC, Lopez Costa JJ, Gonzales SL, Labombada F, Garay L. Basis of progesterone protection in spinal cord neurodegeneration. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 83:199–209, 2002.
188. Kim H, Bang OY, Jung MW, Ha SD, Hong HS, Huh K, Kim SU, Mook-Jung I. Neuroprotective effects of estrogen against beta-amyloid toxicity are mediated by estrogen receptors in cultured neuronal cells. *Neurosci Lett.* 302:58–62, 2001.
189. Singer CA, Figueroa-Masot XA, Batchelor RH, Dorsa DM. The mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *J Neurosci.* 19:2455–63, 1999.
190. Singh M. Ovarian hormones elicit phosphorylation of Akt and extracellular-signal regulated kinase in explants of the cerebral cortex. *Endocrine.* 14:407–15, 2001.

191. Gu G, Rojo AA, Zee MC, Yu J, Simerly RB. Hormonal regulation of CREB phosphorylation in the anteroventral periventricular nucleus. *J Neurosci.* 16:3035–44, 1996.
192. Lee SJ, Campomanes CR, Sikat PT, Greenfield AT, Allen PB, McEwen BS. Estrogen induces phosphorylation of cyclic AMP response element binding (pCREB) in primary hippocampal cells in a time-dependent manner. *Neuroscience.* 124:549–560, 2004.
193. Wade CB, Dorsa DM. Estrogen activation of cyclic adenosine 5'-monophosphate response element-mediated transcription requires the extracellularly regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology.* 144:832–8, 2003.
194. Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *Experimental Biology.* 9:526–533, 1995.
195. Deng HB, Cui DP, Jiang JM. Inhibiting effects of *Achyranthes bidentata* polysaccharide and *Lycium barbarum* polysaccharide on nonenzyme glycation in D-galactose induced mouse aging model. *Biomed Environ Sci.* 16:267–275, 2003.
196. Xu XH, Zhao TQ. Effects of puerarin on D-galactose-induced memory deficits in mice. *Acta Pharmacologica Sinica.* 23:587–590, 2002.
197. Zhang D, Liu GT, Shi JG. *Coeloglossum viride* var. *bracteatum* extract attenuates D-galactose and NaNO₂ induced memory impairment in mice. *J Ethnopharmacol.* 104:250–256, 2006.
198. Song X, Bao M, Li D. Advanced glycation in D-galactose induced mouse aging model. *Mech Ageing Dev.* 108:239–251, 1999.
199. Sun SW, Yu HQ, Zhang H. Quercetin attenuates spontaneous behavior and spatial memory impairment in D-galactose-treated mice by increasing brain antioxidant capacity. *Nutr Res.* 27:169–175, 2007.
200. Shen YX, Xu SY, Wei W. Melatonin reduces memory changes and neural oxidative damage in mice treated with D-galactose. *J Pineal Res.* 32:173–178, 2002.
201. Kong WJ, Wang Y, Wang Q, Chen CF, Lang SY, Zuo PP. The effect of the mtDNA4834 deletion on hearing. *Biochem Biophys Res Commun.* 344:425–430, 2006.
202. Chen CF, Lang SY, Zuo PP, Yang N, Wang XQ, Xia C. Effects of D-galactose on the expression of hippocampal peripheral-type benzodiazepine receptor and spatial memory performances in rats. *Psychoneuroendocrinology.* 31:805–811, 2006.

203. Holden HM, Rayment I, Thoden JB. Structure and function of enzymes of the Leloir pathway for galactose metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*. 278: 43885–43888, 2003.
204. Wei HF, Li L, Song QJ, Ai HX, Chu J, Li W. Behavioural study of the D-galactose induced aging model in C57BL/6J mice. *Behavioural Brain Research*. 157: 245–251, 2005.
205. Cui X, Zuo P, Zhang Q, Li X, Hu Y, Long J, Packer L, Liu J. Chronic systemic D-galactose exposure induces memory loss, neurodegeneration, and oxidative damage in mice: protective effects of R-alpha-lipoic acid. *Journal of Neuroscience Research*. 83:1584–1590, 2006.
206. J. Lu, Y.L. Zheng, L. Luo, D.M. Wu, D.X. Sun, Y.J. Feng, Quercetin reverses D-galactose induced neurotoxicity in mouse brain, *Behav. Brain Res*. 171 (2006) 251–260.
207. Long J, Wang X, Gao H, Liu Z, Liu C, Miao M, Cui X, Packer L, Liu J. D-Galactose toxicity in mice is associated with mitochondrial dysfunction: protecting effects of mitochondrial nutrient R-alpha-lipoic acid. *Biogerontology*. 8: 373–381, 2007.
208. Li W, Wei F, Fan M, Zhang J, Zhang B, Ma X, Yang W, Wei W. Mimetic brain aging effect induced by D-galactose in mice. *Chin J Pharmacol Toxicol*. 9:93–95, 1995.
209. Tian J, Ishibashi K, Ishibashi K, Reiser K, Grebe R, Biswal S, Gehlbach P, Handa JT. Advanced glycation endproduct-induced aging of the retinal pigment epithelium and choroid: a comprehensive transcriptional response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102:11846–11851, 2005.
210. Kaur J, Sharma D, Singh R. Regional effects of ageing on Na⁺, K⁽⁺⁾-ATPase activity in rat brain and correlation with multiple unit action potentials and lipid peroxidation. *Indian J Biochem Biophys*. 35:364–371, 1998.
211. Hammersen G, Houghton S, Levy HL Rennes-like variant of galactosemia: clinical and biochemical studies. *J Pediatr* 87:50–57, 1991.
212. Ursitti JA, Martin L, Resneck WG, Chaney T, Zielke C, Alger BE, Bloch RJ. Spectrins in developing rat hippocampal cells. *Brain Res Dev Brain Res*. 129:81–93, 2001.
213. Barnes GN, Slevin JT, Vanaman TC. Rat brain protein phosphatase 2A: an enzyme that may regulate autophosphorylated protein kinases. *J Neurochem*. 64:340–353, 1995.

214. Gibson JB. Gonadal function in galactosemics and in galactose-intoxicated animals. *Eur J Pediatr.* 154:14–20, 1995.
215. Reynolds A, Laurie C, Mosley RL, Gendelman HE. Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Int. Rev. Neurobiol.* 82:297–325, 2007.
216. Takuma K, Baba A, Matsuda T. Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Prog. Neurobiol.* 72:111–127, 2004.
217. Kandel ER, Kupfermann I, Iverson S. “Learning and Memory” *Principles of neuroalscience.* Ed. Kandel E, Schwartz JH, Jessell TM. Chp. 62 pp 1227-1245. 4th international edition. McGraw-Hill, 2000.
218. Gold PE, McGaugh JL. A single-trace, two-process view of memory storage process. *Short-term memory*, Academic Press. 1975:355-378, 1975.
219. Goldman-Rakic P. Prefrontal cortical dysfunction in schixophrenia: the relevance of working memory. *Psychopahthology and the brain.* 1992:1-23, 1992.
220. Wang JH, Ko GYP, Kelly PT. Cellular and molecular bases of memory: synaptic and neuronal plasticity. *J. Clin. Neuropyhsiology.* 14:264-293, 1997.
221. Garcia R. Stress hippocampal plasticity, and spatial learning. *Synapse.* 40:180-183, 2001.
222. Hölscher C. Stress impairs performance in spatial water maze learning tasks. *Behavioral Brain Res.* 100: 225-235, 1999.
223. Zhang W, Mundy W, Thai L. Decreased glutamate release correlates with elevated dynorphin content in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. *Hippocampus.* 1:391-398, 1991.
224. Qu ZQ, Zhou Y, Zeng YS, Li Y, Chung P. Pretreatment with *Rhodiola rosea* extract reduces cognitive impairment induced by intracerebroventricular streptozotocin in rats: implication of anti-oxidative and neuroprotective effects. *Biomed Environ Sci.* 22:318-26, 2009.
225. Awasthi H, Tota S, Hanif K, Nath C, Shukla R. Protective effect of curcumin against intracerebral streptozotocin induced impairment in memory and cerebral blood flow. *Life Sci.* 86:87-94, 2009.
226. Levin ED. Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) quenches free radicals and attenuates age-related cognitive decline: opportunities for novel drug development in aging. *Curr Alzheimer Res.* 2:191-6, 2005.

227. King DL, Arendash GW. Behavioral characterization of the Tg2576 transgenic model of Alzheimer's disease through 19 months. *Physiol Behav.* 75:627–642, 2002.
228. Frick KM, Stillner ET, Berger-Sweeney J. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods.* 11:47–60, 2000.
229. Gortz N, Lewejohanna L, Tomma M, Ambre'ea O, Keyvanib K, Paulusb W, Sachser N. Effects of environmental enrichment on exploration, anxiety, and memory in female TgCRND8 Alzheimer mice. *Behavioural Brain Research.* 191:43–48, 2008.
230. Moran PM. Differential effects of scopolamine and mecamylamine on working and reference memory in the rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 45:533–538, 1993.
231. Deacon RM, Bannerman DM, Kirby BP, Croucher A, Rawlins JN. Effects of cytotoxic hippocampal lesions in mice on a cognitive test battery. *Behav Brain Res.* 133:57–68, 2002.
232. Dellu F, Fauchey V, Le Moal M, Simon H. Extension of a new two-trial memory task in the rat: Influence of environmental context on recognition processes. *Neurobiol Learning Memory.* 67:112–120, 1997.
233. Choy KC, Visser Y, Nancy R. Buuse N, Buuse M. Combined Neonatal Stress and Young-Adult Glucocorticoid Stimulation in Rats Reduce BDNF Expression in Hippocampus: Effects on Learning and Memory. *Hipokampus.* 18:655–667, 2008.
234. Wang GH. The relation between 'spontaneous' activity and the oestrous cycle in the white rat. *Comparative Psychology Monographs.* 2:1-27, 1923.
235. Braszko JJ, Wisniewski K, Kupryszewski G, Witczuk B. Psychotropic effects of angiotensin II and III In rats: locomotor and exploratory vs. cognitive behaviour. *Behav. Brain Res.* 25:195–203, 1987.
236. Berry A, Tomidokoro Y, Ghiso J, Thornton J. Human chorionic gonadotropin (a luteinizing hormone homologue) decreases spatial memory and increases brain amyloid- β levels in female rats. *Hormones and Behavior.* 54:143-152, 2008.
237. Wasowicz W, Jean N, Peratz A. Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum. Importance of extraction pH and influence of sample, preservation and storage. *Clin. Chem.* 39:2522-2526, 1993.

238. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254, 1976.
239. Wei H, Cai Y, Chu J, Li C, Li L. Temporal Gene Expression Profile in Hippocampus of Mice Treated with D-galactose. *Cell Mol Neurobiol.* 28:781–794, 2008.
240. Cegelski L, Rice CV, O'Connor RD, Caruano AL, Tochtrop GP, Cai, ZY, Covey DF, Schaefer J. Mapping the locations of estradiol and potent neuroprotective analogues in phospholipid bilayers by REDOR NMR. *Drug Dev. Res.* 66:93–102, 2006.
241. Pedersen WA, McMillan PJ, Kulstad J, Leverenz JB, Craft S, Haynatzki GR. Rosiglitazone attenuates learning and memory deficits in Tg2576 Alzheimer mice. *Experimental Neurology.* 199:265–273, 2006.
242. Zaheer A, Zaheer S, Thangavel R, Wu Y, Sahu SK, Yang B. Glia maturation factor modulates β -amyloid-induced glial activation, inflammatory cytokine/chemokine production and neuronal damage. *Brain research.* 12:192 – 203, 2008.
243. Wright RL, Lightner EN, Harman JS, Meijer OC, Conrad CD. Attenuating corticosterone levels on the day of memory assessment prevents chronic stress-induced impairments in spatial memory. *European Journal of Neuroscience.* 24:595–605, 2006.
244. Wright RL, Conrad CD. Enriched environment prevents chronic stress-induced spatial learning and memory deficits. *Behavioural Brain Research.* 187:41–47, 2008.
245. Holcomb LA, Dhanasekaran M, Hitt AR, Young KA, Riggs M, Manyam BV. Bacopa monniera extract reduces amyloid levels in PSAPP mice. *Journal of Alzheimer's Disease.* 9:243–251, 2006.
246. Crouch PJ, Hung LW, Adlar PA, Cortes M, Lal V, Filiz G, Pereza KA, Nurjono M, Caragounisa A, Dua T, Laughton K, Volitakis I, Bush AI, Li Q, Masters CL, Cappai R, Cherny RA, Donnelly PS, White AR, Barnham KJ. Increasing Cu bioavailability inhibits A β oligomers and tau phosphorylation. *PNAS.* 106:381–386, 2009.

ÖZGEÇMİŞ

Deniz KANTAR, 1979 yılında Bursa’da doğdu, ilk öğrenimini Ankara’da orta ve lise öğrenimini Antalya’da tamamladı. 1998 yılında Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Fizik Mühendisliği Bölümü’nde üniversite eğitime başladı. Lisans diplomasını 2005 yılında aldı ve 2007 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans eğitime başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı’nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır. Yabancı dili İngilizce’dir.