

YAĞIZ MERİÇ ALTUN

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2020



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

NÖRODEJENERATİF HASTALIKLARDA HÜCRESEL
SENESANS MEKANİZMASININ ROLÜ

YAĞIZ MERİÇ ALTUN

DANIŞMAN
PROF. DR. ERDEM TÜZÜN

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI
İLERİ NÖROLOJİK BİLİMLER DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL-2020

TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Yağız Meriç Altun

İTHAF



Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında kararlarımı destekleyen, ne zaman olursa olsun ulaşabileceğim, bana Columbia Üniversitesi Taub Enstitüsü'nde çalışma imkânı sağlayıp Amerika Birleşik Devletleri'nde araştırmalarımı devam ettirme fırsatı yaratan tez danışmanım Prof. Dr. Erdem Tüzün'e

Tezimin konusunun seçiminden deneylerin planlanmasına kadarki tüm süreçte en ince detayları birlikte irdelediğim ve beni yalnızca bilimle donatmakla kalmayıp, hayatı ve insan olmayı öğreten Doç. Dr. Şölen Gökhan'a,

Doktora tezimin tüm deneylerini yapmam için bana laboratuvarının kapılarını açan, alanımızdaki en yeni bilgilerle beni her gün geliştiren, araştırma ruhumu her daim canlı tutan, Albert Einstein tıp fakültesi nöroloji anabilim dalı başkanı Prof. Dr. Mark F. Mehler'e,

Doktora serüvenine adım atmamı sağlayan, her zaman bir telefon yakınımda olan, arkadaşım diyebildiğim yardım meleği Doç. Dr. Vuslat Yılmaz'a,

Deneylerimin teknik detaylarını kolaylıkla paylaşabileceğim, bana yardımcı olmak için elinden gelen her şeyi yapan Yrd. Doç. Aldrin Molero'ya

Tez izleme komitemde bulunan Prof. Dr. Ertan Yurdakoş'a ve Prof. Dr. Elif Özkök'e

Tez işlemlerimi transatlantik olarak halletmemi sağlayan arkadaşım Dr. Canan Ulusoy'a

Bütün bu süreç boyunca bana destek olan aileme ve dostlarıma gönülden teşekkür ederim.

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deepest appreciation and sincerest gratitudes to;

my mentor Professor Erdem Tüzün, M.D. who supported my decisions at every stage of my thesis and provided me with the opportunity to work at Taub Institute in Columbia University which ultimately helped me continue my research in the United States;

my co-mentor Associate Professor Şölen Gökhan, M.D. with whom I worked on the finest details of my thesis from determining my research focus to establishing experiments. She has also guided me through every aspect of life and made me a better person;

the chairman of Neurology in Albert Einstein College of Medicine, Professor Mark F. Mehler, M.D. who opened the doors of his laboratory for me to pursue my research. Not only he provided me with the latest informations in neuroscience but also sparked joy within me with his unfathomable knowledge and curiosity and kept my researcher spirit alive every single day;

my friend, Associate Professor Vuslat Yılmaz, Ph.D. who helped me step in this Ph.D. journey and is always one telephone call away;

Assistant Professor Aldrin Molero, M.D., Ph.D. who shared his wisdom and technical skills during my research and did everything in his power to help me;

my thesis committee members Professor Ertan Yurdakoş, M.D., Ph.D. and Professor Elif Özkök, Ph.D.;

my friend Canan Ulusoy, Ph.D. who helped me with all of the administrative work;

my family members and friends who helped me through this process.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
ACKNOWLEDGEMENT	VI
İÇİNDEKİLER	VII
TABLolar LİSTESİ.....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ	XI
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XIII
ÖZET	XV
ABSTRACT.....	XVI
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Nörodejenerasyon	5
2.1.1. Nörodejeneratif Hastalıklar	7
2.1.1.1. Alzheimer Hastalığı	7
2.1.1.2. Parkinson Hastalığı	9
2.1.1.3. Huntington Hastalığı	10
2.1.2. Nörodejenerasyon Risk Faktörleri	11
2.1.2.1. Genetik ve Epigenetik Faktörler	11
2.1.2.2. Çevresel Faktörler	12
2.2. Hücresel Senesans.....	13
2.2.1. Senesans Altıpları	15
2.2.1.1. Gelişimsel Senesans	17
2.2.1.2. Yaşlanma-Patolojik Tip Senesans.....	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1. Normal Yaşlanma ve Dış Stresörle Hızlandırılmış Nörodejenerasyon Hayvan Modelleri.....	20
3.1.1. Fareler	20
3.1.2. Farelere verilecek L-Metiyonin ve Normal Su Hesaplamaları	20
3.2. Davranış Testleri.....	21

3.2.1. Açık Alan Testi	21
3.2.2. Zorunlu Yüzme Testi	22
3.2.3. Denge Kirişi Testi	23
3.2.4. Nesne Tanıma Testi	23
3.2.5. Nesne-Mekan Testi	24
3.2.6. Yükseltilmiş Artı ve O Labirent Testi.....	25
3.3. Doku Elde Edilmesi ve İşlenmesi	26
3.3.1. Perfüzyon	26
3.3.2. Doku İşlemleri ve Saklama	27
3.4. İmmünohistokimya	27
3.4.1. 3,3'-Diaminobenzidine Boyaması	27
3.4.2. Senesansla Alakalı β -Galaktozidaz Boyaması.....	27
3.5. Elektronmikroskopisi	28
3.6. İstatistiksel Analiz ve Kullanılan Yazılımlar	28
4. BULGULAR.....	29
4.1. Fenotip ve Davranış Bulguları	29
4.1.1. Su Alımı ve Ağırlık Değişimi	29
4.1.2. Davranış Testleri.....	30
4.1.2.1. Kontrol ve deney grubu farelerinin genel fiziksel durumlarının, bazal anksiyete ve keşfetme isteği düzeylerinin AAT ile incelenmesi	30
4.1.2.2. Kontrol ve deney grubu farelerinin anksiyete açısından karşılaştırılması ...	32
4.1.2.3. Kontrol ve deney grubu farelerinin depresyon benzeri davranış açısından karşılaştırılması	34
4.1.2.4. Kontrol ve deney grubu farelerinin hipokampüse bağlı mekansal hafıza fonksiyonları açısından karşılaştırılması.....	35
4.1.2.5. Kontrol ve deney grubu farelerinin hipokampus ve kortikal ağlara bağlı öğrenme ve hafıza fonksiyonları açısından karşılaştırılması	40
4.1.2.6. Kontrol ve deney grubu farelerinin motor fonksiyon açısından karşılaştırılması	42
4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular	43
4.2.1. Hippokampal Bulgular	45
4.2.1.1. Dentat Girus – Nöron, Mikroglia ve Astrosit Bulguları	45
4.2.1.2. CA1 ve CA3 – Nöron, Mikroglia ve Astrosit Bulguları	53

4.2.2. Kortikal Bulgular	59
4.2.2.1. Primer Motor Korteks Nöron, Mikroglia ve Astrosit Bulguları	59
4.2.2.2. Somatosensöriyel Motor Korteks Nöron, Mikroglia ve Astrosit Bulguları	62
5. TARTIŞMA	65
KAYNAKLAR	69
ETİK KURUL KARARI	84
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	85
ÖZGEÇMİŞ	86



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: Yaş grubu ve dünya bölgesine göre yıllık demans vakalarının tahmini insidansı.....	8
---	---



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Metiyonin-homosistein siklusu ve artmış homosisteinin dokularda oluşturduğu yanıt.....	4
Şekil 2: 18 aylık dişi fare beyninin elektron mikroskopisi görüntüsü.....	6
Şekil 3: Normal hücrenin çeşitli stresörler altında senesanslaşması ve ortaya çıkan senesans ile alakalı yanıtlar.....	15
Şekil 4: Senesans hücrenin salgıladığı SASP'ın çeşitli patofizyolojik rolleri.....	16
Şekil 5: Hücresel senesans mekanizmasının fizyolojik/gelişimsel süreçlerdeki görevi.....	17
Şekil 6 : Hücresel senesans mekanizmasının patolojik süreçlerdeki rolü.....	19
Şekil 7 : AAT için kullandığımız davranış testi alanı.....	22
Şekil 8: ZYT için kullandığımız gereçler.....	22
Şekil 9: DKT için kullandığımız mekanizma.....	23
Şekil 10: NMT esnasında farenin nesneleri incelemesi.....	24
Şekil 11: NTT ve NMT'nin şematik açıklaması.....	25
Şekil 12: YALT için kullandığımız mekanizma.....	25
Şekil 13: Farelerin perfüzyonu sırasında kullandığımız aletler.....	26
Şekil 14: : Farelerin l-metiyonin yüklemesi boyunca su ve metiyonin alımlarının zamana göre değişimi.....	29
Şekil 15: Farelerin l-metiyonin yüklemesi boyunca ağırlıklarının zamana göre değişimi.....	30
Şekil 16 : AAT'de tımarlanma davranışı.....	32
Şekil 17 : Ayağa kalkıp etrafı keşfetme davranışı.....	32
Şekil 18-A. 4. ay anksiyete düzeyleri.....	32
Şekil 18-B. 9. ay anksiyete düzeyleri.....	33
Şekil 19: 4. ay depresyon düzeyleri.....	35

Şekil 20: Hipokampus Bağımlı Mekansal Hafıza Düzeyleri (NMT-40).....	37
Şekil 21: Hipokampus Bağımlı Mekansal Hafıza Düzeyleri (NMT-70).....	39
Şekil 22: Hipokampus ve Diğer Kortikal Ağlara Bağımlı Hafıza Düzeyleri (NTT).....	40
Şekil 23: Motor Fonksiyon Düzeyler.....	43
Şekil 24: Dişi Farelerin Dentat Girusunda GFAP ve SA β -Gal ekspresyonu.....	51
Şekil 25: Erkek Farelerin Dentat Girusunda GFAP ve SA β -Gal ekspresyonu..	52
Şekil 26: Dişi Farelerin Hipokampus CA3'ünde GFAP ve SA β -Gal ekspresyonu.....	57
Şekil 27: Erkek Farelerin Hipokampus CA3'ünde GFAP ve SA β -Gal ekspresyonu.....	58
Şekil 28: Erkek Farelerin Primer Motor Korteks VI. Katmanında NeuN ve SA β -Gal ekspresyonu.....	61
Şekil 29: Erkek Farelerin Somatosensöriyel Korteks V. Katmanında NeuN ve SA β -Gal ekspresyonu.....	64

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

‰: Yüzde

-: Negatif

+: Pozitif

⁰C: Santrigrad derece

µL: Mikrolitre

mL: Mililitre

L: Litre

mg: Miligram

g: Gram

kg: Kilogram

PFA: Paraformaldehit

PBS: Fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi

TNF-α : Tümör nekroz faktörü- alfa

BDNF: Beyin-türevli nörotrofik faktör

IGF: İnsülin benzeri büyüme faktörü

Aβ: Amiloid beta

PrPSc: Prion proteini scrapie izoformu

NMDA: N-metil d-aspartik asit

SASP: Senesans alakalı sekretuvar fenotip

SA β-Gal: Senesansla alakalı beta-galaktozidaz

AH: Alzheimer hastalığı

PH : Parkinson hastalığı

HH: Huntington hastalığı

MSS: Merkezi sinir sistemi

AAT: Açık Alan Testi

ZYT: Zorunlu Yüzme Testi

DKT: Denge Kirişı Testi

NTT: Nesne Tanıma Testi

NMT: Nesne-Mekan Testi

YALT: Yükseltilmiş Artı Labirent Testi

Y0LT: Yükseltilmiş 0 Labirent Testi

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

İHK: İmmünohistokimya

DG: Dentat Girus

CA: Cornu Ammonis

THF: Tetrahidrofolat

SAM: S-adenozil metiyonin

NeuN: Nöronal Nükleer Protein

GFAP: Glial Fibriler Asidik Protein

Iba1: İyonize Kalsiyum Bağlayıcı Adaptör Molekül 1

CI: Confidence Interval (Güven Aralığı)

χ^2 : ki-kare

ÖZET

Altun, Y.M. (2020). Nörodejeneratif Hastalıklarda Hücrel Senesans Mekanizmasının Rolü. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sinirbilim ABD. Doktora Tezi. İstanbul

Nörodejeneratif hastalıklar geri dönüşü olmayan nöronal ve glial kayıplarla seyreden merkezi ve periferik sinir sistemi yıkımıdır. Bu hastalıklar her ne kadar hücre yıkımı ortak paydasında birleşse de bu hastalıkların her biri farklı klinik bulgularla kendilerini göstermektedir. Nörodejeneratif hastalıkların en önemli özelliklerinden biri de klinik bulguların ortaya çıkmasından önce hücreleri etkileyen patolojik değişikliklerin dekatlar boyu sessiz bir şekilde ilerlemeleridir.

Hücrel senesans, bazen fizyolojik bazen de çeşitli stres etmenleri ve yaşlanmaya bağlı olarak ortaya çıkan ve hücrenin proliferatif yollara girmesini engelleyen bir hücre siklusu durdurma yanıtıdır. Hücrel senesans, çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerin sonucunu etkilediğinden, nörodejeneratif tablolar üzerindeki etkisi araştırılmaktadır.

Nörodejeneratif hastalıklarda sessizce giden hücrel modifikasyonları ve bu tabloya paralel giden kognitif, duygudurumsal ve motor değişiklikleri inceleyebilmek için çevresel stresör olarak verilen l-metiyoninin yol açtığı davranış bozukluklarının ve immünohistokimyasal değişimlerin incelenmesini amaçladık.

L-metiyonin alan farelerde almayanlara kıyasla hipokampus bağımlı mekansal hafıza bozukluğu, hipokampo-kortikal ağlara bağlı öğrenme ve hafıza bozukluğu ve motor bozukluklar gözlemledik. Bu bulguları immünohistokimyasal analizlerle incelediğimizde, hipokampus formasyonunda mekansal hafızayı oluşturmada ve afferent inputların işlenmesi ve ayrıştırılmasında rol oynayan dentat girusta ve CA3'te senesans astrosit yoğunlukları adına değişiklikler gözlemledik. Ayrıca, erkek farelerin davranış testlerinde gözlemlediğimiz motor bozukluk bulgularına paralel olarak, erkek farelerin somatosensöriyel ve primer motor korteks alanlarının sırasıyla V. ve VI. katmanlarında senesans nöronların yoğunluğu adına kontrollere kıyasla deney grubunda istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlemledik.

Çalışmamızın sonuçları beynin farklı alanlarının l-metiyonin yüklemesine olan seçici hassasiyetine dikkat çekmektedir. Bu nöroanatomik hassasiyet farelerin cinsiyetlerine göre farklılık göstermektedir. Hafıza ve motor fonksiyon bozukluklarına eşlik eden değişken senesans yanıtının da nörodejenerasyonla ilişkisi olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Nörodejenerasyon, Hücrel Senesans, Hiperhomosisteinemi, Alzheimer Hastalığı, Demans

Bu çalışmada bildirilen araştırmalar Ulusal Sağlık Enstitüleri (Amerika Birleşik Devletleri) tarafından desteklenmiştir. (Ulusal Nörolojik Bozukluklar ve İnme Enstitüsü – R01NS073758)

ABSTRACT

Altun, Y.M. (2020). The role of cellular senescence in neurodegenerative diseases. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Neuroscience. Doctorate Thesis. İstanbul.

Neurodegenerative diseases are central and peripheral nervous system catastrophes with irreversible neuronal and glial losses. Although these diseases share cell destruction as a common denominator, each of them manifests with different clinical findings. One of the important features of neurodegenerative diseases is the silent progression of the pathological changes affecting the cells for decades before the clinical findings appear.

Cellular senescence is a cell cycle arrest response that may occur due to physiological, various stress factors and/or aging and prevents the cell from entering proliferative pathways. Since cellular senescence affects the outcome of various physiological and pathological processes, its effect on neurodegeneration is under investigation.

We aimed to examine behavioral and immunohistochemical changes caused by l-methionine in order to examine insidious cellular modifications and cognitive, affective and motor function changes accompanying neurodegenerative diseases.

Compared to the controls, we observed hippocampus dependent spatial memory damage, hippocampocortical network dependent learning and memory impairment and motor dysfunctions. In immunohistochemical analysis, we observed changes in senescent astrocyte densities in the dentate gyrus and CA3 which play a role in creating spatial memory and processing/separation of afferent inputs. Parallel to motor dysfunctions observed in the behavior tests of male group; we observed statistically significant differences in senescent neuron densities in layers V. and VI. in the somatosensory and primary motor cortex, respectively.

Our results draw attention to the selective vulnerability of different brain areas to l-methionine. This neuroanatomical vulnerability may differ between sexes. Cellular senescence response accompanying memory and motor dysfunctions is also thought to be related to neurodegeneration.

Key Words: Neurodegeneration, Cellular Senescence, Hyperhomocysteinemia, Alzheimer Disease, Dementia

Research reported in the present work was supported by the National Institutes of Health (National Institute of Neurological Disorders and Stroke Grant RO1NS073758)

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nörodejeneratif hastalıklar geri dönüşü olmayan nöronal ve glial kayıplarla seyreden merkezi ve periferik sinir sistemi yıkımıdır. Nörodejeneratif hastalıkların her biri çok farklı klinik tablolarla kendini göstermektedir. Örneğin, Alzheimer hastalığı (AH) hafıza bozukluğu ve diğer kognitif bozukluklarla seyrederken, Parkinson hastalığı (PH) öncelikle motor bozukluklara yol açmaktadır. Süreç içerisinde kognitif bozukluklar da tabloya eklenebilmektedir (Kovacs 2017). Hastalık başlangıcı ve seyirleri genetik ve epigenetik farklılıklara ve çevresel stresörlere bağlı olarak değişmektedir. Genel anlamda nörodejeneratif hastalıkların prevalansı insanların ortalama yaşam beklentisinin uzamasıyla artmaktadır. Yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğu nörodejeneratif hastalıkları yaşlanmayla bağdaştırırsa da, sayıları giderek artan yeni araştırmalar, bu hastalıkların temelinde sinir sisteminin gelişimsel bozukluklarının yattığını da öne sürmektedir (Molero, Gokhan et al. 2009). Bu açıdan bakıldığında nörodejeneratif hastalıkların patolojisi hala tam olarak aydınlatılamamıştır.

Nörodejeneratif süreçlerde hastalığın hedefini oluşturan hücrelerin sitoskeletinde parçalanma, alt bölmelerinde sitoplazmik organellerin balonlaşması, yıkılması (mitokondrial balonlaşma, genişlemiş lizozomal vaküoller), nörodejeneratif hastalıklara özgü inklüzyon cisimciklerinin belirmesi, (TDP-43 proteini (Hardiman, Al-Chalabi et al. 2017) ve Lewy inklüzyon cisimcikleri vb.), sitoplazma ve nukleoplazmada işlenememiş artıkların çoğalması ve membranların bütünlüğünün bozulmasıyla seyreden çok çeşitli değişiklikler görülür (McMurray 2000). Buna paralel olarak hücre nöron ve glial bağlantılarında kesiklikler, nöronlar arası sinapslarda yıkılma ve hücreler arası matriks materyelinde de yine işlenememiş artıkların çoğaldığı görülür (amiloid, nörofibriler yumak) (DeTure and Dickson 2019). Bu sayılan hücre içi ve dışı değişiklikler süreç içerisinde hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır. Her ne kadar nöronlar merkezi sinir sisteminin yapı taşları olsalar da, astrositler ve oligodendrositlerde de dejeneratif değişiklikler görülmektedir (McMurray 2000). Ayrıca astrositler ve sinir sisteminde yer alan diğer bir hücre grubunu oluşturan mikroglialar, inflamatuvar yanıt oluşturarak nörodejenerasyonu hızlandırmaktadır (Gelders, Baekelandt et al. 2018).

Nörodejeneratif hastalıklar etkiledikleri bölgelere göre nöroanatomik farklılıklar göstermektedir (Braak, Del Tredici et al. 2000). Kolinerjik nöronların birincil hedef olduğu gösterilmiş AH'de bütün kolinerjik nöronlar etkilenmemektedir. Öncelikle Meynert'in bazal nukleusundaki büyük kolinerjik projeksiyon nöronları dejenerasyona uğramaktadır (Liu, Chang et al. 2015). Bazal nukleustaki bu kolinerjik nöronların fonksiyonlarının bozulmasıyla birlikte bu nöronların uzantılarıyla sinaps yapan kortikal ve hipokampal nöronların fonksiyonlarının değiştiği de gösterilmiştir (Whitehouse, Price et al. 1981). Hastalığın çok ileri safhalarında hücresel yıkım merkezi sinir sisteminin diğer alanlarına da yayılmaktadır. PH'de ise öncelikli hedef substantia nigradaki dopaminerjik nöronlardır. Benzeri bir şekilde Huntington hastalığında hücre dejenerasyonu ve ölümleri öncelikle striatumdaki dopaminerjik orta spinal nöronlarda izlenmektedir (Sapp, Schwarz et al. 1997). Spinocerebellar ataksiye ise öncelikli yıkım Purkinje hücrelerini etkiler (Pérez Ortiz and Orr 2018). İlginç bir şekilde bunca farklı nörodejeneratif hastalıkta neden bu özel bölgelerin ve hücre gruplarının hedef seçildiği henüz açıklanamamıştır (Mehler and Gokhan 2000, Mehler and Gokhan 2001).

Nörodejeneratif hastalıkların en önemli özelliklerinden biri de klinik bulguların ortaya çıkmasından önce hücreleri etkileyen patolojik değişikliklerin dekatlar boyu sessiz bir şekilde ilerlemeleridir. Kognitif ve diğer nörolojik fonksiyonların klinik tablonun ortaya çıktığı döneme kadar nasıl olup da korunabildiği henüz aydınlatılamamıştır. Bu konuda bir çok hipotez ortaya atılmış olsa da çevresel etmenlerin, klinik öncesi latent dönemin uzunluğunu belirlediği düşünülmektedir (A. Armstrong 2019). Bu yüzden klinik öncesi dönemde sinir sisteminde süregiden fizyopatolojik değişikliklerin tanısının konulmasını sağlayacak biyomarkerların ve psikometrik testlerin bulunması çok önem kazanmıştır. Böylece ön tanısı konacak hastaların çevresel zararlı etmenlerden kendilerini koruyabilmeleri ve hastalığın klinik tablosunun ortaya çıkmasının mümkün olduğunca geciktirilmesi hedeflenmektedir. Örneğin otozomal dominant bir hastalık olarak bilinen Huntington hastalığına (HH) yakalanacağı belirlenen kişilerin, hastalık tablosunun başlamasından 20-30 yıl öncesinde kontrol grubundakilere göre anlamlı derecede artmış konuşma bozuklukları (parafazi) sergilediği gösterilmiştir (Illes 1989).

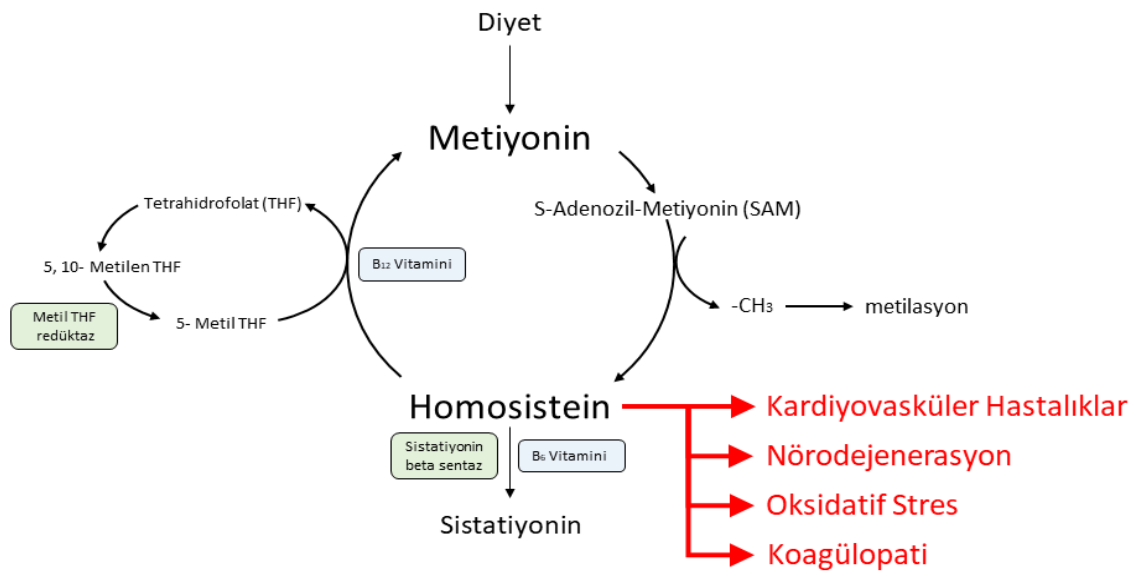
Nörodejeneratif hastalıkların etiyopatogenezleri genetik, epigenetik ve çevresel pek çok faktörün etkileşimiyle açıklanmaktadır. Yukarıda saydığımız klasik ailevi

nörodejeneratif hastalıkların yanı sıra beslenme (B12 eksikliği) (Briani, Dalla Torre et al. 2013), metabolizma bozukluklarına (hipotiroidizm, Wilson hastalığı, glikojen depo hastalıkları vb.) ve çeşitli çevresel toksinlerin (kurşun ve arsenik zehirlenmesi vb.) etkisine bağlı sinir sistemiyle sınırlı olmayan birçok dejeneratif hastalık daha tanımlanmıştır. Son olarak bu çok zengin klinik ve patolojik tabloya genetik ve çevresel faktörlerin nasıl etkili olduğu henüz tam olarak açıklanamamış multipl skleroz hastalığı da eklenmelidir.

Bu hastalıkların çoğu teşhis konulduğunda tedavi edilemeyecek kadar ileri bir klinik tabloya ulaşmış olmaktadır. Bununla birlikte B12 eksikliğinin neden olduğu subakut kombine dejenerasyon, yine hem B12 hem de erişkin hipotiroidizminin neden olduğu geçici demansiyel tabloların, bu besinsel ve endokrin eksikliğin telafi edilmesiyle tedavi edilebiliyor olması nörodejeneratif süreçlerin mutlak geri dönüşümsüz olmadığı umudunu vermektedir. Bu yüzden sayıları giderek artan temel bilim ve klinik araştırmalar ortalama insan ömrünün artmasıyla çağımızın en büyük hastalıkları haline gelen nörodejeneratif tabloların erken teşhisi ve tedavisine odaklanmıştır.

Yukarıda saydığımız çevresel faktörler dışında, B12 eksikliğine de neden olabilen hiperhomosisteineminin de nörodejenerasyona neden olabildiği gösterilmiştir (Tapia-Rojas, Lindsay et al. 2015). Bu tablo genetik mutasyon sonucu sistatyonin beta sentaz enziminin çalışmadığı durumlarda ortaya çıkabilmekle birlikte, homosistein siklusunun ön maddesi olan metiyonin amino asitinin aşırı yüklemesiyle de ortaya çıkabilmektedir (Şekil 1). Alınan metiyonini/homosisteini metabolize etmeye yetişemeyen metiyonin/homosistein siklusu vücutta yan ürün olarak homosistein artışına neden olmaktadır. Bu durum görece folik asit, B12 veya B6 vitamini eksikliği yaratıp çeşitli hematolojik (Durand, Prost et al. 2001), nörodejeneratif tablolara (Tapia-Rojas, Lindsay et al. 2015) ve hatta inmelere (Spence 2016) yol açmaktadır (Yoshitomi, Nakayama et al. 2020). Hiperhomosisteinemi ayrıca damar cidarında endotelial hücrelerin membran bütünlüğünü bozup, yaygın oksidatif stresle (Schöneich 2005) birçok homeostatik mekanizmanın bozulmasına neden olmaktadır (Li, Huang et al. 2016). Biz bu çalışmamızda öncelikle homosistein metabolizmasının dengesinin bozulmasıyla ortaya çıktığı gösterilen nörodejeneratif tabloyu hazırlayan (Tapia-Rojas, Lindsay et al. 2015) ve sonucunda nöroanatomi alanları ve buralardaki hücre tiplerini

selektif olarak etkileyebilecek hücre yıkılım sürecini incelemek istedik. Özellikle bu değişikliklerin, nörodejeneratif süreçlerin başlamasında rolü olabileceği yakın zaman önce öne sürülmüş senesans savunma mekanizmasıyla olan ilgisini araştırdık. Bu özel moleküler savunma yolağı öncelikle hücrenin kanserleşmeye karşı geliştirdiği bir direnç mekanizması olarak tanımlanmıştır (Lee and Lee 2019). İmmünohistokimyasal çalışmalarda, senesans mekanizmasına giren hücreler özel senesansla alakalı beta-galaktozidaz (SA β -Gal) boyamasıyla belirlenmiştir. Bu hücrelerde SA β -Gal boyası, kanserleşmeyi tetikleyen çevresel strese bağlı olarak aktive olan lizozomlarda β -galaktozidaz enziminin arttığını göstermektedir (Debacq-Chainiaux, Erusalimsky et al. 2009). Ancak bu artış sonucunda tetiklenen kanser, hücre ölümü ve nörodejeneratif süreçleri başlatan moleküler yollardaki değişikliklerin incelenmesi hala devam etmektedir. Özellikle senesansın hedef hücrede nörodejenerasyonu başlatan mı, yoksa ona karşı oluşan moleküler bir savunma mekanizması mı olduğu bilinmemektedir. Bu amaçla çalışmamızda, daha önce nörodejenerasyona neden olduğu gösterilmiş (Tapia-Rojas, Lindsay et al. 2015) çevresel bir faktörü (organ yetmezliği dozu altı l-metiyonin yüklemesi) kullanarak akut dönemde farelerde gelişebilecek bilişsel, duygudurum, motor ve denge bozukluklarını ve bu sürecin altında yatabilecek hücresel değişiklikleri çeşitli davranış testleri ve immünohistokimyasal yöntemlerle analiz ettik.



Şekil 1: Metiyonin-homosistein siklusunu ve artmış homosisteinin dokularda oluşturduğu yanıt (<https://www.inner-alchemy.com.au/inner-alchemy-blog/2017/10/22/mthfr-10-tips-to-supporting-mthfr> web sitesinden modifiye edilmiştir.)

2. GENEL BİLGİLER

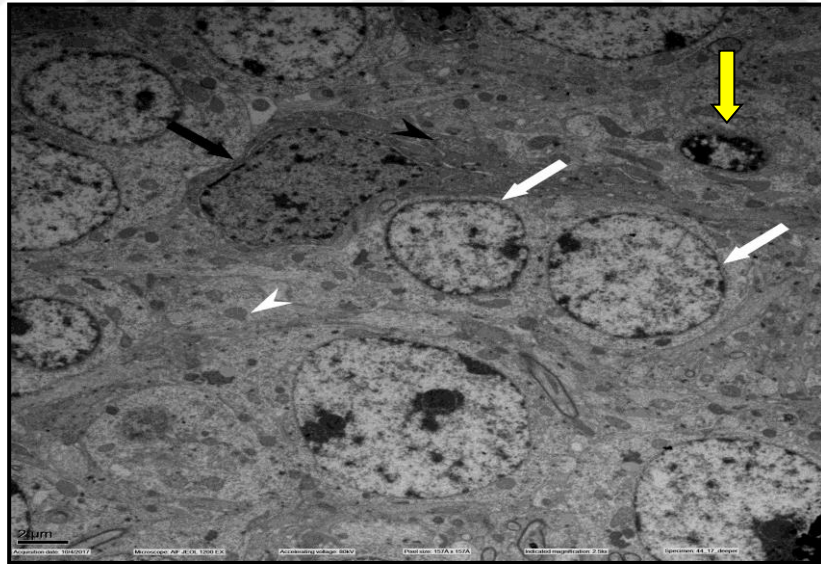
2.1. Nörodejenerasyon

Merkezi Sinir Sistemini (MSS) oluşturan iki temel hücre grubu bulunmaktadır: nöronlar ve glialar. Glialar sayıca üstün olup MSS homeostazında görev alırlar. Aksiyon potansiyeli (bilgi) iletimi ise nöronlar tarafından sağlanmaktadır. MSS homeostazının çeşitli sebeplerle bozulması sonucunda nöronal inflamasyon ve nörodejenerasyon başlamaktadır (Guerreiro, Privat et al. 2020). Her ne kadar kelime anlamı olarak nöronal bozulmayı işaret ediyor olsa da aslında nörodejenerasyon çok geniş çeşitli klinik ve patolojik tablolarla giden sebebi tam anlamıyla çözülmemiş ve progresif seyirli nörolojik hastalıkları kapsamaktadır. Ancak sinir sistemindeki homeostazı bozup nöronal kayıplarla seyredabilen neoplazm, MSS travması, hemoraji vb. durumlar ise nörodejenerasyon olarak sayılmamaktadır. Kısaca nörodejenerasyon sinir sisteminin ilerleyici bir biçimde geri dönüşü olmadan yıkımı olarak tanımlanmıştır (Kovacs 2017).

Son yıllardaki çalışmalar, nörodejenerasyonu yalnızca nöronlara odaklanarak açıklamak yerine, nöron kayıplarına sebep olabilen glia hücrelerini etkileyerek tedrici işlev yitirimi ve yıkılma ile ilerleyen patolojik süreçlere de dikkat çekmişlerdir. Böylelikle nörodejenerasyonun sadece nöron odaklı bir süreç olmadığı ve hem nöroektodermal hem de MSS’de yer alan diğer mezenkimal kaynaklı hücreleri içeren multiselüler bir patoloji olduğu düşünülmeye başlanmıştır (Katsnelson, De Strooper et al. 2016). Örneğin, yakın zamandaki araştırmalar beyinde mikroglialar tarafından eksprese edilen *TREM2* geni mutasyonunun, Alzheimer hastalığına yakalanma riskini iki ile dört kat arasında artırdığını göstermiştir (Guerreiro, Wojtas et al. 2013, Jonsson, Stefansson et al. 2013). Başka bir örnekte ise spinal motor nöronların ölümüyle giden amiyotrofik lateral skleroz hastalığına neden olan SOD1 mutasyonunu taşıyan bireylerden elde edilen astrositlerin bir toksik faktör salınımıyla bu motor nöronların ölümüne yol açtığı gösterilmiştir (Re, Le Verche et al. 2014). Bu örnekler nöron olmayan hücrelerin de nörodejenerasyona katıldığına işaret etmekle kalmayıp ayrıca yeni terapi ve biyomarkerların bulunması için de bu hücrelere yoğunlaşmanın önemini göstermektedir (De Strooper and Karran 2016).

Nörodejenerasyona bir farklı bakış açısı ise nöroinflamasyonun bu patofizyolojide önemine değinmektedir (Ransohoff 2016). Örneğin mikroglialar Aß

(amiloid beta) , PrPSc (prion proteini), agregre α -synuclein, ya da mSOD1 gibi ligandlarla etkileşime girdiğinde birçok inflamatuvar yolağı aktive etmektedir (Lee, Woo et al. 2010, Lee, Suk et al. 2010, Hickman, Izzy et al. 2018). Mikroglialar TNF- α ve azalmış BDNF (brain derived neurotrophic factor) ve IGF (insulin-like growth factor) salınımı ile nöronlar üzerinde indirekt bir stres oluşturmakta olup ayrıca matriks metalloproteaz salınımını arttırarak bu nöronların ölümüne neden olabilmektedir (Bathina and Das 2015, Numakawa, Odaka et al. 2018). Ayrıca iNOS ekspresyonunu arttırarak nöronların mitokondrilerindeki sitokrom oksidaz enzimini inhibe etmektedir (Culmsee, Michels et al. 2019). Glialar NADPH oksidaz enziminin fazla çalışmasıyla da mikroçevrelerinde oksidan maddeleri arttırmaktadır (Simonian and Coyle 1996). Böylece oluşan oksidatif stres, hücre membranındaki lipit yapısına zarar vererek membran akışkanlığını ve membran depolarizasyonu bozmakta ve nöronları nekroza sürüklemektedir (Brown and Vilalta 2015, Hickman, Izzy et al. 2018) (Şekil 2). Böylece nörodejeneratif süreç domino etkisi altında hedef nöronlardan diğer bölgelere doğru yayılmaya başlamakta, klinikte görülen hastalığa özgü tipik bulguların yerini karmaşık bilişsel ve fiziksel düşkünlükle karakterize vejetatif bir tabloya bırakmaktadır.



Şekil 2: 18 aylık dişi fare beyninin elektron mikroskopisi görüntüsü. Hipokampusun CA3 bölgesinde yer alan sağlıklı nöronlar (beyaz ok) ve mitokondrileri (beyaz ok başı), çevresinde yer alan sağlıklı bir oligodendrosit (sarı ok), nükleer membran bütünlüğü bozulmaya başlamış, mitokondrileri genişlemiş (siyah ok başı) ve nükleer membranı blebbinge uğramış ölmekte olan bir nöronun (siyah ok) elektron mikroskopisi ile gösterimi. (Şu anda devam eden ultrastrüktürel analiz çalışmamızdan bir örnek)

2.1.1. Nörodejeneratif Hastalıklar

Nörodejeneratif hastalıklar dünya çapında, özellikle yaşam beklentisinin artması ile giderek artmakta olan bir mortalite ve morbidite nedenidir. Değişik nörodejeneratif hastalıkların klinik bulguları ve altta yatan patofizyolojik süreçleri farklılıklar gösterse de, çoğu zaman ortak özellikleri de mevcuttur. Tanı konmadan önce bu benzerlik ve farklılıkların dikkatli bir şekilde irdelenmesi, prognozu belirlemek ve mümkünse spesifik tedaviye rehberlik etmesi açısından kritik bir öneme sahiptir (Erkkinen, Kim et al. 2018).

Nörodejeneratif hastalıklar her ne kadar nöronal yıkım ortak paydasında birleşseler de altta yatan süreçler birbirlerinden farklı seyir göstermektedir. Belirli bir bölgedeki nöronların ölümüyle seyreden toksik ve metabolik hastalıkların aksine nörodejeneratif hastalıklar genetik ve epigenetik duyarlılıkları açısından hücrel yıkımda öncelikli hedef haline gelen nöron popülasyonlarının ilerleyici kaybıyla ve bu dejenerasyondan direkt etkilenen özel nöroanatomik alanlara özgü bilişsel ve duygudurum bozukluklarıyla devam etmektedir. Örneğin AH öncelikle hafıza bozukluğu ve diğer kognitif bozukluklarla seyrederken; PH'de motor bozukluklar klinik tablonun en belirgin bulgusu olup demansiyel tablonun ortaya çıkmasından çok daha önce görülmektedir (Dugger and Dickson 2017).

Tüm nörodejeneratif hastalıkların epidemiyolojileri, patofizyolojileri, klinik bulguları ve tedavileri bu çalışmanın kapsamı dışında olduğundan, tartışmamızı insidansı en yüksek olup neredeyse günlük hayatta demans ile eş anlamlı olarak kullanılmaya başlanmış AH ile ekstrapiramidal ve otonomik sinir sistemi bulgularının önde gittiği PH üzerine yoğunlaşmak istedik. Klinik açıdan çok değişik nörolojik bulgularla seyreden bu iki patolojide ailevi tablolar bilinmekle birlikte, genetik ve epigenetik özellikleri çok karmaşık olan bir epidemiyoloji ile karşılaşmaktayız. Her iki hastalıkta da ailevi olmayan klinik tablolar bütün hastalık görülme insidansının %90'ını oluşturmaktadır. Bu yüzden tartışmamıza son olarak, görülme insidansı diğerlerine göre çok az, ancak otozomal dominant kalıtımı olan ve çok zengin klinik bulgularla seyreden Huntington hastalığını (HH) ekledik.

2.1.1.1. Alzheimer Hastalığı

Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2015'te yayınladığı son raporuna göre, demansiyel hastalıklar dünya çapında bir epidemiye neden olmuş durumdadır. Her ne

kadar demansiyel hastalıkların büyük çoğunluğu (%63) gelişmiş ülkelerde görülse de giderek standardize olan tıbbi raporların paylaşılmasıyla birlikte uzak doğu ve Sahra altı Afrika ülkelerinde de bu klinik tablonun insidansının hızla arttığını görmekteyiz. 2015'te yapılan hesaplamalara göre dünya genelinde yaklaşık olarak 48 milyonun üzerinde insan demans ile yaşamaktadır. Bu sayının 2030'da 76 milyona, 2050'de ise 136 milyona çıkması beklenmektedir. Bu hastaların bakımı bütün dünyadaki sağlık kurumları ve aileler için altından kalkılması çok güç bir problem haline gelmiştir.

Bu büyük sağlık problemine neden olan hastalıkların başında AH gelmektedir. Daha önce de belirttiğimiz gibi halk arasında neredeyse demansla aynı anlamda kullanılan bu hastalığın çok geniş spektrumlu bir klinik tablosu vardır. Ailevi tablolar bütün AH görülme sıklığının çok az bir kısmını oluşturmaktadır (Cacace, Slegers et al. 2016). Bu ailevi AH'de hastalığın başlangıç yaşı sporadik olanlara kıyasla çok daha erkendir. *PSEN-1* ve *PSEN-2* genleri ile *APP* geninde oluşan çeşitli mutasyonlarla kalıtım gerçekleşmektedir (Sherrington, Rogaev et al. 1995). Ayrıca ApoE allellerinin katılımı hem ailevi hem de sporadik tablolarda hastalık görülme yaşını ve şiddetini belirlediği için AH'nin tanı ve tedavisi açısından önemli bir yer kaplamaktadır .

Bölge	Yaş grupları (yıl)							Toplam
	60-64	65-69	70-74	75-79	80-84	85-89	90+	
Asya	0,39	0,48	0,62	0,72	0,66	0,44	0,26	3,56
Avrupa	0,13	0,18	0,32	0,43	0,54	0,44	0,29	2,34
Amerikalar	0,10	0,13	0,17	0,21	0,25	0,23	0,17	1,25
Afrika	0,07	0,09	0,10	0,11	0,09	0,04	0,02	0,53
Dünya Geneli	0,69	0,88	1,22	1,46	1,54	1,15	0,74	7,68

Tablo1: Yaş grubu ve dünya bölgesine göre yıllık demans vakalarının tahmini insidansı (100.000'de 1 olacak şekilde) (*DSÖ'nün websitesinden alınarak türkçeleştirilmiştir. www.who.int/mental_health/neurology/dementia/en/*)

Demansiyel tabloların AH'den sonra en önemli ikinci sorumlusu bir PH varyantı olan Lewy cisimciği hastalığı (LH), üçüncüsü ise vasküler demanslardır. Her ne kadar demans progresif hafıza kaybı ile eş anlamlı kullanılıyor olsa da, erken tanı konulup izlenebildiğinde bu hastalıkların klinik bulguları çok zengin ve farklıdır. AH başlangıçta genellikle yürütücü bilişsel fonksiyonların yıkımı ve mekansal hafızada bozukluklar ve parafazilerle seyrederken (Zhu, Yan et al. 2017), LH vizüel halüsinasyonlar, ajitasyon ve paranoid delüzyonlarla karakterize bir klinik tablo ile başlar (Gomperts 2016). Vasküler demanslar ise intrakranyal küçük, orta ya da ekstrakranyal büyük çaplı damarlarda gelişen aterosklerotik değişimlerle oluşur (O'Brien and Thomas 2015). Bu aterosklerozun şiddetine göre farklı nöroanatomik bölgeler etkilenebilmektedir. Klinikte vasküler demansı tek başına görmek zordur. Büyük oranda AH, LH ve diğer nörodejeneratif bozukluklara eklenip klinik tabloyu muğlaklaştırmakta, hayat kalitesini hızla düşürüp prognozu kötüleştirmektedir. Bu yüzden DSÖ'nün 2015'te yayınladığı AH raporu, genel anlamda sağlık koşullarının, özellikle de kardiyovasküler hastalıkların tedavisi ile genel anlamda dünyada demans insidansını azaltabileceğimizi vurgulamaktadır.

Bu koruyucu hekimlik çalışmalarının yanı sıra son 30 yıldır, AH etiyojisi ve tedavisi ile ilgili pek çok araştırma yapılmıştır. Nörodejeneratif yıkımın hedefi Meynert'in bazal nukleusundaki büyük somalı kolinerjik projeksiyon nöronlarıdır (Liu, Chang et al. 2015). Bu yıkıma bağlı olarak bahsi geçen nöronların kortikal ve sub-kortikal alanlara sağladığı kolinerjik tonusun azalmasının, hastaların dikkat odaklamada, yönetsel çözümleme ve karar vermede ve yeni bilgileri hafızaya geçirebilmekte zorlanmalarına sebep olduğu düşünülmektedir. Bu tablonun tedavisinde günümüzde asetilkolinin yarı ömrünü uzatmak adına kolinesteraz inhibitörleri kullanılmaktadır. Ayrıca, kolinerjik innervasyonunu görece kaybedip kortikal eksitatuvar nöronların sürekli uyarıcı etkisiyle yıkımı hızlanan hipokampal granüler hücreleri koruyabilmek için de NMDA reseptör antagonisti olan memantine de tedavide kullanılmaktadır (Lu and Nasrallah 2018). Malesef kontrollü çalışmalarda ümit vadeden bu ilaçlar, AH kliniğinde büyük bir değişiklik sağlamamıştır.

2.1.1.2. Parkinson Hastalığı

Parkinson hastalığı (PH), AH'den sonra en sık görülen ikinci nörodejeneratif hastalıktır. PH prevalansının genel popülasyonda %0.3, 60 yaş ve üzerindekilerde

yaklaşık %1 ve 80 yaş ve üzeri insanlarda ise %3 olduğu tahmin edilmektedir. PH insidansı 100.000 kişide 8-18'dir (Tanner and Goldman 1996, Nussbaum and Ellis 2003, de Lau and Breteler 2006). 2010 yılında Fransa popülasyonunda yapılan bir araştırmaya göre erkeklerde kadınlara kıyasla insidans ve prevalans 1.5 kat daha fazladır (Moisan, Kab et al. 2016). Medyan başlangıç yaşı 60 olup PH tanısından ölüme kadar olan ortalama sağ kalım süresi 15 yıldır (Lees, Hardy et al. 2009). Ayrıca hem sporadik hem de ailesel olguların birinci derece akrabalarında PH varlığı PH'ye yakalanma riskini artırmaktadır (Marder, Tang et al. 1996).

PH substantia nigra pars kompaktada hücre kayıpları ve spesifik beyin sapı, spinal kort ve korteks bölgelerinde artmış α -synuclein birikimi ile karakterize bir nörodejeneratif hastalıktır (Dickson 2012). Her ne kadar temel risk faktörü şu an için yaş olsa da, bazı genlerin de (*LRRK-2*, *GBA*) bu hastalığın gelişmesinde rol aldığı düşünülmektedir (Lees, Hardy et al. 2009).

Hem motor hem de motor olmayan semptomlarla karakterize PH'de, hastalar klasik olarak istirahat tremoru, rijidite, bradikinezi ve hafif kambur duruşa sahiptirler. Ayrıca bu motor bozuklukların yanı sıra duygudurum değişiklikleri (depresyon, anksiyete) ve kognitif bozukluklar (demans) da klinik tabloda ilerleyen zamanlarda kendini göstermektedir (Beitz 2014).

Günümüzde PH'nin kesin tedavisi bulunmamakla birlikte levodopa motor fonksiyonların devamlılığı için kullanılan en etkili ilaçtır. Ancak ilaç seçeneklerinin sınırlılığı ve mevcut medikal tedavilerin yan etkileri PH hastalarının tıbbi yönetimini zorlaştırmaktadır. Tek taraflı pallidotomi ve derin beyin stimülasyonu dahil olmak üzere farklı cerrahi yaklaşım türleri bulunmuş ve uygulanıyor olsa da, PH'nin kesin tedavisi oldukları söylenemez (Radhakrishnan and Goyal 2018).

2.1.1.3. Huntington Hastalığı

Huntington hastalığı (HH), artmış CAG trinükleotid tekrarı mutasyonunun neden olduğu, karakteristik motor bulguları ve spesifik beyin patolojisi olan otozomal dominant nörodejeneratif bir hastalıktır. 36 veya daha fazla CAG trinükleotid tekrarı hastalığa neden olmakta ve daha da artan tekrarlar hastalığın penetransını arttırmakta ve başlangıç yaşını küçültmektedir (Kay, Hayden et al. 2017). Bu CAG tekrarının sayısının popülasyon içerisinde değişkenlik göstermesi HH'nin kesin epidemiyolojisini tanımlamayı zorlaştırmaktadır. 2017 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde Medicare

sigortasıyla sağlık kurumuna başvuran popülasyon içinde yapılan bir çalışmada HH insidansının 100.000 kişide 6,1 (kadınlar: 5,9 ve erkekler: 6,4) ve HH prevalansının 100.000 kişide 13,1 (kadınlar: 12,6 ve erkekler: 13,7) olduğunu göstermiştir (Exuzides, Crowell et al. 2020).

Hücresele düzeyde mutant huntingtin geni, transkripsiyonun ve mitokondriyal fonksiyonların bozulması ve mutant proteinin doğrudan toksisitesi gibi bir dizi mekanizma yoluyla nöron disfonksiyonuna ve ölümüne sebep olmaktadır. Hastalığın erken dönemlerinde striatuma makroskopik değişiklikler izlenirken hastalık ilerledikçe korteksin tutulumu da görülür (McColgan and Tabrizi 2018).

Şu anda HH'nin kesin tedavisi yoktur. Bu nedenle destekleyici ve semptomatik tedavi, tedavinin temelini oluşturur.

2.1.2. Nörodejenerasyon Risk Faktörleri

Nörodejeneratif hastalıkların yukarıda bahsettiğimiz kompleks yapıları ve henüz aydınlatılamamış patofizyolojileri araştırmacıları olası risk faktörlerini araştırmaya yönlendirmiştir. Her nörodejeneratif hastalık kendi içerisinde farklı risk faktörlerine sahipken, ortak paydaları ilerleyen yaştır. Tıbbın gelişmesiyle birlikte insan ömrünün uzaması yaşlanmanın ne kadar önemli bir dejenerasyon etmeni olduğunu göstermektedir. Aşağıda risk faktörlerini genetik ve çevresel olarak ikiye ayırarak irdledik.

2.1.2.1. Genetik ve Epigenetik Faktörler

Nörodejenerasyonun oluşumunda rol alan kalıtsal faktörlerin araştırılması, ileride hastalığa yakalanma ihtimali artmış bireyleri bilgilendirme ve çevresel riskler konusunda önlem alınması ve hastalığın geciktirilmesi adına önemlidir. Nörodejeneratif hastalıklara yalnızca genetik ya da yalnızca çevresel faktörlerin varlığından ziyade bunların kombinasyonunun sebep olduğunu bilmekteyiz. AH etiyopatogenezinde en önemli gen mutasyonunun 19q13 kromozomunda yer alan *APOE* geninde olduğu uzun yıllardır bilinmektedir (Corder, Saunders et al. 1993, Spinney 2014). *APOE* geninin $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$ izoformlarının üretilmesine yol açan üç aleli vardır. Bu genin MSS'deki temel rolü ise ApoE reseptörleri aracılığıyla nöronlara kolesterol transportu sağlamaktır (Bu 2009). ApoE4/E3 veya ApoE4 homozigotluğu, sırasıyla üç kattan sekiz-on iki katına kadar AH gelişme riskini arttırdığından dolayı bu alleller önemli bir risk faktörünü

oluşturur. AH vakalarının yaklaşık %40'ında ApoE4 tanımlanmıştır (Farrer, Cupples et al. 1997).

APOE dışında, daha önce bahsettiğimiz *TREM2* geninin de AH patolojisinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Guerreiro, Wojtas et al. 2013). *TREM2*, MSS bağışıklık yanıtını azaltmada önemli olan, mikroglia üzerinde bulunan bir reseptördür (Rohn 2013). AH riskini ve şiddetini arttıran nöroinflamasyon ve amiloid temizlenmesindeki bozukluklar *TREM2*'deki mutasyonlardan da kaynaklanıyor olabilir (Hickman, Faustin et al. 2016). Bu iki gen mutasyonu dışında *APP* (amiloid prekürsör proteini) , *PSEN-1* (presenilin 1) ve *PSEN-2* (presenilin 2) mutasyonlarının da AH'de rol aldığı gösterilmiştir (Blennow, de Leon et al. 2006). Ayrıca AH etiopatogenezinde, daha birçok kalıtsal (diabetes mellitus (Leibson, Rocca et al. 1997, Ott, Stolk et al. 1999), kardiyovasküler bozukluklar (Breteler, Claus et al. 1994, Kuller, Shemanski et al. 1998, Reitz, Brayne et al. 2011) vs.) ve kromozomal hastalıkların (Down sendromu (Hartley, Blumenthal et al. 2015)) da rol aldığı araştırmalarla gösterilmiştir.

PH üzerine son yıllarda genetik açıdan çok fazla ilerleme kaydedilmesine rağmen, günümüzde hala kesin sebep diye gösterilebilecek bir genetik mutasyondan bahsedilememektedir (Billingsley, Bandres-Ciga et al. 2018). Daha önce bahsettiğimiz gibi şu anda bilinen gen mutasyonları *SNCA*, *LRRK2*, *GBA*, *MAPT* 'dir.

Bunca farklı genetik mutasyonun varlığının hastalık patogenezinin tamamen açıklayamaması araştırmacıları bu mutasyonlarla birlikte gidebilecek ve bu mutasyonların etkilerini potansiyelize edebilecek çevresel faktörleri derinlemesine araştırmaya yöneltmiştir.

2.1.2.2. Çevresel Faktörler

Nörodejeneratif hastalıkların araştırılmasında, kalıtsal risk faktörlerinin aksine değiştirilebilir/önlenebilir olduklarından çevresel risk faktörlerinin tanımlanması büyük önem taşımaktadır. Günümüze kadar, nörodejeneratif hastalıklar adına sayısız çevresel risk faktörü analizi yapılmıştır. Örneğin Tayvan'da yapılan bir çalışmaya göre hava kirliliğinin (artan NO₂ ve CO düzeyleri) demans üzerinde bir etkisi olduğu gösterilmiştir (Chang, Chang et al. 2014). Yine Tayvan'da yapılan başka bir çalışma uzun süreli ozon maruziyetinin AH riskini arttırdığını göstermiştir (Jung, Lin et al. 2015). Başka bir çalışma ise çevresel tütün dumanının şiddetli demans ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Chen, Wilson et al. 2013). Ayrıca çeşitli metallerin (alüminyum, kobalt, bakır, demir,

manganez vb.) de AH'nin patogenezinde rol aldığını inceleyen birçok çalışma olmasına rağmen birbiriyle zıt sonuçlar veren araştırmalar sonucunda henüz herhangi bir fikir birliğine varılamamıştır (Killin, Starr et al. 2016). AH'nin barsak mikrobiyal disbiyozu ile ilişkili olduğu üzerine de çalışmalar vardır (Bulgart, Neczypor et al. 2020). Ayrıca, doğurulan çocuk sayısı ile AH'nin arasında bir ilişkinin varlığı da gösterilmiştir (Beerli, Rapp et al. 2009). Hafif travmatik beyin hasarı'nın ise PH ile ilişkisi yakın zamanda yapılan bir çalışmayla ortaya konmuştur (Gardner, Byers et al. 2018).

Bunca farklı çevresel risk faktörünün varlığı, MSS'nin bu risklere karşı olan hassasiyetinin anlaşılmasının ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Ayrıca, nasıl olup da bazı nörodejeneratif hastalıkların MSS'nin yanı sıra periferik (ALSP-adult-onset lökoensefalopati) ve otonomik sinir sistemini de (PH) etkiliyor olabildiğinin açıklanması gerekmektedir.

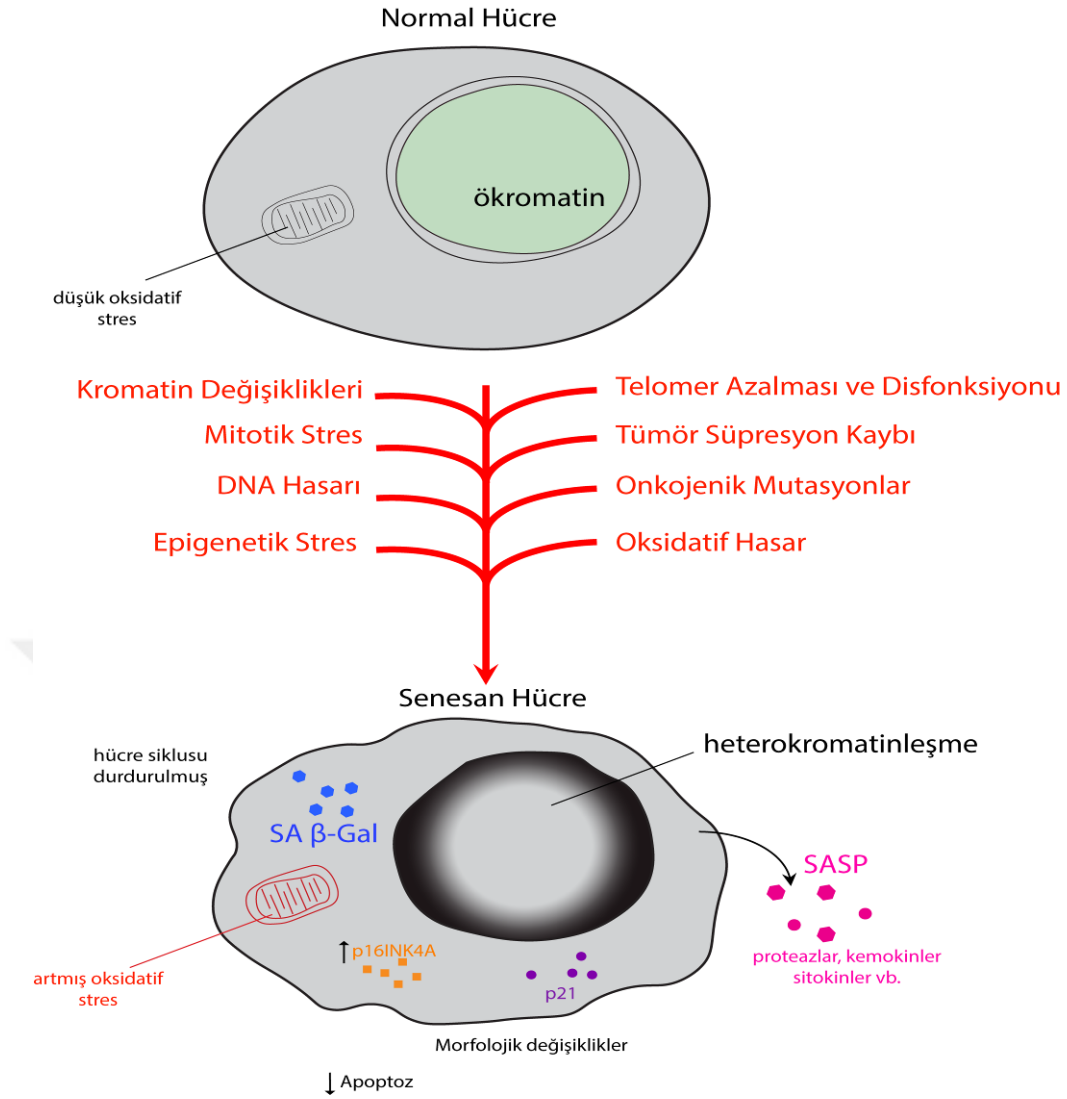
Bu yüzden çalışmamıza başlarken amacımızı nörodejeneratif hastalıklarda özel tedaviyi araştırmaktan ziyade, hastalık tiplerinden bağımsız olarak nörodejenerasyonu başlatan en önemli patoloji olan DNA hasarı ile aktive olan ilk hücresel yanıtlardan biri olan hücresel senesans mekanizmasını açıklamak olarak belirledik. Eğer bu hücresel süreç tanımlanabilir, doğal yaşlanmadaki yeri kesin olarak açıklanabilir, ne zaman sağlıklı ne zaman patolojik yolları etkinleştirdiği gösterilebilirse, nörodejeneratif hastalıkların tanısından bağımsız olarak hastalığın ortaya çıkışını geciktirip, şiddetinin azalmasını sağlayabilecek bir değişken olarak kullanılabilir diye düşündük.

2.2. Hücresel Senesans

Hücresel senesans, çeşitli stres etmenleri ve yaşlanmaya bağlı olarak ortaya çıkan ve hücrenin proliferatif yollara girmesini engelleyen bir hücre siklusu durdurma yanıtıdır (Childs, Durik et al. 2015). Öncelikle böyle bir çoğalma ve büyüme arrestiyle, yaşlanmış ve hasarlı hücrelerin artmasını sınırlar (Ogrodnik, Salmonowicz et al. 2019). Hücre siklusundan çıkmanın yanı sıra, yaşlanan hücreler, kromatin yeniden düzenlemesinden otofaji modülasyonuna kadar birçok farklı fenotipik değişikliğe de uğrarlar (Baker and Petersen 2018). Buna ek olarak, senesans hücreler, senesansla alakalı sekretuar fenotip (SASP) olarak adlandırılan bir sürece girip, birçok metabolik ve moleküler yolağı aktive edip karmaşık kimyasal faktör kombinasyonunu etraflarına salgılamaya başlarlar. Böylece hem kendi hem de civarlarındaki hücrelerin davranışlarını yeniden programlayabilirler (Rhinn, Ritschka et al. 2019).

Uzun yıllar boyunca hücrel senesans mekanizmasının yalnızca yaşlanma ile ilgili olduğu düşünülmüştür. Şüphesiz ki, senesans mekanizması yaşa bağlı olarak oluşan çeşitli stresörlerin (mitotik stres, DNA hasarı, telomer azalması, onkojenik mutasyonlar, oksidatif hasar vs.) ardından oluşabilecek neoplastik değişiklikleri önlemek adına kullanılan güçlü bir anti-kanser mekanizmasıdır (Collado and Serrano 2010). Ancak günümüzde biliyoruz ki, senesans mekanizması yalnızca yaşlanma ya da anti-kanserle alakalı bir süreç değildir: yara iyileşmesinden (Demaria, Ohtani et al. 2014) skar dokusunda oluşabilecek aşırı fibrotik yanıtın engellenmesine (Jun and Lau 2010) ve hatta embriyonik gelişim sırasında apoptoza benzer şekilde el ayak parmaklarında doku şekillenmesine (Lorda-Diez, Garcia-Riart et al. 2015) kadar birçok yolakta rolü bulunmaktadır (Muñoz-Espín and Serrano 2014).

Hücrel senesans, kanser ve yaşa bağlı hastalıklar da dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerin sonucunu etkilediğinden, prosenesan ve antisenesan tedaviler aktif olarak araştırılmaktadır (Herranz and Gil 2018).

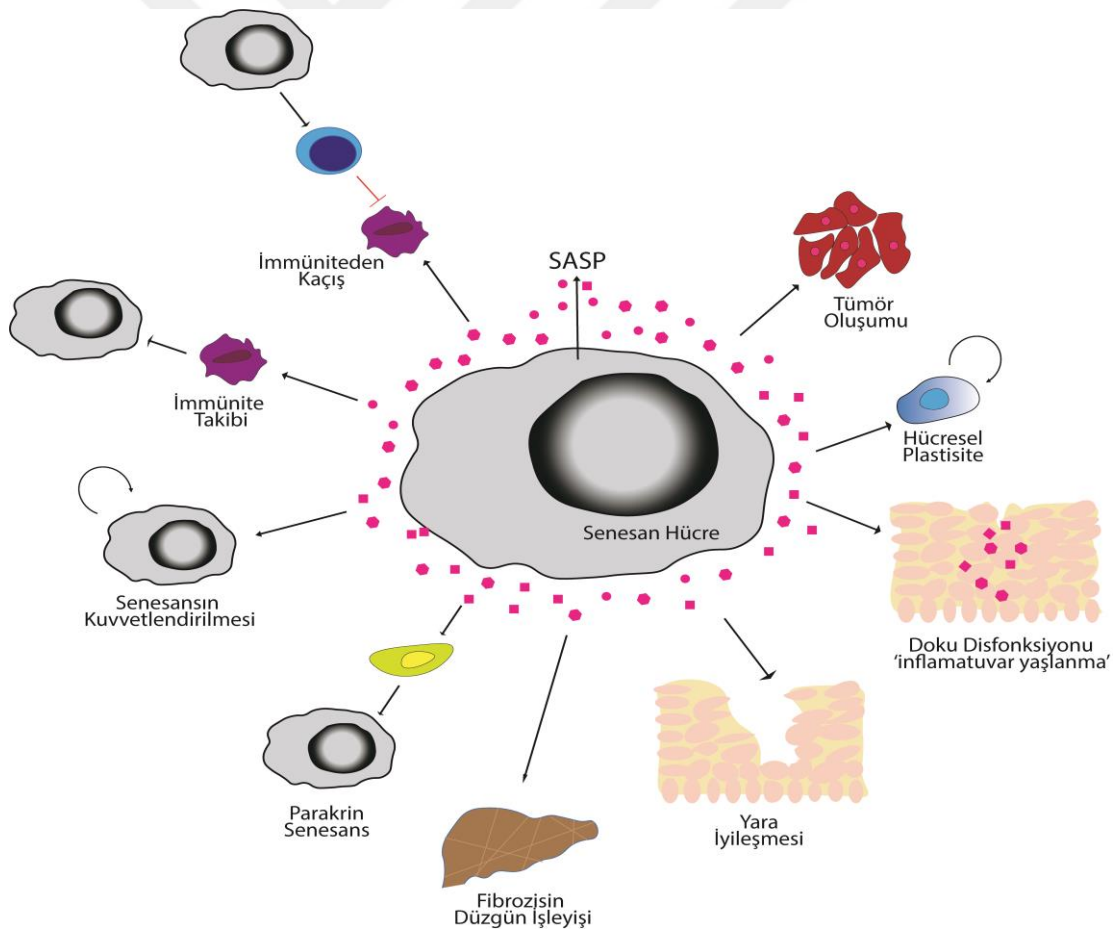


Şekil 3: Normal hücrenin çeşitli stresörler altında senesanslaşması ve ortaya çıkan senesans ile alakalı yanıtlar (*Baker'ın 'Cellular senescence in brain aging and neurodegenerative diseases: evidence and perspectives' isimli makalesinden modifiye edilmiştir.*)

2.2.1. Senesans Altıpları

Daha önce bahsettiğimiz gibi son yapılan çalışmalar hücrel senesans mekanizmasının yalnızca kanserleşmeyi önlemekte rol almadığını, yanı sıra embriyonik gelişim sırasında ve erişkin yaşamda organların doku bütünlüğünün korunmasında çeşitli yararlı etkilerinin de var olduğunu göstermiştir (Muñoz-Espín, Cañamero et al. 2013). Örneğin, aşağıda daha detaylı açıklayacağımız gibi senesans embriyogenez sırasında öncelikle artık hücrelerin ayıklanmasından sorumludur. Erişkin yaşamda birçok farklı doku üzerinde yapılan araştırmalarda senesans hücrelerin, yara iyileşmesi esnasında ekstraselüler matriks yığılmasını azaltarak, artmış fibrotik yanıtı baskılayıp

anormal yara iyileşme cevabını engellediği gösterilmiştir (Krizhanovsky, Yon et al. 2008, Jun and Lau 2010, Schafer, White et al. 2017, Zhao, Tyshkovskiy et al. 2018). Ayrıca, senesansla bağlantılı olduğu daha önce gösterilmiş *p53* ve *p16^{INK4A}* genlerinin heterozigotik eksikliği olan farelerde de yara iyileşmesi sırasında abartılmış fibrotik bir yanıt gözlenmiştir (Rhinn, Ritschka et al. 2019). Bu da senesansın, tekrarlayan ataklarla seyreden genetik ya da çevresel stresörlerin doku bütünlüğünü tehdit ettiği durumlarda fibrozu sınırlamak açısından çok önemli hücresel bir cevap olduğuna işaret etmektedir (Huda, Liu et al. 2019). Bunun yanı sıra senesans mekanizması dokulara özel doğal bağışıklığı sağlayan hücrelerde, örneğin MSS’de mikrogliyalarda hücreler arası alanda artan artıklara karşı infalazomun aktivasyonunda, bunu takiben egzokrin ve parakrin yolların harekete geçmesiyle çevredeki bütün hücelere yayılan kronik patolojik bir cevabın başlamasına neden olabilmektedir (Heneka, McManus et al. 2018) (Şekil 4).

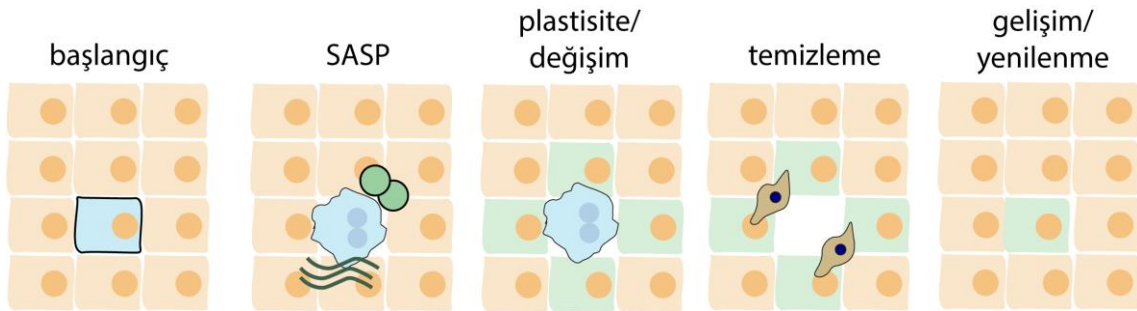


Şekil 4: Senesant hücrenin salgıladığı Senesansla Alakalı Sekretuar Fenotip (SASP)’ın çeşitli patofizyolojik rolleri (Nicolás Herranz ve Jesus Gil’in ‘Mechanisms and functions of cellular senescence’ isimli makalesinden modifiye edilmiştir.)

2.2.1.1. Gelişimsel Senesans

Senesans hücreleri embriyonik gelişim esnasında spesifik bölge ve zamanlarda oluşmakta ve belirli sürelerde varlığını sürdürmekte ve sonra yok olmaktadır. Bu da bizlere aslında hücresel senesans mekanizmasının zamansal ve mekansal sıkı kontrol altında tutulan bir süreç olduğunu göstermektedir (Rhinn, Ritschka et al. 2019). Senesans mekanizmasının aktive olduğuna işaret eden hiçbir hücresel ya da moleküler markerın gözlenmemesi, bu süreçte senesansın gelişimsel apoptoz gibi hasar gören hücreleri yok etmekten ziyade embriyonik gelişimde doku şekillenmesinden sorumlu programlı hücre ayıklanmasında rol aldığını düşündürmektedir (Rhinn, Ritschka et al. 2019) (Şekil 5). Memelilerde el ve ayak gibi organların taslaklarının şekillenmesi ve son halinin verilmesi için parmaklar arasındaki perdelerin yok edilmesi bu süreç için verilebilecek örneklerden birini temsil etmektedir (Fuchs and Steller, 2011). Üstelik bu iki embriyonik hücre ayıklama mekanizmasının, ortak moleküler yolları paylaşıyor olabilirler de düşünülmektedir (Lorda-Diez, Garcia-Riart et al. 2015).

Gelişimsel senesans fizyolojisinde öncelikle belirli bir stimulus karşısında senesansa geçen hücre, SASP'ı aktive ederek mikroçevresindeki hücrelerin aktivitelerini modifiye etmektedir (Coppé, Desprez et al. 2010). Bu modifikasyon sayesinde plastisite ve hücre rejenerasyonu gibi dokular için önemli birçok fonksiyon modüle edilir. Daha sonra görevini tamamlayan senesans hücre, çevredeki immün hücreler tarafından temizlenir, bu sayede dokuda kalmasının ve herhangi olası bir patolojinin önüne geçilir (Rhinn, Ritschka et al. 2019)(Şekil 5).



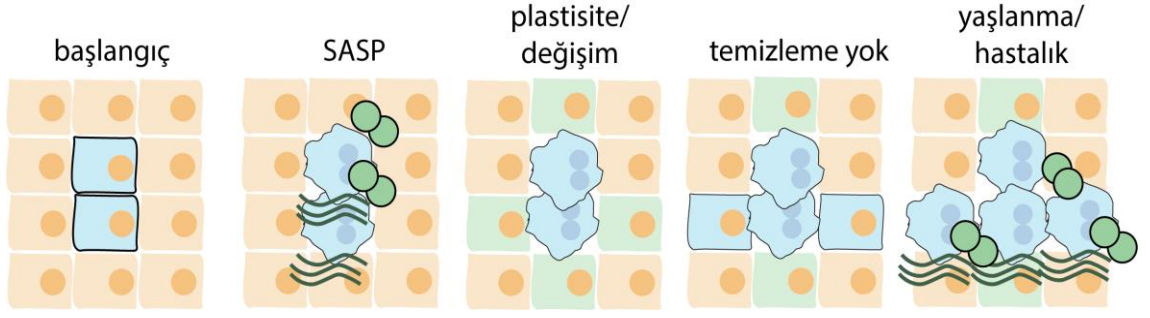
Şekil 5: Hücresel senesans mekanizmasının fizyolojik/gelişimsel süreçlerdeki görevi (Muriel Rhinn'in 'Cellular senescence in development, regeneration and disease' isimli makalesinden modifiye edilmiştir.)

2.2.1.2. Yaşlanma-Patolojik Tip Senesans

Beyin, fonksiyonlarını devam ettirebilmek için ahenk içerisinde çalışan nöronlar, astrositler, mikroglia, oligodendrositler ve endotel hücreleri gibi birçok hücre tipine ihtiyaç duyar. Bariz bir patojen olmasa dahi, yaşlanma, beyinde kronik düşük dereceli bir inflamasyona yol açmaktadır (Frank-Cannon, Alto et al. 2009). Bu durum birçok değişik yolak sonucunda bilişsel yıkıma ve hafıza kayıplarına yol açmaktadır. Ayrıca yaşlanmaya eşlik eden kronik inflamasyonun ötesinde oluşan anormal inflamasyon, birçok nörodejeneratif hastalıkta gözlenmektedir. Bu da hem normal yaşlanma hem de patolojik değişikliklerin ortak proinflamatuvar yollarda birleştiğini göstermektedir (Baker and Petersen 2018).

Böyle inflamatuvar bir ortamda tetiklenen ve sayıları artan senesan hücrelerinin beyinde ya da diğer dokularda birikmesi yaşlanma ve yaşa bağlı olan birçok hastalığı da tetiklemektedir (van Deursen 2014, Childs, Durik et al. 2015). Yaşlanma esnasında, progenitör ve kök hücrelerinin senesanlaşmasının, bulundukları dokuların onarımını ve yenilenmesini engelleyip homeostazı bozabileceği de gündeme gelmektedir.

Dokularda inflamatuvar bir ortam oluştuğunda ya da farklı stimuluslar karşısında bazı hücreler senesanlaşmaktadırlar. Bu hücreler SASP'ı aktive ederek mikroçevresindeki hücrelerin aktivitelerini modifiye etmektedir. SASP'ın durmaksızın devam etmesi ve diğer proinflamatuvar kemokin ve sitokinlerin varlığı çevre hücrelerin patolojik değişime uğramasına neden olur (Coppé, Desprez et al. 2010). Fizyolojik yanıttan farklı olarak bu mekanizmada, immün yanıt, senesan hücreleri temizlemekte gecikmektedir. Bu sebepten ortamdaki senesan hücrelerin sayısı azalmamakta ve kullandıkları SASP mekanizması ile de çevrelerindeki hücreleri strese sokmaktadır (Şekil 6). Dolayısıyla, senesanlaşma her ne kadar bir anti-kanser mekanizması olsa da, bu hücrelerin ısrarlı varlığı etraftaki hücrelerin malign transformasyonu ile tümör oluşumundan nörodejenerasyona kadar birçok patolojik yolağı tetikleyebilmektedir (Herranz and Gil 2018).



Şekil 6 : Hücresel senesans mekanizmasının patolojik süreçlerdeki rolü (Muriel Rhinn'in 'Cellular senescence in development, regeneration and disease' isimli makalesinden modifiye edilmiştir.)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Normal Yaşlanma ve Dış Stresörle Hızlandırılmış Nörodejenerasyon Hayvan Modelleri

Çalışmamızda zamanla (herhangi bir dış değişmen olmadan) oluşan yaşlanmaya bağlı nörodejenerasyonu izleyebilmek için yabani tip fareleri 4 ay, 6 ay, 9 ay, 12 ay ve 18 ay olmak üzere 5 ana zaman diliminin sonucunda gözlemledik. Jackson Laboratory'nin '<https://www.jax.org/research-and-faculty/research-labs/the-harrison-lab/gerontology/life-span-as-a-biomarker>' internet sitesindeki verilere dayanarak C57BL6 farelerin 4. ayda erken erişkinlik dönemini, 6. ayda erişkinlikten orta yaşa geçiş dönemini, 9. ve 12. aylarda orta yaş dönemini ve 18. ayda yaşlılık dönemini inceledik.

Deney grubu farelerinin yukarıda bahsedilen normal yaşam süresinde daha hızlı nörodejenerasyona uğraması için dış bir stresör olan l-metiyonin yüklemesi yaptık.

İlk üç zaman dilimi boyunca farelerin olağan kognitif, duygudurum ve motor bozukluklarını inceledik. 12. ayda ise hücresel değişiklikleri inceledik. Daha sonra 12. ve 18. aylarda ultrastrüktürel yapıları incelemeyi hedefliyoruz.

3.1.1. Fareler

Deneylerimizde 118 adet (38 adet davranış testleri için, 80 adet immünohitokimya analizi için) C57BL6 fareler kullanılmıştır. Deney ve kontrol grubu fareleri, doğumdan itibaren 6 hafta boyunca kontrollü bir ortamda tutulmuş ve hiçbir dış değişkene maruz kalmamışlardır. Diyetleri normal devam etmiştir. İlk 4 hafta boyunca anne fare tarafından emzirilmişlerdir. 4. haftanın sonunda cinsiyetlerine göre ayrılmış ve her kafeste 5 fare olacak şekilde gelişimlerini tamamlamışlardır.

3.1.2. Farelere verilecek L-Metiyonin ve Normal Su Hesaplamaları

6. haftanın sonunda deney grubu fareleri 12 hafta boyunca içme suyu aracılığıyla l-metiyonin almışlardır. L-metiyoninin oral yoldan alımının kolay ve optimum düzeyde olmasının yanı sıra, farelere yapılacak en ağrısız yöntem olması bizi oral alıma yöneltmiştir. Oral alımın 12 hafta gibi uzun bir süreye yayılmasının sebebi ise, yüksek doz ve ani homosistein enjeksiyonu/injesyonunun farelerde epilepsi nöbetlerine yol açabilmektedir. Böylelikle invazif herhangi bir yöntem kullanılmamaktadır, analjezik

veya anestezi kullanma gereksinimi olmayacak ve epilepsi nöbet riski minimal düzeye indirilecektir.

Daha önceki yapılan çalışmalarda standardize edildiği gibi organ yetmezliğine sebebiyet verecek toksik seviyelere ulaşmadan, l-metiyonin dozajını 8,2 g/kg olarak belirledik (Tapia-Rojas, Lindsay et al. 2015). Biz de çalışmamızda, bu makaleden yola çıkarak aynı l-metiyonin yüklemesini farelere uyguladık. Hayvanları günlük olarak inceledik, haftada en az 2 kez kafeslerini değiştirdik, ağırlık değişimlerini ve toplam sıvı alımlarını ölçtük.

Deney farelerinin su tüketimleri kafesten kafese, günden güne, yaştan yaşa ve aynı kafes içerisindeki fareden fareye değişiklik göstermektedir. Bu yüzden her farede l-metiyonin dozajını 8,2 g/kg'da sabitleyebilmek adına yeni bir formül geliştirdik ve bu formülün sonucuna göre her kafes için ayrı l-metiyonin solüsyonlarını her hafta düzenledik.

Formül: L-metiyoninin çözüneceği su miktarı x l-metiyonin dozajı x (kafesteki farelerin ortalama ağırlığı / kafesteki bir farenin tükettiği ortalama su miktarı)

Bu formüle göre her kafesin ihtiyacı olan l-metiyonin miktarını dinamik olarak belirleyebildik. Bunun için haftada bir kez farelerin ağırlıklarını ve tükettikleri toplam sıvı miktarını ölçtük. L-metiyonin içeren suyu vereceğimiz kafesin o haftaki ağırlık ortalaması ile bir önceki haftanın sıvı tüketme trendini formüle yerleştirerek tüm kafesler arasında eşit doz alımına maksimum düzeyde yaklaştık.

3.2. Davranış Testleri

Nörodejenerasyon hayvan modellerinin normal farelerle arasındaki farkı standardize edilmiş davranış testleriyle inceledik. Bilgisayar tarafından otomatik olarak kaydedilen davranış testi verileri aynı zamanda testi uygulayan araştırmacı tarafından da manüel olarak teyit edilmiştir. Davranış testleri ANY-Maze Behavioral Tracking Software ile standardize edilmiş, kaydedilmiş ve incelenmiştir.

3.2.1. Açık Alan Testi

Açık alan testi hayvanların motor koordinasyonlarını, yeni çevreye uyumlarını ve anksiyetelerini ölçmeye yarayan bir davranış testidir. Üstü açık, tahtadan yapılmış ve üstten kırmızı ışıkla aydınlatılan 50 cm³ hacmindeki alana fareler 5 dakikalık sürelerle tek tek yerleştirildi (Şekil 7). Açık alan içerisinde farelerin merkezde ve periferde

izledikleri yol otomatik olarak kaydedildi. Aynı zamanda farelerin iki ayak üzerine çıkıp etrafı incelemeleri de sayısal olarak elle kaydedildi. Bununla birlikte farelerin aksiyetelerini ölçmek için, kendilerini temizleme ve tüylerini düzeltme (tımarlanma) gibi davranışları da sayısal olarak elle kaydedildi. Her fare testi arasında davranış alanı %70 etanol ile silindi. Böylelikle bir önceki farenin bırakmış olabileceği koku engellenmiştir.



Şekil 7 : AAT için kullandığımız davranış testi alanı

3.2.2. Zorunlu Yüzme Testi

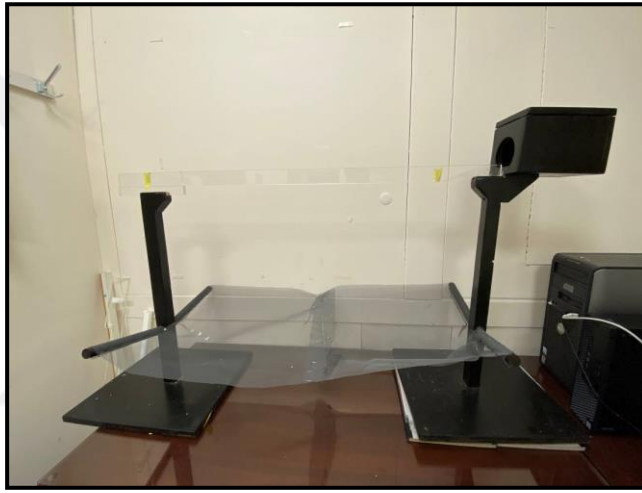
Depresyon benzeri davranış ölçmek adına Porsolt'un zorunlu yüzme testi kullanıldı. Bu testte 4 L'lik beher kaplarına oda sıcaklığında su konduktan sonra fareler tek tek yerleştirildi ve 10 dakika boyunca farelerin sudaki yüzme davranışları incelendi (Şekil 8). Testin ilk 60 saniyesi farelerin suya alışması adına çalışma dışı bırakılırken; sonraki 9 dakika 3 ayrı kümeye bölündü. Böylelikle farelerin hareketsiz kaldığı zaman (depresyon benzeri davranış) 3'er dakikalık kümeler halinde incelendi.



Şekil 8: ZYT için kullandığımız gereçler

3.2.3. Denge Kirişı Testi

Denge kiriş testi için 1 cm kalınlığında ve 1 m uzunluğunda pleksiglastan yapılmış bir kiriş yerden 1 metre yükseklikte iki tahta ayak üzerine sabitlenmiştir. Kirişin sonuna fareleri motive etmesi için yiyecek bırakılmıştır. Fareler ilk iki gün günde üç defa olmak üzere denge kirişinde yürütülerek ortama alışmaları sağlanmıştır. Sonraki iki gün yine günde üç deneme yaparak farelerin denge kirişindeki kaymaları sayılmıştır (Şekil 9). Toplamda elde edilen kayma (denge kaybı) sayıları istatistiksel olarak incelenmiştir. Her fare testi arasında denge kirişi %70 etanol ile silinmiştir. Böylelikle bir önceki farenin bırakmış olabileceği koku engellenmiştir.



Şekil 9: DKT için kullandığımız mekanizma

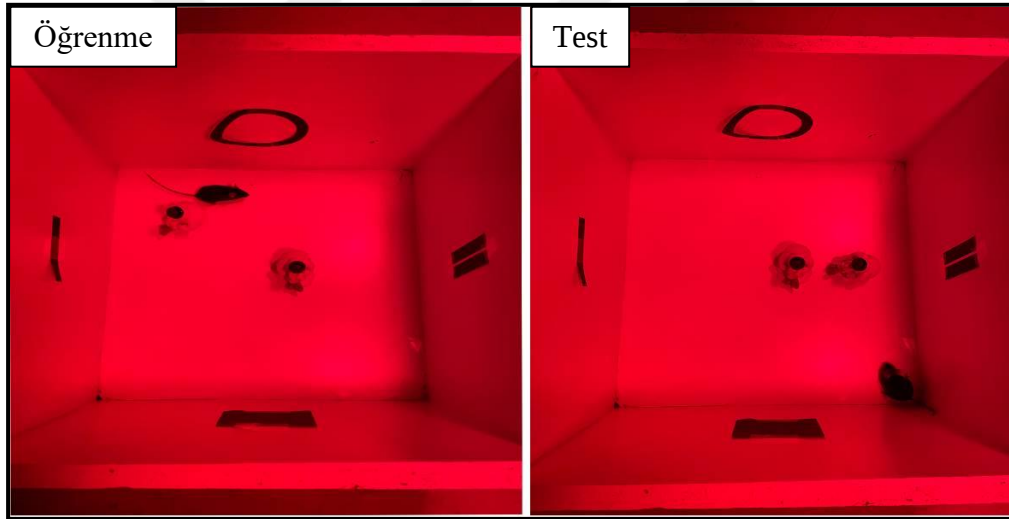
3.2.4. Nesne Tanıma Testi

Farelerin hipokampokortikal ağlara bağlı hafıza ve öğrenmelerini test etmek için kullanılan bir testtir (Tomé, Gökhan et al. 2015). İki adet aynı objeyi incelemeleri için fareler 40 cm x 40 cm lik davranış alanına herhangi başka bir görsel ipucu olmadan bırakılmıştır. Bu davranış alanında fareler kesintisiz 10 dakika boyunca iki adet aynı nesne ile bekletilmiştir. Nesneleri öğrenme süresi bittikten sonra fareler aynı kafes ve ortamlarına geri götürülmüş ve bir gün sonra nesne tanıma testi için davranış testi alanına getirilmiştir. Bu test 6 dakika sürmektedir. Fareler bir önceki aynı alana bırakılır. Nesnelerden yalnızca biri yeni bir nesne ile değiştirilmiştir. Farelerin hangi nesneyi ne kadar zaman incelediği kaydedilmiştir. Her fare testi arasında davranış alanı %70 etanol ile silinmiştir. Böylelikle bir önceki farenin bırakmış olabileceği koku engellenmiştir.

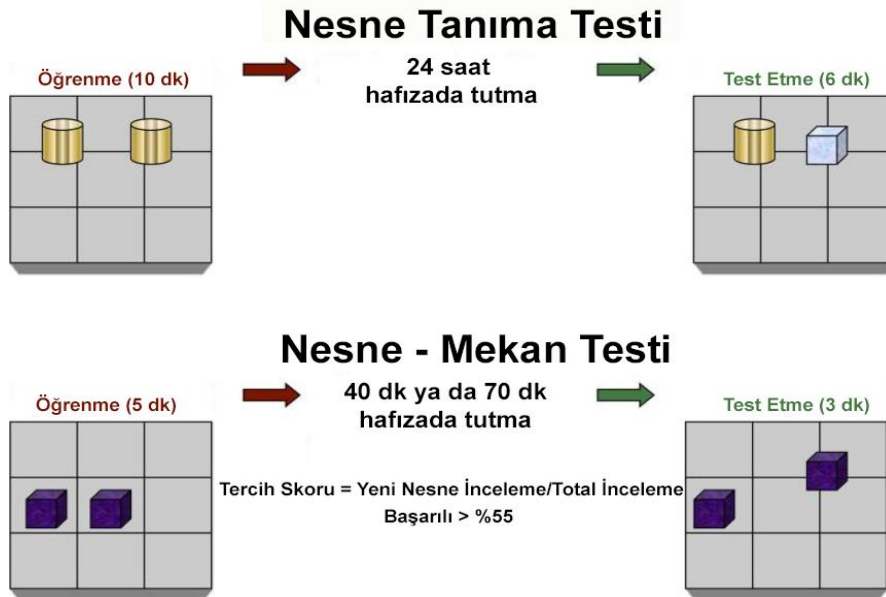
3.2.5. Nesne-Mekan Testi

Nesne-mekan testi (NMT) isminden de anlaşılacağı üzere farelerde mekansal hafızayı test eder. NMT için iki adet aynı nesne (kemirgenler için ilgi çekici) farklı yerlere yerleştirilir. Farelerin nesnelerin yerlerini hatırlayabilmeleri için davranış testi alanının duvarlarına görsel ipuçları yerleştirilir. Böylelikle fareler uzaysal olarak her iki objeyi 4 dakika boyunca inceleyebilmektedir.

Daha sonra nesnelerden biri farklı bir noktaya yerleştirilir ve farenin her iki nesneyi izlediği süreler not edilir. Öğrenim ve test arasındaki süre testten teste değişebilmekte olup biz testlerimizde 40 dakika ve 70 dakika olmak üzere iki test uyguladık. Her test için farklı objeler kullanıldı (Şekil 10-11). Her fare testi arasında davranış alanı %70 etanol ile silinmiştir. Böylelikle bir önceki farenin bırakmış olabileceği koku engellenmiştir.



Şekil 10: NMT esnasında farenin nesneleri incelemesi



Şekil 11: NTT ve NMT'nin şematik açıklaması (*Wolfgang A. Tome'nin 'A mouse model replicating hippocampal sparing cranial irradiation in humans: A tool for identifying new strategies to limit neurocognitive decline' isimli makalesinden modifiye edilmiştir*)

3.2.6. Yükseltilmiş Artı ve O Labirent Testi

Yükseltilmiş artı labirent testi (YALT) ve yükseltilmiş 0 labirent testi (YOLT) farelerde anksiyete ölçmeye yarayan bir testtir. YALT yerden bir metre yükseltilmiş + şeklinde yapılmış iki ucu kenarları kapalı ve diğer iki ucu kenarları açık bir platformdan oluşmaktadır. Farelerin hangi kollarında ne kadar hareket ettiğini ve ne kadar süre kaldığını ANY Maze yazılımı otomatik olarak kaydetmektedir. O Testi ise 0 şeklinde olup yarısı açık yarısı kapalı bir platformdan oluşmaktadır (Şekil 12).

Her fare testi arasında davranış alanı %70 etanol ile silinmiştir. Böylelikle bir önceki farenin bırakmış olabileceği koku engellenmiştir.

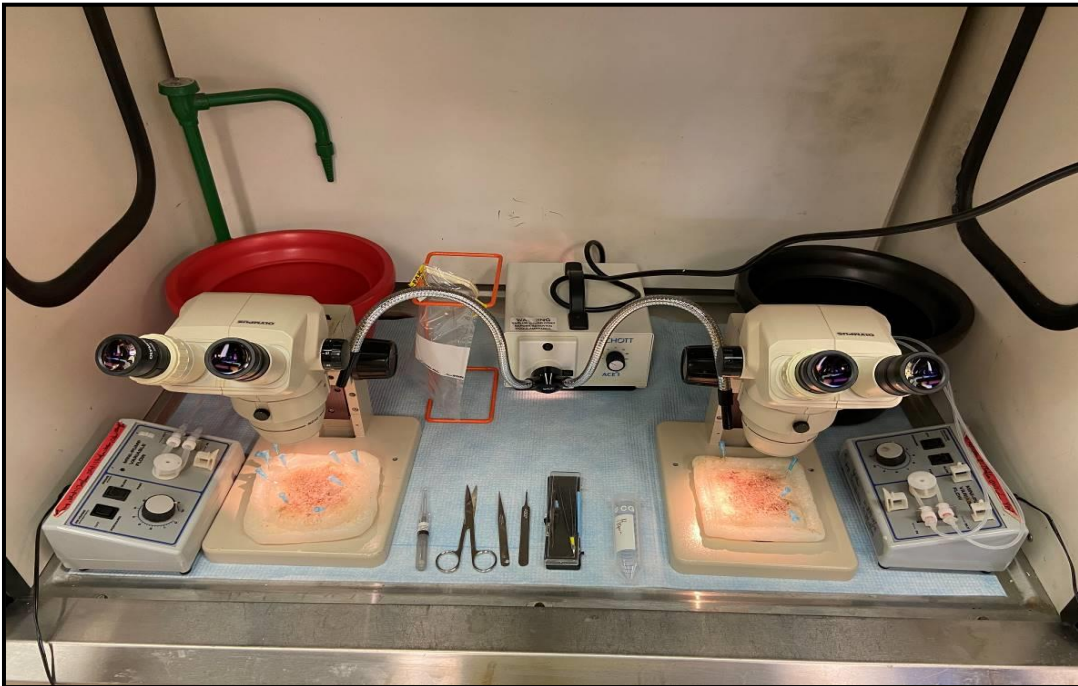


Şekil 12: YALT için kullandığımız mekanizma

3.3. Doku Elde Edilmesi ve İşlenmesi

3.3.1. Perfüzyon

Perfüzyona hazırlanan farelere öncelikle ketamin/xylazine/salin karışımından 150µl intraperitoneal olarak enjekte edildi. Anestezi derinliği ayak parmağına, kuyruğuna ve el parmaklarına verilen ağırlı stimülana bakarak tek tek izlendi ve refleks yanıt alınmamaya başlandığında perfüzyona başlandı. Refleks yanıt kaybının ardından fare sırt üstü parafin plakaya sabitlendi. Daha sonra alkol ile temizlenen deri makas yardımıyla kesildi ve göğüs kafesi bilateral olarak tamamen açıldı. Toraksı açarken, farenin diyaframı kesildi ve acı çekmeden sakrifiye edilmesi sağlandı. Daha sonra ince makas yardımıyla kalbin sol ventrikülüne kateter girecek şekilde delik açıldı ve kalbin içerisine kateter yerleştirildi. Bu kateter aracılığıyla +4 °C 15 mL'lik heparin solüsyonu dakikada 2 mL olacak şekilde pompa yardımıyla enjekte edildi. Heparin sirkülasyonu tamamlandığında, ara vermeden 25 mL %4 paraformaldehit (PFA) solüsyonu dokuların sabitlenmesini sağlamak amacıyla kateterin diğer ucundan eklendi. Sirkülasyona giren heparin ve PFA solüsyonlarının sabit hızda verilebilmesini sağlamak adına perfüzyon pompaları eşit ayarda kullanıldı. Perfüzyonu tamamlanan farelerin beyinleri çıkartıldı. Farelerin kalan dokuları uygun yöntemlerle tıbbi atık prosedürüne uygun olarak saklandı ve imha edildi (Şekil 13).



Şekil 13: Farelerin perfüzyonu sırasında kullandığımız aletler

3.3.2. Doku İşlemleri ve Saklama

Perfüzyonu tamamlanan farelerin beyinleri çıkartıldıktan sonra +4 °C'deki 5 mL PFA dolu tüplere konuldu. Bu tüpler 1 gün boyunca +4 °C'de bekletilerek ek bir tespitleme yapıldı. Bu fiksasyon sonrasında beyinler %20 süktroz-PBS solüsyonuna alındı. Süktroz solüsyonu sayesinde beyin içerisinde kalmış herhangi nem kalıntısı önlenmiştir. Su kalıntısının önlenmesi beyni dondurduğumuzda oluşabilecek kristalleşmelere ve yırtılmalara karşı büyük önem taşımaktadır.

Daha sonra süktrozdan çıkarılan beyinler kurulandıktan sonra standart tissue-tek cryomold 25mmx20mmx5mm ölçülerindeki plastik kaplara yerleştirilip; tüm beyni saracak şekilde M-1 Embedding Matrix ile kaplar dolduruldu. Bu matriks solüsyonu beyni dondurduğumuzda dokunun hareket etmemesi ve sıcaklığını koruması için kullanılmaktadır. Tamamen matriks içerisine alınan beyin daha önceden kuru buz sayesinde -30 °C 'ye getirdiğimiz isopentene solüsyonuna batırılıp tamamen donması sağlandı. Bu şekilde beyinleri -80 °C derin dondurucularda uzun süre saklayabildik.

Beyin kesitleri Leica CM3050S cryostat aracılığıyla 30 mikron boyutlarında sajjital olarak kesildi ve alınan kesitler cryoprotectant solüsyonu ile -20 °C de saklandı.

3.4. İmmünohistokimya

3.4.1. 3,3'-Diaminobenzidine Boyaması

3,3'- Diaminobenzidine (DAB) boyaması için ise dokular endojen peroksidaz enzimi aktivitesini bertaraf etmek için öncelikle 10 dakikalık H₂O₂ solüsyonuna tabi tutuldu. Daha sonra uygun hayvan serumu ile sabitlenen beyin kesitleri belirtilen antikorlarla işaretlendi. Akabinde ikincil biyotinillenmiş antikorlar, DAB kokteyli ve ABC kiti solüsyonlarıyla kesit mikroskopik incelemeye hazır hale getirildi.

3.4.2. Senesansla Alakalı β -Galaktozidaz Boyaması

SA β -Gal yukarıda belirtilen DAB immünolojik boyamasına ek olarak yapılan ve senesans savunma mekanizmasını oluşturmuş hücrelerin ek olarak boyanmasını sağlayan bir metottur. Buna göre daha önceki reaksiyonlara ek olarak, dokular CBA-230 Cellular Senescence Assay Kit solüsyonları ile fiks edildi ve ek olarak X-Gal solüsyonu ile birlikte +37 °C'de 24 saat inkübe edildi.

3.5. Elektronmikroskopisi

İntrakardiyak perfüzyon sonrasında (%2 lik PFA solüsyonu ile) alınan beyin 0,1M sodyum kakodilat tamponunda hazırlanan %2 gluteraldehit solüsyonunda fikse edildi. Bu fiksasyon sonrası beyinler %1 osmiyum tetroksit solüsyonunda bekledildikten sonra blok halinde %2 uranil asetat solüsyonunda boyandı. Daha sonrasında örnekler artan etanol konsantrasyonuyla dehidrate edilip LX112 (LADD Research Industries, Burlington VT) reçinesi içerisine yerleştirildi. Leica EM Ultracut UC7 ile kesilen ultra-ince kesitler (80 nm) önce uranil asetat, akabinde kurşun sitrat solüsyonlarıyla boyandı ve JEOL 1200EX transmisyon elektron mikroskopu ile 80 kV da görüntülendi.

3.6. İstatistiksel Analiz ve Kullanılan Yazılımlar

Çalışmanın salt verileri Microsoft Excel ile dijital ortama aktarıldı; istatistiksel analizler ve oluşturulan grafikler ise GraphPad Prism 8 ile hazırlandı.

Davranış testleri ANY-Maze Behavior Tracking Software ile kaydedildi ve analiz edildi.

İmmunohistokimya yöntemleriyle hazırlanan preparatlar Olympus marka floresan mikroskopla ve Microsuite 5 yazılımıyla dijital ortama kaydedildi. Elektron mikroskopisi için hazırlanan preparatlar JEOL 1200X marka mikroskopla ve Gatan's Digital Micrograph yazılımıyla dijital ortama aktarıldı. Kaydedilen doku fotoğrafları Adobe Illustrator 2019 ve Adobe Photoshop 2020 ile düzenlendi ve analizi sağlandı.

Çalışmada bahsi geçen tüm yayınlar EndNote X9.3.3 ile tezin kaynaklar bölümüne otomatik olarak aktarıldı.

4. BULGULAR

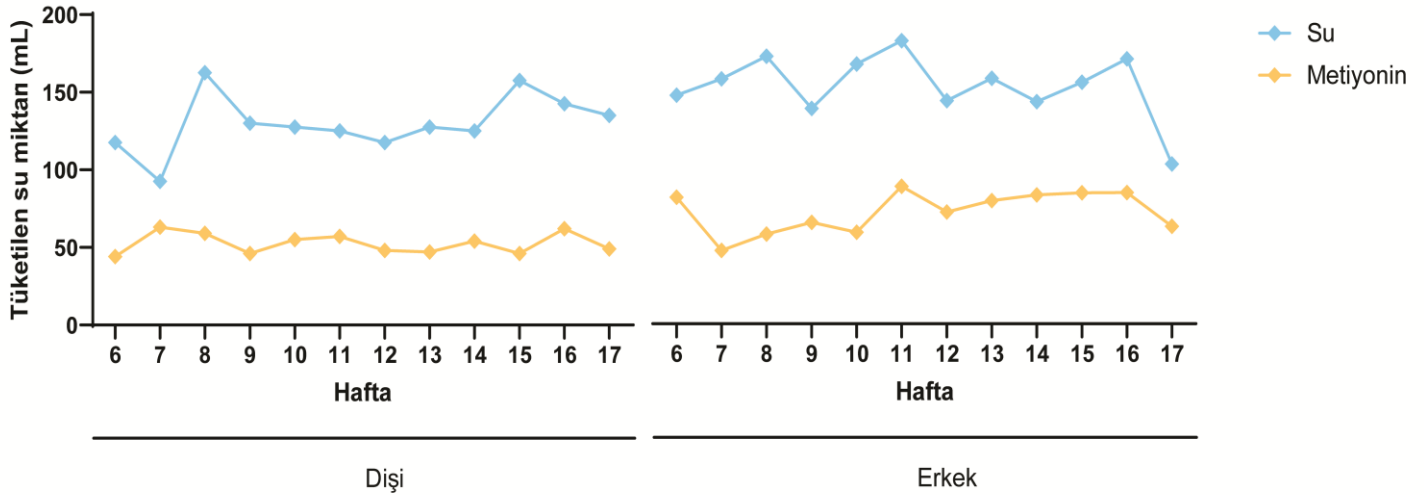
4.1. Fenotip ve Davranış Bulguları

Deneylerimize katılan tüm deney farelerinin 6. haftanın başlamasından 17. haftanın sonuna kadar aldıkları su veya l-metiyonin miktarını ve yine bu süre zarfındaki ağırlık değişimlerini haftalık olarak not aldık.

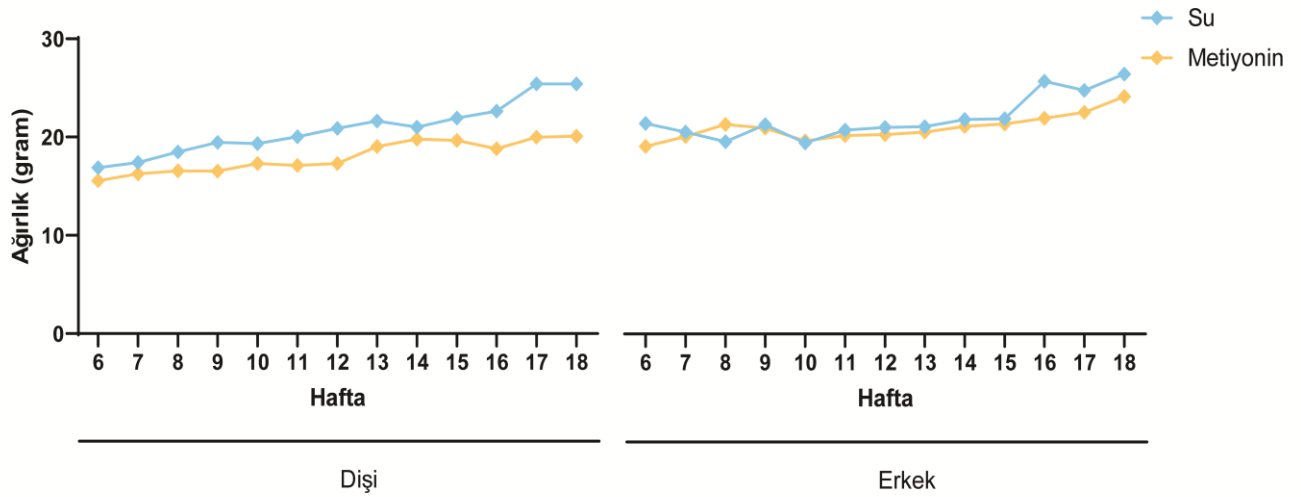
Davranış testlerine katılan fareleri su alan dişiler (n = 10), metiyonin alan dişiler (n = 9), su alan erkekler (n = 9) ve metiyonin alan erkekler (n = 10) olacak şekilde toplam dört gruba ayırdık. Aynı fareler 4. 6. ve 9. ayda davranış testlerine tabi tutuldu.

4.1.1. Su Alımı ve Ağırlık Değişimi

Kontrol ve deney farelerinin su alımlarını ve ağırlık değişimlerini l-metiyonin yüklemesi yaptığımız süre zarfında (post natal 6. haftanın başından 17. haftanın sonuna kadar) haftalık olarak takip ettik (Şekil 14-15). Metiyonin alan farelerin su alanlara kıyasla daha az sıvı tüketmesinin sebebinin l-metiyonin çözeltisinin zaman içinde oluşturduğu sülfürik kokusu olduğunu düşünmekteyiz.



Şekil 14: Farelerin l-metiyonin yüklemesi boyunca su ve metiyonin alımlarının zamana göre değişimi



Şekil 15: Farelerin l-metiyonin yüklemesi boyunca ağırlıklarının zamana göre değişimi

4.1.2. Davranış Testleri

Davranış testlerinin amacı kontrollere kıyasla deney hayvanlarında görülen duygudurum, biliş, motor ve denge bozukluklarını saptamaktır. Yaptığımız deneylerde l-metiyoninin hangi nöroanatomik alanları etkilediğini önceden bilemediğimiz için bütün temel duygudurum, biliş, motor ve denge fonksiyonlarını araştırmaya karar verdik. Bununla birlikte, deney koşullarından bağımsız olarak deney hayvanlarında bulunabilecek ve davranış testlerinin yorumunu etkileyebilecek her türlü fiziksel bozukluğu saptamak amacıyla ilk olarak açık alan testini (AAT) uyguladık (Şekil 16-17).

4.1.2.1. Kontrol ve deney grubu farelerinin genel fiziksel durumlarının, bazal anksiyete ve keşfetme isteği düzeylerinin AAT ile incelenmesi

Farelerin durumları günlük olarak veteriner teknikerleri tarafından takip edilmiş olsa da biz bu test ile, deney hayvanlarında ileride uygulayacağımız testlere katılmalarını engelleyecek herhangi bir fiziksel düşkünlük olup olmadığını tekrar incelemek istedik. Günlük takiplerimiz ve AAT esnasında hayvan protokolümüzde belirlenen standartlara göre (hayati fonksiyonların stabil olmaması, solunum zorluğu çekmesi, acı çektiği için postür değişiklikleri, vokalizasyon vb. yöntemlerle anlaşılan, %15 ve üzerinde kilo kaybı olması, 1 dakikadan fazla süredir kalbin atmaması ve solumaması) hayvanların testlere katılmalarını engelleyecek bir morbidite yoktu. Ayrıca biz de bu testin sonucunda deney hayvanlarında belirgin bir fiziksel sakatlık görmedik.

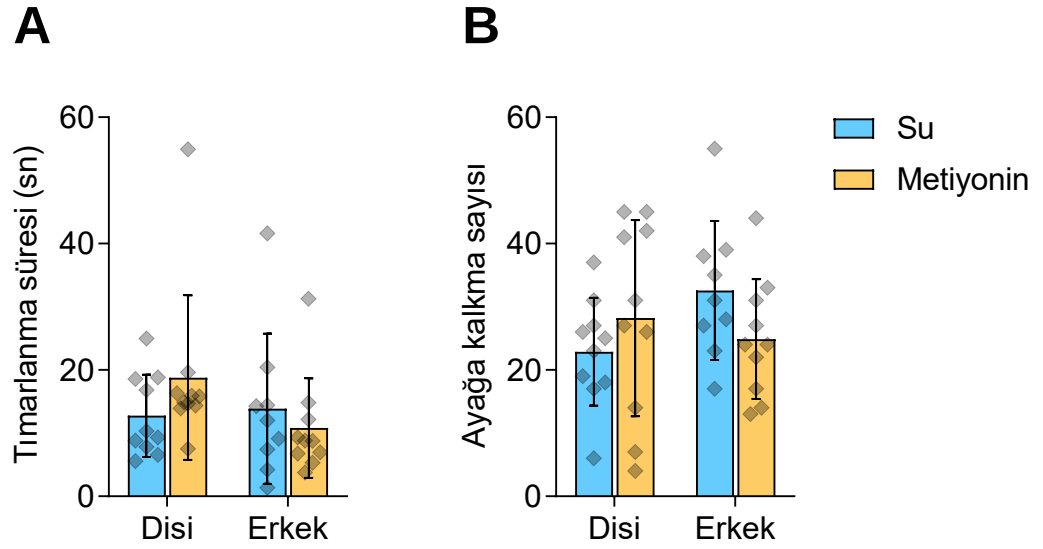
AAT ile farelerin bariz nörolojik, kas-iskelet veya motor bozukluklarının olmadığını tekrar göstermiş olduk.

AAT aynı zamanda farelerin yeni bir ortama girdiklerinde nasıl tepki verdiklerini incelemek için de yararlı bir testtir. AAT’de, davranış testi yaptığımız alanın merkezinde (duvarlardan uzakta) geçirilen sürenin merkezin dışında geçirilen süreye oranı (duvarlara yakın) bize hayvanların ne kadar az derecede anksiyetede olduklarını göstermektedir (Seibenhener and Wooten 2015). Örneğin bir fare ne kadar çok merkez dışında vakit geçiriyorsa o kadar çok anksiyete benzeri davranış paterni göstermektedir. Kontrol ve deney grubu dişi ve erkek fareler arasında yaptığımız iki yönlü ANOVA testine göre anksiyete adına istatistiksel olarak anlamlı bir fark göremedik ($F_{(1, 35)} = 0,9805$ ve $p = 0,3289$) (Şekil 17).

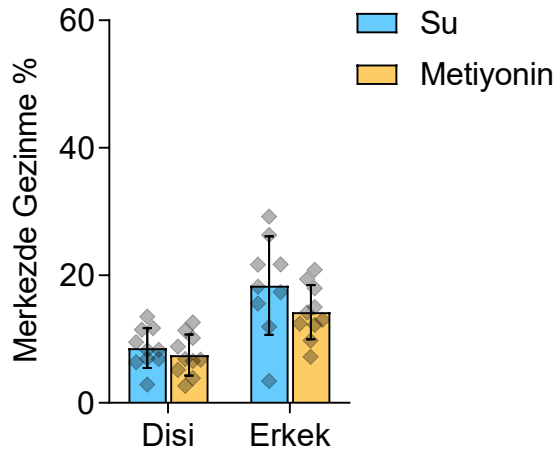
Buna ek olarak bazal anksiyete düzeylerini incelemek için ayrıca AAT’de farelerin tımarlanma sürelerini kaydettik. Farelerin tımarlanması amigdala ve hipotalamus gibi limbik sistemin komponentleri tarafından modüle edilmektedir (Kalueff, Stewart et al. 2016). Daha önce yayınlanmış birçok makale farelerde artan tımarlanma süresinin anksiyete ve amigdalada selektif dopamin salınımının azalmasıyla korelasyon gösterdiğini kanıtlamıştır (Homberg, van den Akker et al. 2002). Bu testin sonucu deney farelerinin kontrol farelerine kıyasla tımarlanma süresi adına yapılan iki yönlü ANOVA testi incelemesinde herhangi bir istatistiksel anlamlı farklılık göstermemiştir ($F_{(1, 35)} = 1,962$ ve $p = 0,1701$) (Şekil 16-A).

Anksiyete incelemesi dışında AAT farelerin eksploratif (keşfedici) davranış paternlerini de incelemeye yarayan bir testtir. Fareler yeni bir ortama girdiklerinde iki arka ayaklarının üzerine çıkarak etrafı keşfetmeye çalışırlar. İleride yapacağımız davranış testlerine olan katılım oranı, bu keşif güdüsüyle paralellik göstermesi açısından önemlidir (Crawley 1999). Biz de AAT’de farelerin keşif davranışını iki ayak üzerine çıktıkları anların sayısal değerlerini kaydederek ölçtük. Bu testte erkek dişi gruplarının kontrol ve deney grupları arasında ayağa kalkıp etrafı keşfetme sayısı adına yapılan iki yönlü ANOVA testi sonucunda herhangi bir istatistiksel anlamlı fark bulamadık ($F_{(1, 35)} = 3,108$ ve $p = 0,0866$) (Şekil 16-B).

AAT ile vardığımız anksiyete ve keşfetme benzeri davranış sonuçlarını ön bilgi olarak elde ettik ve daha detaylı testlerle incelemeye karar verdik.



Şekil 16: A. AAT’de tımarlanma davranışı B. Ayağa kalkıp etrafı keşfetme davranışı



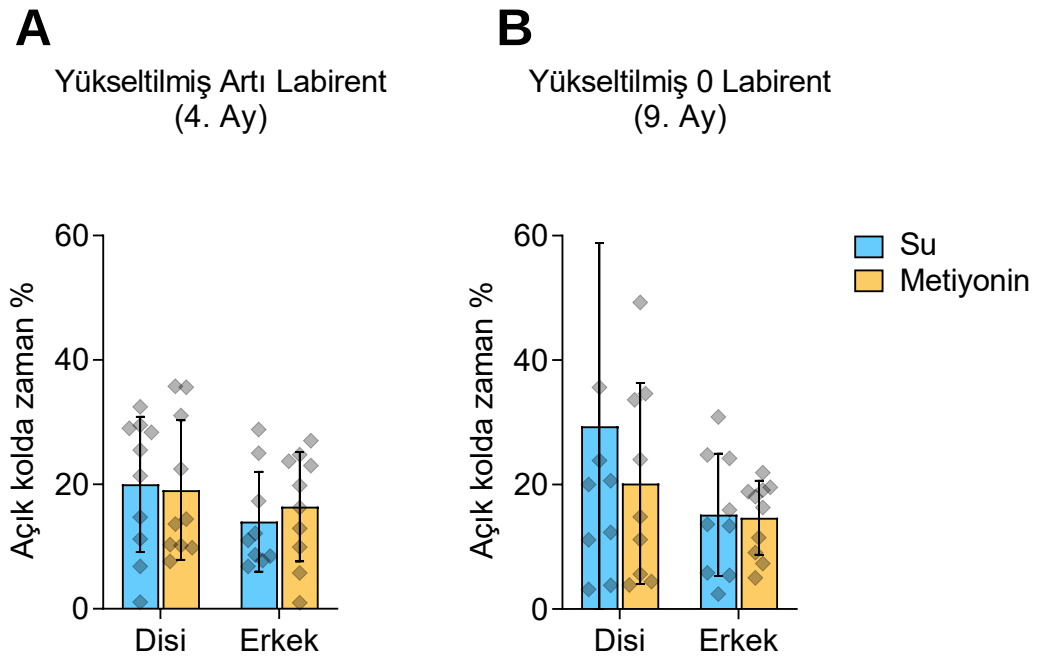
Şekil 17: AAT’de merkezde gezinme yüzdesi

4.1.2.2. Kontrol ve deney grubu farelerinin anksiyete açısından karşılaştırılması

Deneylerimize öncelikle diğer test bulgularının da sonuçlarını etkileyebileceğini bildiğimiz anksiyete ölçümüyle başladık. Anksiyete farelerin davranış testlerindeki motivasyonunu belirleyen temel koşullardan biri olan keşfetme iç güdüsünü direk

etkileyen bir unsurdur. Hayvanların yeni ortam ve nesneleri keşfetmek ve hayatta kalmak arasındaki içsel çatışmalarının arasındaki denge deney sonuçlarını belirleyen temel noktadır (Harro 2018). Ayrıca anksiyete, hafıza ve öğrenme yetilerini kısıtlayıp bu bilişsel testlerin sonuçlarının güvenilirliğini azaltabilmektedir (Dere, Zlomuzica et al. 2010) (Elsey and Kindt 2017). Çalışmamızda kontrol ve deney hayvanları arasında yapılan yaşam evresine uygun olarak seçilmiş çeşitli davranış testlerinde anksiyete açısından bir farklılık saptamadık (Şekil 18A-18B).

Deney hayvanlarında kontrollere göre artmış anksiyete olup olmadığını saptamak için deneylerimize ilk olarak 4. ayda yükseltilmiş artı labirent testi (YALT) ile başladık. Bu testin sonucunda dişi ve erkek fareler arasında; kontrol grubu ve l-metiyonin alan gruplar arasında anlamlı bir fark bulamadık ($F_{(1, 35)} = 0,2778$ ve $p = 0,6015$).



Şekil 18: A. 4. ay anksiyete düzeyleri B. 9. ay anksiyete düzeyleri

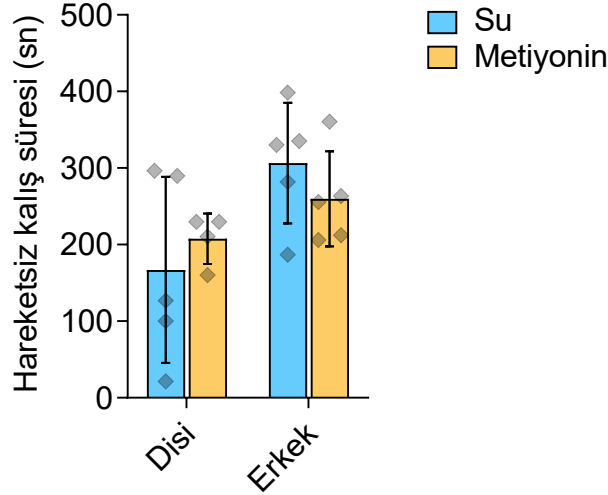
İlerleyen yaşlarda deney hayvanlarının uyguladığımız testleri öğrenip, bu testlerle araştırmayı hedeflediğimiz bulguların baskılanmasını önlemek için daha önce kullandığımız YALT'ı kullanmaktan kaçındık (Prevot, Misquitta et al. 2018). Bu yüzden 9. aya gelmiş farelerin anksiyete ölçümünü alternatif bir test olan yükseltilmiş

sıfır labirentiyle (Y0T) değerlendirdik. Bu testin sonucunda da Şekil 18 B’de görüldüğü gibi bu kez de kontrol ve deney grupları arasında anksiyete adına herhangi bir anlamlı fark bulamadık ($F_{(1, 34)} = 0,5600$ ve $p = 0,4594$). Bu sonuçlardan yaptığımız çıkarıma göre, deneylerimizde kullandığımız l-metiyonin dozu fare sinir sisteminde anksiyete duyudurum fonksiyonunu etkileyebilecek nöroanatmik alanlarda belirgin bir hasara neden olmamaktadır. Dolayısıyla bundan sonraki deneylerimizde ölçeceğimiz hafıza motor ve denge testlerinde anksiyetenin herhangi bir olumsuz etkisi olmayacaktır.

4.1.2.3. Kontrol ve deney grubu farelerinin depresyon benzeri davranış açısından karşılaştırılması

Zorunlu yüzme testi (ZYT) kemirgenlerde depresyon benzeri davranışı ölçmekte en çok kullanılan testlerden biridir (Yankelevitch-Yahav, Franko et al. 2015). Bu teste göre dışardan uygulanan stresör ile başa çıkma yetilerini ölçmeyi hedefledik. Bu deneyde, su ve metiyonin alan her iki cinsiyet grubu arasında depresyon adına istatistiksel (iki yönlü ANOVA) anlamlı bir fark bulamadık ($F_{(1, 15)} = 1,317$ ve $p = 0,2690$). Bununla birlikte, her ne kadar istatistiksel bir anlam kazanmasa da, erkek farelerin dişi farelere göre ortalama olarak daha fazla depresyon benzeri davranış eğilimi gösterdiğini gözledik. Daha önce yapılmış çalışmalar cinsiyetin tek başına depresyona hassasiyeti belirleyen bir unsur olduğunu bildirmiştir. Bizim bulgularımız da bu çalışmalarla tutarlılık göstermektedir (Altemus, Sarvaiya et al. 2014) (Thériault and Perreault 2019) (Rubinow and Schmidt 2019). Biz çalışmamızda ZYT’yi yalnızca 4. ayda kullanabildik. ZYT’nin daha sonraki aylarda uygulanamama sebebi ise farelerin bu su dolu kapları hatırlayabilmeleri ve dolayısıyla hayatta kalmak için çırpınma gereksinimi duymamalarıdır. Bu durumun depresyon olmadığı halde yanlış pozitif bir sonuç doğurabilmesi ihtimalinden dolayı depresyon testlerini 4. ayda noktaladık (Şekil 19).

**Zorunlu Yüzme Testi
(4. Ay)**



Şekil 19: 4. ay depresyon düzeyleri

4.1.2.4. Kontrol ve deney grubu farelerinin hipokampüse bağlı mekansal hafıza fonksiyonları açısından karşılaştırılması

Nesne mekan tanıma testinin (NMT) amacı temelde hipokampus bağımlı mekansal hafızayı ölçmektir. Mekansal hafızayı ölçmeye yarayan diğer testlere (Morris Water Maze vb.) kıyasla NMT'yi tercih etmemizin sebepleri bu testin kolay, tekrarlanabilir ve halihazırda laboratuvarımızca standardize edilmiş olmasıdır. Fareler bu testte, dört duvarına görsel ipucu yerleştirilmiş davranış testi alanında öncelikle birbirinin tıpatıp aynısı olan iki nesneyi keşfeder ve bir süre sonra araştırmacı tarafından yeri değiştirilen nesneyi farelerin tekrar incelemesi gözlemlenir. Normalde bu testte beklenen sonuç, yeri değişen nesneye olan ilginin yeri değişmeyen nesneye olan ilgiye göre daha fazla olmasıdır. Her test için farklı obje kullanabilme ve iki boyutlu olarak daha öncekilerden farklı kombinasyonlarda yer değiştirebilmeleri açısından NMT farklı nesne sayısı el verdikçe uygulanabilir. Biz de bu yüzden kontrol ve deney farelerimizin mekansal hafızalarını zaman içerisinde ölçmek için bu testi 4., 6. ve 9. ay olmak üzere üç kez tekrarladık.

NMT'yi bu üç zaman diliminde tekrarlamaktaki temel nedeni l-metiyonin alımından sonra beyinde oluşabilecek oksidatif strese bağlı akut inflamasyonun daha

sonra gerileyebilmesi ya da tam tersine kalıcı nörodejenerasyon yaparak hafızayı tamamen bozmasına neden olup olamayacağı hakkında kesin bir bilgiye sahip olmadığımızdan kaynaklanmaktadır.

Testlerin zaman içerisinde tekrarlamamızın yanı sıra ayrıca aynı zaman diliminde (4. 6. veya 9. ay) NMT'yi 40 dakika aralıklı ve 70 dakika aralıklı olarak iki kez inceledik. Hayvanların ayrı ayrı 40 dakikalık ve 70 dakikalık mekansal hafızalarını ölçmemizdeki temel amaç, 40 dakikalık hafıza testinin hayvanlar için kolay olabilmesi ve altta yatan mekansal hafıza bozukluğunu kaçırma ihtimalimizi elemektir. Ancak bu süreyi istediğimiz gibi çokça uzatmanın sonucunda farelerin teste olan motivasyonu azalabileceğinden ve olmayan hafıza bozukluğunu varmış gibi gösterebileceğinden deneylerimizi daha önceki çalışmalarda standardize ettiğimiz (Tomé, Gökhan et al. 2015, Chitu, Biundo et al. 2020) 70 dakika ile sınırlandırdık.

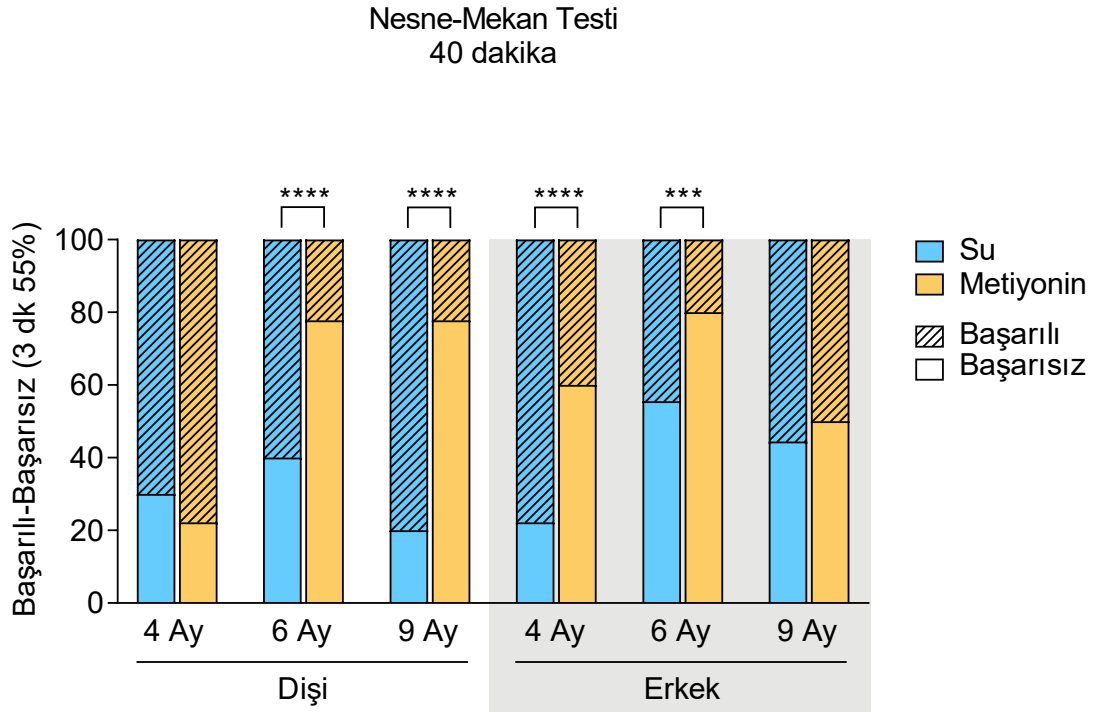
NMT-40'ta 4. ayda dişiler arasında mekansal hafıza bozukluğu adına kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel (ki-kare testi) olarak anlamlı bir fark bulamadık. ($\chi^2_{(1, 19)} = 1,663$ ve $p = 0,1972$). Ancak 4. ayda su ve metiyonin alan erkekler arasında NMT'de başarılı-başarısızlık oranı ki-kare testiyle incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemledik. ($\chi^2_{(1, 19)} = 29,85$ ve $p < 0,0001$). Bu bilgiler ışığında l-metiyonin alımının akabinde yapılan (4. ay) NMT'de su alan erkek farelerin metiyonin alanlara oranla daha başarısız olduğunu; ancak dişi farelerde böyle bir farkın olmadığını gözlemlemiş olduk.

Erkek farelerin l-metiyonin yüklemesine bağlı olan oksidatif strese, MSSde l-metiyonin yüklemesinin tetikleyebileceği diğer zararlı hücrel ve moleküler yolların aktive olması ve akabinde oluşan akut hasara daha yatkın olması muhtemeldir. Ancak bu olasılığın immünohistokimyasal analizlerle doğrulanması gerekmektedir.

İlginç bir şekilde çalışmamızın ilerleyen aylarında NMT-40'ta 6. ayda su alan dişi fareler ile l-metiyonin alan dişi fareler karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gördük ($\chi^2_{(1, 19)} = 29,85$ ve $p < 0,0001$). Erkek farelere gelince 4. ayda gözlemlemiş olduğumuz NMT-40'taki kusur 6. ayda da devam etti; l-metiyonin alan erkek fareleri su alanlarla karşılaştırdığımızda aralarındaki fark istatistiki olarak anlamlı kaldı ($\chi^2_{(1, 19)} = 13,24$ ve $p = 0,0003$). Bu bilgi ışığında mekansal hafıza bozukluğunun erkeklerde akut dönemde (4. ay) başlayarak 6. ayda da sürdüğünü gözlemlemekteyiz. Ancak dişi farelerde akut dönemde herhangi bir mekansal hafıza bozukluğu

görülmekten en erken bulgular 6. ayda ortaya çıktı (Şekil 3). Bu sonuçlar bize erkek farelerin, NMT-40 testinin işlevini ölçtüğü mekansal hafızadan sorumlu hipokampal bölgelerinin l-metyoninin zararlı etkilerine dişilere göre daha duyarlı olabileceğini düşündürdü (Şekil 20).

9. aya geldiğimizde, sadece dişi farelerde su alanlarla karşılaştırıldığında metiyonin alan grubun mekansal hafızada kusur göstermeye devam ettiğini gözledik ($\chi^2_{(1, 19)} = 29,85$ ve $p < 0,0001$). Bununla birlikte aynı yaştaki erkek farelerin mekansal hafızalarını NMT-40 ile değerlendirdiğimizde 6. aya kadar süren hafıza kusurunun artık devam etmediğini gördük. Tüm testlerde kullandığımız fareler aynı olduğundan, 6. ayda su alan farelerin oransal olarak 9. aydaki su alan farelere göre daha başarısız olmaları ve daha sonrasında 9. ayda başarılı olmalarının sebebi 6. aydaki bazı farelerin teste katılım motivasyonunun düşüklüğüyle açıklanabilir. 9. aydaki erkek fareleri incelediğimizde su alan ve metiyonin alan fareler arasında belirli bir istatistiksel anlamlılık saptamadık ($\chi^2_{(1, 19)} = 0,7226$ ve $p = 0,3953$).

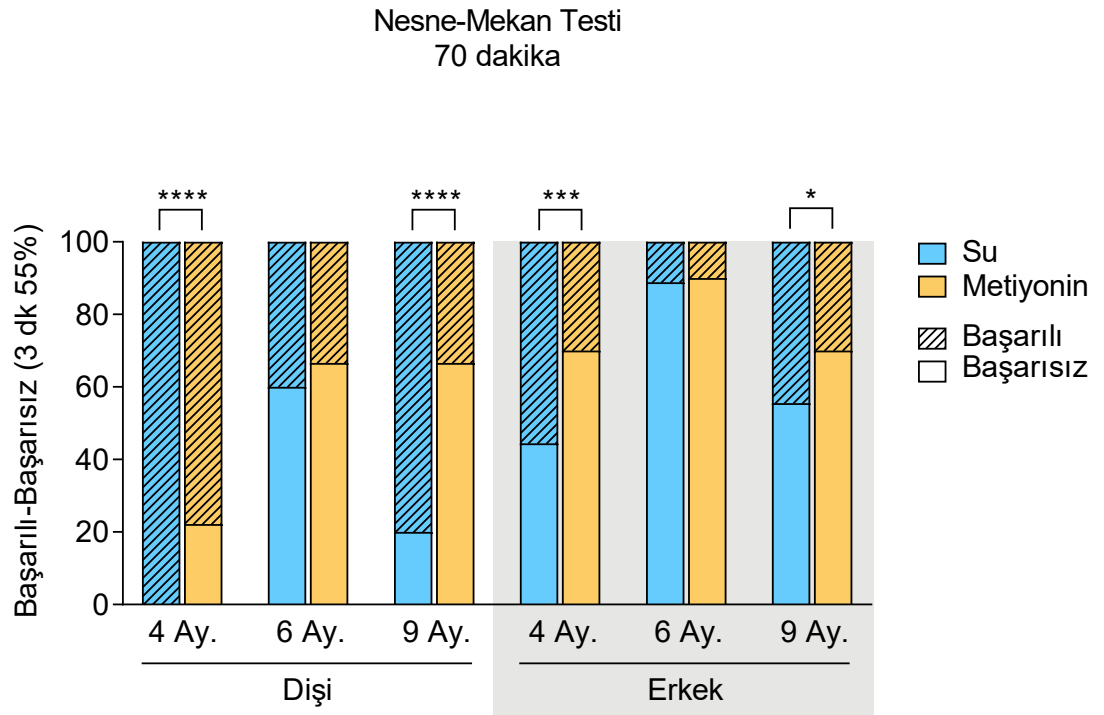


Şekil 20: Hipokampus Bağımlı Mekansal Hafıza Düzeyleri (NMT-40)

4. ayda NMT-70'i incelediğimizde (Şekil 21) metiyonin alan dişi farelerde su alan kontrol dişi farelere kıyasla başarılı-başarısız oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmektedir ($\chi^2_{(1, 19)} = 24,72$ ve $p < 0,0001$). Bu farkı daha öncesinde yaptığımız NMT-40 testinde görememiştik (Şekil 20). Bu oran farkının NMT-40'a kıyasla daha zor bir test olan NMT-70 testinde görülmesinin sebebi bu bozukluğun henüz çok yaygın olmaması olabilir. Erkek fareleri incelediğimizde ise NMT-70'te tıpkı NMT-40'ta olduğu gibi metiyonin alan farelerde su alan kontrol grubuna kıyasla başarılı-başarısız oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlemekteyiz. ($\chi^2_{(1, 19)} = 13,79$ ve $p = 0,3953$). Bu test bir kez daha erkek farelerde mekansal bir hafıza bozukluğunun varlığını göstermektedir.

NMT-70 6. ay NMT-40'ta gördüğümüzün aksine, su ve metiyonin alan dişi fareler arasında başarılı-başarısız oranı adına anlamlı bir fark görülmemektedir ($\chi^2_{(1, 19)} = 1,057$ ve $p = 0,3039$). NMT-40 sonuçlarını açıklarken de bahsettiğimiz gibi 6. ayda yaptığımız testlerde farelerde belirli bir motivasyon düşüklüğü olduğunu görmekteyiz. Şekil 21'e dikkatli bakıldığında 6. aydaki dişi kontrol farelerinin sanki hafıza kaybına girdiği ve 9. ayda bu bozukluktan kurtulduğu gibi bir anlam çıkabilmektedir. Ancak tüm zaman dilimlerinde aynı fareleri kullandığımızdan 6. aydaki bu farklılığı fare motivasyonu düşüklüğü ya da kullanılan nesnenin farelerde anksiyete yaratması vs. gibi etmenlerle açıklayabiliriz. Aynı şekilde erkek farelerde de hem su alan hem de metiyonin alan fare gruplarında teste katılma isteksizliğinden söz edebiliriz. 6. ayda erkek fareler arasında anlamlı bir fark olmasa da ($\chi^2_{(1, 19)} = 0,05321$ ve $p = 0,8176$) metiyonin alan grubun başarı adına oransal süregidişi devam etmektedir.

NMT-70'te 9. aya geldiğimizde 6. ayda hem dişi hem de erkek farelerde görülen motivasyon düşüklüğünün ortadan kalktığını ve hayvanların teste katıldıklarını gözlemliyoruz. 4. ayda dişi farelerde gözlemlediğimiz, su ve metiyonin alan fareler arasında başarılı-başarısız oranındaki farkın istatistiksel anlamlılığı 9. ayda da devam etmektedir ($\chi^2_{(1, 19)} = 44,94$ ve $p < 0,0001$). Dişilere paralel olarak erkeklerde de su ve metiyonin alan gruplar arasında başarılı-başarısız oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlemlenmektedir ($\chi^2_{(1, 19)} = 4,204$ ve $p = 0,0403$).



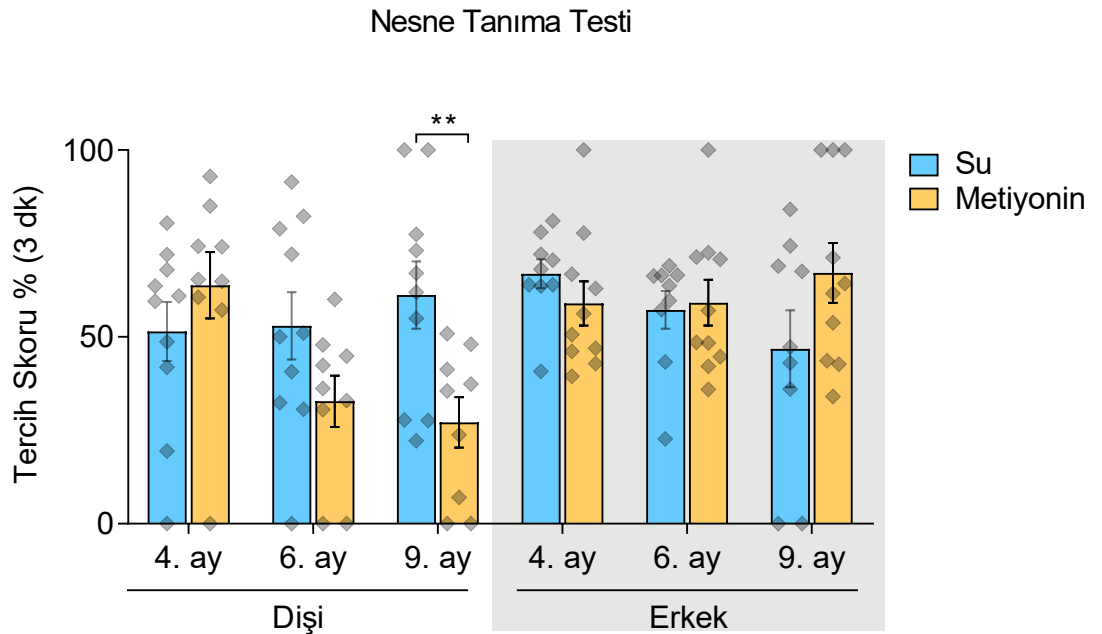
Şekil 21: Hipokampüs Bağımlı Mekansal Hafıza Düzeyleri (NMT-70)

Mekansal hafızayı test etmek için kullanılan NMT testinin zamanlaması geleneksel olarak 40 dakika ya da 70 dakika olarak seçilmiştir. Test koşullarında 40 dakikalık denemede anlamlı sonuç elde edildiğinde genelde 70 dakikalık test uygulamasına geçilmemektedir. Bununla birlikte bizim yukarıda karşılaştığımız gibi deney gruplarında bir sapma ortaya çıkarsa (9. ayda erkek fareler gibi) yaptığımız davranış testinin var olan işlev bozukluğunu tetkik etmekteki hassasiyetini sınavabilmek amacıyla NMT testlerinin 70 dakikada da tekrarlanması gerekmektedir. Nitekim dişi ve erkek fareleri mekansal hafızaları açısından NMT-70'e tabi tuttuğumuzda her iki cinste giderek ilerleyen bir hafıza kusuru saptanmıştır (dişiler 4. ay, 6. ay ve 9. ay ; erkekler 4. ay ve 9. ay). Ancak bu deney koşulunda ilginç bir şekilde erkek kontrol farelerin 6. ayda teste motive olamadıklarını gözlemlemiş bulunmaktayız. Bununla birlikte aynı kontrol hayvanların 3 ay yaşlandıktan sonra 9. ayda teste başarılı bir şekilde katıldıkları için bunun verilerin bütünlüğünü değiştirmeyen bir ayrıntı olduğunu düşünmekteyiz.

NMT-40 ve NMT-70 sonuçlarını incelediğimizde l-metiyoninin dişi ve erkek farelerde kronik bir mekansal hafıza bozukluğuna yol açtığını düşünmekteyiz.

4.1.2.5. Kontrol ve deney grubu farelerinin hipokampus ve kortikal ağlara bağlı öğrenme ve hafıza fonksiyonları açısından karşılaştırılması

Daha önce NMT ile incelediğimiz hipokampus odaklı mekansal hafıza bulgularına ek olarak diğer hafıza fonksiyonlarının ve öğrenmenin alt yapısını oluşturan, hipokampus dışındaki bölgeleri de kapsayan nöronal ağları test edebilmek için NTT'yi kullanmaya karar verdik. NTT'de kullanılan nesneler NMT'de kullanılanlara göre daha basit, üç boyutlu geometrik şekillerdir. NTT'de NMT'den farklı olarak objenin yeri değiştirilmez. Bir gün sonra objelerden birinin yerine tamamen farklı başka bir obje yerleştirilerek hafıza ve öğrenme test edilir. Bu test ile yalnızca hipokampusu değil, hafızanın ve öğrenmenin işlenmesine katılan diğer kortikal yapıları da (entorinal, peririnal ve parahipokampal) test etmiş olduk (Antunes and Biala 2012). Nesne tanıma testini, dişi ve erkek gruplarında ayrı ayrı iki yönlü ANOVA ile analiz ettiğimizde iki değişken (zaman ve metiyonin alıp almamış olmak) arasında anlamlı bir farklılık gözlemledik ($F_{(2, 34)} = 4,631$ ve $p = 0,0166$). Akabinde yaptığımız Sidak çoklu karşılaştırma post-hoc analizi sonrasında, 9. ayda su alan ($n = 10$, $61,23 \pm 28,39$, %95 CI [40,92, 81,53]) ve metiyonin alan ($n = 9$, $27,10 \pm 20,21$, %95 CI 11,57, 42,64) farelerden, sadece dişi fareler arasında tercih skoru açısından anlamlı bir istatistiksel fark bulduk. Bununla birlikte su ve metiyonin almış erkek fareler NTT'de belirgin bir tercih skoru farkı göstermemiştir (Şekil 22).



Şekil 22: Hipokampus ve Diğer Kortikal Ağlara Bağımlı Hafıza Düzeyleri (NTT)

Bu bulgular bize dişi farelerde, erkek farelerin tersine hafıza fonksiyonlarına katılan ekstrasahipokampal bölgelerin l-metiyonin yüklemesine karşı özel bir hassasiyeti olabileceğini düşündürdü. Bu açıdan çalışmamız, cinsiyet farklılığının, çevresel stresörlerin, nöronlar üzerindeki seçici yıkıcı etkisini belirleyen rolünü tanımlayan daha önce yapılmış çalışmalarla uyum içindedir (de Olmos, Bueno et al. 2008, Duffy, Schaner et al. 2011, Scharfman and MacLusky 2014).

Dişi ve erkek fareler arasında gözlemlediğimiz farklı hafıza ve öğrenme bozukluğunun nedenleri çok çeşitli açılardan irdelenebilir. Erkek hayvanlarda gözlemlenen salt hipokampüse dayanan NMT bozukluğu, erişkin fare beyinlerinin endokrin faktörlere bağlı direncinden kaynaklanabilir. Nitekim, östrojenin hipokampüsteki hücreler üzerindeki koruyucu etkisi pek çok yayının ana temasını oluşturmuştur (Brann, Dhandapani et al. 2007, Raghava, Das et al. 2017, Zárte, Stevnsner et al. 2017). Bu savı destekleyenler, kadınlarda menopoza sonrası artan bunama insidansını bu şekilde açıklamışlardır (Wise, Dubal et al. 2001, Scheyer, Rahman et al. 2018). Bununla birlikte erkek ve dişi fareler arasında belgelediğimiz değişik nöroanatomik bölgelerin hasarına bağlı hafıza bozuklukları, MSS gelişimi sırasında, embriyonik dönemde, puberte öncesi ve sonrasında endokrin faktörlerin nöronal ağların ve bunların altyapısını oluşturduğu bilişsel işlevler açısından özelleşmiş kortikal bölgelerin dağılımdaki cinsiyete özel belirleyici rollerine bağlı olabilir (Hanamsagar and Bilbo 2016). Örneğin, yapılan psikolojik ve fonksiyonel MRI testlerinde insanlarda hemisferik özelleşme incelendiğinde, bu farkın erkek beyinlerinde daha belirgin olduğu ortaya konmuştur. (Hier 1979, Sommer, Aleman et al. 2008, Gotts, Jo et al. 2013, Hirnstein, Westerhausen et al. 2013, Plessen, Hugdahl et al. 2014, Guadalupe, Zwiers et al. 2015). Bununla paralel diğer çalışmalarda dil ve hafıza fonksiyonlarının hemisferik dağılımının kadınlarda daha az seçici olduğu ortaya konmuştur. Bu fark kadınları ilk aşamada felç, nörodejeneratif hastalıkların neden olduğu hasarı kompanse edebilmek açısından daha başarılı kılabilir diye düşünülürken, uzun dönemde asosiyatif kortikal nöronal ağlara dayanan bütün bilişsel ve duygudurum fonksiyonlarının hasarı ile seyreden AH ve benzeri nörodejeneratif hastalıklara karşı daha mağdur duruma düşürebilir diye yorumlar yapılabilir. İlginç bir şekilde hamilelik dişi beyinde geri dönüşü olmayan bir değişmeye de neden olmaktadır. Buna dayanarak bazı araştırmacılar kadınlarda çocuk sayısı ve AH arasında bir korelasyon olup olmadığını araştırmaya karar vermişlerdir. Hamilelik aynı zamanda kardiyovasküler bir

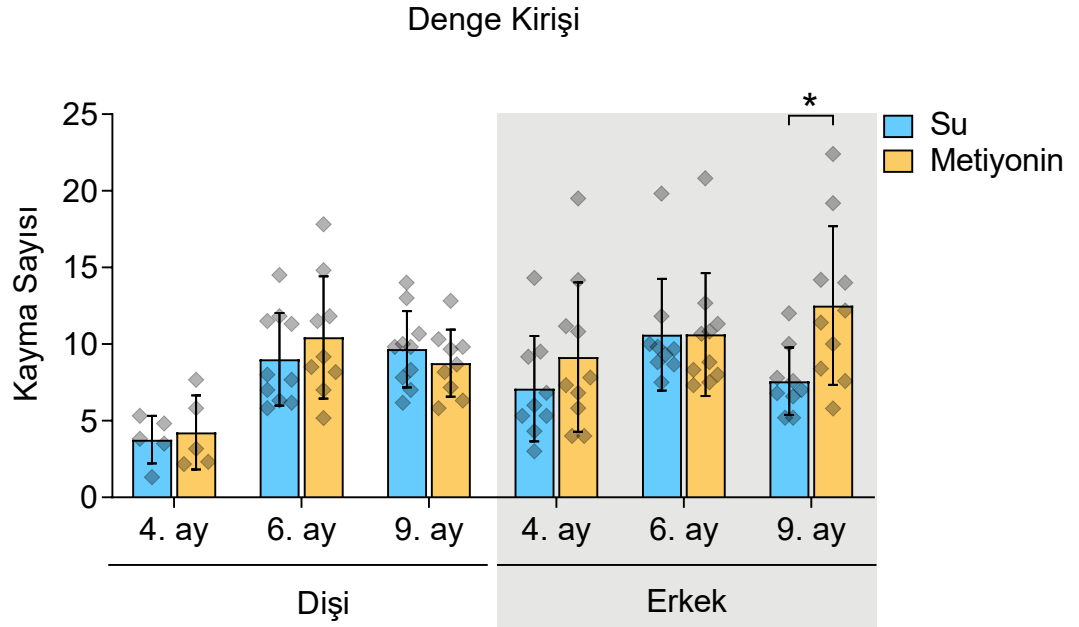
risk olarak da tanımlandığından analizlerinde vasküler demansı bağımsız bir değişken olarak tutmuşlardır. Bu çalışmaya göre artan çocuk sayısı ve AH nöropatolojisi arasında bir korelasyon bulmuşlardır (Beerli, Rapp et al. 2009). Öte yandan kadınlarda yaşam beklentisinin tüm dünyada daha uzun olması, AH açısından tek başına bağımsız bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır (Mielke, Vemuri et al. 2014). Daha önce yayınlanmış bu bulguları göz önüne alarak, çalışmamızda daha önce hamile olmuş fareler kullanmadık. İlaveten, bütün davranış testlerini eş zamanlı olarak karşılaştırılabilir yaşam dilimlerinde uyguladık. Gördüğümüz bulguların altında yatan hücresel değişiklikleri aşağıda daha detaylı olarak tartışacağız. İmmünohistokimyasal çalışmalarımızı daha önceden belirlediğimiz senesans ve nörodejeneratif değişikliklerin tetiklenmesi yolağına sınırlandıracağız. Nörodejenerasyon başlamadan ve başladıktan sonra nöronal ağların elektrofizyolojik fonksiyonlarında görülebilecek ince ve derin değişikliklerin incelenmesi son derece aydınlatıcı olma potansiyeli taşısa da çalışmamızın amaçlarını aşmaktadır.

Ayrıca her ne kadar entorinal ve peririnal korteksin cinsiyet farklılığına bağlı olarak hassasiyeti bizim çalışmamızda ve bizden önceki çalışmalarda ortaya konmuş olsa da bu nöroanatomik bölgelerin neden erkeklerde daha dirençli olduğunun fizyolojik varyansı daha detaylı çalışılmalıdır.

4.1.2.6. Kontrol ve deney grubu farelerinin motor fonksiyon açısından karşılaştırılması

AAT’de bariz bir motor bozukluğun var olup olmadığını incelemiş ve bariz bir bozukluk bulamamıştık. Ancak AAT motor bozukluk bulgularını tamamen ekarte etmeye yetecek bir test değildir. Bu yüzden daha detaylı bir motor koordinasyon testi olan denge kirişi testi (DKT) kullanmaya karar verdik. Bu test ile farelerin ince bir kiriş üzerinde yürürkenki denge kayıplarını, ön ve arka ayak kayma sayıları olarak not ettik. Bu test sonucunda dişi ve erkeklerden elde ettiğimiz sonuçları ayrı ayrı iki yönlü ANOVA testi ile inceledik. Dişilerde herhangi istatistiksel anlamlı bir fark bulamadık ($F_{(2, 25)} = 1,243$ ve $p = 0,0751$). Ancak erkek farelerde yaptığımız iki yönlü ANOVA’da kayma sayısı adına istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemledik ($F_{(2, 34)} = 4,052$ ve $p = 0, 0264$). Bu iki yönlü ANOVA sonrası yaptığımız post-hoc analizi olan Sidak çoklu karşılaştırma testinin sonucunda 9. ayda su ($n = 9, 7,578 \pm 2,199$, %95 CI [5,888, 9,268]) ve metiyonin alan ($n = 10, 12,52 \pm 5,178$, %95 CI [8,816, 16,22]) erkek fareler

arasında istatistiksel olarak kayma sayısı adına anlamlı bir fark gözlemledik ($p = 0,0170$).



Şekil 23: Motor Fonksiyon Düzeyleri

DKT'den elde ettiğimiz bu bilgiler doğrultusunda dişiler dış stresör metiyonin olsun ya da olmasın motor fonksiyon açısından tutarlı bir şekilde hayatlarına devam etmektedir. Ancak aynı şeyi erkek farelerde söylemek mümkün değildir. Erkek farelere dış stresör olarak metiyonin verildiğinde bunun cevabı olarak gecikmeli oluşan bir motor fonksiyon bozukluğunu gözlemlemekteyiz (Şekil 23).

Davranış testlerinden aldığımız bu sonuçları, aşağıda yapacağımız immünohistokimyasal (İHK) çalışmalarda hücrelerin nöroanatomik dağılımlarına göre hayatta kalımları ve nörodejeneratif değişiklikleri gösterme derecelerine göre daha derinlemesine inceleyeceğiz.

4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

Davranış testleriyle varlığını gösterdiğimiz hafıza bozukluklarının temel anatomik komponentlerindeki hücresel değişiklikleri çeşitli immünohistokimyasal boyamalarla inceledik. Bu bağlamda hafızanın temel nöroanatomik merkezi olan hipokampal yapıları incelemeye karar verdik.

Bununla birlikte gördüğümüz motor fonksiyon bozuklukları da bizi motor fonksiyonların afferent ve efferent kortikal yönetim merkezlerini incelemeye yöneltti (somatosensöriyel ve motor korteks). Hipokampal bölgelerde nöron ve mikrogliyal hücrelerin yoğunluklarında hiçbir değişiklik saptamadık.

Yaşlanmanın, endotel hücreleri, oligodendrositler ve nöral kök hücreler dahil olmak üzere, yaşlanan beynin diğer hücre tiplerinde meydana gelip gelmediği şu anda bilinmemektedir (Baker and Petersen 2018). Buna ek olarak yaptığımız ön çalışmalarda miyelinizasyon açısından kontrol ve deney hayvanlarının beyinlerinde herhangi bir farklılık saptamadık. Bu yüzden çalışmamızın bundan sonraki bölümlerinde dikkatimizi nöron, astrosit ve mikrogliyalarda üzerinde yoğunlaştırmaya karar verdik. Öncelikle kullandığımız İHK metotlarıyla hipokampal ve kortikal alanlarda bulunan hücrelerin yoğunluklarını inceledik. Ardından bu hücrelerin yaşamsallıklarını tehdit eden bir stres altında olup olmadıklarını saptamak adına bu hücreleri SA- β Gal ile işaretledik. Bununla birlikte ilerleyen yaşa paralel ya da l-metiyoninin özel etkisi dolayısıyla hücreler arası matrikste bir azalma olduğunda değerlendirdiğimiz bütün hücre gruplarının sayılarının bulundukları hipokampal alana oranının bizi yanlış yönlendirebileceğini düşünerek bütün grupların salt hücre sayısını vermek yerine o hücre grubunun sayısını bulunduğu yüz ölçüme oranını (hücre yoğunluğunu) sonuçlarımızda yansıttık. Her ne kadar birden fazla hücre markerının kolokalizasyonunu görüntülemek için altın standart immüno Floresan yöntemler olsa da, deneyleri yaptığımız esnada ticari olarak satılan SA β -Gal markerları ancak ışık mikroskopisi ile görüntülenemediğinden boyamalarımızı 3,3-DAB ve SA β -Gal ile gerçekleştirdik.

Anlaşılmayı kolaylaştırmak adına bulgularımızı Şekil 24-25-26-27-28'de kompozit olarak gösterdik. Bu 6 şeklin her birinin A kısmında hangi bölgeyi incelediğimizi göstermesi adına anatomik bölgeyi karikatürize ettik. Kortikal bölgeleri incelediğimiz Şekil 27 ve 28'in A kısmında Santiago Ramon y Cajal'ın 1899 yılında yayınladığı "Comparative study of the sensory areas of the human cortex" adlı kitabındaki çizimini kullandık. Bu kompozitlerin B'den I'ya kadar olan kısımlarında kendi İHK preparatlarımızı bulduğumuz bulgular ışığında vermek istediğimiz mesajı göstermesi adına kullandık. Bu şekillerde beyaz ok ucu ile hem senesan hem de hücre antikorları (NeuN, GFAP vs.) ile ortak boyanan hücreleri, beyaz ok ile senesan olmayan hücreleri, sarı ok ile boyadığımız hücre markerıyla boyanmayan senesan hücreleri,

asterisk ile de damar boşluklarında karşılaştığımız senesan hücrelerini gösterdik. Ayrıca şekillerin J, K ve L kısımlarında sırasıyla DAB ile işaretlenen (NeuN, GFAP vs.) tüm hücrelerin yoğunluğunu, hem DAB ile hem de SA β -Gal ile işaretlenen hücre yoğunluğunu ve son olarak hem DAB ile hem de SA β -Gal ile işaretlenen hücrelerin tüm DAB ile işaretlenen hücrelere oranını gösterdik. Ayrıca bu grafiklerde istatistiksel anlamlılıkları su alanlar arasında “#”, metiyonin alanlar arasında “Δ” ve su ile metiyonin alanlar arasında “*” ile gösterdik. İstatistiksel anlamlılıkta kullandığımız sembollerin sayısını p sayısının derecesine göre belirledik (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$).

4.2.1. Hippokampal Bulgular

Davranış testlerinde gördüğümüz hafıza bozukluklarını incelemek için öncelikle hipokampüste İHK analizi yaptık. Bunun için hücreleri hem SA β -Gal hem de nöronal ve glial markerlar olan NeuN (nöronlar için), GFAP (astrositler için) ve Iba1 (mikroglialar için) ile işaretledik. Bu analizleri yaparken hipokampüsün 3 ana nöroanatomik bölgesi olan dentat girus, CA1 ve CA3’ü ayrı ayrı inceledik.

4.2.1.1. Dentat Girus – Nöron, Mikroglia ve Astrosit Bulguları

Yaptığımız incelemeler sonucunda nöron sayısını incelediğimizde dentat girus’ta herhangi istatistiksel olarak anlamlı bir nöron yoğunluğu değişikliğine rastlamadık. Buna paralel olarak senesan nöronların yoğunluğunda da herhangi bir değişiklik gözlemlemedik. Ayrıca, senesansa girmiş nöronların tüm nöronlara olan oranını incelediğimizde de bir fark gözlemlemedik. İncelediğimiz alanların yüz ölçümleri açısından da herhangi bir fark saptamadık. Bu bulgular l-metiyoninin yol açtığı hafıza kaybının direk nöronal kayıplara seyretmediğini düşündürmektedir.

Her ne kadar nöron yoğunluğunda bir azalma görmemiş olsak da, bu daha önce davranış testleriyle bulduğumuz hafıza bozukluğunun gerçekliğini bertaraf etmemektedir. Dentat girusta nöron kaybı dışında, oluşabilecek nöron-nöron ve nöron-glia arasındaki sinaptik kayıplar, artmış inflamasyon ve nöronal dejenerasyon da hafıza bozukluğuna sebep olabileceğinden ileride bu sayılan konular detaylıca incelenmelidir. İleriki çalışmalarımızda 12. ve 18. ay dişi ve erkek farelerden elde ettiğimiz hipokampüs dokularını elektron mikroskopisinde inceleyerek bu sorulara cevap vermeye çalışacağız.

Nöronlarda uyguladığımız kriterlere göre, mikroglia adına yaptığımız İHK analizlerinde Iba1+ hücre yoğunlukları adına hem dişi hem de erkek gruplarında anlamlı bir istatistiksel farklılığa rastlamadık.

Aynı istatistiki metotları uyguladığımızda, tüm mikrogliaların yoğunluğunda ya da senesansa girmiş mikrogliaların yoğunluğunda herhangi bir değişiklik saptamadık. Ayrıca, senesansa girmiş mikrogliaların tüm mikroglialara olan oranını incelediğimizde de bir fark gözlemlemedik. Bunlara ek olarak incelediğimiz alanların yüz ölçümü açısından herhangi bir fark saptamadık. Aynı şekilde artmış ya da azalmış bir SA β -Gal + mikroglia hücre yoğunluğu da gözlemlemedik.

Biz çalışmalarımızda reaktif ve reaktif olmayan mikroglia ayırt etmeksizin salt Iba1+ hücrelerin yoğunluklarını analiz ettik. Bu yüzden mikroglia ve senesan mikroglia yoğunluklarındaki bu sabitlik olası bir nöroinflamasyonu ekarte etmemelidir. İleriki çalışmalarımızda reaktif mikroglia markerlarıyla, mikroglia hücre gövdesi hacminin konfokal 3 boyutlu analizi ve mikroglial uzantıların fraktal analiziyle bu sonuçları tekrar irdeleyeceğiz.

Dentat girusta astrosit yoğunluklarını ve bu astrositlerin senesan olup olmadıklarını 4. 6. 9. ve 12. aylarda inceledik. Öncelikle dişilerde su alan ve metiyonin alan fareler arasında toplam astrosit yoğunluğunun zamana göre değişimini iki yönlü ANOVA ile inceledik ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamadık ($F_{(3, 11)} = 1,165$ ve $p = 0,3670$) (Şekil 24-J).

Her ne kadar toplam astrosit yoğunluğunda anlamlı bir fark göremesek de, SA β -Gal açısından incelendiğinde kontrol grubu farelerin astrositlerinin zamanla artan bir şekilde senesanaştığını görüyoruz. Bu dişi kontrol grubu astrosenesans yoğunluğu farklılığını iki yönlü ANOVA ile analiz ettiğimizde anlamlı bir fark gözlemledik ($F_{(3, 11)} = 6,716$ ve $p = 0,0077$). Daha sonra yaptığımız post-hoc analizi olan uncorrected Fisher's LSD testi ile, 4. ay su alan fareler ($n = 3$, $11,00 \pm 2,00$, %95 CI [6,032 , 15,97]) ile 12. ay fareler ($n = 3$, $52,00 \pm 1,732$, %95 CI [47,70 , 56,30]) arasında ($p = 0,0002$) , 6. ay su alan ($n = 3$, $23,33 \pm 9,504$, %95 CI [-0,2769 , 46,94]) ve 12. ay su alan fareler ($n = 3$, $52,00 \pm 1,732$, %95 CI [47,70 , 56,30]) arasında ($p = 0,0462$) ve son olarak 9. ay su alan ($n = 3$, $26,33 \pm 5,132$, %95 CI [13,59 , 39,08]) ve 12. ay su alan fareler ($n = 3$, $52,00 \pm 1,732$, %95 CI [47,70 , 56,30]) arasında ($p = 0,0227$) senesan astrosit yoğunluğu bakımından istatistiksel anlamlı farklılıklar gözlemledik. Bu sonuçlar

bize dişi kontrol grubunda, zamanla artan astrosit senesansı trendini ve bu trendin 12. ayda diğer aylara oranla istatistiksel bir anlam kazandığını göstermektedir (Şekil 24-K).

SA β -Gal+ astrositlerin yoğunluğunu iki yönlü ANOVA ile incelediğimizde su ve metiyonin alan dişi fareler arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık gözlemlemiştik. İki yönlü ANOVA sonrası yaptığımız post-hoc uncorrected Fisher's LSD analizi sonucunda 4. ayda su ($n = 3$, $11,00 \pm 2,00$, %95 CI [6,032 , 15,97]) ve metiyonin alan ($n = 3$, $33,33 \pm 10,41$, %95 CI [7,478 , 59,19]) dişi fareler arasında senesan astrosit yoğunluğu açısından istatistiksel anlamlı bir fark bulduk ($p = 0,0033$). Bu bulguya paralel olarak 9. ayda da su ($n = 3$, $26,33 \pm 5,132$, %95 CI [13,59 , 39,08]) ve metiyonin alan ($n = 3$, $40,67 \pm 8,505$, %95 CI [19,54 , 61,79]) dişi fareler arasında senesan astrosit yoğunluğu açısından istatistiksel anlamlı bir fark gözlemledik ($p = 0,0407$). Bu iki ayda metiyonin alan dişi farelerde su alanlara kıyasla artmış bir SA β -Gal astrosit yoğunluğu gözlemlememize karşın 12. ayda bu fark kapanmakta ve su alan dişi farelerin senesan astrosit yoğunluğunun metiyonin alanlara kıyasla daha fazla olduğu gözlemlenmektedir. Yapılan çift yönlü ANOVA ve post-hoc uncorrected Fisher's LSD çoklu karşılaştırma testi sonucunda senesan astrosit yoğunluğu 12. ayda su alan dişi fareler ($n = 3$, $52,00 \pm 1,732$, %95 CI [47,70 , 56,30]) ile metiyonin alanlar ($n = 2$, $33,50 \pm 0,7071$, %95 CI [27,15 , 39,85]) arasında istatistiksel anlamlılık da dikkat çekmektedir ($p = 0,0206$).

Şekil 24'teki hipokampal kesitlerin GFAP ve SA β -Gal boyamaları incelendiğinde su alan dişi farelerde senesan astrositlerin (beyaz ok başı) zamanla arttığı gözlemlenmektedir (Şekil 24 B-C-D-E). Her ne kadar 9. ayda astrosit olmayan (GFAP ile boyanmayan) senesan hücrelerin (sarı ok) sayıları artsa da, senesan astrosit sayısındaki artış ancak 12. ayda kendini göstermektedir.

Metiyonin alan dişi farelerde senesan astrositlerin 4. aydan itibaren sayıca yüksek olması ve zaman içerisinde bu sayıyı koruması bize artmış bir inflamasyonun varlığını düşündürmektedir. Ayrıca 12. ayda metiyonin alan dişi farelerdeki senesan astrositlerin ani yıkımının bu mekanizmanın apoptoz yolağını kapatmasına rağmen sonsuza kadar hayatta kalmadığını düşündürmektedir.

Bu bulgulara ek olarak, senesan astrositlerin tüm astrositlere oranına bakarak, var olan astrositlerin ne kadarının senesansa girdiğini, eğer hipokampüste azalan bir

astrosit yoğunluğu varsa bu azalmanın temelinde senesan astrositler mi yoksa senesan olmayan astrositler mi olduğunu anlamaya çalıştık.

Öncelikle su alan dişi farelerde senesan astrositlerin tüm astrositlere oranına iki yönlü ANOVA ile bakıldığında ($F_{(3, 11)} = 21,39$ ve $p < 0,0001$), akabinde de post-hoc analiz olarak uncorrected Fisher's LSD ile incelendiğinde: 4. ay ($n = 3$, $1,667 \pm 0,5774$, %95 CI [0,2324, 3,101]) ile 9. ay ($n = 3$, $4,333 \pm 0,5774$, %95 CI [2,899, 5,768]) arasında ($p = 0,0153$), 4. ay ($n = 3$, $1,667 \pm 0,5774$, %95 CI [0,2324, 3,101]) ile 12. ay ($n = 3$, $8,333 \pm 0,5774$, %95 CI [6,899, 9,768]) arasında ($p = 0,0025$), 9. ay ($n = 3$, $4,333 \pm 0,5774$, %95 CI [2,899, 5,768]) ile 12. ay ($n = 3$, $8,333 \pm 0,5774$, %95 CI [6,899, 9,768]) arasında ($p = 0,0202$) ve 6. ay ($n = 3$, $3,00 \pm 1,732$, %95 CI [-1,303, 7,303]) ile 12. ay ($n = 3$, $8,333 \pm 0,5774$, %95 CI [6,899, 9,768]) arasında ($p = 0,0153$) istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar görülmektedir. Bu oran farklılığı toplam astrosit yoğunluğunda bir değişiklik olmaması ve artan senesan astrosit yoğunluğuyla açıklamak mümkündür. Bu sonuç bize, artan senesan astrosit yoğunluğunun yeni astrosit doğumuna bağlı olmadığını, aksine var olan astrositlerin gitgide senesans mekanizmasına girdiğini düşündürmektedir. (Şekil 24-L)

Metiyonin alan dişi farelerdeki senesan astrositlerin tüm astrositlere olan oranına baktığımızda ise anlamlı istatistiksel farklılığın yalnızca 4. ($n = 3$, $6,333 \pm 0,5774$, %95 CI [4,899, 7,768]) ve 6. aylar ($n = 3$, $3,667 \pm 0,5774$, %95 CI [2,232, 5,101]) arasında olduğunu görmekteyiz ($p = 0,0153$). Su alanlara kıyasla metiyonin alan dişi farelerin hipokampuslarındaki astrosit senesans oranı dalgalanma göstermektedir. Bu değişkenliğin mikroçevre üzerindeki etkisi daha detaylıca incelenmelidir.

Son olarak su ve metiyonin alan fareleri iki yönlü ANOVA ile astrosit senesansının tüm astrositlere oranı açısından karşılaştırdığımızda ($F_{(3, 11)} = 21,39$ ve $p < 0,0001$), 4. ayda su ($n = 3$, $1,667 \pm 0,5774$, %95 CI [0,2324, 3,101]) ve metiyonin alan ($n = 3$, $6,333 \pm 0,5774$, %95 CI [4,899, 7,768]) dişi fareler arasında ($p = 0,0006$) ve 12. ayda su ($n = 3$, $8,333 \pm 0,5774$, %95 CI [6,899, 9,768]) ve metiyonin alan ($n = 2$, $4,500 \pm 0,7071$, %95 CI [-1,853, 10,85]) dişi fareler arasında istatistiksel anlamlı farklılık görülmüştür ($p = 0,0269$).

Tüm bu bilgiler ışığında, kontrol dişi farelerde astrositlerin yaşlanmayla birlikte senesanslaştığından yola çıkarak bunun fizyolojik bir süreç olduğu çıkarımına varabiliriz. Ancak metiyonin alan dişi farelerde (Şekil 24-F-G-H-I-K) 4. aydan itibaren başlayan ve

9. aya kadar giden kontrol düzeyine oranla yüksek senesan astrosit yoğunluğu, l-metiyoninin astrositler üzerinde bir etkisi olduğunu düşündürmektedir. Daha önce yayınlanmış bir çok çalışma bize bu astrosit senesansının dışarıdan verilen stresöre bağlı olarak kendini savunmanın da ötesine giderek hipokampüste inflamatuvar bir ortam yaratarak hafıza bozukluğu paternine yol açtığını düşündürmektedir. Bu inflamatuvar yanıtın apoptozis yolağını kapatıp, senesans yolağına girmiş astrositlerin SASP'ıyla alakalı olduğunu düşünmekteyiz. Zira senesan hücreler çevrelerine sayısız sitokin ve proteaz salgılamakta ve mikroçevrelerini büyük ölçüde etkilemektedirler (Cohen and Torres 2019). Ayrıca bir araştırmaya göre de senesan hücreler çevrelerindeki sağlıklı hücrelerin senesans yolağına girmelerini de tetiklemektedir (Acosta, Banito et al. 2013). Bu açıdan bakıldığında astrositlerin senesanslaşması nörodejeneratif yolakları aktive ederek bir kognitif yıkımın başlangıcına sebep olduğunu da düşündürmektedir.

Erkek fareleri incelediğimizde ise dişilerden farklı bir tabloyla karşılaştık. Öncelikle dişilerden farklı olarak, erkek farelerde astrosit yoğunluğu kontrol ve deney gruplarında zamanla bir artış trendi göstermektedir ve bu artış 9. aya kadar sürmekte ve 12. ayda durmaktadır (Şekil 25-J). Yaptığımız iki yönlü ANOVA ($F_{(3, 14)} = 4,002$ ve $p = 0,0299$) ve akabinde yaptığımız post-hoc uncorrected Fisher's LSD testi sonucunda bu astrosit yoğunluğu farkı su alan erkek farelerde 4. ay ($n = 3$, $537,3 \pm 78,87$, %95 CI [341,4 , 733,3]) ve 6. ay ($n = 3$, $797,3 \pm 52,00$, %95 CI [668,2 , 926,5]) arasında istatistiksel olarak anlamlılık taşıdığını gördük ($p = 0,036$). Metiyonin alan erkek farelerde istatistiksel anlamlı fark 6. ay ($n = 3$, $618,7 \pm 45,62$, %95 CI [505,3 , 732,0]) ve 9. ay ($n = 2$, $950,0 \pm 96,17$, %95 CI [85,98 , 1814]) arasında görülmektedir ($p = 0,0410$). Her ne kadar istatistiksel analizimiz 6. ayda su ($n = 3$, $797,3 \pm 52,00$, %95 CI [668,2 , 926,5]) ve metiyonin alan ($n = 3$, $618,7 \pm 45,62$, %95 CI [505,3 , 732,0]) erkek fareler arasında astrosit yoğunluğu adına anlamlı bir farklılık göstermiş olsa da ($p = 0,0121$) bu farklılığın belirli bir fizyopatolojik anlamından söz edememekteyiz çünkü takip eden aylarda bu fark yok olmaktadır. Muhtemelen kontrol ve deney hayvan sayısını arttırdığımızda bu fark ortadan kalkacaktır.

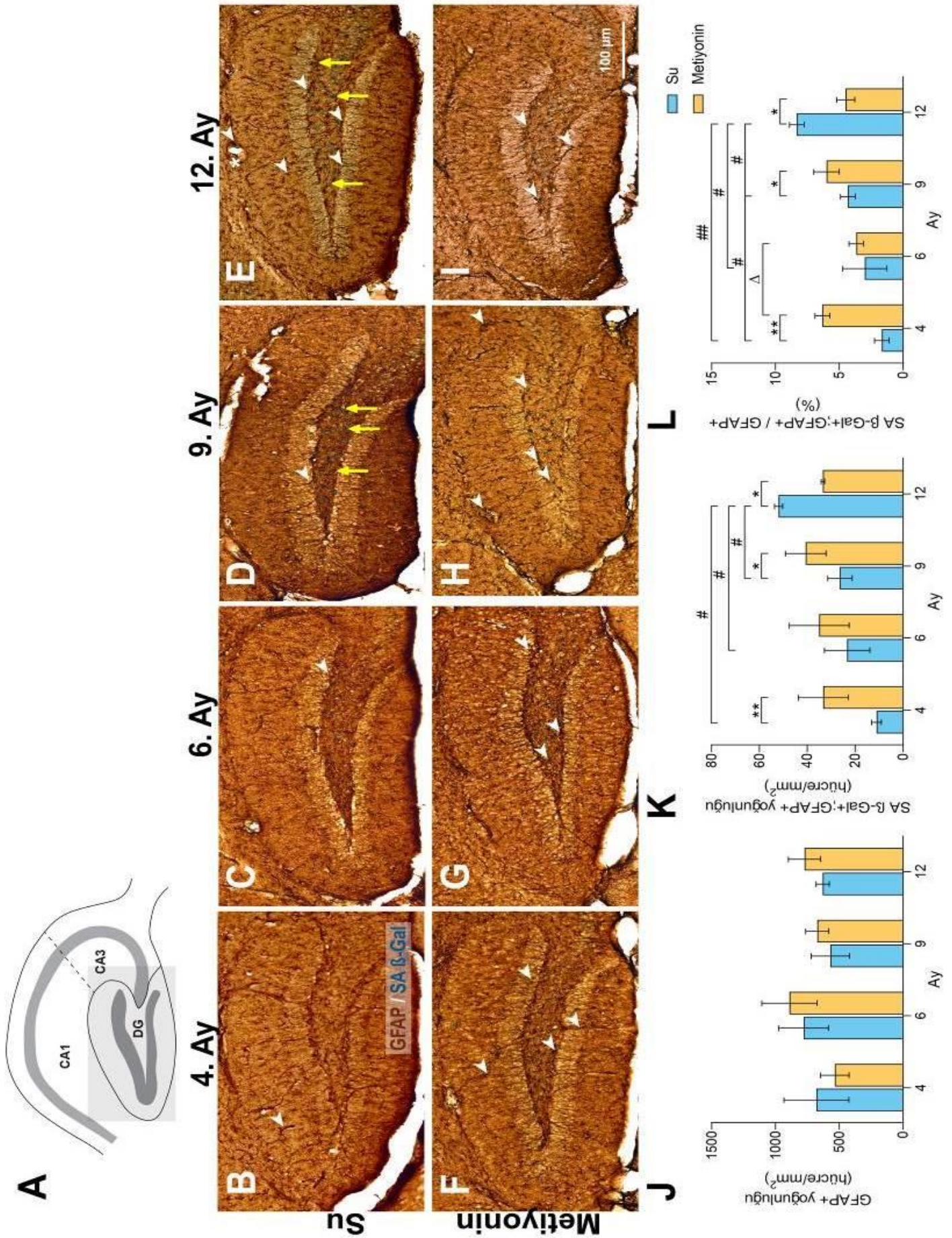
Erkek farelerin senesan astrosit yoğunluğunu incelediğimizde, bu yoğunluğun su alanlarda 9. aya kadar artma trendi gösterdiğini ve 12. ayda bir düşüşe geçtiğini görmekteyiz. Buna paralel olarak metiyonin alan erkek farelerin senesan astrosit yoğunluğu da aynı trendi izlemektedir. Her ne kadar kontrol ve deney grupları arasında iki yönlü ANOVA ($F_{(3, 14)} = 2,843$ ve $p = 0,0758$) ile anlamlı bir istatistiksel fark

bulamamış olsak da; metiyonin alan erkek farelerin senesan astrosit yoğunluklarının su alanlara kıyasla daha fazla olduğunu söylemek mümkündür (Şekil 25-B-C-D-E-F-G-H-I ve K).

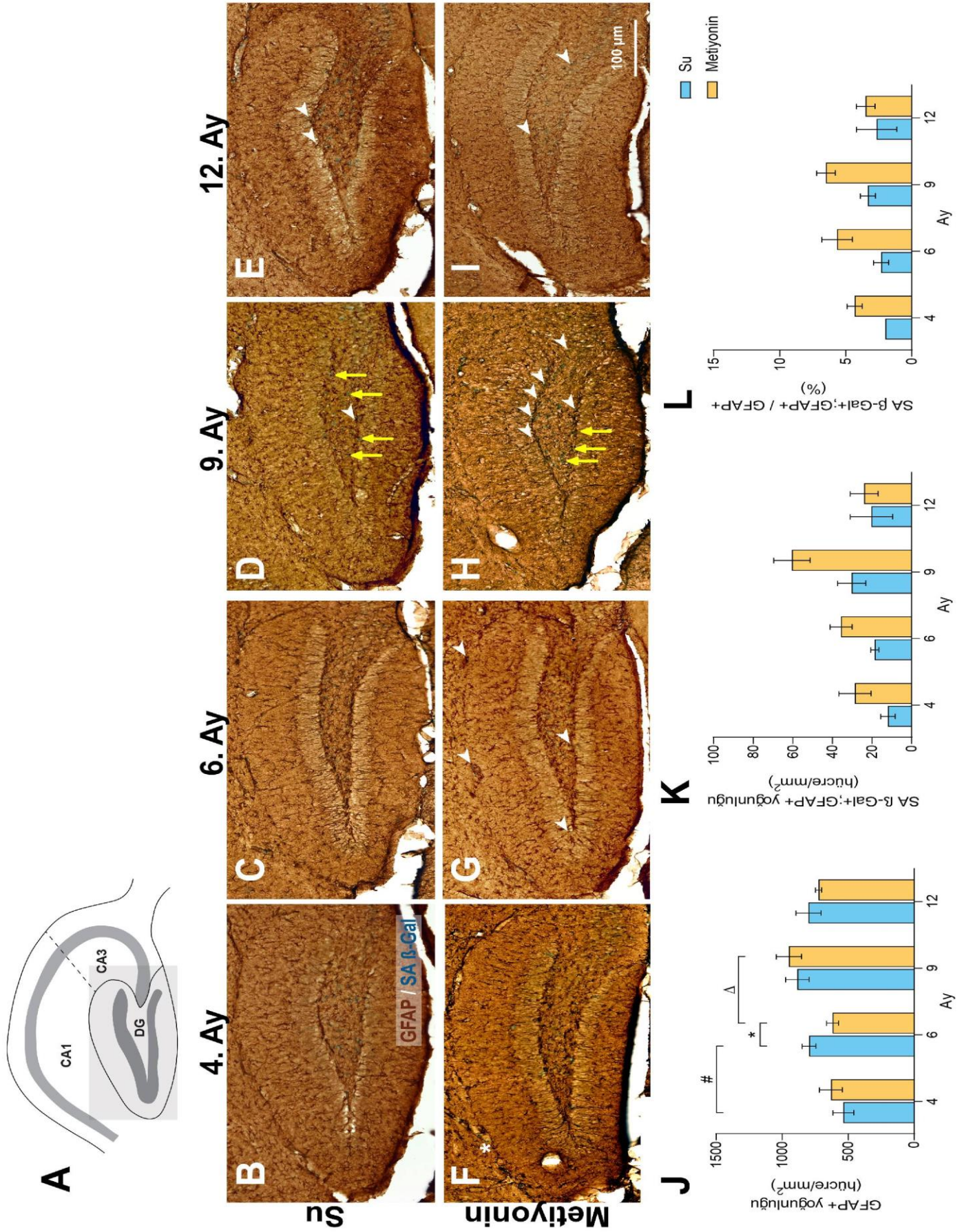
Son olarak erkek farelerin senesan astrositlerinin tüm astrositlere oranını incelediğimizde su alan farelerin senesan astrosit yoğunluğunun tüm dentat girus boyunca sabit ilerlediğini görmekteyiz (Şekil 25-L). Daha önce Şekil 25-J ve Şekil 25-K’de gösterdiğimiz gibi hem astrosit yoğunluğunda hem de senesan astrosit yoğunluğunda bir artış trendi vardı. Senesan astrositlerin tüm astrositlere olan oranının sabit kalışının nedeninin her iki yoğunluğun da (tüm astrositler ve senesan astrositler) aynı oranda arttığını bize düşündürmektedir.

Metiyonin alan erkek fareleri incelediğimizde ise, senesan astrositlerin tüm astrositlere oranının zaman içinde artmakta olduğunu görmekteyiz (Şekil 25-L). Daha önce yaptığımız iki yönlü ANOVA ($F_{(3, 14)} = 2,83$ ve $p = 0,0758$) sonucu burada da geçerli olduğundan herhangi bir istatistiksel anlamlı farklılık bulunamamıştır.

Bu bulgular ışığında erkek fareler tıpkı dişilerde olduğu gibi hem astrosit hem de senesan astrosit yoğunluğu açısından zaman içerisinde artma trendi göstermektedirler. Ancak dişilerden farklı olarak bu iki yoğunluğun artışı senesan astrositlerin tüm astrositlere olan oranına yansımaktadır. Böylelikle aslında erkek farelerdeki senesan astrosit yoğunluğu artışının, astrosit yoğunluğu artışından oransal olarak daha fazla olduğu çıkarımına varmaktayız.



Şekil 24: Dişi Farelerin Dentat Girusunda GFAP ve SA β -Gal ekspresyonu



Şekil 25: Erkek Farelerin Dentat Girusunda GFAP ve SA β-Gal ekspresyonu

4.2.1.2. CA1 ve CA3 – Nöron, Mikroglia ve Astrosit Bulguları

Yaptığımız incelemeler sonucunda nöron sayısını incelediğimizde CA1 ve CA3'te herhangi istatistiksel olarak anlamlı bir nöron yoğunluğu değişikliğine rastlamadık. Buna paralel olarak senesan nöronların ekspresyonunda da herhangi bir değişiklik gözlemlenemedi. Ayrıca, senesansa girmiş nöronların tüm nöronlara olan oranını incelediğimizde de bir fark gözlemlenemedi. İncelediğimiz alanların yüz ölçümü açısından herhangi bir fark saptamadık. Bu bulgular l-metiyoninin yol açtığı hafıza kaybının direk olarak nöronal kayıplara seyretmediğini düşündürmektedir.

Nöronlarda bağlı kaldığımız kriterlere göre, mikroglia adına yaptığımız İHK analizlerde Iba1+ hücre yoğunlukları adına hem dişi hem de erkek gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa rastlamadık.

Aynı istatistiki metotları uyguladığımızda, tüm mikrogliaların yoğunluğunda ya da senesana girmiş mikrogliaların yoğunluğunda herhangi bir değişiklik saptamadık. Ayrıca, senesansa girmiş mikrogliaların tüm mikroglialara olan oranını incelediğimizde de bir fark gözlemlenemedi. İncelediğimiz alanların yüz ölçümü açısından da herhangi bir fark saptamadık. Bu açıdan nöronlar ve mikroglialar açısından CA1 ve CA3 dentat girusla benzer sonuçlar vermiştir.

CA1'de astrositler adına tıpkı nöron ve mikroglia analizlerimizdeki sonuçlar gibi hiçbir istatistiksel anlamlı fark gözlemlenemedi.

CA3'te hem dişi hem erkek farelerde astrosit yoğunlukları, senesan astrosit yoğunlukları ve senesan astrositlerin tüm astrositlere olan oranı adına çeşitli istatistiksel anlamlı farklılıklar gözlemlenmedi. Bulgularımıza öncelikle dişi farelerle başlayacağız sonrasında erkek farelerdeki istatistiksel analizleri aktaracağız.

Dişi farelerin hipokampuslerinin CA3 bölgesinde yaptığımız GFAP İHK boyamasıyla elde ettiğimiz sonuçlarda su ve metiyonin alan fareler arasında astrosit yoğunluğu açısından istatistiki anlamlı (iki yönlü ANOVA testi) bir fark bulamadık ($F_{(3, 11)} = 1,565$ ve $p = 0,2533$).

Senesan astrositlerin yoğunluğunu iki yönlü ANOVA ile incelediğimizde ($F_{(3, 15)} = 6,957$ ve $p = 0,0037$) dişi fareler arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi. Daha sonrasında yaptığımız post-hoc analiz olan uncorrected Fisher's LSD test ile su alan dişi farelerde, 4. ay ($n = 3$, $15,67 \pm 1,528$, %95 CI [11,87, 19,46]) ile 6. ay ($n = 3$, $25,67 \pm$

3.215 , 95% CI [17,68 , 33,65]) arasında ($p = 0,0131$) , 4. ay ($n = 3$, $15,67 \pm 1,528$, %95 CI [11,87 , 19,46]) ile 9. ay ($n = 3$, $61,33 \pm 16,86$, %95 CI [19,45 , 103,2]) arasında ($p = 0,0358$), 4. ay ($n = 3$, $15,67 \pm 1,528$, %95 CI [11,87 , 19,46]) ile 12. ay ($n = 3$, $89,00 \pm 22,65$, %95 CI [32,74 , 145,3]) arasında ($p = 0,0342$), 6. ay ($n = 3$, $25,67 \pm 3,215$, %95 CI [17,68 , 33,65]) ile 9. ay ($n = 3$, $61,33 \pm 16,86$, %95 CI [19,45 , 103,2]) arasında ($p = 0,0464$) ve son olarak 6. ay ($n = 3$, $25,67 \pm 3,215$, %95 CI [17,68 , 33,65]) ile 12. ay ($n = 3$, $89,00 \pm 22,65$, %95 CI [32,74 , 145,3]) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu gözlemledik ($p = 0,0482$).

Metiyonin alan dişi farelere baktığımızda ise, senesan astrosit yoğunluğu açısından istatistiksel anlamlı farkın 4. ay ($n = 3$, $28,33 \pm 9,452$, %95 CI [4,854 , 51,81]) ile 6. ay ($n = 3$, $52,00 \pm 7,000$, %95CI [34,61 , 69,39]) arasında olduğunu gözlemlemekteyiz ($p = 0,0037$).

Su alan dişi fareler ile metiyonin alan dişi fareleri yine aynı iki yönlü ANOVA'nın akabinde yaptığımız post-hoc uncorrected Fisher's LSD teste göre incelendik. 6. ayda su alanlar ($n = 3$, $25,67 \pm 3,215$, %95 CI [17,68 , 33,65]) ile metiyonin alanlar ($n = 3$, $52,00 \pm 7,000$, %95 CI [34,61 , 69,39]) arasında ($p = 0,0331$) ve 12. ayda su alanlar ($n = 3$, $89,00 \pm 22,65$, %95 CI [32,74 , 145,3]) ile metiyonin alanlar ($n = 2$, $42,50 \pm 3,536$, %95 CI [10,73 , 74,27]) arasında ($p = 0,0021$) CA3 bölgesindeki senesan astrosit yoğunluğu açısından istatistiksel anlamlı bir fark gözlemledik.

Şekil 26-K'deki grafikte de görüldüğü gibi su alan dişi farelerin CA3'teki senesan astrositlerin yoğunluğu zaman içerisinde artmaktadır. Buna paralel olarak metiyonin alan dişi farelerin de senesan astrositlerinin yoğunluğunda bir artış varken 12. ayda bu yoğunluk artışının bariz bir düşüş yaşadığını gözlemlemekteyiz.

Dişi farelerin CA3'ünde son olarak incelediğimiz senesan astrositlerin tüm astrositlere olan oranının gruplar arasında ve zamana bağlı değişimini iki yönlü ANOVA testi ile inceledik ve anlamlı bir fark gözlemledik ($F_{(3, 15)} = 3,437$ ve $p = 0,0442$). Ardından yaptığımız post-hoc analizi uncorrected Fisher's LSD test ile incelediğimizde su alan dişi fareler arasında, bahsedilen oran açısından, 4. ay ($n = 3$, $2,187 \pm 0,3179$, %95 CI [1,397 , 2,976]) ile 9. ay ($n = 3$, $10,00 \pm 2,486$, %95 CI [3,824 , 16,18]) arasında ($p = 0,0330$), 4. ay ($n = 3$, $2,187 \pm 0,3179$, %95 CI [1,397 , 2,976]) ile 12. ay ($n = 3$, $11,39 \pm 3,332$, %95 CI [3,108 , 19,66]) arasında ($p = 0,0409$),

6. ay ($n = 3$, $2,353 \pm 0,3177$, %95 CI [1,564 , 3,143]) ile 9. ay ($n = 3$, $10,00 \pm 2,486$, %95 CI [3,824 , 16,18]) arasında ($p = 0,0314$) ve son olarak 6. ay ($n = 3$, $2,353 \pm 0,3177$, %95 CI [1,564 , 3,143]) ile 12. ay ($n = 3$, $11,39 \pm 3,332$, %95 CI [3,108 , 19,66]) arasında ($p = 0,0454$) istatistiksel olarak anlamlı farklar gözlemledik.

Erkek fareleri incelemeye geçecek olursak, erkek farelerin hipokampuslerinin CA3 bölgesinde yaptığımız GFAP İHK boyamasıyla elde ettiğimiz sonuçlarda su ve metiyonin alan farelerin arasında zaman değişkeni de dahil olmak kaydıyla astrosit yoğunluğu açısından istatistiki anlamlı (iki yönlü ANOVA testi) bir fark gözlemledik. ($F_{(3, 14)} = 5,252$, $p = 0,0123$). Ardından yaptığımız post-hoc analiz olan uncorrected Fisher's LSD testi ile su alan erkek farelerde yalnızca 4. ay ($n = 3$, $638,7 \pm 53,30$, %95 CI [506,3 , 771,1]) ile 9. ay ($n = 3$, $1188 \pm 158,2$, %95 CI [794,9 , 1581]) arasında astrosit yoğunluğu adına anlamlı bir fark gözlemledik ($p = 0,0457$).

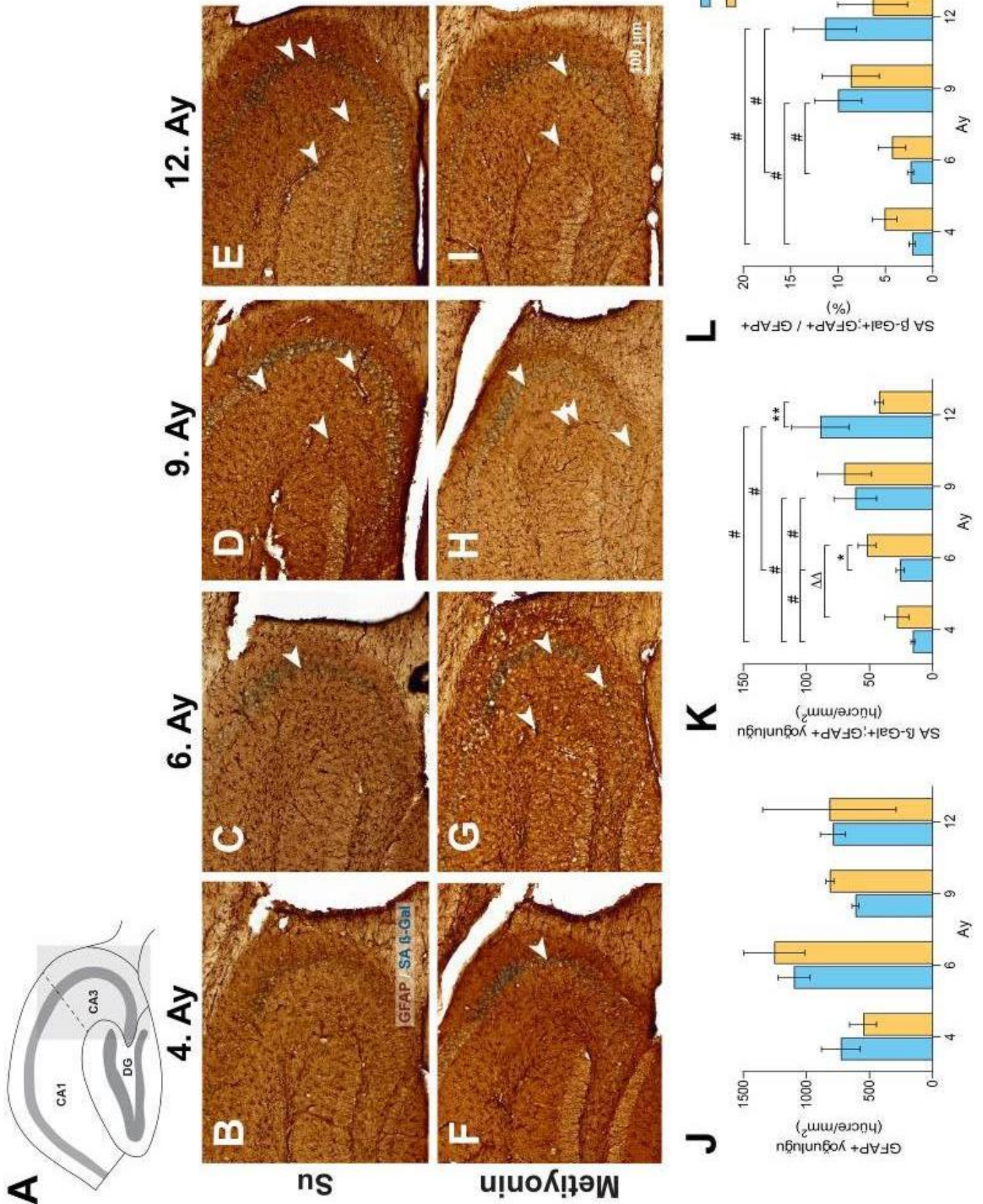
Metiyonin alan erkek fareler arasında astrosit yoğunluğu açısından anlamlı bir fark gözlemlemedik.

Su alan erkek fareler ile metiyonin alan erkek fareleri karşılaştırdığımızda, 4. ayda su alan erkek fareler ($n = 3$, $638,7 \pm 53,30$, %95 CI [506,3 , 771,1]) ile metiyonin alan erkek fareler ($n = 3$, $920,0 \pm 116,8$, %95 CI [629,8 , 1210]) arasında ($p = 0,0349$), 9. ayda su alan erkek fareler ($n = 3$, $1188 \pm 158,2$, %95 CI [794,9 , 1581]) ile metiyonin alan erkek fareler ($n = 2$, $782,0 \pm 117,4$, %95 CI [-272,6 , 1837]) arasında ($p = 0,0093$) astrosit yoğunluğu açısından istatistiksel anlamlı farklar gözlemledik.

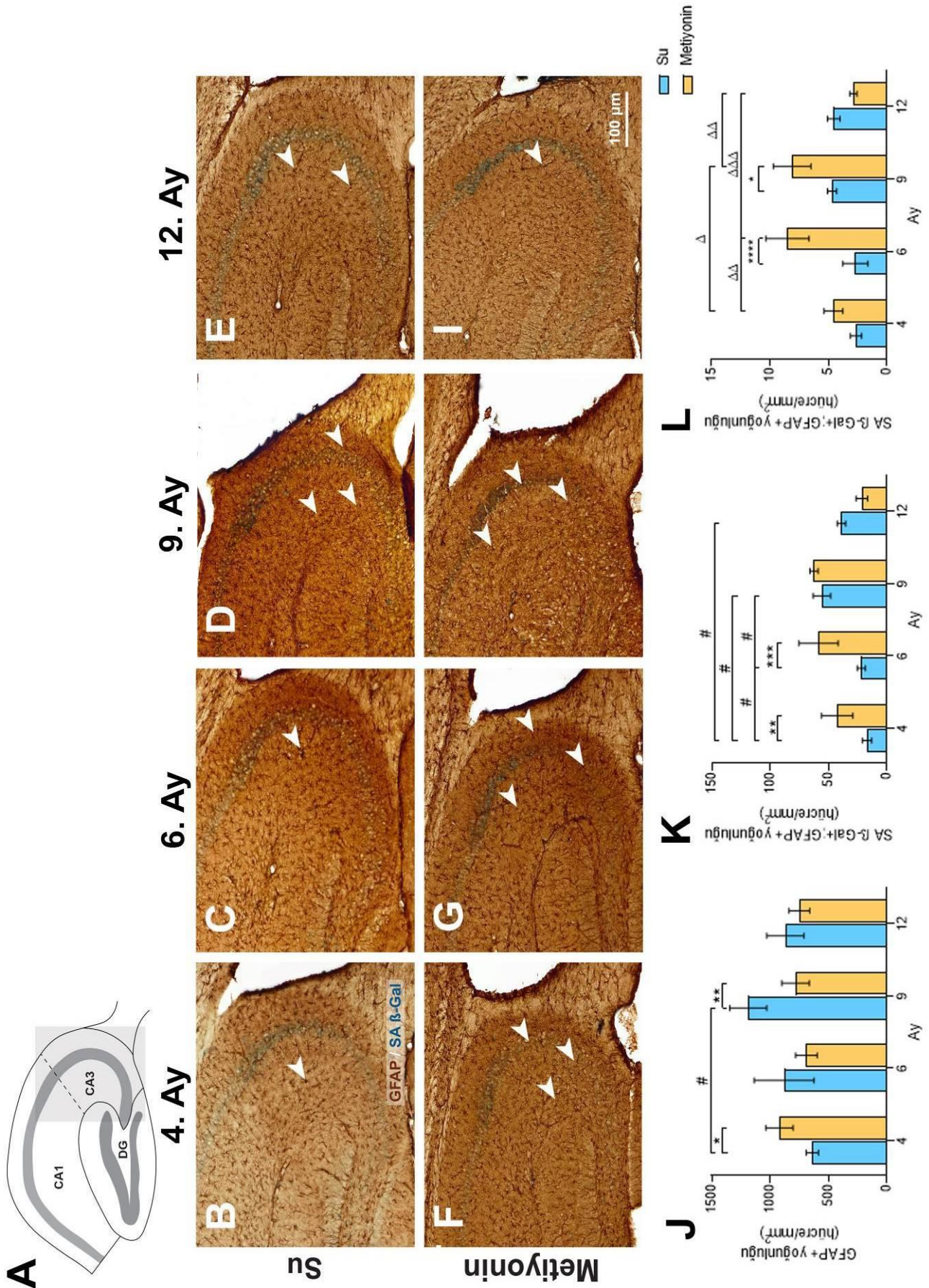
Erkek farelerin senesan astrosit yoğunluğunu su-metiyonin ve zaman değişkenleri açısından iki yönlü ANOVA ile incelediğimizde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gördük ($F_{(3, 14)} = 9,010$, $p = 0,0014$). Ardından post-hoc analiz uncorrected Fisher's LSD testi ile incelediğimizde su alan erkek fareler arasında CA3'te senesan astrosit yoğunluğu açısından 4. ay ($n = 3$, $17,00 \pm 4,000$, %95 CI [7,063 , 26,94]) ile 6. ay ($n = 3$, $22,00 \pm 3,606$, %95 CI [13,04 , 30,96]) arasında ($p = 0,0131$), 4. ay ($n = 3$, $17,00 \pm 4,000$, %95 CI [7,063 , 26,94]) ile 9. ay ($n = 3$, $55,67 \pm 7,506$, %95 CI [37,02 , 74,31]) arasında ($p = 0,0157$), 4. ay ($n = 3$, $17,00 \pm 4,000$, %95 CI [7,063 , 26,94]) ile 12. ay ($n = 3$, $39,00 \pm 3,606$, %95 CI [30,04 , 4,96]) arasında ($p = 0,0321$) ve son olarak 6. ay ($n = 3$, $22,00 \pm 3,606$, %95 CI [13,04 , 30,96]) ile 9. ay ($n = 3$, $55,67 \pm 7,506$, %95 CI [37,02 , 74,31]) arasında ($p = 0,0162$) istatistiksel olarak anlamlı farklar

gözlemledik. CA3'te senesan astrositlerin yoğunluğunu incelediğimizde metiyonin alan erkek farelerin kendi aralarında bir anlamlı fark göstermediğini gördük. Su alan ve metiyonin alan erkek fareler kıyaslandığıdaysa, 4. ayda su alan erkekler ($n = 3$, $17,00 \pm 4,000$, %95 CI [7,063 , 26,94]) ile metiyonin alan erkekler ($n = 3$, $42,67 \pm 13,32$, %95 CI [9,586 , 75,75]) arasında ($p = 0,0038$) ve 6.ayda su alan erkekler ($n = 3$, $22,00 \pm 3,606$, %95 CI [13,04 , 30,96]) ile metiyonin alan erkekler ($n = 3$, $58,67 \pm 16,77$, %95 CI [17,00 , 100,3]) arasında ($p = 0,0002$) senesan astrosit yoğunluğu açısından istatistiksel anlamlı farklar gözükmemektedir.

Erkek farelerin CA3'ündeki senesan astrositlerin tüm astrositlere olan oranını iki yönlü ANOVA ile inceledik ve bu oran açısından istatistiksel anlamlı bir fark gözlemledik ($F_{(3, 10)} = 13,68$, $p = 0,0007$). Ardından yaptığımız post-hoc analizi olan uncorrected Fisher's LSD test ile su alan erkekler arasında anlamlı bir fark gözlemlemedik. Ancak metiyonin alan erkeklerin zaman değişkeninde kendi aralarında bu oran açısından 4. ay ($n = 3$, $4,577 \pm 0,8085$, %95 CI [2,568 , 6,585]) ile 6. ay ($n = 3$, $8,510 \pm 1,856$, %95 CI [3,900 , 13,12]) arasında ($p = 0,0032$), 4. ay ($n = 3$, $4,577 \pm 0,8085$, %95 CI [2,568 , 6,585]) ile 9. ay ($n = 2$, $8,115 \pm 1,619$, %95 CI [-6,434 , 22,66]) arasında ($p = 0,0188$), 6. ay ($n = 3$, $8,510 \pm 1,856$, %95 CI [3,900 , 13,12]) ile 12. ay ($n = 2$, $2,860 \pm 0,3111$, %95 CI [0,06463 , 5,655]) arasında ($p = 0,0005$) ve 9. ay ($n = 2$, $8,115 \pm 1,619$, %95 CI [-6,434 , 22,66]) ile 12. ay ($n = 2$, $2,860 \pm 0,3111$, %95 CI [0,06463 , 5,655]) arasında ($p = 0,0024$) istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlemledik. Son olarak, yaptığımız post-hoc analizi uncorrected Fisher's LSD test ile su alan erkek fareler ile metiyonin alanlar arasında bahsedilen oran açısından inceledik. 6. ay su alan erkek fareler ($n = 3$, $2,697 \pm 1,073$, %95 CI [0,03153 , 5,362]) ile metiyonin alan erkek fareler ($n = 3$, $8,510 \pm 1,856$, %95 CI [3,900 , 13,12]) arasında ($p < 0,0001$) ve 9. ay su alan erkek fareler ($n = 3$, $4,683 \pm 0,3955$, %95 CI [3,701 , 5,666]) ile metiyonin alan erkek fareler ($n = 2$, $8,115 \pm 1,619$, %95 CI [-6,434 , 22,66]) arasında ($p = 0,0122$) istatistiksel anlamlı bir fark gözlemledik.



Şekil 26: Dişi Farelerin Hipokampus CA3'ünde GFAP ve SA β-Gal ekspresyonu



Şekil 27: Erkek Farelerin Hipokampus CA3'ünde GFAP ve SA β -Gal ekspresyonu

4.2.2. Kortikal Bulgular

Korteksteki İHK incelemelerimizi daha önce yaptığımız davranış testlerinin ışığında gösterdiğimiz motor bozuklukları incelemek adına, primer motor korteks ve somatosensöriyel korteks üzerinde yoğunlaştırdık. Bu iki kortikal alanda hipokampüste uyguladığımız NeuN, GFAP, Iba1 ve SA β -Gal boyamalarını kullandık. Her iki kortikal alan için hücre yoğunluklarını ve oranlarını tüm kortikal katmanlarda ayrı ayrı hesapladık (katman I, katman II-III, katman IV, katman V ve katman VI). Bu analizlerin sonucunda DKT’de gördüğümüz su alan erkek fareler ile metiyonin alan erkek fareler arasındaki motor fonksiyon farkını anlamaya çalışacağız.

4.2.2.1. Primer Motor Korteks Nöron, Mikroglia ve Astrosit Bulguları

Hem dişi hem de erkek farelerde yaptığımız İHK analizler sonucunda ne mikrogliyalarda ne de astrositlerde (astrosit ekspresyonu kortekste yok denecek kadar az) hücre yoğunluğu, senesan hücre yoğunluğu ve senesan hücre oranı açısından herhangi bir fark saptamadık. Ancak NeuN ve SA β -Gal NeuN ekspresyonu açısından incelediğimizde sadece erkeklerde VI. katmanda çeşitli istatistiksel anlamlı farklılıklara rastladık.

Erkek farelerin primer motor kortekslerinin VI. katmanında bulunan NeuN+ nöronların yoğunluğunu iki yönlü ANOVA ile incelediğimizde gruplar arasında herhangi bir anlamlı fark bulamadık ($F_{(3, 13)} = 1,937$ ve $p = 0,1735$). Şekil 28-J’de de görüldüğü üzere VI. Katmandaki NeuN+ nöron sayısı zamana ve metiyonin alıp almamaya göre istatistiksel bir anlamlı fark yaratacak düzeyde değişmemektedir.

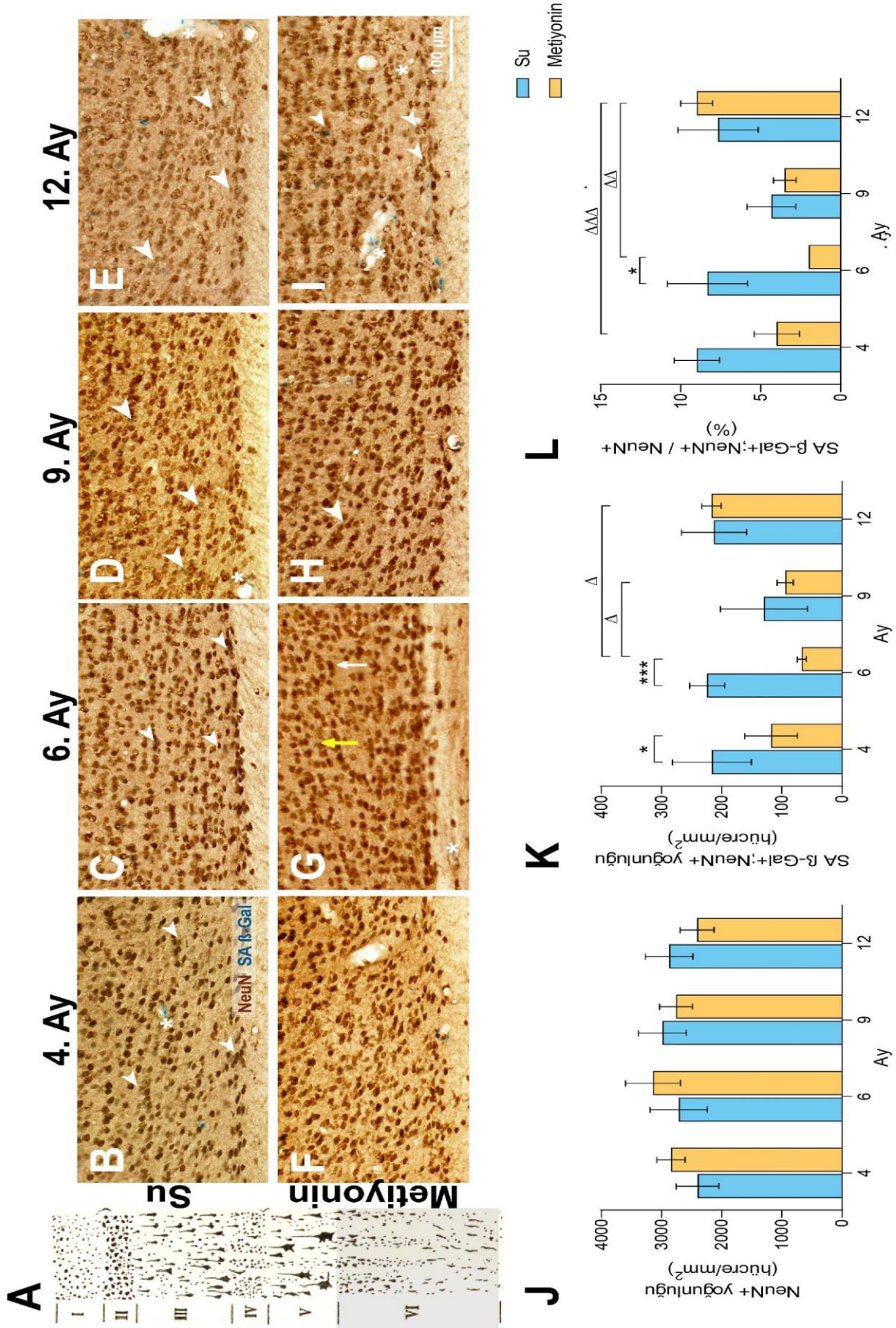
SA β -Gal ve NeuN ile ortak boyanan hücrelerin (senesan nöronlar) yoğunluğunu iki yönlü ANOVA ile incelediğimizde ($F_{(3, 13)} = 3,791$ ve $p = 0,0374$) anlamlı bir istatistiksel fark bulduk. Akabinde yaptığımız post-hoc analizi olan uncorrected Fisher’s LSD ile incelediğimizde su alan erkek senesan nöron yoğunluğunun zaman içerisinde değişmediğini gözlemledik. Ancak metiyonin alan erkek farelerde 6. ay ($n = 3$, $67,00 \pm 7,550$, %95 CI [48,25, 85,75]) ile 9. ay ($n = 2$, $94,50 \pm 13,44$, %95 CI [-26,21, 215,2]) arasında ($p = 0,1735$) ve 6. ay ($n = 3$, $67,00 \pm 7,550$, %95 CI [48,25, 85,75]) ile 12. ay ($n = 3$, $217,0 \pm 16,00$, %95 CI [177,3, 256,7]) arasında ($p = 0,0067$) istatistiksel olarak anlamlı farklar gözlemledik. Ayrıca 4. ayda su alan ($n = 2$, $216,5 \pm 65,76$, %95 CI [-374,3, 807,3]) ve metiyonin alan ($n = 2$, $118,0 \pm 43,84$, %95 CI [-275,9, 511,9]) erkek farelerin arasında ($p = 0,0428$) ve 6. ayda su alan ($n = 3$, $224,3 \pm$

29,26 , %95 CI [151,6 , 297,0]) ve metiyonin alan ($n = 3$, 67,00 $\pm$ 7,550 , %95 CI [48,25 , 85,75]) erkek farelerin arasında ($p = 0,0007$) da senesan nöron yoğunluğu açısından istatistiksel anlamlı farklılıklar bulunmuştur.

Senesan nöronların tüm nöronlara oranını istatistiksel olarak incelediğimizde, iki yönlü ANOVA sonucunda ($F_{(3, 9)} = 6,420$, $p = 0,0129$) anlamlı bir farklılık olduğunu görmekteyiz. İki yönlü ANOVA sonrasında yaptığımız post-hoc analizi uncorrected Fisher's LSD testinin sonucuna göre su alan erkek fareler arasında zaman içerisinde senesan nöronların tüm nöronlara oranı açısından herhangi bir istatistiksel anlamlı fark olmadığı görülmektedir. Metiyonin alan farelerde ise 4. ay ($n = 2$, 4,00 $\pm$ 1,414 , 95% CI [-8,706 , 16,71]) ile 12. ay ($n = 3$, 9,000 $\pm$ 1,000 , %95 CI [6,516 , 11,48]) arasında ($p < 0,0001$) ve 6. ay ($n = 3$, 2,000 $\pm$ 0 , %95 CI [2,000 , 2,000]) ile 12. ay ($n = 3$, 9,000 $\pm$ 1,000 , %95 CI [6,516 , 11,48]) arasında ($p = 0,0067$) bu oran adına istatistiksel olarak anlamlı farklar görülmektedir.

Bu bulgular bize normalde sabit yoğunlukta nöronların ve senesan nöronların varlığını ve zaman içerisinde (ilk 12 ay) bu yoğunlukların değişmediğini göstermiştir. Bir dış stresör olarak l-metiyonin verildiğinde ise erkek farelerin primer motor kortekslerinin VI. katmandaki bu nöronların senesans yolağına ilk aşamada (ilk 6 ay) girmediklerini ya da giremediklerini düşündürmektedir. Ancak daha sonra (9. aydan itibaren), dış stresörün senesan nöron yoğunluğu üzerindeki etkisinin ortadan kalktığı gözlemlenmektedir. Bu ilk 6 aylık süreçteki gecikmiş nöronal senesans yoğunluğunun DKT'de gözlemlediğimiz motor bozukluğa olan katkısı konusunda literatür araştırmasının sonucunda herhangi bir araştırmaya rastlamadık. Bu konunun araştırılması bizce elzemdir.

Motor fonksiyonlar yalnızca primer motor kortekse değil aynı zamanda hareketin planlanmasından başlatılmasına ve çevre algısına kadar bir çok kompleks yolak ve nöroanatomik yapı tarafından kontrol edilmektedir. Bu çalışmamızı primer motor korteks ve somatosensöriyel korteks olarak sınırlandırmış olsak da, ileri de bazal gangliaları oluşturan yapıları (globus pallidus, ventrolateral striatum, substantia nigra pars reticulata, substantia nigra pars compacta vs.) ve serebellumu da incelemeyi planlamaktayız.



Şekil 28: Erkek Farelerin Primer Motor Korteks VI. Katmanında NeuN ve SA β -Gal ekspresyonu

4.2.2.2. Somatosensöriyel Motor Korteks Nöron, Mikroglia ve Astrosit Bulguları

Motor fonksiyonların düzgün çalışabilmesi için çevreden alınan uyarıların düzgün işlenebilmesi ve kortikal yapılar arasında yapılan iletişimin de sağlam olması gerekmektedir. Bu açıdan primer motor korteks dışında duyuşal stimulusların işlendiğı somatosensöriyel kortekste ki nöron ve senesan nöron yoğunluklarını araştırmaya karar verdik.

Hem dişi hem de erkek farelerde yaptığımız İHK analizleri sonucunda tıpkı primer motor kortekste olduğı gibi, somatosensöriyel kortekste de ne mikroglialarda ne de astrositlerde hücre yoğunluğu, senesan hücre yoğunluğu ve senesan hücre oranı açısından herhangi bir fark saptamadık.

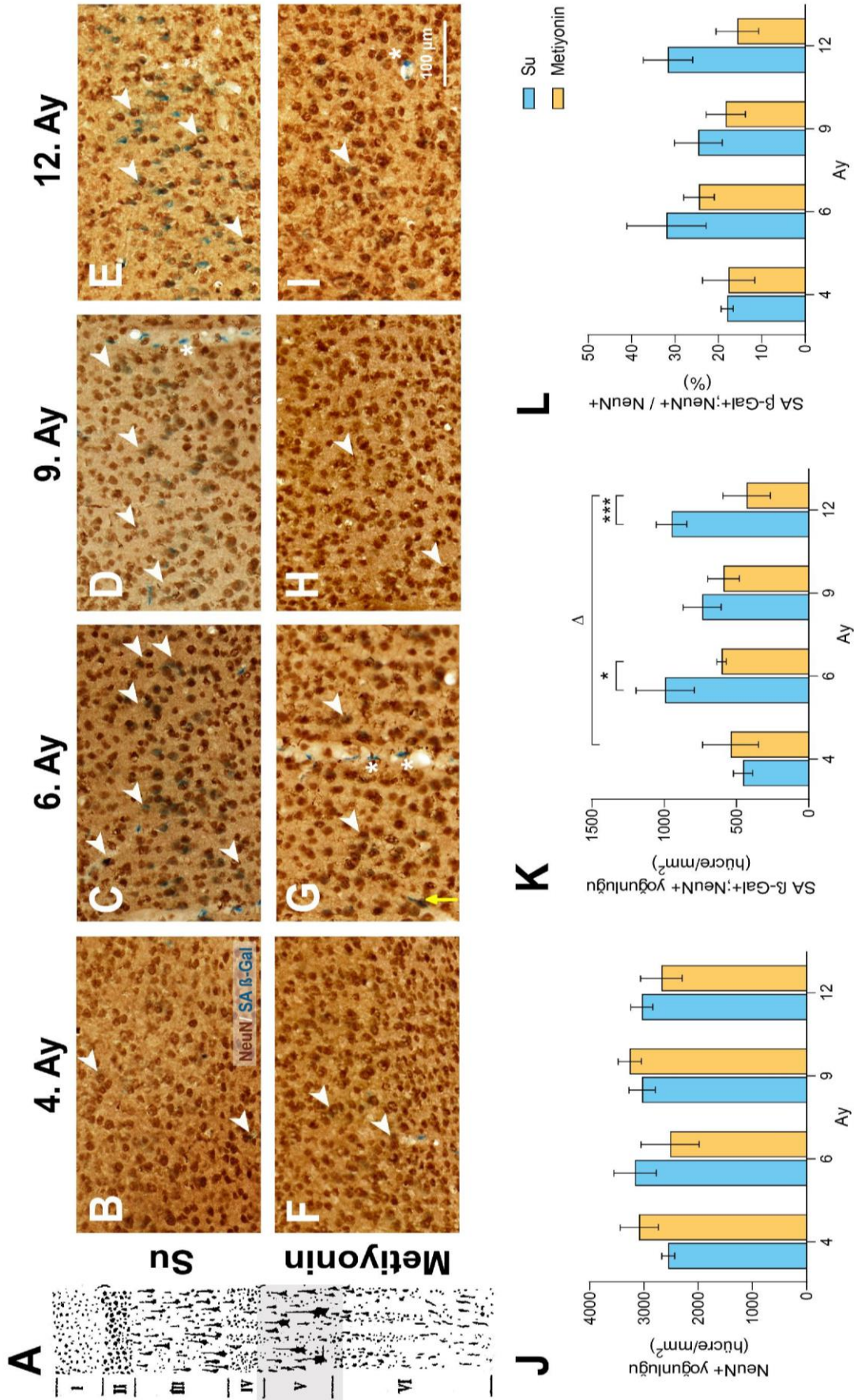
Ancak NeuN ve SA β -Gal NeuN ekspresyonu açısından incelediğimizde sadece erkeklerde V. katmanda çeşitli istatistiksel anlamlı farklılıklara rastladık.

Öncelikle istatistiksel incelememize erkek farelerin somatosensöriyel korteks V. katmanındaki toplam nöron yoğunluğuyla başladık. Şekil 29 -B'den -I'ya gösterdiğimiz İHK preparatları ve Şekil 29-J'deki grafikten de anlaşılacağı üzere, nöron yoğunluğu açısından gruplar arasında bir fark bulamadık. İstatistiksel analizini iki yönlü ANOVA ile yaptık ve anlamlı bir istatistiksel fark olmadığını gördük. ($F_{(3, 10)} = 3,590$ ve $p = 0,0541$).

SA β -Gal ve NeuN ile ortak boyanan hücrelerin (senesan nöron) yoğunluğunu iki yönlü ANOVA ile incelediğimizde ($F_{(3, 10)} = 4,478$ ve $p = 0,0307$) anlamlı bir istatistiksel fark bulduk. Akabinde yaptığımız post-hoc analizi olan uncorrected Fisher's LSD ile incelediğimizde su alan erkek farelerin senesan nöron yoğunluğunun zaman içerisinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratacak şekilde değişmediğini gözlemledik. Ancak metiyonin alan erkek farelerde 4. ay ($n = 3$, $541,7 \pm 193,4$, %95 CI [61,36, 1022]) ile 12. ay ($n = 3$, $430,3 \pm 164,1$, %95 CI [22,66, 838,0]) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemledik ($p = 0,0226$). Ayrıca 6. ayda su ($n = 3$, $995,0 \pm 201,9$, %95 CI [493,6, 1496]) ve metiyonin alan ($n = 2$, $604,0 \pm 32,53$, %95 CI [311,8, 896,2]) erkek farelerin arasında ($p = 0,0107$) ve 12. ayda su ($n = 3$, $951,0 \pm 106,2$, %95 CI [687,3, 1215]) ve metiyonin alan ($n = 3$, $430,3 \pm 164,1$, %95 CI [22,66, 838,0]) erkek farelerin arasında ($p = 0,0006$) da SA β -Gal ve NeuN ile ortak boyanan hücre yoğunluğu açısından istatistiksel anlamlı farklılık bulunmuştur.

Son olarak senesan nöronların tüm nöronlara oranını istatistiksel olarak incelediğimizde , iki yönlü ANOVA sonucunda ($F_{(3, 14)} = 1,698$ ve $p = 0,2130$) anlamlı bir farklılık olmadığını görmekteyiz.

Günümüze kadar yapılan araştırmalar hücrel senesansın yarattığı patolojinin, bu hücrelerin yaşlanmayla birlikte dokularda birikmesi ve immün hücreler tarafından temizlenememesinin yarattığı inflamatuvar ortamdan kaynaklandığını göstermişlerdir (Herranz and Gil 2018). Biz çalışmamızda biriken senesan hücrelerinin yanı sıra zaman içerisinde anormal dalgalanmalarla giden bir nöronal senesans yanıtının da varlığını gözlemledik (Şekil 28-K). Bu bulgular bize senesans mekanizmasının, aktive olduğu ortamlarda artık madde gibi birikmesi ve hastalığa yol açmasının yanı sıra senesansın dinamik bir süreç olduğunu ve bu sürecin bozulmasının nörodejenerasyonda rolü olabileceğini düşündürdü.



Şekil 29: Erkek Farelerin Somatosensöriyel Korteks V. Katmanında NeuN ve SA β -Gal ekspresyonu

5. TARTIŞMA

Hiperhomosisteinemi kemirgen modelleri uzun yıllardır çok farklı hastalık etiyopatogenez araştırılmasında kullanılmaktadır (Montalescot 1996, Quéré, Hillaire-Buys et al. 1997). Kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklardan retinal inflamasyona kadar birçok patolojinin araştırmasında hiperhomosisteinemi modelleri kullanılmıştır (McCully 1969, Elsherbiny, Sharma et al. 2020). Homosistein, bulunduğu ortamda sahip olduğu sülfür bağı nedeniyle çevresindeki moleküllerle artmış elektron alışverişinde bulunarak Red/Ox dengesini bozmaktadır (Bellamy and McDowell 1997, Chen, Wu et al. 2015). Bu durum bu aminoasitin çok farklı patofizyolojik yollarda etkili olmasına neden olmaktadır (Sikora, Lewandowska et al. 2020).

Biz bu çalışmada kronik l-metiyonin yüklemesine tabi tutulmuş farelerde, bu negatif etkinin beyinde hangi hücre gruplarını etkilediğini araştırmak istedik. Cinsiyetlerine ve yaşlarına göre karşılaştırılabilir gruplara ayrılmış fareleri, standardize edilmiş çeşitli davranış testleriyle inceledik. Bu çalışmaları yaparken seçtiğimiz l-metiyonin yükleme dozunun organ yetmezliğine neden olabilecek eşiğin altında olmasına özen gösterdik (Hånell and Marklund 2014). Bu yükleme sonucunda beklemediğimiz bir şekilde sadece hipokampüse bağlı mekansal hafızada bozulma olmadığını ayrıca bütün hafıza fonksiyonlarına katılan diğer kortikal ağların ve motor fonksiyonların da bozulduğunu gözlemledik. Kognitif bozukluğu hem dişi, hem de erkek farelerde gösterirken motor fonksiyon bozukluğunu yalnızca erkek farelerde gösterebildik. Ayrıca erkek farelerin dişilere kıyasla NMT ile test edilen mekansal hafızada farklı bozukluk gidişatı gösterdiğini de gözlemledik (Tapia-Rojas, Lindsay et al. 2015, Thériault and Perreault 2019). Bu farklılık bize, dişi ve erkek fare cinslerinin l-metiyonin yüklemesine karşı değişik dirence sahip olduğunu düşündürdü. Cinsiyet farklılığının davranış paternleri üzerine etkisi ile ilgili bir çok yayın yapılmış olmasına rağmen (Eltokhi, Kurpiers et al. 2020), bu farklılığın alt yapısını oluşturan nöroanatomik alanların cinsiyete göre işlevselliği ve stresör hassasiyetleri henüz tam anlamıyla anlaşılamamıştır.

Daha önce yapılan çalışmalarda hafıza fonksiyonlarının teste tabi tutulan öznenin duygu durumundan etkilenebileceği gösterilmiştir (Darcet, Mendez-David et al. 2014). Bununla birlikte bizim çalışmamızda kullandığımız hiperhomosisteinemi

modelinde ne dişi, ne de erkek farelerde anksiyete ve depresyon gözlemlenmedi. Böylelikle olası duygudurum değışikliklerinin hafıza testlerinin sonuçlarını etkileme ihtimalini ortadan kalkmış oldu. Bu açıdan bakıldığında kullandığımız modelin salt hafıza bozukluğunu incelemek açısından avantajlı olduğu ortaya çıkmaktadır.

Çalışmamızda nörodejenerasyonun sinir sisteminde etkilediğı alanların yaygınlığını incelemek açısından bilişsel ve duygudurum testlerinin yanı sıra motor ve denge testlerini de kullandık. Yalnızca erkek farelerde geç dönemde (9. ay) bir motor bozuklukla karşılaştık. Dolayısıyla yaptığımız çalışmada hiperhomosisteineminin olumsuz etkisine en fazla duyarlı alanın öncelikli olarak hipokampal bölgeler olduğu çıkarımına vardık. Bununla birlikte uzun dönemde l-metiyonin yüklemesinin etkileri sinir sisteminde yaygın hasara da neden olabilir. Öte yandan hipokampo-kortikal devrelere bağı hafıza üzerinde yalnızca dişilerde geç dönemde (9. ay) anlamlı bir farklılık bulmuş olmamız ve motor fonksiyon bozukluğunun yalnızca erkeklerde geç dönemde (9. ay) ortaya çıkması, ya bu bölgelerin l-metiyonin etkisine daha dirençli olduğunu, ya da bu devreleri oluşturan diğ er nöroanatomik alanlarda (striatum, substantia nigra, entorinal korteks vb.) bilişsel ve motor işlevleri negatif etkileyebilecek nörodejenerasyonun daha geç oluştuğunu düşündürmektedir. Bu söz konusu anatomik ve hücresel değışiklikleri yaptığımız İHK testlerle daha derinlemesine inceledik.

Günümüze kadar nörodejenerasyonu açıklayan moleküler yollar içinde oksidatif stres (Beal 1995), apoptoz (Mattson 2000), bağırsak disbiyozu (Kowalski and Mulak 2019), hücresel senesans (Saez-Atienzar and Masliah 2020) vb. pek çok mekanizma öne sürülmüştür. Bu çalışmamızda l-metiyonin yüklemesinin akabinde hipokampüste hücre kaybı olmaksızın, hücresel senesans mekanizmasının özellikle astrositlerde artmış olduğunu gösterdik.

Hipokampüs formasyonundaki dentat girus, entorinal korteksten perforan yolk aracılığıyla aldığı inputları modüle edip patern ayırıştırması yaptıktan sonra bu bilgileri CA3'e aktararak mekansal hafızanın işlenmesine ve saklanmasına yardım eder (Senzai 2019). Dentat girus gerek değışken nöronal plastisite işleviyle, gerekse ender görülen erişkin tip nöroenezin odağı olması açısından (Nakashiba, Cushman et al. 2012) çok dinamik bir nöroanatomik yapıdır. Böylesine dinamik bir ortamda homeostazın korunması tüm hücre tiplerinin belirli bir ahenk içerisinde çalışmasını gerektirmektedir. Hipokampüste artan senesans astrosit yoğunluğunun, davranış testleri sonucu

gözlemlediğimiz hafıza bozukluğuyla korelasyon göstermesi, bize astrositlerin bu homeostaz bozukluğunda öncül ve önemli bir faktör olabileceğini düşündürdü. Bizim bulgularımız da daha önce AH ve astrositler üzerine yapılmış birçok çalışma ile paralellik göstermektedir (Myung, Zhu et al. 2008, Salminen, Ojala et al. 2011). Bu çalışmalardan en önemlisi AH'ye yakalanmış bireylerin post-mortem beyin dokusu incelemelerinde artmış senesans astrosit sayısına işaret etmektedir (Bhat, Crowe et al. 2012).

Hücrel senesans ilk tanımlandığında çeşitli stresörlere maruz kalan hücrenin kanserleşmeyi önlemek adına geliştirdiği bir savunma yöntemi olarak tanımlanmıştır. Bu teori senesansı, kanserleşme ve apoptoz arasında seçim yapmak durumunda kalan hücrenin, hücre siklusundan çıkıp, apoptotik yolları geçici olarak inhibe edip on yıllar boyunca temel işlevlerini idame ettirebildiği bir dönem olarak tanımlanmıştır (Calcinotto, Kohli et al. 2019). Ancak bu savunma mekanizması hücreyi ilelebet koruyamamaktadır. Senesansa giren hücreler, daha önce de belirttiğimiz gibi İHK yöntemlerle SA β -Gal boyası ile belirlenir. Ancak son yıllarda yapılan immünohistokimyasal çalışmalar bu SA β -Gal boyamasının, kanser dışındaki sinir sisteminin embriyonik gelişiminde programlı hücre ölümünden çok çeşitli nörodejeneratif süreçlere varan ortamlarda senesansa girmiş hücrelerin varlığını göstermiştir (Piechota, Sunderland et al. 2016). Bu bağlamda embriyonik gelişim ya da nörodejenerasyon sürecinde hücrel senesansın kanserde olduğu gibi genetik, epigenetik ve çevresel stresler tarafından işlevselliği bozulmuş hücrelerin ayıklanmasını tetikleyen bir süreç mi olduğu, yoksa bu özel hücrel konumlarda nörodejenerasyonu engellemek için geliştirilmiş bir savunma mekanizması mı olduğu, ya da tam tersine nörodejenerasyonu başlatan moleküler yolları aktive mi ettiği bilinmemektedir. Son olarak hücrel senesans, bütün bu fizyolojik gelişimsel ve patolojik süreçlerden bağımsız olarak, moleküler yollarla ortaya çıkan epifenomenolojik değişiklikleri de yansıtır olabilir. Bu soruları cevaplayabilmek için daha sonraki çalışmalarımızda l-metionin yüklemesi yapılmış farelerde uzun dönemde hipokampüste ve hafızayı destekleyen diğer nöroanatmik alanlarda ortaya çıkabilecek ultrastrüktürel değişimleri incelemeyi amaçlıyoruz. Böylece hücrel senesans mekanizmasının tek başına nörodejenerasyonu başlatmaya yeterli olup olmadığını açıklamaya çalışacağız.

Her ne kadar bizim çalışmamız, hafıza ve motor bozukluklarıyla korelasyon gösteren spesifik nöroanatomik alanlardaki senesans astrosit/nöron yoğunluğu değişiminin varlığı göstermiş olsa da bu senesans mekanizmasının nörodejenerasyona sebep olan yolları mı başlattığı yoksa nörodejenerasyonla birlikte giden ve ona karşı kullanılan bir savunma mekanizması mı olduğuna henüz yanıt verememektedir.

Senesans mekanizmasının sadece patolojik bir süreç olduğunu ileriki çalışmalarımızla kesin olarak kanıtlayabilirsek, şu anda üzerinde çalışılan ve senesans hücreleri elimine etmeyi hedefleyen senolitik ilaçlardan biriyle (Ovadya and Krizhanovsky 2018) bu dejenerasyon sürecini geri döndürmeye çalışacağız. Bunun aksine, daha sonra yapacağımız çalışmaların sonuçları senesansın yalnızca hücresel bir savunma mekanizması olduğunu gösterecek olursa, aynı ilaçlarla nörodejenerasyonun hızlanıp hızlanmadığını test etmeyi amaçlıyoruz. Böylece 21. yüzyılın en önemli sağlık problemlerinden biri olan nörodejeneratif hastalıkların özgül tedavileri bulununcaya kadar, bu hastalıkların başlama yaşını geciktirip ve şiddetini azaltıp bu hastalıklardan muzdarip insanların olabildiğince aktif ve verimli bir yaşam sürmelerine katkıda bulunabilmeyi umut ediyoruz.

KAYNAKLAR

A. Armstrong, R. (2019). "Risk factors for Alzheimer's disease." Folia Neuropathologica **57**(2): 87-105.

Acosta, J. C., A. Banito, T. Wuestefeld, A. Georgilis, P. Janich, J. P. Morton, D. Athineos, T.-W. Kang, F. Lasitschka, M. Andrusis, G. Pascual, K. J. Morris, S. Khan, H. Jin, G. Dharmalingam, A. P. Snijders, T. Carroll, D. Capper, C. Pritchard, G. J. Inman, T. Longerich, O. J. Sansom, S. A. Benitah, L. Zender and J. Gil (2013). "A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence." Nature Cell Biology **15**(8): 978-990.

Altemus, M., N. Sarvaiya and C. Neill Epperson (2014). "Sex differences in anxiety and depression clinical perspectives." Frontiers in neuroendocrinology **35**(3): 320-330.

Antunes, M. and G. Biala (2012). "The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications." Cognitive processing **13**(2): 93-110.

Baker, D. J. and R. C. Petersen (2018). "Cellular senescence in brain aging and neurodegenerative diseases: evidence and perspectives." The Journal of Clinical Investigation **128**(4): 1208-1216.

Bathina, S. and U. N. Das (2015). "Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications." Archives of medical science : AMS **11**(6): 1164-1178.

Beal, M. F. (1995). "Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases." Ann Neurol **38**(3): 357-366.

Beeri, M. S., M. Rapp, J. Schmeidler, A. Reichenberg, D. P. Purohit, D. P. Perl, H. T. Grossman, I. Prohovnik, V. Haroutunian and J. M. Silverman (2009). "Number of children is associated with neuropathology of Alzheimer's disease in women." Neurobiology of aging **30**(8): 1184-1191.

Beitz, J. M. (2014). "Parkinson's disease: a review." Front Biosci (Schol Ed) **6**: 65-74.

Bellamy, M. F. and I. F. W. McDowell (1997). "Putative mechanisms for vascular damage by homocysteine." Journal of Inherited Metabolic Disease **20**(2): 307-315.

Bhat, R., E. P. Crowe, A. Bitto, M. Moh, C. D. Katsetos, F. U. Garcia, F. B. Johnson, J. Q. Trojanowski, C. Sell and C. Torres (2012). "Astrocyte senescence as a component of Alzheimer's disease." PLoS One **7**(9): e45069-e45069.

Billingsley, K. J., S. Bandres-Ciga, S. Saez-Atienzar and A. B. Singleton (2018). "Genetic risk factors in Parkinson's disease." Cell and tissue research **373**(1): 9-20.

Blennow, K., M. J. de Leon and H. Zetterberg (2006). "Alzheimer's disease." Lancet **368**(9533): 387-403.

Braak, H., K. Del Tredici, C. Schultz and E. Braak (2000). "Vulnerability of select neuronal types to Alzheimer's disease." Ann N Y Acad Sci **924**: 53-61.

Brann, D. W., K. Dhandapani, C. Wakade, V. B. Mahesh and M. M. Khan (2007). "Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: basic mechanisms and clinical implications." Steroids **72**(5): 381-405.

Breteler, M. M., J. J. Claus, D. E. Grobbee and A. Hofman (1994). "Cardiovascular disease and distribution of cognitive function in elderly people: the Rotterdam Study." Bmj **308**(6944): 1604-1608.

Briani, C., C. Dalla Torre, V. Citton, R. Manara, S. Pompanin, G. Binotto and F. Adami (2013). "Cobalamin deficiency: clinical picture and radiological findings." Nutrients **5**(11): 4521-4539.

Brown, G. C. and A. Vilalta (2015). "How microglia kill neurons." Brain Res **1628**(Pt B): 288-297.

Bu, G. (2009). "Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy." Nature reviews. Neuroscience **10**(5): 333-344.

Bulgart, H. R., E. W. Neczypor, L. E. Wold and A. R. Mackos (2020). "Microbial involvement in Alzheimer disease development and progression." Molecular Neurodegeneration **15**: 42.

Cacace, R., K. Sleegers and C. Van Broeckhoven (2016). "Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited." Alzheimers Dement **12**(6): 733-748.

Calcinotto, A., J. Kohli, E. Zagato, L. Pellegrini, M. Demaria and A. Alimonti (2019). "Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury." Physiol Rev **99**(2): 1047-1078.

Chang, K. H., M. Y. Chang, C. H. Muo, T. N. Wu, C. Y. Chen and C. H. Kao (2014). "Increased risk of dementia in patients exposed to nitrogen dioxide and carbon monoxide: a population-based retrospective cohort study." PLoS One **9**(8): e103078.

Chen, R., K. Wilson, Y. Chen, D. Zhang, X. Qin, M. He, Z. Hu, Y. Ma and J. R. Copeland (2013). "Association between environmental tobacco smoke exposure and dementia syndromes." Occupational and environmental medicine **70**(1): 63-69.

Chen, S., P. Wu, L. Zhou, Y. Shen, Y. Li and H. Song (2015). "Relationship between increase of serum homocysteine caused by smoking and oxidative damage in elderly patients with cardiovascular disease." International journal of clinical and experimental medicine **8**(3): 4446-4454.

Childs, B. G., M. Durik, D. J. Baker and J. M. van Deursen (2015). "Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy." Nature medicine **21**(12): 1424-1435.

Chitu, V., F. Biundo, G. G. L. Shlager, E. S. Park, P. Wang, M. E. Gulinello, Ş. Gokhan, H. C. Ketchum, K. Saha, M. A. DeTure, D. W. Dickson, Z. K. Wszolek, D. Zheng, A. L. Croxford, B. Becher, D. Sun, M. F. Mehler and E. R. Stanley (2020). "Microglial Homeostasis Requires Balanced CSF-1/CSF-2 Receptor Signaling." Cell Rep **30**(9): 3004-3019.e3005.

Cohen, J. and C. Torres (2019). "Astrocyte senescence: Evidence and significance." Aging cell **18**(3): e12937-e12937.

Collado, M. and M. Serrano (2010). "Senescence in tumours: evidence from mice and humans." Nature Reviews Cancer **10**(1): 51-57.

Coppé, J.-P., P.-Y. Desprez, A. Krtolica and J. Campisi (2010). "The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression." Annual review of pathology **5**: 99-118.

Corder, E. H., A. M. Saunders, W. J. Strittmatter, D. E. Schmechel, P. C. Gaskell, G. W. Small, A. D. Roses, J. L. Haines and M. A. Pericak-Vance (1993). "Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families." Science **261**(5123): 921-923.

Crawley, J. N. (1999). "Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests." Brain Res **835**(1): 18-26.

Culmsee, C., S. Michels, S. Scheu, V. Arolt, U. Dannlowski and J. Alferink (2019). "Mitochondria, Microglia, and the Immune System-How Are They Linked in Affective Disorders?" Frontiers in psychiatry **9**: 739-739.

Darcet, F., I. Mendez-David, L. Tritschler, A. M. Gardier, J.-P. Guilloux and D. J. David (2014). "Learning and memory impairments in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression." Frontiers in Behavioral Neuroscience **8**(136).

de Lau, L. M. and M. M. Breteler (2006). "Epidemiology of Parkinson's disease." Lancet Neurol **5**(6): 525-535.

de Olmos, S., A. Bueno, C. Bender, A. Lorenzo and J. de Olmos (2008). "Sex differences and influence of gonadal hormones on MK801-induced neuronal degeneration in the granular retrosplenial cortex of the rat." Brain Struct Funct **213**(1-2): 229-238.

De Strooper, B. and E. Karran (2016). "The Cellular Phase of Alzheimer's Disease." Cell **164**(4): 603-615.

Debacq-Chainiaux, F., J. D. Erusalimsky, J. Campisi and O. Toussaint (2009). "Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo." Nat Protoc **4**(12): 1798-1806.

Demaria, M., N. Ohtani, Sameh A. Youssef, F. Rodier, W. Toussaint, James R. Mitchell, R.-M. Laberge, J. Vijg, H. Van Steeg, Martijn E. T. Dollé, Jan H. J. Hoeijmakers, A. de Bruin, E. Hara and J. Campisi (2014). "An Essential Role for Senescent Cells in Optimal Wound Healing through Secretion of PDGF-AA." Developmental Cell **31**(6): 722-733.

Dere, E., A. Zlomuzica, M. A. De Souza Silva, L. A. Ruocco, A. G. Sadile and J. P. Huston (2010). "Neuronal histamine and the interplay of memory, reinforcement and emotions." Behavioural Brain Research **215**(2): 209-220.

DeTure, M. A. and D. W. Dickson (2019). "The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease." Mol Neurodegener **14**(1): 32.

Dickson, D. W. (2012). "Parkinson's disease and parkinsonism: neuropathology." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(8).

Duffy, A. M., M. J. Schaner, S. H. Wu, A. Staniszewski, A. Kumar, J. C. Arévalo, O. Arancio, M. V. Chao and H. E. Scharfman (2011). "A selective role for ARMS/Kidins220 scaffold protein in spatial memory and trophic support of entorhinal and frontal cortical neurons." Experimental neurology **229**(2): 409-420.

Dugger, B. N. and D. W. Dickson (2017). "Pathology of Neurodegenerative Diseases." Cold Spring Harb Perspect Biol **9**(7).

Durand, P., M. Prost, N. Loreau, S. Lussier-Cacan and D. Blache (2001). "Impaired Homocysteine Metabolism and Atherothrombotic Disease." Laboratory Investigation **81**(5): 645-672.

Else, J. W. B. and M. Kindt (2017). "Tackling maladaptive memories through reconsolidation: From neural to clinical science." Neurobiol Learn Mem **142**(Pt A): 108-117.

Elsherbiny, N. M., I. Sharma, D. Kira, S. Alhusban, Y. A. Samra, R. Jadeja, P. Martin, M. Al-Shabrawey and A. Tawfik (2020). "Homocysteine Induces Inflammation in Retina and Brain." Biomolecules **10**(3): 393.

Eltokhi, A., B. Kurpiers and C. Pitzer (2020). "Behavioral tests assessing neuropsychiatric phenotypes in adolescent mice reveal strain- and sex-specific effects." Scientific reports **10**(1): 11263.

Erkkinen, M. G., M.-O. Kim and M. D. Geschwind (2018). "Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases." Cold Spring Harbor perspectives in biology **10**(4): a033118.

Exuzides, A., V. Crowell, S. R. Reddy, E. Chang and G. Yohrling (2020). "Epidemiology of Huntington's Disease (HD) in the US Medicare Population (670)." Neurology **94**(15 Supplement): 670.

Farrer, L. A., L. A. Cupples, J. L. Haines, B. Hyman, W. A. Kukull, R. Mayeux, R. H. Myers, M. A. Pericak-Vance, N. Risch and C. M. van Duijn (1997). "Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium." Jama **278**(16): 1349-1356.

Frank-Cannon, T. C., L. T. Alto, F. E. McAlpine and M. G. Tansey (2009). "Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases?" Mol Neurodegener **4**: 47.

Gardner, R. C., A. L. Byers, D. E. Barnes, Y. Li, J. Boscardin and K. Yaffe (2018). "Mild TBI and risk of Parkinson disease." Neurology **90**(20): e1771.

Gelders, G., V. Baekelandt and A. Van der Perren (2018). "Linking Neuroinflammation and Neurodegeneration in Parkinson's Disease." Journal of immunology research **2018**: 4784268-4784268.

Gomperts, S. N. (2016). "Lewy Body Dementias: Dementia With Lewy Bodies and Parkinson Disease Dementia." Continuum (Minneapolis, Minn) **22**(2 Dementia): 435-463.

Gotts, S. J., H. J. Jo, G. L. Wallace, Z. S. Saad, R. W. Cox and A. Martin (2013). "Two distinct forms of functional lateralization in the human brain." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(36): E3435-3444.

Guadalupe, T., M. P. Zwiers, K. Wittfeld, A. Teumer, A. A. Vasquez, M. Hoogman, P. Hagoort, G. Fernandez, J. Buitelaar, H. van Bokhoven, K. Hegenscheid, H. Völzke, B. Franke, S. E. Fisher, H. J. Grabe and C. Francks (2015). "Asymmetry within and around the human planum temporale is sexually dimorphic and influenced by genes involved in steroid hormone receptor activity." Cortex **62**: 41-55.

Guerreiro, R., A. Wojtas, J. Bras, M. Carrasquillo, E. Rogaeva, E. Majounie, C. Cruchaga, C. Sassi, J. S. Kauwe, S. Younkin, L. Hazrati, J. Collinge, J. Pocock, T. Lashley, J. Williams, J. C. Lambert, P. Amouyel, A. Goate, R. Rademakers, K. Morgan, J. Powell, P. St George-Hyslop, A. Singleton and J. Hardy (2013). "TREM2 variants in Alzheimer's disease." N Engl J Med **368**(2): 117-127.

Guerreiro, S., A. L. Privat, L. Bressac and D. Toulorge (2020). "CD38 in Neurodegeneration and Neuroinflammation." Cells **9**(2).

Hanamsagar, R. and S. D. Bilbo (2016). "Sex differences in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders: Focus on microglial function and neuroinflammation during development." The Journal of steroid biochemistry and molecular biology **160**: 127-133.

Hånell, A. and N. Marklund (2014). "Structured evaluation of rodent behavioral tests used in drug discovery research." Frontiers in Behavioral Neuroscience **8**(252).

Hardiman, O., A. Al-Chalabi, A. Chio, E. M. Corr, G. Logroscino, W. Robberecht, P. J. Shaw, Z. Simmons and L. H. van den Berg (2017). "Amyotrophic lateral sclerosis." Nature Reviews Disease Primers **3**(1): 17071.

Harro, J. (2018). "Animals, anxiety, and anxiety disorders: How to measure anxiety in rodents and why." Behav Brain Res **352**: 81-93.

Hartley, D., T. Blumenthal, M. Carrillo, G. DiPaolo, L. Esralew, K. Gardiner, A. C. Granholm, K. Iqbal, M. Krams, C. Lemere, I. Lott, W. Mobley, S. Ness, R. Nixon, H. Potter, R. Reeves, M. Sabbagh, W. Silverman, B. Tycko, M. Whitten and T.

Wisniewski (2015). "Down syndrome and Alzheimer's disease: Common pathways, common goals." Alzheimers Dement **11**(6): 700-709.

Heneka, M. T., R. M. McManus and E. Latz (2018). "Inflammasome signalling in brain function and neurodegenerative disease." Nature reviews. Neuroscience **19**(10): 610-621.

Herranz, N. and J. Gil (2018). "Mechanisms and functions of cellular senescence." The Journal of Clinical Investigation **128**(4): 1238-1246.

Hickman, R. A., A. Faustin and T. Wisniewski (2016). "Alzheimer Disease and Its Growing Epidemic: Risk Factors, Biomarkers, and the Urgent Need for Therapeutics." Neurologic clinics **34**(4): 941-953.

Hickman, S., S. Izzy, P. Sen, L. Morsett and J. El Khoury (2018). "Microglia in neurodegeneration." Nature neuroscience **21**(10): 1359-1369.

Hier, D. B. (1979). "Sex differences in hemispheric specialization: Hypothesis for the excess of dyslexia in boys." Bulletin of the Orton Society **29**(1): 74-83.

Hirnstein, M., R. Westerhausen, M. S. Korsnes and K. Hugdahl (2013). "Sex differences in language asymmetry are age-dependent and small: a large-scale, consonant-vowel dichotic listening study with behavioral and fMRI data." Cortex **49**(7): 1910-1921.

Homberg, J. R., M. van den Akker, H. S. Raasø, G. Wardeh, R. Binnekade, A. N. Schoffeleer and T. J. de Vries (2002). "Enhanced motivation to self-administer cocaine is predicted by self-grooming behaviour and relates to dopamine release in the rat medial prefrontal cortex and amygdala." Eur J Neurosci **15**(9): 1542-1550.

Huda, N., G. Liu, H. Hong, S. Yan, B. Khambu and X.-M. Yin (2019). "Hepatic senescence, the good and the bad." World journal of gastroenterology **25**(34): 5069-5081.

Illes, J. (1989). "Neurolinguistic features of spontaneous language production dissociate three forms of neurodegenerative disease: Alzheimer's, Huntington's, and Parkinson's." Brain Lang **37**(4): 628-642.

Jonsson, T., H. Stefansson, S. Steinberg, I. Jonsdottir, P. V. Jonsson, J. Snaedal, S. Bjornsson, J. Huttenlocher, A. I. Levey, J. J. Lah, D. Rujescu, H. Hampel, I. Giegling, O. A. Andreassen, K. Engedal, I. Ulstein, S. Djurovic, C. Ibrahim-Verbaas, A. Hofman, M. A. Ikram, C. M. van Duijn, U. Thorsteinsdottir, A. Kong and K. Stefansson

(2013). "Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease." N Engl J Med **368**(2): 107-116.

Jun, J.-I. and L. F. Lau (2010). "The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing." Nature Cell Biology **12**(7): 676-685.

Jun, J. I. and L. F. Lau (2010). "The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing." Nat Cell Biol **12**(7): 676-685.

Jung, C. R., Y. T. Lin and B. F. Hwang (2015). "Ozone, particulate matter, and newly diagnosed Alzheimer's disease: a population-based cohort study in Taiwan." J Alzheimers Dis **44**(2): 573-584.

Kalueff, A. V., A. M. Stewart, C. Song, K. C. Berridge, A. M. Graybiel and J. C. Fentress (2016). "Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience." Nature reviews. Neuroscience **17**(1): 45-59.

Katsnelson, A., B. De Strooper and H. Y. Zoghbi (2016). "Neurodegeneration: From cellular concepts to clinical applications." Science Translational Medicine **8**(364): 364ps318.

Kay, C., M. R. Hayden and B. R. Leavitt (2017). Chapter 3 - Epidemiology of Huntington disease. Handbook of Clinical Neurology. A. S. Feigin and K. E. Anderson, Elsevier. **144**: 31-46.

Killin, L. O. J., J. M. Starr, I. J. Shiue and T. C. Russ (2016). "Environmental risk factors for dementia: a systematic review." BMC geriatrics **16**(1): 175-175.

Kovacs, G. G. (2017). "Concepts and classification of neurodegenerative diseases." Handb Clin Neurol **145**: 301-307.

Kowalski, K. and A. Mulak (2019). "Brain-Gut-Microbiota Axis in Alzheimer's Disease." Journal of neurogastroenterology and motility **25**(1): 48-60.

Krizhanovsky, V., M. Yon, R. A. Dickins, S. Hearn, J. Simon, C. Miething, H. Yee, L. Zender and S. W. Lowe (2008). "Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis." Cell **134**(4): 657-667.

Kuller, L. H., L. Shemanski, T. Manolio, M. Haan, L. Fried, N. Bryan, G. L. Burke, R. Tracy and R. Bhadelia (1998). "Relationship between ApoE, MRI findings, and cognitive function in the Cardiovascular Health Study." Stroke **29**(2): 388-398.

Lee, E. J., M. S. Woo, P. G. Moon, M. C. Baek, I. Y. Choi, W. K. Kim, E. Junn and H. S. Kim (2010). "Alpha-synuclein activates microglia by inducing the expressions of matrix metalloproteinases and the subsequent activation of protease-activated receptor-1." J Immunol **185**(1): 615-623.

Lee, H.-J., J.-E. Suk, C. Patrick, E.-J. Bae, J.-H. Cho, S. Rho, D. Hwang, E. Masliah and S.-J. Lee (2010). "Direct transfer of alpha-synuclein from neuron to astroglia causes inflammatory responses in synucleinopathies." The Journal of biological chemistry **285**(12): 9262-9272.

Lee, S. and J.-S. Lee (2019). "Cellular senescence: a promising strategy for cancer therapy." BMB reports **52**(1): 35-41.

Lees, A. J., J. Hardy and T. Revesz (2009). "Parkinson's disease." Lancet **373**(9680): 2055-2066.

Leibson, C. L., W. A. Rocca, V. A. Hanson, R. Cha, E. Kokmen, P. C. O'Brien and P. J. Palumbo (1997). "The risk of dementia among persons with diabetes mellitus: a population-based cohort study." Ann N Y Acad Sci **826**: 422-427.

Li, Y., T. Huang, Y. Zheng, T. Muka, J. Troup and F. B. Hu (2016). "Folic Acid Supplementation and the Risk of Cardiovascular Diseases: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials." J Am Heart Assoc **5**(8).

Liu, A. K., R. C. Chang, R. K. Pearce and S. M. Gentleman (2015). "Nucleus basalis of Meynert revisited: anatomy, history and differential involvement in Alzheimer's and Parkinson's disease." Acta Neuropathol **129**(4): 527-540.

Liu, A. K. L., R. C.-C. Chang, R. K. B. Pearce and S. M. Gentleman (2015). "Nucleus basalis of Meynert revisited: anatomy, history and differential involvement in Alzheimer's and Parkinson's disease." Acta neuropathologica **129**(4): 527-540.

Lorda-Diez, C. I., B. Garcia-Riart, J. A. Montero, J. Rodriguez-León, J. A. Garcia-Porrero and J. M. Hurlé (2015). "Apoptosis during embryonic tissue remodeling is accompanied by cell senescence." Aging **7**(11): 974-985.

Lu, S. and H. A. Nasrallah (2018). "The use of memantine in neuropsychiatric disorders: An overview." Ann Clin Psychiatry **30**(3): 234-248.

Marder, K., M. X. Tang, H. Mejia, B. Alfaro, L. Côté, E. Louis, J. Groves and R. Mayeux (1996). "Risk of Parkinson's disease among first-degree relatives: A community-based study." Neurology **47**(1): 155-160.

Mattson, M. P. (2000). "Apoptosis in neurodegenerative disorders." Nature Reviews Molecular Cell Biology **1**(2): 120-130.

McColgan, P. and S. J. Tabrizi (2018). "Huntington's disease: a clinical review." Eur J Neurol **25**(1): 24-34.

McCully, K. S. (1969). "Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis." The American journal of pathology **56**(1): 111-128.

McMurray, C. T. (2000). "Neurodegeneration: diseases of the cytoskeleton?" Cell Death & Differentiation **7**(10): 861-865.

Mehler, M. F. and S. Gokhan (2000). "Mechanisms underlying neural cell death in neurodegenerative diseases: alterations of a developmentally-mediated cellular rheostat." Trends Neurosci **23**(12): 599-605.

Mehler, M. F. and S. Gokhan (2001). "Developmental mechanisms in the pathogenesis of neurodegenerative diseases." Prog Neurobiol **63**(3): 337-363.

Mielke, M. M., P. Vemuri and W. A. Rocca (2014). "Clinical epidemiology of Alzheimer's disease: assessing sex and gender differences." Clin Epidemiol **6**: 37-48.

Moisan, F., S. Kab, F. Mohamed, M. Canonico, M. Le Guern, C. Quintin, L. Carcaillon, J. Nicolau, N. Duport, A. Singh-Manoux, M. Boussac-Zarebska and A. Elbaz (2016). "Parkinson disease male-to-female ratios increase with age: French nationwide study and meta-analysis." J Neurol Neurosurg Psychiatry **87**(9): 952-957.

Molero, A. E., S. Gokhan, S. Gonzalez, J. L. Feig, L. C. Alexandre and M. F. Mehler (2009). "Impairment of developmental stem cell-mediated striatal neurogenesis and pluripotency genes in a knock-in model of Huntington's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(51): 21900-21905.

Montalescot, G. (1996). "Homocysteine: the new player in the field of coronary risk." Heart (British Cardiac Society) **76**(2): 101-102.

Muñoz-Espín, D., M. Cañamero, A. Maraver, G. Gómez-López, J. Contreras, S. Murillo-Cuesta, A. Rodríguez-Baeza, I. Varela-Nieto, J. Ruberte, M. Collado and M. Serrano (2013). "Programmed Cell Senescence during Mammalian Embryonic Development." Cell **155**(5): 1104-1118.

Muñoz-Espín, D. and M. Serrano (2014). "Cellular senescence: from physiology to pathology." Nature Reviews Molecular Cell Biology **15**(7): 482-496.

Myung, N. H., X. Zhu, Kruman, II, R. J. Castellani, R. B. Petersen, S. L. Siedlak, G. Perry, M. A. Smith and H. G. Lee (2008). "Evidence of DNA damage in Alzheimer disease: phosphorylation of histone H2AX in astrocytes." Age (Dordr) **30**(4): 209-215.

Nakashiba, T., J. D. Cushman, K. A. Pelkey, S. Renaudineau, D. L. Buhl, T. J. McHugh, V. Rodriguez Barrera, R. Chittajallu, K. S. Iwamoto, C. J. McBain, M. S. Fanselow and S. Tonegawa (2012). "Young dentate granule cells mediate pattern separation, whereas old granule cells facilitate pattern completion." Cell **149**(1): 188-201.

Numakawa, T., H. Odaka and N. Adachi (2018). "Actions of Brain-Derived Neurotrophin Factor in the Neurogenesis and Neuronal Function, and Its Involvement in the Pathophysiology of Brain Diseases." International journal of molecular sciences **19**(11): 3650.

Nussbaum, R. L. and C. E. Ellis (2003). "Alzheimer's disease and Parkinson's disease." N Engl J Med **348**(14): 1356-1364.

O'Brien, J. T. and A. Thomas (2015). "Vascular dementia." Lancet **386**(10004): 1698-1706.

Ogrodnik, M., H. Salmonowicz, D. Jurk and J. F. Passos (2019). "Expansion and Cell-Cycle Arrest: Common Denominators of Cellular Senescence." Trends in Biochemical Sciences **44**(12): 996-1008.

Ott, A., R. P. Stolk, F. van Harskamp, H. A. Pols, A. Hofman and M. M. Breteler (1999). "Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study." Neurology **53**(9): 1937-1942.

Ovadya, Y. and V. Krizhanovsky (2018). "Strategies targeting cellular senescence." The Journal of Clinical Investigation **128**(4): 1247-1254.

Pérez Ortiz, J. M. and H. T. Orr (2018). "Spinocerebellar Ataxia Type 1: Molecular Mechanisms of Neurodegeneration and Preclinical Studies." Adv Exp Med Biol **1049**: 135-145.

Piechota, M., P. Sunderland, A. Wysocka, M. Nalberczak, M. A. Sliwinska, K. Radwanska and E. Sikora (2016). "Is senescence-associated β -galactosidase a marker of neuronal senescence?" Oncotarget **7**(49): 81099-81109.

Plessen, K. J., K. Hugdahl, R. Bansal, X. Hao and B. S. Peterson (2014). "Sex, age, and cognitive correlates of asymmetries in thickness of the cortical mantle across the life span." J Neurosci **34**(18): 6294-6302.

Prevot, T. D., K. A. Misquitta, C. Fee, D. Newton, E. Sibille and M. Banasr (2018). "Repeated assessment of anxiety-like behavior in mice: a new tool with increased reliability and consistency." bioRxiv: 414029.

Quéré, I., D. Hillaire-Buys, C. Brunschwig, J. Chapal, C. Janbon, J. P. Blayac, P. Petit and M. M. Loubatières-Mariani (1997). "Effects of homocysteine on acetylcholine- and adenosine-induced vasodilatation of pancreatic vascular bed in rats." British journal of pharmacology **122**(2): 351-357.

Radhakrishnan, D. M. and V. Goyal (2018). "Parkinson's disease: A review." Neurol India **66**(Supplement): S26-s35.

Raghava, N., B. C. Das and S. K. Ray (2017). "Neuroprotective effects of estrogen in CNS injuries: insights from animal models." Neuroscience and neuroeconomics **6**: 15-29.

Ransohoff, R. M. (2016). "How neuroinflammation contributes to neurodegeneration." Science **353**(6301): 777.

Re, D. B., V. Le Verche, C. Yu, M. W. Amoroso, K. A. Politi, S. Phani, B. Ikiz, L. Hoffmann, M. Koolen, T. Nagata, D. Papadimitriou, P. Nagy, H. Mitsumoto, S. Kariya, H. Wichterle, C. E. Henderson and S. Przedborski (2014). "Necroptosis drives motor neuron death in models of both sporadic and familial ALS." Neuron **81**(5): 1001-1008.

Reitz, C., C. Brayne and R. Mayeux (2011). "Epidemiology of Alzheimer disease." Nat Rev Neurol **7**(3): 137-152.

Rhinn, M., B. Ritschka and W. M. Keyes (2019). "Cellular senescence in development, regeneration and disease." Development **146**(20): dev151837.

Rohn, T. T. (2013). "The triggering receptor expressed on myeloid cells 2: "TREM-ming" the inflammatory component associated with Alzheimer's disease." Oxid Med Cell Longev **2013**: 860959.

Rubinow, D. R. and P. J. Schmidt (2019). "Sex differences and the neurobiology of affective disorders." Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology **44**(1): 111-128.

Saez-Atienzar, S. and E. Masliah (2020). "Cellular senescence and Alzheimer disease: the egg and the chicken scenario." Nature Reviews Neuroscience **21**(8): 433-444.

Salminen, A., J. Ojala, K. Kaarniranta, A. Haapasalo, M. Hiltunen and H. Soininen (2011). "Astrocytes in the aging brain express characteristics of senescence-associated secretory phenotype." Eur J Neurosci **34**(1): 3-11.

Sapp, E., C. Schwarz, K. Chase, P. G. Bhide, A. B. Young, J. Penney, J. P. Vonsattel, N. Aronin and M. DiFiglia (1997). "Huntingtin localization in brains of normal and Huntington's disease patients." Ann Neurol **42**(4): 604-612.

Schafer, M. J., T. A. White, K. Iijima, A. J. Haak, G. Ligresti, E. J. Atkinson, A. L. Oberg, J. Birch, H. Salmonowicz, Y. Zhu, D. L. Mazula, R. W. Brooks, H. Fuhrmann-Stroissnigg, T. Pirtskhalava, Y. S. Prakash, T. Tchkonina, P. D. Robbins, M. C. Aubry, J. F. Passos, J. L. Kirkland, D. J. Tschumperlin, H. Kita and N. K. LeBrasseur (2017). "Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease." Nat Commun **8**: 14532.

Scharfman, H. E. and N. J. MacLusky (2014). "Sex differences in the neurobiology of epilepsy: a preclinical perspective." Neurobiology of disease **72 Pt B**: 180-192.

Scheyer, O., A. Rahman, H. Hristov, C. Berkowitz, R. S. Isaacson, R. Diaz Brinton and L. Mosconi (2018). "Female Sex and Alzheimer's Risk: The Menopause Connection." J Prev Alzheimers Dis **5**(4): 225-230.

Schöneich, C. (2005). "Methionine oxidation by reactive oxygen species: reaction mechanisms and relevance to Alzheimer's disease." Biochim Biophys Acta **1703**(2): 111-119.

Seibenhener, M. L. and M. C. Wooten (2015). "Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice." Journal of visualized experiments : JoVE(96): e52434-e52434.

Senzai, Y. (2019). "Function of local circuits in the hippocampal dentate gyrus-CA3 system." Neuroscience Research **140**: 43-52.

Sherrington, R., E. I. Rogaev, Y. Liang, E. A. Rogaeva, G. Levesque, M. Ikeda, H. Chi, C. Lin, G. Li, K. Holman, T. Tsuda, L. Mar, J. F. Foncin, A. C. Bruni, M. P. Montesi, S. Sorbi, I. Rainero, L. Pinessi, L. Nee, I. Chumakov, D. Pollen, A. Brookes, P. Sanseau, R. J. Polinsky, W. Wasco, H. A. R. Da Silva, J. L. Haines, M. A. Pericak-

Vance, R. E. Tanzi, A. D. Roses, P. E. Fraser, J. M. Rommens and P. H. St George-Hyslop (1995). "Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease." Nature **375**(6534): 754-760.

Sikora, M., I. Lewandowska, Ł. Marczak, E. Bretes and H. Jakubowski (2020). "Cystathionine β -synthase deficiency: different changes in proteomes of thrombosis-resistant Cbs(-/-) mice and thrombosis-prone CBS(-/-) humans." Scientific reports **10**(1): 10726-10726.

Simonian, N. A. and J. T. Coyle (1996). "Oxidative stress in neurodegenerative diseases." Annu Rev Pharmacol Toxicol **36**: 83-106.

Sommer, I. E., A. Aleman, M. Somers, M. P. Boks and R. S. Kahn (2008). "Sex differences in handedness, asymmetry of the planum temporale and functional language lateralization." Brain Res **1206**: 76-88.

Spence, J. D. (2016). "Homocysteine lowering for stroke prevention: Unravelling the complexity of the evidence." Int J Stroke **11**(7): 744-747.

Spinney, L. (2014). "Alzheimer's disease: The forgetting gene." Nature **510**(7503): 26-28.

Tanner, C. M. and S. M. Goldman (1996). "Epidemiology of Parkinson's disease." Neurol Clin **14**(2): 317-335.

Tapia-Rojas, C., C. B. Lindsay, C. Montecinos-Oliva, M. S. Arrazola, R. M. Retamales, D. Bunout, S. Hirsch and N. C. Inestrosa (2015). "Is L-methionine a trigger factor for Alzheimer's-like neurodegeneration?: Changes in A β oligomers, tau phosphorylation, synaptic proteins, Wnt signaling and behavioral impairment in wild-type mice." Molecular neurodegeneration **10**: 62-62.

Thériault, R.-K. and M. L. Perreault (2019). "Hormonal regulation of circuit function: sex, systems and depression." Biology of sex differences **10**(1): 12-12.

Tomé, W. A., Ş. Gökhan, N. P. Brodin, M. E. Gulinello, J. Heard, M. F. Mehler and C. Guha (2015). "A mouse model replicating hippocampal sparing cranial irradiation in humans: A tool for identifying new strategies to limit neurocognitive decline." Scientific reports **5**: 14384.

Tomé, W. A., Ş. Gökhan, N. P. Brodin, M. E. Gulinello, J. Heard, M. F. Mehler and C. Guha (2015). "A mouse model replicating hippocampal sparing cranial irradiation in humans: A tool for identifying new strategies to limit neurocognitive decline." Scientific reports **5**(1): 14384.

van Deursen, J. M. (2014). "The role of senescent cells in ageing." Nature **509**(7501): 439-446.

Whitehouse, P. J., D. L. Price, A. W. Clark, J. T. Coyle and M. R. DeLong (1981). "Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis." Ann Neurol **10**(2): 122-126.

Wise, P. M., D. B. Dubal, M. E. Wilson, S. W. Rau and M. Böttner (2001). "Minireview: Neuroprotective Effects of Estrogen—New Insights into Mechanisms of Action." Endocrinology **142**(3): 969-973.

Yankelevitch-Yahav, R., M. Franko, A. Huly and R. Doron (2015). "The forced swim test as a model of depressive-like behavior." J Vis Exp(97).

Yoshitomi, R., K. Nakayama, S. Yamashita, M. Kumazoe, T.-A. Lin, C.-Y. Mei, Y. Marugame, Y. Fujimura, M. Maeda-Yamamoto, S. Kuriyama and H. Tachibana (2020). "Plasma Homocysteine Concentration is Associated with the Expression Level of Folate Receptor 3." Scientific reports **10**(1): 10283-10283.

Zárate, S., T. Stevnsner and R. Gredilla (2017). "Role of Estrogen and Other Sex Hormones in Brain Aging. Neuroprotection and DNA Repair." Frontiers in Aging Neuroscience **9**(430).

Zhao, Y., A. Tyshkovskiy, D. Muñoz-Espín, X. Tian, M. Serrano, J. P. de Magalhaes, E. Nevo, V. N. Gladyshev, A. Seluanov and V. Gorbunova (2018). "Naked mole rats can undergo developmental, oncogene-induced and DNA damage-induced cellular senescence." Proceedings of the National Academy of Sciences **115**(8): 1801.

Zhu, H., H. Yan, N. Tang, X. Li, P. Pang, H. Li, W. Chen, Y. Guo, S. Shu, Y. Cai, L. Pei, D. Liu, M.-H. Luo, H. Man, Q. Tian, Y. Mu, L.-Q. Zhu and Y. Lu (2017). "Impairments of spatial memory in an Alzheimer's disease model via degeneration of hippocampal cholinergic synapses." Nature communications **8**(1): 1676-1676.

ETİK KURUL KARARI



T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayın Prof. Dr. Erdem TÜZÜN
İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü

Karar No:2018/ 07

Başvuru : 22.02.2018

Toplantı Tarihi : 02.03.2018

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, aşağıda çalışma materyali belirtilen **Doktora Öğrencisi Yağız Meriç ALTUN**'a ait "Senesans Mekanizmasının Nörodejeneratif Hastalıklardaki Rolü" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

Çalışılacak Hayvanın	Türü	Fare
	Cinsiyeti	Dişi
	Sayısı	98
Proje Başlangıç/Bitiş Tarihi	20.03.2018/20.10.2018	

Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ
İÜ HADYEK Başkanı

Prof. Dr. Mehmet YALTIRIK
Üye

Prof. Dr. Ufuk ÇAKATAY
Üye

Prof. Dr. Mustafa Oral ÖNCÜL
Üye

Doç. Dr. Alper OKYAR
Üye

Doç. Dr. Aygül EKİCİ
Üye

Doç. Dr. Uğur AKSU
Üye

Yard. Doç. Dr. Altan ARMUTAK
Üye

Yrd. Doç. Dr. Aydın ÇEVİK
Üye

Uzm. Vet. Hek. Fatma TEKELİ
Üye

Dr. Burak OLGUN
Mak.Yük. Müh
Üye

Avukat Selma DEMİR
Üye

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

NÖRODEJENERATİF HASTALIKLARDA HÜCRESEL SENESANS MEKANİZMASININ ROLÜ

ORIJİNALLIK RAPORU

% 4	% 2	% 1	% 3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Canakkale Onsekiz Mart University Öğrenci Ödevi	<% 1
2	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1
3	Submitted to Marmara University Öğrenci Ödevi	<% 1
4	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<% 1
5	Submitted to Istanbul Medipol Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
6	www.asmrehberi.com İnternet Kaynağı	<% 1
7	www.jove.com İnternet Kaynağı	<% 1
8	Submitted to Yeditepe University Öğrenci Ödevi	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Yağız Meriç	Soyadı	Altun
Doğ.Yeri	Antalya	Doğ.Tar.	07.11.1989
Email	yagiz.altun@einsteinmed.org	Uyruğu	T.C.

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	2014
Lise	Galatasaray Lisesi	2008

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Tıp Doktoru	T.C. Sağlık Bakanlığı	2014-2016
2.	Araştırma Görevlisi	Albert Einstein College of Medicine	2016-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi		94 (TOEFL)
Fransızca	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi		
İtalyanca	İyi	İyi	İyi		
Rusça	Orta	Orta	Orta		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	82,41695	83,40363	70,90510
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi
Adobe Photoshop/Illustrator	İyi
Graphpad Prism	İyi
Endnote	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Altun Y.M., Tüzün E, Mehler M.F., Gökhan Ş (2020) "L-Metiyoninin Neden Olduğu Nörokognitif Yıkılma: Bir Nörodejenerasyon Fare Modeli" Experimed 2020; 10(2): 59-66

Gokhan S, Aronson K, Altun Y, et al. (2019) "BSCI-18. ABLATION OF Csf2 MITIGATES RADIATION-INDUCED NEUROCOGNITIVE DECLINE INDEPENDENT OF HIPPOCAMPAL NEUROGENESIS" Neuro-oncology Advances 2019 Aug;1(Suppl 1):i4-i4

Pari Sohrabi, Zafer Habip, Suat Saribas, Asli Vatan, Harika Oyku Dinc, Yagiz M Altun, Tevhide Ziver, Reyhan Caliskan, Mehmet Demirci, Omer Uysal, Pelin Yuksel, and Bekir Kocazeybek (2017) "Neopterin and soluble CD14 (sCD14) levels as immunoactivation markers in aHBc-only cases" Future Virology 12:8, 409-419

Kurt B , Altun Y , Güvenç S , Uslu N , Diz Küçükkaya R . "Nadir görülen bir trombositopeni nedeni: Siklik trombositopeni" İstanbul Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Tıp Dergisi. 2016; 2(1): 53-55.

Namal E., Cerciz O.E., Gokmen E., Kurt B., Altun YM., (2016). "Malign Asit Tedavisinde İntraperitoneal Catumaxomab Kullanımı: 4 Olgu" Ş.E.E.A.H. Tıp Bülteni 2017;51(2):156-60

Bekir S. Kocazeybek, Pelin Yuksel, Dilek Keskin, Suhail Sheikh, Zafer Habip, Serap Sahin Yavuzer, Reyhan Caliskan, Yagiz Meric Altun, Mert Kuskucu, Mahir Cengiz, Harika Oyku Dinc, Asiye Karakullukcu, Sevgi Ergin, Suat Saribas, Nail Yilmaz, Hrisi Bahar Tokman (2016). "Travel-associated infections caused by unusual serogroups of Legionella pneumophila identified using Legionella BIOCHIP slides in Turkey and Iraq." Travel Medicine and Infectious Disease 14(3): 248-254.