

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MAGNEZYUM L-TREONATIN A β 1-42 PEPTİDİ
UYGULANARAK ALZHEİMER MODELİ
OLUŞTURULAN SIÇANLARDA KOGNİTİF
FONKSİYONLAR ÜZERİNE ETKİSİ**

DR.SİNEM YAPRAK

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2022

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MAGNEZYUM L-TREONATIN A β 1-42 PEPTİDİ
UYGULANARAK ALZHEİMER MODELİ
OLUŞTURULAN SIÇANLARDA KOGNİTİF
FONKSİYONLAR ÜZERİNE ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

DR.SİNEM YAPRAK

TEZ DANIŞMANI

PROF.DR.SEVİL GÖNENÇ ARDA

İÇİNDEKİLER

RESİM DİZİNİ	iv
ŞEKİL DİZİNİ	v
KISALTMALAR	vi
TEŞEKKÜR	viii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT	xi
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1.Alzheimer Hastalığı.....	4
2.1.1.Risk Faktörleri	4
2.1.2.Alzheimer Hastalığı Fiziopatolojisi	5
2.1.2.1.Amiloid Beta Prekürsör Proteini ve Amiloid Beta Peptidi.....	6
2.1.2.2. Nörofibriler Yumaklar	8
2.1.3. Nöroinflamasyon	8
2.1.4. Alzheimer Hastalığı ve Oksidatif Stres	10
2.1.5 Bellek	11
2.1.5.1. Belleğin Sınıflandırılması.....	11
2.1.5.1.1. Kısa Süreli Bellek	11
2.1.5.1.2.Uzun Süreli Bellek.....	12
2.1.5.2.Long Term Potansiyalizasyon (LTP)	14
2.1.5.3.AH ve Glutamat Eksitotoksitesisi	18
2.1.5.4. NMDA Reseptörleri	19
2.2. Magnezyum ve Magnezyum L-treonat	19
2.2.1.Magnezyum L-treonat	21
2.3.BDNF Sentezi ve Salınımı	21
2.3.1.BDNF in Fizyolojik Özellikleri	23
2.4. Alzheimer Hastalığının Klinik Özellikleri	24
2.5.Alzheimer Hastalığının Tedavisi	26
2.5.1.Memantin	27
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1.Deney Hayvanları	29

3.2.İlaçların Hazırlanması	30
3.3 İlaç Uygulamaları	30
3.3.1.Mg L-treonat ve Memantin Uygulamaları	33
3.4.Davranış ve Bellek Testleri	33
3.4.1 Morris Water Maze (MWM) Testi.....	33
3.4.2 Açık Alan Testi	34
3.4.3. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi (YALT).....	35
3.4.4. Motor Performansı Testi (Rotarod Testi)	35
3.5. Sakrifikasyon ve Doku Ayrımı.....	36
3.6.Doku Homojenatlarının Hazırlanması.....	36
3.7.Biyokimyasal İncelemeler	37
3.7.1.BDNF Ölçümü	37
3.7.2.MDA Ölçümü	38
3.7.3 T-AOC Ölçümü	39
3.7.4.TNF- α Ölçümü	40
3.7.5.BCA Protein Analizi.....	41
3.8.Verilerin Değerlendirilmesi.....	42
4.BULGULAR	43
4.1. İzlem Sonuçları.....	43
4.1.1.Ağırlık Değişimi	43
4.2.Davranış ve Bellek Testlerinin Sonuçları.....	44
4.2.1.Morris Water Maze Testi Sonuçları	44
4.2.2.Yükseltilmiş Artı Labirent Testi Sonuçları.....	47
4.2.3.Açık Alan Testi Sonuçları.....	50
4.2.4.Motor Performans Testi (Rotarod) Sonuçları.....	52
4.3. Biyokimyasal Analiz Sonuçları	52
4.3.1.Hipokampus BDNF Düzeyleri	52
4.3.2.Prefrontal Korteks BDNF Düzeyleri	53
4.3.3.Hipokampus MDA Düzeyleri	54
4.3.4.Prefrontal Korteks MDA Düzeyleri	55
4.3.5.Hipokampus T-AOC Düzeyleri	55
4.3.6.Prefrontal Korteks T-AOC Düzeyleri	56

4.3.7.Hipokampus TNF- α Düzeyleri	57
4.3.8.Prefrontal Korteks TNF- α Düzeyleri	58
5.TARTIŞMA	59
5.1.Davranış Bulgularının Değerlendirilmesi	59
5.1.1.Morris Water Maze (MWM) Bulgularının Değerlendirilmesi.....	59
5.1.2.Yükseltilmiş Artı Labirent Testi Bulgularının Değerlendirilmesi.....	62
5.1.3.Açık Alan Testi Bulgularının Değerlendirilmesi.....	63
5.1.4.Rotarod Motor Performans Testi Bulgularının Değerlendirilmesi	64
5.2.Biyokimyasal Bulguların Değerlendirilmesi.....	64
5.2.1.BDNF Bulgularının Değerlendirilmesi.....	64
5.2.2.MDA ve T-AOC Bulgularının Değerlendirilmesi	67
5.2.3.TNF α Bulgularının Değerlendirilmesi.....	70
6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	73
7. KAYNAKLAR	75
8. EKLER.....	89

RESİM DİZİN

Resim 1. Bregma -4.36 mm koronal düzleme ait stereotaksi koordinatları

Resim 2. ISV enjeksiyon uygulama basamakları

Resim 3. Rotarod düzeneği



ŞEKİL DİZİNİ

- Şekil 1. Amiloid kaskad hipotezi
- Şekil 2. APP bölünme yolları
- Şekil 3. Erken ve geç LTP
- Şekil 4. Glutamat Eksitotoksitesi
- Şekil 5. BDNF'in bölünmesi
- Şekil 6. BDNF'in salınımı
- Şekil 7. NMDA reseptörü ve memantin yapısı
- Şekil 8. Deney dizaynı şematik gösterimi
- Şekil 9. Haftalık sıçan başına ağırlık
- Şekil 10 . MWMT platforma ulaşma süresi 1. gün
- Şekil 11. MWMT platforma ulaşma süresi 2. gün
- Şekil 12. MWMT platforma ulaşma süresi 3. gün
- Şekil 13. MWMT platforma ulaşma süresi 4. Gün
- Şekil 14. MWMT 5. Gün Platformda bulunma süresi
- Şekil 15. YALT açık kollarda geçirilen süre
- Şekil 16. YALT açık kollara giriş sayısı
- Şekil 17. YALT kapalı kollarda geçirilen süre
- Şekil 18 . YALT kapalı kollara giriş sayısı
- Şekil 19 . Açık alan testinde toplam kat edilen mesafe
- Şekil 20 . Açık alan testinde orta alanda geçirilen süre
- Şekil 21. Açık alan testinde tigmotaksis süreleri
- Şekil 22. Motor Performans Testi
- Şekil 23. Hipokampus BDNF düzeyi
- Şekil 24. Prefrontal Korteks BDNF düzeyi
- Şekil 25. Hipokampus MDA düzeyi
- Şekil 26. Prefrontal korteks MDA düzeyi
- Şekil 27 . Hipokampus T-AOC düzeyi
- Şekil 28 . Prefrontal Korteks T-AOC düzeyi
- Şekil 29 . Hipokampus TNF – α düzeyi
- Şekil 30 . Prefrontal Korteks TNF – α düzeyi

KISALTMALAR

A β : Amiloid Beta

AH: Alzheimer Hastalığı

ALZ: Alzheimer

Apo E: Apolipoprotein E

APP: Amiloid Prekürsör Protein

BDNF: Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

Ca⁺²: Kalsiyum

cAMP: Siklik AMP

CAMKII: Kalsiyum Kalmodulin Bağımlı Protein Kinaz II

CAT: Katalaz

CREB: Siklik AMP Yanıt Elemanı Bağlayıcı Protein

DMSO: Dimetil Sülfoksit

EAAT: Eksitatör Aminoasit Taşıyıcıları

ERK: Ekstrasellüler Sinyal Düzenleyici Kinaz

GFAP: Glial Fibriler Asidik Protein

GSH-PX: Glutasyon Peroksidaz

KBB : Kan Beyin Bariyeri

ISV: İntraserebroventriküler

LTD:Long Term Depresyon

LTP: Long Term Potansiyalizasyon

MAP:Mikrotübül Assosiyasyon Protein

MAPK: Mitojenler Tarafından Aktive Edilen Protein Kinaz A

Mg: Magnezyum

MDA: Malondialdehid

MWM: Morris Water Maze

NGF: Nöron Büyüme Faktörü

NF- κ B: Nükleer Faktör Kappa B

NMDA: N-metil D- Aspartat

NO:Nitrik Oksit

NOS: Nitrik Oksit Sentaz

NFY: Nörofibriler Yumak
PHF: Paired Helical Filaments
PI-3K: Fosfotidil inozitol 3 -kinaz
PKA: Protein Kinaz A
PLC γ : Fosfolipaz C
PSEN 1: Presenilin 1
PSEN 2: Presenilin 2
ROS: Reaktif Oksijen Türleri
SOD: Süperoksit Dismutaz
SSS: Santral Sinir Sistemi
T-AOC: Total Anti Oksidan Kapasitesi
TNF - α :Tümör Nekroz Faktörü Alfa
TrkB: Tirozin Kinaz B
YALT: Yükseltilmiş Artı Labirent Testi

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca daima yanımda olan bilgisi ve deneyimi ile tez çalışmam süresince beni en güzel şekilde yönlendiren çalışma planlamasının ilk gününden itibaren sabır ve anlayışla desteğini hiç esirgemeyen değerli danışmanım Prof. Dr. Sevil GÖNENÇ ARDA' ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam boyunca tüm sorularıma yanıt vererek bilgi ve deneyimi ile bana destek olan sevgili hocam Doç.Dr. Ferda Ulviye HOŞGÖRLER'e çok teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca her zaman yol gösteren, bilgi ve deneyimlerini aktaran, hoşgörü ve anlayışını esirgemeyen başta anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Müge KIRAY olmak üzere tüm anabilim dalı öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Çalışmanın cerrahi uygulamalarında vermiş olduğu bilgiler ve tüm yapıcı paylaşımları için Doç. Dr. Mehmet ATEŞ'e teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince bilgisi ve deneyimiyle çalışmanın tüm aşamalarında daima bana destek olan çalışma arkadaşım Dr. Başar KOÇ'a ;

Eğitim sürecinde her zaman destekçim olan ve birlikte öğrenmekten mutluluk duyduğum tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bölümümüzde her zaman hepimizin yardımına koşan ağabeyimiz Ferhan ORAL' a çok teşekkür ederim.

Hayatımın her anında yanımda olan , bugünlere gelmemde çok büyük emekleri olan , bu hayattaki ilk ve en büyük iki öğretmenim çok sevgili annem ve babama ;

Her zaman olduğu gibi bu çalışma süresince de bilgisi ve deneyimleriyle bana destek olan daima önümü ,yolumu açan çok sevgili ablama teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Sinem YAPRAK

MAGNEZYUM L-TREONATIN A β 1-42 PEPTİDİ UYGULANARAK ALZHEİMER MODELİ OLUŞTURULAN SIÇANLARDA KOGNİTİF FONKSİYONLAR ÜZERİNE ETKİSİ

ÖZET

Giriş ve Amaç

Alzheimer hastalığı (AH) demans olgularının büyük bir çoğunluğunu oluşturmaktadır. Tam bir tedavisi bulunmamakla birlikte hastalığın seyrinin bazı tedavi modaliteleri ile yavaşlatılması hedeflenmektedir. Fizyopatolojisinde pek çok mekanizma olmakla birlikte bazı besinsel elementlerin AH için kilit rolü olduğunu savunan çalışmalar bulunmaktadır. Mineraller içerisinde en çok dikkati çeken Alzheimer için potansiyel risk faktörü olan magnezyumdur (Mg) . Mg eksikliği Alzheimer ve pek çok nörodejeneratif hastalıkla ilişkilidir. Bu çalışmanın amacı bir Mg bileşiği olan Magnezyum L-treonat ile AH tedavisinde kullanılan bir N-metil D-aspartat (NMDA) antagonisti olan memantin , ayrı ayrı ve beraber uygulandığında amiloid beta (A β) 1-42 peptidi uygulanarak AH oluşturulan sıçanlarda kognitif fonksiyonlar üzerine olan etkilerinin karşılaştırılmasıdır.

Yöntem

Bu çalışmada toplam 42 adet 22-24 haftalık sağlıklı erkek Sprague Dawley ırkı sıçanlar kullanılmıştır. Çalışmada 14 günlük kafes arkadaşına alışma periyodunun ardından denekler rastgele kontrol, sham , Alzheimer, Alzheimer + Memantin, Alzheimer + Mg L-treonat , Alzheimer +Memantin + Mg L-treonat olmak üzere 6 gruba ayrılmıştır. A β 1-42 peptidi AH modeli oluşturulacak olan sıçanlara intraserebroventriküler (ISV) enjeksiyon ile uygulanıp işlemden 2 hafta sonrasında memantin ve Mg L-treonat alacak olan grupların ilaç uygulamaları başlamıştır. Deneyin 45. gününde öğrenme bellek ve anksiyete seviyelerini değerlendirmek için davranış testleri yapılmıştır. Sonrasında denekler sakrifiye edilip hipokampus ve prefrontal kortekste beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), Malondialdehid (MDA) , Total antioksidan kapasitesi (T-AOC), Tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) düzeyleri ölçülmüştür.

Bulgular

MWM testi 5.günde Alzheimer grubunun kontrol grubuna göre platform alanında geçirdiği sürenin azaldığı görüldü. ($p<0,01$).Alzheimer grubunda kontrole göre hipokampus ve prefrontal korteks dokularından bakılan MDA ve TNF- α seviyelerinin arttığı TAOC ve BDNF seviyelerinin ise azaldığı gözlemlendi.ALZ +Memantin ve ALZ +Mg L-treonat gruplarında Alzheimer grubuna kıyasla hipokampus BDNF düzeylerinin yükseldiği görülmüştür ($p<0,05$) .ALZ + Memantin +Mg L-treonat grubunda ise Alzheimer grubuna kıyasla hipokampus BDNF düzeyleri artarak kontrol grubunun BDNF seviyesine ulaştığı saptanmıştır ($p<0,0001$). ALZ +Memantin ,ALZ +Mg L-treonat ve ALZ +Memantin + Mg L-treonat gruplarının hipokampus MDA düzeyleri Alzheimer grubuna kıyasla azaldı ($p<0,05$). Alz+ Mem +Mg L-treonat grubunda hipokampus ve prefrontal korteks T-AOC düzeyleri Alzheimer grubuna göre yükselmiştir ($p<0,05$).ALZ +Mem , ALZ+Mg L-treonat ve ALZ+ Mem + Mg L-treonat gruplarının hipokampus ve prefrontal korteks TNF- α düzeyleri Alzheimer grubuna göre anlamlı olarak azaldığı görüldü.

Sonuç

Bu çalışmada A β 1-42 peptidi uygulanarak AH modeli oluşturulan sıçanlarda Memantin ve Mg L-treonatın beraber verilmesinin ayrı ayrı verilmesine göre kognitif fonksiyonları daha olumlu yönde etkilediği görülmüştür. Bunu yanında çalışmamızda A β 1-42 peptidi uygulanması ile indüklenen oksidatif stresin Memantin ve Mg L-treonatın birlikte verilmesi ile gerilediği görülmüştür. Literatürde AH modeli oluşturulan sıçanlarda Memantin ve Mg L-treonatın ayrı ayrı uygulandığı çalışmalara rastlanmıştır ve bu çalışmada her ikisinin kombine etkisinin değerlendirilmesi çalışmanın özgün değerini oluşturmaktadır. Bu anlamda Mg L-treonatın Alzheimer hastalarında Memantin tedavisiyle birlikte uygulanması tedavi etkinliğini arttıracaktır. Çalışma sonuçlarımızın bu alanda yeni deneysel araştırma ve çalışmalara ışık tutabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler :Alzheimer ,Magnezyum L-treonat, Memantin, A β 1-42 peptid, sıçan

THE EFFECT OF MAGNESIUM L- THREONATE ON COGNITIVE FUNCTIONS IN A RAT MODEL OF A β 1-42 PEPTIDE INDUCED ALZHEIMER'S DISEASE

ABSTRACT

Introduction and Aim

Alzheimer's disease constitutes the majority of dementia cases. Although there is no complete cure, it is aimed to slow down the prognosis of the disease with some treatment modalities. There are many mechanisms in its pathophysiology with these mechanisms also there are studies support that some nutritional elements play a key role in Alzheimer's disease. Among the minerals, magnesium is the most prominent potential risk factor for Alzheimer's. Magnesium deficiency is associated with Alzheimer's and many neurodegenerative diseases. The aim of this study is to compare the effects of magnesium L-threonate, a magnesium compound, and memantine, an NMDA antagonist used in the treatment of Alzheimer's disease, when administered separately or together on cognitive functions in a rat model of A β 1-42 peptide induced Alzheimer's.

Method

Forty two adult male Sprague Dawley rats were used in this study. In the study, after 14 days of habituation period the rats were randomly divided into six groups as control, sham, Alzheimer, Alzheimer+ Memantine, Alzheimer + Magnesium L-threonate and Alzheimer +Memantine +Magnesium L-threonate. A β 1-42 peptide was administered by intracerebroventricular injection to rats to be modeled Alzheimer's disease, and drug administration was started for the groups that would receive memantine and magnesium L-threonate 2 weeks after the procedure. On the 45th day of the experiment, behavioral tests were administered to the rats to assess learning, memory and anxiety levels. Afterwards, the subjects were sacrificed and BDNF, MDA, T-AOC, TNF- α levels were measured in the hippocampus and prefrontal cortex.

Findings

On the 5th day of the MWM test, it was observed that the time spent in the platform area of the Alzheimer group decreased compared to the control group ($p < 0.01$). It was observed that MDA and $\text{TNF-}\alpha$ levels in the hippocampus and prefrontal cortex tissues increased in the Alzheimer group compared to the control group, while TAOC and BDNF levels decreased. In the Alz + Memantine and ALZ + Mg L-threonate groups, hippocampus BDNF levels were found to be increased compared to the Alzheimer group ($p < 0.05$). In the Alz + Memantine + Mg L-threonate group, hippocampus BDNF levels increased and reached the BDNF levels of control group ($p < 0.0001$). Hippocampal MDA levels of ALZ + Memantine, ALZ + Mg L-threonate and ALZ + Memantine + Mg L-threonate groups were decreased compared to Alzheimer group ($p < 0.05$). Hippocampus and prefrontal cortex T-AOC levels were higher in the Alz+ Mem + Mg L-threonate group compared to the Alzheimer group ($p < 0.05$). It was observed that the hippocampus and prefrontal cortex $\text{TNF-}\alpha$ levels of ALZ + Memantine, ALZ + Mg L-threonate and ALZ + Memantine + Mg L-threonate groups were significantly decreased compared to the Alzheimer group.

Results

In this study, it was observed that the administration of Memantine and Mg L-threonate together in the rats that $\text{A}\beta$ 1-42 peptide induced AD model, had a more positive effect on cognitive functions than administration separately. In addition, it was observed that the oxidative stress induced by the application of $\text{A}\beta$ 1-42 peptide regressed with the co-administration of Memantine and Mg L-threonate. Studies in which Memantine and Mg L-threonate were applied separately in AD rat models were found in the literature and in this study the evaluation of the combined effect of both, constitutes the original value of the study. In this sense, the application of Mg L-threonate together with Memantine treatment in Alzheimer's patients will increase the effectiveness of the treatment. It is thought that our study results can shed light on new experimental research and studies in this field.

Keywords: Alzheimer, Mg L-threonate, Memantine, $\text{A}\beta$ 1-42 peptide, rat

1.GİRİŞ VE AMAÇ

AH beynin erken yaşlanması olarak tanımlanır ve genellikle orta yaşlarda başlayıp hızla ilerleyerek mental gücün çok ileri yaşlardakine benzer şekilde aşırı kaybına yol açar. Kişinin günlük aktiviteleri gerçekleştirme yeteneğinin bozulmasına , hastalığın geç evrelerinde çeşitli nöropsikiyatrik semptomlara ve davranışsal bozukluklara yol açan, ilerleyici ve ölümcül bir nörodejeneratif hastalıktır ve yaşlılarda görülen demansın yaygın bir şeklidir (1).

Fizyopatolojisinde A β peptidin plaklar halinde hücre dışı birikimleri ve hiperfosforile tau proteini tarafından oluşturulan nörofibriler yumakların hücre içi birikimleri büyük rol oynamaktadır (2,3). Özellikle amiloid plakların birikimi nöroinflamasyonu ve nöron hücre kayıplarını tetiklemektedir. Amiloid plakları akson atrofisi ve sinapslarda kayıp yapması nedeniyle Alzheimer hastalarında görülen kademeli kognitif bozulmaların en büyük sebebi olarak düşünülmektedir (4,5) .

Alzheimer patogenezinde önemli rolü olan diğer bir faktör de oksidatif strestir. Oksidatif stres A β peptid birikimi ile bağlantılı olarak gelişir. Organizmadaki reaktif oksijen radikalleri hem endojen hem de eksojen kaynaklar tarafından meydana getirilebilir. Normal şartlar altında bu radikaller antioksidan mekanizmalar ile temizlenir. A β peptidleri mitokondrideki ETZ zincirinde bozulmalara sebebiyet vererek reaktif oksijen radikallerinin artmasına yol açar ve mitokondriyal disfonksiyona sebep olur. A β peptidler aynı zamanda beyinde birikerek lipid peroksidasyonuna da neden olur(6, 7).

AH'da artan A β seviyeleri glutamatın sinaptik aralıktaki seviyelerini artırarak glutamat eksitotoksitesine neden olur. Sinaptik aralıkta glutamatın artması NMDA reseptörlerinin aşırı uyarımına ve bu da kalsiyum (Ca⁺²) seviyelerinin artmasına, tau hiperfosforilasyonuna neden olan yolakların aktivitesinde artışa ve aynı zamanda nöronu koruyan yolakların inhibisyonuna neden olarak sinaptik kayıplara ve sinaptik plastisitede bozulmalara neden olur (8,9).

Memantin AH tedavisinde kullanılan voltaj bağımlı, non-kompetitif,selektif, orta derecede afinite gösteren bir NMDA reseptör antagonistidir. NMDA reseptörlerini

göreceli olarak zayıf bloke ederek glutamati azaltır ve Ca^{+2} un hücre içine patolojik olarak girişini önler.

AH demans olgularının büyük bir çoğunluğunu oluşturmaktadır. Tam bir tedavisi bulunmamakla birlikte hastalığın seyrinin bazı tedavi modaliteleri ile yavaşlatılması hedeflenmektedir (10) .

Pek çok çalışma bazı besinsel elementlerin Alzheimer hastalığı için kilit rolü olduğunu savunmaktadır. Son çalışmalar prooksidan gıdaları fazla tüketen ve anti oksidan elementlerden fakir diyetle beslenen kişilerin AH geliştirmesi yönünden daha riskli olduğunu ileri sürmektedir (11). Mineraller içerisinde en çok dikkati çeken ise Alzheimer için potansiyel risk faktörü olan magnezyumdur. Alzheimer hastaları üzerinde postmortem yapılan bir çalışmada beyin dokularından yapılan biopsilerde sağlıklı kişilere kıyasla magnezyum konsantrasyonlarının düşük olduğu saptanmıştır (12).

Mg ATP, DNA, RNA ve pek çok sayıda enzim sisteminin kofaktörü olması nedeniyle organizma fonksiyonları açısından önemli bir iyonudur. Mg eksikliği pek çok kronik hastalık, kardiyovasküler hastalıklar, metabolik hastalık ve nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilidir (13,14).Demans tedavilerine Mg desteğinin eklenmesinin öğrenmeyi kolaylaştıracağı ve bilişsel fonksiyonları iyileştireceği düşünülmektedir (15).

Mg, NMDA reseptöründeki Ca^{+2} kanalı için bir blokaj görevi görür , glutamaterjik eksitator sinyalin oluşabilmesi için magnezyumun buradan uzaklaştırılması gerekir. (16).Mg seviyelerinin düşük olması teorik olarak glutamaterjik nörotransmisyonu güçlendirebilir, bu da oksidatif strese ve nöronal hücre ölümüne yol açabilen eksitotoksisite için destekleyici bir ortama yol açar (17).

Mg L-treonat kan beyin bariyerini (KBB) geçebilen bir Mg bileşimidir (18). Mg bileşikleri içerisinde diyetle alımında diğerlerine kıyasla beyindeki Mg seviyelerini belirgin düzeyde yükseltebildiği ve kognitif fonksiyonları güçlendirdiği düşünülmektedir (19, 20).

Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada Mg L-treonatın beyinde NMDA reseptör sinyalizasyonunu ve BDNF salınımını arttırdığı gösterilmiştir (21, 22).

BDNF, periferik ve santral sinir sistemindeki (SSS) nöronların hayatta kalması, farklılaşması ,gelişimi ve işlevlerini etkileyerek sinaps işlevini, akson ve dendrit dallanmalarını düzenleyen bir nörotrofindir (23).

BDNF mRNA ekspresyonu fizyolojik ve patolojik durumlarda değişiklik göstermektedir. Öğrenme ve bellek stimülasyonu gibi olgularda BDNF mRNA ekspresyonu artmaktadır (24). BDNF sentez ve salınımındaki aksaklıkların ise bir takım nörolojik ve nörodejeneratif hastalıklara yatkınlığı arttırdığı düşünülmektedir(25). Alzheimer hastaları üzerinde postmortem yapılan bir çalışmada beyin dokusunda BDNF mRNA ekspresyonlarının azalmış olduğu gözlenmiştir (26) .

Çalışmamızda bir Mg bileşiği olan ve diğer Mg bileşiklerine kıyasla KBB'ni geçebilen Mg L- treonat ile AH tedavisinde kullanılan bir NMDA antagonisti olan Memantinin, ayrı ayrı ve beraber uygulandığında Aβ peptidi ISV uygulanarak AH oluşturulan sıçanlarda kognitif fonksiyonlar üzerine olan etkilerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Alzheimer Hastalığı

AH beynin erken yaşlanması olarak tanımlanır ve genellikle orta yaşlarda başlayıp hızla ilerleyerek mental gücün çok ileri yaşlardakine benzer şekilde aşırı kaybına yol açar. Kişinin günlük aktiviteleri gerçekleştirme yeteneğinin bozulmasına ve hastalığın geç evrelerinde çeşitli nöropsikiyatrik semptomlara ve davranışsal bozukluklara yol açan, ilerleyici ve ölümcül bir nörodejeneratif hastalıktır ve yaşlılarda görülen demansın yaygın bir şeklidir (1).

Hastalık ilk olarak Alman psikiyatrist ve nöropatolog olan Alois Alzhemier tarafından tanımlanmıştır. Auguste Deter isimli 51 yaşındaki hasta ilerleyici bellek kaybı ve bilişsel fonksiyonlardaki bozukluk nedeniyle eşi tarafından doktor Alois Alzheimer'a getirilmiştir.

Hastanın ilerleyen süreçte bellek kayıplarının arttığı, evinde eşyaları sakladığı,yönünü bulamadığı ve bazı kişilerin kendini öldürmek istediğini iddia ettiği saptandıktan sonra hastaneye yatırılarak takip edilmeye başlanmıştır. 5 yıldan daha az bir süre içerisinde ölümü gerçekleşen hastadan yapılan otopside alınan beyin örneklerinde kortekste incelme tespit edilmiş , hücreler içinde ve çevresinde farklı birikimlere rastlanmıştır. Doktor Alzheimer tanımladığı bu hastalığa presenil demans adını vermiştir (27).

2.1.1.Risk Faktörleri

Multifaktöriyel bir nörodejeneratif hastalık olan AH'nın en önemli ve değiştirilemeyen risk faktörü yaştır. AH olanların oranı her beş yaşta iki katına çıkarak 60 yaşında %1 iken , 85 yaşında %30 a kadar yükselmektedir (1) . Bunun yanında AH'na zemin hazırlayan genetik, serebrovasküler hastalıklar, diyabet, hipertansiyon,obezite, dislipidemi,kafa travması, fiziksel aktivite ,sigara ve alkol kullanımı, malnutrisyon gibi pek çok potansiyel risk faktörü bulunmaktadır (28).

Genetik faktörler:

AH ilk semptomun başlangıç yaşına göre 2'ye ayrılabilir.

Erken başlangıçlı AH , 65 yaş altı bireylerde görülür ve AH'nın %4-6 kadarını oluşturur. Genellikle 21. kromozom üzerindeki amiloid prekürsör protein (APP)

geni, 14. kromozom üzerindeki presenilin 1(PSEN1) ve 1. kromozom üzerindeki presenilin 2 (PSEN2) genlerindeki mutasyonlardan kaynaklanır.

Geç başlangıçlı AH 65 yaş ve üzeri bireylerde görülür ve daha çok apolipoprotein E (apo E)genindeki polimorfizimden kaynaklandığı düşünülmektedir (29,30).

21. kromozomda kodlanan APP geninin AH ile ilişkili 30 dan fazla dominant mutasyonu olduğu saptanmıştır. 14. kromozomda kodlanan PSEN 1 ve 1.kromozomda kodlanan PSEN2 genlerinin otozomal dominant mutasyonları da erken AH ile ilişkilidir. Tüm bu mutasyonlar farklı mekanizmalar ile Aβ 1-42 peptidi arttırarak Aβ 42 : Aβ 40 oranının artışına neden olur. Bu orandaki bozulma beyin dokularında Aβ peptid depozitlerinin birikimine yol açar (31).

Apolipoprotein E lipid metabolizmasında rol alan bir proteindir. Apo E geni 19 . kromozomda kodlanır. Apo E' nin E2,E3, E4 izoformlarını kodlayan sırasıyla ε2, ε3, ε4 olmak üzere 3 adet alleli vardır ve ε4 alelinin geç başlangıçlı AH oluşumunda majör risk faktörü olduğu tespit edilmiştir.Hastalığın görülme riski ε4 aleli heterozigot olanlarda 3 kat artarken , homozigotlarda bu risk 12 kat artmaktadır.Buna karşılık ε2 alelinin varlığı AH gelişme riskini azaltmaktadır (32).

2.1.2.Alzheimer Hastalığı Fizyopatolojisi

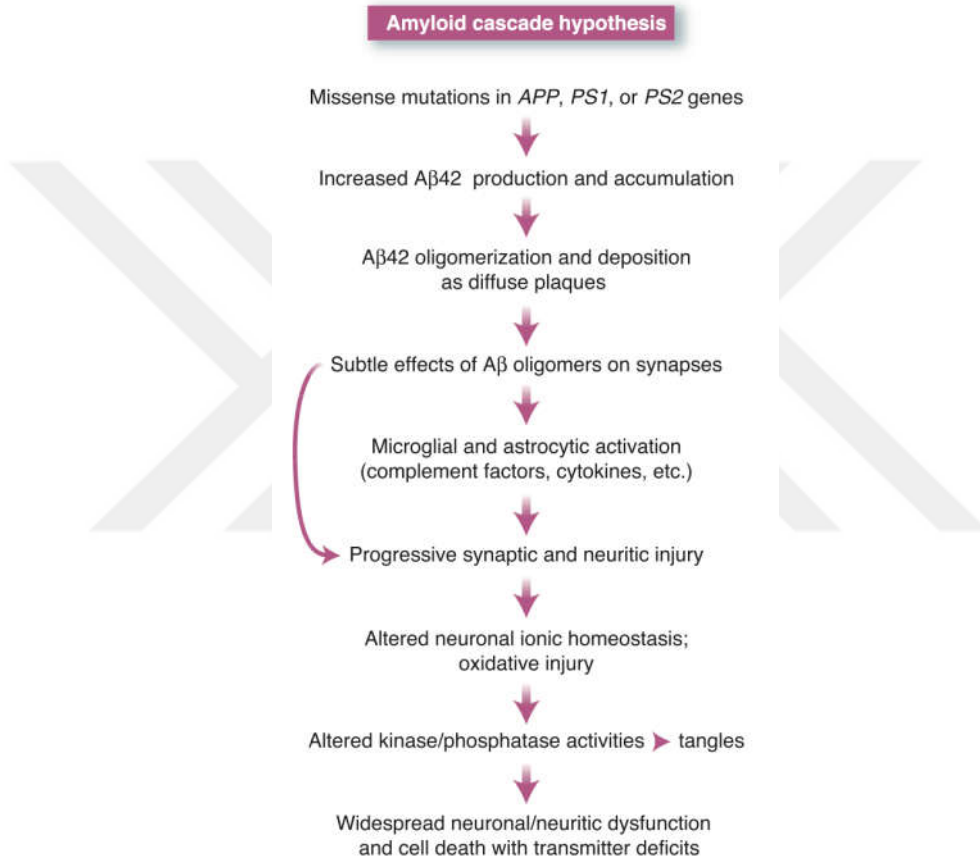
AH'nın fizyopatolojisinde amiloid kaskad ve kolinerjik hipotez olmak üzere 2 önemli hipotez bulunmaktadır .

Amiloid kaskad hipotezi Aβ plaklarının ekstrasellüler ve nörofibriler yumakların intrasellüler olarak birikimi ile başlar. Bu birikim Ca^{+2} homeostazının bozulması, glutamat eksitotoksitesi , reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi ve nöroinflamasyon gibi çok sayıda nörotoksik yolağı harekete geçirir (33). Bu hipoteze göre Aβ peptidin serebral birikiminin AH gelişiminde ana patolojik tetikleyici olduğunu gösterilirken ; nörofibriler yumakların oluşumu gibi ikincil değişiklikler, Aβ peptid üretimi ve klirensi arasındaki dengesizliğin bir sonucu olarak gösterilmektedir (34).

Kolinerjik hipotezde ise kolin asetil transferazın kaybı sonucunda bir nörotransmitter olan asetilkolinin azalmasıyla bilişsel ve bellek ile ilgili fonksiyonlarda bozulma meydana gelir (35).

Asetilkolin sisteminde bozukluk , kolinerjik nöronlarda kayıp gibi nedenler Alzheimer hastalığının patolojisinde gösterilse de amiloid kaskad hipotezi Alzheimer hastalığında gözlenen nörodejenerasyonun bir nedeni olarak uzun yıllardır yaygın olarak kabul edilmektedir (36).

Yapılan pek çok moleküler, genetik , biyokimyasal ve klinik çalışmalar AH da görülen sinaptik bozulma ve nöron dejenerasyonunda A β oligomerlerinin asıl rolü olduğunu belirtmektedir (37).



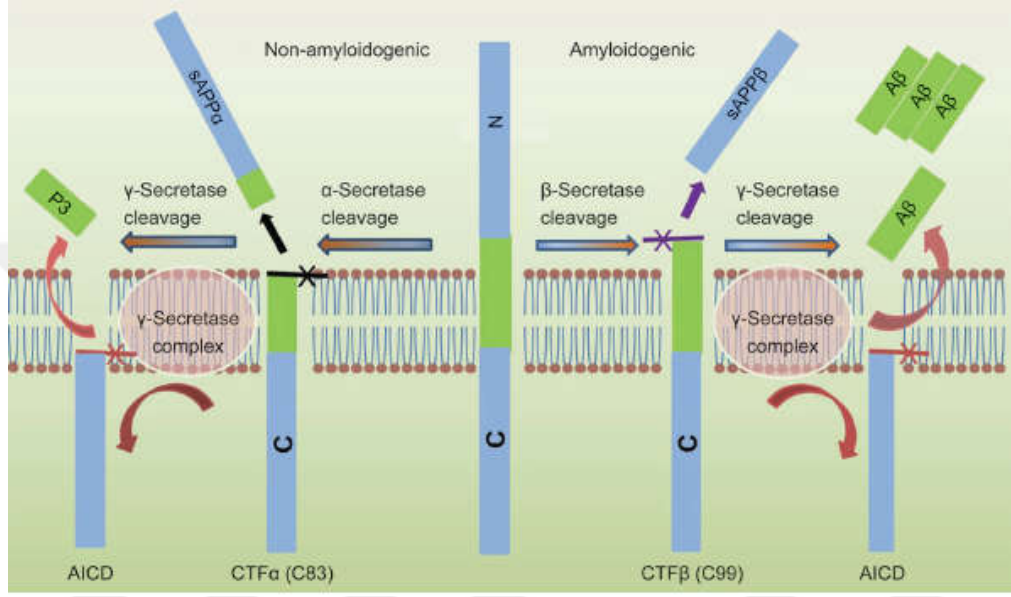
Şekil 1 : Amiloid kaskad hipotezi (37)

2.1.2.1. Amiloid Beta Prekürsör Proteini ve Amiloid Beta Peptidi

APP pek çok dokudan eksprese edilen ve nöronal plastisite için büyük önemi olan bir integral membran proteinidir. Bu protein büyük bir ekstrasellüler kısım, kısa bir transmembranal bölge ve sitoplazmik bir kuyruktan oluşmaktadır (38).

Amiloidojenik olmayan yolla APP ilk olarak N-terminal ucundan α sekretaz ile bölünerek 12 aminoasitlik büyük ve çözülebilen α -APP peptidi ekstrasellüler alana

salınmış olur. Amiloidojenik yolda ise APP β sekretaz enzimi ile bölünmesi sonucunda daha küçük olan β -APP peptidi serbestlenmiş olur (39). Bu bölünmeyi takiben geride kalan zarla ilişkili karboksiterminal parçadan γ sekretaz ile gerçekleşen bölünme ile A β peptidi oluşur. A β peptidlerin büyük çoğunluğunu A β 1-40 oluştururken yaklaşık %10 luk bir kısmını daha hidrofobik ve daha hızlı agregre olan A β 1-42 oluşturmaktadır (40).



Şekil 2 : APP bölünme yolları (38)

AH'nda görülen en belirgin nöropatolojik değişiklik hipokampus ve kortekste senil amiloid plakların yoğunlaşmasıdır. A β peptid bu senil plakların major komponentidir ve nöronlar, astrositler, glial hücreler ve beyin endotelyumu üzerinde çok sayıda toksik etkisi vardır (41). Serebral endotelial hücre sınırı, kan-beyin bariyerinin major komponentidir, KBB'nin geçirgenliğinin ve beyin parankiminin dengesinin korunmasında hayati bir rol oynar. AH'nda senil plakların birikimiyle birlikte serebral endotelial hücre sınırının yapı ve fonksiyonları bozulur; serebral kan akışı azalır, mikrovasküler yoğunluk artar, membranlardaki Ca^{+2} kanallarının formasyonu ve hücrel Ca^{+2} seviyesi değişir (42).

2.1.2.2. Nörofibriler Yumaklar

Tau proteini nöronal mikrotübül asosiye protein (MAP) ailesine ait olup mikrotübüllerin organizasyonu ve stabilizasyonunda rol alan ana proteindir(43) Hücre iskeleti proteinlerinden olan mikrotübüller hücre morfolojisinin korunmasında ve akson ve dendritlerdeki transportun sağlanmasında görev alır. Dolayısı ile tau proteini aksonal transport ve hücre morfolojisinin korunmasında rol oynar. Ayrıca tau proteininin nöron ve diğer hücre nükleuslarında DNA ve RNA ile etkileşime girdiği ve nukleolar yapının oluşumunda rol oynadığı düşünülmektedir (44, 45).

17. kromozomun üzerinde bulunan tek bir gen tarafından kodlanan tau proteini çözülebilir bir moleküldür. Ancak AH'da bu çözülebilen molekül fosforilasyon döngüsünün bozulması nedeniyle (kinaz aktivitesinde artış ve fosfataz aktivitesinde azalış) hiperfosforile olarak mikrotübüllere bağlanma yeteneği bozulur ve bağlanmamış hiperfosforilize tau monomerleri kendi üzerinde hatalı katlanarak toksik oligomerlere ve ardından toksik özellikte çözülemeyen çift sarmallı filamanlara (paired helical filaments- PHF) polimerize olur (46). PHF'ler ısı şoku proteinleri ve ubiquitin proteozom sistemlerinin varlığında intranöronal nörofibriler yumaklar (NFY) halinde kondanse olurlar. Bu NFY ler hücre iskeleti bütünlüğü ve aksonal iletimi bozarak hücrenin ölümüne neden olurlar (47) .

2.1.3. Nöroinflamasyon

Nöroinflamasyon başlangıçta çeşitli patojenleri inhibe ederek ya da ortadan kaldırarak beyni koruyan bir savunma mekanizmasıdır. İnflamatuvar yanıtın hücre artıklarını ortamdaki uzaklaştırarak ve doku onarımını düzenleyerek faydalı etkileri olsa da uzamış olan inflamatuvar yanıt doku rejenerasyonunu inhibe ederek zararlı etkiler ortaya çıkarabilir (48).

AH'nın oluşum sürecinde nöroinflamasyon her ne kadar plak birikimi ile indüklenerek gelişse de nöroinflamasyonun patofizyolojisi çok daha karmaşık ve farklı beyin hücrelerinin aktivasyonları ile oluşan bir süreçtir ve bu süreçte ana görev yapan hücreler herhangi bir beyin hasarı durumunda hızlı yanıt veren glial hücrelerdir (49).

Glial hücrelerden mikroglia ve astrositler SSS'deki inflamatuvar yanıtta rol alır. Hasarlı uyarı ortadan kaldırmak için aktive olarak fonksiyon ve morfolojilerinde bir takım önemli değişiklikler meydana gelir. Buradaki amaç A β plaklarının ortamdan uzaklaştırılması, A β plaklarına bağlı nörotoksisitenin azaltılması, plakların etrafında koruyucu bir bariyer sağlanmasıdır.

Mikroglialar , SSS'de mikroçevrenin korunmasından ve hasara karşı lokal immün yanıtta sorumludurlar ve immün yanıtta ilk sırada rol alan savunma hücreleridir. Fizyolojik koşullar altında istirahat halinde bulunan mikroglia hücreleri, SSS mikroçevresindeki değişikliklerle birlikte aktive hale gelir (50).

Bu aktivasyon yüzeylerinde bulunan kalıp tanıma reseptörleri (PRR ,pattern recognition receptor) aracılığıyla ilgili liganda bağlanması sonucu gerçekleşir. Aktive olmuş mikroglialardan TNF- α , IL-6, IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinler, inflamatuvar mediyatörler , ROS , Nitrik oksit (NO) ve kemokin salınımı gerçekleşir.

Aktive olmuş mikroglialardan salınan proinflamatuvar mediyatörler KBB sıkı bağlantılar ,transport ve endotelial hücre yüzey (surface) proteinlerinde ve vasküler dansitede bir takım değişikliklere neden olarak bariyerin permeabilitesinde artışa neden olur (36). KBB'nin bozulması, monositler, makrofajlar, nötrofiller ve T hücreleri dahil olmak üzere diğer immün hücrelerin inflamatuvar bölgeye göçüne neden olur .Bu inflamatuvar süreç kontrol edilemez veya baskılanamazsa, SSS'nin yerleşik hücreleri zarar görebilir doku hasarı ve nöron ölümü meydana gelebilir.

Astrositler beynin fonksiyonel ve yapısal düzenlenmesinde aktif olarak rol alan hücrelerdir. Nöronlara trofik ve metabolik destek sağlar , nöronal sinyal iletimi, sinaptik formasyon ve plastisitede görev alır (51).

Astrositler SSS'deki hasar ve hastalık durumlarında glial fibriler asidik proteinin (GFAP) artışı ile hipertrofi ve proliferasyonun da içinde olduğu bir takım morfolojik değişikliklere uğrayarak reaktif astrogliozis meydana gelir(50).Reaktif astrositlerden proinflamatuvar sitokinlerin salınımı gerçekleşir.

AH'da aktivasyon süresinin uzamasıyla birlikte aktive olmuş mikroglia ve astrositlerden salınan proinflamatuvar sitokinler APP in beta sekretaz ile bölünmesinde artışa neden olarak A β plaklarının oluşumuna ,bu plakların aktive olmuş glial hücreler tarafından fagosit edilip temizlenmesinde azalmaya ve plak seviyelerinde artışa neden olur (50) .

2.1.4. Alzheimer Hastalığı ve Oksidatif Stres

Oksidatif stres , ROS'un tetiklediği hücre, doku ya da organlardaki hücresel oksidan oluşumlar ve antioksidan mekanizmalar arasındaki dengesizliği ifade eden bir terimdir (52). Dokularda bu redoks dengesinin bozulması protein, lipid ve DNA yı da içine alan hücrenin tüm komponentleri için toksik etkileri olan peroksitlerin ve ROS üretimine neden olur (53).

ROS son yörüngelerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektronu olan moleküllerdir. Bu moleküllerin elektron yapılanmaları onları yüksek derecede kararsız ve kimyasal olarak fazla reaktif hale getirir. Bulabildikleri herhangi bir molekül ile etkileşime girer ve bu molekülden ya bir elektron alarak ya da ona bir elektron vererek yapısını bozarlar (54).

ROS detoksifikasyonu beyin için özellikle önemlidir, çünkü beyin oksidatif strese karşı çeşitli nedenlerden ötürü hassas bir organdır. Bu nedenler ; diğer hücrelere kıyasla nöronların yüksek aerobik enerji döngüsü için oksidatif fosforilasyona bağımlı olmaları ,beynin yüksek oksijen konsantrasyonuna maruz kalması , nöron membranlarının lipid peroksidasyonuna eğilimi olan poliansatüre yağ asidi içeriğinden zengin olması, hücresel süperoksitin ana üretim merkezi olan mitokondrilerin diğer organlara göre beyinde daha fazla bulunması ,nöronların glutasyon üretme yeteneğinin olmaması ve nispeten zayıf konsantrasyonlarda antioksidan içermesi beyin oksidatif stresle mücadele yeteneğini sınırlandırır .Bu da onu reaktif oksijen türlerine duyarlı hale getirir. Bu reaktif oksijen türleri lipitlere ve proteinlere saldırarak hücre zarının yapısını ve fonksiyonlarını bozabilirler (55).

Alzheimer tipi demansta ROS düzeyini arttırabilecek çeşitli nedenler de bulunmaktadır. Bunlar elektron transport zincirinde bozulma ve bunun sonucunda aşırı ROS oluşumuna neden olan mitokondriyal işlev bozukluğu , nöroinflamatuvar yanıtı başlatan ve mikrogliaları aktive eden (mikrogliaların aktivasyonu kendi başına potansiyel ROS kaynağıdır) ekstrasellüler Aβ peptid birikimidir (56).

İnflamasyon canlı dokuların karşılaştıkları hasara vermiş oldukları bir yanıttır. Beyin enfeksiyon , hastalık ve hasara karşı inflamasyon ile yanıt verir (57).

Nöroinflamasyon AH'nın ilerlemesinde en büyük rolü olan etkenlerden biridir ve hipokampus gibi nöroinflamasyona yatkın olan bölgelerde dejenerasyona neden olabilir (58). Alzheimer hastalığında oksidatif stres, kendi kendini devam ettiren kronik nöroinflamasyon döngüsünü aktifleyerek oksidatif stresin ilerlemesine ve geri dönüşü olmayan nöronal hasar ve hücre ölümüne neden olabilmektedir (59). Oksidatif stres ve nöroinflamasyonun Aβ üretimini arttırdığını kanıtlayan bazı araştırmalar da mevcuttur (60, 61, 62).

AH' daki nörodejenerasyon kaskadında oksidatif stres ve inflamasyonun önemli etkisi bulunmaktadır (63).

2.1.5 Bellek

Öğrenilen bilgilerin depolanması , kalıcı hale getirilmesi ,kodlanması ve geri çağırılabilmesine bellek denir. Belleğin oluşum sürecinde bir takım moleküler ve hücresel düzeyde değişiklikler, sinapslarda fonksiyonel ve yapısal değişimler meydana gelmektedir. Nöronal aktivitenin paternleri olarak bilinen sinaptik gücün azalması uzun süreli depresyon (long-term depression, LTD) ve sinaptik gücün artması uzun süreli potansiyalizasyon (long-term potentiation, LTP) un bellek oluşum sürecinde altta yatan hücresel mekanizmalar olduğu düşünülmektedir (64).

2.1.5.1. Belleğin Sınıflandırılması

2.1.5.1.1. Kısa Süreli Bellek

Gelen bilgi alındıktan sonra kısa bir süre için saniyeden dakikaya kadar kayıtlar ve saklar. Diğer bir tanımla bilinçli olarak bilgiyi aklımızda tuttuğumuzda kullandığımız bellektir. Kendi içerisinde duyuşsal bellek, kısa dönem depolama ve işler bellek olarak 3 e ayrılır. Kısa süreli bellek günler veya aylarca depolanan ve sonra yeniden geri çağırılabilen uzun süreli belleğe dönüşebilir. Bu dönüşüm işlemine konsolidasyon denir (65).

2.1.5.1.2.Uzun Süreli Bellek

Uzun süreli bellekte bilgiler yıllarca saklanabilir. Deklaratif ve non deklaratif bellek olmak üzere 2 ye ayrılır.

Deklaratif (eksplisit) bellek: Bilinçli deneyimlerin akılda tutulması ve hatırlanmasıdır. İlk kez Kanadalı psikolog Endel Tulving tarafından tanımlanmış ve epizodik bellek ve semantik bellek olarak ikiye ayrılmıştır. Mediyal temporal lob her iki belleğin oluşmasında da kritik bir role sahiptir. Deklaratif belleğin oluşumunda kodlama,depolama,konsolidasyon ve geri çağırma olmak üzere birbiri ile ilişkili 4 basamak bulunmaktadır.

Kodlama : Yeni bilgilerin belleğe kaydedildiği ve eski bilgilerle ilişkilendirildiği süreçtir.

Depolama: Zaman boyunca belleğin saklandığı alanları ve mekanizmaları ifade eder. Uzun süreli belleğin hemen hemen sınırsız bir kapasiteye sahip olduğu düşünülmektedir. Aksine işler belleğin herhangi bir zamanda sadece birkaç parça bilgiyi tutabildiği düşünülmektedir.

Konsolidasyon: Geçici depolanmış bilginin daha kalıcı hale getirilmesi sürecidir.Bu süreç sinapsta yapısal değişikliğe neden olan protein sentezi ve gen ekspresyonunu gerektirir.

Geri çağırma : Depolanmış bilginin hatırlanmasıdır. Farklı alanlarda depolanmış farklı tipteki bilginin zihinde geri çağırılmasıdır.

Non-deklaratif (implisit) Bellek : Bilinçli çaba olmaksızın kazanılan ve bilinçsiz davranışlarımıza rehberlik eden bilgi formu olarak bilinir. Non-deklaratif bellek bilinçsiz ve otomatik olarak işlev görür ve alışkanlıkların, algısal ve motor becerilerin belleğidir. Kendi içerisinde 4 e ayrılır.

- 1) Priming (Hazırlama): Daha önceki karşılaşmayla kelimelerin ve cisimlerin tanınmasının kolaylaşmasıdır. Priming herhangi bir uyaran ile tekrar karşılaşıldığında daha verimli ve daha hızlı bir yanıt oluşmasını sağlar.
- 2) Prosedural bellek (Beceri ve alışkanlık belleği): Alışkanlıkların önemli bir bölümü erken yaşlarda kalanları ise yaşam boyu kazanılır. Motor öğrenme basit davranışlar için hareket kalıplarının oluşturulması ve sağlamlaştırılması ile gerçekleşir. Karmaşık motor öğrenme ise basit kalıpların birleştirilmesiyle oluşur. Becerilerin öğrenilmesi kademelidir. Yeni algısal, motor ya da bilişsel yetenekler tekrarlar ile öğrenilir. Tekrarlar ile performans daha doğru ve daha hızlı hale gelir. Motor beceriler önce daha çok bilinçli dikkat gerektiren deklaratif bellekte öğrenilir, sonrasında non-deklaratif bellek ile daha çok otonom olarak gerçekleştirilir. Becerilerin öğrenilmesi bazal gangliyonlar, serebellum ve kortekse bağlıdır. Alışkanlık öğrenmesinin pek çok şekli striatum, globus pallidum, substantia nigra, subthalamik çekirdek olmak üzere bazal gangliyonların dört çekirdeğine bağlıdır.
- 3) Asosiyatif Bellek : İki uyaran arasındaki ilişkinin öğrenilmesi olarak tanımlanır. En bilinen şekli klasik şartlanmadır. Klasik şartlanma ilk olarak Ivan Pavlov tarafından tanımlanmıştır. Burada bir şartlı uyaran (ses, ışık veya dokunma gibi normalde pek yanıt oluşturmayan) bir de şartsız uyaran (elektrik şoku gibi her koşulda yanıt oluşturan) kullanılır. Şartlı uyaran ardından şartsız uyaran birlikte verilirse bir süre sonra şartlı uyarana tek başına yanıt oluşabilir. Şartlı uyaran bir tahmin sinyali olarak öğrenilir ve yanıt oluşturmaya başlar. Edward Thorndike tarafından tanımlanan ve Burrhus Frederic Skinner tarafından sistematik olarak çalışılan operant şartlanma, deneyin özel bir davranışla ödüllendirici bir olayı ilişkilendirmeyi öğrenmesidir. Örneğin, aç bırakılan bir kemirgen kafeste bulunan bir levyeye raslantısal olarak basar ve yiyeceği alır. Bundan sonra levyeye daha sık basar ve yemek alır, sonunda acıktıkça levyeye basması gerektiğini öğrenir. Bu öğrenme tipinde özgül bir uyaran yoktur. Hem klasik hem de operant şartlanmada zamanlama önemlidir. Hayvan levyeye bastıktan kısa süre sonra yanıt alırsa hızlı öğrenir, geç yanıt alırsa ilişkiyi kurmakta zorlanır.

- 4) Nonasosiyatif Bellek : Nonasosiyatif bellek bir uyarana verilen yanıtın değişmesidir. Habitüasyon (alışma) ve sensitizasyon (duyarlanma) olmak üzere ikiye ayrılır. Uyarının tekrarlayan uygulaması yanıtta azalmaya yol açıyorsa habitüasyon, artmaya yol açıyorsa sensitizasyon adı verilir. Her ikisinde de uyarılarla yanıt arasında zamanlamanın önemi yoktur (65).

2.1.5.2.Long Term Potansiyalizasyon (LTP)

Sinaptik plastisite kavramı, 1949’da Donald Hebb adlı bir psikolog tarafından bir hücrenin aksonunun diğer hücreyi tekrarlayan ve sürekli olarak uyarması sonucunda her iki hücrede de bir takım yapısal ve metabolik değişikliklerin olabileceğini öne sürmesi ile ortaya çıkmıştır (66).

Nöronların birbirleriyle bağlantı kurduğu ve etkileşim içinde olduğu bölgelere sinaps denir. Sinaptik plastisite bu sinapslar arasındaki bağlantının değişme kapasitesi olarak tanımlanır ve davranış ve belleğin altında yatan temel mekanizmayı oluşturmaktadır. LTP ve LTD olmak üzere sinaptik plastisitenin 2 ana formu bulunmaktadır (67).

LTP sinaptik gücün uzun süreli, aktivite bağımlı olarak artmasıdır ve kendi içerisinde kısa dönem, erken ve geç LTP olmak üzere üç sıralı faza ayrılır. Eksitator, kısa süreli ve yüksek frekanslı bir set uyarılar yaklaşık 1-3 saat kadar süren kısa dönem ve erken LTP oluşumuna neden olur. Bu fazlarda yeni protein sentezi gerçekleşmez. 4 set ve daha fazla eğitim uyarıları ise geç LTP olarak adlandırılan en az 24 saat süren yeni protein ve RNA sentezinin olduğu daha kalıcı bir LTP fazını indükler. Bu fazda siklik AMP (cAMP)- Protein Kinaz A (PKA)-Mitojenler tarafından aktive edilen protein kinaz (MAPK)- siklik AMP yanıt elemanı bağlayıcı proteinini (CREB) sinyal yolağını uyarır (66).

LTP oluşum mekanizmalarını değerlendirmek için hipokampusün CA1 bölgesi Schaffer kollateralleri en çok çalışılan bölgedir (68).

Bir uyarının LTP oluşturabilmesi için hem eksitator özellikte olması hem de yüksek frekanslı olması gerekir. Hipokampusün CA3 piramidal nöronlarından CA1 nöronlarına uzanan Schaffer kollaterallerinde NMDA reseptörlerinin LTP

oluşturması öğrenme ve bellekle ilgili temel mekanizmalardan biridir. Schaffer kollaterallerinden serbestlenen glutamat CA1 piramidal nöronların postsinaptik membranlarında bulunan hem NMDA hem de AMPA reseptörlerine bağlanmaktadır ancak NMDA reseptörleri Mg ile bloke olduğundan sadece AMPA reseptörleri membran potansiyel değişikliğine neden olmaktadır. Eğer postsinaptik nöronda aksiyon potansiyeli oluşursa Mg blokajı kalkmakta ve NMDA reseptörleri de etkin hale gelerek postsinaptik depolarizasyona katkıda bulunmaktadır. NMDA reseptörleri AMPA'ya göre çok daha fazla Ca^{+2} a geçirgendir. NMDA reseptörleri açılınca hücre içinde hızla Ca^{+2} miktarı artar. Bu artış kalsiyum kalmodulin bağımlı protein kinaz II (CaMKII), protein kinaz C ve tirozin kinaz olmak üzere birkaç sinyal yolağını aktive eder. Bu sinyal yolları hem postsinaptik hücrede yanıtı arttırmakta hem de presinaptik hücrelerden daha fazla glutamat serbestlenmesine neden olmaktadır. Hücre içi artan Ca^{+2} nitrik oksit sentaz (NOS) enzimini de aktive etmektedir. NOS sayesinde üretilen NO membranları kolayca geçtiğinden hızla difüzyona uğramaktadır. Presinaptik alana ulaşan NO veziküllerin membrana bağlanmasını artırarak presinaptik uçtan daha da fazla glutamat serbestlenmesine neden olur. Tüm bu süreçlerle post sinaptik hücrede çok daha büyük ve uzun süreli eksitator yanıt olan LTP oluşmaktadır (65).

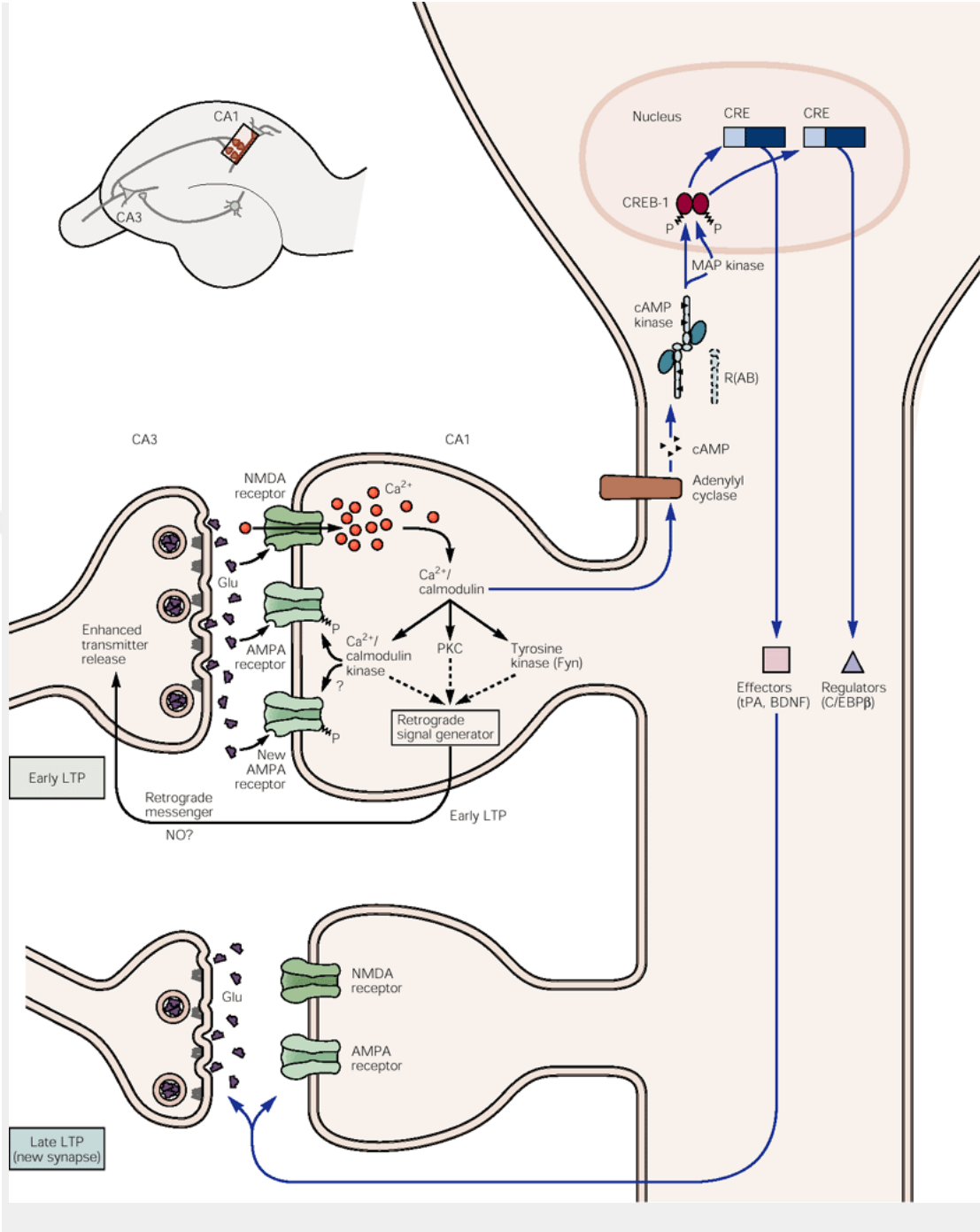
LTP bir kez oluştuğunda kendi kendini devam ettirebilmektedir. Ca^{+2} un hücre içi konsantrasyonlarının sürekli artması adenilat siklazı aktive eder. Adenilat siklaz da cAMP miktarını artırarak cAMP bağımlı protein kinazı aktive eder. Aktive olan cAMP kinaz hücre çekirdeğine girerek CREB'i fosforiller. CREB de hedef genleri aktive ederek yapısal değişikliğe neden olan protein sentezini başlatır. Bunun sonucunda yeni sinaps oluşumunda rol alan doku plazminojen aktivatörü ve BDNF sentezlenir (69).

Belleğin kodlanmasında sinaptik bağlantıların yapısı ve gücünün önemli olduğu bilinmektedir. Sinaptik gücün göstergesi olan LTP deki azalmalar bellek bozukluklarına neden olurken, LTP deki artışlar öğrenme ve belleğin güçlenmesi ile ilişkilidir (70). Bununla birlikte, sinir ağlarında yeni bilgileri depolama yeteneği, sinaptik bağlantıların plastisite derecesi kadar mevcut bağlantıların sayısına da bağlıdır. Bu nedenle, sinaps sayısı da öğrenme ve bellek için kritik önemdedir.

Sinaps kaybının, sıçanlarda yaşa bağı bellek kaybı ile ilişkili olduğı bilinmektedir (71).

AH fare modelleri ile yapılan bir çalışmada A β oligomerlerinin sinaptik plastisiteyi bozduğı ve LTP yi inhibe ettiğı gözlemlenmiştir (72).

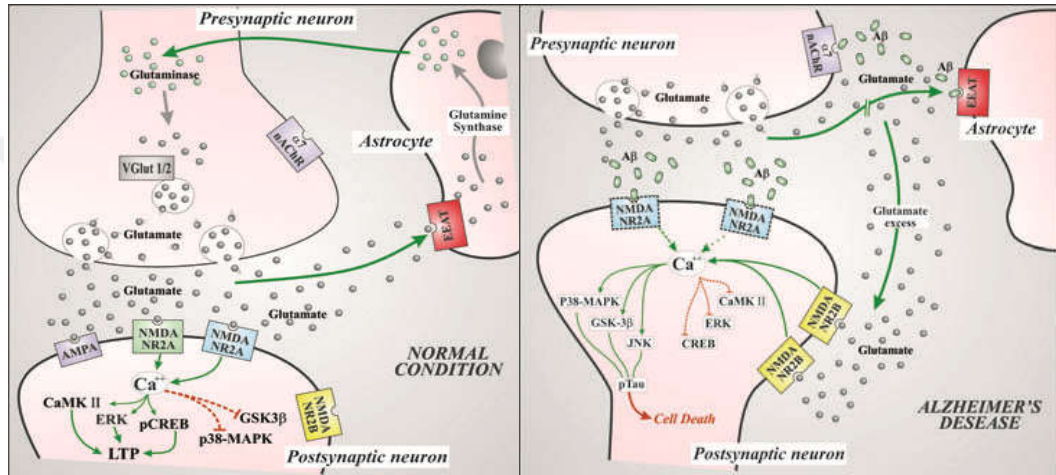




Şekil 3: Erken ve geç LTP (69)

2.1.5.3.AH ve Glutamat Eksitotoksitesitesi

Sinaps aktivasyonunu takiben glial hücreler fazla olan glutamati EAAT 1 ve 2 (excitatory amino acids transporters-eksitator amino asit taşıyıcıları) aracılığı ile alır. Burada glutamat glutamine dönüştürülerek presinaptik terminallere geri taşınır. Presinaptik terminallerde glutamin glutaminaz enzimi aracılığı ile glutmata dönüşür ve veziküler taşıyıcılar VGLUT 1 ve 2 aracılığı ile veziküllere taşınır (73) .



Şekil 4: Glutamat Eksitotoksitesitesi (74)

AH' da patolojik olarak artan Aβ glutamatin EATT taşıyıcıları aracılığıyla glial hücrelere alımını bloke eder. Böylece sinaptik aralıkta glutamat konsantrasyonlarının artışına neden olur (75, 76).

Glutamat seviyelerinin yükselmesi NR2B reseptörlerinde aşırı aktivasyonuna yol açar. NR2B reseptörlerinin aşırı aktivasyonu Ca⁺² seviyelerinin artmasına, tau hiperfosforilasyonuna neden olan yollarına aktivitesinin artmasına ve aynı zamanda nöronu koruyan yolların inhibisyonuna neden olarak sinaptik kayıplara ve sinaptik plastisitede bozulmalara neden olur. Bu durum ne kadar devam ederse, aktive patolojik yollar tau hiperfosforilasyonu ile birlikte nöronal dejenerasyon ve hücre ölümüne o kadar fazla yol açar (8, 9).

2.1.5.4. NMDA Reseptörleri

NMDA reseptörlerinin sinaptik plastisitenin kontrolünde ve bellek oluşumunda şekillenmesinde görev alan önemli moleküller olduğu bilinmektedir (77, 78).

NMDA reseptörleri hemen her yerde bulunan NR1 subuniti ve modülatör olan NR2 (NR2A-D) ve NR3 (NR3A-B) subunitlerinden oluşmaktadır. Santral sinir sisteminde NR2 subunitleri gelişimsel ve bölgesel olarak farklı ekspresyon paternleri gösterir. Yetişkin bireylerin beyin dokusunda neokorteks ve hipokampüste NR2A ve B reseptörleri en çok bulunan formudur. Gelişimin farklı basamaklarını değerlendirmek amacıyla 3,10 ve 30 aylık fare grupları alınarak yapılan bir çalışmada yaşlanmayla birlikte NR2B subunitlerinin mRNA ekspresyonunda belirgin bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Bunun sonucunda NR2B subunitindeki belirgin azalmanın yaşa bağlı bellek ve kognitif fonksiyonlardaki bozulma ile ilişki olabileceği düşünülmüştür (79). Beyin yaşlandıkça önbeyindeki NR2B subunitleri azalarak NR2A:NR2B oranında artışa neden olur. Bu artış sinaptik plastisitede azalmaya ve uzun süreli bellekte bozulmalara neden olur(80).

Deneyisel Alzheimer modeli oluşturulan farelerde yapılan bir çalışmada sinaptik bölgelerde NR2A subunit seviyesinde önemli ölçüde artış olduğu gözlenmiştir (81).

AH olan bireyler üzerinde postmortem yapılan başka bir çalışmada ise kontrol grubuna kıyasla hipokampus ve entorhinal kortekste NR2B reseptör seviyelerinde belirgin bir azalma olduğu saptanmıştır (82) .

2.2. Magnezyum ve Magnezyum L-treonat

Mg insan vücudunda 300 den fazla enzimatik reaksiyonun kofaktörü olmak üzere çok sayıda rolü olan önemli bir mineraldir. Kas kasılması, kan basıncı ve insülin metabolizmasının düzenlenmesinde, DNA, RNA ve proteinlerin sentezinde gerekli olan esas elementtir (83). Sinir sisteminde magnezyum, optimal sinir iletimi ve nöromusküler koordinasyon için önemlidir ve ayrıca eksitotoksisteye karşı korumada önemli rolü vardır (84). Mg'un ana nörolojik işlevlerinden biri NMDA reseptörü ile etkileşiminden kaynaklanmaktadır. Mg, NMDA reseptöründeki Ca⁺² kanalı için bir blokaj görevi görür, glutamaterjik eksitator sinyalin oluşabilmesi için magnezyumun buradan uzaklaştırılması gerekir (85). Mg seviyelerinin düşük olması teorik olarak glutamaterjik nörotransmisyonu güçlendirebilir, bu da oksidatif strese

ve nöronal hücre ölümüne yol açabilen eksitotoksisite için destekleyici bir ortama yol açar (17). Anormal glutamaterjik sinir iletimi, migren, kronik ağrı, epilepsi, Alzheimer ve Parkinson hastalığı dahil olmak üzere birçok nörolojik ve psikiyatrik bozuklukla ve bu nörolojik bozukluklarla sıklıkla birlikte görülen depresyon ve anksiyete ile ilişkilendirilmiştir (86).

Mg NMDA reseptörlerindeki Ca^{+2} kanalını bloke eder. Buradan yola çıkarak Mg seviyesinin yükselmesinin NMDA reseptörlerine bağlı sinyalizasyonda bir azalma ve bunun sonucunda öğrenme ve bellek bozukluklarında artış meydana getirebileceği düşüncesi oluşmaktadır. Fakat Slutsky ve ark. hipokampal nöron kültürleri üzerinde yaptığı bir çalışmada fizyolojik koşullar altında hipokampal nöron kültür ortamında Mg konsantrasyonunun hafif ve geçici olarak yükseltilmesinin (0,8 mM den 1 saat içerisinde 1,2 mM'ye kadar) NMDA dinlenim membran potansiyelinde azalmaya yol açtığı gözlenirken , Mg'un yükselmesi yeterince uzun sürdüğünde (nöronlar 1,2 mM Mg altında büyütüldükten sonra) kaydedilen NMDA dinlenim membran potansiyeli bazal durum ile neredeyse aynı bulunmuştur. Mg yeterince uzun süre uygulandığında NMDA reseptör miktarının arttığı ve pozitif membran potansiyelinin çok daha yüksek amplitüd oluşturduğu da gözlenmiştir. Bunların sonucunda kronik Mg uygulamasının NMDA reseptörlerine bağlı sinyalizasyonu arttırdığı sonucuna varılmıştır (22).

Hipokampal nöron kültürlerinde yapılan bir in vitro çalışmada ekstrasellüler sıvıdaki Mg artışının sinaptik plasititeyi arttırdığı gösterilmiştir (87). Farklı yaşlardaki sıçanlara Mg L-treonat verilerek in vivo yapılan bir çalışmada ise beyindeki Mg seviyesindeki artışın LTP yi güçlendirdiği gözlemlenmiştir (22).

Alzheimer hastaları üzerinde postmortem yapılan bir çalışmada beyin dokularından yapılan biopsilerde sağlıklı kişilere kıyasla Mg konsantrasyonlarının düşük olduğu saptanmıştır (12). Fare hücre kültürleri üzerinde yapılan başka bir çalışmada ekstrasellüler Mg seviyesinin yüksek olması durumunda APP'nin bölünme aşamalarında Mg'un alfa sekretaz ile olan bölünme yolunu uyardığı gözlenmiştir (88).

2.2.1.Magnezyum L-treonat

L-Treonat, (2R,3S)-2,3,4-Trihidroksibütanoat, $C_4H_7O_5$ yapısında, vücutta doğal olarak bulunan bir şeker asididir (89). Treonat ve Mg^{+2} kombinasyonundan oluşan Mg L-treonat tuzunun oral yoldan verilmesi ile hem yaşlı sıçanlarda hem de geç evre AH modeli farelerinde sinaps yoğunluğunu ve hafıza yeteneğini arttırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur (15, 22).

Bilinen diğer mevcut magnezyum bileşiklerinde Mg'un biyoyararlanımı, Mg'un kan-beyin bariyerinden geçişini sınırlayabilir. Bunun nedeni, aktif taşıma sistemlerinin önce sindirim sisteminden kana, sonra kandan beyin omurilik sıvısına (BOS) geçen Mg miktarını sıkı bir şekilde kontrol etmesidir (90). İnsanlarda kan Mg'unu %300'e kadar artırmak, BOS Mg seviyesinde sadece %19'dan daha az bir değişime neden olmaktadır (91). Bu sorunu çözebilmek için oral alım ile BOS'taki Mg konsantrasyonunun daha efektif olarak artırması amacıyla Mg L-treonat geliştirilmiştir. Çeşitli magnezyum bileşikleriyle yapılan bir çalışmada farklı Mg bileşiklerinin verilmeden önceki, verildikten sonra 12. ve 24. günlerde BOS'taki Mg seviyeleri ölçülmüştür. Mg L-treonatın diğer Mg bileşiklerine göre Mg'un KBB'den daha verimli geçişine izin verdiği ve BOS'ta Mg seviyesini daha etkili bir şekilde artırdığı gözlenmiştir. Yine aynı çalışmada diğer Mg bileşiklerine kıyasla Mg L-treonatın BOS'ta ve beyinde NR2B ekspresyonunda belirgin artış sağladığı, nesne tanıma belleğini, çalışma belleğini ve spasyal belleği önemli ölçüde iyileştirdiği gözlenmiştir (22).

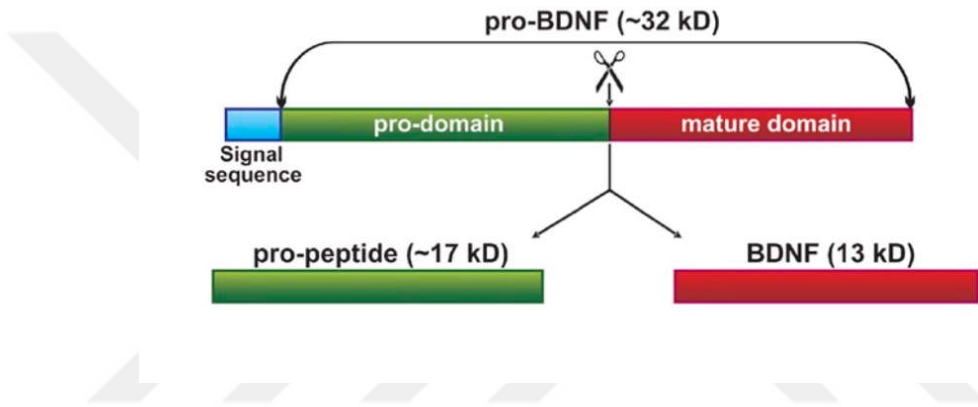
50-70 yaş aralığındaki Alzheimer hastaları ile yapılan bir çalışmada ise plasebo verilen gruba kıyasla Mg L-treonat alan grupta Mg L-treonatın kognitif bozuklukları iyileştirmede etkili olduğu gösterilmiştir (92).

2.3.BDNF Sentezi ve Salınımı

Nöron büyüme faktörü (NGF), BDNF ve nörotrofinler(NT-3,NT-4,NT-6) memeli nörotrofin protein ailesini oluşturur (93). BDNF 1982 yılında keşfedilmiştir ve başlangıçta küçük bir dimerik protein olarak tanımlanmıştır (94). İnsan vücudunda pro ve olgun olmak üzere 2 tip BDNF bulunur (95). Nörotrofinler ve BDNF endoplazmik retikulumda pre-pro-nörotrofinler olarak sentezlenir. Pre-pro-BDNF sinyal peptidin ayrılması ile pro-BDNF haline gelir (96).

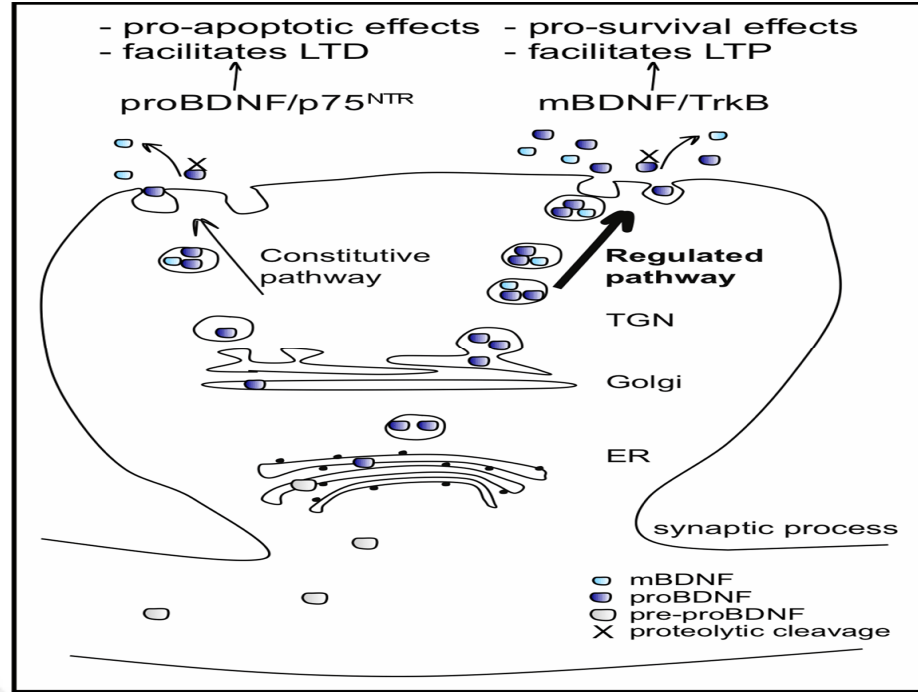
Pro-BDNF, prodomain içinde N-glikozillenmiş ve glikosülfatlanmış kalıntılara sahip 247 amino asit içeren 32 kDa'lık bir öncüdür (97).

Pro-BDNF in büyük bir çoğunluğu veziküller içerisinde paketlenir ve plazmin, metalloproteinaz gen matrilisin, tPA/plazmin kaskadı ve ekstrasellüler matriks metalloproteinazlar gibi ekstrasellüler proteazlar aracılığıyla N terminal ucundan bölünür. Golginin trans yüzünde ilk bölümün ayrılması ile olgun BDNF oluşur. Bu oluşan olgun BDNF daha sonrasında aktiviteye bağlı olarak nöronlardan salınır (98).



Şekil 5: BDNF'in bölünmesi (96)

BDNF'nin yüksek affiniteli reseptörü (Tirozin kinaz B) TrkB, düşük affiniteli reseptörü ise p75'dir. BDNF TrkB reseptörüne bağlandıktan sonra fosfatidil inozitol-3 kinaz (PI-3 K), fosfolipaz C gama (PLC γ) ve hücre dışı sinyal düzenleyici kinaz (ERK) gibi büyüme ve sağkalım sinyal yollarını aktive eder. ProBDNF'nin p75NTR'ye bağlanması ise nöronal apoptozisi teşvik eder (99).



Şekil 6: BDNF'nin salınımı (99)

2.3.1.BDNF in Fizyolojik Özellikleri

BDNF, periferik ve santral sinir sistemindeki nöronların hayatta kalması, farklılaşması ,gelişimi ve işlevlerini etkileyerek sinaps işlevini, akson ve dendrit dallanmalarını düzenleyen bir nörotrofindir (23).

BDNF ayrıca SSS'de nörotransmitterlerin görev yaptığı önemli sinir yollarının yapısal olarak sağlıklı kalmalarına ve görevlerini devam ettirmelerine de katkı sağlar. Bu bağlamda sentez ve salınımindaki aksaklıkların bir takım nörolojik ve nörodejeneratif hastalıklara yatkınlığı arttırdığı düşünülmektedir (25). Alzheimer hastaları üzerinde postmortem yapılan bir çalışmada beyin dokusunda BDNF mRNA ekspresyonlarının azalmış olduğu gözlenmiştir (26). Zheng ve arkadaşlarının 2010 yılında yapmış olduğu bir çalışmada A β peptidin, pro-BDNF'den BDNF in proteolitik dönüşümünü doğrudan engelleyebileceğine ve böylece seviyelerini azaltabileceğine dair bazı bulgular elde edilmiştir ve bunun oligomerik A β varlığında Pro BDNF ten olgun BDNF oluşumunu sağlayan ekstrasellüler proteazların ProBDNF i ayırmak yerine A β ' yı hedef almasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür (100).

Sinaptik plastisitenin bilinen en iyi düzenleyicisi BDNF'dir. BDNF in hipokampüste nöronal aktiviteye bağlı olarak ekspresyonu ve salgılanması artmaktadır (101). BDNF knockout farelerde yapılan bir çalışmada öğrenme ve bellek formasyonunun bozulduğu ,dışarıdan rekombinant BDNF protein verilmesi ile birlikte ise LTP ve bazal sinaptik iletimin düzeldiği görülmüştür. Bu BDNF ekspresyonundaki azalmanın hipokampal LTP oluşumunda önemli derecede bozulmaya neden olduğunun bir göstergesi olarak kabul edilmiştir (102, 103).

BDNF NMDA reseptörlerinin fosforilasyonunu düzenleyerek postsinaptik glutamaterjik sinaptik iletimi artırarak NMDA reseptör aktivitesini artırır (104). Hipokampal nöron kültürlerinde yapılan bir çalışmada BDNF'in NMDA reseptörlerinin kümelenmesini arttırdığı ve AMPA reseptör protein seviyelerinde artışa neden olduğu gözlenmiştir (105).

BDNF, hipokampal ve kortikal nöronlarda NR1 ve NR2B alt birimlerinin fosforilasyonunu ve NMDA reseptör kanallarının açık kalma olasılığını artırır. NR2B'nin fosforilasyonunun, BDNF tarafından glutamaterjik sinaptik iletimin artmasına katkıda bulunduğu ve NR2B alt biriminin tirozin fosforilasyonunun da hipokampüsün CA1 bölgesindeki LTP ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (106, 107).

BDNF'nin NMDA reseptörleri üzerindeki bu hızlı etkilerine ek olarak serebrokortikal nöron kültürleri üzerinde yapılan başka bir çalışmada NR1 için mRNA'nın translasyonunu arttırdığı da gösterilmiştir (108).

2.4. Alzheimer Hastalığının Klinik Özellikleri

Alzheimer Hastalığının klinik belirtilerini kognitif belirtiler, davranışsal belirtiler ve günlük yaşam aktivitelerinde bozulma belirtileri olarak 3 grupta toplayabiliriz.

Kognitif belirtiler ; AH tipik olarak sinsi başlayan ve yavaş yavaş ilerleyen bir amnezi ile karakterizedir. Limbik veya hipokampal tipte olduğu bilinen bu amnezinin en büyük özelliği yeni bilgilerin kaydedilmesinde ortaya çıkan güçlülüdür. Hastalar çok yakındaki (örneğin birkaç dakika ya da birkaç saat önce olan) olayları , söylenenleri hatırlayamazlar. Bunun sonucunda dakikalar içinde aynı soruları tekrar sorarlar. Nereye koyduklarını hatırlamadıkları için kişisel eşyaların kaybı sıktır. Bu

şekilde yakın geçmişi hatırlayamayan hastaların uzak geçmişi ince ayrıntıları ile anlatabilmeleri göze çarpar. Tipik olarak bellekte geriye doğru bir yıkım vardır. En son öğrenilen bilgiler, olaylar, yetiler ilk önce kaybedilirken mental gelişim esnasında ilk öğrenilen bilgiler en son unutulur.

Kognitif işlevler arasında bellek ilk ve en ağır tutulan alan olmakla birlikte zaman içerisinde giderek diğer kognitif işlevler de bozulur. Dil işlevlerinde erken dönemlerde en sık görülen sorun anomik afazidir. Hastalar özellikle sık kullanılmayan kelimeleri bulmakta güçlük çekerler, bu kelime ya da isimleri tarif ederler , konuşurken duraksamalar yaşarlar. Görsel -uzaysal işlevler erken dönemlerde göreceli olarak korunmuşken giderek yer oryantasyonunda bozulma , bilinen mekan veya sokaklardaki yol kayıpları , ilerleyen dönemlerde hastanın kendi evini tanıyamaması ortaya çıkar. Basit dikkat fonksiyonları da erken dönemde göreceli olarak iyiyken giderek bozulur, hastalar dikkatlerini toplamakta, bir makale okuma , bir film seyretme ya da bir diyalogu sürdürmede , konsantre olmakta güçlük çekerler. Yürütücü işlevler kapsamında ilk bozulan içgörüdür. Hastaların büyük bir kısmı unutkanlıklarının farkında değildirler, hekime gitmek istemezler. Giderek planlayabilme, öngörebilme, sonuç çıkarabilme , bağlantı kurabilme gibi işlevler de bozulur.

Davranışsal belirtiler : Başlangıç döneminde en sık görülen bozukluk kişilik değişiklikleridir. Hastalar daha sessiz daha ilgisiz olup içlerine çekilmeye başlarlar. Başlangıç döneminde depresif belirtiler sıktır. Bu durum bazen depresyon tanısıyla karışabilir. Hezeyanlar sıklıkla çalınma hezeyanları şeklindedir, hastalar bulamadıkları eşyalarının, paralarının çalındığını düşünürler. Halüsinasyonlar hastaların yaklaşık %25 inde ortaya çıkar ve daha ziyade görseldir.

Günlük yaşam aktivitelerinde bozulma belirtileri : İlk bozulmaya başlayanlar daha kompleks olan işlevlerdir. Banka hesaplarının, faturaların takibi , vergi hesaplarının yapılması, para kavramı ve planlaması erkenden bozulabilir. Kadınlarda yemeklerin tadında tuzunda bozulma , yemek yakmalar, uygun giyisi seçimi yapamama görülebilir. Başlangıçta hastalar temel günlük yaşam aktivitelerini hatırlatma ile

kendileri yapabilirken giderek daha fazla yönlendirme ve yardıma ihtiyaç duyarlar, ileri dönemlerde ise tam bakıma muhtaç hale gelirler (10).

2.5.Alzheimer Hastalığının Tedavisi

AH'nın farmakolojik tedavisi konvansiyonel olarak semptomatik tedavi ve hastalık seyrini modifiye edici tedavi olarak ikiye ayrılır. Semptomatik tedavide spesifik ve non-spesifik tedaviler olarak iki grupta toplanır. Spesifik farmokolojik tedavisinde iki grup ilaç kullanılmaktadır.

1. Kolinesteraz inhibitörleri : Bu ilaçlar asetilkolini sinaptik aralıkta yıkarak etkisini sonlandıran kolinesteraz enzimlerini inhibe ederler. Bu inhibisyon sonucu asetlikolinin sinaptik aralıkta kalış süresi, dolayısıyla da post-sinaptik etkisi uzar. Bu grupta bulunan ilaçlar kullanıma çıkış sırası ile donepezil, rivastigmin ve galantamindir.
2. NMDA reseptör antagonistleri: AH'nın patofizyolojisinde yer alan Aβ plakları nöronların eksitotoksisteye olan eğilimini arttırır. Aβ plakları astrositlerin depolarizasyonunu, glutamatın ekstrasellüler birikimi ve Ca²⁺ 'un intrasellüler birikimini indükler . Bu nedenle AH tedavisinde glutamatın indüklediği eksitotoksiste yolu mükemmel bir hedeftir (109). NMDA reseptör antagonistlerinin presinaptik glutamaterjik terminallerden membran instabilitesi sonucu sızan post-sinaptik NMDA reseptörlerinde sürekli bir uyarıyla sinaptik gürültüye sebep olan glutamat hiperaktivitesini inhibe ederek etki ettiği düşünülmektedir. Bu grup içerisinde AH tedavisinde kullanılan memantin voltaj bağımlı, non-kompetitif, selektif, orta derecede afinite gösteren bir NMDA reseptör antagonistidir.

AH'nın patolojik seyrini değiştirdiği bilinen bir ilaç henüz mevcut değildir. Kolinesteraz inhibitörleri ve memantin hastalığın klinik seyrini yavaşlatsa da patolojik değişikliklerin ilerlemesini durdurduklarına dair bir bulgu yoktur (10).

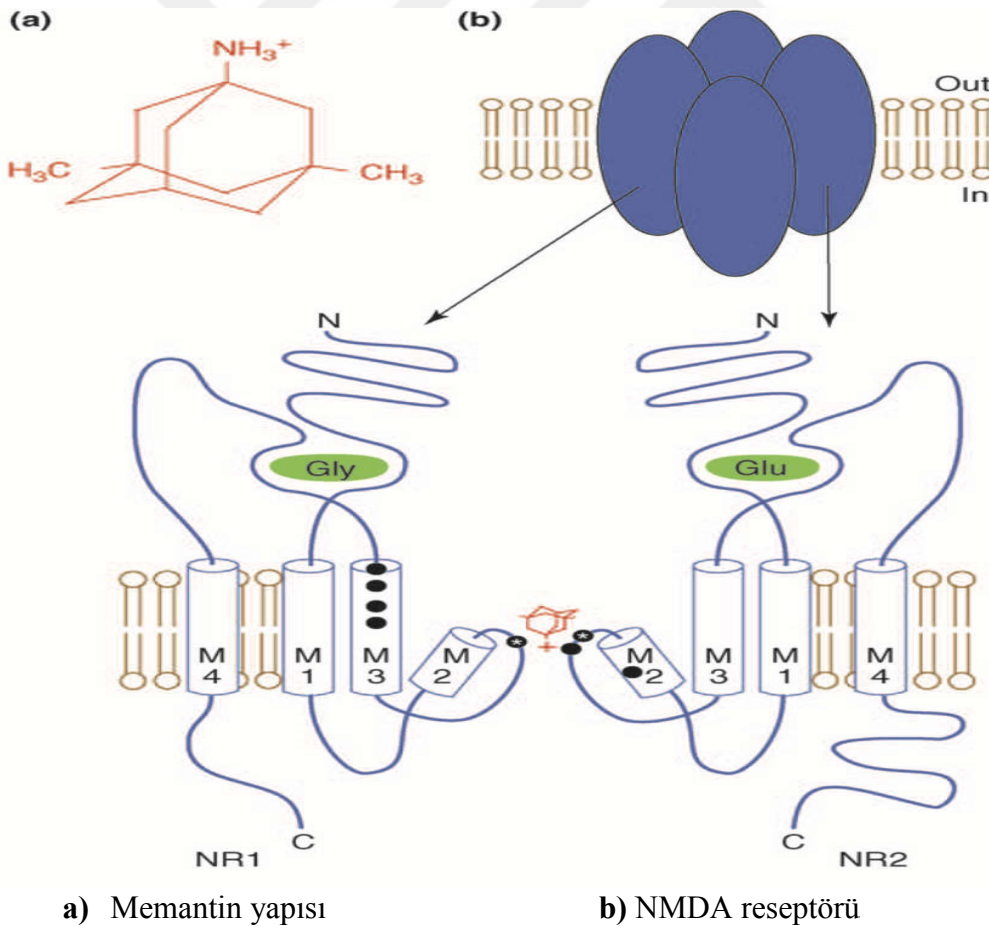
2.5.1. Memantin

Memantin ilk olarak 1960 lı yıllarda keşfedilmiş ve 1970 li yıllarda santral sinir sistemi üzerine etkileri olduğu farkedilmiştir (110). 1989 yılında memantin NMDA reseptörlerini inhibe ettiği bulundu (111).

Memantin yapısal formülü: $C_{12}H_{21}N$

Moleküler ağırlığı: 179,30

Memantin (1-amino-3,5-dimetilamantadine hidroklorid) non -kompetitif, düşük afiniteli bir NMDA antagonisiti olup amantadin analogudur .Yapısındaki $-NH_3^+$ fizyolojik koşullarda pozitif yüklüdür .Memantin NH_3 kısmı ile NMDA reseptör ilişkili iyon kanalına Mg^{+2} nin bağlandığı yer ya da onun çok yakınında bulunan bölgeden bağlanır (112) .



Şekil 7: NMDA reseptörü ve memantin yapısı (113)

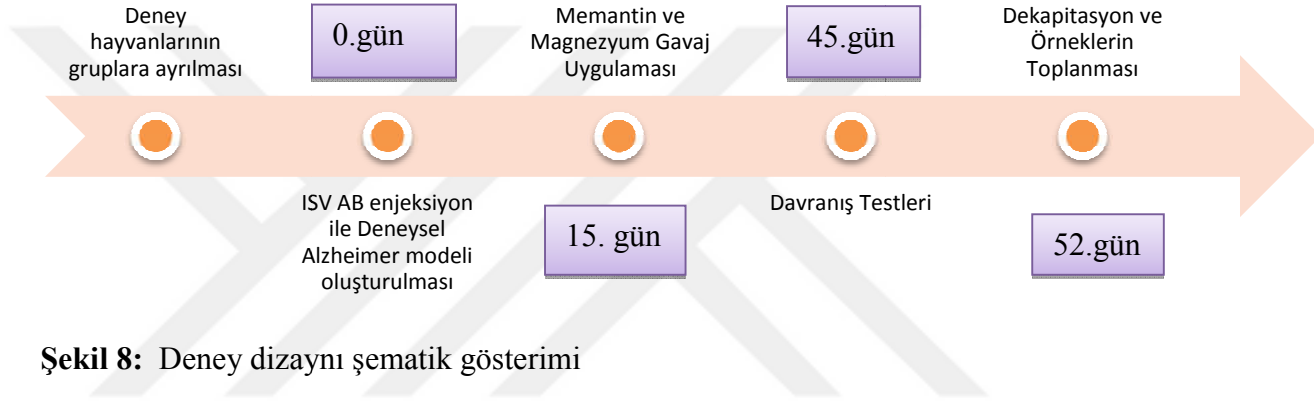
Fizyolojik koşullar altında, nöronlar tarafından salınan glutamat, komşu hücreler tarafından içeriye alınır veya metabolize edilir. Bu yollar bozulduğunda, biriken glutamat, NMDA reseptörünü aşırı uyarır ve nörodejeneratif hastalıkların patolojik karakteristiğini indükler. NMDA reseptörleri, glisin ve glutamat NMDA ile bağlandığında aktive olan bir Ca^{+2} iyonu kanalı görevi görür. Bununla birlikte, kanal Mg^{+2} iyonu tarafından bloke edilmesi nedeniyle yalnızca hücre zarı depolarize olduğunda işlev görür. Bu, durum nöron dinlenme halindeyken içeriye Ca^{+2} girişini engeller. Zarın devamlı depolarize olduğu patolojik koşullar altında, Mg^{+2} kanalı terk eder ve nöronal metabolizma inhibe edilerek hücre ölümüne yol açar (114). Bu gerçekleştiğinde, Ca^{+2} akışı kısıtlanamaz ve normalden daha uzun bir süre boyunca devam eder. Bu Ca^{+2} akışı mitokondride Ca^{+2} yükünün artmasına, ROS oluşumu, apoptozu indükleyen faktörlerin salınımı ve kaspaz aktivasyonu ile nöronal disfonksiyona ve hücre ölümüne neden olur. NMDA antagonistleri kanalın geçirgenliğini azaltarak bu Ca^{+2} akışını engellerler (115). Bu nedenle NMDA reseptör antagonistleri, nöronları olası hasarlardan koruyucu ajanlar ve nörodejeneratif hastalıklar için potansiyel tedaviler olarak görülmektedir (116).

Memantin, NMDA reseptör kanalını bloke ederek çalışır. Memantin ancak kanal açıldıktan sonra girip akışı engelleyebildiği için "açık kanal engelleyici" olarak sınıflandırılır (117). Memantin aktive olmuş NMDA reseptör kanalında yer alan bölgeye bağlanarak etkisini gösterir. Reseptör kanalına hızlı bağlanan bir antagonist olmasına rağmen aynı zamanda konsantrasyondan bağımsız bir şekilde reseptörden hızlıca ayrılır (118). Bu durum memantin minimal yan etkilerle etki gücünü (potens) arttırmasına olanak sağlar.

Diğer antagonistlere kıyasla memantin çok daha hızlı hareket eder bu nedenle fizyolojik mekanizmalar üzerinde daha az etkiye sahiptir. Bunun yanında memantin non-kompetitif olması nedeniyle NMDA reseptörlerinin yoğun aktivasyonu olan bölgelerde antagonistik aktivitesi daha güçlüdür (119). Ayrıca etki mekanizmasının voltaj bağımlı olması membran depolarizasyonu ile memantin blokajının giderilmesini sağlar. Tüm bu özellikler eksitotoksisite ile indüklenen patolojik süreçlerin tedavisi için memantini güçlü bir aday yapmaktadır (120).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 10.03.2021 tarihli ve 10/2021 karar sayısı ile onaylanmıştır. Çalışmadaki bütün uygulamalar etik kurul protokolüne uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Deneyler Nisan 2022 -Haziran 2022 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Fiziyojji Anabilim Dalı Deneysel Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 8: Deney dizaynı şematik gösterimi

3.1.Deney Hayvanları

Çalışmamızda Dokuz Eylül Üniversitesi Fiziyojji Anabilim Dalı Deneysel Araştırmalar Birimi'nden temin edilen 42 adet 22-24 haftalık sağlıklı erkek Sprague Dawley ırkı sıçan, rastgele gruplar halinde kafeslere yerleştirilmiş ve 14 gün boyunca hiçbir uygulama yapılmadan birbirlerine alışmaları sağlanmıştır. Tüm sıçanlar $22\pm1^{\circ}\text{C}$ oda sıcaklığında, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık periyod sağlanarak her kafeste 3-4 sıçan olacak şekilde, standart pellet yemlerine ve suya serbestçe erişebilecekleri konumda bulundurulmuştur. Kafeslerin temizliği haftalık olarak yapıp, altlık olarak talaş kullanılmıştır. Deneklerin ağırlıkları haftalık olarak ölçölüp takip edilmiştir.

Hayvanlar 6 gruba ayrılmıştır :

- 1) Kontrol grubu (K, n=7) : Deneklere herhangi bir ilaç verilmeyecek kontrol grubu
- 2) Sham grubu (Sham , n =7) :Dimetil sülfoksit (DMSO) (2,2 nmol/10µl) İSV olarak uygulanmıştır.
- 3) Alzheimer grubu (ALZ,n=7) : Aβ1-42 peptidi (2,2 nmol/10µl) İSV olarak uygulanmıştır.
- 4) Alzheimer +Memantin grubu (ALZ+Mem, n=7) : Aβ1-42 peptidi (2,2 nmol/10µl) İSV olarak uygulandıktan 15 gün sonra takip eden 13 gün boyunca memantin oral olarak gavaj yardımıyla 10 mg/kg uygulanmıştır (121).
- 5) Alzheimer + Mg L-Treonat (ALZ+Mg, n=7) : Aβ1-42 peptidi (2,2 nmol/10µl) İSV olarak uygulandıktan 15 gün sonra takip eden 30 gün boyunca Mg L-treonat 50 mg/kg oral olarak gavaj yardımıyla uygulanmıştır. (22)
- 6) Alzheimer+Memantin+ Mg L-Treonat (ALZ+Mg+Mem, n=7) : Aβ1-42 peptidi (2,2 nmol/10µl) İSV olarak uygulandıktan 15 gün sonra takip eden 13 gün boyunca memantin oral olarak gavaj yardımıyla 10 mg/kg ve Mg L-treonat 50 mg/kg oral olarak gavaj yardımıyla 30 gün boyunca uygulanmıştır.

3.2.İlaçların Hazırlanması

Sıçanlarda deneysel Alzheimer modeli oluşturmak için Aβ1-42 (Tocris Bioscience) kullanıldı. Aβ1-42 5 µcg/µl konsantrasyonda olacak şekilde DMSO ile oligomerize edilerek İSV enjeksiyon için hazır hale getirildi.

3.3 İlaç Uygulamaları

İSV uygulama basamakları : Alzheimer modeli oluşturulacak sıçanlara (AH, AH+Mem,AH+Mg ve AH +Mem+Mg) Aβ1-42 peptidi (2,2 nmol/10µl) İSV olarak uygulanmak üzere hazırlanmıştır (122) .

Uygulama öncesinde hazırlanan Ketamin (100 mg/kg) ve Xylazine (5mg/kg) tüm sıçanlara intraperitoneal yolla uygulanıp anestezi oluşturulmuştur. Anestezi sonrasında sıçanların kafası stereotaksik cihaza yerleştirilip cihazın kulak



Resim 2 : ISV enjeksiyonu uygulama basamakları

3.3.1.Mg L-treonat ve Memantin Uygulamaları

Memantin ALZ+ Mem ve ALZ+ Mem+Mg gruplarına bulunan 14 sıçana 10 mg/kg dozunda 13 gün boyunca oral olarak gavaj yardımıyla uygulandı.

Mg L-treonat ALZ+Mg ve ALZ+ Mem+Mg gruplarında bulunan 14 sıçana 50 mg/kg dozunda 30 gün boyunca oral olarak gavaj yardımıyla verildi.

Memantin ve Mg uygulamaları tamamlandıktan sonra davranış deneylerine geçildi.

3.4.Davranış ve Bellek Testleri

Çalışma süresi sonunda tüm hayvanlara davranış ve bellek testleri uygulanmıştır.

3.4.1 Morris Water Maze (MWM) Testi

Yaklaşık 38 yıl önce Morris tarafından, laboratuvar ortamında uzaysal öğrenme ve belleği değerlendirmek için su tankı modeli tanımlanmıştır (124). Bu test zaman içerisinde davranışsal nörobilimde en sık kullanılan modellerden biri olmuştur.

Morris su tankı düzeneği içerisinde gizlenmiş 10 cm çapında bir platform bulunan 50 cm'e kadar suyla doldurulmuş; çapı 140 cm, derinliği ve yerden yüksekliği 75 cm olan, ışığı yansıtmayan malzemeden yapılmış yuvarlak bir havuzdan oluşmaktadır.

Öğrenme ve belleği değerlendirmek amacıyla tüm sıçanlara MWM testi yapılmıştır. Test sessiz bir odada aynı ekiple yapılarak deney süresince aynı giysilerin giyilmesine, odada sessiz olunmasına ve denekler için ekstra bir uyarı oluşturulmamaya dikkat edildi. Test tüm hayvanlar için her gün sabah saat 9:00 ile 12:00 arasında gerçekleştirilmiştir.

Havuzun bulunduğu odanın duvarlarına saat , tablo gibi işaretler yerleştirilmiş ve sıçanların bu işaretleri kullanarak yönlerini belirlemesi sağlanmıştır. Sıçanların davranışlarını izlemek ve kaydetmek üzere su tankının merkezinden ortalama 2 m yükseklikte bir video kamera sistemi kurulmuştur. Sıçanlar testin yapıldığı her gün

gizli platformun bulunmadığı 3 kadrardan rastgele seçilmiş birinden yüzleri havuz kenarına dönük olarak suya bırakılmış ve gizli platformu bulana dek yüzmelerine izin verilmiştir. Sıçanların maksimum yüzme süresi 60 saniye olarak sınırlandırılmıştır. Eğer 60 saniye içerisinde hayvan platformu bulamazsa, 15 saniye üstünde kalmasına izin verilmiştir (125). Her sıçan günde 5 ardışık deneye tabi tutulmuştur ve deney aralıkları 60 saniyedir. Her deneyin tamamlanmasından sonra sıçanlar platform üzerinden alınarak kurulanmış ve kafeslerine geri yerleştirilmiştir. Bu işlemler ard arda 4 gün tekrarlanmıştır. Böylece her sıçana 4 günde toplamda 20 deney uygulanmıştır. 5.gün her sıçana bir araştırma deneyi (probe trial) uygulanmıştır. Platform havuzdan kaldırılarak sıçanın 60 saniye yüzmesine izin verilmiştir (125). Probe trial bitiminde HVS image video tracking sistemi kullanılarak yüzme mesafesi, platformu bulma süresi ve her kadranda harcadığı süre ile davranışsal veriler değerlendirilmiştir.

3.4.2 Açık Alan Testi

Deney hayvanlarının lokomotor aktivite ve anksiyete seviyelerini değerlendirmek için yapılır. Açık alan testinde hayvanın orta alandan kaçınması anksiyetenin bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir (126, 127).

Tigmotaksis, duvara yakın bölümlerde zaman geçirme isteği olarak tanımlanmakta ve anksiyete benzeri davranış gösteren hayvanların bu davranışı daha sık gösterdiği kabul edilmektedir (127).

Açık alan testi için 1x1 metrelik bir alan kullanılmıştır. Bu alan 35 lükslük bir ışık kaynağı ile aydınlatılmıştır. Deney hayvanı alanın tam ortasına yerleştirilip 5 dakikalık test süresi boyunca alan içerisindeki hareketleri kamera ile kaydedilerek analiz edilmiştir. Her bir deneğin test sonunda gezdiği tüm alanlar % 70'lik alkol ile temizlenmiştir. Açık alan testinde zemin 16 kareye bölünmüştür (12'si (%75) kenarlarda, 4'ü (%25) merkezde). Hayvanların alan içerisinde toplam gezinme mesafesi, toplam gezinme süresi, orta ve kenardaki alanlara toplam giriş sayısı Noldus Ethovision XT yazılımı (Hollanda) tarafından kaydedilmiş ve analizi yapılmıştır .

3.4.3. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi (YALT)

Yükseltilmiş artı labirent testi ilk olarak 1985 yılında tanımlanmış ve koşullanma olmayan anksiyeteyi ölçmek amacıyla kullanılmıştır (128). Test yükseltilmiş 2 kapalı ve 2 açık kola sahip artı şeklinde bir düzenden oluşur. Normalde sıçanların kapalı kollarda daha fazla zaman geçirme eğilimi vardır. Açık kollardan daha sık olarak kapalı kollara girerler bu da korku ve anksiyete ile açık kollardan kaçınma davranışını yansıtmaktadır (129). Çevreyi tanıma davranışı gösteren ve açık kollarda daha uzun süre zaman geçiren sıçanların ise anksiyete seviyesi düşük olarak değerlendirilmektedir (130) .

YALT için yerden yüksekliği 75 cm olan, merkezde 5×5 cm’lik bir merkez platform ile yanlarda 50 cm uzunluğunda, 10 cm genişliğinde, 0,5 cm yüksekliğinde duvarları bulunan iki açık ve 50 cm uzunluğunda, 10 cm genişliğinde, 40 cm yüksekliğinde duvarları bulunan iki kapalı koldan oluşan bir düzenek kullanılmıştır. Deney hayvanı açık kollardan birine bakacak şekilde merkez platforma bırakılıp beş dakika boyunca açık ve kapalı kollara giriş sayısı ile merkez platformda ve kollarda geçirilen süre kameraya kaydedilerek ölçülmüştür. Her test sonunda düzenek % 70’lik alkol ile temizlenmiştir. Testin kayıtları ve analizinde Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Deneysel Araştırmalar Birimi’nde bulunan Noldus Ethovision XT video tracking sistemi kullanılmıştır.

3.4.4. Motor Performansı Testi (Rotarod Testi)

Rotarod cihazı uzun eksen etrafında kendi çevresinde belli bir hızda dönen yatay bir rot üzerine deney hayvanının yerleştirildiği ve bu bardan düşme süresi dikkate alınarak deneğin motor koordinasyonunun ölçüldüğü bir cihazdır . Hız artırılan protokolde her denemede 4-40 rpm arasında dereceli hızlar denenir. Toplam 300 sn uygulanan testte 16 rpm hız ile başlanmış, 20-26 ve 30 rpm hızda giderek ölçümler yapılmıştır. Testte sıçanın, zemininde zamanlayıcı bulunan düzenek yardımıyla düşmeden mil üzerinde her hızda düşmeden ne kadar durabildiği ölçülmüş ve 3 kere düştüğü hız yürüyebildiği maksimum hız olarak kaydedilmiştir.



Resim 3: Rotarod Düzenegi

3.5. Sakrifikasyon ve Doku Ayrımı

Davranış testlerinin hemen sonrasında CO₂ anestezisi altında kalp sol ventrikülünden deneğin tüm kanı alınarak yaşamı sonlandırılmıştır.

Tüm grupların beyinleri çıkarılarak biyokimyasal inceleme için hipokampus ve prefrontal korteks dokuları ayrılmıştır. Bu beyin dokuları ölçümler yapılabilecek -80°C’de saklanmıştır.

3.6.Doku Homojenatlarının Hazırlanması

Sonuçları olumsuz etkilememesi için dokularda kalan hemolize kan soğuk PBS (phosphate buffered saline) (0,01 M; pH = 7.4) ile temizlenmiştir. Sakrifikasyon sonrası -80°C’de saklanan hipokampus ve prefrontal korteks dokuları öncelikle hassas doku tartısı ile tartılmıştır. Örneklere doku ağırlığı (g): PBS hacmi (ml) oranı 1:10 olacak şekilde soğuk PBS eklenmiştir. Dokular sonrasında buz üzerinde ultrasonik homojenizatör kullanılarak homojenize edilmiştir. Homojenatlar 5000xg’de 10 dakika süresince soğutmalı santrifüjde çevrilerek süpernatantlar elde

edilmiştir. Homojenizasyon işlemi tamamlanan dokular ELISA ölçümleri yapılana dek - 80°C’de saklanmıştır.

3.7.Biyokimyasal İncelemeler

ELISA yöntemi ile hipokampus ve prefrontal korteks BDNF, MDA, T-AOC, TNF- α düzeyleri ölçülmüştür. Doku homojenatlarının kullanıldığı tüm ELISA ölçümlerinde ölçüm sonuçları doku protein başına hesaplanmıştır.

3.7.1.BDNF Ölçümü

Hipokampus ve prefrontal korteks BDNF ölçümleri BT LAB Sıçan BDNF kiti (katalog no : E0476Ra, duyarlılık 0.01 ng/ml , tespit aralığı 0.05-10 ng/ml) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Kit içeriğinin hazırlanması:

- 1- Kullanım öncesi tüm reaktifler oda sıcaklığına getirilmiştir.
- 2- Standart çalışma solüsyonu: Referans standardın üzerine 120µl referans standart ve örnek diluenti eklenip 6.4 ng/ml standart stok solüsyonu elde edildi. Dilüsyon yapılmadan önce standart hafifçe çalkalanarak 15 dk beklenildi. Sonrasında seri dilüsyonlar yapıldı.
- 3- Yıkama solüsyonu: Konsantre yıkama solüsyonundan 20 ml alınarak 500 ml distile su içerisinde seyreltilerek hazırlandı.

Analizin Yapılışı

Tüm reaktifler, standart çözeltiler ve numuneler talimatlara uygun şekilde hazırlandı, kullanım öncesi tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Test için gerekli olan şerit sayısı belirlendi, şeritler kullanılmak üzere kuyucuklara yerleştirildi ve standart kuyucuğuna 50 µl standart eklendi. Numune kuyucuklarına 40µl numune, üzerine 10µl anti-BDNF antikor ve daha sonra numune ve standart kuyucuklarına 50µl streptavidin-HRP eklendi. Plak iyice karıştırıldı, üzeri sızdırmaz madde ile örtüldü ve 37°C de 60 dakika inkubasyona bırakıldı. Sızdırmaz madde çıkarıldı, plak 5 kere

yıkama solüsyonuyla yıkandı. Her yıkama için kuyucuklar 30 saniye ile 1 dakika arasında en az 0.30 ml yıkama solüsyonu ile yıkandı. Her kuyucuğa 50µl substrat solüsyon A ve daha sonra 50µl substrat solüsyon B eklendi. Plak yeni bir kapatıcı ile 10 dakika boyunca 37°C de karanlıkta inkübe edildi. Her kuyucuğa 50µl stop solüsyonu eklendi. Mavi rengin hemen sarıya döndüğü gözlemlendi. Stop solüsyonu eklendikten 10 dakika sonra kuyucukların optik dansitesinin belirlenmesi için 450 nm'ye ayarlanmış Biotek marka ELx800 mikropalak okuyucu (Vermont, ABD) ile değerlendirildi.

3.7.2.MDA Ölçümü

Hipokampus ve prefrontal korteks MDA ölçümleri Bio Vision MDA kiti (katalog no: E 4601-100 , duyarlılık <4.688 ng/ml , tespit aralığı 7.813-500 ng/ml) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Kit içeriğinin hazırlanması:

- 1- Kullanım öncesi tüm reaktifler oda sıcaklığına getirilmiştir.
- 2- Yıkama solüsyonu: Konsantre yıkama solüsyonundan 30 ml alınıp 750 ml distile su içerisine konularak hazırlanmıştır.
- 3-Standart çalışma solüsyonu: Liyofilize MDA standardına 1 ml örnek dilüentinden eklenip 500 ng/ml standart stok solüsyonu elde edildi. Sonrasında seri dilüsyonlar yapılmıştır.
- Dilüsyon metodu: Yedi adet endorf tüp alınarak her birine 300 µl referans standart ve örnek dilüenti eklenmiştir. İlk deney tüpüne hazırlanan 500 ng/ml konsantrasyonundaki çalışma solüsyonundan 300 µl ilave edilmiş, sonrasında son tüp hariç her tüpe sırayla bir öncekinden 300 µl eklenerek 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.6, 7.81 ve 0 ng/ml konsantrasyonlarında olacak şekilde standart solüsyonlar hazırlanmıştır.
- 4- Biotinize tespit antikoru çalışma solüsyonu: kullanım öncesi santrifüjlenen konsantre biyotinize tespit antikoru, biyotinize tespit antikor dilüenti ile 1:100 oranında karıştırılarak hazırlanmıştır.
- 5-Horseradish peroxidase (HRP) konjugat çalışma solüsyonu: konsantre HRP konjugatı 1:100 oranında HRP konjugat dilüenti ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

Analizin yapılışı :

1-Tüm reaktifler, standart çözeltiler ve numuneler talimatlara uygun şekilde hazırlandı, kullanım öncesi tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi.

2-Standart ve numuneler konulmadan önce plak yıkama solüsyonu ile 2 kez yıkandı.

3-Standart kuyucuğuna 50 µl standart numune kuyucuklarına 50µl numune eklendi hemen ardından 50 µl biyotinize tespit antikoru çalışma solüsyonu tüm kuyucuklara eklenmiştir. Sonrasında plağın üzeri kapatılmış, 37°C’de 45 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

4-Inkübasyon sonrası kuyucuklardaki solüsyon dikkatlice dökülmüştür. Yıkama işlemi için tüm kuyucuklara 350 µl yıkama solüsyonu eklenerek bu şekilde 1-2 dk bekletilmiş, sonrasında dikkatlice dökülmüştür. Plak temiz bir kurutma kağıdına vurularak kuyucuklarda kalan solüsyon uzaklaştırılmıştır. Bu yıkama işlemi üç kez tekrarlanmıştır.

5-Her kuyucuğa 100 µl HRP konjugat çalışma solüsyonu eklenmiştir. Sonrasında plağın üzeri kapatılarak 37°C’de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

6- Inkübasyon sonrası kuyucuklardaki solüsyon dikkatlice dökülmüştür. Yıkama işlemi dördüncü basamakta açıklandığı gibi beş kez uygulanmıştır.

7- Her kuyucuğa 90 µl substrat reaktifi eklenmiştir. Plağın üzeri kapatılarak 37°C’de 15 dakika inkübasyona bırakılmış, plağın ışıktan korunmasına özen gösterilmiştir.

8- Inkübasyon sonrası her kuyucuğa 50 µl durdurma solüsyonu eklenmiştir.

9- Optik yoğunluklar 450 nm’de Biotek marka ELx800 mikropalak okuyucu (Vermont, ABD) ile değerlendirilmiş, bu yoğunluklara göre MDA düzeyleri hesaplanmıştır.

3.7.3 T-AOC Ölçümü

Hipokampus ve prefrontal korteks T-AOC ölçümleri Ealbscience T-AOC kiti (katalog no: E-BC-K225 , duyarlılık 0.049 mmol/L , tespit aralığı 0.049-2.5 mmol/L) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Kit içeriğinin hazırlanması:

1- Kullanım öncesi tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi.

- 2- FRAP çalışma solüsyonu Buffer solüsyon, TPTZ solüsyon,substrat solüsyonu sırasıyla 10:1:1 oranında karıştırılarak elde edildi.
- 3- FeSO₄ solüsyonu hazırlanması: Hassas terazide 27.8. mg FeSO₄ 1 ml distile su ile karıştırılarak 100 mmol/L FeSo₄ solüsyonu hazırlandı .
- 4- FeSO₄ solüsyonu 2.5, 2.1, 1.8, 1.5, 1.2, 0.9, 0.6, 0.3, 0.15 mmol/L gradyentinde olacak şekilde dilüe edildi.

Analizin yapılışı :

- 1-Tüm reaktifler, standart çözeltiler ve numuneler talimatlara uygun şekilde hazırlandı, kullanım öncesi tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi.
- 2- Standart kuyucuğuna 5 µl standart, numune kuyucuklarına 5 µl numune eklendi.
- 3-FRAP çalışma solüsyonundan 180 µl standart ve numune kuyucuklarına eklendi.
- 4-Plak 37°C'de 5 dakika inkübe edildikten sonra mikropalak okuyucu 593 nm'ye ayarlanarak ölçüm yapıldı.

3.7.4.TNF- α Ölçümü

Hipokampus ve prefrontal korteks ölçümleri TNF- α BT LAB Sıçan TNF- α kiti (katalog no : E0764Ra, duyarlılık 2.51 ng/L , tespit aralığı 5-1000 ng/L) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Kit içeriğinin hazırlanması:

- 1-Kullanım öncesi tüm reaktifler oda sıcaklığına getirilmiştir.
- 2-Standart çalışma solüsyonu: Referans standardın üzerine 120µl referans standart ve örnek diluenti eklenip 640 ng/L standart stok solüsyonu elde edildi. Dilüsyon yapılmadan önce standart hafifçe çalkalanarak 15 dk beklenildi. Sonrasında seri dilüsyonlar yapıldı.
- 3-Yıkama solüsyonu: Konsantre yıkama solüsyonundan 20 ml alınarak 500 ml distile su içerisinde seyreltilerek hazırlandı.

Analizin Yapılışı

Tüm reaktifler, standart çözeltiler ve numuneler talimatlara uygun şekilde hazırlandı, kullanım öncesi tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Test için gerekli olan şerit

sayısı belirlendi, şeritler kullanılmak üzere kuyucuklara yerleştirildi ve standart kuyucuğuna 50 µl standart eklendi. Numune kuyucuklarına 40µl numune, üzerine 10µl anti-TNF α antikor ve daha sonra numune ve standart kuyucuklarına 50µl streptavidin-HRP eklendi. Plak iyice karıştırıldı, üzeri sızdırmaz madde ile örtüldü ve 37°C de 60 dakika inkubasyona bırakıldı. Sızdırmaz madde çıkarıldı, plak 5 kere yıkama solüsyonuyla yıkandı. Her yıkama için kuyucuklar 30 saniye ile 1 dakika arasında en az 0.30 ml yıkama solüsyonu ile yıkandı. Her kuyucuğa 50µl substrat solüsyon A ve daha sonra 50µl substrat solüsyon B eklendi. Plak yeni bir kapatıcı ile 10 dakika boyunca 37°C de karanlıkta inkübe edildi. Her kuyucuğa 50µl stop solüsyonu eklendi. Mavi rengin hemen sarıya döndüğü gözlemlendi. Stop solüsyonu eklendikten 10 dakika sonra kuyucukların optik dansitesinin belirlenmesi için 450 nm'ye ayarlanmış Biotek marka ELx800 mikropalak okuyucu (Vermont, ABD) ile değerlendirildi.

3.7.5.BCA Protein Analizi

Hipokampus ve prefrontal korteks BCA (bikinkoninik asit) protein analizleri Elabscience BCA protein analiz kiti (Wuhan, Çin; katalog no: E-BC-K318, duyarlık 16.5 µg/ml, tespit aralığı 16.5-1000 µg/ml) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Analizin yapılışı

- 1- Protein standardı 1 ml protein standart dilüenti ile karıştırılmış, bu şekilde 10 mg/ml konsantrasyonunda stok solüsyonu elde edilmiştir.
- 2- Stok solüsyonu 1 mg/ml konsantrasyonda dilüe edilmiştir.
- 3- BCA çalışma solüsyonunun hazırlanması: reaktif A ve reaktif B 50:1 oranında karıştırılmıştır.
- 4- Standart solüsyondan sırayla 0, 4, 8, 12, 16, ve 20 µl alınarak kuyucuklara konulmuş, her kuyucuğa standart dilüent eklenerek hacim 20 µl'ye tamamlanmıştır.
- 5- Örneklerden 20 µl alınarak mikropalakdaki diğer kuyucuklara eklenmiştir.
- 6- Her bir kuyucuğa 200 µl BCA çalışma solüsyonu eklenmiş ve 37°C'de 30 dk inkübasyona bırakılmıştır.
- 7- Optik yoğunluklar 562 nm'de Biotek marka ELx800 mikropalak okuyucu (ABD) ile değerlendirilmiş ve hesaplanmıştır.

3.8.Verilerin Değerlendirilmesi

İstatistiksel analiz SPSS 23.0 programı ile yapılmıştır. Davranış testleri, ELISA ve spektrofotometrik yöntemle elde edilen verilerde gruplar arasındaki farklılıklar tek yönlü varyans analizi ANOVA ve Post-hoc Tukey testi ile değerlendirilmiştir. $p<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı sınır değer olarak değerlendirilmiştir.

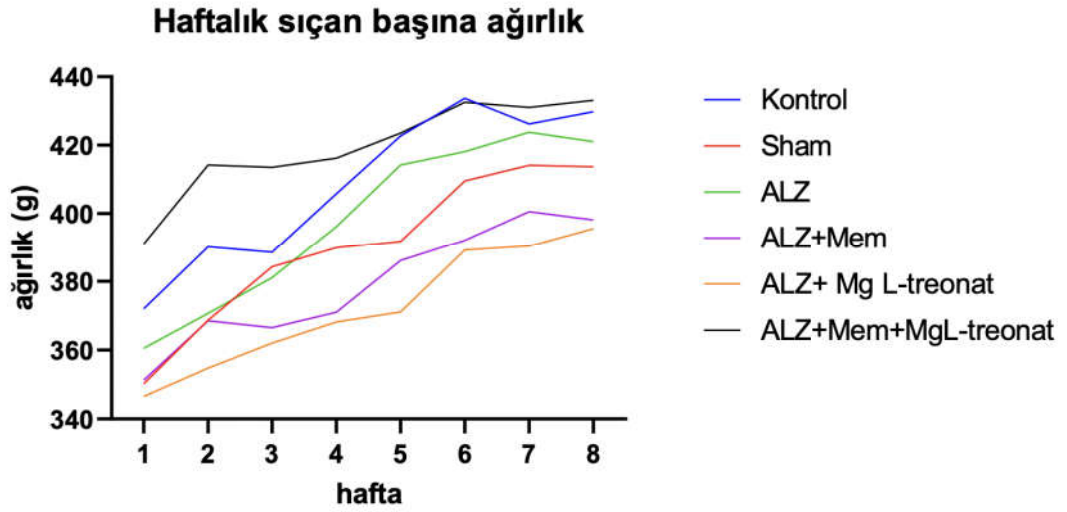


4.BULGULAR

4.1.İzlem Sonuçları

4.1.1.Ağırlık Değişimi

Araştırmada kullanılan sıçan gruplarından; kontrol grubu, sham grubu , ALZ grubu, ALZ+ Mem grubu, ALZ+Mg L-treonat, ALZ+Mem+ Mg L-treonat grubuna ilişkin 8 hafta boyunca, haftalık ölçülen vücut ağırlık ortalamaları Şekil 9 'da yer almaktadır. Her grup için son ölçülen değerler ilk ölçülen değerlere göre artmış bulundu. Bu sonuç deneydeki uygulamalara bağlı olarak hayvan ağırlıklarının olumsuz etkilenmediğini ve ağırlıkların deneyin başlangıcından itibaren geçen zamana bağlı olarak artmış olduğunu düşündürdü.

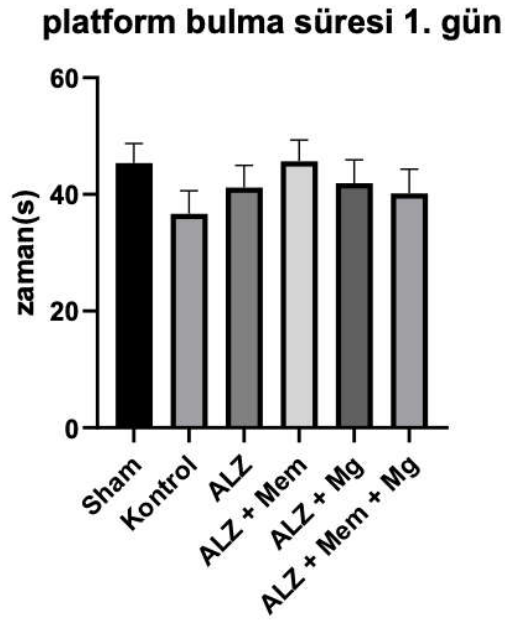


Şekil 9: Haftalık sıçan başına ağırlık

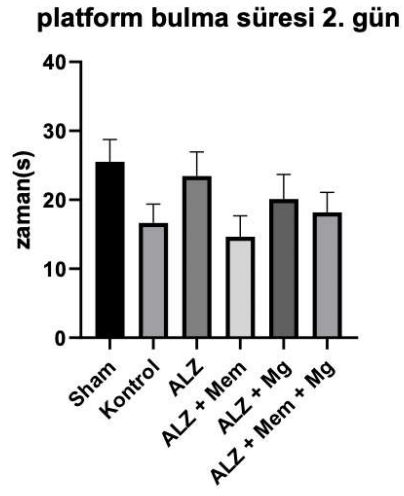
4.2.Davranış ve Bellek Testlerinin Sonuçları

4.2.1.Morris Water Maze Testi Sonuçları

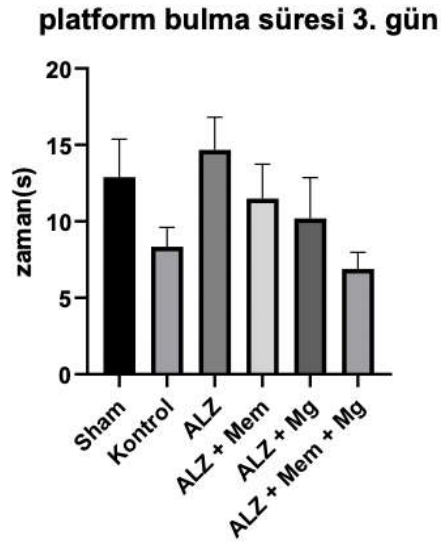
ALZ grubunda MWM testinde eğitim denemelerinin 4. gününde ALZ+ Mem+Mg L-treonat grubuna göre platformu bulma süresinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır ($p<0.05$) (Şekil 13) .



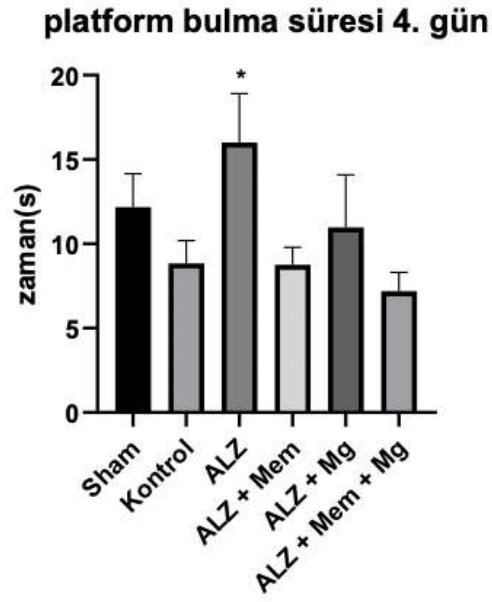
Şekil 10: MWM testi platformu bulma süresi 1. Gün



Şekil 11 : MWM testi platformu bulma süresi 2. gün



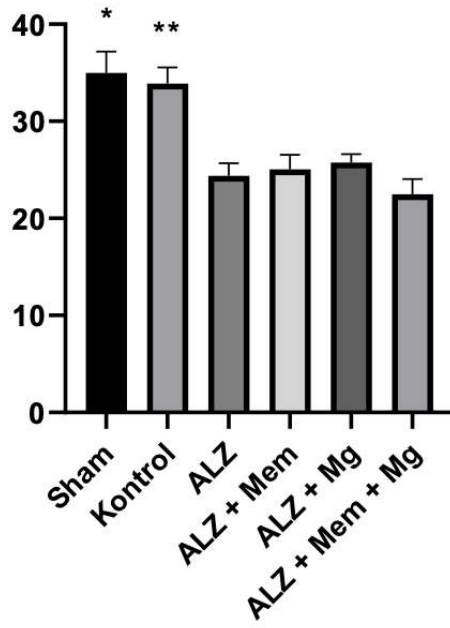
Şekil 12 : MWM testi platformu bulma süresi 3. gün



*ALZ +Mem+Mg L-treonat grubuna göre ($p<0,05$)

Şekil 13 : MWM testi platformu bulma süresi 4. Gün

MWM testi 5. gün platform alanında geçirilen süre ALZ, ALZ+Mem, ALZ + Mg L-treonat ve ALZ+Mem+ Mg L-treonat gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma olduğu saptanmıştır ($p<0,01$). MWM testi 5. gün platform alanında geçirilen süre ALZ, ALZ+Mem, ALZ + Mg L-treonat ve ALZ+Mem+ Mg L-treonat gruplarında sham grubuna göre anlamlı bir düşüş saptanmıştır ($p<0,001$) (Şekil 14).



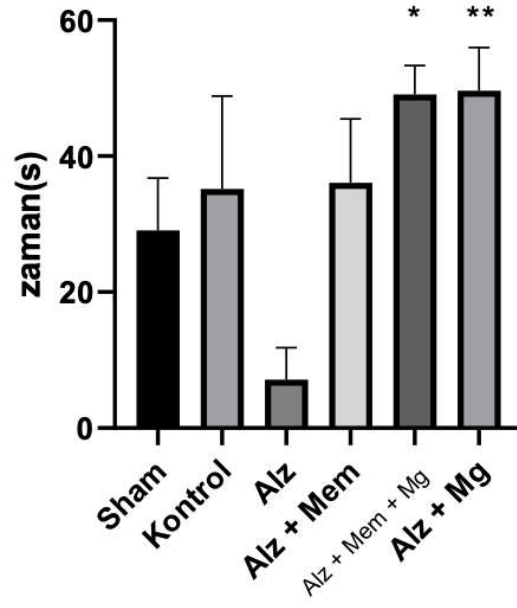
*ALZ,ALZ+Mem,ALZ+Mg L-treonat, ALZ+Mem+Mg L-treonat a göre (p<0,001)

** ALZ,ALZ+Mem,ALZ+Mg L-treonat, ALZ+Mem+Mg L-treonat a göre (p<0,01)

Şekil 14 : MWM testi 5. Gün platform alanında geçirilen süre

4.2.2.Yükseltilmiş Artı Labirent Testi Sonuçları

YALT testinde açık kolda geçirilen sürelerde ALZ +Mg L-treonat grubunda ALZ grubuna göre anlamlı bir artış saptandı (p< 0,05). ALZ+Mem+Mg L-treonat grubunda ALZ grubuna göre anlamlı bir artış saptandı (p< 0,05) (Şekil 15).

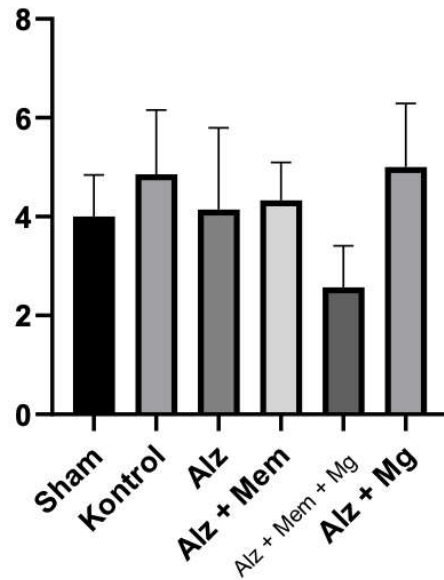


*ALZ grubuna göre ($p < 0,05$)

**ALZ grubuna göre ($p < 0,05$)

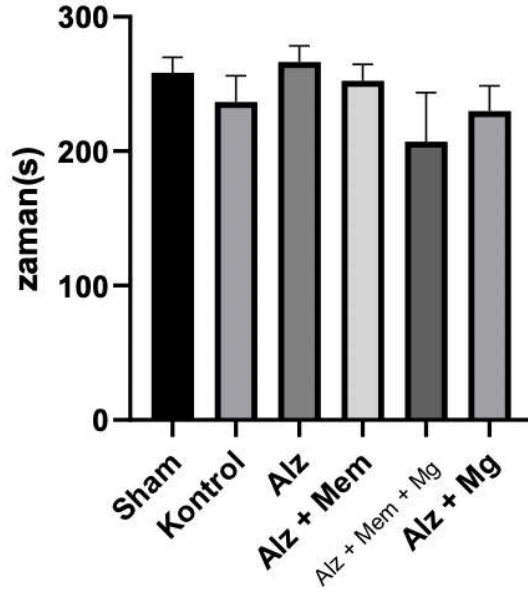
Şekil 15 : YALT açık kollarda geçirilen süre

YALT testinde açık kollara giriş sayısında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Şekil 16).



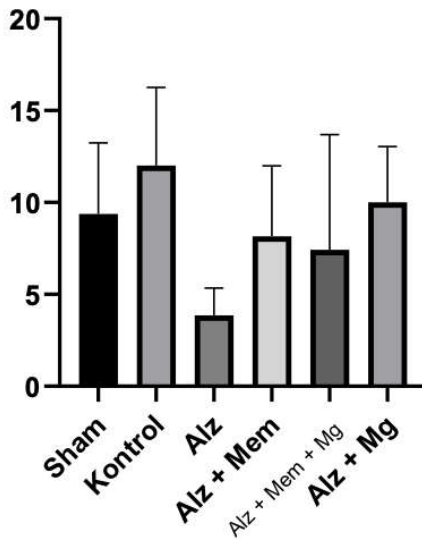
Şekil 16 : YALT açık kollara giriş sayısı

YALT testinde kapalı kolda geçirilen sürede gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Şekil 17).



Şekil 17 : YALT kapalı kolda geçirilen süre

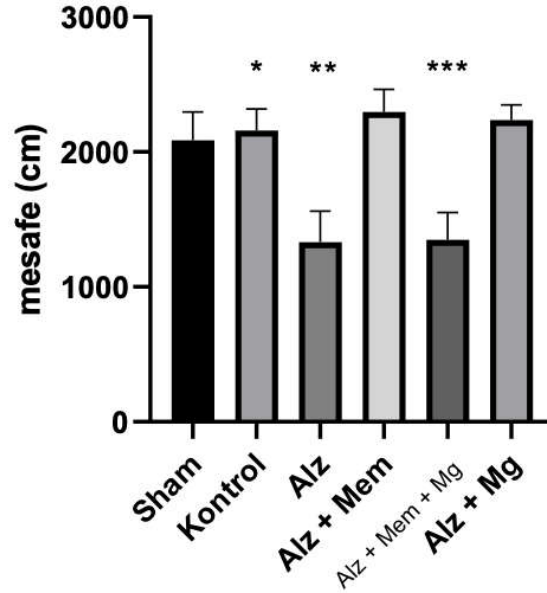
YALT testinde kapalı kollara giriş sayısında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Şekil 18).



Şekil 18 :YALT kapalı kollara giriş sayısı

4.2.3. Açık Alan Testi Sonuçları

Açık alan testinde toplam katedilen mesafe ALZ ve ALZ+Mem+Mg L-treonat grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. ($p<0,05$) . ALZ grubunda açık alan testinde toplam kat edilen mesafe ALZ + Mg L-treonat grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır ($p<0,05$). ALZ grubunda açık alan testinde toplam katedilen mesafe ALZ + Mem grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır ($p<0,05$). ALZ+Mem+Mg L-treonat grubunda ALZ+Mem grubuna göre toplam kat edilen mesafe anlamlı olarak azalmıştır ($p<0,05$). ALZ+Mem+Mg L-treonat grubunda ALZ+Mg L-treonat grubuna göre toplam kat edilen mesafe anlamlı olarak azalmıştır ($p<0,05$) (Şekil 19).



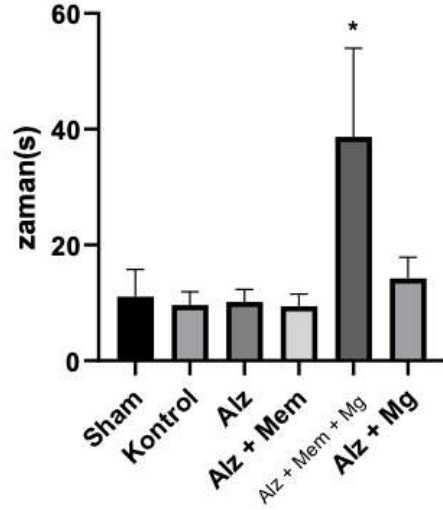
*ALZ ve ALZ+Mem+Mg L-treonat grubuna göre ($p<0,05$)

**ALZ+Mem ve ALZ+Mg L-treonat grubuna göre ($p<0,05$)

***ALZ+Mem ve ALZ+Mg L-treonat grubuna göre ($p<0,05$)

Şekil 19 : Açık alan testinde toplam kat edilen mesafe

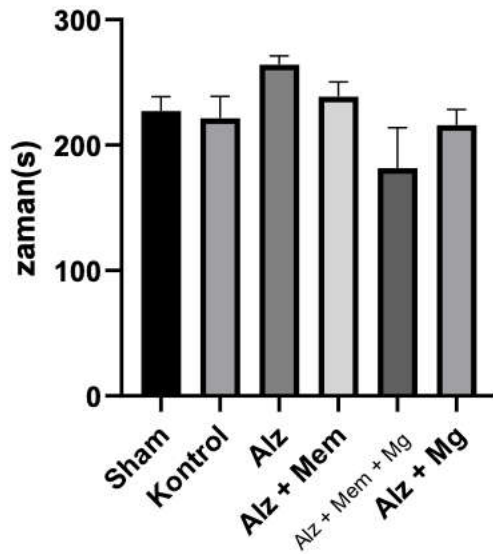
Açık alan testinde orta alanda geçirilen süre ALZ+Mem+Mg L-treonat grubunda kontrol,sham, ALZ ve ALZ+Mem gruplarına kıyasla anlamlı olarak artmıştır ($p<0,05$) (Şekil 20).



* Kontrol,sham, ALZ ve ALZ+mem gruplarına göre ($p<0,05$)

Şekil 20 : Açık alan testinde orta alanda geçirilen süre

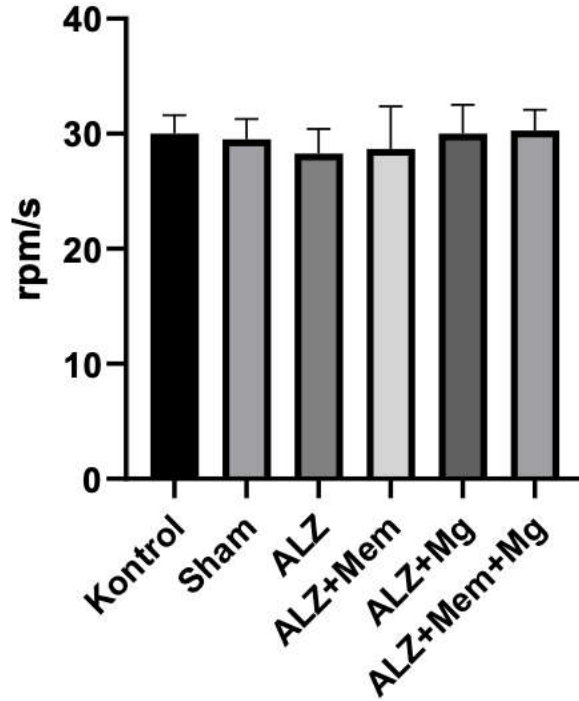
Açık alan testinde tigmotaksis sürelerinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (Şekil 21).



Şekil 21 : Açık alan testinde tigmotaksis süreleri

4.2.4. Motor Performans Testi (Rotarod) Sonuçları

Motor performans testinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (Şekil 22).



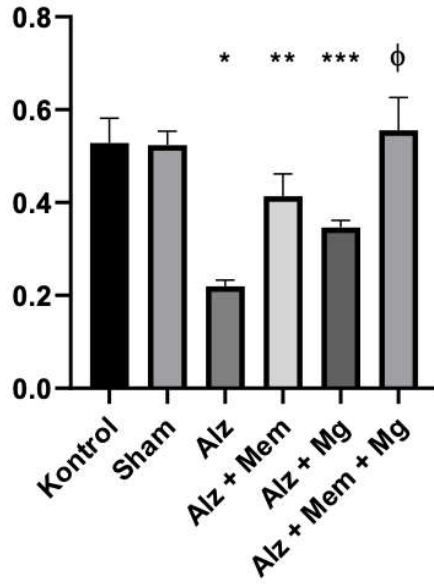
Şekil 22 : Motor performans testi

4.3. Biyokimyasal Analiz Sonuçları

4.3.1. Hipokampus BDNF Düzeyleri

Hipokampus BDNF düzeyleri ALZ grubunda kontrol ve sham grubuna kıyasla anlamlı olarak düşüktür ($p < 0,0001$). ALZ+Mem grubunun hipokampus BDNF seviyeleri ALZ grubuna kıyasla anlamlı olarak yükselmiştir ($p < 0,05$). ALZ +Mem grubunun hipokampus BDNF seviyeleri ALZ+ Mem+Mg L-treonat grubuna göre anlamlı olarak düşüktür ($p < 0,05$). ALZ+Mg L-treonat grubunun ALZ grubuna kıyasla hipokampus BDNF düzeyleri anlamlı olarak artmıştır ($p < 0,05$). ALZ +Mg L-treonat grubunun hipokampus BDNF seviyeleri ALZ+ Mem+Mg L-treonat grubuna göre anlamlı olarak düşüktür ($p < 0,05$). ALZ+ Mem+Mg L-treonat grubunda ALZ grubuna kıyasla hipokampus BDNF düzeyleri anlamlı olarak artmıştır ($p < 0,0001$) (Şekil 23).

Hipokampüs bdnf elisa

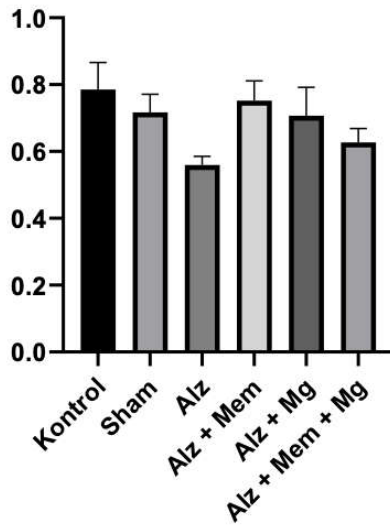


- *Kontrol ve sham grubuna göre ($p < 0,0001$)
- ** ALZ ve ALZ Mem+Mg L-treonat grubuna göre ($p < 0,05$)
- ***ALZ ve ALZ Mem+Mg L-treonat grubuna göre grubuna göre ($p < 0,05$)
- φ ALZ grubuna göre ($p < 0,05$)

Şekil 23 : Hipokampus BDNF düzeyleri

4.3.2. Prefrontal Korteks BDNF Düzeyleri

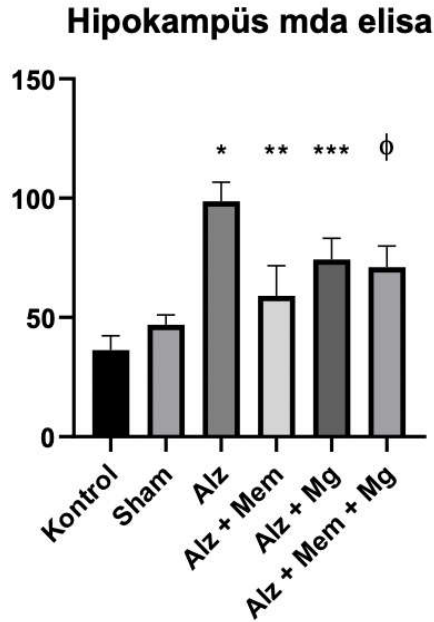
Prefrontal korteks BDNF düzeylerinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (Şekil 24).



Şekil 24 : Prefrontal korteks BDNF düzeyleri

4.3.3.Hipokampus MDA Düzeyleri

Hipokampus MDA düzeyleri ALZ grubunda kontrol ve sham grubuna göre anlamlı olarak yükselmiştir($p<0,001$). ALZ + Mem grubunun hipokampus MDA düzeyleri ALZ grubuna kıyasla anlamlı olarak azalmıştır ($p<0,05$). ALZ+ Mg L-treonat grubunun hipokampus MDA düzeyleri ALZ grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır.($p<0,05$). ALZ+ Mem+Mg L-treonat grubunun hipokampus MDA düzeyleri ALZ grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır($p<0,05$) (Şekil 25) .

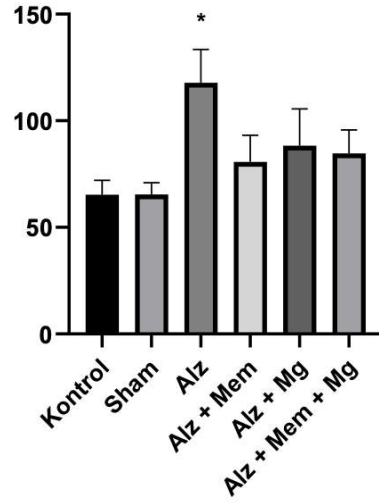


- *Kontrol ve sham grubuna göre ($p<0,001$)
- **ALZ grubuna göre ($p<0,05$)
- *** ALZ grubuna göre ($p<0,05$)
- φ ALZ grubuna göre ($p<0,05$)

Şekil 25 : Hipokampus MDA düzeyleri

4.3.4. Prefrontal Korteks MDA Düzeyleri

ALZ grubunda kontrol ve sham grubuna göre prefrontal korteks MDA düzeyleri anlamlı olarak artmıştır ($p<0,05$) (Şekil 26).

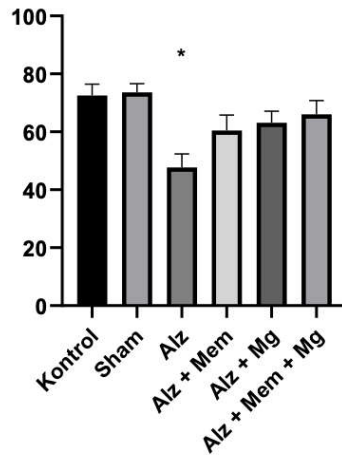


*Kontrol ve sham grubuna göre ($p<0,05$)

Şekil 26 : Prefrontal korteks MDA düzeyleri

4.3.5. Hipokampus T-AOC Düzeyleri

Hipokampus T-AOC düzeyleri ALZ grubunda kontrol ve sham grubuna göre anlamlı olarak düşüktür ($p<0,01$). ALZ +Mem+Mg L-treonat grubunda hipokampus T-AOC düzeyleri ALZ grubuna göre anlamlı olarak yükselmiştir ($p<0,05$) (Şekil 27).



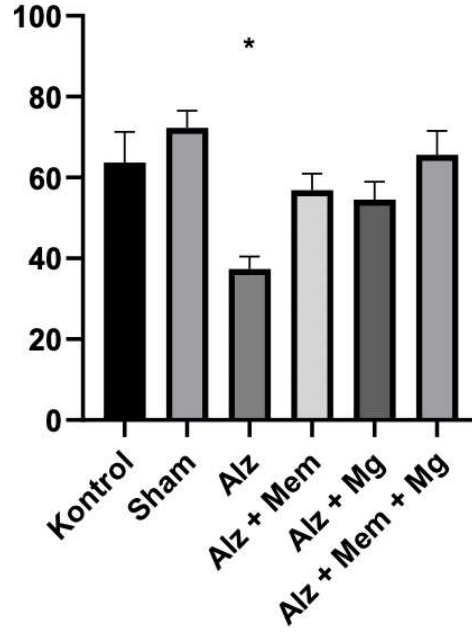
*Kontrol ve sham grubuna göre ($p<0,01$)

*ALZ+Mem+Mg L-treonat grubuna göre ($p<0,05$)

Şekil 27 : Hipokampus T-AOC düzeyleri

4.3.6. Prefrontal Korteks T-AOC Düzeyleri

Prefrontal korteks T-AOC düzeyleri ALZ grubunda kontrol ve sham grubuna göre anlamlı olarak düşüktür ($p<0,01$). ALZ +Mem+Mg L-treonat grubunda hipokampus T-AOC düzeyleri ALZ grubuna göre anlamlı olarak yükselmiştir ($p<0,05$)(Şekil 28).



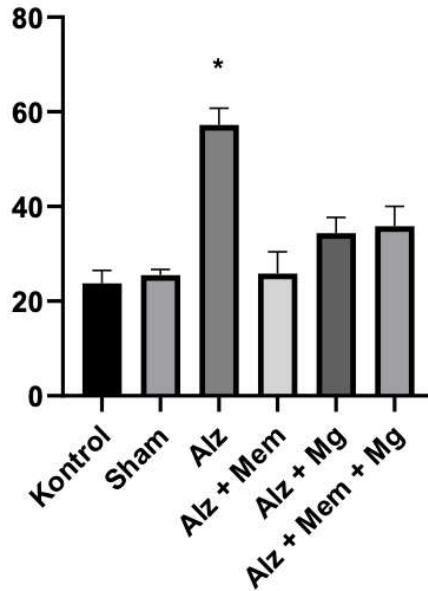
*Kontrol ve sham grubuna göre ($p<0,01$)

*ALZ+Mem+Mg L-treonat grubuna göre ($p<0,05$)

Şekil 28 : Prefrontal korteks T-AOC düzeyleri

4.3.7.Hipokampus TNF- α Düzeyleri

Hipokampus TNF- α düzeyleri ALZ grubunda kontrol ve sham grubuna kıyasla anlamlı olarak yükselmiştir($p<0,0001$). ALZ+ Mem grubunun ALZ grubuna göre hipokampus TNF- α düzeyleri anlamlı olarak azalmıştır($p<0,001$). ALZ+ Mg L-treonat grubunun ALZ grubuna göre hipokampus TNF- α düzeyleri anlamlı olarak azalmıştır($p<0,001$). ALZ+Mem+ Mg L-treonat grubunun ALZ grubuna göre hipokampus TNF- α düzeyleri anlamlı olarak azalmıştır($p<0,001$) (Şekil 29).



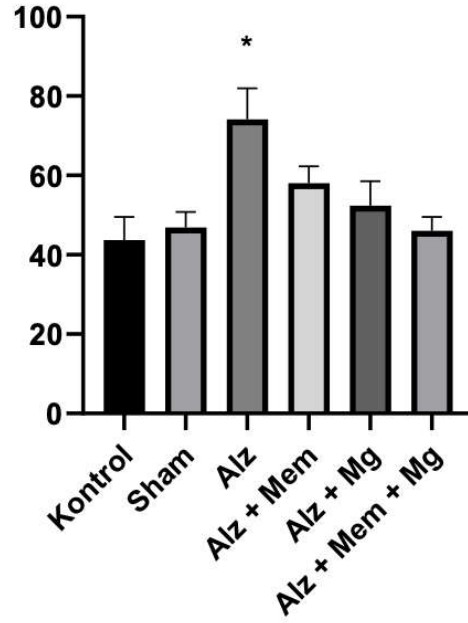
*Kontrol ve sham grubuna göre ($p<0,0001$)

*ALZ+Mem, ALZ+Mg L-treonat,
ALZ+Mem+Mg L-treonat grubuna göre($p<0,001$)

Şekil 29 : Hipokampus TNF- α düzeyleri

4.3.8.Prefrontal Korteks TNF- α Düzeyleri

Prefrontal korteks TNF- α düzeyleri ALZ grubunda kontrol ve sham grubuna kıyasla anlamlı olarak yükselmiştir($p<0,01$). ALZ+ Mem grubunun ALZ grubuna göre prefrontal korteks TNF- α düzeyleri anlamlı olarak azalmıştır($p<0,05$). ALZ+ Mg L-treonat grubunun ALZ grubuna göre prefrontal korteks TNF- α düzeyleri anlamlı olarak azalmıştır($p<0,05$).ALZ+Mem+ Mg L-treonat grubunun ALZ grubuna göre prefrontal korteks TNF- α düzeyleri anlamlı olarak azalmıştır($p<0,05$) (Şekil 30).



*Kontrol ve sham grubuna göre ($p<0,01$)

* ALZ+Mem, ALZ+Mg L-treonat,

ALZ+Mem+Mg L-treonat grubuna göre($p<0,05$)

Şekil 30 : Prefrontal korteks TNF- α düzeyleri

5.TARTIŞMA

Çalışmamızda Mg L- treonat ile AH tedavisinde kullanılan bir NMDA antagonisti olan Memantinin Aβ 1-42 peptidi ISV uygulanarak AH modeli oluşturulan sıçanlarda ayrı ayrı ve beraber uygulandığında kognitif fonksiyonlar üzerine olan etkileri araştırılmıştır. MWM testi bulguları ve BDNF sonuçlarına göre AH modeli oluşturulan sıçanlarda öğrenme ve bellek mekanizmalarının bozulduğu Mg L-treonat ve Memantini beraber alan grupta öğrenme fonksiyonlarının olumlu yönde etkilendiği gözlenmiştir. BDNF düzeylerinin Aβ 1-42 peptidi uygulanması ile belirgin ölçüde azaldığı memantin , Mg L-treonat ve ikisini beraber verilmesi ile BDNF in anlamlı şekilde arttığı saptanmıştır. Memantin ve Mg L-treonatı birlikte uygulanmasının BDNFi kontrol grubunun düzeylerine getirdiği görülmüştür. Oluşturduğumuz AH modelinde Aβ 1-42 peptidi ISV uygulanması ile sıçanlarda oksidatif stresin indüklendiği Memantin ve Mg L-treonatın beraber uygulandığında AH da gelişen bu oksidatif stresi azalttığı saptanmıştır.

5.1.Davranış Bulgularının Değerlendirilmesi

5.1.1.Morris Water Maze (MWM) Bulgularının Değerlendirilmesi

MWM testi sıçanlarda spasyal öğrenme ve belleği değerlendirmek amacıyla yapılan bir davranış testidir. Morris su labirenti sıçanların dairesel bir havuz içerisinde uzaysal ipuçlarından yararlanarak sudan kaçıp, gizlenmiş veya görünür bir platforma ulaşmaya çalıştıkları düzenektir. Minimal eğitim gerektirmesi, vücut ağırlığından bağımsız olması, farklı türlerde uygulanabiliyor olması ve tekrarlanabilir olması gibi avantajları bu testin kognitif fonksiyonların değerlendirilmesi açısından en iyi ve en çok tercih edilen yöntem olmasını sağlar. AH kognitif işlevlerde bozulmalarla karakterize olan bir hastalıktır ve Morris water maze testi Alzheimer modeli oluşturulan deney hayvanlarında öğrenme ve belleği değerlendirmek için kullanılabilecek en önemli yöntemlerden biridir (131).

MWM testinde platform alanında geçirilen süre hayvanın platformun hangi kadranda bulunduğunu öğrenip öğrenmediğini gösterir ve bellek performansını değerlendirmede önemlidir. Platformu bulma süresi ise öğrenme performansını

değerlendirmek için kullanılır. Li ve ark. 2010 yılında yaptıkları bir çalışmada A β 1-42 peptidi ISV uygulanarak AH modeli oluşturulan sıçanlarda sham grubuna göre probe trial testinde platform alanında geçirilen sürede anlamlı bir azalış olduğu gözlemlenmiştir. Yine aynı çalışmada MWM eğitim denemelerinin son gününde AH modeli oluşturulan sıçanlarda sham grubuna göre platformu bulma süresinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu saptanmıştır (122).

Zhang ve ark. 2015 yılında A β 1-42 peptidi ISV uygulanarak AH oluşturulan sıçanlar üzerinde yapmış oldukları başka bir çalışmada ise MWM testinde probe trial uygulamasında A β 1-42 uygulanan sıçan grubunun sham grubuna kıyasla hedef kadranda bulunma sürelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış olduğu gösterilmiştir. Eğitim denemelerinin 3 ve 4. gününde A β 1-42 uygulanan grubun platformu bulma sürelerinde sham grubuna göre anlamlı bir artışın olduğu saptanmıştır. Yine aynı çalışmada MWM testinin 5. gününde hayvanların platformu bulmak için izledikleri yolu gösteren temsili navigasyon görüntülerinde A β 1-42 uygulanan grubun sham grubuna göre spasyal öğrenme ve bellek mekanizmalarında önemli ölçüde bozulmaların olduğu saptanmıştır (132).

Ma ve ark. 2015 yılında yapmış olduğu çalışmada A β 1-42 peptidi ISV uygulanmış olan sıçanlarda sham grubuna kıyasla eğitim denemelerinin 1-4. günleri arasında ortalama platformu bulma sürelerinde anlamlı bir artışın olduğu saptanmıştır (133).

Prakash ve ark. 2013 yılında A β 1-42 peptidi ISV enjeksiyonu ile AH oluşturulan sıçanlar üzerinde yapmış oldukları diğer bir çalışmada ise A β 1-42 uygulanan grupta sham grubuna kıyasla platforma ulaşma süresinde anlamlı bir uzama olduğu saptanmıştır ve bu bulgunun A β 1-42 peptidinin spasyal öğrenme ve bellek mekanizmalarının bozulmasına neden olduğunu destekler nitelikte olduğu düşünülmüştür (134).

Çalışmamızda literatürde A β 1-42 peptidi ISV uygulanarak AH modeli oluşturulan sıçanlar üzerinde yapılan MWM testi sonuçları ile tutarlı şekilde testin 5. günü probe trial testinde platform alanında geçirilen sürenin ALZ grubunda kontrol ve sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gösterdiği saptanmıştır. Eğitim

denemelerinin 4. gününde ALZ grubunun ,ALZ Me+Mg L-treonat grubuna göre platformu bulma süresinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır. Bunun yanında eğitim denemelerinde ALZ grubunun istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte kontrol grubuna kıyasla platformu bulma süresinde bir artış olduğu da gözlemlenmiştir.

Treonat ve magnezyum kombinasyonundan oluşan Mg L-treonat KBB'ni geçebilen bir Mg bileşiğidir (18). Mg bileşikler içinde diyetle alımında diğerlerine kıyasla beyindeki Mg seviyelerini belirgin düzeyde yükseltebildiği ve kognitif fonksiyonları güçlendirdiği bilinmektedir(19, 20).

Slutsky ve arkadaşlarının 2009 yılında hem genç (2 aylık) hem de yaşlı (18 aylık) sıçanlara 30 gün boyunca 50 mg /kg/gün dozunda Mg L-treonat vererek yapmış olduğu bir çalışmada MWM testinde her iki Mg L-treonat grubunun kendi kontrol grubuna kıyasla platformu bulma sürelerinin daha kısa olduğu saptanmıştır.

Lou ve ark. 2016 yılında 30 günlük sıçanlar üzerinde 30 gün boyunca 50 mg/kg/gün oral yoldan Mg L-treonat uygulayarak yaptıkları başka bir çalışmada sadece Mg L-treonat alan grubun kontrol gruba kıyasla hedef kadranda bulunma süresinde anlamlı bir artış olduğu ve platforma ulaşma süresinde ise anlamlı bir azalma olduğu gösterilmiştir (21, 135).

Mg L-treonatın kognitif fonksiyonlar üzerinde olumlu etkileri olduğunu destekleyen Slutsky ve ark . ve Lou ve ark. çalışmalarında bizim çalışmamızdan farklı olarak sıçanlara daha öncesinde A β 1-42 peptit uygulaması yapılmamıştır. A β 1-42 peptidin AH da kognitif fonksiyonları bozduğu bilinmektedir. Çalışmamızda A β 1-42 uygulanarak Alzheimer modeli oluşturulan grubun MWM testinde platformu daha uzun sürede bulması ve platform alanında daha az süre geçirmesi hipokampal spasyal öğrenme ve bellek mekanizmalarının bozulduğunu, Alzheimer modelinin başarılı olduğunu destekler. Ayrıca çalışmamızda MWM'de test aşamasında platforma ulaşma süresi en uzun olan ALZ grubu iken, en kısa olan ALZ+Me+Mg L-treonat grubu olduğu saptanmıştır. Bunun AH modeli oluşturulan sıçanlarda, Mg L-treonatın memantinle birlikte öğrenmeyi olumlu yönde etkilediğini destekler nitelikte bir bulgu olduğu düşünülmektedir. Bunun yanında MWM testi 5. Günü probe trial

testinde memantin , Mg L-treonat ve her ikisini birlikte alan gruplarda platform alanında geçirilen süre ALZ grubuna göre anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Bu bulgu bize Memantin , Mg L-treonat ve her ikisinin birlikte uygulanmasının bellek üzerine anlamlı bir olumlu etkisi olmadığını düşündürmüştür. Literatürde Mg L-treonatın AH modeli oluşturulmuş olan sıçanlarda kognitif fonksiyonlar üzerine etkisini kıyaslama yapabileceğimiz başka bir çalışmaya rastlanmamıştır.

5.1.2.Yükseltilmiş Artı Labirent Testi Bulgularının Değerlendirilmesi

Koşullanma olmayan anksiyeteyi ölçmek amacıyla kullanılan YALT testinde normalde sıçanların kapalı kollarda daha fazla zaman geçirme eğilimi vardır(129). Çevreyi tanıma davranışı gösteren ve açık kollarda daha uzun süre zaman geçiren sıçanların anksiyete seviyesi düşük olarak değerlendirilmektedir (130). Açık kollardan çekinme davranışının anksiyete benzeri davranışı gösterdiği kabul edilmektedir (136). Sıçanların düzeneğe ilk bırakıldıkları bölge olan orta alanda fazla zaman geçirmesi, sıçanın kapalı kollar ile açık kollara gitmek arasında karar veremediğini, bunun da yüksek anksiyete benzeri davranış nedeniyle gerçekleştiğini işaret etmektedir (137 , 138) .

Cionca ve ark. Aβ 1-42 peptiti ISV uygulayarak AH oluşturulan sıçanlar üzerinde yapmış oldukları çalışmada Aβ 1-42 verilen grupta kontrol ve sham grubuna kıyasla açık kollarda geçirilen süre ve açık kollara girme sayısında anlamlı bir düşüş olduğu gözlenmiştir (139) . Zhou ve ark.nın 2020 de sıçanlar üzerinde yapmış olduğu bir çalışmada Mg L-treonat alan grupta kontrole kıyasla YALT testinde açık kollara giriş sayısında artış olduğu gözlemlenmiştir (140). Çalışmamızda yükseltilmiş artı labirent testinde açık kolda geçirilen süreler ALZ+Mg L-treonat grubunda ALZ grubuna göre ve ALZ+Mem +Mg L-treonat grubunda ALZ grubuna göre anlamlı bir artış göstermiştir. .Bu Mg L-treonatın anksiyeteyi azalttığını gösteren literatürdeki diğer çalışmaları destekler nitelikte bir bulgudur. Bununla birlikte Mg L-treonatın Memantin ile beraber uygulanmasının da anksiyeteyi azalttığı bu çalışmada gözlenmiştir. YALT testinde açık ve kapalı kollara giriş sayısı ve kapalı kollarda geçirilen sürelerde gruplar arası anlamlı bir fark görülmemiştir.

5.1.3.Açık Alan Testi Bulgularının Değerlendirilmesi

Deney hayvanlarının lokomotor aktivite ve anksiyete seviyelerini değerlendirmek amacıyla yapılan açık alan testinde hayvanın orta alandan kaçınması anksiyetenin bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir (126). Sıçanların genel olarak küçük alanlarda yaşaması ve sosyal hayvanlar olmaları nedeniyle onları sosyal grubundan ayırarak daha geniş bir alana yerleştirmek anksiyete davranışını tetikler. Bu durumlarda sıçanlar tigmotaksis olarak adlandırılan duvarlara yakın mesafede durma ve açık alanlardan kaçınma eğilimi gösterirler (127). Çalışmamızda açık alan testinde toplam katedilen mesafe, tigmotaksis süresi ve orta alan geçirilen süre olmak üzere 3 parametre incelenmiştir. Toplam katedilen mesafe değerlerine göre çalışmamızda kontrol grubuna kıyasla ALZ grubunun hareketliliğinin azaldığı saptanmıştır. Gruplar arası anlamlılık açısından toplam katedilen mesafe ALZ grubu ve ALZ+Mem+Mg L-treonat grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. ALZ+Mem grubunda ALZ grubuna kıyasla ve ALZ+Mg L-treonat grubunun ALZ grubuna kıyasla toplam katedilen mesafe değerleri anlamlı olarak yüksek saptanmıştır. ALZ+Mem ve ALZ+Mg gruplarında ALZ+Mem+Mg L-treonat grubuna kıyasla toplam katedilen mesafenin anlamlı olarak yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Rotarod motor performans testinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmamasından ötürü toplam kat edilen mesafedeki bu farklılıkların lokomotor aktivite kaynaklı olmadığı düşünülmüştür.

Orta alanda geçirilen süre ALZ+Mem+Mg L-treonat grubunda diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir. Sartori ve ark. 2011 yılında 8 haftalık C57Bl/6N ve BALB/c farelerde 3 hafta boyunca magnezyumdan fakir diyet vererek yapmış oldukları bir çalışmada magnezyumdan fakir diyetle beslenen grupta kontrol grubuna kıyasla açık alan testinde orta alanda geçirme süresinde anlamlı bir azalma olduğu saptanmıştır. Bu bulgunun magnezyumun anksiyolitik etkisini destekler nitelikte olduğu sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızda tigmotaksis sürelerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

5.1.4.Rotarod Motor Performans Testi Bulgularının Değerlendirilmesi

Rotarod testi, koordinasyon, denge ve motor kontrolün ölçülerek motor performansın değerlendirilmesini sağlar. Düzenek deney hayvanının belirli bir hızda ya da hızı giderek artırılarak dönen bir mil üzerinde durabilme yeteneğini ölçer. Hayvan aşağı düşmemek için rotun döndüğü yönün tersi yönünde yürümeye çalışır. Sağlıklı bir hayvan normal şartlarda uzun süre rot üzerinde düşmeden kalabilmektedir. Hayvanlarda motor koordinasyonla ilgili sistemlerin bozulması durumunda hayvan yürümeyi bırakır ve düşer. Aşağı düşen hayvanlar aynı şekilde tekrar alınıp dönen mil üzerine konulur. Üç kez yürüme hakkı verilen hayvanın yere düştüğü anda süre durdurulur ve artan hızda 3. düşmede tespit edilen hız yürüyebildiği maksimum hız olarak kaydedilir.

Çalışmamızda rotarod testinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadığı görülerek hayvanlarda uygulanan stereotaksik cerrahi işleminden kaynaklı herhangi bir nörolojik defekt gelişmediğinden emin olundu.

5.2.Biyokimyasal Bulguların Değerlendirilmesi

5.2.1.BDNF Bulgularının Değerlendirilmesi

Sinaptik plastisitenin bilinen en iyi düzenleyicisi olan BDNF, periferik ve santral sinir sistemindeki nöronların hayatta kalması, farklılaşması ,gelişimi ve işlevlerini etkileyerek sinaps işlevini, akson ve dendrit dallanmalarını düzenleyen bir nörotrofindir (23, 101).

LTP sinaptik gücün uzun süreli ,aktivite bağımlı olarak artmasıdır. Bir uyarının LTP oluşturabilmesi için hem eksitator özellikte olması hem de yüksek frekanslı olması gerekir. Hipokampusün CA3 piramidal nöronlarından CA1 nöronlarına uzanan Schaffer kollaterallerinde NMDA reseptörlerinin LTP oluşturması öğrenme ve bellekle ilgili temel mekanizmalardan biridir.

NMDA reseptörleri AMPA'ya göre çok daha fazla Ca^{+2} a geçirgendir. NMDA reseptörleri açılınca hücre içinde hızla Ca^{+2} miktarı artar. Bu artış CaMKII, protein kinaz C ve tirozin kinaz olmak üzere birkaç sinyal yolağını aktive eder. Bu sinyal yolları hem postsinaptik hücrede yanıtı arttırmakta hem de presinaptik hücrelerden daha fazla glutamat serbestlenmesine neden olmaktadır (65).

Ca^{+2} un hücre içi konsantrasyonlarının sürekli arttığı geç LTP durumlarında Ca^{+2} adenilat siklazı aktive eder. Adenilat siklaz da cAMP miktarını arttırarak cAMP bağımlı protein kinazı aktive eder. Aktive olan cAMP kinaz hücre çekirdeğine girerek CREB proteinini fosforiller. CREB de hedef genleri aktive ederek yapısal değişikliğe neden olan protein sentezini başlatır. Bunun sonucunda yeni sinaps oluşumunda rol alan ve sinaptik plastisiteyi destekleyen BDNF sentezlenir (69).

Korte ve ark. BDNF knockout farelerde yapmış oldukları çalışmada, BDNF knockout farelerde kontrole kıyasla öğrenme ve bellek fonksiyonunun bozulduğu LTP oluşumunda azalmanın olduğu gözlemlenmiştir (102). Patterson ve ark. BDNF knockout farelerde yapmış oldukları başka bir çalışmada ise knockout farelerde hipokampus Schaffer kollaterallerinde bazal sinaptik iletim ve LTP'de bozulmaların olduğu , dışarıdan rekombinant BDNF protein verilmesi ile birlikte ise LTP ve bazal sinaptik iletimin düzeldiği görülmüştür. BDNF ekspresyonundaki bu azalmanın hipokampal LTP oluşumunda önemli derecede bozulmanın bir göstergesi olduğu kabul edilmiştir (103).

AH' da patolojik olarak artan A β peptidi glutamatın glial hücrelere alımını bloke ederek sinaptik aralıkta glutamat konsantrasyonlarının artışına neden olur (75,76). Glutamat seviyelerinin yükselmesi NR2B reseptörlerinde aşırı aktivasyonuna yol açar .Bu durum Ca^{+2} seviyelerinin artmasına, tau hiperfosforilasyonuna neden olan yollarına aktivitesinin artmasına, nöronu koruyan yolların inhibisyonuna neden olarak sinaptik kayıplara ve LTP'nin oluşumunu inhibe ederek sinaptik plastisitede bozulmalara neden olur (8, 9).

Zhang ve ark., Prakash ve ark. ve Song ve ark. A β 1-42 peptidi ISV enjeksiyonu ile AH oluşturulan sıçanlar üzerinde yapmış oldukları çalışmalarda, A β 1-42 uygulanan grupta sham ve kontrol gruplarına kıyasla BDNF seviyelerinde anlamlı bir azalma olduğu gözlemlenmiştir (132, 134, 141).

Memantin AH tedavisinde kullanılan voltaj bağımlı, non-kompetitif,selektif, orta derecede afinite gösteren bir NMDA reseptör antagonistidir. NMDA reseptörlerini göreceli olarak zayıf bloke ederek glutamati azaltır ve Ca⁺² un hücre içine patolojik olarak girişini önler.Böylece AH'da görülen glutamat eksitotoksitesinin ve onun indüklediği LTP inhibisyonu ve diğer patolojik süreçlerin tedavisi amacıyla kullanılmaktadır (120). Amidfar ve ark. 14 gün boyunca 20 mg/kg intraperitoneal memantin uygulayarak sıçanlar üzerinde yapmış olduğu bir çalışmada sadece memantin uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla hipokampus ve prefrontal kortekste ölçülen BDNF mRNA seviyelerinde anlamlı bir artış olduğu gözlemlenmiştir(142).

Magnezyum, NMDA reseptöründeki Ca⁺² kanalı için bir blokaj görevi görür (85). Magnezyum seviyelerinin düşük olması teorik olarak glutamaterjik nörotransmisyonu güçlendirebilir, bu da oksidatif strese ve nöronal hücre ölümüne yol açabilen eksitotoksiste için destekleyici bir ortama yol açar (17).

Slutsky ve arkadaşlarının diğer Mg bileşiklerine kıyasla KBB'ni geçerek beyindeki Mg seviyelerini daha çok yükselttiği bilinen Mg L-treonatın sinaptik plastisite ve BDNF üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada hem genç (2 aylık) hem de yaşlı (18 aylık) sıçanlara 30 gün boyunca 50 mg /kg/gün dozunda Mg L-treonat oral yoldan verilmiştir. Mg L-treonat verilen gruplarda kontrol gruplarına kıyasla hipokampus BDNF seviyelerinde anlamlı bir artış olduğu gözlemlenmiştir. Mg L- treonat verilen sıçanlarda hipokampüste magnezyum seviyelerinin artışının CaMKII ve CREB in ekspresyonunda bir değişiklik yapmadığı bunun yanında her ikisinin de aktivasyonunu arttırdığı gösterilen çalışmada Mg L-treonatın CaMKII ve CREB in fosforilasyonunu arttırarak BDNF salınımında bu artışa neden olduğu düşünülmüştür (22). Sıçanlar üzerinde yapılan başka bir çalışmada Magnezyum L-

treonatin beyinde NMDA reseptör sinyalizasyonunu ve BDNF salınımını arttırdığı gösterilmiştir (21, 22).

Çalışmamızda literatürdeki diğer çalışmalarla uyumlu olarak ALZ grubunda kontrol ve sham grubuna göre hipokampustan ölçülen BDNF seviyelerinde belirgin bir azalmanın olduğu saptandı. ALZ+Mem grubunun hipokampus BDNF seviyelerinde ALZ grubuna kıyasla anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir bu sonucun Memantin NMDA reseptörlerini antagonize ederek AH'da gelişen glutamat eksitotoksitesini azalttığını destekler nitelikte olduğu düşünülmüştür. ALZ + Mg L-treonat grubunun ALZ grubuna kıyasla hipokampus BDNF seviyelerinde anlamlı bir yükseliş gösterdiği saptanmıştır. AH modeli oluşturulup sadece Memantin alan grubun AH modeli oluşturulup Memantin ve Mg L-treonat beraber uygulanan gruba göre ve AH modeli oluşturulup sadece Mg L-treonat alan grubun AH modeli oluşturulup Memantin ve Mg L-treonat beraber uygulanan gruba göre hipokampus BDNF seviyelerinin anlamlı olarak daha düşük olduğu saptandı. ALZ+ Mem+ Mg L-treonat grubunun hipokampus BDNF seviyesinde ALZ grubuna kıyasla anlamlı bir artışın olduğu ve bu artışla BDNF'in kontrol grubu seviyelerini yakaladığı görülmüştür. Bu AH'da Memantin ve Mg L-treonatin ayrı ayrı uygulanmasının kognitif fonksiyonlar üzerine olumlu etkileri olabileceğini ve her ikisinin beraber verilmesinin bu kognitif fonksiyonlar üzerindeki etkiyi Memantin ve Mg L-treonatin tek başına uygulanmasına göre çok daha belirgin ölçüde arttıracaklarını destekler niteliktedir.

5.2.2.MDA ve T-AOC Bulgularının Değerlendirilmesi

Oksidatif stres beyinle ilişkili çeşitli hastalıkların patogeneğinde ortak olarak altta yatan temel mekanizmayı oluşturmaktadır (143). Alzheimer hastalığında oksidatif stres A β peptidin ekstrasellüler birikimi ile bağlantılı olarak gelişir. Organizmadaki reaktif oksijen radikalleri hem endojen hem de eksojen kaynaklar tarafından meydana getirilebilir. Normal şartlar altında bu radikaller antioksidan mekanizmalar ile temizlenir. AH da A β peptidleri mitokondrideki elektron transport zincirinde bozulmalara sebebiyet vererek reaktif oksijen radikallerinin artmasına yol açar ve mitokondriyal disfonksiyona sebep olur bunun yanında mikrogliaları aktive ederek nöroinflamatuvar yanıtı tetikler (6, 56).

Ek olarak Alzheimer hastalığında oksidatif stres, kendi kendini devam ettiren kronik nöroinflamasyon döngüsünü aktifleyerek oksidatif stresin ilerlemesine ve geri dönüşü olmayan nöronal hasar ve hücre ölümüne neden olabilmektedir (59).

Reaktif oksijen türleri son yörüngelerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektronu olan moleküllerdir. Bu moleküllerin elektron yapılanmaları onları yüksek derecede kararsız ve kimyasal olarak fazla reaktif hale getirir. Reaktif oksijen türleri bulabildikleri herhangi bir molekül ile etkileşime girer ve bu molekülden ya bir elektron alarak ya da ona bir elektron vererek yapısını bozarlar (54). DNA yapısında bozulmalara protein ve lipitlerde peroksidasyona neden olurlar (53).

Beyin diğer organlara kıyasla metabolik olarak çok aktif olması ve hücre sel yenilenme kapasitesinin daha az olması nedeniyle bu reaktif oksijen türlerine karşı diğer organlardan çok daha fazla duyarlıdır. AH da A β peptidler beyinde birikerek lipid peroksidasyonuna neden olur. Malondialdehid lipid peroksidasyonun göstergesi olarak en çok çalışılan üründür ve peroksidasyonun derecesi ile korelasyon gösterir (7). Artmış olan oksidatif stres Alzheimer hastalarının prefrontal korteks ve hipokampus bölgelerinde oksidatif hasara neden olur (133).

Li ve ark. yaptıkları bir çalışmada A β 1-42 peptidi ISV uygulanarak AH modeli oluşturulan sıçanların prefrontal korteks homojenatlarında sham grubuna göre ölçülen MDA seviyelerinde anlamlı bir artış olduğu saptanmıştır (122).

Prakash ve ark. ve Ma ve ark. da A β 1-42 peptidi ISV enjeksiyonu ile AH oluşturulan sıçanlar üzerinde yapmış oldukları çalışmalarda A β 1-42 peptidi uygulanan grupta sham grubuna kıyasla hipokampüste MDA seviyelerinde anlamlı bir artış olduğu gözlemlenmiştir (133). Bu çalışmalar A β 1-42 peptidi ISV yolla uygulanarak oluşturulan denysel Alzheimer modelinde hipokampus ve prefrontal kortekste lipit peroksidasyonu oluştuğunu desteklemektedir.

Mg'un oksidan/antioksidan dengesini modüle ettiği ve antioksidan seviyesini yükselterek beyindeki lipit peroksidasyonunu azalttığı bilinmektedir (144).

Sadir ve arkadaşlarının sıçanlar üzerinde farklı magnezyum tuzlarını (MgCl₂, MgSO₄, Mg L-treonat) 28 gün boyunca oral yoldan vererek yapmış olduğu

çalışmada magnezyum alan grupların (MgCl₂, MgSO₄, Mg L-treonat) kontrole kıyasla MDA seviyelerinde anlamlı bir azalma olduğu gözlemlenmiştir.

Sales ve ark. yapmış olduğu başka bir çalışmada Aβ 1-42 peptidi ISV uygulanarak AH modeli oluşturulan sıçanlarda memantin alan grubun sadece model oluşturulan gruba kıyasla hipokampus homejenatından bakılan MDA seviyelerinde anlamlı bir azalma olduğu saptanmıştır (145).

Çalışmamızda ALZ grubunun hipokampus ve prefrontal korteks homojenatlarından ölçülen MDA seviyelerinin kontrol ve sham grubuna kıyasla anlamlı olarak artış gösterdiği saptanmıştır. Bu bulgu Aβ 1-42 peptidin lipid peroksidasyonunu arttırdığını destekleyen literatürdeki diğer çalışmalar ile uyumludur. Bunun yanında ALZ+Mem ,ALZ+Mg L-treonat , ALZ+Mem+Mg L-treonat gruplarının ALZ grubuna kıyasla hipokampus MDA seviyelerinde anlamlı bir azalma olduğu gözlenmiştir. AH modeli oluşturulup sadece Memantin ,sadece Mg L-treonat ve her ikisini birlikte alan gruplar arasında ise hipokampus ve prefrontal korteks MDA düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Bunun Mg L-treonat, memantin ve her ikisinin birlikte uygulanmasının Aβ 1-42 peptidin tetiklediği lipid peroksidasyonun derecesini azalttığını fakat Memantin ve Mg L- treonatin birlikte verilmesinin ayrı ayrı verilmesine göre aralarında bir farklılık olmadığını destekler nitelikte bir sonuç olduğu düşünülmüştür.

T-AOC, organizmanın toplam antioksidan seviyesini yansıtır ve çeşitli antioksidan enzim ve maddelerden oluşur. Bunlar arasında, glutatyon peroksidaz (GSH-PX,) süperoksit dismutaz (SOD)ve katalaz (CAT) , reaktif oksijen türlerini temizleyen temel endojen antioksidan enzimleri temsil eder.

Prakash ve ark. yapmış oldukları çalışmada Aβ 1-42 peptidin oksidatif stresi tetiklediğini destekler nitelikte AH modeli oluşturan sıçanlarda sham grubuna kıyasla GSH,SOD ve CAT aktivitelerinde anlamlı bir azalma olduğunu gözlemlenmiştir.

Ma ve ark. yapmış olduğu başka bir çalışmada Aβ 1-42 peptidi ISV uygulanmış olan sıçanların hipokampus ve prefrontal korteks homojenatlarından ölçülen SOD ve GSH seviyelerinde sham grubuna kıyasla anlamlı bir azalma olduğu saptanmıştır (133).

Sales ve ark. nın yaptığı çalışmada A β 1-42 pepitidi uygulanan grubun hipokampus homejenatlarından bakılan SOD, CAT, GSH düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma olduğu, memantin verilen Alzheimer hastalıklı grupta verilmeyen gruba kıyasla ise SOD, CAT ve GSH seviyelerinde anlamlı bir artış olduğu saptanmıştır (145).

Çalışmamızda ALZ grubunda kontrol ve sham grubuna kıyasla hem hipokampus hem prefrontal korteks homejenatlarından bakılan T-AOC seviyelerinde anlamlı bir azalışın olduğu gözlenmiştir bu literatürde A β 1-42 peptinin oksidatif stresi tetiklediğini gösteren diğer çalışmalar ile uyumludur. AH modeli oluşturulup sadece memantin ve sadece Mg L-treonat alan grupta ALZ grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık saptanmamışken AH modeli oluşturulup Mg L-treonat ve memantini beraber alan grupta ise ALZ grubuna kıyasla T-AOC seviyelerinde anlamlı bir yükseliş olduğu saptanmıştır ve ALZ+Mem+Mg L-treonat grubundaki bu artış ile T-AOC düzeyinin kontrol grubu seviyelerini yakaladığı gözlenmiştir .Literatürde sıçanlarda AH modeli oluşturulup memantin ve Mg L-treonatın beraber uygulandığı başka bir çalışmaya rastlanmamış olmakla beraber çalışmamızdaki bu sonuç Memantin ve Mg L-treonatın beraber uygulandığında AH da gelişen oksidatif stresi azaltacağı yönünde değerlendirilmiştir.

5.2.3. TNF α Bulgularının Değerlendirilmesi

AH'nda senil amiloid plaklar hipokampus ve korteks bölgesinde birikme eğilimindedir (41) .Bu plaklar herhangi bir beyin hasarı durumunda hızlı yanıt veren glial hücreleri aktive ederek nöroinflamatuvar sürecin başlamasına neden olur (49). Mikroglialar immun yanıtta ilk sırada rol alan savunma hücreleridir. Fizyolojik koşullar altında istirahat halinde bulunan mikroglia hücreleri, SSS mikroçevresindeki değişikliklerle birlikte aktive hale gelir (50). Aktive olmuş mikroglialardan TNF α , IL-6, IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinler, inflamatuvar mediyatörler , ROS , NO ve kemokin salınımı gerçekleşir.

Aktive olmuş mikroglialardan salınan proinflamatuvar mediyatörler kan beyin bariyerinde sıkı bağlantılar, transport ve endotelial hücre yüzey (surface)

proteinlerinde ve vasküler dansitede bir takım değişikliklere neden olarak bariyerin permeabilitesinde artışa neden olur (36). KBB'nin bozulması, monositler, makrofajlar, nötrofiller ve T hücreleri dahil olmak üzere diğer immün hücrelerin inflamatuvar bölgeye göçüne neden olur .Bu inflamatuvar süreç kontrol edilemez veya baskılanamazsa, SSS'nin yerleşik hücreleri zarar görebilir doku hasarı ve nöron ölümü meydana gelebilir.

Alzheimer hastalığında aktivasyon süresinin uzamasıyla birlikte aktive olmuş mikrogliya ve astrositlerden salınan proinflamatuvar sitokinler APP in beta sekretaz ile bölünmesinde artışa neden olarak A β plaklarının oluşumuna ,bu plakların aktive olmuş glial hücreler tarafından fagosite edilip temizlenmesinde azalmaya ve plak seviyelerinde artışa neden olur (50).

TNF α nın , öğrenme ve bellekle ilişkili sinaptik plastisite formu olan LTP nin A β ile indüklenen inhibisyonunda rol aldığı bilinmektedir. Li ve ark. yapmış oldukları bir çalışmada A β 1-42 peptidi ISV uygulanan sıçanlarda sham grubuna göre TNF α seviyelerinde belirgin derecede artış olduğu gözlemlenmiştir (122).

Mg inflamasyon üzerindeki etkinliğine yönelik çalışmalar daha çok Mg eksikliği oluşturulan modeller üzerinedir. Mg eksikliğinde ekstrasellüler Mg değerleri azalmakta ve bu durum Mg 'un NMDA reseptörleri üzerindeki blokan etkiyi ortadan kaldırarak hücre içerisine Ca⁺² girişine sebebiyet vermektedir (146).

Mg eksikliğine bağlı olarak inflamasyonu tetikleyen bir diğer olası mekanizma NF- κ B (nükleer faktör kappa B) nin aktivasyonudur. NF κ B ailesi inflamatuvar yanıtın önemli basamaklarında rol alan çok sayıda sitokinlerin ve diğer immün yanıt genlerinin ekspresyonunu düzenleyen bir grup indüklenebilir transkripsiyon faktörlerinden oluşur. NF κ B sitoplazmada inaktif formda bulunur ve enfeksiyon, ısı şoku ,oksidatif stres gibi birçok farklı stres koşuluna yanıt olarak aktive edilebilir (147, 148).

Yu ve ark. transgenik APP/PS1 fareler üzerinde yapmış oldukları çalışmada Mg L-treonat verilen grubun Alzheimer grubuna kıyasla TNF- α seviyelerinde belirgin derecede azalmanın olduğu görülmüştür (149).

Sales ve ark. yapmış oldukları çalışmada A β 1-42 peptidi ISV uygulanarak AH modeli oluşturulan sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla TNF α seviyelerinde belirgin bir artışın olduğu saptanmıştır. AH modeli oluşturulup memantin alan grupta ise A β 1-42 peptidinin tetkiklediği TNF α seviyelerindeki bu artışın anlamlı olarak azaldığı gözlemlenmiştir (145).

Çalışmamızda literatürdeki diğer çalışmalar ile uyumlu olarak ALZ grubunda kontrol ve sham grubuna kıyasla hipokampus ve prefrontal korteks örneklerinde TNF- α seviyelerinde anlamlı bir artışın olduğu görülmüştür. ALZ grubunun hipokampus ve prefrontal korteks TNF - α seviyelerinin AH modeli oluşturulup sadece memantin, sadece Mg L-treonat ve ikisini birlikte alan gruplara kıyasla anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptanmıştır. AH modeli oluşturulup sadece Memantin, sadece Mg L-treonat ve her ikisini birlikte alan gruplar arasında ise hipokampus ve prefrontal korteks TNF- α düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Bunun Mg L-treonat, memantin ve her ikisinin birlikte uygulanmasının A β 1-42 peptidin indüklediği nöroinflamasyonun derecesini azalttığını fakat Memantin ve Mg L-treonatın birlikte verilmesinin ayrı ayrı verilmesine göre aralarında anlamlı bir farklılık olmadığını destekler nitelikte bir sonuç olduğu düşünülmüştür.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Toplumda yaşlı popülasyonun giderek artmasıyla birlikte demans olguları ve demansın yaygın bir şekli olan AH her geçen gün artmakta ve bu nedenle çok önemli bir sağlık sorunu haline gelmektedir . Şu anda günümüzde AH'nı tamamen iyileştirebilecek bir tedavi modalitesi mevcut değildir . Klinik denemelerin çeşitli aşamalarında çok sayıda yeni tedaviler araştırılmaya devam etmektedir.

Deneyssel AH modellerinde uzun zamanlardan beri yapılan çeşitli öğrenme ve bellek testleri ile AH'deki kognitif bozukluğun tedavisi ve mevcut tedavilerine destek olabilecek yeni ajanların araştırılması araştırmacıların oldukça ilgisini çekmektedir.

Bu tez çalışmasında bir magnezyum bileşiği olan ve diğer magnezyum bileşiklerine kıyasla KBB'ni geçebilen Magnezyum L- treonat ile AH tedavisinde kullanılan bir NMDA antagonisti olan Memantinin , ayrı ayrı ve beraber verildiğinde Aβ 1-42 peptidi ISV uygulanarak AH oluşturulan sıçanlarda kognitif fonksiyonlar üzerine olan etkileri araştırılmıştır. MWM testi bulgularına göre AH modeli oluşturulan sıçanlarda öğrenme ve bellek mekanizmalarının bozulduğu Mg L-treonat ve Memantini beraber alan grupta ise öğrenme fonksiyonlarının olumlu yönde etkilendiği gözlenmiştir. BDNF düzeylerinin ise Aβ 1-42 peptidi uygulanması ile belirgin ölçüde azaldığı Memantin , Mg L-treonat ve ikisinin beraber verilmesi ile BDNF'in anlamlı şekilde arttığı saptanmıştır. AH modeli oluşturulup Memantin ve Mg L-treonatın birlikte uygulanmasının ayrı ayrı uygulanmasına göre hipokampus BDNF seviyelerini anlamlı olarak arttırdığı ve hipokampus BDNF seviyesini kontrol grubunun düzeylerine getirdiği görülmüştür . Bu AH'da Memantin ve Mg L-treonatın ayrı ayrı uygulanmasının kognitif fonksiyonlar üzerine olumlu etkileri olabileceğini ve her ikisinin beraber verilmesinin ise bu kognitif fonksiyonlar üzerindeki etkiyi Memantin ve Mg L-treonatın tek başına uygulanmasına göre çok daha belirgin ölçüde arttıracakını destekler niteliktedir. YALT testi bulgularına göre AH'da Mg L-treonat uygulamasının anksiyeteyi anlamlı olarak azalttığı gözlenmiştir. Kognitif fonksiyonların yanında oksidatif stres ve nöroinflamasyonu değerlendirmek için bakılan MDA, T-AOC ve TNF-α ölçümlerinde sıçanlarda oluşturduğumuz AH modeli ile oksidatif stresin Aβ 1-42 peptidi ile indüklendiği çok net bir şekilde

gözenmiş olup Memantin ve Mg L-treonatın birlikte uygulandığında AH da gelişen bu oksidatif stresi belirgin ölçüde azalttığı saptanmıştır.

Çalışmamızda nöroinflamasyon üzerindeki etkileri değerlendirmek için AH patogeneğinde yer alan proinflamatuvar sitokinlerden TNF- α düzeyleri değerlendirilmiştir. Sonuçlar A β 1-42 peptidi ile indüklenen nöroinflamasyonun memantin ve Mg L-treonat uygulamaları ile azaltılabileceği görüşünü destekler nitelikte olmakla birlikte nöroinflamasyonun daha geniş çapta değerlendirilebilmesi için TNF- α 'nın yanında diğer proinflamatuvar sitokinlerin de değerlendirmesine ihtiyaç vardır.

Literatürde AH modeli oluşturulan sıçanlarda Memantin ve Mg L-treonatın ayrı ayrı uygulandığı çalışmalara rastlanmıştır ve bu çalışmada her ikisinin kombine etkisinin değerlendirilmesi çalışmanın özgün değerinin oluşturmaktadır. Bu anlamda Mg L-treonatın Alzheimer hastalarında Memantin tedavisiyle birlikte uygulanması tedavi etkinliğini arttıracaktır. Çalışma sonuçlarımızın bu alanda yeni deneysel araştırma ve çalışmalara ışık tutabileceği düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Guyton AC, Hall JE. Guyton ve Hall Tıbbi Fizyoloji. Çev. Ed. Yeğen BÇ. Beynin etkinlik durumları, uyku, beyin dalgaları, epilepsi, psikozlar, Alzheimer hastalığı-amiloid plaklar ve baskılanmış bellek. Nobel Tıp Kitapevleri 2013; 59: 727-8.
2. Chavali VD, Agarwal M, Vyas VK, Saxena B. Neuroprotective Effects of Ethyl Pyruvate against Aluminum Chloride-Induced Alzheimer's Disease in Rats via Inhibiting Toll-Like Receptor 4. J Mol Neurosci. 2020;70(6):836-850. doi:10.1007/s12031-020-01489-9
3. Drummond E., Wisniewski T. Alzheimer's disease: experimental models and reality. Acta Neuropathol. 2016;133:155–175.
4. Puzzo D, Lee L, Palmeri A, Calabrese G, Arancio O. Behavioral assays with mouse models of Alzheimer's disease: practical considerations and guidelines. Biochem Pharmacol. 2014;88:450–467 .
5. Selkoe DJ (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. Science 298: 789–791. PMID: 12399581.
6. Toffa DH, Magnerou MA, Kassab A, Hassane DF, Sow AD (2019) Can magnesium reduce central neurodegeneration in Alzheimer's disease? Basic evidences and research needs. Neurochem Int 126, 195–202.
7. Ng LF, Gruber J, Cheah IK, Goo CK, Cheong WF, Shui G, Sit KP, Wenk MR, Halliwell B. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ extends lifespan and improves healthspan of a transgenic Caenorhabditis elegans model of Alzheimer disease. Free Radic Biol Med. 2014 Jun;71:390–401.
8. Kerven M, Angeli A, Nicole O, et al. Selective impairment of some forms of synaptic plasticity by oligomeric amyloid beta peptide in the mouse hippocampus: implication of extrasynaptic NMDA receptors. J Alzheimer Dis 2012;32:183–196.
9. Bordji K, Becerill-Ortega J, Nicole O, Buisson A. Activation of extrasynaptic, but not synaptic, NMDA receptors modifies amyloid precursor protein expression pattern and increases amyloid-Beta production. J Neurosci 2010;30:15927–15942.
10. Emre M (Ed). Nöroloji Temel Kitabı. Güneş Tıp Kitabevleri, İstanbul 2013; 938, 941- 42, 956-8.

11. Lakshmi, B. V. S., Sudhakar, M. & Prakash, K. S. Protective Effect of Selenium Against Aluminum Chloride-Induced Alzheimer's Disease: Behavioral and Biochemical Alterations in Rats. *Biol Trace Elem Res* 165, 67–74 (2015).
12. Andrási E, Igaz S, Molnár Z, Mako S. Disturbances of magnesium concentrations in various brain areas in Alzheimer's disease. *Magnes Res.* 2000;13(3):189-196.
13. Kirkland AE, Sarlo GL, Holton KF (2018) The Role of Magnesium in Neurological Disorders. *Nutrients* 10(6), Xu ZP, Li L, Bao J, Wang ZH, Zeng J, Liu EJ, Li XG, Huang RX, Gao D, Li MZ, Zhang Y, Liu GP, Wang JZ.
14. Xu, Z.P.; Li, L.; Bao, J.; Wang, Z.H.; Zeng, J.; Liu, E.J.; Li, X.G.; Huang, R.X.; Gao, D.; Li, M.Z.; et al. Magnesium protects cognitive functions and synaptic plasticity in streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's model. *PLoS ONE* 2014, 9, e108645.
15. Li W, Yu J, Liu Y, Huang X, Abumaria N, Zhu Y, Huang X, Xiong W et al (2014) Elevation of brain magnesium prevents synaptic loss and reverses cognitive deficits in Alzheimer inverted question marks disease mouse model. *Mol Brain* 7:65.
16. D.; Casado, M.; Paoletti, P. Triheteromeric nmda receptors: From structure to synaptic physiology. *Curr. Opin. Physiol.* 2018, 2, 1–12.
17. Castilho, R.F.; Ward, M.W.; Nicholls, D.G. Oxidative stress, mitochondrial function, and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* 1999, 72, 1394–1401.
18. Shen Y, Dai L, Tian H, et al. Treatment of magnesium-L-threonate elevates the magnesium level in the cerebrospinal fluid and attenuates motor deficits and dopamine neuron loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2019;15:3143–3153.
19. Huang Y, Huang X, Zhang L, Han F, Pang K-L, Li X, et al. Magnesium boosts the memory restorative effect of environmental enrichment in Alzheimer's disease mice. *CNS Neurosci Ther.* 2018;24(1):70–9.
20. Sadir S, Tabassum S, Emad S, et al. Neurobehavioral and biochemical effects of magnesium chloride (MgCl₂), magnesium sulphate (MgSO₄) and magnesium-

- L-threonate (MgT) supplementation in rats: a dose dependent comparative study. *Pak J Pharm Sci.* 2019;32.
21. Lou ZY, Chen W, Xue WZ, Ding JJ, Yang QQ and Wang HL (2017). Dietary intake of magnesium-L-threonate alleviates memory deficits induced by developmental lead exposure in rats. *RSC Adv.*, 7: 8241-8249.
 22. Slutsky I, Abumaria N, Wu LJ, et al. Enhancement of learning and memory by elevating brain magnesium. *Neuron* 2010;65(2):165-77.
 23. Lewin, G.R. and Barde, Y.A. (1996) Physiology of the neurotrophins. *Annu. Rev. Neurosci.*, 19, 289±317.
 24. Tanila H. The role of BDNF in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 2017;97:114–8 .
 25. Woo NH, Lu B. BDNF in synaptic plasticity and memory. *National Institutes of Health* 220:223-50, 2014 .
 26. Phillips HS., Hains JM., Armanini M., Laramée GR., Johnson SA., Winslow JW., 1991. BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease. *Neuron*, 7, 695-702.
 27. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. Learning and Memory. In: *Principles of Neural Science*. The McGraw-Hill Companies. 2013; 5th Edition, USA, p:1441-60.
 28. M.V.F. Silva, C.M.G. Loures, L.C.V. Alves, L.C. de Souza, K.B.G. Borges, M.D.G. Carvalho, Alzheimer's disease: risk factors and potentially protective measures, *J. Biomed. Sci.* 26 (1) (2019) 33.
 29. Giri M, Zhang M, Lu Y. Genes associated with Alzheimer's disease: an overview and current status. *Clin Interv Aging.* 2016;11:665–81.
 30. Cacace R, Sleegers K, Van Broeckhoven C. Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. *Alzheimers Dement.* 2016;12(6):733–48.
 31. Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW. Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 2010;23(4):213–27.
 32. Karch CM, Goate AM. Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biol Psychiatry.* 2015;77(1):43–51.
 33. Parihar MS, Hemnani T. Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic Interventions. *Journal of Clinical Neuroscience*, 2004;11 (5):456–467.

34. Awasthi M, Singh S, Pandey VP, Dwivedi UN. Alzheimer's disease: An overview of amyloid beta dependent pathogenesis and its therapeutic implications along with in silico approaches emphasizing the role of natural products. *J Neurol Sci* 2016;361:256-71.
35. Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1999;66 (2):137–147.
36. Z Cai, MD Hussain, L-J Yan, Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *Int J Neurosci* 124, 307–321 (2014).
37. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002;297:353–356.
38. Chen, G.F., Xu, T.H., Yan, Y., Zhou, Y.R., Jiang, Y., Melcher, K., Xu, H.E., 2017. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol. Sin.* 38 (9), 1205–1235.
39. Hamley, I.W., 2012 The amyloid beta peptide : a chemist's perspective. Role in Alzheimer's and fibrillization. *Chem. Rev.* 112,5147-5192 .
40. LaFerla FM, Green KN, Oddo S. 2007. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 8:499–509.
41. Askarova S, Yang X, Lee J. Impacts of Membrane Biophysics in Alzheimer's Disease: From Amyloid Precursor Protein Processing to A β Peptide-Induced Membrane Changes. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2011;10 (4061):1-12 .
42. Grammas P. Neurovascular dysfunction, inflammation and endothelial activation: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, 2011;26:2-12.
43. Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 72:1858–1862.
44. Meraz-Rios MA, Lira-De Leon KI, Campos-Pena V, De Anda-Hernandez MA, Mena-Lopez R. Tau oligomers and aggregation in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2010;112:1353-67.

45. Sjöberg MK, Shestakova E, Mansuroğlu Z, Maccioni RB, Bonnefoy E. Tau protein binds to pericentromeric DNA: a putative role for nuclear tau in nucleolar organisation. *J Cell Sci* 2006;119:2025-34.
46. Mandelkow E., von Bergen M., Biernat J. and Mandelkow E. M. (2007) Structural principles of tau and the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 17, 83–90
47. Gürvit H . Demans sendromu , Alzheimer hastaligi ve Alzheimer disi demanslar. Noroloji (Editor A. Emre Ogel. Nobel Tip Kitabevi. Istanbul. 2004; 377-204.
48. Kwon, H.S.; Koh, S.H. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: microglia and astrocytes. *Transl. Neurodegener* **2020**, 9, 42
49. Bronzuoli, M. R., Iacomino, A., Steardo, L., and Scuderi, C. (2016). Targeting neuroinflammation in Alzheimer's disease. *J. Inflamm. Res.* 9, 199–208.
50. Kaur, D.; Sharma, V.; Deshmukh, R. Activation of microglia and astrocytes: A roadway to neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Inflammopharmacology*
51. Dá Mesquita, S., Ferreira, A. C., Sousa, J. C., Correia-Neves, M., Sousa, N., and Marques, F. (2016). Insights on the pathophysiology of Alzheimer's disease: the crosstalk between amyloid pathology, neuroinflammation and the peripheral immune system. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 68, 547–562.
52. Bernhard, D., & Wang, X. L. (2007). Smoking, oxidative stress and cardiovascular diseases—do anti-oxidative therapies fail? *Current Medicinal Chemistry*, 14, 1703–1712.
53. Gutierrez, J., Ballinger, S. W., Darley-USmar, V. M., & Landar, A. (2006). Free radicals, mitochondria, and oxidized lipids: The emerging role in signal transduction in vascular cells. *Circulation Research*, 99, 924–932.
54. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif oksijen partikülleri ve Antioksidan savunma, *Türk Nefroloji ve Transplantasyon Dergisi* 1997. 3-4, 92-95.
55. Halliwell, B., 2001. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 18, 685–716. , Shichiri M. The role of lipid peroxidation in neurological disorders. *J Clin Biochem and Nutrition* 2014; 54:151–60.
56. Beal MF: Oxidative damage as an early marker of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 2005; 26:585-6.

57. Shaftel, S. S., Griffin, W. S., & O'Banion, M. K. (2008). The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: An evolving perspective. *Journal of Neuroinflammation*, 5, 7.
58. Rosi, S., Ramirez-Amaya, V., Hauss-Wegrzyniak, B., & Wenk, G. L. (2004). Chronic brain inflammation leads to a decline in hippocampal NMDA-R1 receptors. *Journal of Neuroinflammation*, 1, 12.
59. Maccioni, R. B., Rojo, L. E., Fernandez, J. A., & Kuljis, R. O. (2009). The role of neuroimmunomodulation in Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1153, 240–246 .
60. Agostinho, P., Cunha, R. A., & Oliveira, C. (2010). Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Current Pharmaceutical Design*, 16, 2766–2778 .
61. Candore, G., Bulati, M., Caruso, C., Castiglia, L., Colonna-Romano, G., Di Bona, D., et al. (2010). Inflammation, cytokines, immune response, apolipoprotein E, cholesterol, and oxidative stress in Alzheimer disease: Therapeutic implications. *Rejuvenation Research*, 13, 301–313 .
62. Yao, Y., Chinnici, C., Tang, H., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., & Pratico, D. (2004). Brain inflammation and oxidative stress in a transgenic mouse model of Alzheimer-like brain amyloidosis. *Journal of Neuroinflammation*, 1, 21.
63. Cai Z, Zhao B, Ratka A. Oxidative stress and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med* 2011;13:223–250.
64. Martin SJ, Grimwood PD, Morris RG. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci* 2000;23:649-711)
65. Kanit L.Öğrenme,Bellek ve Dikkat. Ağar E.İnsan Fizyolojisi .İstanbul : İstanbul Tıp Kitabevleri; 2021.607-624.
66. Kandel, E. R., & Schwartz, H. J. (2013). Cellular mechanisms of implicit memory storage and the biological basis of individuality. In E. R. Kandel, H. J. Schwartz, T. M. Jessell, S. A. Siegelbaum, & A. J. Hudspeth (Eds.), *Principles of neural science* (Vol. Fifth Edition, pp. 1461-1485): The McGraw-Hill Companies.
67. Siegelbaum SA, Kandel ER. Prefrontal Cortex, Hippocampus, and the Biology of Explicit Memory Storage. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum

- SA, Hudspeth AJ.(Eds) Principles of Neural Science.5th ed Newyork:The McGraw-Hill Companies; 2013. p. 1487-519.
68. Lu, Y., Christian, K. & Lu, B. BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? *Neurobiol. Learn. Mem.* **89**, 312–323 (2008).
 69. Kandel ER, Schawetz JH, Jessel TM. Cellular mechanisms of learning and the biological basis of individuality. *Principles of Neural Science*. New York: Elsevier Press; 1991. p. 997-1008 .
 70. Lee, Y.S., and Silva, A.J. (2009). The molecular and cellular biology of enhanced cognition. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 126–140 .
 71. Burke, S.N., and Barnes, C.A. (2006). Neural plasticity in the ageing brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 30–40
 72. Balducci C, Beeg M, Stravalaci M, Bastone A, Scip A, Biasini E, Tapella L, Colombo L, Manzoni C, Borsello T, Chiesa R, Gobbi M, Salmona M, Forloni G. Synthetic amyloid-beta oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010; 107(5): 2295-300.
 73. Ivanov A, Pellegrino C, Rama S, et al. Opposing role of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in regulation of the extracellular signal-regulated kinases (ERK) activity in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 2006;572:789–798.
 74. Esposito, Z. et al. Amyloid β , glutamate, excitotoxicity in Alzheimer's disease: are we on the right track? *Cns Neurosci. Ther.* **19**, 549–555 (2013).
 75. Koch G, Di Lorenzo F, Bonni S, Ponzo V, Caltagirone C, Martorana A. Impaired LTP- but not LTD-Like Cortical Plasticity in Alzheimer's Disease Patients. *J Alzheimers Dis* 2013;33:525–533.
 76. Texido L, Martín-Satue M, Alberdi E, Solsona C, Matute C. Amyloid β peptide oligomers directly activate NMDA receptors. *Cell Calcium* 2011;49:184–190
 77. Corlew R, Wang Y, Ghermazien H, et al. Developmental switch in the contribution of presynaptic and postsynaptic NMDA receptors to long-term depression. *J Neurosci* 2007;27(37):9835-45 .

78. Rodriguez-Moreno A, Kohl MM, Reeve JE, et al. Presynaptic induction and expression of timing-dependent long-term depression demonstrated by compartment-specific photorelease of a use-dependent NMDA receptor antagonist. *J Neurosci* 2011;31(23):8564-9 .
79. Magnusson KR. Declines in mRNA expression of different subunits may account for differential effects of aging on agonist and antagonist binding to the NMDA receptor. *J Neurosci* 2000;20(5):1666-74.
80. Magnusson KR. Aging of the NMDA receptor: from a mouse's point of view. *Fut Neurol* 2012;7(5):627-37 The author reviews the changes in the NMDA receptor function in the mouse during the aging process.
81. Shen J, Kelleher RJ III. The presenilin hypothesis of Alzheimer's disease: evidence for a loss-of-function pathogenic mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(2):403-9 .
82. SzeC, BiH, Kleinschmidt-DeMasters BK, et al. N-methyl-D-aspartate receptor subunit proteins and their phosphorylation status are altered selectively in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 2001;182(2):151-9 .
83. Grober, U.; Schmidt, J.; Kisters, K. Magnesium in prevention and therapy. *Nutrients* 2015, 7, 8199–8226.
84. Vink, R.; Nechifor, M. Magnesium in the Central Nervous System; University of Adelaide Press: Adelaide, Australia, 2011; p. 342.
85. Stroebel, D.; Casado, M.; Paoletti, P. Triheteromeric nmda receptors: From structure to synaptic physiology. *Curr. Opin. Physiol.* 2018, 2, 1–12.
86. Olloquequi, J.; Cornejo-Cordova, E.; Verdaguer, E.; Soriano, F.X.; Binvignat, O.; Auladell, C.; Camins, A. Excitotoxicity in the pathogenesis of neurological and psychiatric disorders: Therapeutic implications. *J. Psychopharmacol.* 2018, 32, 265–275.
87. Slutsky I, Sadeghpour S, Li B, Liu G. Enhancement of synaptic plasticity through chronically reduced Ca^{2+} flux during uncorrelated activity. *Neuron* 2004;44(5):835-49.
88. Yu J, Sun M, Chen Z, Lu J, Liu Y, et al. (2010) Magnesium modulates amyloid-beta protein precursor trafficking and processing. *J Alzheimers Dis* 20: 1091–1106.

89. Deutsch, J.C., Butler, J.A., Marsh, A.M., Ross, C.A., Norris, J.M., 1999. Rapid mass spectrometric analysis for ascorbate and related organic acids in small volumes of plasma for use in pediatric subjects. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 726, 79e84.
90. Kim YJ, McFarlane C, Warner DS, Baker MT, Choi WW, Dexter F (1996) The effects of plasma and brain magnesium concentrations on lidocaine-induced seizures in the rat. *Anesth Analg* 83, 1223-1228.
91. McKee JA, Brewer RP, Macy GE, Phillips-Bute B, Campbell KA, Borel CO, Reynolds JD, Warner DS (2005) Analysis of the brain bioavailability of peripherally administered magnesium sulfate: A study in humans with acute brain injury undergoing prolonged induced hypermagnesemia. *Crit Care Med* 33, 661-666.
92. Liu, G., Weinger, J.G., Lu, Z.L., Xue, F., Sadeghpour, S., 2015. Efficacy and safety of MMFS-01, a synapse density enhancer, for treating cognitive impairment in older adults: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Alzheimers Dis.* 49, 971e990.
93. Levi-Montalcini R: The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237: 1154-1162, 1987. , Gotz R, Koster R, Winkler C, et al: Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature* 372: 266-269, 1994.
94. Lessmann V and Brigadski T: Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: an update. *Neurosci Res* 65: 11-22, 2009.
95. Yang J, Siao CJ, Nagappan G, et al: Neuronal release of proBDNF. *Nat Neurosci* 12: 113-115, 2009.
96. Dieni S, Matsumoto T, Dekkers M, Rauskolb S, Ionescu MS, Deogracias R, Gundelfinger ED, Kojima M, Nestel S, Frotscher M, Barde YA (2012) BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons. *J Cell Biol* 196(6):775–788.
97. Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S, et al: Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem* 276: 12660-12666, 2001.
98. Chen, A.; Xiong, L.J.; Tong, Y.; Mao, M. The neuroprotective roles of bdnf in hypoxic ischemic brain injury. *Biomed. Rep.* 2013, 1, 167–176.

99. Cunha C., Brambilla R., Thomas KL., 2010. A simple role for BDNF in learning and memory? *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 3, 1-14.
100. Zheng Z, Sabirzhanov B, Keifer J. Oligomeric amyloid- β inhibits the proteolytic conversion of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), AMPA receptor trafficking, and classical conditioning. *J Biol Chem*. 2010 Nov 5;285(45):34708-17.
101. Zafra, F., Hengerer, B., Leibrock, J., Thoenen, H., & Lindholm, D. Activity dependent regulation of bdnf and ngf mrnas in the rat hippocampus is mediated by non- nmda glutamate receptors. *EMBO Journal*. 1990; 9 (11): 3545-3550.
102. Korte M, Carroll P, Wolf E, Brem G, Thoenen H, Bonhoeffer T (1995) Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8856–8860 ,
103. Patterson SL, Abel T, Deuel TA, Martin KC, Rose JC, Kandel ER (1996) Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron* 16:1137–1145.
104. Caldeira, M. V., Melo, C. V., Pereira, D. B., Carvalho, R. F., Carvalho, A. L., & Duarte, C. B. Bdnf regulates the expression and traffic of nmda receptors in cultured hippocampal neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2007; 35 (2): 208- 219.
105. Narisawa-Saito, M., Carnahan, J., Araki, K., Yamaguchi, T., Nawa, H., 1999a. Brain-derived neurotrophic factor regulates the expression of AMPA receptor proteins in neocortical neurons. *Neuroscience* 88, 1009–1014.
106. Alder, J., Thakker-Varia, S., Crozier, R.A., Shaheen, A., Plummer, M.R., Black, I.B., 2005. Early presynaptic and late postsynaptic components contribute independently to brain-derived neurotrophic factor-induced synaptic plasticity. *J. Neurosci*. 25, 3080–3085.
107. Nakazawa, T., Komai, S., Tezuka, T., Hisatsune, C., Umemori, H., Semba, K., Mishina, M., Manabe, T., Yamamoto, T., 2001. Characterization of Fyn-mediated tyrosine phosphorylation sites on GluR epsilon 2 (NR2B) subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J. Biol. Chem*. 276, 693–699.
108. Schratt, G.M., Nigh, E.A., Chen, W.G., Hu, L., Greenberg, M.E., 2004. BDNF regulates the translation of a select group of mRNAs by a mammalian

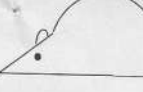
- target of rapamycin-phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway during neuronal development. *J. Neurosci.* 24, 7366–7377.
109. Harkany T, Abraham I, Timmerman W, et al. Beta-amyloid neurotoxicity is mediated by a glutamate-triggered excitotoxic cascade in rat nucleus basalis. *Eur J Neurosci.* 2000;12(8):2735–2745.
 110. Parsons CG, Danysz W, Quack G: Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist — a review of preclinical data. *Neuropharmacology* 1999, 38:735–767.
 111. Bormann J: Memantine is a potent blocker of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor channels. *Eur J Pharmacol* 1989, 166:591–592. , Kornhuber J, Bormann J, Retz W, Hubers M, Riederer P: Memantine displaces [³H]MK-801 at therapeutic concentrations in postmortem human frontal cortex. *Eur J Pharmacol* 1989, 166:589–590.
 112. Lipton SA: Prospects for clinically-tolerated NMDA antagonists: open-channel blockers and alternative redox states of nitric oxide. *Trends Neurosci* 16:527–32, 1993.
 113. Johnson, J. W. & Kotermanski, S. E. Mechanism of action of memantine. *Curr. Opin. Pharmacol.* 6, 61–67 (2006).
 114. Zeevalk GD, Nicklas WJ. Evidence that the loss of the voltage-dependent Mg^{2+} block at the N-methyl-D-aspartate receptor underlies receptor activation during inhibition of neuronal metabolism. *J Neurochem.* 1992;59(4):1211–1220.
 115. Lipton SA, Nicotera P. Calcium, free radicals and excitotoxins in neuronal apoptosis. *Cell Calcium.* 1998;23(2–3):165–171.
 116. Lipton SA. Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(2):160–170.
 117. Sobolevsky AI, Koshelev SG, Khodorov BI: Interaction of memantine and amantadine with agonist-unbound NMDA-receptor channels in acutely isolated rat hippocampal neurons. *J Physiol* 1998, 512:47–60.
 118. Chen HS, Lipton SA. Mechanism of memantine block of NMDA-activated channels in rat retinal ganglion cells. *J Physiol.* 1997;499(Pt 1): 27–49.
 119. Chen HS, Pellegrini JW, Aggarwal SK, et al. Open-channel block of N-methyl-D-aspartate (NMDA) responses by memantine: therapeutic advantage

- against NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *J Neurosci.* 1992;12(11):4427–4436.
120. Bresink I, Benke TA, Collett VJ, et al. Effects of memantine on recombinant rat NMDA receptors expressed in HEK 293 cells. *Br J Pharmacol.* 1996;119(2):195–204.
 121. Rai S, Kamat PK, Nath C, Shukla R (2014) Glial activation and post-synaptic neurotoxicity: the key events in streptozotocin (ICV) induced memory impairment in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 117:104–117.
 122. Li J, Wang C, Zhang JH, Cai JM, Cao YP, et al. (2010) Hydrogen-rich saline improves memory function in a rat model of amyloid-beta-induced Alzheimer's disease by reduction of oxidative stress. *Brain Res* 1328: 152–161.
 123. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Academic Press. 2009.
 124. D'Hooge, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Research Reviews* 2001; 36:60-90.
 125. MORRIS R (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of neuroscience methods.* 1 (11): 47-60.
 126. Treit D, Fundytus M. Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 1988; 31(4): 959-62 .
 127. Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol*, 2003; 463(1-3): 3-33.
 128. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*, 1985; 14(3): 149-67.
 129. Hogg S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 1996;54(1):21–30.
 130. Carobrez AP, Bertoglio LJ. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev*, 2005; 29(8): 1193- 205.
 131. TIAN H, DING N, GUO M, WANG S, WANG Z, LIU H, YANG J, LI Y, REN J, JIANG J (2019). Analysis of Learning and Memory Ability in an

- Alzheimer's Disease Mouse Model using the Morris Water Maze. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 152 e60055.
132. Zhang, L.; Fang, Y.; Xu, Y.; Lian, Y.; Xie, N.; Wu, T.; Zhang, H.; Sun, L.; Zhang, R.; Wang, Z. Curcumin Improves Amyloid β -Peptide (1–42) Induced Spatial Memory Deficits through BDNF-ERK Signaling Pathway. *PLoS ONE* 2015, 10, e0131525.
 133. Ma, Q.; Ruan, Y.Y.; Xu, H.; Shi, X.M.; Wang, Z.X.; Hu, Y.L. Safflower yellow reduces lipid peroxidation, neuropathology, tau phosphorylation and ameliorates amyloid beta-induced impairment of learning and memory in rats. *Biomed. Pharm.* 2015, 76, 153–164.
 134. Prakash A, Kumar A (2014). Role of nuclear receptor on regulation of BDNF and neuroinflammation in hippocampus of beta-amyloid animal model of Alzheimer's disease. *Neurotox Res*, 25(4):335-47.
 135. Wang P, Wang ZY (2016) Metal ions influx is a double edged sword for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev* 35:265–290.
 136. Lister RG. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol Ther*, 1990; 46(3): 321-40.
 137. de Visser L, Baars AM, Lavrijsen M, van der Weerd CM, et al. Decision-making performance is related to levels of anxiety and differential recruitment of frontostriatal areas in male rats. *Neuroscience*, 2011; 184: 97-106.
 138. Miu AC, Heilman RM, Houser D. Anxiety impairs decision-making: psychophysiological evidence from an Iowa Gambling Task. *Biol Psychol*, 2008; 77(3): 353-8.
 139. Cioanca, O.; Hritcu, L.; Mihasan, M.; Trifan, A.; Hancianu, M. Inhalation of coriander volatile oil increased anxiolytic-antidepressant-like behaviors and decreased oxidative status in beta-amyloid (1–42) rat model of Alzheimer's disease. *Physiol. Behav.* 2014, 28, 68–74.
 140. Zhou X, Huang Z, Zhang J, Chen JL, Yao PW, Mai CL, Mai JZ, Zhang H, Liu X.G (2020) Chronic oral administration of magnesium-L-threonate prevents oxaliplatin-induced memory and emotional deficits by normalization of TNF- α /NF- κ B signaling in rats. *Neurosci Bull*:1–15.

141. Song, X.; Liu, B.; Cui, L.; Zhou, B.; Liu, W.; Xu, F.; Hayashi, T.; Hattori, S.; Ushiki-Kaku, Y.; Tashiro, S.-I.; et al. Silibinin ameliorates anxiety/depression-like behaviors in amyloid β -treated rats by upregulating BDNF/TrkB pathway and attenuating autophagy in hippocampus. *Physiol. Behav.* 2017, 179, 487–493.
142. Amidfar, M.; Kim, Y.K.; Wiborg, O. Effectiveness of memantine on depression-like behavior, memory deficits and brain mRNA levels of BDNF and TrkB in rats subjected to repeated unpredictable stress. *Pharmacol. Rep.* 2018, 70, 600–606.
143. Chung CP, Schmidt D, Stein CM, Morrow JD and Salomon RM (2013). Increased oxidative stress in patients with depression and its relationship to treatment. *Psychiatry Res.*, 206: 213-216.
144. Buha A, Bulat Z, Đukic-Ćosic D and Matovic V (2012). Effects of oral and intraperitoneal magnesium treatment against cadmium-induced oxidative stress in plasma of rats. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.*, 63: 247-254.
145. Karimi-Sales, R.; Ashiri, M.; Hafizi, M.; Kalanaky, S.; Maghsoudi, A. H.; Fakharzadeh, S.; Maghsoudi, N.; Nazaran, M. H. Neuroprotective effect of new nanochelating-based nano complex, ALZc3, against $A\beta(1-42)$ -induced toxicity in rat: A comparison with memantine. *Pharm. Res.* 2020, 37, 48.
146. Mazur A, Maier JA, Rock E, Gueux E, Nowacki W, Rayssiguier Y. Magnesium and the inflammatory response: Potential physiopathological implications. *Arch Biochem Biophys* 2007; 458:48-56.
147. Y. Yamamoto, R.B. Gaynor, *Curr. Mol. Med.* 1 (2001) 287–296.
148. Y. Kabe, K. Ando, S. Hirao, M. Yoshida, H. Handa, *Antioxid. Redox Signal* 7 (2005) 395–403.
149. Yu, X.; Guan, P.-P.; Zhu, D.; Liang, Y.-Y.; Wang, T.; Wang, Z.-Y.; Wang, P. Magnesium Ions Inhibit the Expression of Tumor Necrosis Factor α and the Activity of γ -Secretase in a β -Amyloid Protein-Dependent Mechanism in APP/PS1 Transgenic Mice. *Front. Mol. Neurosci.* 2018, 11, 172.

8. EK 1 .ETİK KURUL ONAYI

 DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

35340, Inciraltı, İzmir-232 4122234

Gündem No/Toplantı No/Yıl : 08/03/2021
Toplantı Tarihi : 10 Mart 2021

Sayın, Prof. Dr. Sevil GÖNENÇ ARDA
DEÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

10/2021 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Magnezyum L-treonatın A β 1-42 Peptidi Kullanılarak Alzheimer Modeli Oluşturulan Ratlarda Kognitif Fonksiyonlar Üzerine Etkisi" isimli, Sinem YAPRAK, Başar KOÇ'un araştırmacı olduğu, 42 adet Sprague-Dawley erkek sıçan talep edilen projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde **bold** karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.