



**İN VİTRO ALZHEİMER HASTALIK MODELİNDE
SODYUM VE POTASYUM'LU BİLEŞİKLERİN NÖRON
KORUYUCU ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Yasemin SEVİM

**Doktora Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Dr. Örg. Üyesi Mehmet Enes ARSLAN**

2023

Her hakkı saklıdır.



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZİ**

**İN VİTRO ALZHEİMER HASTALIK MODELİNDE SODYUM VE
POTASYUM'LU BİLEŞİKLERİN NÖRON KORUYUCU ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Yasemin SEVİM

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Enes ARSLAN

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Erzurum

2022

Her hakkı saklıdır

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

19 / 01 / 2023

Yasemin SEVİM

ÖZET

DOKTORA TEZİ

İN VİTRO ALZHEİMER HASTALIK MODELİNDE SODYUM VE POTASYUM'LU BİLEŞİKLERİN NÖRON KORUYUCU ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Yasemin SEVİM

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Enes ARSLAN

Alzheimer hastalığı, hafızayı ve düşünme becerilerini ve nihayetinde en basit görevleri yerine getirme yeteneğini yavaş yavaş yok eden nörodejeneratif bir hastalıktır. Bu çalışmamızda, İnsan nöroblastoma hücre hattı (SH-SY5Y) retinoik asit uygulanmasıyla nöron benzeri hücrelere dönüştürülmüştür. Dönüşen hücreler Alzheimer benzeri ortam oluşturmak amacı ile H₂O₂ geniş doz aralıklarıyla uygulandı (0-200 µM) ve H₂O₂'nin IC50 değeri MTT canlılık testiyle analiz edilmiştir. Sonuç olarak elde edilen IC50 değeri kültürlerine uygulanarak aday moleküllerin koruyucu etkileri incelendi. Sitotoksik çalışmaları gerçekleştirilmiş olan 9 adet sodyum/potasyum bazlı bileşiklerden Sodyum Hidrojen Fosfat, Sodyum Sitrat Tirbazik Dihidrat, Sodyum Hidrojen Karbonat, Sodyum Fosfat Dibazik ve Potasyum Tartarat moleküllerinin belirli dozlarda toksisiteye neden olmadığı bu yüzden nöron koruyucu özellikleri Alzheimer hastalığı modelinde denenebileceği belirlendi. Yapılan çalışma sonucunda, Bu moleküller arasında sodyum hidrojen fosfat, sodyum hidrojen karbonat, sodyum sitrat tribazik dihidrat ve potasyum tartarat moleküllerinin µg/ml konsantrasyon seviyesinde de hücre canlılığını H₂O₂ uygulanmasına kıyasla önemli seviyelerde artırdığı tespit edilmiştir. Ardında hücre hattındaki toksisitenin yol açtığı apoptoz /nekrozları belirlemek amacıyla Annexin-V/PI incelemesi flov sitometri yöntemi kullanılmıştır. Hücre hattında ki apoptoz ve çekirdek integritisi, Hoechst 33258 floresan boyama metodu kullanılarak mikroskop altında incelenmiştir. Son olarak, seçilen sodyum ve potasyumlu bileşiklerin asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesi, toplam antioksidan kapasite (TAK) ve toplam oksidatif durum (TOD) seviyeleri üzerine olan etkileri belirlenmiştir. Sonuçlara göre, seçilen bileşiklerin kastrasyonlarının H₂O₂ karşı koruyucu etkileri hücre canlılık testleriyle gösterilmiştir. Seçilen bileşiklerin hücrelerde gerçekleşen nekroz ölümlerinde önemli ölçüde düşüşe neden olduğu flov sitometri sonuçlarıyla gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar ışığında seçilen bileşiklerin uygulamalarının AchE aktivitesinde ve TOD seviyesinde azalmaya ve TAK seviyesinde artışa neden olduğu gözlenmiştir. Bulgularımız, seçilen bileşiklerin anti-Alzheimer aktivitesini ortaya koymuştur.

2023, 68 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Alzheimer Hastalığı, Sitotoksosite, Nekroz, Nöroprotektif etki

ABSTRACT

Ph.D

IN VITRO EVALUATION OF NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF SODIUM AND POTASSIUM COMPOUNDS AGAINST ALZHEIMER MODEL

Yasemin SEVİM

Erzurum Technical University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Mehmet Enes ARSLAN

Alzheimer's Disease, which is one of the most common causes of dementia, is a neurodegenerative disease that gradually destroys memory and thinking skills. Our study, the human neuroblastoma cell line was transformed into mature neuron-like structures by application of retinoic acid. Transformed cells were administered with H₂O₂ at specified dose intervals (0-200 µM) to stimulate an AD-like environment and the IC₅₀ value of H₂O₂ was determined by using MTT viability test. It was determined that under specific doses of citrate tribasic dihydrate, sodium hydrogen carbonate, sodium phosphate dibasic and potassium tartrate molecules did not cause toxicity, so their neuroprotective properties could be tested in AD model. Among these molecules were found to significantly increase cell viability at µg/ml concentration levels compared to H₂O₂ application. Flow cytometry method was used to observe apoptosis/necrosis caused by H₂O₂ toxicity. Cell death mechanisms and cellular nuclear integrities were examined using Hoechst 33258 fluorescent staining method under a light microscope. The effects of selected sodium and potassium compounds on AChE, TAS and TOS level are investigated. The protective effects of the castrations of the selected compounds against H₂O₂ were demonstrated by MTT tests. Flow cytometry results showed that the selected compounds significantly reduced the necrotic cell deaths. It has been shown that the applications of the selected compounds cause a significant decrease in AChE activity and TOS level, and an increase in TAS level. In the light of our findings, candidate molecules from sodium and potassium-based molecules exhibited neuroprotective effect on the experimental AD model.

2023, 68 page

Keywords: Alzheimer's Disease, Cytotoxicity, Necrosis, Neuroprotective effect

TEŞEKKÜR

Bu tez alıŐması Erzurum Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Laboratuvarlarında yapılmıştır. Tez süreci boyunca desteğini esirgemeyen değerli danıŐmanım Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Enes ARSLAN'a sonsuz teŐekkürü bir borç bilirim. Tez çalıŐmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Sena ÖNER'e sonsuz teşekkür ederim. Zorlu süreçlerde bile desteğini esirgemeyen ve ne zaman zorlansam hep yanımda olan sevgili eŐim Erdoğan SEVİM'e ve manevi olarak beni yalnız bırakmayan değerli oğlum Kuzey SEVİM'e hayatımda oldukları için minnettirim. Tüm hayatım boyunca desteklerini üzerimde hissettiğim beni benden çok düşünen değerli annem Fatma KÖKSAL ve babam Haydar KÖKSAL'a teŐekkürü bir borç bilirim.

Yasemin SEVİM
Ocak 2023

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Alzheimer Hastalığı Tarihçesi.....	1
1.2. Alzheimer Hastalığı.....	2
1.3. Alzheimer Hastalığı'nın Epidemiyolojisi.....	3
1.4. Alzheimer Hastalığının Histopatolojisi.....	4
1.4.1. Amiloid plak oluşumu.....	4
1.4.2. Nörofibril yumaklar.....	5
1.5. Alzheimer Hastalığında Risk Faktörleri.....	7
1.5.1. Yaş.....	7
1.5.2. Genetik.....	7
1.5.3. Serebrovasküler hastalıklar.....	9
1.5.4. Tip 2 diyabet.....	9
1.5.5. Hipertansiyon.....	10
1.5.6. Dislipidemi.....	10
1.5.7. Sigara tüketimi.....	10
1.6. Alzheimer Hastalığının Teşhis ve Tedavisi.....	11
1.6.1. Alzheimer hastalığının teşhisi.....	11
1.6.2. Alzheimer hastalığının tedavisi.....	15
1.7. Voltaj Kaplı İyon Kanalları.....	16
1.7.1. Voltaj kaplı sodyum kanalları.....	16
1.7.2. Voltaj kaplı potasyum kanalları.....	19
1.7.3. Voltaj kaplı kalsiyum kanalı.....	21
1.8. Alzheimer Hastalığının Etiyolojisinde Hidrojen Peroksitin Rolü.....	25

2. KAYNAK ÖZETLERİ	27
3. MATERYAL ve YÖNTEM	30
3.1. Materyaller	30
3.2. Yöntem.....	31
3.2.1. Hücre kültürü ve nöronal farklılaşma	31
3.2.2. Hüresel AH toksisite modeli	32
3.2.3. Hoechst boyama	32
3.2.4. Hücre canlılığı analizi	33
3.2.5. Asetilkolinesteraz (AChE) aktivite testi.....	33
3.2.6. Toplam antioksidan durumu (TAS) ve toplam oksidan durumu (TOS) analizleri	33
3.2.7. Flow sitometri analizi.....	34
3.2.8. İstatistiksel analiz	34
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	35
4.1. SH-SY5Y hücre hatının normal nöron hücrelerine dönüştürülmesi.....	35
4.2. H ₂ O ₂ Uygulamasına Karşı Hücre Canlılığı Testi	35
4.3. Sodyum ve Potasyumlu Bileşiklere Hücre Canlılığı Testi.....	36
4.4. <i>İn Vitro</i> AH Modelinde Sodyum ve Potasyumlu Bileşiklerin Uygulamasının Hoechst 33258 Floresan Boyama Sonuçları	38
4.5. <i>İn Vitro</i> AH Modelinde Sodyum Hidrojen Fosfat'ın Nöron Koruyucu Etkileri.....	40
4.6. In Vitro AH Modelinde Sodyum Hidrojen Fosfat Mumelesinin Flov Sitometrik Sonuçları	40
4.7. <i>İn Vitro</i> AH Modelinde Sodyum Hidrojen Fosfat Muamelesi Sonucunda Toplam Antioksidan Seviyeleri (TAS)/Toplam Oksidatif Stres (TOS) Seviyeleri Ve Asetilkolinesteraz Aktivitesi Üzerine Etkileri	41
4.8. <i>İn Vitro</i> AD Modelinde Sodyum Sitrat Tribazik Dihidrat'ın Nöron Koruyucu Etkileri.....	43
4.9. In Vitro AH Modelinde Sodyum Sitrat Tribazik Dihidrat Muamelesinin Flov Sitometrik Sonuçları	43
4.10. <i>İn Vitro</i> AH Modelinde Sodyum Sitrat Tribazik Dihidrat Muamelesi Sonucunda Toplam Antioksidan Seviyeleri (TAS)/Toplam Oksidatif Stres (TOS) Seviyeleri ve Asetilkolinesteraz Aktivitesi Üzerine Etkileri.....	44
4.11. <i>İn Vitro</i> AD Modelinde Sodyum Fosfat Dibazik'in Nöron Koruyucu Etkileri	46

4.12. <i>İn Vitro</i> AD Modelinde Sodyum Hidrojen Karbonat Nöron Koruyucu Etkileri ...	46
4.13. <i>In Vitro</i> AH Modelinde Sodyum Hidrojen Karbonat Muamelesinin Flov Sitometrik Sonuçları	47
4.14. <i>İn Vitro</i> AH Modelinde Sodyum Hidrojen Karbonat Muamelesi Sonucunda Toplam Antioksidan Seviyeleri (TAS)/Toplam Oksidatif Stres (TOS) Seviyeleri Ve Asetilkolinesteraz Aktivitesi Üzerine Etkileri	48
4.15. <i>İn Vitro</i> AD Modelinde Potasyum Tartarat'ın Nöron Koruyucu Etkileri.....	49
4.16. <i>In Vitro</i> AH Modelinde Potasyum Tartarat Muamelesinin Flov Sitometrik Sonuçları.....	50
4.17. <i>İn Vitro</i> AH Modelinde Potasyum Tartarat Muamelesi Sonucunda Toplam Antioksidan Seviyesi (TAS)/Toplam Oksidatif Stres (TOS) Seviyeleri ve Asetilkolinesteraz Aktivitesi Üzerine Etkileri.....	51
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	53
KAYNAKLAR	57

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler Açıklama

°	Derece
%	Yüzde konsantrasyon
µ g	Mikrogram
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre

Kısaltmalar

AChE	Asetilkolin Esteraz Enzimi
AH	Alzheimer Hastalığı
APP	Amiloid Öncü Protein
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
HBB	Hafif Bilişsel Bozukluk
NFT	Nörofibril Yumaklar
ROS	Reaktif oksijen türleri
TAS	Toplam Antioksidan Kapasite
TOS	Toplam Oksidatif Stres
βA	Beta Amiloid
PET	Pozitron Emisyon Tomografisi
VKSK	Voltaj Kaplı Sodyum Kanalkı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Alois Alzheimer tarafından 1911 yılında çizilen erken ve geç dönem nörofibriler yumaklar.(Stelzmann et al. 1995).....	1
Şekil 1.2. (A) Alzheimer hastalığının iki ayırt edici özelliği, AD beyindeki amiloid plaklar (ok başı) ve nörofibriler yumaklar (oklar) (Nixon et al. 2005).....	3
Şekil 1.3. Amiloid Prekürsör protein (APP)'nin proteolitik kesimi (Yuan et al. 2013).....	5
Şekil 1.4. Nörofibril yumak oluşumu (Barron et al. 2017).....	6
Şekil 1.5. Tau ve A β PET görüntüleri. CDR, klinik demans derecelendirmesi; SUVR, standartlaştırılmış alım değeri oranı Bilişsel olarak sağlıklı kontrollerde (üst-CDR0) ve AD hastalarında (alt-CDR>0) (Brier et al. 2016).....	14
Şekil 1.6 AH hastalarının fraksiyonel anizotropi artışını (mavi-mor skala) sağlıklı kontroller (kırmızı-sarı skala) ile karşılaştıran difüzyon tensör görüntüsü (Douaud et al. 2011).....	15
Şekil 1.7. Voltaj kaplı sodyum kanalları (Katzung BG et al. 2006).....	17
Şekil 1.8. Voltaj kaplı potasyum kanalı (Liu et al. 2014).....	20
Şekil 1.9. Voltaj kaplı kalsiyum kanalı (Simms and Zamponi 2014).	22
Şekil 1.10. Sodyum / kalsiyum değiştiriciler (Annunziato et al. 2004).....	24
Şekil 4.1. Farklılaşmamış ve farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinin morfolojik yapıları. A- RA içermeyen hücre kültürü, B- 10 mM RA uygulanmış hücre kültürü	35
Şekil 4.2. Dönüştürölmüş SHSY-5Y hücre kültürüne H ₂ O ₂ 24 saat uygulaması ile hücre canlılığı analizi	36
Şekil 4.3. Sodyum içrikli bileşiklerin SH-SY5Y hücre kültüründe sitotoksik özelliklerinin MTT canlılık testiyle belirlenmesi.....	37
Şekil 4.4. Sodyum içrikli bileşiklerin SH-SY5Y hücre kültüründe sitotoksik özelliklerinin MTT canlılık testiyle belirlenmesi.....	37
Şekil 4.5. Potasyum içrikli bileşiklerin SH-SY5Y hücre kültüründe sitotoksik özelliklerinin MTT canlılık testiyle belirlenmesi.....	38

Şekil 4.6. A:Negatif kontrol, B:Sodyum hidrojen fosfat, C:Sodyum sitrat tribazik dihidrat, D: Sodyum hidrojen karbonat, E:Sodyum fosfat dibazik, F: Potasyum tartarat.....	39
Şekil 4.7. Sodyum hidrojen karbonat molekülünün deneysel alzheimer hastalığı modelinde nöron korucu etkilerinin MTT hücre canlılık testiyle belirlenmesi	40
Şekil 4.8. Hücre ölümünü araştırmak için annexin V-FITC apoptosis Kit (Abcam [®] , BioVision, UK) analizi yapılmıştır. A- 24 saat süresince sadece SH-SY5Y hücreleri B- 24 saat süresince sadece H ₂ O ₂ (100 uM) içeren hücre kültürü C- 24 saat süresince H ₂ O ₂ (100 uM) + sodyum hidrojen fosfat (12,5 µg / ml).....	41
Şekil 4.9. Sodyum sitrat tribazik dihidrat molekülünün deneysel Alzheimer hastalığı modelinde nöron korucu etkilerinin MTT hücre canlılık testiyle belirlenmesi	43
Şekil 4.10. Hücre ölümünü araştırmak için annexin V-FITC apoptosis kit (Abcam [®] , BioVision, UK) analizi yapılmıştır. A- 24 saat süresince sadece SH-SY5Y hücreleri B- 24 saat süresince sadece H ₂ O ₂ (100 uM) içeren hücre kültürü C- 24 saat süresince H ₂ O ₂ (100 uM) + Sodyum Sitrat Tribazik (12,5 µg / ml).....	44
Şekil 4.11. Sodyum fosfat dibazik molekülünün deneysel alzheimer hastalığı modelinde nöron korucu etkilerinin MTT hücre canlılık testiyle belirlenmesi	46
Şekil 4.12. Sodyum hidrojen karbonat molekülünün deneysel alzheimer hastalığı modelinde nöron korucu etkilerinin MTT hücre canlılık testiyle belirlenmesi	47
Şekil 4.13. Hücre ölümünü araştırmak için annexin V-FITC apoptosis Kit (Abcam [®] , BioVision, UK) analizi yapılmıştır. A- 24 saat süresince sadece SH-SY5Y hücreleri B- 24 saat süresince sadece H ₂ O ₂ (100 uM) içeren hücre kültürü C- 24 saat süresince H ₂ O ₂ (100 uM) + sodyum hidrojen karbonat (12,5 µg/ml).....	48
Şekil 4.14. Potasyum tartarat molekülünün deneysel alzheimer hastalığı modelinde nöron korucu etkilerinin MTT hücre canlılık testiyle belirlenmesi	50

Şekil 4.15. Hücre ölümünü araştırmak için annexin V-FITC apoptosis kit (Abcam[®], biovision, UK) analizi yapılmıştır. A- 24 saat süresince sadece SH-SY5Y hücreleri B- 24 saat süresince sadece H₂O₂ (100 uM) içeren hücre kültürü C- 24 saat süresince H₂O₂ (100 uM) + Potasyum Tartarat (12,5 µg / ml..... 51



ÇİZELGELER DİZİNİ

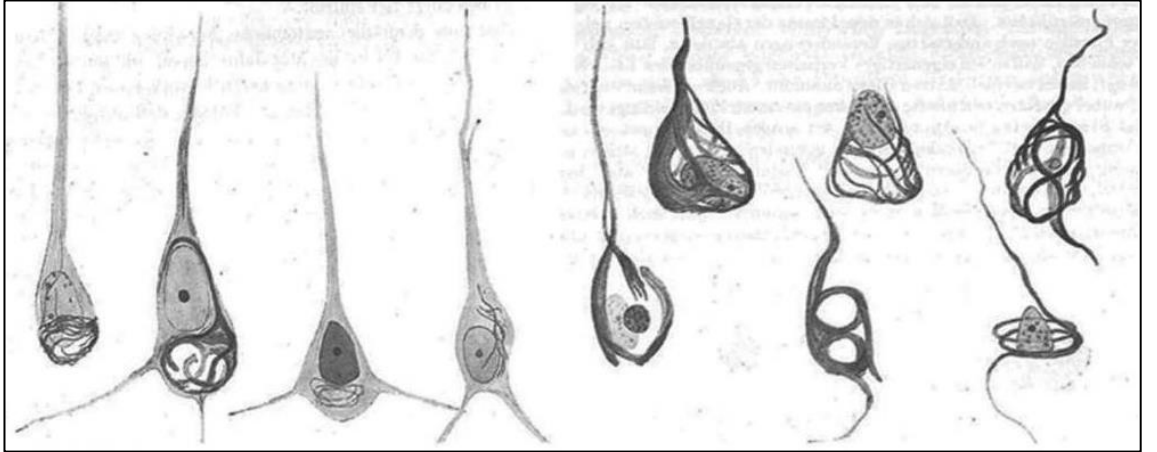
Tablo 1.1. Memeli hücrelerine ait VKSK α ve β alt birim izoformları, bu proteinlerin kodlayıcı genleri.....	19
Tablo 3.1. Araştırmada kullanılan kit ve kimyasal listesi	30
Tablo 3.2. Araştırmada kullanılan cihaz listesi	31
Tablo 4.1. Potasyum ve sodyum içerikli bileşiklerin uygulanmasından sonra mikronükleus, loblu ve çentikli çekirdek anomali sayıları	39
Tablo 4.2 Sodyum hidrojen fosfat 24 saat tedavi edilen deneysel bir in vitro nörodejeneratif hastalık modelinde toplam antioksidan durumu (TAS) ve toplam oksidan durumu (TOS) seviyeleri. Çoklu karşılaştırma için one-way ANOVA, dunnett testleri kullanıldı. Aynı sütundaki farklı harfler, her bir değerden istatistiksel anlamlılık gösterir, $p < 0,05$	42
Tablo 4.3. 24 saat boyunca sodyum hidrojen fosfat uygulamalarına göre in vitro nörodejeneratif hastalık modelinin asetilkolinesteraz aktivitesi (mu/ml). çoklu karşılaştırma için one-way ANOVA, dunnett testleri kullanıldı. Aynı sütundaki farklı harfler, her bir değerden istatistiksel anlamlılık gösterir, $p < 0,05$	42
Tablo 4.4. Sodyum Sitrat tirbazik dihidrat 24 saat tedavi edilen deneysel bir in vitro nörodejeneratif hastalık modelinde toplam antioksidan durumu (TAS) ve toplam oksidan durumu (TOS) seviyeleri. Çoklu karşılaştırma için one-way ANOVA, dunnett testleri kullanıldı. Aynı sütundaki farklı harfler, her bir değerden istatistiksel anlamlılık gösterir, $p < 0,05$	45
Tablo 4.5. Sodyum sitrat tirbazik 24 saat boyunca uygulamalarına göre in vitro nörodejeneratif hastalık modelinin Asetilkolinesteraz Aktivitesi (mu/ml). Çoklu karşılaştırma için one-way ANOVA, dunnett testleri kullanıldı. aynı sütundaki farklı harfler, her bir değerden istatistiksel anlamlılık gösterir, $p < 0,05$	45
Tablo 4.6. Sodyum hidrojen karbonat 24 saat tedavi edilen deneysel bir in vitro nörodejeneratif hastalık modelinde toplam antioksidan durumu (TAS) ve toplam oksidan durumu (TOS) seviyeleri. Çoklu karşılaştırma için one-way ANOVA, dunnett testleri kullanıldı. Aynı sütundaki farklı harfler, her bir değerden istatistiksel anlamlılık gösterir, $p < 0,05$	49

- Tablo 4.7.** Sodyum hidrojen karbonat 24 saat boyunca sodyum hidrojen fosfat uygulamalarına göre in vitro nörodejeneratif hastalık modelinin asetilkolinesteraz Aktivitesi (mu/ml). Çoklu karşılaştırma için one-way ANOVA, dunnett testleri kullanıldı. Aynı sütundaki farklı harfler, her bir değerden istatistiksel anlamlılık gösterir, $p < 0,05$49
- Tablo 4.8.** Potasyum tartarat 24 saat tedavi edilen deneysel bir in vitro nörodejeneratif hastalık modelinde toplam antioksidan durumu (TAS) ve toplam oksidan durumu (TOS) seviyeleri. Çoklu karşılaştırma için one-way ANOVA, dunnett testleri kullanıldı. Aynı sütundaki farklı harfler, her bir değerden istatistiksel anlamlılık gösterir, $p < 0,05$ 52
- Tablo 4.9.** Sodyum hidrojen karbonat 24 saat boyunca Sodyum hidrojen fosfat uygulamalarına göre in vitro nörodejeneratif hastalık modelinin Asetilkolinesteraz Aktivitesi (mu/ml). Çoklu karşılaştırma için one-way ANOVA, dunnett testleri kullanıldı. Aynı sütundaki farklı harfler, her bir değerden istatistiksel anlamlılık gösterir,.....52

1. GİRİŞ

1.1. Alzheimer Hastalığı Tarihçesi

Alzheimer Hastalığı yaklaşık 100 yıldan önce tanımlandı fakat demansın en yaygın nedeni ve önemli ölüm nedenlerinden biri olduğu 70 yıldır bilinmektedir. Alois Alzheimer, 1901 yılında Deter adında 51 yaşında davranış problemleri ve unutkanlığı olan bir hastanın tedavisini üstlenmiştir. Kadın hastada; sanrılar, şiddetli hafıza kaybı, yönelim bozukluğu, dil eksiklikleri ve davranış bozuklukları semptomları nedeniyle Frankfurt'ta hastaneye kaldırılır. Auguste Deter'in ölümünden sonra hastanın beyninde yapmış olduğu otopside atrofik bir beyin görüldüğünü, mikroskopik beyin incelemesinde ise nöron kaybına eşik eden senil plaklar, nörofibriler yumakların varlığını bildirmiştir (Stelzmann et al. 1995). AH Oskar Fischer, Francesco Bonfiglio ve Graetano Perusini tarafından tanımlanmıştır (Lage 2006). Alois Alzheimer ilk olarak tanımlanan bir hastalığın vakası yayımladı ve bunu "presenile dementia" (presenil demans) olarak adlandırdı; bu hastalık daha sonra 1910 yılında Emil Kraepelin psikiyatri kitabında ilk defa Alzheimer hastalığı olarak isimlendirildi.



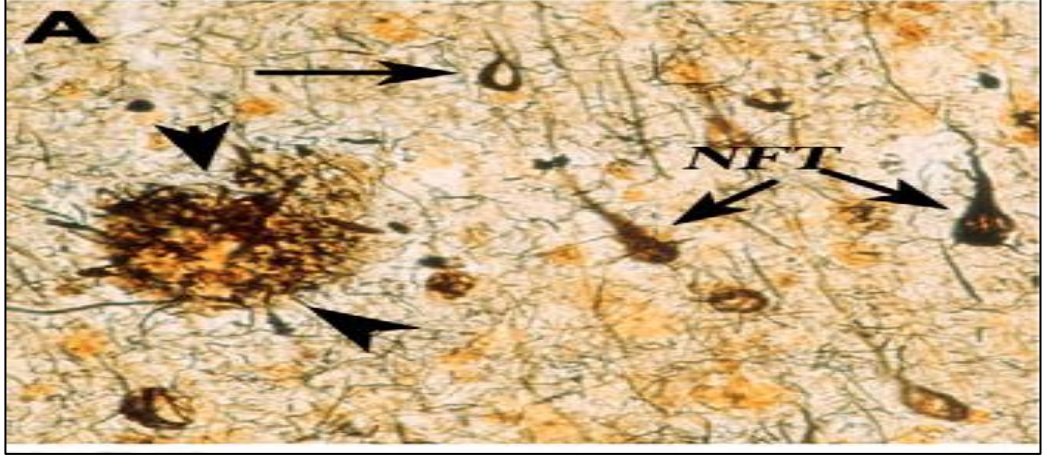
Şekil 1.1. Alois Alzheimer tarafından 1911 yılında çizilen erken ve geç dönem nörofibriler yumaklar.(Stelzmann et al. 1995).

Elektron mikroskopunun keşfiyle 1960'lı yıllarda Alzheimer'ın belirttiği NFY'ler ve plaklar görüntüledikten sonra bu konuda çalışmalar artmıştır. 1960'lı yılların sonlarına kadar AH demansa bağlı bir hastalık olarak düşülmekteydi daha sonra el yapılan çalışmalarda SP, NFT ve bilişsel zayıflama arasında bağlantı olduğu gösterilmiştir (Lage

2006). Yapılan diğer çalışmalarda AH demansın farklı olduğunu ve bu hastalığın kalıtsal çeşitlerinde tanımlanamayan mutasyonların bulunduğu göstermişlerdir (Tanzi et al. 1996). AH tanımlandıktan sonra 50 yıl boyunca patolojik değişikliklerle ilgili büyük bir gelişme olmadı fakat; elektron mikroskopunun keşfiyle 1960'lı yıllarda NFY ve SP'lerin görüntülenmesiyle AH olan ilgi ve çalışmalar artmıştır (Berchtold and Cotman 1998). 1976 yılına gelindiğinde Robert Katzman'ın epidemiyolojik verilere bakarak senil ve presenil AH histopatolojik olarak benzer olduğunu gösteren çalışmasında aynı zamanda bu çalışmada AH'nın yaşlılar için ölüm nedenleri arasında dördüncü sırada olduğunu önermesiyle AH bakış açısı değişmiştir. AH demansın nadir görülen türü olmaktan çıkarmış büyük bir sağlık sorunu olduğunu olarak kabul gördü ve AH araştırmak amacıyla Ulusal Alzheimer Hastalığı Araştırma Merkezleri kuruldu (Boller and Forette 1989).

1.2. Alzheimer Hastalığı

Demans, bireylerin günlük faaliyetlerini gerçekleştirme yeteneğini etkileyen; hafıza, dil, problem çözme ve diğer bilişsel becerilerdeki düşüş ile karakterize edilen bir rahatsızlıktır. Alzheimer hastalığı, genellikle hafif bilişsel bozukluk ile başlayan ve yavaş yavaş daha şiddetli hale gelip kişiyi fonksiyon göremez hale getiren demans ile karakterize edilen hastalıktır. Diğer görülen sık bulgular arasında konfüzyon, zayıf muhakeme, dil zorlukları, görsel şikayetler, ajitasyon, içe kapanma ve halüsinasyonlar bulunmaktadır (Bekris et al. 2010). Yapılan çalışmaların ışığında AH'nin birçok risk faktörüne bağlı olarak ortaya çıkabileceğini belirtmektedir. AH için en önemli bireysel bir risk faktörü yaştır, ortalama yaş ömrünün uzamasıyla birlikte AH insidansı da artmıştır. AH artması ile AH hastalığına bağlı bakım ve tedavi maliyetleri de artmıştır. Alzheimer hastalığı, nöron ve sinaps kaybına neden olan, bilişsel işlev kaybının yanı sıra beyin dokusunda A β plakların ve NFY yumakların oluşumu bunların patolojik birikimleriyle karakterize edilen nörodejeneratif bir hastalıktır (Lashley et al. 2018; Halawany et al. 2017).



Şekil 1.2. (A) Alzheimer hastalığının iki ayırt edici özelliği, AD beyindeki amiloid plaklar (ok başı) ve nörofibriler yumaklar (oklar) (Nixon et al. 2005).

1.3. Alzheimer Hastalığının Epidemiyolojisi

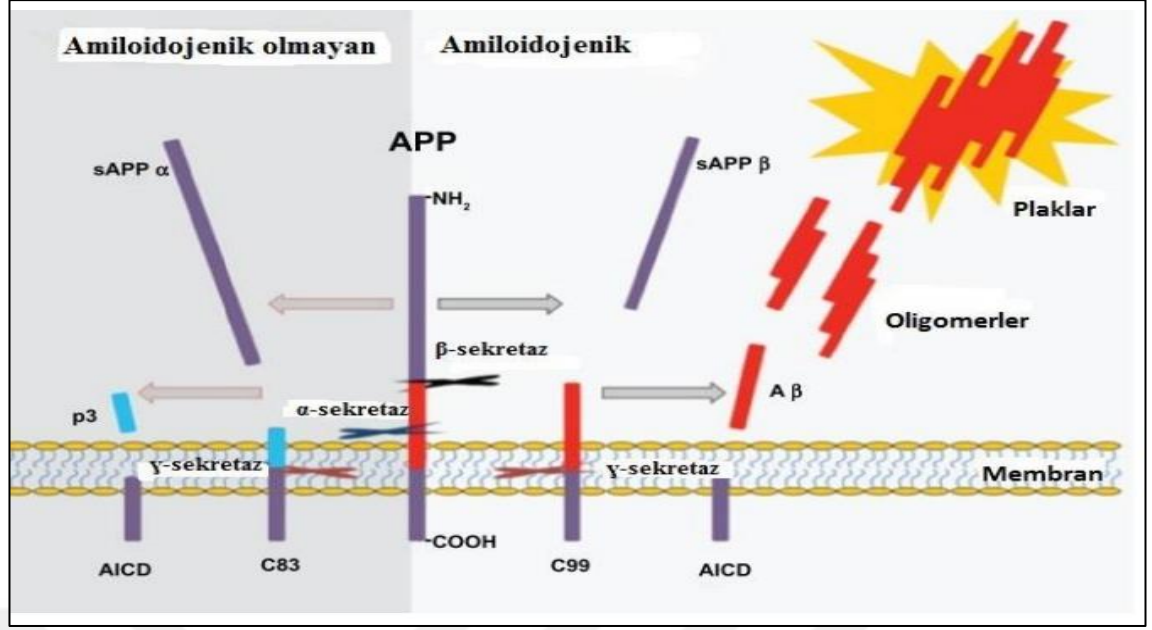
Günümüzde 65 yaş üstü 9 kişiden bir tanesi AH iken 85 yaş üstü kişiler de bu oran her 3 kişiden biri AH ile mücadele etmektedir. Yaşlanma AH için en önemli risk faktörü olarak bildirilse de erken yaşlarda başlayan AH vakaları tüm vakaların %5 'ini temsil etmektedir. 60 yaş altı vakalarda erken başlangıçlı AH olarak bildirilmektedir. Demans vakalarının yarısından fazlasını AH vakaları oluşturulduğu düşünülürse AH'nın doğrudan ve dolaylı olarak toplumun geneli üzerinde ciddi maliyet oluşturmaktadır. Uluslararası Alzheimer Hastalığı Derneği'nin 2018 yılında yayınladığı rapora göre; dünya üzerinde yaklaşık 50 milyon Alzheimer hastası eğer tedavi ve önleme konusunda büyük bir gelişme olmazsa 2030 yılında 82 milyona, 2050'de 152 milyona yükselmesi beklenmektedir (Anonymous 2018). Ülkemizdeki durum ise; TÜİK'in açıkladığı ölüm ve ölüm nedeni istatistiklerine göre, Alzheimer hastalığından hayatını kaybeden yaşlıların sayısı, 2015 yılında 12 bin 59 iken 2019 yılında 13 bin 498'e yükseldi. Alzheimer hastalığından ölen yaşlıların oranı 2015 yılında %4,3 iken bu oran 2019 yılında da değişmediği gözlemlenmiştir. Alzheimer hastalığından ölen yaşlıların oranı cinsiyete göre incelendiğinde, erkeklerde azalış, kadınlarda artış olduğu görüldü. Alzheimer hastalığından ölen yaşlıların oranı 2015 yılında erkeklerde %3,4, kadınlarda %5,2 iken bu oranlar 2019 yılında erkeklerde %3,2'ye düşerken, kadınlarda %5,4'e yükseldi (Anonim 2015).

1.4. Alzheimer Hastalığının Histopatolojisi

AH'nın histopatolojisinde önemli rol oynayan beyinde amigdala, hipokampus ve neokortekste SP ve nörofibriler yumak (NFY) oluşumu, sinaps, nöron kaybı ve beyinde belirgin bir atrofi de sık gözlenen bulgular arasındadır. Patolojik olarak AH, kolinerjik nöron kaybı, APP'nin anormal işlenmesine dayalı olarak A β proteininin hücre dışı birikimi, hiperfosforile tau proteinin hücre içi NFY oluşumu, glikoz kaybı ile karakterizedir. Buna ek olarak; hücre dışı A β 'nin birikmesi ve NFY'lerin hücre içi birikmesi bağlı oksidatif stres, eksitotoksikite, nöroinflamasyon ve nörotransmitter eksikliklerinde önemli rol oynamaktadır (Kumar et al. 2018).

1.4.1. Amiloid plak oluşumu

Amiloid öncü proteini (APP), birçok dokuda eksprese edilen ve Alzheimer hastalığının patogenizde merkezi bir rol oynayan nöronların sinapslarında eksprese edilen bütünlüleyici bir zar proteinidir. Transmembran proteini olan APP, büyük bir hücre dışı glikosile edilmiş N-terminali ve daha kısa bir sitoplazmik C-terminali kısımlarından oluşur (Coulson et al. 2000). APP, hücre yüzey reseptör görevi sinaps oluşumu nöral plastisite, anti mikrobiyal aktivite ve demir taşınmasının düzenlenmesinde rol oynar (Duce et al. 2010). APP 37 ila 49 amino asit kalıntısı peptit üretmek için β -sekretazlar ve γ -sekretazlar tarafından kesilen bilinen en iyi öncü moleküldür. İnsan APP'si iki alternatif yolla işlenebilir: amiloidojenik ve amiloidojenik olmayan yol (Nunan and Small 2000). APP ilk önce α -sekretaz (amiloidojenik olmayan yol) veya β -sekretaz (amiloidojenik yol) tarafından bölünerek membrana bağlı α - veya β -C terminal fragmanları (CTF'ler) oluşturur. APP'nin α -sekretaz tarafından bölünmesi, hücre yüzeyinden sAPPa'yı serbest bırakır ve 83 amino asitli bir C-terminal APP fragmanı (C83) bırakır. sAPPa üretimi, elektriksel aktiviteye ve muskarinik asetilkolin reseptörlerinin aktivasyonuna yanıt olarak artar, bu da nöronal aktivitenin APP'nin α -sekretaz bölünmesini arttırdığını gösterir (Haass et al. 1995). Daha sonraki süreçlerde γ -sekretaz tarafından α - ve β CTF'lerin intramembran bölünmesiyle beraber sırasıyla P3 (3 kDa) ve A β (4 kDa) peptitlerini serbest bırakır (Iwatsubo 2004). APP'nin amiloidojenik işlenmesi, A β 'nin N ve C uçlarında β - ve γ -sekretaz tarafından ardışık bölünmeleri içerir.



Şekil 1.3. Amiloid Prekürsör protein (APP)'nin proteolitik kesimi (Yuan et al. 2013)

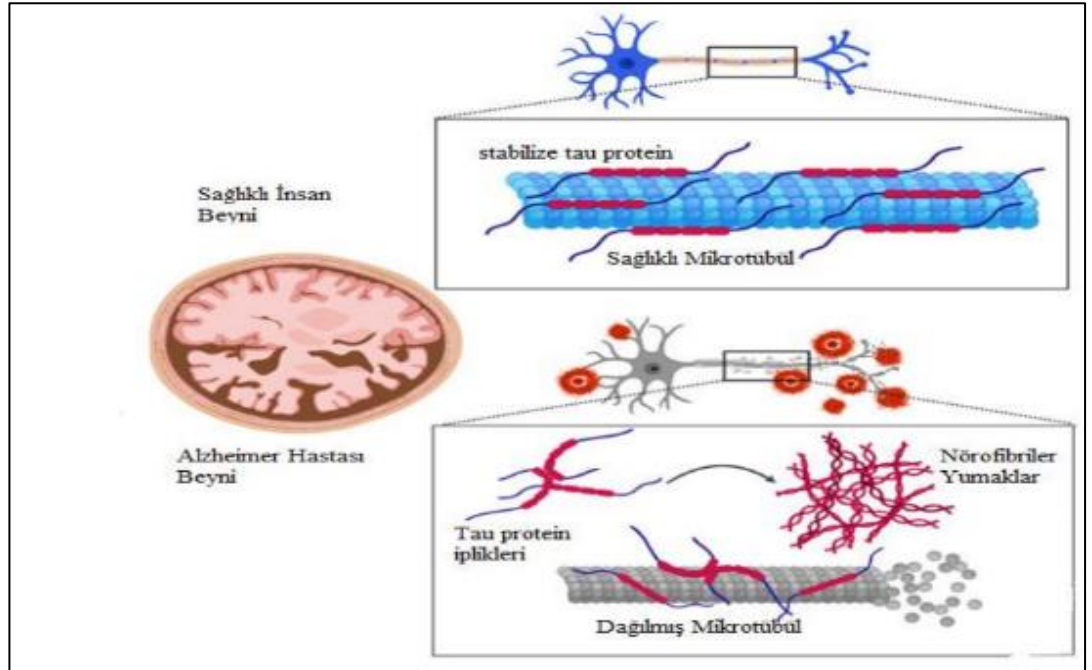
APP β -sekretaz tarafından kesilerek 99 aminoasit C-terminal (C99) fragment oluşur ilerleyen süreçlerde γ -sekretaz çoklu kesim yaparak 43,45,46,48,49 ,51 amino asitli fragmentler olutmaya devam eder ve finalde $A\beta$ formları olan $A\beta_{40}$ ve 42 amino asitli $A\beta_{42}$ birikmeye başlar (Takami et al. 2009). C99'un γ -sekretaz tarafından bölünmesi, çekirdeğe yer değiştirebilen APP'ni hücre içi alanını serbest bırakır ve özellikle apoptotik genlerin indüklenmesi dahil olmak üzere gen ekspresyonunu düzenleyebildiği yerlerde. APP/C99'un kaspazlar tarafından bölünmesi, nörotoksik bir peptit üretmektedir (Lu et al. 2000). β bölgesi APP parçalama enzimi nöronlarda bol miktarda bulunur ve beyindeki amiloidojenik işleme yolunu hızlandırır ve nöronal sağkalımı bozar.

1.4.2. Nörofibril yumaklar

Fizyolojik formunda mikrotübül ile ilişkisi olan tau proteini, nöral hücre iskeletini stabilize ederek mikrotübüllerin hücre içi birleşmesini destekler (Hanger et al. 2014) insan tau proteini ikincil yapıya sahip olan katlanmamış bir proteindir. İnsan tau proteinin altı izoformu, üç veya dört mikrotübül bağlama alanı tekrarı ile tanımlanan alternatif RNA birleştirme yoluyla ortaya çıkar (Andreadis 2005). Tau proteini ağırlıklı olarak beyindeki nöronlarda bulunur, ancak daha düşük glia seviyelerinde de ifade edilebilir. Tau proteinin translasyon sonrası modifikasyonları ve protein kinazlar tarafından fosforillemesi glikojen sentaz kinaz 3 de dahil olmak üzere, tau'nun hem fonksiyonunu hem de

1. GİRİŞ

stabilitesini etkileyen kritik bir aracı olarak hareket ettiği gösterilmiştir (Teravskis et al. 2020). Fizyolojik koşullar altında, tau'nun fosforilasyonu, kinesin ve dinein motorları ile rekabet halinde mikrotübüllere bağlanmasını modüle eder, böylece hücresel kargoların sırasıyla ileri ve geri taşınmasını düzenler (Bodea et al. 2016). Patofizyolojik koşullar altında tau'nun hiperfosforilasyonu Alzheimer hastalığı dahil olmak üzere diğer nörodejenerik hastalıkları kapsayan tauopatiler tanımlanmıştır. Patolojik olarak tauopatiler, tau'nun anormal hiperfosforilasyonu ve bunların bozuklukların beyin lezyonu ile ayırt edici özelliğini temsil eden, çift sarmal filamentlerin baskın çözünmeyen toksik türlerine ve NFY'lere agregasyonu ile karakterize edilir (Alonso et al. 1996). AH sırasında tau'nun hiperfosforilasyonu, aynı yaşta hasta olmayan bireylere göre yaklaşık sekiz kat daha fazladır. Tau proteinin hiperfosforilasyonu mikrotübül bağlama özelliğine müdahale eder ve agrega oluşturma eğilimindedir. NFY'lerin toplanma miktarı ve dağılım modelinin, hastalık şiddeti ve bilişsel gerileme süresi ile doğrudan ilişkili olduğu bulundu (Serrano-Pozo et al. 2011). Yapılan çalışmalara rağmen tau aracılı nörodejenarasyonu harekete geçiren moleküler yollar hala belirli değildir. Yapılan çalışmaların ışığında, fosforilasyonun ve daha az derecede glikosilasyonun, tau'nun fizyolojik işlevlerinin düzenlenmesi için çok önemli olduğunu ve anormal hiperfosforilasyonun hücresel lokalizasyon modelini ve MT'lere bağlanma yeteneğini bozduğunu ve sonuç olarak tau agregasyon sürecini beslediğini bulmuştur (Brion et al. 1993).



Şekil 1.4. Nörofibril yumak oluşumu (Barron et al. 2017)

1. GİRİŞ

AH sırasında tau proteini mikrotübüllerden ayrılır ve sitoplazmada birikir ve daha sonra nöronal hücre gövdelerinde filamentli inklüzyonların oluşumuna yol açar (Cripps et al. 2006). Filamentli tau inklüzyonları nöronal ve gliyalde birikir beyin hücreleri ve nörotoksisiteye neden olur (Lee and Leugers, 2012; Lee et al. 2001). Nörofibriler lezyonlar, esas olarak anormal derecede hiperfosforile edilmiş tau'dan oluşan PHF'ler ve düz filamentler tarafından oluşturulur (Lee et al. 2001). Periyodikliği 60-80 nm ve genişliği 8 ila 20 nm arasında değişen iki protofilament bükümü PHF'leri oluşturur, ancak bu sarmal periyodiklik düz filamentlerde yoktur. Tau agregasyonu süreci, fonksiyonel taumonomerden hastalığa spesifik tau filamentleri oluşturmak için dört temel adımı içeren çekirdeklenme-uzama modelini takip eder (Congdon et al. 2008). Tau'nun kümelemeyi başlatmak ve kümeleme yetkin bir yapıyı benimsemek için minimum bir konsantrasyona ihtiyacı vardır. Bu nedenle, mikromolar altı protein konsantrasyonlarında normal fizyolojik koşullar altında, tau monomerleri agrega oluşumuna direnir. Toplama yetkin konformasyonlar elde edildiğinde, tau dimerlerinin oluşumu başlar. Bu çekirdeklenme aşaması hız sınırlayıcıdır ve fizyolojik tau konsantrasyonlarında enerjik olarak tercih edilmez. Son adım, tau monomerlerinin sonradan oluşan filament uçlarına eklendiği filament uzamasıdır (Bergen et al. 2000).

1.5. Alzheimer Hastalığında Risk Faktörleri

1.5.1. Yaş

Birçok epidemiyolojik çalışma, yaş, cinsiyet, ırk ve sosyal sınıf gibi çeşitli demografik faktörler arasında yaşın bilişsel gerileme ve AH için en önemli risk faktörlerinden biri olduğu konusunda hemfikirdir (Herrup 2010). İlerleyen yaşla birlikte, AH prevalansı 75-84 yaşındaki bireylerde tahmini olarak %19'a, 85 yaşından büyüklerde ise %30-35' hatta %50'ye yükselir (Ferri et al. 2005).

1.5.2. Genetik

AH ilk semptomlarına göre başlama yaşına göre sınıflandırılabilir. Erken başlangıçlı AH, 65 yaşın altındaki bireyleri etkiler ve AH vakalarının yaklaşık %4-6'sını oluştururken, geç başlangıçlı AH 65 yaş ve üzerindeki bireyleri etkiler. Semptomların

1. GİRİŞ

başlangıç yaşının yanı sıra, AH erken ve geç formları diğer klinik, nöropsikolojik, nöropatolojik ve nörogörüntüleme değişkenlerinde farklılık gösterir (Mendez 2017). Erken AH genellikle APP, PSEN1 ve PSEN2 genlerindeki mutasyonlar nedeniyle oluşurken, geç form AH esas olarak APOE genindeki bir polimorfizm ile ilişkilidir. Özellikle $\epsilon 4$ alelinin varlığı ile ilişkilendirilmektedir (Cacace et al. 2016). APP geninde 30'dan fazla baskın mutasyon bulunmuş ve erken başlangıçlı otozomal dominant AH vakalarının yaklaşık %15'i ile ilişkilidir. PSEN1 genindeki mutasyonlar, erken başlangıçlı AH vakalarının %80'i ile ilişkilirken, vakaların %5'i PSEN2 mutasyonları ile ilişkilidir (Calero 2015). APP gen mutasyonlarının çoğu ve ayrıca PSEN1 mutasyonları, ya $A\beta 42$ artan ekspresyonu, $A\beta 40$ 'ın azalması veya her ikisi ile $A\beta 42:A\beta 40$ oranında bir artışa yol açar. Regülasyonun bozulması beyin dokusunda amiloidojenik kaskadını destekleyen erken $A\beta$ birikimini destekler (Bekris et al. 2010). Apolipoprotein E (ApoE), 19. kromozomda yer alan APOE geni tarafından kodlanan lipid metabolizmasında yer alan bir proteindir. AH $\epsilon 4$ aleli, geç başlangıçlı AH için ana risk faktörüdür. Heterozigotlukta $\epsilon 4$ 'ün varlığı AH gelişme riskini 3 kat artırırken, homozigotlukta risk 12 kat artar. Tersine, $\epsilon 2$ alelinin varlığı AH geliştirme riskini azaltır (Mahley 2016). Yapılan bazı çalışmalarda mekanizmalar önerilmiş olmasına rağmen apoE arasındaki ilişkinin nedenleri henüz tam olarak anlaşılabilmiştir. Bu çalışmalar arasında, bazıları apoE'nin $A\beta$ peptidine bağlanabildiğini göstermektedir. ApoE4 izoformu, fibrillerde polimerizasyonunu ve birikmesini teşvik eden $A\beta$ peptidine bağlanırken, apoE2 ve apoE3 formları, bu peptidin temizlenmesini teşvik etmede daha etkilidir ve beyin dokusunda birikmesini azaltır (Kim et al. 2009). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, miyeloid hücreler 2 (TREM2) geninde eksprese edilen tetikleyici reseptördeki nadir değişikliklerin, AH gelişimi için risk oranını %2,9 artırdığı gözlemlendi (Jonsson et al. 2013). Gen, 6p21 kromozomu üzerinde bulunur ve TREM2 proteini, merkezi sinir sisteminin fagositik hücreleri olan mikroglia yüzeyinde yüksek oranda eksprese edilmiş bir reseptördür ve merkezi sinir sisteminde fagositik ve inflamatuvar yanıtları modüle etme işlevine sahiptir (Jiang et al. 2018). Gendeki eksikliğin AH için risk oranını arttırdığı patofizyolojik mekanizmanın hala daha iyi açıklığa kavuşturulması gerekmektedir.

1.5.3. Serebrovasküler hastalıklar

Serebrovasküler hastalıklar ve AH, sıklıkla örtüşen birçok risk faktörünü paylaşır. Hemorajik enfarktlar, küçük ve büyük iskemik kortikal enfarktlar, vaskülopatiler ve serebral beyaz cevherdeki değişiklikler gibi serebrovasküler değişikliklerin demans riskini arttırdığı bilinmektedir. 2015 yılında Liu ve arkadaşlarına göre nöropatolojik bulgular, demanslı bireylerin %6 ila 47'sinde eşzamanlı serebrovasküler hastalık oluşumuna sahip olduğunu göstermektedir (Liu et al. 2015). AH'nın "çift vuruş" teorisine göre, vasküler risk faktörleri kan-beyin bariyerinde işlev bozukluğuna ve beyin kan akımında azalmaya, bölgeye kan akımının azalmasına (oligoemi) yol açar. Bu olay amiloidojenik olmayan ve amiloidojenik yollarla nöronal hasara yol açar. İlk olarak, kan beyin bariyerinin işlev bozukluğu oligoemiye ve nörotoksik moleküllerin birikmesine ve çoklu fokal iskemik enfarktüslerin ortaya çıkması ile ilişkili olaylara, hipoksiden kaynaklanan mikro yaralanmalara neden olarak nöronal hasara yol açar (Zlokovic 2011).

1.5.4. Tip 2 diyabet

Epidemiyolojik çalışmalar, tip 2 diyabet mellitus ile artan AH olma riski arasında net bir ilişki olduğunu göstermiştir. Bu ilişki için çeşitli mekanizmalar önerilmektedir, insülin direnci ve insülin eksikliği, bozulmuş insülin reseptörü, hipergliseminin toksisitesi, gelişmiş glikasyon son ürünlerinden kaynaklanan yan etkiler, serebrovasküler hasar, vasküler inflamasyon ve diğerleri (Li et al. 2015) insülin direnci veya eksikliği, NFT oluşumuna yol açan tau proteininin hiperfosforilasyonunu indükleyebilir. İnsülin ve insülin benzeri büyüme faktörü, insülin reseptörüne bağlanarak onun otofosforilasyonuna ve aktivasyonuna yol açar. Bu reseptörün aktivasyonu, tau protein fosforilasyonu için önemli olan glikojen sentaz kinaz 3 β (GSK3 β) enzimini fosforile eden ve inhibe eden fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) enziminin fosforilasyonuna yol açar. Böylece insülin eksikliği/direnci GSK3 β anormal aktivasyonuna ve dolayısıyla p-tau oluşumunun artmasına neden olur (Kimura 2016).

1.5.5. Hipertansiyon

Hipertansiyon, vasküler duvarlarda hipoperfüzyon, iskemi ve serebral hipoksiye yol açabilecek değişikliklere neden olarak AH gelişimini tetiklemeye yol açabilir. Yapılan çalışmalar ışığında serebral iskeminin, A β sentezinde yer alan presenilin ekspresyonunu uyarmanın yanı sıra APP ve A β birikimine yol açabildiğini göstermektedir. Hipertansiyon AH oluşumuyla ilgili olan kan beyin bariyerinde işlev bozukluğuna da yol açar (Skoog and Gustafson 2006).

1.5.6. Dislipidemi

Yüksek kolesterol düzeyleri, AH gelişimi için risk faktörleri olabileceği öne sürülmüştür. Çalışmalar da sağlıklı bireylere kıyasla AH hastalarda kolesterol seviyelerinin %10 daha yüksek olduğu göstermiştir (Popp et al. 2013). Hiperkolesterolemi, hem ateroskleroz gelişimi ve AH gelişimi için hem de diğer nörodejeneratif hastalıklar için bir risk faktörüdür (Xue-shan et al. 2016). Hiperkolesterolemi, öncelikle kan-beyin bariyeri üzerindeki etkilerinden dolayı AH riskini artırır. Hayvan modellerini kullanılarak yapılan deneysel çalışmalarda, hiperkolesteroleminin, artan NFT oluşumu, bilişsel düşüş, nöroinflamasyon, kolinerjik nöronların işlev bozukluğu ve AH ile uyumlu serebral mikro hemorajilerin varlığına ek olarak artan A β peptit birikimi ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Ricciarelli et al. 2012).

1.5.7. Sigara tüketimi

Sigara içmek çeşitli mekanizmalarla AH geliştirme riskini etkileyebilir. Sigara kullanımının serbest radikallerin oluşumunu artırdığı, bunun yanında oksidatif stresi artırabildiği ve bağışıklık sisteminde proinflamatuvar etkiyi teşvik ederek fagositlerin aktivasyonuna ve dolayısıyla ek oksidatif hasara yol açabildiği bilinmektedir. Bunlara ek olarak sigara kullanımı AH riskini artıran serebrovasküler hastalıklara yol açabilir (Traber et al. 2000).

1.6. Alzheimer Hastalığının Teşhis ve Tedavisi

1.6.1. Alzheimer hastalığının teşhisi

AH demansın görülen en sık tablosudur, bunu sırasıyla vasküler demans, sayısız diğer nörodejenaratif patolojiler takip eder. Gelişen teknoloji ve modern beyin görüntüleme tekniklerine rağmen, AH diğer demansa neden olan nöropatolojilerden ayırt etmek zordur (Hyman et al. 2012) PET kullanan mevcut görüntüleme modallerinde in vivo amiloid yükünün açık kanıtını sağlarken, AH sinaptik kayıp, gliozis, Lewy cisimcikleri, nöron kaybı, granülovakuolar dejenerasyon ve serebral amiloid anjiyopati gibi birçok histopatolojik özelliğini ölçmeden önce miktarını belirlemek zordur. AH Lewy cisim hastalığı ve vasküler hasarlar gibi kognitif bozukluğu şiddetlendirebilen diğer komorbiditelerle birlikte bulunur (Montine and Larson 2009). Lewy cisim hastalığı, amiloid β benzer fibriller oluşturduğu bilinen bir protein olan α -sinüklein proteininin toplanmasını ve birikmesini içeren nörolojik patolojiye sahip hastalıktır. En son tanı kriterlerine göre, AH'nın klinik başlangıcı üç geniş döneme ayrılabilir: klinik öncesi, hafif bilişsel bozukluk (HBB) ve AH demansı (Sperling et al. 2011). Amiloid kaskadı hipotezine göre, AH ile ilgili patolojik bozuklukları klinik öncesi aşamasından on yıl öncesine dayandığı düşünülmektedir. Klinik öncesi faz asemptomatik serebral amiloidoz ile başlar. Monomerik Amiloid plak, rezervuarını BOS'ta bırakarak toplanmaya başlar ve nöronal yüzey ve sinapslarda birikmeye başlar (Elman et al. 2014). Preklinik fazın ikinci aşaması sırasında, BOS artan tau, posterior singulattaki hipometabolizma ve kortikal incelme gibi belirli BOS biyobelirteçleri saptanabilir hale gelir (Albert et al. 2011). HBB evresinde hasta toplumun özerk ve işlevsel bir üyesi olarak kalmasına izin veren bir düzeyde olsa da bilişsel işlevde bir azalma ile karakterize edilen AH evresidir. AH biyobelirteçleri ve görüntüleme modalitelerindeki gelişmelere rağmen, HBB evresinde klinisyen tarafından bilişsel ve fonksiyonel testler yoluyla biraz öznel bir belirleme yapılmasıyla belirlenebilir bunun yanında henüz bir laboratuvar testiyle teşhis edilememektedir (Albert et al. 2011). Bununla birlikte, PET görüntüleme ve BOS analizi, demans semptomlarını ayırt etmek için hala geçerli yöntemdir. Demansı ayırt ederken, bunama benzeri semptomlardan sorumlu diğer metabolik veya yapısal etiyolojileri ayırt etmek önemlidir. HBB evresinde hasta veya aile üyelerinden biri durumu fark etmese bile, ilerleyen dönemlerde bellek, dikkat, dil ve yürütme işlevi gibi çeşitli alanlardaki

düşüş zamanla fark edilebilir olacaktır. AH'nın diğer demansa neden olan hastalıklardan başarılı bir şekilde ayırt edilebildiği nokta genellikle hastalığın Alzheimer demans sürecinde geç ortaya çıkar (Knopman et al. 2001). Demans tanısı genellikle ayrıntılı bir öykü ve MoCA veya MMSE gibi bilişsel işlev testinin ardından konur. AD'yi diğer demans nedenlerinden ayırt etmek, özellikle hastalığın ilerlemesinin erken evrelerinde genellikle zor olabilir (McKhann et al. 2011). Hem MMSE hem de MoCA testleri, klinik kullanımlar için güvenilir olarak kabul edilir, bunama olmayanlara kıyasla demans teşhisi için yeterince yüksek hassasiyet ve özgüllük sağlar (Kahle-Wroblewski et al. 2007). Klinik öykü ve bilişsel testlerin yanı sıra biyobelirteçler; örneğin BOS A β seviyeleri ve PET taramaları demans semptomlarının etiyojisine dair ek bilgiler sağlayabilir. Her iki test yöntemi de tek başına AD tanısı koymak için yetersizdir (Dubois et al. 2014).

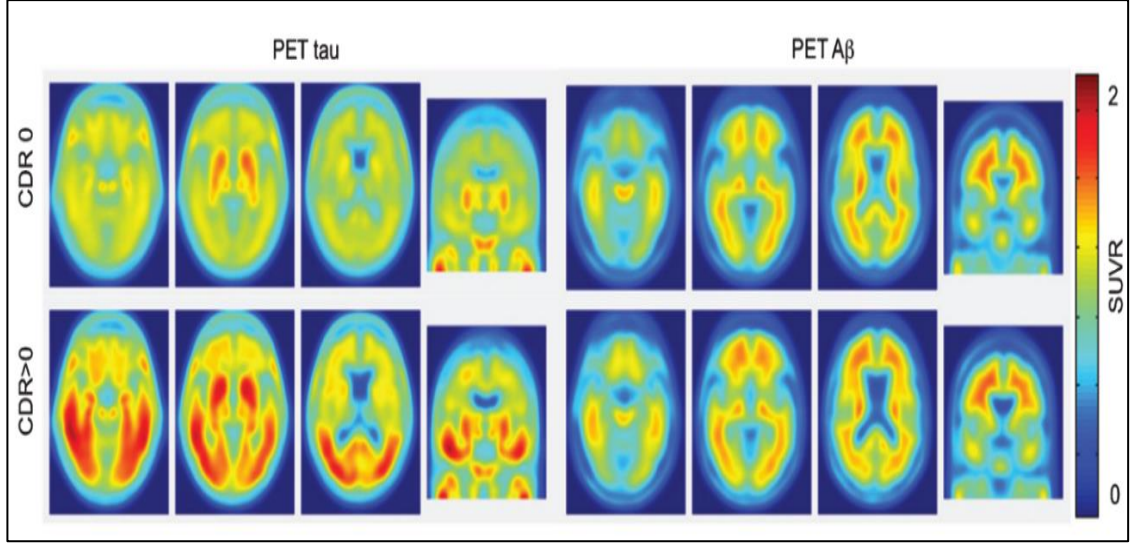
Biyobelirteçler

AH için biyobelirteçler, bir hastada AH patolojisinin ilerlemesini değerlendirmeye ve işaretlemeye yardımcı olabilecek ölçülebilir göstergelerdir. Biyobelirteçlerin, hastalık ilerlemesinin belirli aşamalarını saptamak ve doktorların AH'nın seyrini izlemesine yardımcı olmak için tanı sürecine entegre edilebileceğini göstermektedir (Bateman et al. 2012). AH biyobelirteçleri iki ana sınıfa ayrılabilir: doğrudan ve dolaylı. Doğrudan biyobelirteçler, A β proteini ve tau birikimi gibi AH patolojisini yansıtan spesifik anahtar proteinlerdir. AH patolojisinin Direkt A β biyobelirteçleri, çeşitli spesifik ligandların kullanımı yoluyla PET görüntülerinde beyinde A β birikintilerinin kanıtının yanı sıra BOS'daki azaltılmış A β seviyelerinin ölçümünü içerir (McKhann et al. 2011). A β 'nin serebral birikimi orta yaşta başlar ve bireyin yaşıyla birlikte sıklığı artar (Meyer 2010). A β 'nin serebral birikimi orta yaşta başlar ve bireyin yaşıyla birlikte sıklığı artar. Tau birikiminin doğrudan biyobelirteçleri, BOS içindeki toplam tau veya fosforile edilmiş tau proteinini (p-tau) içerir. Yüksek tau seviyeleri, AH ilerlemesiyle ilişkili olsa da ancak tau proteini prion hastalıkları ve travmatik beyin hasarı gibi diğer nörodejeneratif bozukluklarda da ortaya çıkabilir. BOS'ta tau'nun doğrudan ölçümü, genel olarak nöronlara ve sinapslara verilen hasarın güçlü bir belirteci olarak kabul edilmesinin yanı sıra aynı zamanda özellikle AH ile ilişkilidir. Beynin interstisyel sıvısındaki monomerik tau miktarı da mikrodializ yoluyla ölçülebilir. İnterstisyel sıvıda monomerik tau'nun önemli ölçüde azalmasının, tau birikmesinin

başlangıcı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Yamada et al. 2014). BOS'da yüksek A β ve yüksek tau seviyeleri gösteren biyobelirteçlerin bir kombinasyonu, AH ilerleme olasılığının yüksek olduğunu gösteren son derece bilgilendirici veriler sağlar (Dubois et al. 2014).

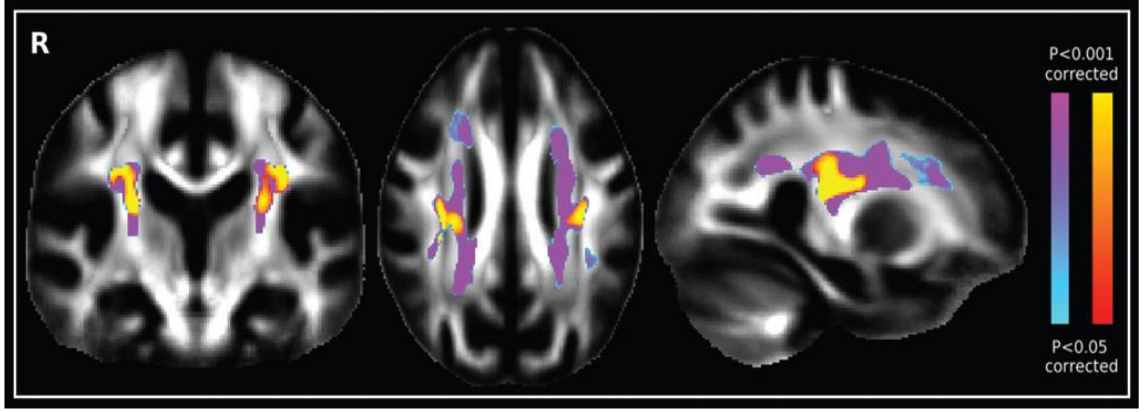
Görüntüleme

Modern görüntüleme tekniklerindeki son gelişmeler sayesinde AH araştırmalarının ön saflarına taşıdı ve AH'nın patogenezi hakkındaki bilgimizi büyük ölçüde artırdı. AH'nı incelemek için birincil görüntüleme yöntemleri, büyük anatomik ve bağlantı değişikliklerini incelemek için MR ve A β ve mikrotübül tau proteininin yayılmasını izlemek için moleküler bir görüntüleme yöntemi olan PET'lerdir. PET görüntüleme takibi ile, A β birikimi klinisyenlere AH diğer demans biçimlerinden ayırt etmede yardımcı olma potansiyeline sahiptir, ancak PET henüz tanısal amaçlar için yaygın klinik kabul görmemiştir (Hardy and Selkoe 2002). Hem BOS hem de görüntüleme biyobelirteçlerini birleştirmek, en yüksek tanısal doğruluğu sağlar ve bu görüntüleme modalitelerinin klinik kullanım için daha geniş bir uygulamasını sağlar (Walhovd et al. 2010). Klunk ve arkadaşlarının in situ amiloid birikimi PET görüntülemeleri devrim yarattı.¹¹C radyo izotopuna dayalı olarak PiB izleyicisi, fibriler amiloid türleri için nanomolar bir afiniteye sahiptir (Klunk et al. 2004). Amiloid PET ile ölçülen amiloid yükü, hastalığın ilerlemesi ile yüksek oranda ilişkilidir (Visser et al. 2009). Son zamanlarda FDA onaylı Florbetapir gibi 18F radyoizotopuna dayalı radyoizleyiciler, 11C tabanlı radyoizotopların daha yüksek bir sinyal-gürültü oranına sahip olmasına rağmen, bir siklotrona olan ihtiyacın ortadan kalkması nedeniyle, daha kısa yarı ömürlü 11C tabanlı radyoizleyicilerin yerini giderek daha fazla alıyor (Clark et al. 2011). Diğer radyoizleyicilerden daha yüksek bir teşhis doğruluğu sağlayabilen bir hedefleme PET radyo izleyicileri geliştirilmiştir. Örneğin, 18F-flutemetamol, %93'ten daha büyük bir duyarlılık ve özgüllük göstermiştir (Vandenberghe et al. 2010).



Şekil 1.5. Tau ve A β PET görüntüleri. CDR, klinik demans derecelendirmesi; SUVR, standartlaştırılmış alım değeri oranı Bilişsel olarak sağlıklı kontrollerde (üst-CDR0) ve AD hastalarında (alt-CDR>0) (Brier et al. 2016).

PET ile ölçülen tau yükü, BOS tau seviyesi ile iyi bir korelasyona sahiptir ve BOS A β 42 seviyeleri ile ters orantılıdır. Beyindeki A β 42 “yutucu” BOS'tan A β 42'nin “kaynağını” kullandığı için, A β nörotoksitesitesi tau patolojisini tetikler (Gordon et al. 2016). Brier ve arkadaşları, AH'li bir hasta kohortunda ve sağlıklı kontrollerde tau'nun ilerlemesini izlemek için tau bazlı PET kullandı (Brier et al. 2016). Modern MR tabanlı moleküler görüntüleme teknikleri, amiloid veya tau kümelerini PET benzeri hassasiyetle tespit etmek için bir yol sağlayabilir. MR'ın bir nörogörüntüleme yöntemi olarak gücü, klinik ortamlarda her yerde bulunmasının yanı sıra, anatomik yapıların yüksek çözünürlüklü görüntülenmesinde ve bilgisayarlı tomografiye göre üstün kontrastında yatmaktadır (Albert et al. 2011). DTI, vücuttaki su protonlarının difüzyonunu ölçen MR tabanlı bir tekniktir. Beyaz madde ve gri madde gibi farklı dokular farklı difüzyon katsayılarına sahiptir ve bu nedenle bir DTI görüntüsünde farklı kontrast seviyeleri gösterir. AH hastaları, beyaz madde ağlarının en kısa yol uzunluklarında artışlar ve AH ile ilişkili ağlarda, özellikle ön lobda topolojik bir düzensizliği gösteren küresel verimde azalma göstermiştir (Lo et al. 2010).



Şekil 1.6 AH hastalarının fraksiyonel anizotropi artışı (mavi-mor skala) sağlıklı kontroller (kırmızı-sarı skala) ile karşılaştıran difüzyon tensör görüntüsü (Douaud et al. 2011).

1.6.2. Alzheimer hastalığının tedavisi

AH'nin mevcut tedavisi sadece semptomatiktir. AChE inhibitörleri (donepezil, galantamin ve rivastigmin) ve NMDA antagonisti (memantin), FDA tarafından AH için şu anda onaylanan dört ilaçtır (Anonymous 2018). Kolinerjik hipoteze dayanarak, AH'nin bilişsel işlev bozukluğu ve diğer semptomları, kolinerjik nöronların kaybı ile açıklanmaktadır. AChE inhibitörleri, asetilkolinin hidrolizini önleyerek ve ardından sinaptik seviyelerini artırarak kolinerjik sinir iletimini artırır. Donepezil, galantamin ve rivastigminin hafif ila orta dereceli AH'li hastalarda etkinliği kanıtlanmıştır (Atri 2019). Farmakokinetik ve farmakodinamiklerinde bazı farklılıklar olmasına rağmen, üç ilaç arasında etkinlik açısından önemli bir fark yoktur. AChE inhibitörleri normalde hastalar tarafından iyi tolere edilir. Bulantı, kusma, diyare ve anoreksi gibi gastrointestinal etkiler en sık görülen yan etkilerdir (Tricco et al. 2018). FDA tarafından onaylanan son ilaç olan Memantin, rekabetçi olmayan bir NMDA antagonistidir. Kesin etki mekanizması belirsizliğini koruyor ancak glutamatın uyarıcı nörotoksisite etkisini azalttığı düşünülüyor (Long and Holtzman 2019). Memantin, monoterapi olarak kullanıldığında orta ila şiddetli AD tedavisinde orta derecede etkinlik ve güvenlik profili göstermiştir (McShane et al. 2019).

1.7. Voltaj Kaplı İyon Kanalları

Voltaj kaplı iyon kanalları (VGIC'ler), hücrelerin elektriksel sinyalleşmesinde önemli roller oynayan transmembran proteinlerdir. VGIC'lerin aktivitesi, hücrenin zar potansiyeli tarafından düzenlenir ve açık kanallar iyonların hücre zarları boyunca bir elektrokimyasal gradyan boyunca hareket etmesine izin verir. İlettikleri iyonlara bağlı olarak VGIC'ler voltaj kaplı sodyum, potasyum, kalsiyum veya klorür kanalı olarak sınıflandırılabilir (Ruiz and Kraus 2015).

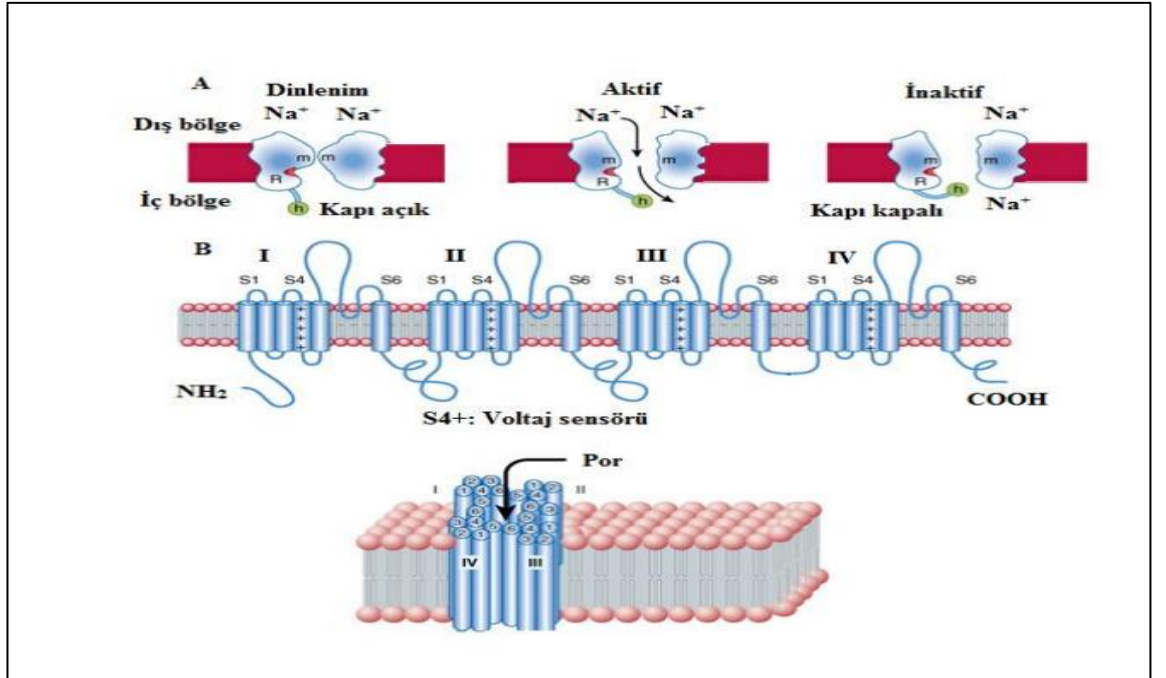
1.7.1. Voltaj kaplı sodyum kanalları

Voltaj kaplı sodyum akımları, 1952'de Hodgkin ve Huxley tarafından dev mürekkep balıklarının aksonlarındaki elektrik iletkenliğini incelerken keşfedildi (Hodgkin and Huxley 1952). Yirmi altı yıl sonra Sodyum kanalları (Navs) yılan balığı elektoplaksından izole edildi ve saflaştırıldı (Agnew et al. 1978). Yapılan çalışmalarda bugüne kadar Nav1.1'den Nav1.9'a kadar adlandırılan dokuz Nav1 kanal alt tipi klonlanmıştır. Yakın zamanda yeni bir Nav2 kanalları ailesi keşfedildi, ancak işlevi hakkında çok az şey biliniyor (Watanabe et al. 2000). Memeli Nav kanalları, bir veya iki β alt birimi (30-40 kDa) ile birleşen büyük bir sözde tetramerik gözenek oluşturucu α alt birimi (260 kDa) tarafından oluşturulur. Buna karşılık, ökaryotik Nav'lerin yapısını araştırmak için kullanılan prokaryotik Nav kanalları, homotetramerler tarafından oluşturulur. Nav kanalı α alt birimleri, dokuya özgü ekspresyon profillerini gösterir. Nav1.1, Nav1.2 ve Nav1.3 alt tipleri merkezi sinir sisteminde (MSS) ifade edilir.

Nav1.6, hem periferik hem de merkezi sinir sisteminde ifade edilirken, Nav1.7, Nav1.8 ve Nav1.9 çoğunlukla periferik sinir sistemi (PSS) ile sınırlıdır (Catterall et al. 2005). Nav1.4 ve Nav1.5 kanalları sırasıyla iskelet ve kalp kaslarında bol miktarda bulunur. Nav kanalları, sinirlerde ve kas liflerinde aksiyon potansiyellerinin başlatılması ve yayılmasının altında yatan Na^+ akımlarının üretilmesinden sorumludur. Birincil duyuşal nöronlarda, örneğin bir aksonun zararlı bir uyarandan depolarizasyonu, sinir sistemi yoluyla ağrı olarak algılanabilen duyuşal bilgilerin beyne iletilmesine yol açar. İskelet ve kalp kası hücrelerinde alınan aksiyon potansiyelleri, vücut hareketlerini ve kan akışını sağlayan kas kasılmasını üretir. Nav kanalları, uyarılabilir ve uyarılabilir

1. GİRİŞ

olmayan hücrelerin hücre zarlarında ifade edilir. Nav kanallarının aktivasyonu voltajla yönlendirilir ve proteinin voltaj sensörü tarafından tespit edilen hücrel membran potansiyeli, kanalların bulunduğu durumu belirler. Hiperpolarize dinlenme potansiyellerinde Nav kanallarının açık durumda olma olasılığı düşüktür. Membran depolarizasyonu, voltaj algılama alanları içindeki hareketler tarafından indüklenen α alt biriminin konformasyonel bir değişikliğini kolaylaştırır, bu da Na^+ -seçici kanal gözeneklerinin açılmasına neden olur. Nav kanalları çok hızlı açılır ve sinir ve kas liflerindeki nöronal ve kardiyak aksiyon potansiyellerinin hızlı yükselişinin altında yatan Na^+ 'nın içe doğru akımına aracılık eder (Catterall 2014). Genel olarak Nav kanalları, milisaniyeler içinde kapanan/kapanan kinetik hızlı geçici kanallardır. Bununla birlikte, belirli koşullar altında, tamamlanmamış hızlı inaktivasyon, kalıcı sodyum akımları üretebilir. Bazı nöronlarda, Nav kanalları, membran repolarizasyonu sırasında hızlı inaktivasyondan sonra açılır. Kanal gözeneklerinin geçici açılması, yeniden canlanma akımı olarak adlandırılan büyük bir içe doğru sodyum akımı üretir. Nav kanalları ayrıca astrositler, mikroglia, makrofajlar ve kanser hücreleri gibi uyarılabilir olarak kabul edilmeyen hücre tiplerinde de ifade edilir ve fagositoz, hücre hareketliliği ve metastatik aktivitenin düzenlenmesinde rol oynar (Black and Waxman 2013).



Şekil 1.7. Voltaj kaplı sodyum kanalları (Katzung et al. 2006)

1. GİRİŞ

Dinlenme membran potansiyellerinde, VKSK'ler kapatılır ve depolarizasyonun aktive edilmesi gerekir. Aktivasyon üzerine, uyarılabilir hücrelerde aksiyon potansiyelinin yükselmesine katkıda bulunurlar. Kanal açılması, hücre içine hızlı bir sodyum iyonu akışı ve zar potansiyelinin sodyum için denge potansiyeline (çoğu nöronda + 60mV) doğru depolarizasyonu ile sonuçlanır. VKSK'ler, aksiyon potansiyelinin aşağı inmesine katkıda bulunan hızlı inaktivasyon adı verilen bir işlem ile açıldıktan sonra milisaniyeler içinde kapanır. İşlevsel olarak, VKSK'lerin yapısı, voltaj sensörüne katkıda bulunan S1-S4 transmembran alanları ve sodyum seçici gözenek oluşturmak üzere düzenlenen S5-S6 ile iki bölüme ayrılabilir (Catterall et al. 2005). Membran voltajındaki değişikliklerin voltaj kapılı iyon kanalı proteinleri üzerinde konformasyonel bir değişiklik sağladığı moleküler mekanizma, I-IV alanlarının S4 segmentinde bulunan modüler voltaj sensörlerinin hareketi yoluyla gerçekleşir (Alabi et al. 2007).

Hücresinin depolarizasyonu, hücre zarı boyunca elektrik alanını değiştirerek DI-III S4 voltaj sensörlerinin hızlı hareketine ve iyon kanalı gözeneklerini açan proteinde konformasyonel bir değişikliğe neden olur (Bosmans et al. 2008). Voltaj algılamanın moleküler mekanizması hakkında bilinenlerin çoğu, yüksek çözünürlüklü kristal yapıların elde edildiği voltaj kapılı potasyum kanalları üzerindeki çalışmalardan kaynaklanmaktadır. Dokuz farklı VGSC alt birimi farklı şekilde ifade edilir ve VGSC işlevinin bozulması çok çeşitli patolojilere yol açabilir. VKSK'ların epilepsi ve ağrıdaki rolü iyi bilinmektedir; bununla birlikte, kanser, multipl skleroz, kas ve bağışıklık bozuklukları, otizm, nörodejenerasyon ve kardiyovasküler komplikasyonlar dahil olmak üzere diğer bozukluklarda VKSK'ların rolüne dair artan kanıtlar vardır. İnsan kalıtsal bozuklukları artık kolaylıkla haritalandırılabilir. Sodyum kanallarını kodlayan genlerdeki mutasyonlara birtakım bozukluklar atfedilmiştir ve farelerde hedeflenen sodyum kanalı mutasyonları ve gen silinmesinin analizi ile daha fazla genetik anlayış sağlanmıştır.

1. GİRİŞ

Tablo 1.1. Memeli hücrelerine ait VKSK α ve β alt birim izoformları, bu proteinlerin kodlayıcı genleri.

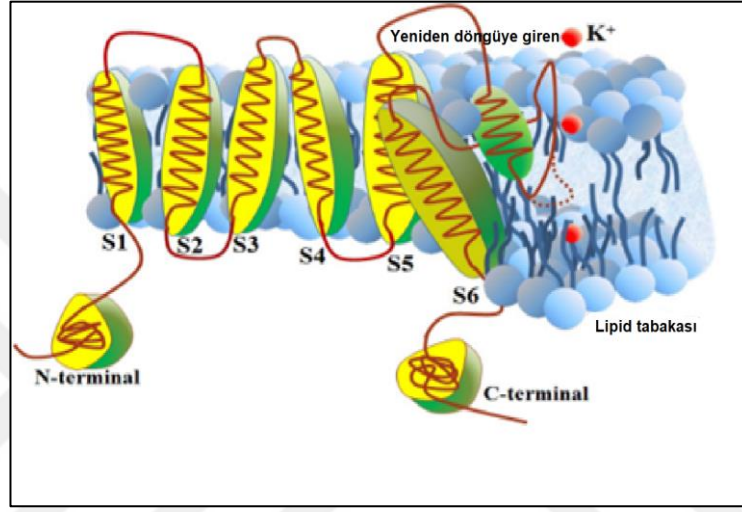
VKSK alt birim izoformları	Kodlayıcı gen	Kanal Lokalizasyonu
NaV _{1.1}	SCN1A	MSS
NaV _{1.2}	SCN2A	MSS
NaV _{1.3}	SCN3A	MSS
NaV _{1.4}	SCN4A	İskelet Kası
NaV _{1.5}	SCN5A	Kalp Kası
NaV _{1.6}	SCN8A	MSS ve PSS
NaV _{1.7}	SCN9A	PSS
NaV _{1.8}	SCN10A	PSS
NaV _{1.9}	SCN11A	PSS
β 1	SCN1B	MSS, PSS, Kalp ve iskelet kası
β 1B	SCN1B	MSS, PSS
β 2	SCN2B	MSS, PSS, Kalp kası
β 3	SCN3B	MSS, PSS, böbrek
β 4	SCN4B	MSS, PSS, Kalp ve iskelet kası

1.7.2. Voltaj kaplı potasyum kanalları

Potasyum (K^+) kanalları hücre zarlarında yer alır ve K^+ iyonlarının hücrelerden dışarı akışını ve hücrelere girişini kontrol eder. Hem uyarılabilir hem de uyarılamaz hücrelerde çok önemli roller oynarlar ve bazı parazitler dışında hemen hemen tüm türlerde bulunabilirler (Kuo et al. 2005). K^+ kanalları, lipid çift tabakasını kapsayan transmembran sarmallara (TM_s 'ler) sahiptir. Yapı ve fonksiyona bağlı olarak kanallar üç ana sınıfa ayrılır: voltaj kaplı (K_v), içe doğru doğrultucu (K_{ir}) ve tandem gözenek alanı (K_{2P}) kanallar (Buckingham et al. 2005). Ayrıca, ligand kaplı (K_{ligand}) kanallar iki veya altı TM 'ye sahiptir ve çeşitli haberciler tarafından uyarılır. Öğrenme, ezberleme ve algılama yeteneği nöronlar arasındaki sinyal alışverişine bağlıdır (Armstrong et al. 1998). Aksiyon potansiyeli, sinir hücreleri tarafından üretilen elektrik sinyali çeşitli voltaj kaplı iyon kanalları içerir (Bean 2007). Aksiyon potansiyellerinin nöron hücre gövdelerinde ve aksonlarda farklı işlevleri vardır; ek olarak, çeşitli nöron türlerinin kendi aksiyon potansiyeli modelleri vardır (Bean 2007). K_v kanallarının çoğu, zar depolarize olduğunda açılır ve zar hiperpolarize olduğunda kapanır (Swartz 2008). K_v kanalının altı TM 'si vardır ve ilk dört sarmal ($S1-S4$), voltaj sensörü alanını (VSA) oluşturur (Long and Holtzman 2019). Son iki sarmal (sırasıyla $KcsA$ 'daki dış ve iç sarmallara karşılık gelen $S5-S6$) gözenek oluşturucu alanı oluşturur. Bugüne kadar mikrogliada bulunan K_v kanalları özetlenmiştir ve esas olarak gecikmeli doğrultucu K_v kanallarından oluşur. AH 'den özellikle etkilenen bir alan olan hipokampus, mikrogliya açısından zengindir ve mikrogliayı hızla aktive ettiği gösterilen serebrovasküler hasarlara özellikle duyarlıdır.

1. GİRİŞ

Mikroglia, AH'da nöro-inflamasyona aracılık eden anahtar inflamatuvar hücrelerdir ve Kv kanalları, mikroglial fonksiyonun, özellikle Kv1.3'ün temel düzenleyicileridir. Plazma zarı depolarize olduğunda S4, dışa doğru hareket eder ve S5-S6 sarmalları daha sonra konformasyonel değişikliklere uğrar, dolayısıyla K⁺ çıkışına izin vermek için sitoplazmik aktivasyon kapısını açar (Choe 2002). Çok sık olarak Kv kanalı α -alt birimleri, kanal trafiğini ve geçitlemeyi etkileyen yardımcı alt birimlerle kompleksler oluşturur (Yellen 2002).



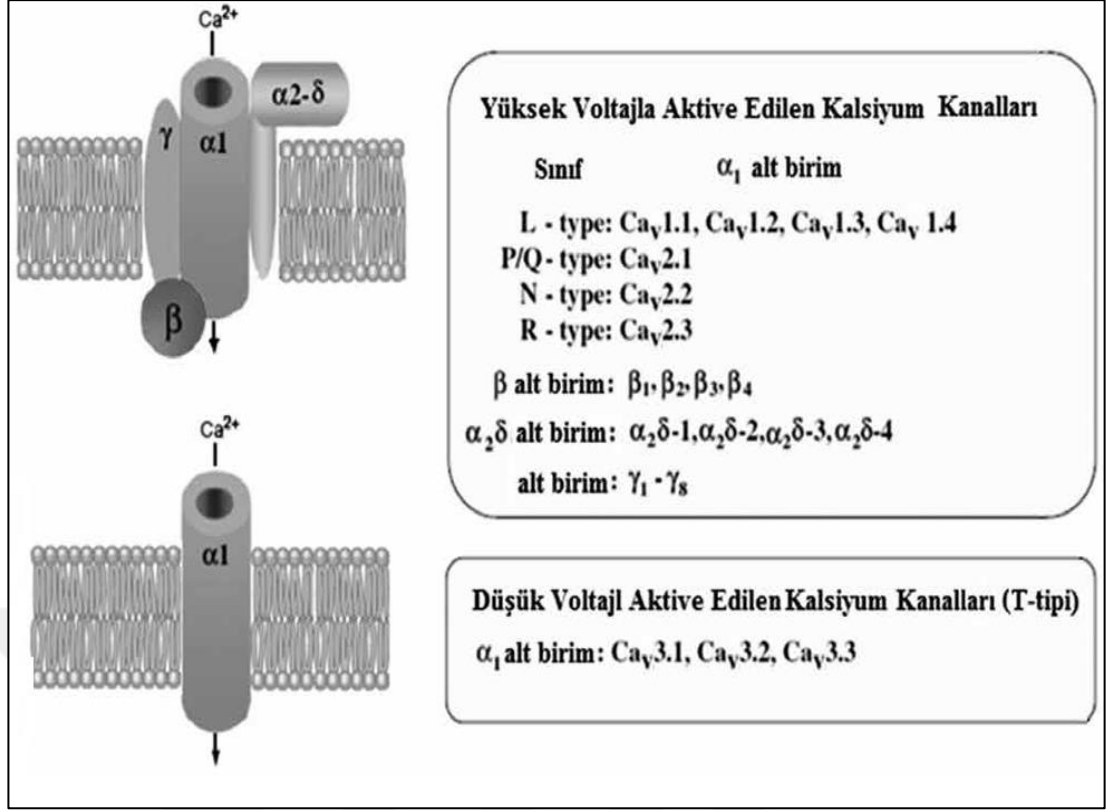
Şekil 1.8. Voltaj kaplı potasyum kanalı (Liu et al. 2014)

Dizi homolojisine bağlı olarak, Kv kanalları şu şekilde sınıflandırılır: Kv1 ila Kv12 alt ailesi ve her Kv alt ailesinin bir dizi alt türü üyesi vardır. Kv alt ailesinin α alt birimlerinin çoğu işlevsel kanal gözenekleri oluştururken, bazı alt aile üyeleri (Kv5, Kv6, Kv8 ve Kv9) değiştiriciler veya susturuculardır (iyon ileten kanallar oluşturmaz, ancak diğer Kv alt ailesi üyelerinin geçitleriyle heterotetramerize olabilir ve bunları değiştirebilir) (Ottshytsch et al. 2002). Farklı nöron türleri, ihtiyaçlarına uygun benzersiz bir Kv kanalı seti ifade eder ve nöronun uyarılabilirlik modellerini kontrol etmesine izin verir. Kv kanallarının en iyi bilinen işlevi, K⁺ akışı için bir yol sağlamak ve böylece nöronal uyarılabilirliği azaltmak olsa da, son 13 yıldaki ikna edici kanıtlar, Kv kanallarının nöronal apoptoza dahil olduğunu göstermektedir. Öte yandan, belirli Kv kanallarının ekspresyonunun olmaması veya aktivitelerinin azalması, nöronal hipereksitabiliteye yol açarak epilepsi gibi nörolojik bozukluklara neden olur (Miceli et al. 2008). Nöronlar dahil birçok hücre tipinde apoptoz, sitozolik K⁺ konsantrasyonunda bir düşüşle ilişkilendirilmiştir (Yu 2003). Nöronal hücre apoptozisine, plazma

membranında Kv kanallarının eş zamanlı artan ekspresyonunun eşlik ettiği bilinmektedir (Redman et al. 2007).

1.7.3. Voltaj kaplı kalsiyum kanalı

Birçok farklı hücre tipindeki Ca^{+2} kanalları, membran depolarizasyonunda aktive olur ve aksiyon potansiyellerine ve eşik altı depolarize edici sinyallere yanıt olarak Ca^{+2} akışına aracılık eder. Voltaj kaplı Ca^{+2} kanallarından hücreye giren Ca^{+2} birçok farklı hücreyel olayı başlatan elektriksel sinyalleşmenin ikinci habercisi olarak hizmet eder. Kalp ve düz kas hücrelerinde Ca^{+2} kanallarının aktivasyonu, doğrudan sitozolik Ca^{2+} konsantrasyonunu artırarak ve dolaylı olarak sarkoplazmik retikulumda ryanodine duyarlı Ca^{+2} salınım kanalları tarafından kalsiyuma bağımlı kalsiyum salınımını aktive ederek kasılmayı başlatır (Bers 2002). Enine tübüllerdeki aynı Ca^{+2} kanalları aynı zamanda sitozolik konsantrasyonu artıran yavaş bir Ca^{+2} iletkenliğine aracılık eder ve böylece sinir uyarılarının yüksek frekanslı dizilerine yanıt olarak kasılma kuvvetini düzenler (Catterall 1991). Nöronlarda voltaj kaplı Ca^{+2} kanalları sinaptik iletimi başlatır (Catterall and Few 2008). Birçok farklı hücre tipinde, voltaj kaplı Ca^{+2} kanalları yoluyla sitozole giren Ca^{+2} enzim aktivitesini, gen ekspresyonunu ve diğer biyokimyasal süreçleri düzenler (Flavell and Greenberg 2008). Farklı hücre tiplerinde sinyal iletimi, farklı fizyolojik, farmakolojik ve düzenleyici özelliklere sahip voltaj kaplı Ca^{2+} akımlarına aracılık eden voltaj kaplı Ca^{2+} kanallarının farklı moleküler alt tiplerini içerir. VGCC'ler, iletim gözeneklini, voltaj sensörünü ve geçit aparatını içeren tek bir $\alpha 1$ alt birimi ve üç yardımcı alt birimin $\alpha 2$ - δ , β ve γ kombinasyonunu içeren dört alt birimden oluşan heteromultimerlerdir. $\alpha 1$ alt birimi, her biri altı ntransmembran sarmal segmenti (S1-S6) olan dört homolog alan içerir. S4 segmenti voltaj sensörü olarak işlev görür ve iyon seçiciliği ve iletkenliği S5 ve S6 tarafından belirlenir (Armstrong and Hille 1998).



Şekil 1.9. Voltaj kaplı kalsiyum kanalı (Simms and Zamponi 2014)

Sodyum /kalsiyum değiştiriciler

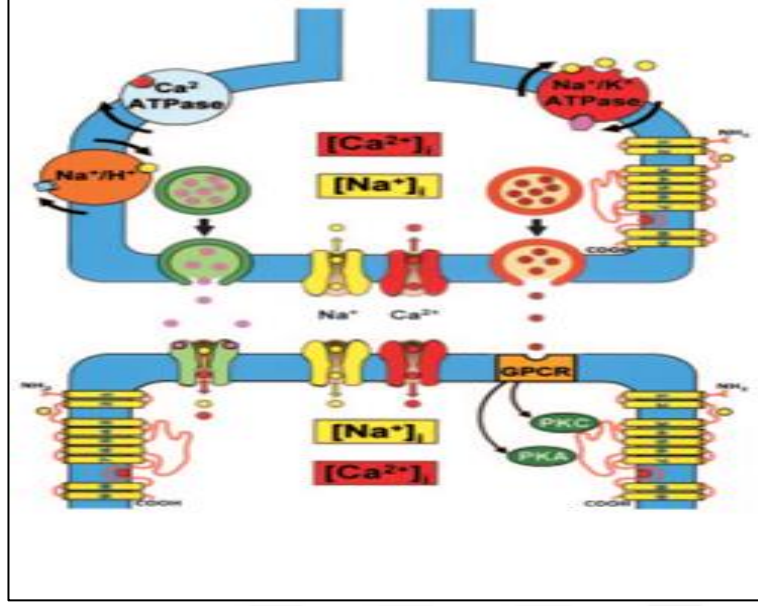
Na^+/Ca^+ değiştiricileri, hemen hemen tüm hayvan hücre tiplerinde Ca^+ homeostazının korunmasında önemli rollere sahip olan plazma membran proteinleridir. Na^+/Ca^{+2} değiştiricileri, içe doğru yönlendirilmiş Na^+ gradyanının enerjisini kullanarak bir elektrokimyasal potansiyele karşı sitoplazmik Ca^{+2} 'yi ekstrüde eden etkili elektrojenik antiporterler olarak işlev görür (Philipson and Nicoll 2000). Na^+/Ca^{+2} değiştiricilerinin iki ana grubu, K^+ 'dan bağımsız ve K^+ 'ye bağlı Na^+/Ca^{+2} değiştiricilerdir. NCX'ler 3 Na^+ 'yı 1 Ca^{+2} ile değiştirir (stoikiometrisi mutlak olmasa da), NCKX'ler 4 Na^+ 'yı 1 Ca^{+2} artı 1 K^+ ile değiştirir (Kang and Hilgemann 2004). Na^+/Ca^{+2} değişim aktivitesinin kardiyak kontraktilite, düz kas tonusu, renal Ca^{+2} geri emilimi, fotoreseptör sinyal iletimi ve nöral fonksiyonda kritik rolleri vardır.

Uyarılabilir hücrelerde Na^+ ve Ca^{+2} homeostazının düzenlenmesinde önemli bir oyuncu olarak, Na^+/Ca^{+2} değiştirici (NCX), $[Ca^{+2}]_i$ ve/veya $[Na^+]_i$ dengesizliğinin meydana gelebileceği AH dahil olmak üzere insan patofizyolojik koşullarında yer alır.

1. GİRİŞ

Seçici iyon kanalları ve ATP'ye bağlı pompalarla birlikte NCX, Na^+ ve Ca^{+2} konsantrasyonlarının fizyolojik bir aralıkta korunmasına katkıda bulunur (Blaustein and Lederer 1999). NCX, esas olarak Ca^{+2} düzensizliğine karşı nöronal hayatta kalma mekanizmalarında rol oynamış olsa da, birkaç çalışma, farklı patolojik koşullarda hücre içi Na^+ yükselmesine nöronal tepkilerdeki rolünü vurgulamıştır (Gerkau et al. 2018). Ayrıca, NCX'in ER ve mitokondriyal Ca^{+2} işlemlerine katkıda bulunarak nöroprotektif bir rol oynadığı gösterilmiştir. NCX, Na^+ ve Ca^{+2} iyonlarının karşı taşınmasını katalize eder plazma zarı çift yönlüdür. NCX'in 1Ca^{+2} iyonu için 3Na^+ iyonlarının bir stokiyometrisine sahip olduğu genel olarak kabul edilir (Philipson and Nicoll 2000). Özellikle, $[\text{Ca}^{+2}]_i$ arttığında, NCX, Ca^{+2} ekstrüzyonunu ve Na^+ akışını (ileri mod) birleştirerek $[\text{Ca}^{+2}]_i$ 'nin dinlenme seviyelerine dönüşünü sağlar. Buna karşılık, $[\text{Na}^+]_i$ 'de bir artış ve/veya membran depolarizasyonu meydana geldiğinde, NCX, plazma zarı boyunca azaltılmış Na^+ elektrokimyasal gradyanını takiben Na^+ ekstrüzyonuna ve Ca^{+2} akışına aracılık eder (ters mod).

Üç NCX izoformu, özellikle AH'nin patofizyolojisinde yer alan serebral korteks ve hipokampus gibi iki beyin bölgesinde eksprese edilir (Juhaszova et al. 1996). Özellikle, insan ölüm sonrası AH hastaların beyinlerinden saflaştırılan serebral plazma membran veziküllerinde NCX aktivitesinde bir artış gözlemlenildi. Yapılan çalışmalarda nörodejenerasyondan etkilenen beyin bölgelerinin hayatta kalan nöronlarında NCX aktivitesinin arttığını buldular, bu da NCX fonksiyonundaki bu artışın AH patolojisi sırasında nöronal sağkalıma yardımcı olabileceğini düşündürdü. $\text{A}\beta$ 'ye maruz kalan hipokampal nöronlarda NCX akımlarında bir artış gözlemlendi. NCX3 fragmanı, apoptotik hücre ölümünü geciktirebildiğinden, $\text{A}\beta_{1-42}$ 'nin nörotoksik etkisinin erken fazı sırasında koruyucu bir mekanizmayı temsil ettiği düşünüldü. NCX3'ün $\text{A}\beta$ ile indüklenen yukarı regülasyonu doğrultusunda, Colvin ve arkadaşları, önemli bir nöronal hayatta kalmanın gözlemlendiği alanlarda, ölüm sonrası AH beyinlerinden alınan plazma membran keseciklerinde NCX aktivitesinde bir artış buldular (Blaustein and Lederer 1999). Bazı araştırmacılar, inme ve AH deney koşulları altında, Ca^{+2} 'ya bağlı kalpain aktivasyonundan sonra benzer bir NCX3 bölünmesinin meydana gelebileceğini bulduğu belirtmişlerdir.



Şekil 1.10. Sodyum / kalsiyum değiştiriciler (Annunziato et al. 2004)

NCX3'ün aracılık ettiği artan Na^+ bağımlı Ca^{+2} akışına, hem sitozolik Ca^{+2} aşırı yüklenmesini hem de ER stresini önleyen bir mekanizma olan ER'ye artan Ca^{+2} tamponlaması eşlik eder. NCX3 susturulduğunda veya devre dışı bırakıldığında, ER Ca^{+2} içeriğinde önemli bir azalma, kaspaz-12 aktivasyonu ve apoptotik nöronal ölüm gözlemlenmiştir (Pannaccione et al. 2012). ER içindeki Ca^{+2} konsantrasyonlarındaki değişiklikler ve ER Ca^{+2} homeostazındaki değişiklik, hücre fonksiyonu ve hayatta kalması için çok önemli görünmektedir (Pahl 1999). ER, bir A β üretim bölgesi tanımlanmıştır, bu nedenle ER Ca^{+2} homeostazındaki bozukluklar ve bunun sonucunda ER işlev bozukluğu, APP'nin patolojik işlenmesine ve A β seviyelerinin artmasına neden olabilir (Paschen 2001). AH farelerinin hipokampal astrositlerinde meydana gelen A β kaynaklı ER stresi, AH'da çok önemli bir patomekanizma olduğu gösterilen astrogliosis ile ilişkilendirilmiştir. NCX3, ER Ca^{+2} dolumunu geliştirerek ve A β hakareti sırasında ER fonksiyon değişikliklerini önleyerek, yukarı regülasyonu nedeniyle A β toksisitesine karşı önemli bir nöroproteksiyon aracı olarak ortaya çıktı, ER stresini geciktirdiği düşünülmüştür (Alberdi et al. 2013).

ER içindeki Ca^{+2} konsantrasyonlarındaki değişiklikler ve ER Ca^{+2} homeostazı, hücre fonksiyonu ve hayatta kalması için çok önemli görünmektedir. NCX'in ER Ca^{+2} yeniden doldurulmasına aracılık etmedeki katkısının, beyin iskemisi sırasında meydana gelen oksijen ve glukoz yoksunluğu dahil olmak üzere diğer patolojik durumlarda da

nöroproteksiyon için belirleyici olduğu gösterilmiştir (Gerkauf et al. 2018). Bir aile tabanlı genom çapında ilişkilendirme çalışması, NCX3 geni SLC8A3 üzerindeki nadir bir tek nükleotid polimorfizminin AH'nın başlangıç yaşıyla önemli bir ilişkisi olduğunu bildirerek, AH patogenezinde NCX3'ün kritik bir etkisi olduğunu düşündürmektedir (Saad et al. 2015).

1.8. Alzheimer Hastalığının Etiyolojisinde Hidrojen Peroksitin Rolü

Hidrojen peroksit (H_2O_2), kararlı, yüksüz ve serbestçe yayılabilen bir reaktif oksijen türü (ROS) ve ikinci habercidir. Reaktif oksijen türleri (ROS), nörodejeneratif hastalıklarda ana anahtar moleküllerdir. Alzheimer hastalığının patolojisi ayrıca oksidatif stres ile ilişkilidir ve H_2O_2 'nin oksidatif stres ve A β peptidinin nörotoksitesinde rol oynadığı bilinmektedir. A β 'nin H_2O_2 üretme yeteneği ve H_2O_2 'nin demir ve bakır ile yüksek derecede toksik ROS üretme etkileşimleri, Alzheimer hastalığı ile ilişkili oksidatif stres için bir mekanizma sağlayabilir. H_2O_2 de dahil olmak üzere ROS beyinde sürekli olarak üretilir ve beyin dokusu oksidatif strese karşı özellikle hassastır. Oksijen, zar potansiyellerinin sürdürülmesi ve nörotransmitterlerin salınması ve depolanması için temel bir unsurdur. Nöronlar ayrıca yüksek düzeyde adenosin trifosfat tüketimine ve dolayısıyla yüksek oksijen talebine sahiptir. Nispeten düşük seviyelerde antioksidan enzimler ve antioksidan bileşiklerle birleştiğinde bu, nöronları oksidatif hasara karşı oldukça duyarlı hale getirir. H_2O_2 molekülü beyinde önemli bir biyokimyasaldır ve patolojik durumlarda terapötik müdahale için önemli bir hedef olabilir. Sağlıklı beyin dokusunda, glutatyon (GSH), E vitamini, diyet flavonoidleri ve C vitamini ve bir dizi antioksidan enzim dahil olmak üzere bir dizi antioksidan bileşik vardır (Schulz et al. 2000).

Kültürlenmiş nöronal hücrelerde hidrojen peroksit maruziyeti, ROS üretimi ve süpürme aktivitelerinde bir dengesizliğe neden olur. Bu süreç, hücre hattı modellerinde bu oksidatif stres indükleyiciyi incelemek için yaygın olarak kullanılabilir (Zhang et al. 2007). H_2O_2 ile indüklenen oksidatif stres, tau proteininde hiperfosforilasyona neden olabilir ve beyin hücrelerinde toksik nörofibriler yumakların oluşumunu indükleyebilir (Hu et al. 2017). Retinoik asit (RA) indüksiyonu, SH-SY5Y hücrelerinin nöronal morfolojik farklılaşmasını geliştirecek ve tau ve GSK3- β ekspresyonu gibi Alzheimer

1. GİRİŞ

hastalığı belirteçlerini artıracaktır. Bu nedenle, SH-SY5Y hücrelerinde H₂O₂ kaynaklı patojenite ve RA farklılaşması, nöronal hücre dejenerasyonunu incelemek için uygun bir model sistem görevi görebilir (Paik et al. 2019).



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Corcoran et al. (2010), yaptıkları bir çalışmada Sodyum Selenatın PP2A fosfataz enzimini aktive ederek tau proteinini defosforile ettiğini ve hafıza eksikliklerini tersine çevirdiği bulgusuna ulaşmışlardır. AH'da anormal derecede fosforile edilmiş tau proteinlerinde oluşan nörofibril yumaklar AH tanısından önemli bir belirteçtir. Yapılan çalışmanın ana fikri tau proteinin fosforilenmesine aracılık eden enzimlerin aktivitesini artırmanın tau proteinin fosforillenmesinin azaltacağını düşünmüşlerdir. Tau proteinin fosforilasyonun düzenlenmesinde rol oynayan anahtar enzimlerden birisi de serin-treonin fosfotazdır (PP2A). Yapılan bu çalışmada Sodyum Selenat PP2A için önemli bir agonist olarak hareket ederek fosfotazın aktivitesini önemli ölçüde artırdığı belirlenmiştir. Sonuçları; Sodyum selenat verilen transgenik farelerin hipokampusunda daha düşük fosfat ve tau proteinine rastlanmış ve amigdalaları karşılaştırıldığında Morris Su labirent Hafıza testin de önemli ölçüde uzamsal öğrenme ve hafıza sergilemişlerdir.

Govindarajan et al. (2011); Histon asetilasyonun düzensizliği yaşa bağlı hafıza bozukluğunun başlangıcında ve nörodejenaratif hastalıkların patagonezinde yer almıştır. Yapılan bu çalışmada histon deasetilasyonun yükseltilmesi ile hafıza bozukluğunun iyileştirilebileceği yeni bir terapötik bir yol olabileceği düşünülmüş. Yayınlanan makalede şiddetli amiloid birikiminin patolojisini farelerin ön beyinde belirgin bir histon asetilasyonu düzensizliği ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. PAN- HDAC inhibitörü olan sodyum butirat ile uzun süreli tedavi transgenik farelerde ileri aşamadaki çağrimsal belleği iyileştirdiği göstermiştir. Yapılan çalışmadan çıkan bir diğer sonuç; hafıza fonksiyonunun geri kazanılmasında yüksek hipokampal histon asetilasyonu ve öğrenmede rol oynayan genlerin ekspresyonunun artmasıyla doğru orantılıdır. Bu veriler ışığında HDAC inhibitörlerinin AH tedavisi için potansiyel bir tedavi olduğu düşünülmüştür.

Jin et al. (2017); Sodyum selenatın tauopatik fare modellerinde nörofibriler yumakları (NFT) azalttığı rapor edilmiştir, ancak Wnt/ β -katenin sinyal yolu ve APP işleme üzerindeki etkileri AH oluşumuna nasıl yol açtığı bilinmemektedir. Bu çalışmada üçlü transgenik farelerin 10 ay içme suyuna karıştırılan sodyum selenatla tedavi edilmiş ve 10 ayın sonunda hipokampal patolojileri incelenmiş. Wnt/ β -katenin sinyallemesinin aşağı regülasyonu, AD patolojisinin değişmesi ile yakından ilişkilidir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Sodyum selenat ile tedavi, tip 2A (PP2A) protein fosfatazlarının aktivitesini önemli ölçüde arttırmış ve AH ayırt edici özelliklerini bastırmış. PP2A'nın sodyum selenat tarafından aktivasyonu, aktif β -katenin seviyesini artırabilir ve hipokampal dokuda öncelikle AD model farelerin kültürlenmiş nöronlarında GSK3 β aktivitesini inhibe edebilir, Wnt/ β -katenin sinyalleşmesinin aktivasyonuna ve hedef genlerin transaktivasyonuna yol açar, pozitif olarak düzenlenmiş genler c-myc, survivin, TXNRD2 ve negatif olarak düzenlenmiş gen BACE1 dahil. Bu bulgular, Wnt/ β -katenin sinyalleşmesinin AH önlenmesi için potansiyel bir hedef olduğunu ve AH tedavisi için yeni bir ilaç olarak sodyum selenat geliştirilebileceğini ortaya koymaktadır.

Pan et al. (2019); Rutin (quercetin-3-rutinosid), bazı patolojik durumlarda farklı biyolojik fonksiyonlara sahip doğal bir flavonoid olarak uzun süredir araştırılmaktadır. Sodyum rutin (NaR), mikroglialdaki fagositozla ilişkili reseptörlerin ekspresyon seviyelerini artırarak mikroglialı artırarak A β klirensini destekleyebileceğini düşünmüşlerdir. NaR, anaerobik glikolizden mitokondriyal OXPHOS'a (oksidatif fosforilasyon) metabolik bir geçişi teşvik eder, bu da mikroglialıya A β klirensi için yeterli enerji (ATP) sağlayabilir. NaR uygulaması, nöroinflamasyonu hafifletebilir ve mitokondriyal OXPHOS ve mikroglia aracılı A β klirensini artırabilir, sinaptik plastisite bozukluğunu iyileştirebilir ve sonunda uzamsal öğrenme ve hafıza eksikliklerini tersine çevirebilir. Yapılan çalışmalarda, NaR'nin AH için potansiyel bir terapötik ajan olduğunu göstermektedir.

Wang et al. (2019) yılında; Son zamanlarda ortaya çıkan kanıtlar ışığında bağırsak disbiyozu ve AH ilerlemesi arasında ilişki kurulmuş fakat patogenezi hakkındaki rolü belirsizliğini koruyor. Yapılan bu çalışmada bağırsak disbiyozu ve nöroinflamasyon arasındaki mekanik bir bağlantı bulmaya çalışılmıştır. AH ilerlemesi sırasında bağırsak mikrobiyatasında; proinflamatuvar T yardımcı 1 (Th1) hücrelerinin farklılaşmasını ve çoğalmasını uyaran fenilalanin ve izolösinin periferik birikimine yol açtığını görülmüş. Beyine sızmış periferik Th1 bağışıklık hücreleri, AH ile ilişkili nöroinflamasyona katkıda bulunan M1 mikroglia aktivasyonu ile ilişkilidir. AH bağlı hafif bilişsel bozukluğu olan iki küçük bağımsız hasta grubunda fenilalanin ve izolösin konsantrasyonlarının yükselmesi ve kandaki Th1 hücre frekansının artması da gözlemlendi. Çin'deki bir faz 3 klinik denemesinde sağlam ve tutarlı bir biliş gelişimi sergileyen bir sodyum oligomanat

olan GV-971, bağırsak disbiyozunu ve buna bağlı fenilalanin/izolösin birikimini bastırır, nöroinflamasyondan yararlanır ve biliş bozukluğunu tersine çevirir. Bağırsak disbiyozunun teşvik ettiği nöroinflamasyonun AH ilerlemesindeki rolünü vurgulamış ve Bağırsak mikrobiyotasını yeniden şekillendirerek AH tedavisi için yeni bir strateji olabileceği ortaya konulmuştur.

Cisternas et al. (2014); Bugüne kadar, AH'nın başlangıcı ve ilerlemesi, hipertansiyon ve diyabet gibi patolojilerle ilişkilendirilmiştir. Yüksek Na⁺ alımı hipertansiyon için önemli bir risk faktörü olduğundan, bu hastalığın hastaların yeme davranışı ile yakın bir ilişkisi vardır. Aslında, K⁺ alımındaki artışla birlikte Na⁺ tüketiminde bir azalma, hipertansiyonu önlemede farmakolojik olmayan birincil bir yaklaşımdır. K⁺ alımındaki bir artışın belirli nöropatolojik belirteçlerin ekspresyonunu veya bir fare modelinin bilişsel performansını etkileyip etkilemediğini incelenmiştir. K⁺ alımındaki bir artışın A β peptidinin kümelenme modelinde bir değişikliğe yol açtığını gözlemlenmiş ve tau fosforilasyonunun bazı epitoplarında kısmi bir azalma ve bilişsel performansta iyileşme gözlemlenmiştir. Ayrıca glial fibriler asidik protein (GFAP), interlökin 6 (IL-6) ve 4-hidroksinonenal (4-HNE) gibi inflamasyon ve oksidatif stres ile ilgili belirteçlerde de azalma gözlemlenmiştir. Veriler birlikte, diyetteki değişikliklerin, örneğin K⁺ alımındaki bir artış, farmakolojik olmayan bir tedavi olarak AH başlamasının önlenmesinde önemli olabileceği düşünülmüştür.

Rangaraju et al. (2014) ; Otoimmünitede terapötik önemi olan voltaj kapılı bir potasyum kanalı olan Kv1.3, aktive edilmiş mikroglia tarafından yukarı regüle edilir ve in vitro olarak amiloid aracılı mikroglial hazırlama ve reaktif oksijen türleri üretimine aracılık eder. İnsan AD beyin dokusunda Kv1.3 kanal ifadesinin arttığını varsaydık. On AH hastası ve on hastalık dışı kontrol üzerinde gerçekleştirilen kör bir ölüm sonrası immünohistokimyasal yarı kantitatif analizde, kontrollere kıyasla, AH beyinlerinin ön korteksinde önemli ölçüde daha yüksek bir Kv1.3 boyama yoğunluğu (p = 0.03) ve Kv1.3-pozitif hücre yoğunluğu (p = 0,03) gözlemlenmiştir. Bu, AH beyinlerinde artan sayıda Iba1-pozitif mikroglia ile paraleldi. Kv1.3-pozitif hücreler mikroglial morfolojiye sahipti ve amiloid plakları ile ilişkiliydi. AH beyinlerinde daha yüksek Kv1.3 ifadesi, western blot analizi ile de doğrulandı. Bulgular, Kv1.3 kanallarının insan AH biyolojik olarak alakalı ve mikrogliaya özgü hedefler olduğunu desteklemektedir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyaller

Tez kapsamındaki araştırmalarda kullanılan SH-SY5Y (ATCC®, CRL-2266™) insan nöroblastom hücre modeli ATCC® hücre kültürü koleksiyonundan temin edildi. Çalışmada kullanılan kitler ve diğeri kimyasal malzemeler Tablo 3.1’de, cihazlar ise Tablo 3.2’de gösterilmektedir.

Tablo 3.1. Araştırmada kullanılan kit ve kimyasal listesi

Kitler	Alındığı Firma
MTT Cell Proliferation Assay Kit	Chemicon® (Germany)
LDH Assay Kit	Cell Biolabs (Chinese)
DMEM	Sigma-Aldrich® (Germany)
FBS (Fetal Bovine Serum)	Gibco® (USA)
L-Glutamine	Gibco® (USA)
PBS	Sigma-Aldrich® (Germany)
Tripan Blue	Sigma-Aldrich® (Germany)
DMSO	Sigma-Aldrich® (Germany)
Trypsin/EDTA	Sigma-Aldrich® (Germany)
Etanol	Sigma-Aldrich® (Germany)
Triton-X-100	Cell Biolabs (Chinese)

Tablo 3.2. Araştırmada kullanılan cihaz listesi

Cihazın Adı	Modeli
Spektrofotometre	Biotek EPOCH
Biyogüvenlik Kabini	ESCO NordicSafe™
CO ₂ 'li İnkübatör	ESCO Celculture
Santrifüj	Hettich Zentrifugen Universal 320R
İnvert Mikroskop	Leica DFC450C Model: CH-9435
Vorteks	Wisd Wisemix VM-10
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore, Q-3W
Masaüstü pH Metre	Adwa , AD1000
Dijital Mikrobiyolojik Emniyet Kabini	ESCO, AC2-4E8M
Soğutmalı Santrifüj	Hettich, Universal 320R
Isıtıcı-soğutucu Kuru Blok	Bioer, ch 202
C02İ incubator(115lt)	Esco, ccl-170b
Derin dondurucu – 86, büyük boy	Esco, uus-439b
UV-Visible Spektrofotometre	Mecasys, Optizen uv/vis
Vorteks	DAIHAN
Otoklav	JSR, JSAC-60
Analitik Terazi (0,0001)	Shimadzu ATX 224
Isıtıcı Manyetik Karıştırıcı	Daihan, shr
Su Banyosu	Daihan
Sterilizatör	Microtech, mst 55

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre kültürü ve nöronal farklılaşma

Nöroblastoma (SH-SY5Y) hücre dizisi (ATCC, CRL-226) hücresel bir Alzheimer modeli oluşturmak ve Sodyum Hidrojen Karbonat, Sodyum dihidrojen fosfat, sodyum fosfat dibazik, sodyum asetat trihidrat, sodyum sitrat tribazik dihidrat, sodyum hidrojen karbonat, potasyum klorür, potasyum hidrojen fosfat, potasyum sodyum tartarat bileşiklerin hastalığın fenotipi üzerindeki etkinliklerine yönelik araştırmaya için kullanıldı.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

%5 fetal sığır serumu, %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM/F12 hazırlandı ve 5% CO₂ ve 37°C de büyümesi için bırakıldı. Hücre kültürü falaksları %80 yoğunlukta kapladıktan sonra, flask içindeki kültürlere DMEM: F12 (%2 fetal sığır serumu) içinde 10 µM olacak şekilde trans-retinoik asit (RA) uygulandı ve 7 gün inkübe edildi. Daha sonra hücre kültürüne 3 gün daha 50 ng/ml BDNF uygulandı. İverted mikroskop altında hücrenel farklılaşma gözlemlendi ve bir akış sitometresi (The CyFlow® Cube 6, Almanya) kullanılarak farklılaşmayı doğrulamak için hücre döngüsü analizleri yapıldı.

3.2.2. Hücrenel AH toksisite modeli

Farklılaştırılmış olan SH-SY5Y hücre kültürleri, 48 kuyucuklu plaklara her bir kuyucukta 10⁵ hücre sayısı olacak şekilde ekildi ve AH toksisite ortamı oluşturmak amacı ile H₂O₂'nin inhibe edici dozları, hücre kültürleri için geniş bir konsantrasyon spektrumunda (12-1500 ug/ml) analiz edildi. H₂O₂'nin %50 inhibe edici konsantrasyon (IC50) konsantrasyonu, AH toksisitesini uyarmak için kültürlere eklendi. Sodyum hidrojen karbonat, Sodyum dihidrojen fosfat, sodyum fosfat dibazik, sodyum asetat trihidrat, sodium sitrat tribazik dihidrat, sodium hidrojen karbonat, potasyum klorür, potasyum hidrojen fosfat, potasyum sodium tartarat'ın iyileşirici etkileri, hücrenel AH modeli için farklı konsantrasyonlarda (6,25-400 µg/ml) analiz edildi. 24 saatlik inkübasyonun ardından, sitotoksisite deneyleri kullanılarak üçlü tekrarlanan örnekler incelenmiştir. Pozitif kontrol için inkübasyon sürelerinin sonunda kültürlere 10 µl triton X (Sigma-Aldrich® Germany) uygulandı.

3.2.3. Hoechst boyama

Hoechst boyama için, ilk olarak ortam farklı konsantrasyonlarda L-malik asit ile muamele edilerek hazırlanan hücre kültürleri plakalarından çıkarıldı. Ardından kuyucuklar 2 kez PBS ile yıkandı. Son olarak, oyuklar 1mM Hoechst 33258 floresan boya ile oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Nükleer anomaliler bir floresan mikroskobu altında hesaplandı. Toplam 1.000 hücre sayıldı ve mutasyonlar belirlendi.

3.2.4. Hücre canlılığı analizi

Hücre canlılığı araştırmak ve sonuçları ilişkilendirmek için 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) hücre canlılığı deneyleri kullanıldı. Hücre kültürlerindeki hücre canlılıklarını araştırmak için MTT test kiti (Sigma-Aldrich®, ABD) kullanıldı. Üretici talimatlarına göre hücre kültürlerine 5 mg/ml MTT solüsyonu eklendi ve 37°C'de 3 saat inkübe edildi. Daha sonra sağlık hücreleri tarafından üretilen formazan kristalleri inorganik bir çözücü (DMSO, Sigma-Aldrich®, ABD) kullanılarak çözüldü. Son olarak, hücre kültürleri 570 nm dalga boyunda bir mikropilaka okuyucu kullanılarak izlendi.

3.2.5. Asetilkolinesteraz (AChE) aktivite testi

Hücresel AH modelindeki asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesi ticari bir kit (Abcam®, UK, Cambridge) kullanılarak üreticinin talimatlarına göre araştırıldı. 24 saatlik kimyasal uygulanan hücre kültürleri, kitin lizis tamponu kullanılarak lizlendi. Her örneğe 50 µl asetiltiyokolin reaksiyon tamponu eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Örneklerdeki renk yoğunlukları, 410 nm dalga boyunda bir mikropilaka okuyucu kullanılarak izlendi. Enzim aktivitelerini hesaplamak için numunelerdeki absorbanslar kitin standartlarıyla karşılaştırıldı.

3.2.6. Toplam antioksidan durumu (TAS) ve toplam oksidan durumu (TOS) analizleri

Toplam Antioksidan Durumu (TAS) ve Toplam Oksidan Durumu (TOS) araştırmaları ticari kitler (Rel Assay Diagnostics®, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak yapıldı. Hücreler bileşiklerle 24 saatlik inkübasyonda bırakıldı. TAS analizi, 18 µl hücre kültürü süpernatanı (ve pozitif ve negatif kontroller olarak kitin standardı-Trolox 1 mmol/L ve dH₂O) 48 kuyucuklu plakalarda 300 µl Reaktif 1 ile karıştırlarak kullanıldı. İlk okuma bileşenlerin 660 nm absorbansta karıştırlmasından hemen sonra yapıldı. Daha sonra örnekler 37°C'de 5 dakika inkübe edildi ve tekrar 660 nm dalga boyunda okumalar yapıldı. İkinci okuma ise ilk okumadan çıkarıldı ve nihai sonuçlara göre hesaplamalar yapıldı. TOS analizi, 45 µl hücre kültürü süpernatanı (ve H₂O₂ 10 µmol/L ve dH₂O) ve

300 µl kit reaktifi karıştırılarak gerçekleştirildi. Absorbans okumaları, numuneler 530 nm'de karıştırıldıktan sonra yapıldı. Daha sonra her örneğe kit reaktifi 2 eklendi ve karışımlar 37°C'de 5 dakika inkübe edildi. Absorbans, bir mikropilaka okuyucu kullanılarak 530 nm'de izlendi.

3.2.7. Flow sitometri analizi

Seçilen potasyum ve sodyumlu bileşiklerin uygulamasına karşı hücrel AH modelinde apoptotik ve nekrotik durum, üretici talimatlarına göre Annexin V-FITC Apoptosis Kit (Abcam®, BioVision, UK) kullanılarak belirlendi. 10^5 hücre, 48 kuyucuklu bir plakaya ekildi ve bileşikler ile 24 saat süreyle kültürle muamele edildi.

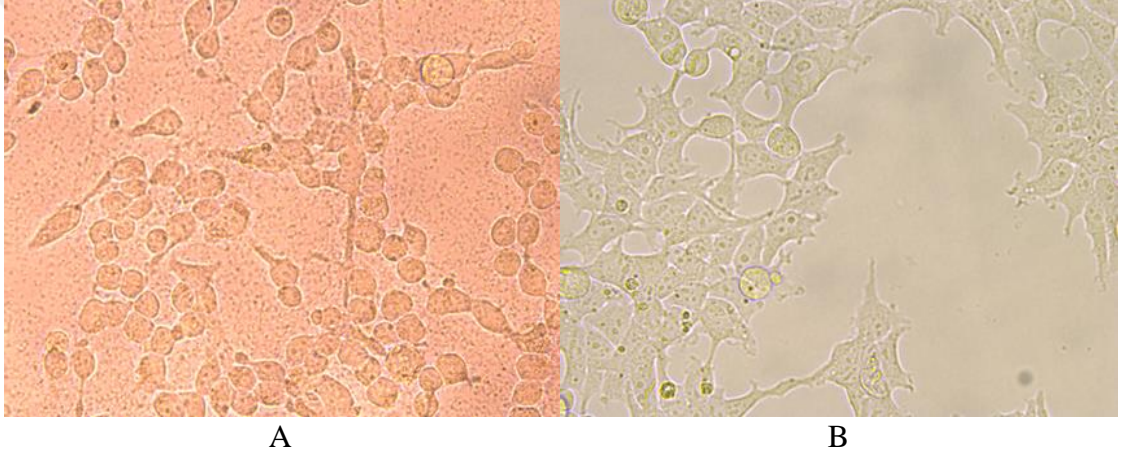
3.2.8. İstatistiksel analiz

Çalışmalardan elde edilen sayısal verilerin istatistiksel analizi, SPSS® Sürüm 20.0 ile gerçekleştirildi. Post Hoc LSD testi, İstatistiksel değerlendirme için Tek Yönlü Anova testi kullanılmış ve istatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. SH-SY5Y Hücre Hatının Normal Nöron Hücrelerine Dönüştürülmesi

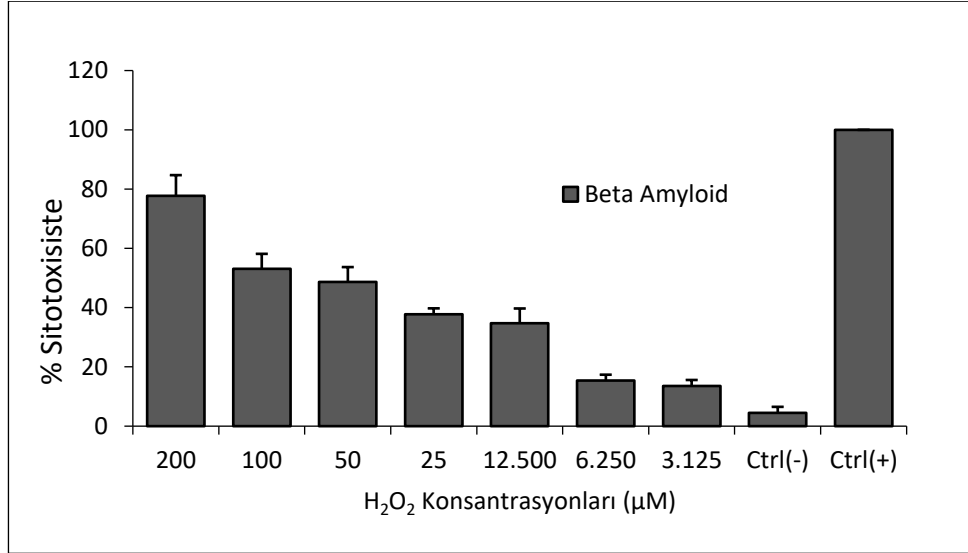
SH-SY5Y hücre hattı T25 flaska ekildi ve hücre kültürü flakslardaki yoğunluğu %80'e ulaşması için hücreler 7 gün inkübe edildi. Daha sonra nöroblastoma hücre hattı nöron benzeri hücre kültürü için 5 gün boyunca hücre kültürüne 10 mM all-trans retinoik asit (RA) ilave edildi. Sonuçlar incelendiğinde hücre hattında belirgin morfolojik değişimler gözlemlendi. İnverted mikroskop altında incelendiğinde hücreler daha düz ve dendrit/akson uzadığı gözlemlendi. Hücreler arasındaki temas ve iletişimin arttığı gözlemlendi.



Şekil 4.1. Farklılaşmamış ve farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinin morfolojik yapıları. **A-** RA içermeyen hücre kültürü, **B-** 10 mM RA uygulanmış hücre kültürü.

4.2. H₂O₂ Uygulamasına Karşı Hücre Canlılığı Testi

Dönüştürülmüş SH-SY5Y hücrelerinin H₂O₂ 'e karşı IC₅₀ değerlerini belirlemek için, çeşitli konsantrasyonlar (3.125-200 μ M) hücre kültürüne 24 saat ve 42 saat süresince uygulandı. Sonuçlar değerlendirildiğinde 24 saat süresince 100 μ M H₂O₂ ve 42 saat süresince 50 μ M H₂O₂ toplam hücre popülasyonlarının %50,8'ini öldürdüğü gözlemlendi.

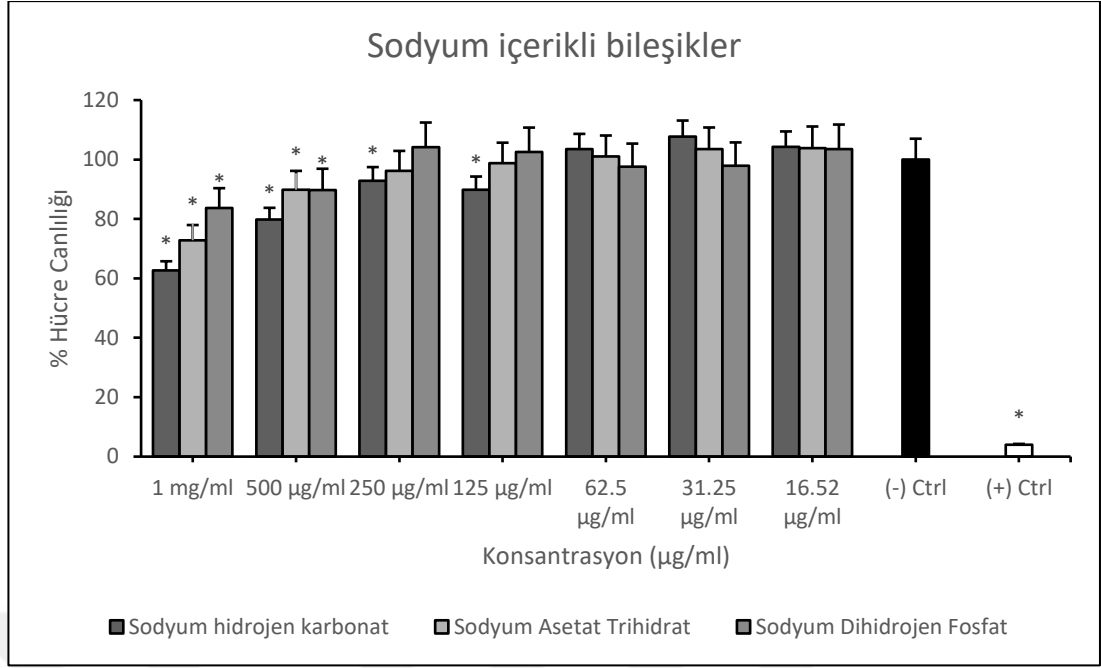


Şekil 4.2. Dönüştürülmüş SHSY-5Y hücre kültürüne H₂O₂ 24 saat uygulaması ile hücre canlılığı analizi.

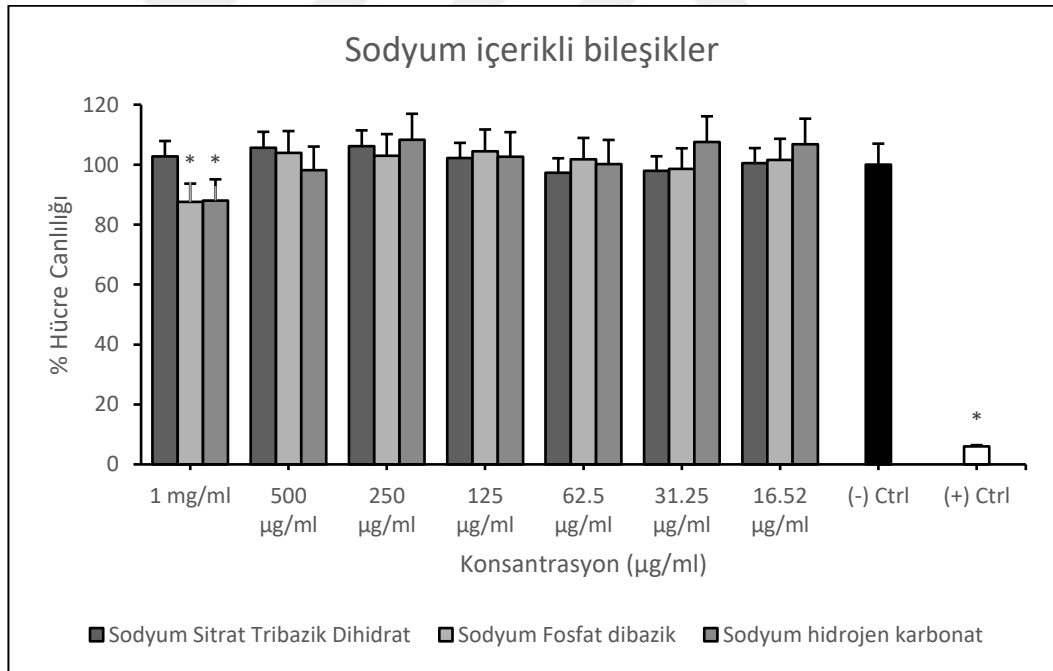
4.3. Sodyum ve Potasyumlu Bileşiklere Hücre Canlılığı Testi

Yapılan çalışma kapsamında ,sitotoksik ve olmayan aday moleküllerin belirlenmesi için hücre canlılık testi olan MTT analizi yapılmıştır.Sodyum hidrojen karbonat, Sodyum dihidrojen fosfat, sodyum fosfat dibazik, sodyum asetat trihidrat, sodyum sitrat tribazik dihidrat, sodyum dihidrojen karbonat, potasyum klorür, potasyum hidrojen fosfat, potasyum sodium tartarat'ın daha önceden belirlenmiş olan H₂O₂'ın IC50 değeri ile 9 aday olan bileşik belirlenen doz aralığında(1mg/ml-16,52µg/ml) test edildi. Yapılan MTT analiz sonucunda Sodyum Hidrojen Fosfat, Sodyum Sitrat Tirbazik Dihidrat, Sodyum Hidrojen Karbonat, Sodyum Fosfat Dibazik ve Potasyum Tartarat moleküllerinin belirli dozlarda (1mg/ml-16,52µg/ml) toksisiteye neden olmadığı bu yüzden nöron koruyucu özellikleri Alzheimer hastalığı modelinde denenebileceği belirlenmiştir.

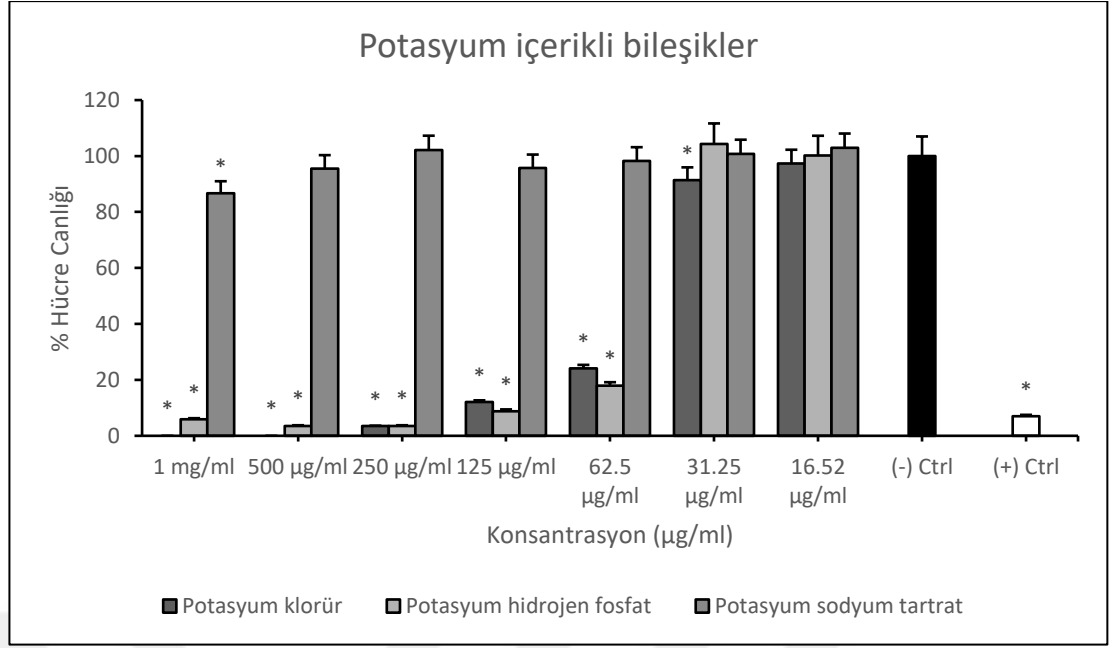
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA



Şekil 4.3. Sodyum içerikli bileşiklerin SH-SY5Y hücre kültüründe sitotoksik özelliklerinin MTT canlılık testiyle belirlenmesi.



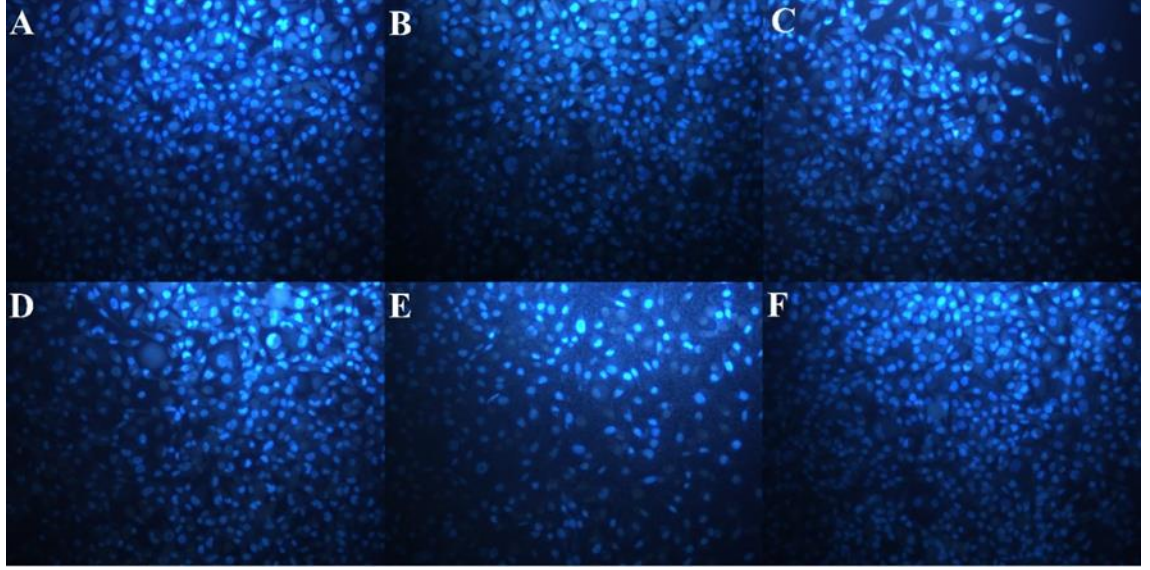
Şekil 4.4. Sodyum içerikli bileşiklerin SH-SY5Y hücre kültüründe sitotoksik özelliklerinin MTT canlılık testiyle belirlenmesi.



Şekil 4.5. Potasyum içerikli bileşiklerin SH-SY5Y hücre kültüründe sitotoksik özelliklerinin MTT canlılık testiyle belirlenmesi.

4.4. *In Vitro* AH Modelinde Sodyum ve Potasyumlu Bileşiklerin Uygulamasının Hoechst 33258 Floresan Boyama Sonuçları

Sodyum Hidrojen Fosfat, Sodyum Sitrat Tirbazik Dihidrat, Sodyum Hidrojen Karbonat, Sodyum Fosfat Dibazik ve Potasyum Tartarat'ın ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinin kromozom bütünlüğünü analiz etmek için Hoechst 33258 fluoesan boyama tekniği kullanıldı. Sodyum Hidrojen Fosfat, Sodyum Sitrat Tirbazik Dihidrat, Sodyum Hidrojen Karbonat, Sodyum Fosfat Dibazik ve Potasyum Tartarat'ın ilavesi, 24 saat ve 48 saat süresince genotoksik özellik göstermeği gözlemlenmiştir. Nükleer anomaliler bir floresan mikroskopu altında hesaplandı. Toplam 1.000 hücre sayıldı ve mutasyonlar belirlendi.



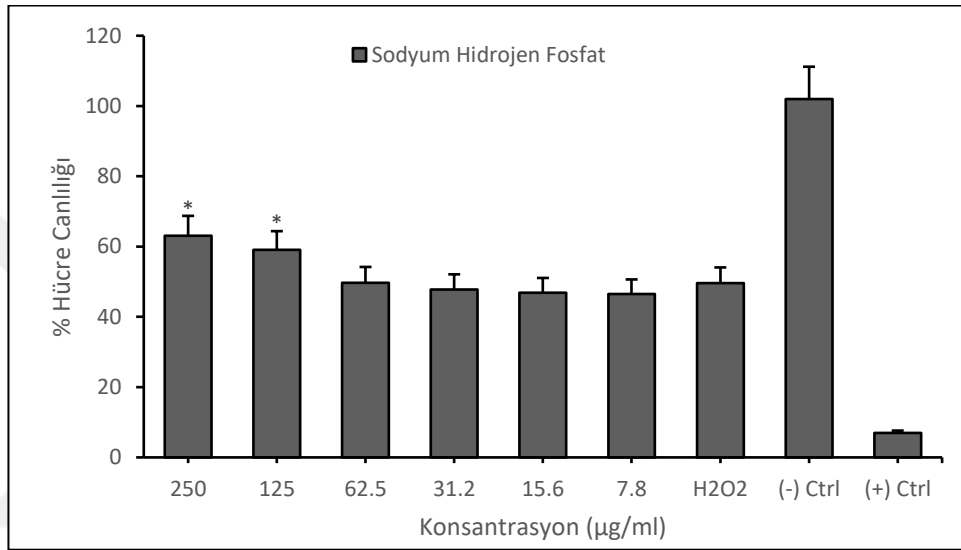
Şekil 4.6. A:Negatif kontrol, B:Sodyum hidrojen fosfat, C:Sodyum sitrat tirbazik dihidrat, D: Sodyum hidrojen karbonat, E:Sodyum fosfat dibazik, F: Potasyum tartarat.

Tablo 4.1. Potasyum ve sodyum içerikli bileşiklerin uygulanmasından sonra mikronükleus, loblu ve çentikli çekirdek anomali sayıları.

Bileşikler	Mikro Çekirdek	Loblu	Çentikli	Anomali sayısı/1000 hücre
Negatif kontrol	6	5	6	0,017±0,00119
Sodyum Hidrojen Fosfat	5	7	7	0,019±0,00133
Sodyum Sitrat Tirbazik Dihidrat	6	5	7	0,018±0,00126
Sodyum Hidrojen Karbonat	7	5	5	0,017±0,00119
Sodyum Fosfat Dibazik	8	6	6	0,020±0,00014
Potasyum Tartarat	6	5	4	0,015±0,00105

4.5. *In Vitro* AH Modelinde Sodyum Hidrojen Fosfat'ın Nöron Koruyucu Etkileri

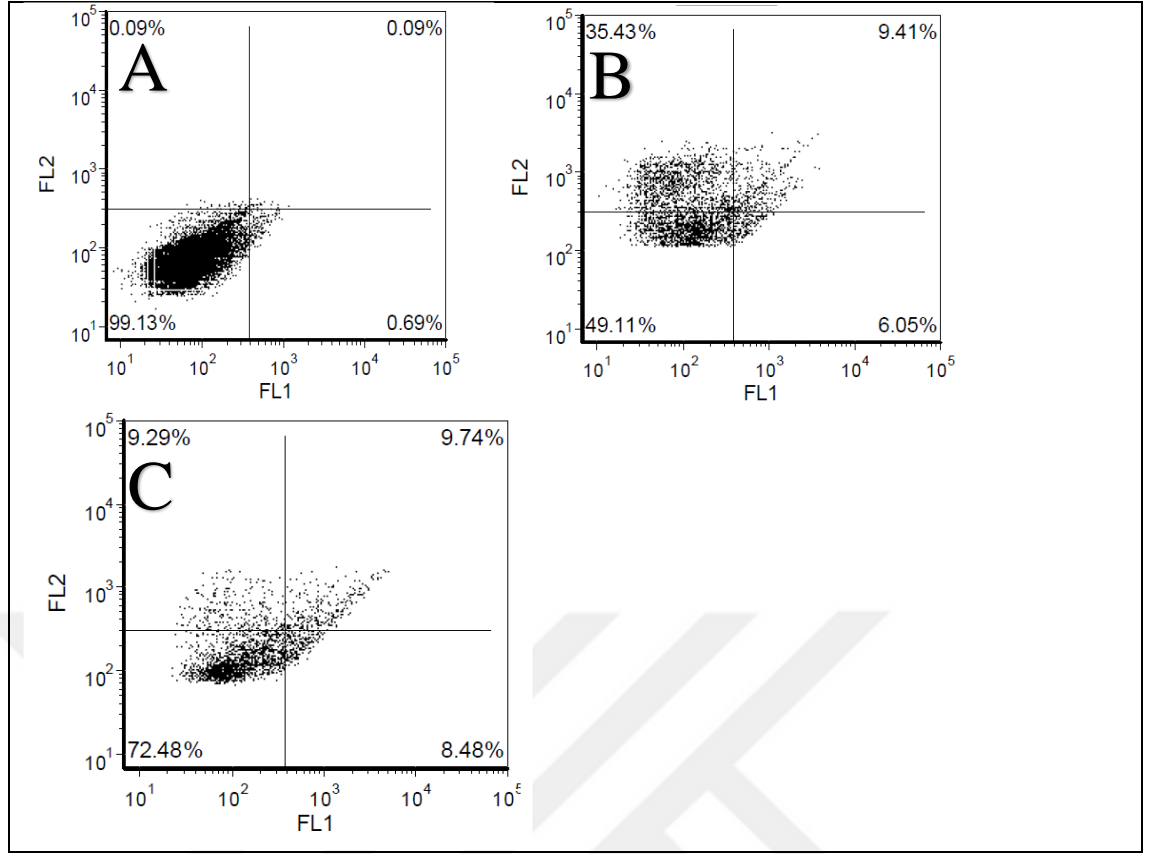
24 saat süresince 100 µM H₂O₂ uygulanan hücre hatlarına 7,8; 15,6; 31,2; 62,5; 125; 250 µg/ml konsantrasyonlarda Sodyum Hidrojen Fosfat ile muamele edilen SH-SY5Y hücre hattında nöron koruyucu etkinin 24 saat için molekülü 250 µg/ml konsantrasyon dışında 125 µg/ml konsantrasyon seviyesinde de hücre canlılığını uygulanmış H₂O₂ kıyasla önemli seviyelerde arttırdığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.7. Sodyum hidrojen karbonat molekülünün deneysel alzheimer hastalığı modelinde nöron korucu etkilerinin MTT hücre canlılık testiyle belirlenmesi.

4.6. *In Vitro* AH Modelinde Sodyum Hidrojen Fosfat Mumelesinin Flow Sitometrik Sonuçları

Sodyum Hidrojen Fosfat muamelesi ile 24 saat süresince H₂O₂ ilavesine karşı hücreler %72,48 yaşayabilirliğini arttırdı. H₂O₂ maruziyetinden kaynaklanan nekroz seviyeleri hem 24 saat süresince önemli ölçüde azalttığı gözlemlendi.



Şekil 4.8. Hücre ölümünü araştırmak için annexin V-FITC apoptosis Kit (Abcam®, BioVision, UK) analizi yapılmıştır. **A-** 24 saat süresince sadece SH-SY5Y hücreleri **B-** 24 saat süresince sadece H₂O₂ (100 uM) içeren hücre kültürü **C-** 24 saat süresince H₂O₂ (100 uM) + sodyum hidrojen fosfat (12,5 µg / ml).

4.7. *In Vitro* AH Modelinde Sodyum Hidrojen Fosfat Muamelesi Sonucunda Toplam Antioksidan Seviyeleri (TAS)/Toplam Oksidatif Stres (TOS) Seviyeleri ve Asetilkolinesteraz Aktivitesi Üzerine Etkileri

Sodyum Hidrojen Fosfat'ın nöron koruyucu etkisinin mekanizmaya olan katkısını anlamak için Toplam Antioksidan Kapasitesi (TAK) ve Toplam Oksidatif Stres (TOS) düzeyleri analiz edildi. Yapılan analiz sonucunda H₂O₂ uygulanması negatif kontrole göre oksidatif stresi artırarak antioksidasyon seviyesini önemli ölçüde düşürmüştür. Sodyum Hidrojen Fosfat muamelesi TAS ve TOS seviyesini negatif kontrole yakın seviyelere çekerek anlamlı bir sonuç göstermiştir.

Tablo 4.2 Sodyum hidrojen fosfat 24 saat tedavi edilen deneysel bir in vitro nörodejeneratif hastalık modelinde toplam antioksidan durumu (TAS) ve toplam oksidan durumu (TOS) seviyeleri. Çoklu karşılaştırma için one-way ANOVA, dunnett testleri kullanıldı. Aynı sütundaki farklı harfler, her bir değerden istatistiksel anlamlılık gösterir, $p < 0,05$.

Gruplar	TAS (mMTrolox Equiv./L)	TOS ($\mu\text{H}_2\text{O}_2$ Equiv./L)
(-) Kontrol	0,52±0,12 ^a	2,36±0,65 ^d
H ₂ O ₂	0,25±0,08 ^b	6,91±1,08 ^e
Sodyum Hidrojen Fosfat	0,71±0,18 ^a	2,62±0,43 ^d

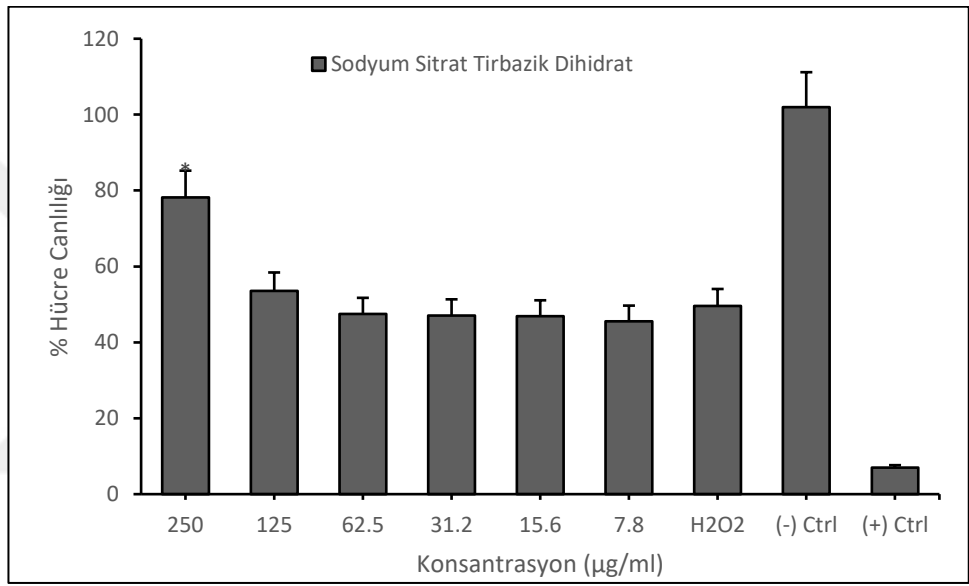
Bunun ile beraber Asetilkolinesteraz tahlili, Sodyum Hidrojen Fosfat 24 saat H₂O₂ etkileşimi sonrasında AChE düzeylerinde önemli ölçüde bir düşüş sağlayamadı.

Tablo 4.3. 24 saat boyunca sodyum hidrojen fosfat uygulamalarına göre in vitro nörodejeneratif hastalık modelinin asetilkolinesteraz aktivitesi ($\mu\text{u/ml}$). çoklu karşılaştırma için one-way ANOVA, dunnett testleri kullanıldı. Aynı sütundaki farklı harfler, her bir değerden istatistiksel anlamlılık gösterir, $p < 0,05$.

Gruplar	Asetilkolinesteraz aktivitesi ($\mu\text{u/ml}$)
(-) Kontrol	294,62±8,15 ^a
H ₂ O ₂	412,32±14,32 ^b
Sodyum Hidrojen Fosfat	350,52±11,42 ^c

4.8. *In Vitro* AD Modelinde Sodyum Sitrat Tribazik Dihidrat'ın Nöron Koruyucu Etkileri

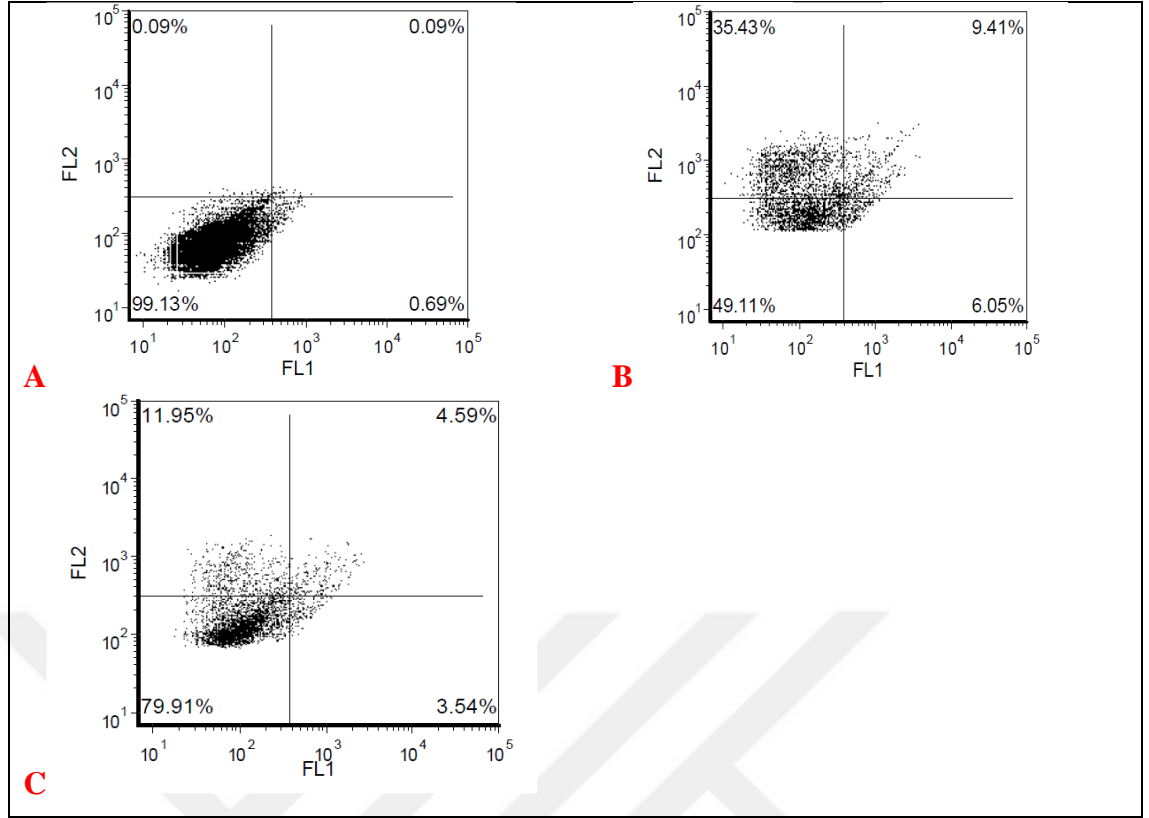
24 saat süresince 100 µM H₂O₂ uygulanan hücre hatlarına 7,8; 15,6; 31,2; 62,5; 125; 250 µg/ml konsantrasyonlarda Sodyum Sitrat Tribazik Dihidrat ile muamele edilen SH-SY5Y hücre hattında nöron koruyucu etkinin 24 saat için molekülü 250 µg/ml konsantrasyon seviyesinde hücre canlılığını uygulanmış H₂O₂ kıyasla önemli seviyelerde arttırdığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.9. Sodyum sitrat tribazik dihidrat molekülünün deneysel alzheimer hastalığı modelinde nöron korucu etkilerinin MTT hücre canlılık testiyle belirlenmesi.

4.9. *In Vitro* AH Modelinde Sodyum Sitrat Tribazik Dihidrat Muamelesinin Flov Sitometrik Sonuçları

Sodyum Sitrat Tribazik Dihidrat muamelesi ile 24 saat süresince H₂O₂ ilavesine karşı hücreler %79.91 yaşayabilirliğini arttırdı. Seçilen bileşikler arasında canlılık oranını en fazla artıran bileşik olduğu gözlemlendi. H₂O₂ maruziyetinden kaynaklanan nekroz seviyeleri hem 24 saat süresince önemli ölçüde azalttığı gözlemlendi.



Şekil 4.10. Hücre ölümünü araştırmak için annexin V-FITC apoptosis kit (Abcam®, BioVision, UK) analizi yapılmıştır. **A-** 24 saat süresince sadece SH-SY5Y hücreleri **B-** 24 saat süresince sadece H₂O₂ (100 uM) içeren hücre kültürü **C-** 24 saat süresince H₂O₂ (100 uM) + Sodyum Sitrat Tribazik (12,5 µg / ml).

4.10. *In Vitro* AH Modelinde Sodyum Sitrat Tribazik Dihidrat Muamelesi Sonucunda Toplam Antioksidan Seviyeleri (TAS)/Toplam Oksidatif Stres (TOS) Seviyeleri ve Asetilkolinesteraz Aktivitesi Üzerine Etkileri

Sodyum Sitrat Tribazik Dihidrat nöron koruyucu etkisinin mekanizmaya olan katkısını anlamak için Toplam Antioksidan Seviyesi (TAS) ve Toplam Oksidatif Stres (TOS) düzeyleri analiz edildi. Yapılan analiz sonucunda H₂O₂ uygulanması negatif kontrole göre oksidatif stresi artırarak antioksidasyon seviyesini önemli ölçüde düşürmüştür. Sodyum Sitrat Tribazik Dihidrat muamelesi TAS seviyesini negatif kontrole yakın biçimde yükseltirken TOS seviyelerinde önemli düşüş sağlamadı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Tablo 4.4. Sodyum Sitrat tirbazik dihidrat 24 saat tedavi edilen deneysel bir in vitro nörodejeneratif hastalık modelinde toplam antioksidan durumu (TAS) ve toplam oksidan durumu (TOS) seviyeleri. Çoklu karşılaştırma için one-way ANOVA, dunnett testleri kullanıldı. Aynı sütundaki farklı harfler, her bir değerden istatistiksel anlamlılık gösterir, $p < 0,05$.

Gruplar	TAS(mMTrolox Equiv./L)	TOS(μ H2O2 Equiv./L)
(-) Kontrol	0,52 \pm 0.12 ^a	2,36 \pm 0,65 ^d
H ₂ O ₂	0,25 \pm 0.08 ^b	6,91 \pm 1,08 ^e
Sodyum Sitrat Tirbazik Dihidrat	0,39 \pm 0.12 ^a	4,16 \pm 0,83 ^g

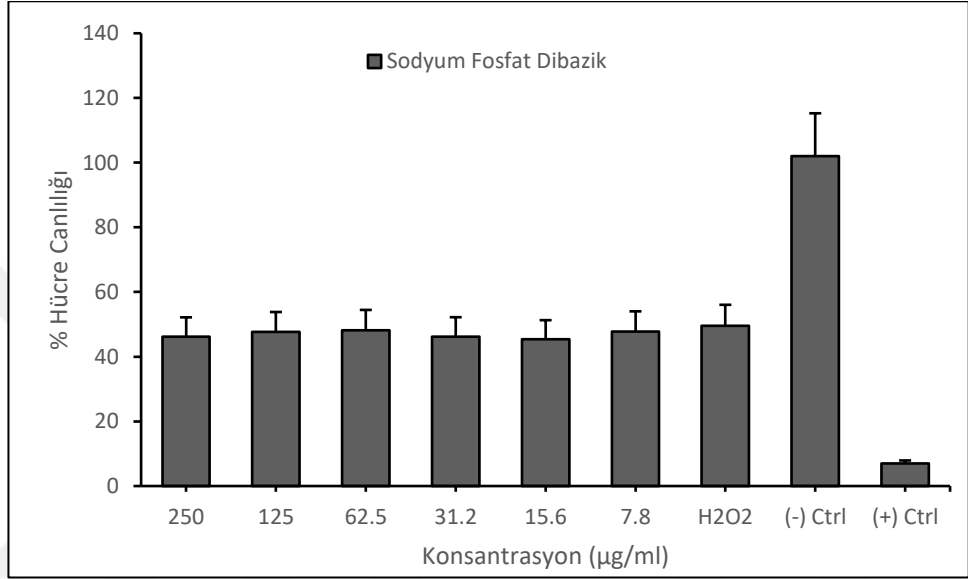
Bunun ile beraber Asetilkolinesteraz tahlili, Sodyum Sitrat Tribazik Dihidrat ile 24 saat H₂O₂ etkileşimi sonrasında ACHE düzeylerinde önemli ölçüde düşüş sağladığı gözlemlendi.

Tablo 4.5. Sodyum sitrat tirbazik 24 saat boyunca uygulamalarına göre in vitro nörodejeneratif hastalık modelinin Asetilkolinesteraz Aktivitesi (mu/ml). Çoklu karşılaştırma için one-way ANOVA, dunnett testleri kullanıldı. aynı sütundaki farklı harfler, her bir değerden istatistiksel anlamlılık gösterir, $p < 0,05$.

Groups	Asetilkolinesteraz aktivitesi (mu/ml)
(-) Kontrol	294,62 \pm 8,15 ^a
H ₂ O ₂	412,32 \pm 14,32 ^b
Sodyum Sitrat Tirbazik Dihidrat	325,18 \pm 9,65 ^a

4.11. *In Vitro* AD Modelinde Sodyum Fosfat Dibazik'in Nöron Koruyucu Etkileri

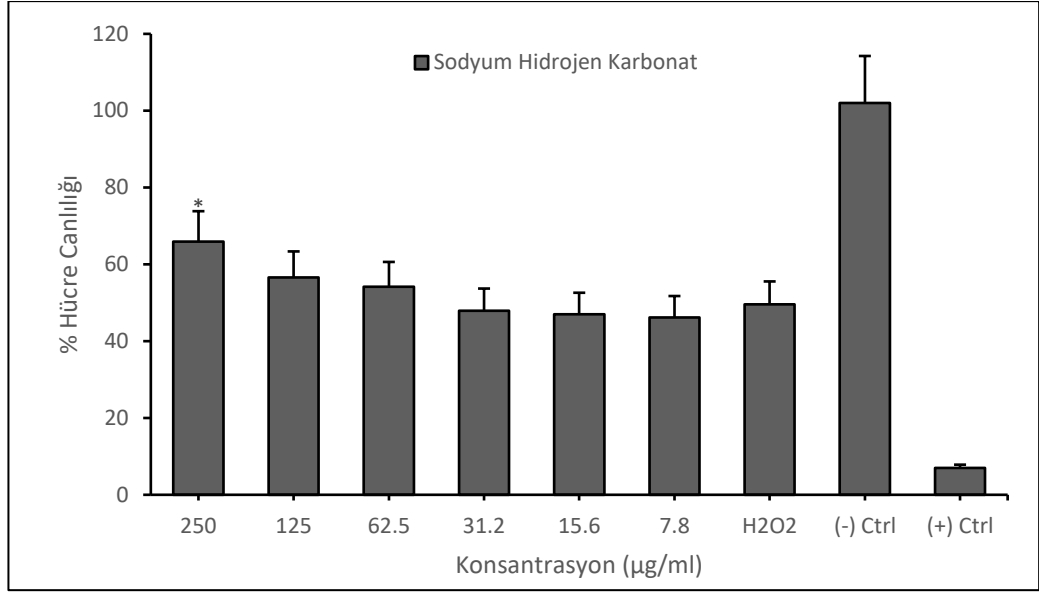
24 saat süresince 100 μM H_2O_2 uygulacak hücre hatlarına 7,8; 15,6; 31,2; 62,5; 125; 250 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda Sodyum Fosfat Dibazik ile muamele edilen SH-SY5Y hücre hattında hücre canlılığını uygulanmış H_2O_2 kıyasla seviyelerde koruyucu bir özellik göstermemiştir.



Şekil 4.11. Sodyum fosfat dibazik molekülünün deneysel alzheimer hastalığı modelinde nöron korucu etkilerinin MTT hücre canlılık testiyle belirlenmesi.

4.12. *In Vitro* AD Modelinde Sodyum Hidrojen Karbonat Nöron Koruyucu Etkileri

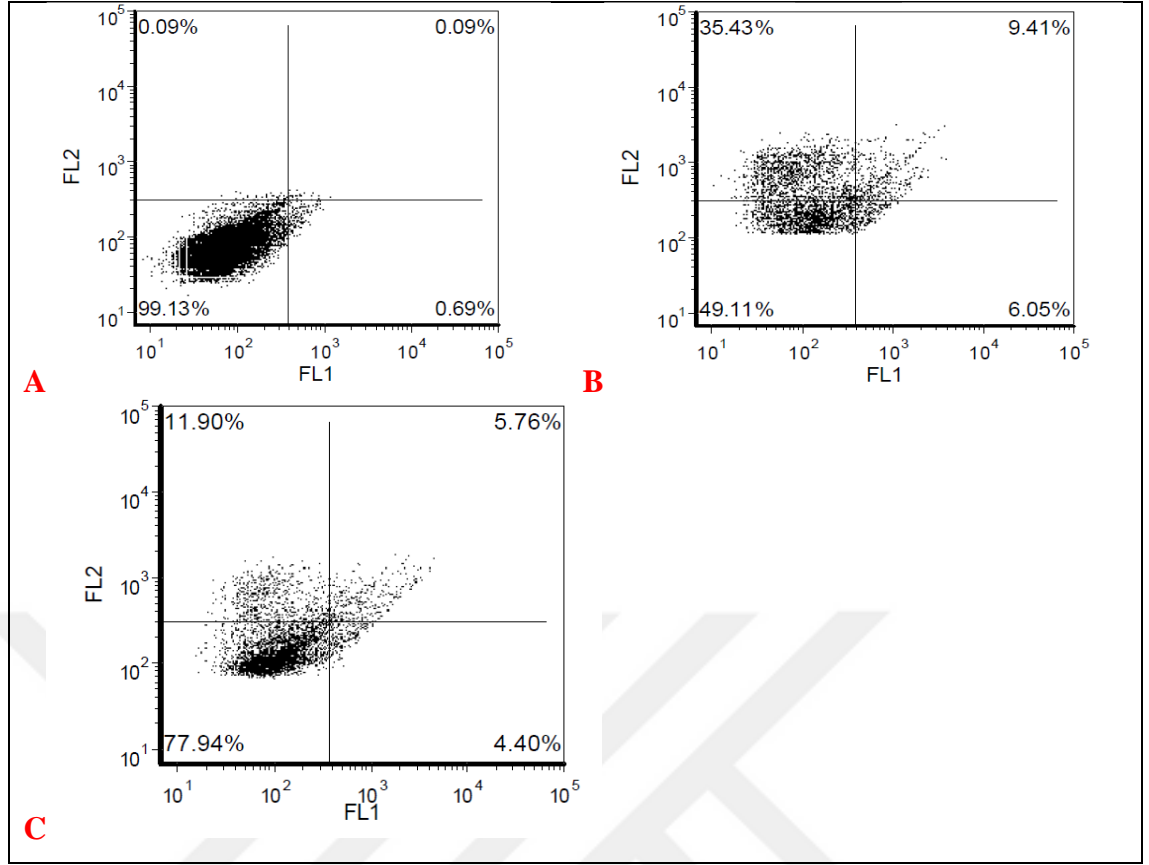
24 saat süresince 100 μM H_2O_2 uygulanacak hücre hatlarına 7,8; 15,6; 31,2; 62,5; 125; 250 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda Sodyum Hidrojen Karbonat ile muamele edilen SH-SY5Y hücre hattında nöron koruyucu etkinin 24 saat için molekülü 250 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon seviyesinde hücre canlılığını uygulanmış H_2O_2 kıyasla önemli seviyelerde arttırdığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.12. Sodyum hidrojen karbonat molekülünün deneysel Alzheimer hastalığı modelinde nöron korucu etkilerinin MTT hücre canlılık testiyle belirlenmesi.

4.13. *In Vitro* AH Modelinde Sodyum Hidrojen Karbonat Muamelesinin Flov Sitometrik Sonuçları

Sodyum Hidrojen Karbonat muamelesi ile 24 saat süresince H₂O₂ ilavesine karşı hücreler %77.94 yaşayabilirliğini arttırdı. H₂O₂ maruziyetinden kaynaklanan nekroz seviyeleri hem 24 saat süresince önemli ölçüde azalttığı gözlemlendi.



Şekil 4.13. Hücre ölümünü araştırmak için annexin V-FITC apoptosis Kit (Abcam®, BioVision, UK) analizi yapılmıştır. **A-** 24 saat süresince sadece SH-SY5Y hücreleri **B-** 24 saat süresince sadece H₂O₂ (100 µM) içeren hücre kültürü **C-** 24 saat süresince H₂O₂ (100 µM) + sodyum hidrojen karbonat (12,5 µg/ml).

4.14. *In Vitro* AH Modelinde Sodyum Hidrojen Karbonat Muamelesi Sonucunda Toplam Antioksidan Seviyeleri (TAS)/Toplam Oksidatif Stres (TOS) Seviyeleri ve Asetilkolinesteraz Aktivitesi Üzerine Etkileri

Sodyum Hidrojen Karbonat nöron koruyucu etkisinin mekanizmaya olan katkısını anlamak için Toplam Antioksidan Seviyesi (TAS) ve Toplam Oksidatif Stres (TOS) düzeyleri analiz edildi. Yapılan analiz sonucunda H₂O₂ uygulanması negatif kontrole göre oksidatif stresi artırarak antioksidasyon seviyesini önemli ölçüde düşürmüştür. Sodyum Hidrojen Karbonat muamelesi TAS seviyesini negatif kontrole yakın biçimde yükseltirken TOS seviyelerinde önemli düşüş sağlayamadı.

Tablo 4.6. Sodyum hidrojen karbonat 24 saat tedavi edilen deneysel bir *in vitro* nörodejeneratif hastalık modelinde toplam antioksidan durumu (TAS) ve toplam oksidan durumu (TOS) seviyeleri. Çoklu karşılaştırma için one-way ANOVA, dunnett testleri kullanıldı. Aynı sütundaki farklı harfler, her bir değerden istatistiksel anlamlılık gösterir, $p < 0,05$.

Gruplar	TAS (mM Trolox Equiv./L)	TOS (μ M H ₂ O ₂ Equiv./L)
(-) Kontrol	0,52±0,12 ^a	2,36±0,65 ^d
H ₂ O ₂	0,25±0,08 ^b	6,91±1,08 ^e
Sodyum Hidrojen Karbonat	0,47±0,13 ^a	3,87±0,78 ^f

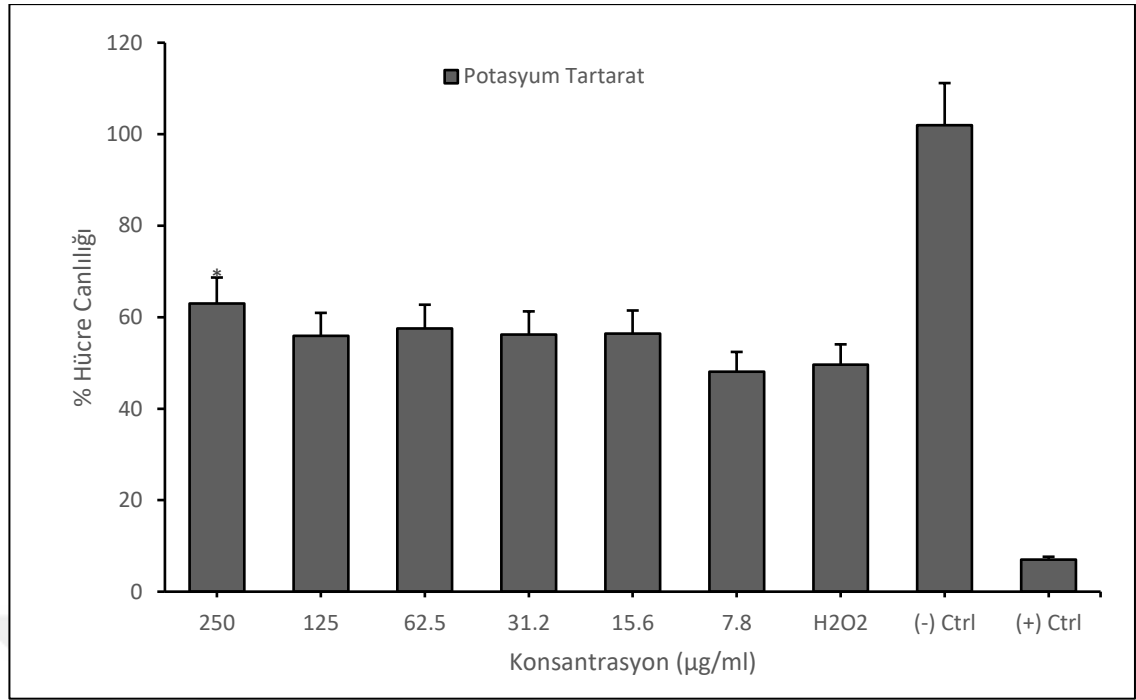
Bunun ile beraber Asetilkolinesteraz tahlili, Sodyum Hidrojen Karbonat ile 24 saat H₂O₂ etkileşimi sonrasında ACHE düzeylerinde önemli ölçüde düşüş sağlayamadığı gözlemlendi.

Tablo 4.7. Sodyum hidrojen karbonat 24 saat boyunca sodyum hidrojen fosfat uygulamalarına göre *in vitro* nörodejeneratif hastalık modelinin asetilkolinesteraz Aktivitesi (μ g/ml). Çoklu karşılaştırma için one-way ANOVA, dunnett testleri kullanıldı. Aynı sütundaki farklı harfler, her bir değerden istatistiksel anlamlılık gösterir, $p < 0,05$.

Gruplar	Asetilkolinesteraz aktivitesi (μ g/ml)
(-) Kontrol	294,62±8,15 ^a
H ₂ O ₂	412,32±14,32 ^b
Sodyum Hidrojen Karbonat	339,38±14,52 ^c

4.15. *In Vitro* AD Modelinde Potasyum Tartarat'ın Nöron Koruyucu Etkileri

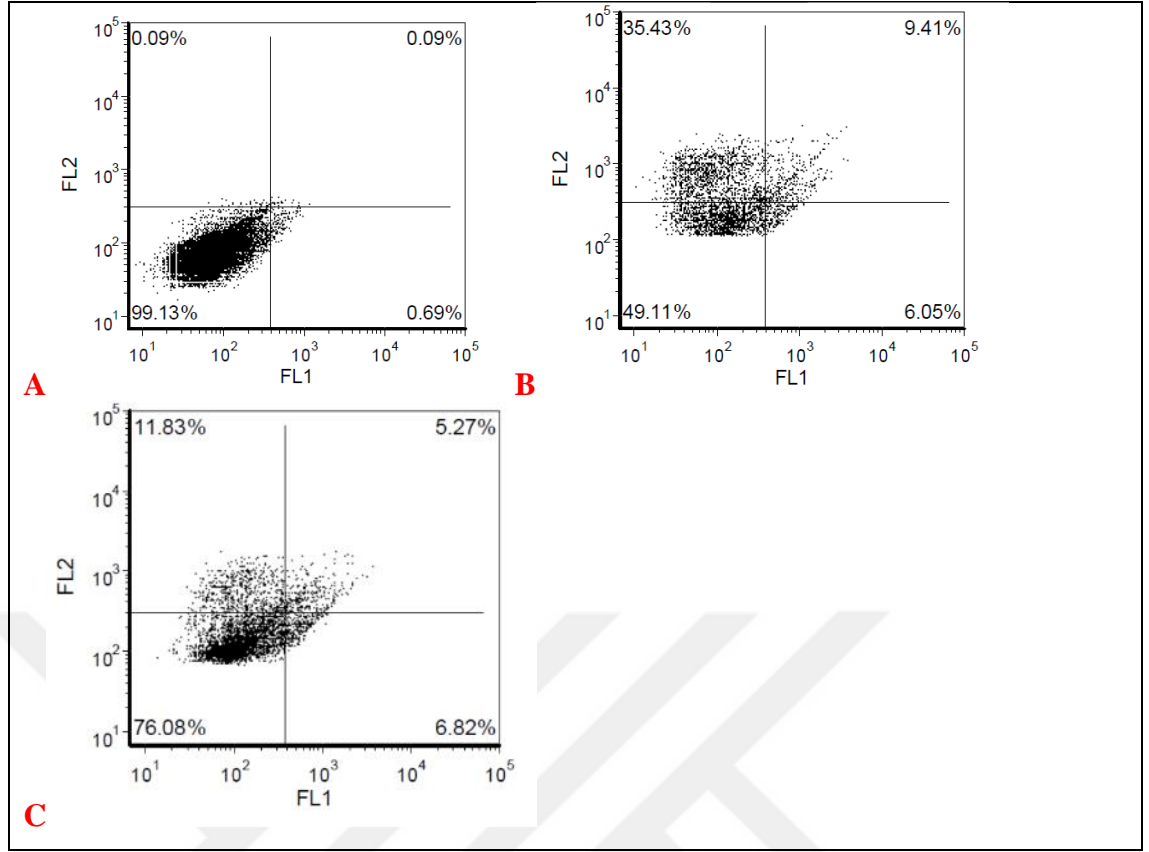
24 saat süresince 100 μ M H₂O₂ uygulanacak hücre hatlarına 7,8; 15,6; 31,2; 62,5; 125; 250 μ g/ml konsantrasyonlarda Potasyum Tartarat ile muamele edilen SH-SY5Y hücre hattında nöron koruyucu etkinin 24 saat için molekülü 250 μ g/ml konsantrasyon seviyesinde hücre canlılığını uygulanmış H₂O₂ kıyasla önemli seviyelerde arttırdığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.14. Potasyum tartarat molekülünün deneysel alzheimer hastalığı modelinde nöron korucu etkilerinin MTT hücre canlılık testiyle belirlenmesi.

4.16. *In Vitro* AH Modelinde Potasyum Tartarat Muamelesinin Flov Sitometrik Sonuçları

Potasyum Tartarat muamelesi ile 24 saat süresince H₂O₂ ilavesine karşı hücreler %77.94 yaşayabilirliğini arttırdı. H₂O₂ maruziyetinden kaynaklanan nekroz seviyeleri hem 24 saat süresince önemli ölçüde azalttığı gözlemlendi.



Şekil 4.15. Hücre ölümünü araştırmak için annexin V-FITC apoptosis kit (Abcam®, biovision, UK) analizi yapılmıştır. A- 24 saat süresince sadece SH-SY5Y hücreleri B- 24 saat süresince sadece H₂O₂ (100 µM) içeren hücre kültürü C- 24 saat süresince H₂O₂ (100 µM) + Potasyum Tartarat (12,5 µg / ml).

4.17. *In Vitro* AH Modelinde Potasyum Tartarat Muamelesi Sonucunda Toplam Antioksidan Seviyesi (TAS)/Toplam Oksidatif Stres (TOS) Seviyeleri ve Asetilkolinesteraz Aktivitesi Üzerine Etkileri

Potasyum Tartarat nöron koruyucu etkisinin mekanizmaya olan katkısını anlamak için Toplam Antioksidan Seviyesi (TAS) ve Toplam Oksidatif Stres (TOS) düzeyleri analiz edildi. Yapılan analiz sonucunda H₂O₂ uygulanması negatif kontrole göre oksidatif stresi artırarak antioksidasyon seviyesini önemli ölçüde düşürmüştür. Potasyum Tartarat muamelesi TAS seviyesini negatif kontrole yakın biçimde yükseltirken TOS seviyelerinde önemli düşüş sağlayamadı.

Tablo 4.8. Potasyum tartarat 24 saat tedavi edilen deneysel bir in vitro nörodejeneratif hastalık modelinde toplam antioksidan durumu (TAS) ve toplam oksidan durumu (TOS) seviyeleri. Çoklu karşılaştırma için one-way ANOVA, dunnett testleri kullanıldı. Aynı sütundaki farklı harfler, her bir değerden istatistiksel anlamlılık gösterir, $p < 0,05$.

Gruplar	TAS (mM Trolox Equiv./L)	TOS (μ M H ₂ O ₂ Equiv./L)
(-) Kontrol	0,52 \pm 0,12 ^a	2,36 \pm 0,65 ^d
H ₂ O ₂	0,25 \pm 0,08 ^b	6,91 \pm 1,08 ^e
Potasyum Tartarat	0,69 \pm 0,17 ^a	3,25 \pm 0,24 ^f

Bunun ile beraber Asetilkolinesteraz tahlili, Potasyum Tartarat ile 24 saat H₂O₂ etkileşimi sonrasında ACHE düzeylerinde önemli ölçüde düşüş sağlayamadığı gözlemlendi.

Tablo 4.9. Sodyum hidrojen karbonat 24 saat boyunca Sodyum hidrojen fosfat uygulamalarına göre in vitro nörodejeneratif hastalık modelinin Asetilkolinesteraz Aktivitesi (μ u/ml). Çoklu karşılaştırma için one-way ANOVA, dunnett testleri kullanıldı. Aynı sütundaki farklı harfler, her bir değerden istatistiksel anlamlılık gösterir.

Gruplar	Asetilkolinesteraz aktivitesi (μ u/ml)
(-) Control	294,62 \pm 8,15 ^a
H ₂ O ₂	412,32 \pm 14,32 ^b
Potasyum Tartarat	335,25 \pm 12,62 ^c

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Alzheimer hastalığı (AH), β -amiloid ($A\beta$) içeren hücre dışı plaklar ve tau içeren hücre içi nörofibriler yumaklar ile karakterize edilen nörodejeneratif bir hastalıktır. AH tipik olarak belirgin amnestik bilişsel bozulma ile kendini gösterir, ancak daha az sıklıkla amnestik olmayan bilişsel bozukluk olarak da ortaya çıkabilir. AH'lı hastalarda bilişsel bozukluğun şiddeti değişir. En erken belirtiler, nesnel bilişsel testlerde bozulmuş performans olmadığında, zihinsel yeteneklerde öznel bir düşüş olmasıyla ifade edilir (Jessen et al. 2014). Hafif bilişsel bozukluk (HBB), tek bir bilişsel alanın veya muhtemelen birden fazla bilişsel alanın en azından hafif bir ölçüde bozulduğu ve işlevsel kapasitelerin nispeten korunduğu bilişsel bozukluğun en erken semptomatik aşamasını ifade eder (Petersen, 2004). Buna karşılık bunama, bağımsızlığı bozmaya ve günlük yaşamı etkilemeye yetecek büyüklükte bilişsel bozukluk olarak tanımlanır. Belirgin amnestik semptom ve bulgularla birlikte kademeli başlangıçlı ve devam eden ilerlemeli demans, AH'nın prototipik klinik fenotipidir (McKhann et al. 2011b). AH başlangıçta klinikopatolojik bir varlık olarak kabul edilir, yani hasta bir amnestik demansın klinik sendromunu yerine getirirse ve diğer koşullar dışlanırsa, nedenin AH patolojisi olduğu varsayılabilir (Petersen 2018).

Yapılan çalışmada seçilen sodyum ve potasyumlu bileşiklerin nöron koruyucu etkileri farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre hattında incelenmiştir. SH-SY5Y hücre hattı nöroloji araştırmalarında en sık kullanılan hücre dizilerinden birdir. Yaptığımız çalışmada farklılaşmamış SH-SY5Y hücre hattına 7 gün boyunca retinoik asit uygulanarak hücrelerin nöron benzeri hücrelere dönüşümü gerçekleştirildi. Seçilen Sodyum hidrojen karbonat, Sodyum dihidrojen fosfat, sodyum fosfat dibazik, sodyum asetat trihidrat, sodyum sitrat tribazik dihidrat, sodyum hidrojen karbonat, potasyum klorür, potasyum hidrojen fosfat, potasyum sodyum tartarat bileşiklerin hücre canlılık testleri MTT analizi ile belirlendi. Önceden belirlenen H_2O_2 'ın IC_{50} değeri ile 9 aday olan bileşik belirlenen doz aralığında (1mg/ml-16.52 μ g/ml) test edildi. Yapılan MTT analiz sonucunda Sodyum Hidrojen Fosfat, Sodyum Sitrat Tribazik Dihidrat, Sodyum Hidrojen Karbonat, Sodyum Fosfat Dibazik ve Potasyum Tartarat moleküllerinin belirli dozlarda (1mg/ml-16.52 μ g/ml) toksisiteye neden olmadığı bu yüzden nöron koruyucu özellikleri Alzheimer hastalığı modelinde denenebileceği belirlendi. Yapılan çalışmalar sonucunda sırasıyla

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

sodyum hidrojen fosfat, sodyum hidrojen karbonat, sodyum sitrat tribazik dihidrat ve potastum tartarat moleküllerinin 250 µg/ml konsantrasyona 24 saatlik inkübasyon sonucunda koruyucu etki göstermiştir. Sodyum hidrojen fosfat molekülü 250 µg/ml konsantrasyon dışında 125 µg/ml konsantrasyon seviyesinde de hücre canlılığını 24 saat boyunca canlılığı koruyucu etki göstermiştir.

Yapılan Flov sitometri sonuçları H₂O₂ 'nin hücre canlılığı ve nekrotik özelliklerini ortaya çıkarmıştır. Yapılan bazı çalışmalar ortaya koymuştur ki β-amiloid peptidinin oluşumu apoptotik bir yoldan ziyade nekrotik bir yolak ile oluştuğu ortaya konulmuştur (Akama and Van Eldik 2000). Yapılan bu çalışma ışığında uygulanan sodyum hidrojen fosfat uygulaması nekrozu 24 saat sonunda %9,29' a kadar azaltabileceği gösterilmiştir. Yine sodyum hidrojen karbonat'ın 24 saatlik uygulaması sonucunda nekrozu %11, 90' e kadar azaltabileceği ortaya konmuştur. Sodyum sitrat tribazik dihidrat'ın 24 saatlik uygulaması sonucunda nekrozu %11, 95' düşürdüğü göstermiştir. Potastum tartarat'24 saatlik uygulanması sonucunda ise nekroz oranı %11,83'e kadar düşürdüğü gözlemlenmiştir. Sodyum ve potasyumlu bileşiklerle yapılan çalışmalar nekrozu önleme ve kromozom bütünlüğünü korumaya yönelik etkileri Hoechst 33258 florasan boyama ile test edilmiştir. Sağlıklı hücreler ve sağlam çekirdek yapılarında önemli ölçüde artışın gerçekleştiğini yapılan çalışmalar ile gözler önüne serilmiştir.

Yaptığımız çalışmada H₂O₂ toksisitesine karşı, Sodyum Hidrojen Fosfat, Potasyum Tartarat, Sodyum Sitrat Tirbazik Dihidrat, Sodyum Hidrojen Karbonat uygulamaları açısından farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre kültürlerinde antioksidan ve oksidatif stres koşullarını analiz etmek için Toplam Antioksidan Durumu (TAS) ve Toplam Oksidan Durumu (TOS) tanestleri yapılmıştır. H₂O₂ uygulanması negative kontrole göre oksidatif stresi artırarak antioksidasyon seviyesini önemli ölçüde düşürmüştür. Sodyum Hidrojen Fosfat, Potasyum Tartarat, Sodyum Sitrat Tirbazik Dihidrat, Sodyum Hidrojen Karbonat uygulamaları toplam antioksidan seviyelerini negatif kontrol seviyelerine yükseltmiştir. Seçilen bileşiklerden sadece Sodyum Hidrojen Fosfat oksidatif stresi negative kontrol seviyesine düşürdüğü gözlemlendi.Yapılan çalışmaları desteklemek adına asetilkolin esteraz aktite analizi yapılmıştır. Asetilkolinesteraz (AChE) aktiviteleri, Sodyum Hidrojen Fosfat, Potasyum Tartarat, Sodyum Sitrat Tirbazik Dihidrat, Sodyum Hidrojen Karbonat uygulamaları hücresel AH

modelinde denendi. Negatif kontolle kıyaslandığında bileşiklerin farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre kültürlerinde AChE aktivitelerini önemli ölçüde değiştirmedeği gözlemlendi. Öte yandan, H₂O₂ uygulandığında negatif kontrole karşılaştırıldığında farklılaşmış hücre kültürlerinde AChE aktivitesini önemli ölçüde artırmıştır (294,62±98,15 mu/ml'den 412,32±14,32 mu/ml'ye). Ayrıca H₂O₂ bileşiği içeren hücre kültürlerine Sodyum Hidrojen Fosfat, Sodyum Hidrojen Karbonat, Potasyum Tartarat uygulandığında H₂O₂ AChE inhibitör özelliklerini işlenmemiş koşullarda iyileştirebildiği gözlemlendi.

Sonuçlar değerlendirildiğinde, seçilen sodyum ve potasyumlu bileşiklerin H₂O₂ toksisitesine karşı bir nöroprotektif etkisi olduğu gösterilmiştir. Farklılaşmış SH-SY5Y hücre kültüründe H₂O₂ sitotoksitesini önemli ölçüde azalttığı göstermiş olduk. H₂O₂ neden olduğu nekrozu seçilen sodyum ve potasyumlu bileşiklerle önemli ölçüde azalttığını gösterdik. Alzheimer hastalığında artan asetilkolinesteraz aktivitesi seçilen sodyum ve potasyumlu bileşiklerin uygulaması ile inhibe edilebileceği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar tam olarak etki mekanizmalarını ortaya koymamakta. Seçilen bileşiklerin Sodyum/Kalsiyum değiştiricilere olan etki mekanizmasını ortaya koymak. ER, bir A β üretim bölgesi tanımlanmıştır, bu nedenle ER Ca⁺² homeostazındaki bozukluklar ve bunun sonucunda ER işlev bozukluğu, APP'nin patolojik işlenmesine ve A β seviyelerinin artmasına neden olabilir (Paschen 2001).Seçtiğimiz sodyumlu bileşiklerin hücre hattına uygulanması ile hücre içinde sodyumun hücre içinde kalsiyum ile sodyum/kalsiyum değiştiriciler sayesinde hücre içi kalsiyum hemostazını dengeleyerek APP'nin patolojik işlenmesini engelleyerek nöron hücrelerini nekroza gitmesini engellediğini düşünmekteyiz. Yapılan bazı çalışmalarda Alzheimer olan hastaların nöron hücrelerinde NCX'lerin artması bunu bize düşündürmüştür. Pedro Cisternas ve ark 2014 yılında; Bugüne kadar, AH'nın başlangıcı ve ilerlemesi, hipertansiyon ve diyabet gibi patolojilerle ilişkilendirilmiştir. K⁺ alımındaki bir artışın belirli nöropatolojik belirteçlerin ekspresyonunu veya bir fare modelinin bilişsel performansını etkileyip etkilemediğini incelenmiştir. K⁺ alımındaki bir artışın A β peptidinin kümelenme modelinde bir değişikliğe yol açtığını gözlemlenmiş ve tau fosforilasyonunun bazı epitoplarda kısmi bir azalma ve bilişsel performansta iyileşme gözlemlenmiştir. Bu bilgiler ışığında hücre içine potasyum alımının artması AH için tedavi edici özellikte olabileceği düşünülmüştür.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

İlerleyen aşamalarda gen seviyesinde yapılacak olan çalışmalar kullanılan bileşiklerin etki mekanizmaları daha rahat anlaşılacaktır. Ayrıca gen seviyesindeki araştırmalar fare uygulamalarıyla desteklenerek ilaç olarak kullanımı uygun olup olmadığı araştırılacaktır.



KAYNAKLAR

- Agnew, W. S., Levinson, S. R., Brabson, J. S. and Raftery, M. A. 1978. Purification of the tetrodotoxin-binding component associated with the voltage-sensitive sodium channel from *Electrophorus electricus* electroplax membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(6), 2606–2610.
- Alabi, A. A., Bahamonde, M. I., Jung, H. J., Kim, J. Il and Swartz, K. J. 2007. Portability of paddle motif function and pharmacology in voltage sensors. *Nature*, 450(7168), 370–375.
- Alberdi, E., Wyssenbach, A., Alberdi, M., Sánchez-Gómez, M. V, Cavaliere, F., Rodríguez, J. J. and Matute, C. 2013. Ca(2+) -dependent endoplasmic reticulum stress correlates with astrogliosis in oligomeric amyloid β -treated astrocytes and in a model of Alzheimer's disease. *Aging Cell*, 12(2), 292–302.
- Albert, M. S., DeKosky, S. T., Dickson, D., Dubois, B., Feldman, H. H., Fox, N. C. and Phelps, C. H. 2011. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 7(3), 270–279.
- Alonso, A. del C., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K. 1996. Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nature Medicine*, 2(7), 783–787.
- Andreadis, A. 2005. Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1739(2–3), 91–103.
- Anonim, 2015. Web Sitesi: <http://www.wtuik.gov.tr>, Erişim Tarihi: 06.11.2022
- Anonymous, 2018. Web Sitesi: <http://www.alz.org>, Erişim Tarihi: 05.12.2022
- Annunziato, L., Pignataro, G., Di Renzo, G. F. 2004. Pharmacology of brain Na^+ / Ca^{2+} exchanger: from molecular biology to therapeutic perspectives. *Pharmacological Reviews*, 56(4), 633–654.
- Armstrong, C. M., Hille, B. 1998. Voltage-Gated ion channels and electrical excitability. *Neuron*, 20(3), 371–380.
- Atri, A. 2019. Current and future treatments in Alzheimer's disease. *Seminars in Neurology*, 39(02), 227–240.
- Barron, M., Gartlon, J., Dawson, L. A., Atkinson, P. J. and Pardon, M.-C. 2017. A state of delirium: Deciphering the effect of inflammation on tau pathology in Alzheimer's disease. *Experimental Gerontology*, 94, 103–107.

- Bateman, R. J., Xiong, C., Benzinger, T. L. S., Fagan, A. M., Goate, A., Fox, N. C. and Morris, J. C. 2012. Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*, 367(9), 795–804.
- Bean, B. P. 2007. The action potential in mammalian central neurons. *Neuroscience*, 8(6), 451–465.
- Bekris, L. M., Yu, C.-E., Bird, T. D. and Tsuang, D. W. 2010. Genetics of Alzheimer disease. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology*, 23(4), 213–227.
- Berchtold, N. C., Cotman, C. W. 1998. Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer's disease: Greco-Roman period to the 1960s. *Neurobiology of Aging*, 19(3), 173–189.
- Bers, D. M. 2002. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 415(6868), 198–205.
- Black, J. A., Waxman, S. G. 2013. Noncanonical roles of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 80(2), 280–291.
- Blaustein, M. P. 1976. The ins and outs of calcium transport in squid axons: internal and external ion activation of calcium efflux. *Federation Proceedings*, 35(14), 2574–2578.
- Blaustein, M. P., Lederer, W. J. 1999. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiological Reviews*, 79(3), 763–854.
- Bodea, L., Eckert, A., Ittner, L. M., Piguat, O. and Götz, J. 2016. Tau physiology and pathomechanisms in frontotemporal lobar degeneration. *Journal of Neurochemistry*, 138(S1), 71–94.
- Boller, F., Forette, F. 1989. Alzheimer's disease and THA: a review of the cholinergic theory and of preliminary results. *Biomedecine & Pharmacotherapie*, 43(7), 487–491.
- Bosmans, F., Martin-Eauclaire, M.-F., Swartz, K. J. 2008. Deconstructing voltage sensor function and pharmacology in sodium channels. *Nature*, 456(7219), 202–208.
- Brier, M. R., Gordon, B., Friedrichsen, K., McCarthy, J., Stern, A., Christensen, J. and Ances, B. M. 2016. Tau and A β imaging, CSF measures, and cognition in Alzheimer's disease. *Science Translational Medicine*, 8(338), 338ra66.
- Brion, J. P., Smith, C., Couck, A. M., Gallo, J. M. and Anderton, B. H. 1993. Developmental changes in tau phosphorylation: fetal tau is transiently phosphorylated in a manner similar to paired helical filament-tau characteristic of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 61(6), 2071–2080.
- Buckingham, S., Kidd, J., Law, R., Franks, C., Sattelle, D. 2005. Structure and function of two-pore-domain K channels: contributions from genetic model organisms. *Trends in Pharmacological Sciences*, 26(7), 361–367.

- Cacace, R., Slegers, K., Van Broeckhoven, C. 2016. Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of The Alzheimer's Association*, 12(6), 733–748.
- Calero, M., Gómez-Ramos, A., Calero, O., Soriano, E., Avila, J. and Medina, M. 2015. Additional mechanisms conferring genetic susceptibility to Alzheimer's disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 138.
- Catterall, W A. 1991. Excitation-contraction coupling in vertebrate skeletal muscle: a tale of two calcium channels. *Cell*, 64(5), 871–874.
- Catterall, William A. 2014. Structure and function of voltage-gated sodium channels at atomic resolution. *Experimental Physiology*, 99(1), 35–51.
- Catterall, William A, Few, A. P. 2008. Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. *Neuron*, 59(6), 882–901.
- Catterall, William A, Goldin, A. L., Waxman, S. G. 2005. International union of pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4), 397–409.
- Choe, S. 2002. Potassium channel structures. *Neuroscience*, 3(2), 115–121.
- Cisternas, P., Lindsay, C. B., Salazar, P., Silva-Alvarez, C., Retamales, R. M., Serrano, F. G. and Inestrosa, N. C. 2015. The increased potassium intake improves cognitive performance and attenuates histopathological markers in a model of Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1852(12), 2630–2644.
- Clark, C. M., Schneider, J. A., Bedell, B. J., Beach, T. G., Bilker, W. B., Mintun, M. A. and AV45-A07 Study Group. 2011. Use of florbetapir-PET for imaging beta-amyloid pathology. *JAMA*, 305(3), 275–283.
- Congdon, E. E., Kim, S., Bonchak, J., Songrug, T., Matzavinos, A., Kuret, J. 2008. Nucleation-dependent tau filament formation: the importance of dimerization and an estimation of elementary rate constants. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(20), 13806–13816.
- Corcoran, N. M., Martin, D., Hutter-Paier, B., Windisch, M., Nguyen, T., Nheu, L. and Hovens, C. M. 2010. Sodium selenate specifically activates PP2A phosphatase, dephosphorylates tau and reverses memory deficits in an Alzheimer's disease model. *Journal of Clinical Neuroscience*, 17(8), 1025–1033.
- Couch, M. J., Blasiak, B., Tomanek, B., Ouriadov, A. V., Fox, M. S., Dowhos, K. M. and Albert, M. S. 2015. Hyperpolarized and Inert Gas MRI: The Future. *Molecular Imaging and Biology*, 17(2), 149–162.
- Coulson, E. J., Paliga, K., Beyreuther, K. and Masters, C. L. 2000. What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function. *Neurochemistry International*, 36(3), 175–184.

- Cripps, D., Thomas, S. N., Jeng, Y., Yang, F., Davies, P. and Yang, A. J. 2006. Alzheimer disease-specific conformation of hyperphosphorylated paired helical filament-Tau is polyubiquitinated through Lys-48, Lys-11, and Lys-6 ubiquitin conjugation. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(16), 10825–10838.
- de Lera Ruiz, M., Kraus, R. L. 2015. Voltage-Gated sodium channels: structure, function, pharmacology, and clinical indications. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(18), 7093–7118.
- De Meyer, G. 2010. Diagnosis-independent Alzheimer disease biomarker signature in cognitively normal elderly people. *Archives of Neurology*, 67(8), 949.
- Douaud, G., Jbabdi, S., Behrens, T. E. J., Menke, R. A., Gass, A., Monsch, A. U. and Smith, S. 2011. DTI measures in crossing-fibre areas: increased diffusion anisotropy reveals early white matter alteration in MCI and mild Alzheimer's disease. *NeuroImage*, 55(3), 880–890.
- Dubois, B., Feldman, H. H., Jacova, C., Hampel, H., Molinuevo, J. L., Blennow, K. and Cummings, J. L. 2014. Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *The Lancet Neurology*, 13(6), 614–629.
- Duce, J. A., Tsatsanis, A., Cater, M. A., James, S. A., Robb, E., Wikke, K. and Bush, A. I. 2010. Iron-export ferroxidase activity of β -amyloid precursor protein is inhibited by zinc in Alzheimer's disease. *Cell*, 142(6), 857–867.
- Elman, J. A., Oh, H., Madison, C. M., Baker, S. L., Vogel, J. W., Marks, S. M. and Jagust, W. J. 2014. Neural compensation in older people with brain amyloid- β deposition. *Nature Neuroscience*, 17(10), 1316–1318.
- Ferri, C. P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L. and Ganguli, M. 2005. Alzheimer's disease international global prevalence of Dementia: a Delphi consensus study. *Lancet (London, England)*, 366(9503), 2112–2117.
- Flavell, S. W., Greenberg, M. E. 2008. Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. *Annual Review of Neuroscience*, 31, 563–590.
- Forette, F. 1989. Reliability of clinical criteria for the diagnosis of Dementia. *Archives of Neurology*, 46(6), 646.
- Gerkau, N. J., Rakers, C., Durry, S., Petzold, G. C. and Rose, C. R. 2018. Reverse NCX attenuates cellular sodium loading in metabolically compromised cortex. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 28(12), 4264–4280.
- Gordon, B. A., Friedrichsen, K., Brier, M., Blazey, T., Su, Y., Christensen, J. and Benzinger, T. L. S. 2016. The relationship between cerebrospinal fluid markers of Alzheimer pathology and positron emission tomography tau imaging. *Brain : a Journal of Neurology*, 139, 2249–2260.
- Götz, J., Bodea, L.-G., Goedert, M. 2018. Rodent models for Alzheimer disease. *Nature Reviews, Neuroscience*, 19(10), 583–598.

- Govindarajan, N., Agis-Balboa, R. C., Walter, J., Sananbenesi, F. and Fischer, A. 2011. Sodium butyrate improves memory function in an Alzheimer's disease mouse model when administered at an advanced stage of disease progression. *Journal of Alzheimer's Disease*, 26(1), 187–197.
- Haass, C., Lemere, C. A., Capell, A., Citron, M., Seubert, P., Schenk, D. and Selkoe, D. J. 1995. The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nature Medicine*, 1(12), 1291–1296.
- Halawany, A. M. El, Sayed, N. S. EL, Abdallah, H. M. and Dine, R. S. El. 2017. Protective effects of gingerol on streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's disease: emphasis on inhibition of β -amyloid, COX-2, alpha-, beta - secretases and A β 1a. *Scientific Reports*, 7(1), 2902.
- Hanger, D. P., Lau, D. H. W., Phillips, E. C., Bondulich, M. K., Guo, T., Woodward, B. W. and Noble, W. 2014. Intracellular and extracellular roles for tau in neurodegenerative disease. *Journal of Alzheimer's Disease* . 40(1),37-45.
- Hardy, J., Selkoe, D. J. 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5580), 353–356.
- Herrup, K. 2010. Reimagining Alzheimer's disease--an age-based hypothesis. *Journal of Neuroscience*, 30(50), 16755–16762.
- Hodgkin, A. L., Huxley, A. F. 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of physiology*, 117(4), 500–544.
- Hu, Y., Zhou, K.-Y., Wang, Z., Lu, Y. and Yin, M. 2017. N-stearoyl-1-Tyrosine inhibits the cell senescence and apoptosis induced by H₂O₂ in HEK293/Tau cells via the CB2 receptor. *Chemico-Biological Interactions*, 272, 135–144.
- Hyman, B. T., Phelps, C. H., Beach, T. G., Bigio, E. H., Cairns, N. J., Carrillo, M. C. and Montine, T. J. 2012. National institute on aging–Alzheimer's association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 8(1), 1–13.
- Iwatsubo, T. 2004. The gamma-secretase complex: machinery for intramembrane proteolysis. *Current Opinion in Neurobiology*, 14(3), 379–383.
- Jessen, F., Amariglio, R. E., Boxtel, M., Breteler, M., Ceccaldi, M., Chételat, G. and Wagner, M. 2014. A conceptual framework for research on subjective cognitive decline in preclinical Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 10(6), 844–852.
- Jiang, T., Zhang, Y.-D., Gao, Q., Ou, Z., Gong, P.-Y., Shi, J.-Q. and Zhou, J.-S. 2018. TREM2 Ameliorates Neuronal tau pathology through suppression of microglial inflammatory response. *Inflammation*, 41(3), 811–823.

- Jin , H. Zhu , X.Liang , W. Huang , Q. Xie , P. Xiao , J. Ni , Q. Liu 2017. Sodium selenate activated Wnt/ β -catenin signaling and repressed amyloid- β formation in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. 36-49.
- Jonsson, T., Stefansson, H., Steinberg, S., Jonsdottir, I., Jonsson, P. V, Snaedal, J. and Stefansson, K. 2013. Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*, 368(2), 107–116.
- Juhaszova, M., Shimizu, H., Borin, M. L., Yip, R. K., Santiago, E. M., Lindenmayer, G. E. and Blaustein, M. P. 1996. Localization of the Na(+)-Ca²⁺ exchanger in vascular smooth muscle, and in neurons and astrocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 779, 318–335.
- Kahle-Wroblewski, K., Corrada, M. M., Li, B. and Kawas, C. H. 2007. Sensitivity and specificity of the mini-mental state examination for identifying Dementia in the oldest-old: the 90+ study. *Journal of the American Geriatrics Society*, 55(2), 284–289.
- Kang, T. M., Hilgemann, D. W. 2004. Multiple transport modes of the cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Nature*, 427(6974), 544–548.
- Kim, J., Basak, J. M., Holtzman, D. M. 2009. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron*, 63(3), 287–303.
- Kimura, N. 2016. Diabetes Mellitus induces Alzheimer's disease pathology: histopathological evidence from animal models. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(4), 503.
- Klunk, W. E., Engler, H., Nordberg, A., Wang, Y., Blomqvist, G., Holt, D. P. and Långström, B. 2004. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Annals of Neurology*, 55(3), 306–319.
- Knopman, D. S., DeKosky, S. T., Cummings, J. L., Chui, H., Corey-Bloom, J., Relkin, N. and Stevens, J. C. 2001. Practice parameter: diagnosis of Dementia (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, 56(9), 1143–1153.
- Kumar, K., Kumar, A., Keegan, R. M., Deshmukh, R. 2018. Recent advances in the neurobiology and neuropharmacology of Alzheimer's disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy* . 98, 297–307.
- Kung, H. F. 2012. The β -Amyloid Hypothesis in Alzheimer's disease: seeing is believing. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 3(4), 265–267.
- Kuo, M. M.-C., Haynes, W. J., Loukin, S. H., Kung, C., Saimi, Y. 2005. Prokaryotic K(+) channels: from crystal structures to diversity. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(5), 961–985.
- Lage, J. M. M. 2006. 100 Years of Alzheimer's disease (1906-2006). *Journal of Alzheimer's Disease* , 9(3), 15–26.

- Lashley, T., Schott, J. M., Weston, P., Murray, C. E., Wellington, H., Keshavan, A. and Zetterberg, H. 2018. Molecular biomarkers of Alzheimer's disease: progress and prospects. *Disease Models & Mechanisms*, 11(5).
- Lee, G., Leugers, C. J. 2012. Tau and tauopathies. *Progress In Molecular Biology And Translational Science*, 107, 263–293.
- Lee, V. M., Goedert, M., Trojanowski, J. Q. 2001. Neurodegenerative tauopathies. *Annual Review of Neuroscience*, 24, 1121–1159.
- Lei, P., Ayton, S., Bush, A. I. 2021. The essential elements of Alzheimer's disease. *Journal of Biological Chemistry*, 296, 100105.
- Li, X., Song, D., Leng, S. X. 2015. Link between type 2 diabetes and Alzheimer's disease: from epidemiology to mechanism and treatment. *Clinical Interventions in Aging*, 10, 549–560.
- Liu, W.-X., Deng, E.-Z., Chen, W., Lin, H. 2014. Identifying the subfamilies of voltage-gated potassium channels using feature selection technique. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(7), 12940–12951.
- Liu, W., Wong, A., Law, A. C. K. and Mok, V. C. T. 2015. Cerebrovascular disease, amyloid plaques, and Dementia. *Stroke*, 46(5), 1402–1407.
- Liu, X., Wu, Y., Zhou, D., Xie, Y., Zhou, Y., Lu, Y. and Liu, S. 2020. N-linoleyltyrosine protects PC12 cells against oxidative damage via autophagy. *International Journal of Molecular Medicine*.
- Liu, Y., Grimm, M., Dai, W.-T., Hou, M.-C., Xiao, Z.-X. and Cao, Y. 2020. CB-Dock: a web server for cavity detection-guided protein-ligand blind docking. *Acta Pharmacologica Sinica*, 41(1), 138–144.
- Lo, C.-Y., Wang, P.-N., Chou, K.-H., Wang, J., He, Y. and Lin, C.-P. 2010. Diffusion tensor tractography reveals abnormal topological organization in structural cortical networks in Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience*. 30(50), 16876–16885.
- Long, J. M., Holtzman, D. M. 2019. Alzheimer Disease: an update on pathobiology and treatment strategies. *Cell*, 179(2), 312–339.
- Long, S. B., Campbell, E. B., Mackinnon, R. 2005. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5736), 897–903.
- Lu, D. C., Rabizadeh, S., Chandra, S., Shayya, R. F., Ellerby, L. M., Ye, X. and Bredesen, D. E. 2000. A second cytotoxic proteolytic peptide derived from amyloid beta-protein precursor. *Nature Medicine*, 6(4), 397–404.
- Mahley, R. W. 2016. Apolipoprotein E: from cardiovascular disease to neurodegenerative disorders. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 94(7), 739–746.

- Maki, M., Nagayama, M., Oda, T. and Shinagawa, S. 1976. Anticoagulant release during shock. *Thrombosis Research*, 8(1), 159–163.
- McKhann, G. M., Knopman, D. S., Chertkow, H., Hyman, B. T., Jack, C. R., Kawas, C. H. and Phelps, C. H. 2011a. The diagnosis of Dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia : The Journal of the Alzheimer's Association*, 7(3), 263–269.
- McKhann, G. M., Knopman, D. S., Chertkow, H., Hyman, B. T., Jack, C. R., Kawas, C. H. and Phelps, C. H. 2011b. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 7(3), 263–269.
- McShane, R., Westby, M. J., Roberts, E., Minakaran, N., Schneider, L., Farrimond, L. E. and Debarros, J. 2019. Memantine for Dementia. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 3(3), CD003154.
- Mendez, M. F. 2017. Early-Onset Alzheimer disease. *Neurologic Clinics*, 35(2), 263–281.
- Mentzer, R. M., Van Wylen, D. G., Sodhi, J., Weiss, R. J., Lasley, R. D., Willis, J. and Flint, L. M. 1989. Effect of pyruvate on regional ventricular function in normal and stunned myocardium. *Annals of Surgery*, 209(5), 629–633.
- Miceli, F., Soldovieri, M. V., Martire, M. and Tagliatela, M. 2008. Molecular pharmacology and therapeutic potential of neuronal Kv7-modulating drugs. *Current Opinion in Pharmacology*, 8(1), 65–74.
- Montine, T. J., Larson, E. B. 2009. Late-life Dementias: does this unyielding global challenge require a broader view. *Jama*, 302(23), 2593–2594.
- Nixon, R. A., Wegiel, J., Kumar, A., Yu, W. H., Peterhoff, C., Cataldo, A. and Cuervo, A. M. 2005. Extensive Involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 64(2), 113–122.
- Nunan, J., Small, D. H. 2000. Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases. *FEBS*. 483(1), 6–10.
- Ottschytch, N., Raes, A., Van Hoorick, D. and Snyders, D. J. 2002. Obligatory heterotetramerization of three previously uncharacterized Kv channel alpha-subunits identified in the human genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(12), 7986–7991.
- Pahl, H. L. 1999. Signal transduction from the endoplasmic reticulum to the cell nucleus. *Physiological Reviews*, 79(3), 683–701.

- Paik, S., Somvanshi, R. K., Kumar, U. 2019. Somatostatin-Mediated changes in microtubule-associated proteins and retinoic acid-induced neurite outgrowth in SH-SY5Y cells. *Journal of Molecular Neuroscience* : MN, 68(1), 120–134.
- PanR. X. Kong, X. Wang, S. Li, XiaoLong Qi, Y.H. Yan, J. Cheng, Q. Liu , W. Jin, Chang-Heng Tan and Z. Yuan 2019. Sodium rutin ameliorates Alzheimer's disease-like pathology by enhancing microglial amyloid- β clearance. *Science Advances*, 5(2), eaau6328.
- Pannaccione, A., Secondo, A., Molinaro, P., D'Avanzo, C., Cantile, M., Esposito, A. and Annunziato, L. 2012. A New concept: a 1-42 generates a hyperfunctional proteolytic ncx3 fragment that delays caspase-12 activation and neuronal death. *Journal of Neuroscience*, 32(31), 10609–10617.
- Paschen, W. 2001. Dependence of vital cell function on endoplasmic reticulum calcium levels: implications for the mechanisms underlying neuronal cell injury in different pathological states. *Cell Calcium*, 29(1), 1–11.
- Petersen, R. C. 2004. Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. *Journal of Internal Medicine*, 256(3), 183–194.
- Petersen, Ronald C. 2018. How early can we diagnose Alzheimer disease. *Neurology*, 91(9), 395–402.
- Philipson, K. D., Nicoll, D. A. 2000. Sodium-calcium exchange: a molecular perspective. *Annual Review of Physiology*, 62, 111–133.
- Popp, J., Meichsner, S., Kölsch, H., Lewczuk, P., Maier, W., Kornhuber, J. and Lütjohann, D. 2013. Cerebral and extracerebral cholesterol metabolism and CSF markers of Alzheimer's disease. *Biochemical Pharmacology*, 86(1), 37–42.
- Prasad, H., Rao, R. 2015. The Na⁺/H⁺ exchanger NHE6 modulates endosomal pH to control processing of amyloid precursor protein in a cell culture model of alzheimer disease. *Journal of Biological Chemistry*, 290(9), 5311–5327.
- Rangaraju S., Gearing M. ,Jin, L. Allana 2015. Potassium Channel Kv1.3 Is Highly Expressed by Microglia in Human Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 44(3), 797-808.
- Redman, P. T., He, K., Hartnett, K. A., Jefferson, B. S., Hu, L., Rosenberg, P. A. and Aizenman, E. 2007. Apoptotic surge of potassium currents is mediated by p38 phosphorylation of Kv2.1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(9), 3568–3573.
- Ricciarelli, R., Canepa, E., Marengo, B., Marinari, U. M., Poli, G., Pronzato, M. A. and Domenicotti, C. 2012. Cholesterol and Alzheimer's disease: a still poorly understood correlation. *IUBMB Life*, 64(12), 931–935.
- Saad, M., Brkanac, Z., Wijsman, E. M. 2015. Family-based genome scan for age at onset of late-onset Alzheimer's disease in whole exome sequencing data. *Genes, Brain, and Behavior*, 14(8), 607–617.

- Saint-Aubert, L., Barbeau, E. J., Péran, P., Nemmi, F., Vervueren, C., Mirabel, H. and Pariente, J. 2013. Cortical florbetapir-PET amyloid load in prodromal Alzheimer's disease patients. *EJNMMI Research*, 3(1), 43.
- Salminen, A., Kauppinen, A. and Kaarniranta, K. 2017. Hypoxia/ischemia activate processing of Amyloid Precursor Protein: impact of vascular dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 140(4), 536–549.
- Schulz, J. B., Lindenau, J., Seyfried, J. and Dichgans, J. 2000. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *European Journal of Biochemistry*, 267(16), 4904–4911.
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E. and Hyman, B. T. 2011. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1), a006189.
- Simms, B. A., Zamponi, G. W. 2014. Neuronal voltage-gated calcium channels: structure, function, and dysfunction. *Neuron*, 82(1), 24–45.
- Skoog, I., Gustafson, D. 2006. Update on hypertension and Alzheimer's disease. *Neurological Research*, 28(6), 605–611.
- Sperling, R. A., Aisen, P. S., Beckett, L. A., Bennett, D. A., Craft, S., Fagan, A. M. and Phelps, C. H. 2011. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia : The Journal of the Alzheimer's Association*, 7(3), 280–292.
- Stansley, B., Post, J., Hensley, K. 2012. A comparative review of cell culture systems for the study of microglial biology in Alzheimer's Disease *Journal of Neuroinflammation*, 9(1), 3–8.
- Stelzmann, R. A., Norman Schnitzlein, H. and Reed Murtagh, F. 1995. An english translation of alzheimer's 1907 paper, ber eine eigenartige erkankung der hirnrinde?. *Clinical Anatomy*, 8(6), 429–431.
- Swartz, K. J. 2008. Sensing voltage across lipid membranes. *Nature*, 456(7224), 891–897.
- Takami, M., Nagashima, Y., Sano, Y., Ishihara, S., Morishima-Kawashima, M., Funamoto, S. and Ihara, Y. 2009. gamma-Secretase: successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of beta-carboxyl terminal fragment. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal Of The Society For Neuroscience*, 29(41), 13042–13052.
- Tanzi, R. E., Kovacs, D. M., Kim, T. W., Moir, R. D., Guenette, S. Y. and Wasco, W. 1996. The gene defects responsible for familial Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, 3(3), 159–168.

- Teravskis, P. J., Ashe, K. H. and Liao, D. 2020. The accumulation of tau in postsynaptic structures: A common feature in multiple neurodegenerative diseases. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology And Psychiatry*, 26(5–6), 503–520.
- Traber, M. G., van der Vliet, A., Reznick, A. Z. and Cross, C. E. 2000. Tobacco-related diseases. Is there a role for antioxidant micronutrient supplementation. *Clinics in Chest Medicine*. 21(1), 173–187.
- Tricco, A. C., Ashoor, H. M., Soobiah, C., Rios, P., Veroniki, A. A., Hamid, J. S. and Straus, S. E. 2018. Comparative effectiveness and safety of cognitive enhancers for treating Alzheimer’s disease: systematic review and network metaanalysis. *Journal of the American Geriatrics Society*. 66(1), 170–178.
- Vandenberghe, R., Van Laere, K., Ivanoiu, A., Salmon, E., Bastin, C., Triau, E. and Brooks, D. J. 2010. F-flutemetamol amyloid imaging in Alzheimer disease and mild cognitive impairment: A phase 2 trial. *Annals of Neurology*, 68(3), 319–329.
- Visser, P. J., Verhey, F., Knol, D. L., Scheltens, P., Wahlund, L.-O., Freund-Levi, Y. and Blennow, K. 2009. Prevalence and prognostic value of CSF markers of Alzheimer’s disease pathology in patients with subjective cognitive impairment or mild cognitive impairment in the DESCRIPA study: a prospective cohort study. *The Lancet Neurology*, 8(7), 619–627.
- von Bergen, M., Friedhoff, P., Biernat, J., Heberle, J., Mandelkow, E. M. and Mandelkow, E. 2000. Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(10), 5129–5134.
- Walhovd, K. B., Fjell, A. M., Brewer, J., McEvoy, L. K., Fennema-Notestine, C. and Hagler, D. J. Alzheimer’s Disease Neuroimaging Initiative. 2010. Combining MR imaging, positron-emission tomography, and CSF biomarkers in the diagnosis and prognosis of Alzheimer disease. *AJNR. American Journal of Neuroradiology*, 31(2), 347–354.
- Wang, G. Sun, T. Feng, J. Zhang, X. Huang, T. Wang, Z. Xie, X. Chu, J. Yang, H. Wang, S. Chang, Y. Gong, L. Ruan, G. Zhang, S. Yan, W. Lian, C. Du, D. Yang, Q. Zhang, F. Lin, J. Liu, H. Zhang, C. Ge, S. Xiao, M. Geng 2019. Sodium oligomannate therapeutically remodels gut microbiota and suppresses gut bacterial amino acids-shaped neuroinflammation to inhibit Alzheimer’s disease progression. *Cell Research*, 29(10), 787-803.
- Watanabe, E., Fujikawa, A., Matsunaga, H., Yasoshima, Y., Sako, N., Yamamoto, T. and Noda, M. 2000. Nav2/NaG channel is involved in control of salt-intake behavior in the CNS. *The Journal of neuroscience: The Official Journal Of The Society For Neuroscience*, 20(20), 7743–7751.
- Xue-Shan, Z., Juan, P., Qi, W., Zhong, R., Li-Hong, P., Zhi-Han, T. and Lu-Shan, L. 2016. Imbalanced cholesterol metabolism in Alzheimer’s disease. *Clinica*

Chimica Acta; International Journal Of Clinical Chemistry, 456, 107–114.

Yamada, K., Holth, J. K., Liao, F., Stewart, F. R., Mahan, T. E., Jiang, H. and Holtzman, D. M. 2014. Neuronal activity regulates extracellular tau in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 211(3), 387–393.

Yellen, G. 2002. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature*, 419(6902), 35–42.

Yu, S. P. 2003. Regulation and critical role of potassium homeostasis in apoptosis. *Progress in Neurobiology*, 70(4), 363–386.

Yuan, W., Shun Chen, Xue-mei Ge, Chen, Y., Nan Lu and Liu, Z. 2013. Advances with RNA interference in Alzheimer's disease research *Drug Design, Development and Therapy*, 117.

Zhang, L., Yu, H., Sun, Y., Lin, X., Chen, B., Tan, C. and Wang, Z. 2007. Protective effects of salidroside on hydrogen peroxide-induced apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *European Journal of Pharmacology*, 564(1–3), 18–25.

Zlokovic, B. V. 2011. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Neuroscience*, 12(12), 723–738.