



**DENEYSEL ALZHEİMER MODELİ OLUŞTURULAN ve
SERBEST HAREKET EDEBİLEN SIÇANLARDA
GLUTAMAT GERİ ALINIM SÜRELERİNİN *IN VIVO*
VOLTAMETRİ TEKNİĞİ ile DEĞERLENDİRİLMESİ**

Cemil BAYRAM

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU**

Doktora Tezi-2022

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL ALZHEİMER MODELİ OLUŞTURULAN ve
SERBEST HAREKET EDEBİLEN SIÇANLARDA
GLUTAMAT GERİ ALINIM SÜRELERİNİN *IN VIVO*
VOLTAMETRİ TEKNİĞİ ile DEĞERLENDİRİLMESİ**

Cemil BAYRAM

**Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU**

**ERZURUM
2022**

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	V
ÖZET	VI
ABSTRACT.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XII
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Nörodejeneratif Hastalıklar.....	5
2.2. Alzheimer Hastalığı	8
2.3. Tarihçe	9
2.4. Epidemiyoloji.....	10
2.5. Risk Faktörleri	11
2.6. Alzheimer Hastalığı ile İlgili Hipotezler	12
2.6.1. Kolinerjik Hipotez	12
2.6.2. Amiloid Hipotezi	12
2.7. Tanı Yöntemleri.....	13
2.8. Patofizyoloji.....	14
2.8.1. Aβ Plakları ve Nörofibriler Yumaklar	14
2.8.2. Yaşlanma	16
2.8.3. Oksidatif Stres.....	16
2.9. Nöropatoloji	18
2.10. Beyinde Bulunan Nörotransmitter Sistemi ve Disfonksiyonları	19

2.10.1. Asetilkolin.....	20
2.10.2. Gama Aminobütirik Asit (GABA)	21
2.10.3. Glutamat Reseptörleri	21
2.10.3.1. Glutamat, Alzheimer Hastalığı ilişkisi ve Eksitotoksitesitesi.....	22
2.11. Alzheimer Hastalığında Tedavi	24
2.11.1. Güncel Tedaviler.....	25
2.11.1.1. Farmakolojik Uygulamalar	25
2.11.1.2. Farmakolojik Olmayan Uygulamalar	28
2.11.2. Antibiyotikle Tedavi	29
2.11.2.1. Beta Laktam Antibiyotikler	29
2.11.3. Gelecek Tedavi Yaklaşımları.....	31
2.12. Deneysel Alzheimer Modelleri.....	32
2.12.1. Sıçan Modelleri.....	33
2.12.2. Fare Modelleri.....	33
2.12.3. Omurgasız Hayvan Modelleri.....	34
2.12.4. İntraserebroventriküler Streptozotosin (ICV-STZ) Modeli	34
2.12.5. İntraperitoneal Alüminyum Klorür Modeli	35
2.12.6. İntraperitoneal Skopolamin Modeli	36
2.15. Davranış Testleri.....	36
2.15.1. Lokomotor Aktivite Testi	36
2.15.3. Morris Su Labirenti (Morris Water Maze) Testi	36
2.15.2. Pasif Sakınma Testi	37
2.13. <i>In vivo</i> Voltametri	38
2.14. LC-MS/MS	40
3. MATERYAL VE METOT.....	42

3.1. Deney Protokolü	42
3.2. Deneysel Alzheimer Modelinin Oluşturulması ve Uygulamalar	43
3.3. Davranış Modelleri	47
3.3.1. Lokomotor Aktivite Testi	47
3.3.2. Morris Su Labirenti Testi:.....	48
3.3.3. Pasif Sakınma Testi	50
3.4. <i>In Vivo</i> Voltametri Testi	52
3.5. LC-MS/MS	55
3.7. Patolojik İncelemeler	56
3.7.1. Histopatolojik İnceleme	56
3.7.2. İmmunohistokimyasal İnceleme	56
3.8. İstatistiksel Analiz.....	57
4. BULGULAR.....	58
4.1. Lokomotor Aktivite Testi Bulguları	58
4.2. Morris Su Labirenti Testi Bulguları.....	62
4.3. Pasif Sakınma Testi Bulguları	67
4.4. <i>In Vivo</i> Voltametri Testi Bulguları	69
4.5. LC-MS/MS Testi Bulguları	73
4.7. Histopatolojik Boyama Bulguları	76
4.8. İmmunohistokimyasal Boyama Bulguları	78
5. TARTIŞMA.....	83
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	99
KAYNAKLAR	100
EKLER	155
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	155

EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU 156

EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU 157



TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmayı değerli bilgi ve katkıları ile yöneten, hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU'na en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Doktora eğitimimin her aşamasında değerli fikirleriyle desteğini esirgemeyen, bilgi birikimi ile akademik gelişimime yön veren değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Ufuk OKKAY, Sayın Doç. Dr. Irmak FERAH OKKAY ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Selma SEZEN'e şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmaları kapsamında LC-MS/MS spektrumlarını alan Sayın Doç. Dr. Onur ŞENOL'a, materyal temini konusundaki katkıları için Sayın Doç. Dr. Halil ÖZCAN'a, tezin histopatolojik çalışmalarını ve analizlerini yürüten değerli hocam Sayın Doç. Dr. Mustafa ÖZKARACA'ya, hayvan deneyleri aşamasında özverili yardımları ve önemli destekleri için Sayın Arş. Gör. Ecz. Dr. Muhammed Sait ERTUĞRUL'a ve yüksek lisans öğrencisi Vet. Hekim Ziadoon Al-Yaqoobi'ye teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında ilgi ve desteklerini esirgemeyen Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine, çalışma arkadaşlarıma, Sağlık Bilimleri Enstitüsü müdürümüz ve Anabilim dalı başkanımız olan Sayın Prof. Dr. Elif ÇADIRCI'ya ve yoğun eğitim dönemim boyunca sabırla beni destekleyen aileme teşekkür ederim.

Doktora eğitimim süresince maddi desteğinden dolayı YÖK 100/2000 Öncelikli Alan Programı'na kabulümü sağlayan Yükseköğretim Kurumu'na (YÖK) teşekkür ederim.

Cemil BAYRAM

ÖZET

Deneyisel Alzheimer Modeli Oluşturulan ve Serbest Hareket Edebilen Sıçanlarda Glutamat Geri Alınım Sürelerinin *In Vivo* Voltametri Tekniği ile Değerlendirilmesi

Amaç: AH ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır. Kesin bir tedavisi bulunmayan AH için bu çalışmada üçüncü kuşak sefalosporin grubundan sefiksim ilacının etkileri araştırılmıştır. Sıçan AH ile ilişkili bölgelerinde anlık glutamat seviyeleri *in vivo* voltametri tekniği ile ölçülerek AH’de görülen klinik ve biyokimyasal değişiklikler ilk kez serbest hareket eden hayvanlarda ortaya konmaya çalışılmıştır. Sefiksimin deneyisel AH modelinde elektrokimyasal ve davranış testleri üzerindeki etkinliği de test edilmiştir. Anestezi altında olmayan serbest hareket eden hayvan verileri, anestezi altında alınan verilere kıyasla daha değerli olduğu için çalışma serbest hareket eden hayvanlarda yapılmıştır.

Materyal ve Metot: Bu çalışma, 10 sağlıklı sıçan ve ICV-STZ yoluyla deneyisel AH modeli oluşturulmuş 30 sıçan üzerinde yürütülmüştür. Sıçanlar sağlıklı Kontrol, STZ, STZ+MEM ve STZ+SEF olmak üzere 4 eşit gruba bölünmüştür. Morris su labirenti, lokomotor aktivite ve pasif sakınma testi gibi davranış testleriyle AH’nin sıçanlar üzerindeki etkileri, LC-MS/MS ile glutamat, tau ve ACh seviyeleri ve voltametri testleriyle ise glutamat geri alım süresi ölçülmüştür.

Bulgular: Hipokampus CA3 bölgesindeki glutamat geri alım süreleri deneyisel AH oluşturulmuş sıçanlarda istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük bulunmuştur. LC-MS/MS bulguları davranış testleriyle uyumlu sonuçlar vermiş, sefiksimin etkinliğinin spontan tedavi ilacı olan memantin ile uyumlu sonuçlar verdiği görülmüştür. Davranış testlerinden elde edilen bulgulara göre, sıçanlar hafıza problemleri göstermiştir. Tedavi sonrasında ise bu semptomların AH’li sıçanlara kıyasla önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir.

Sonuç: AH’li gruplarda glutamat geri alım süresinin uzamasına kıyasla sefiksim ile tedavi edilen grupta glutamat geri alım süresinde anlamlı bir iyileşme olduğu görülmüştür. Sefiksim AH hayvan modelinin davranış testlerinde de iyileşme göstermiştir. Bu sonuçlar sefiksimin AH’de faydalı olabileceğini ve bu etkisini glutamatın geri alım sürelerini kontrol gruplarına yakınlaştırarak yaptığını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer hastalığı, Demans, Glutamat, *In vivo* voltametri, Sefiksim.

ABSTRACT

Evaluation of Glutamate Re-uptake Times by *In Vivo* Voltammetry Technique in Experimental Alzheimer's Modeled and Freely Moving Rats

Aim: AD is a progressive neurodegenerative disease. In this study, the effects of cefixime from the third generation cephalosporin group were investigated for AD, which has no definitive treatment. The clinical and biochemical changes observed in AD were tried to be revealed for the first time in free-moving animals by measuring the instantaneous glutamate levels in the rat AD-related regions by *in vivo* voltammetry technique. The efficacy of cefixime on electrochemical and behavioral tests in the experimental AD model was also tested. The study was performed in freely moving animals, as data from free-moving animals not under anesthesia are more valuable than data obtained under anesthesia.

Material and method: This study was conducted on 10 healthy rats and 30 rats that were experimentally modeled AD by ICV-STZ. Rats were divided into 4 equal groups as healthy Control, STZ, STZ+MEM and STZ+SEF. The effects of AD on rats were measured by behavioral tests such as the Morris water maze, locomotor activity and passive avoidance tests, glutamate, tau and ACh levels were measured by LC-MS/MS, and glutamate re-uptake time was measured by voltammetry tests.

Results: Glutamate reuptake times in the hippocampus CA3 region were found to be statistically significantly lower in rats with experimental AD. LC-MS/MS findings gave results consistent with behavioral tests, and it was observed that the efficacy of cefixime gave results consistent with the spontaneous treatment drug memantine. According to the findings from behavioral tests, the rats showed memory problems. After treatment, these symptoms were found to be significantly reduced compared to rats with AD.

Conclusion: There was a significant improvement in the glutamate reuptake time in the cefixime-treated group compared to the prolongation of the glutamate reuptake time in the AD groups. Cefixime also showed improvement in behavioral tests of the animal model of AD. These results showed that cefixime may be beneficial in AD and it does this by making glutamate reuptake times closer to the control groups.

Key Words: Alzheimer's disease, Cefixime, Dementia, Glutamate, *In vivo* voltammetry.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	:	Alfa
β	:	Beta
γ	:	Gama
AB	:	Amiloid beta
AB40	:	Amiloid beta peptit bileşeni
AB42	:	Amiloid beta peptit bileşeni
ACh	:	Asetilkolin
AChE	:	Asetilkolin esteraz
AChEI	:	Asetilkolinesteraz inhibitörleri
AD	:	Alzheimer's Disease (Alzheimer Hastalığı)
ADRDA	:	Alzheimer Hastalığı ve İlişkili Bozukluklar Derneği
AH	:	Alzheimer Hastalığı
AICD	:	APP intraselüler domain
ALS	:	Amyotrofik lateral skleroz
AMPA	:	α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit
AP	:	Anteroposterior (Önden arkaya doğru)
APP	:	Amiloid prekürsör protein
AQP4	:	Aquaporin-4
BT	:	Bilgisayarlı tomografi
BuChE	:	Bütirilkolinesteraz
Ca	:	Kalsiyum
CA1-3	:	Cornu Ammonis 1, 2 ve 3'üncü bölgeleri
CaMKII	:	Ca^{+2} /kalmodulin-bağımlı protein kinaz II
CE	:	Kılcık elektroforez
ChAT	:	Kolin asetiltransferaz
CHT	:	Kolin taşıyıcısı
Ct	:	Cycle threshold
DHT	:	Dihidrotestosteron
DSÖ	:	Dünya Sağlık Örgütü
DV	:	Dorsoventral (Üstten alta doğru)
EAAT	:	Eksitator aminoasit taşıyıcısı
ECD	:	Elektrokimyasal tespit
EEG	:	Elektroensefalografi
FDA	:	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GABA	:	Gama aminobütirik asit
GC	:	Gaz kromatografisi

GSK-3 β	: Glikojen sentaz kinaz 3 β
H&E	: Hematoksilen-Eozin Boyama
HBB	: Hafif bilişsel bozukluk
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IL	: İnterlökin
i.c.v.	: intraserebroventriküler
ICV-STZ	: intraserebroventriküler STZ enjeksiyonu
L	: Lateral
LC-MS/MS	: Sıvı kromatografisi/tandem kütle spektrometresi
MAPT	: Mikrotübül bağlantılı tau proteini
mAR	: Membran androjen reseptörü
MEM	: Memantin
ML	: Mediolateral (Ortadan yana doğru)
Mg	: Magnezyum
mGluR	: Metabotropik glutamat reseptörü
MRI	: Manyetik rezonans görüntüleme
MRM	: Multiple Reaction Monitoring
MS	: Kütle spektrometresi
MSL	: Morris su labirenti
NFY	: Nörofibriler yumak
NINCDS	: Ulusal Nörolojik ve İletişimsel Bozukluklar ve İnme Enstitüsü
NMDA	: N-metil-D-aspartat
NMDAr	: NMDA reseptörü
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
PET	: Pozitron emisyon tomografisi
PH	: Parkinson Hastalığı
PSEN	: PSEN geni tarafından kodlanan presenilin proteini
RNS	: Reaktif azot türleri
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SEF	: Sefiksim
sn	: Saniye
STZ	: Streptozotosin
t80	: Glutamat geri alım süresinin %80'i
TNF-a	: Tümör nekroz faktörü
UV	: Ultraviyole
VGLUT	: Veziküler glutamat taşıyıcıları
Voltametri	: <i>In vivo</i> voltametri

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 3.1. Deney protokolü	42
Şekil 3.2. Stereotaksi cihazı ve CA3 bölgesi koordinatları	44
Şekil 3.3. Stereotaksi üzerinde sabitlenmiş bir sıçan.....	45
Şekil 3.4. Hamilton şırıngası ile STZ enjeksiyonu	46
Şekil 3.5. Lokomotor aktivite ölçüm cihazı (MAY ACT 508)	48
Şekil 3.6. Morris su labirenti tankı (MAY WM-150).....	49
Şekil 3.7. Pasif sakınma testi ölçüm cihazı (MAY PAC-214)	51
Şekil 3.8. Sıçan kafatasının sabitlenmesi ve mikro vidaların yerleştirilmesi	54
Şekil 4.1. Lokomotor aktivite bazal ölçüm sonuçları	58
Şekil 4.2. Lokomotor aktivite tedavi sonrası ölçüm sonuçları	59
Şekil 4.3. Kontrol grubuna ait örnek lokomotor aktivite haritası.	60
Şekil 4.4. STZ grubuna ait örnek lokomotor aktivite haritası.	61
Şekil 4.5. STZ+MEM grubuna ait örnek lokomotor aktivite haritası.	61
Şekil 4.6. STZ+SEF grubuna ait örnek lokomotor aktivite haritası.	62
Şekil 4.7. Morris su labirenti testi bazal ölçüm sonuçları	63
Şekil 4.8. Morris su labirenti testi alıştırmaya yönlendirme sonuçları.	64
Şekil 4.9. Morris su labirenti testi öğrenme yönlendirme sonuçları.	65
Şekil 4.10. MSL testi Kontrol grubunun örnek sıcaklık haritası ve gezinme rotası.....	65
Şekil 4.11. MSL testi STZ grubunun örnek sıcaklık haritası ve gezinme rotası.	66
Şekil 4.12. MSL testi tedavi gruplarının örnek sıcaklık haritaları ve gezinme rotaları..	66
Şekil 4.13. Morris su labirenti grupların kadrantlarda geçirdiği süre.	67
Şekil 4.14. Pasif sakınma testi bazal ölçüm sonuçları.	68

Şekil 4.15. Pasif sakınma testi tedavi sonrası ölçüm sonuçları	69
Şekil 4.16. Voltametri testinde CA3 bölgesinde glutamat geri alım süreleri.	70
Şekil 4.17. Voltametri testi Kontrol grubu örnek kaydı	71
Şekil 4.18. Voltametri testi STZ grubu örnek kaydı.....	71
Şekil 4.19. Voltametri testi STZ+MEM grubu örnek kaydı.....	72
Şekil 4.20. Voltametri testi STZ+SEF grubu örnek kaydı	72
Şekil 4.21. LC-MS/MS Glutamik asit grafikleri.	73
Şekil 4.22. LC-MS/MS Dopamin grafikleri.	74
Şekil 4.23. LC-MS/MS Asetilkolin grafikleri.	75
Şekil 4.24. Hematoksilen-Eozin örnek boyamaları (H&E).	78
Şekil 4.25. İmmunohistokimyasal örnek boyamada Tau immunopozitifliği.	80
Şekil 4.26. İmmunohistokimyasal örnek boyamada β -Amiloid immunopozitifliği.....	81
Şekil 4.27. İmmunohistokimyasal örnek boyamada AChE immunopozitifliği.....	82

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Voltametri testinde kullanılan enzimler ve kullanım amaçları.	40
Tablo 4.1. Nöronlarda görülen piknotik değişimler.....	77
Tablo 4.2. Nöronlarda görülen dejeneratif değişimler.	78
Tablo 4.3. Tau ile yapılan immunohistokimyasal boyama.	79
Tablo 4.4. β -Amiloid ile yapılan immunohistokimyasal boyama.....	79
Tablo 4.5. AChE ile yapılan immunohistokimyasal boyama.	79

1.GİRİŞ

Nörodejeneratif hastalıklar, 65 yaş üstü toplumun %11'ini ve bu kişilerin bakımından sorumlu önemli sayıda insanı etkileyen, ilerleyici ve çoğunlukla ölümlle sonuçlanan hastalıklardır.¹⁻³ Nörodejeneratif hastalıkların etiyolojisi ve patogenezi bilinmemekle birlikte, radikal tedavileri de bulunamamıştır. Ancak yapılan çalışmalar nörodejeneratif hastalıkların patolojisinde inflamatuvar süreçlerin rol oynadığı ve hastaların nörolojik semptomlarının kötüye gittiği bilinmektedir. Nörodejeneratif hastalıklara sebep olan faktörler çeşitlidir. Yapılan çalışmalar hücre sel, genetik ve dolaşım bozukluklarının alzheimer hastalığının (AH) hem sebebi hem de sonucu olabileceğini düşündürmektedir. Diğer nörodejeneratif hastalıklardan olan parkinson hastalığı (PH), dopaminin iletiminden sorumlu nöronların hasarlanması veya ölümüyle ortaya çıkmaktadır. Amyotrofik lateral skleroz (ALS, diğer adıyla Lou Gehrig hastalığı), merkezi sinir sistemi elemanlarında (beyin, omurilik) bulunan motor nöronlarının progresif dejenerasyonu ile ortaya çıkar.⁴ PH'de dopamin eksikliğinden kaynaklanan semptomlar dopamin eksikliğinin giderilmesi ile kontrol altına alınabilirken, diğer nörodejeneratif hastalıklar için henüz benzer bir tedavi mevcut değildir. Yapılan meta analizlerde nörodejenerasyonun yaşla ilişkili olduğu bildirilmektedir.⁵ Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2040 yılı itibariyle 65 yaş üstü birey sayısının 1,3 milyar olacağını öngörmektedir ve bu sayı toplam nüfusun %14'üne denk gelmektedir. PH 65 yaş üstü olan insanların %1'inde görülürken AH bu yaş grubunun %10'unda görülmektedir.⁶ AH tedavisi pahalı bir hastalıktır. Gelecek yıllarda artan yaşlı nüfusuna bağlı olarak kamu harcamalarına ekstradan bir maddi yük olacağı belirtilmektedir. Devletlerin bu yükten kurtulmasını sağlamak amacıyla, öncelikli olarak AH'nin oluşmasını önlemeleri veya daha düşük fiyatlı ilaçların üretilmesini sağlamaları gerekir.

AH, sinsi başlangıcı olan, yaşa bağlı demansların en sık sebebi olup, progresif,

geri dönüşümsüz, tedavisi olmayan, bilişsel ve işlevsel düşüşün seyrini ifade eden nörodejeneratif bir hastalıktır ve en yaygın demans şeklidir.^{7, 8} AH'nin kesin tanısı için, otopside nöron çevresinde amiloid plakların görülmesi, nöron içinde nörofibriler yumakların tespit edilmesi gereklidir.¹ Genellikle AH ile karıştırılmasına karşın demans temelde bir semptom grubunu ifade etmektedir. Demans hafıza kaybı, konuşma zorluğu, problem çözme yeteneği ve günlük aktiviteleri gerçekleştirmeyi engelleyen zorlukları ifade eden karakteristik özelliklerdir. Demans AH'nin ilerleyen süreçlerinde karşılaşılan bir dönemdir ve hastalığın bir parçasıdır.⁸ Kardiyovasküler hastalıklar, lewy cisimciği hastalığı, PH ve frontotemporal lobar dejenerasyon gibi AH dışında birçok hastalık demansın sebebi olabilmektedir.

AH'li hastaların pahalı terapilere ihtiyaç duymasından dolayı yeni sentez birçok molekül hastalığın ilerlemesini durdurmak amacıyla kullanılmakta, ayrıca mevcut ilaçların da AH üzerindeki endikasyonları araştırılmaktadır. Hastalığı kontrol altına almak amacıyla asetilkolinesteraz inhibitörleri (AChEI), NMDA reseptör antagonistleri ve nörotransmitter geri alım aktivatörleri, kalsiyum kanal blokerleri, hormonlar, antioksidan ilaçlar ve aşı araştırmaları yapılmaktadır.^{9, 10} Kan beyin bariyerini kolay geçmeleri ve nispeten daha ucuz olmalarından dolayı nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde antibiyotiklere de yer verilmiştir.^{11, 12} Yapılan bir çalışmada cüzzamlı hastaların cüzzam ilaçlarıyla tedavi edilmeleri sonunda, tedavi edilmeyen gruplara göre önemli oranda daha az demans insidansına sahip oldukları bildirilmiştir.¹³ Minosiklin kan beyin bariyerini kolaylıkla geçebilen ikinci jenerasyon bir tetrasiklidir. Çoğunlukla akne ve romatoid artrit tedavisinde kullanılmaktadır. Huntington hastalığı, ALS ve AH gibi birçok nörodejeneratif hastalığın deney modelinde minosiklin kullanılmıştır.^{11, 14} Bir çalışmada yaşlı sıçanlarda minosiklinin mikrogliya aktivasyonunu geciktirebileceği bu nedenle de bilişsel düşüşü engelleyemediğini bildirmiştir.¹⁵ Ayrıca azitromisin ve

eritromisin makrolid grubu antibiyotikler, Amfoterisin B ve tetrasiklin de AH modellenmiş deney hayvanlarında araştırılmıştır.^{4,12} β -laktam grubu ilaçlarla yapılan bazı çalışmalardan olumsuz sonuçlar elde edilmesi üzerine araştırmacılar sefalosporinler üzerine araştırmaya yönelmişlerdir.^{16,17} Sefalosporinler AH'nin yanı sıra menenjit, inme, ALS ve PH'de faydalı bulunmuştur.¹⁸⁻²²

Glutamat ana eksitatör nörotransmitterdir. Öğrenme, bellek, algılama ve koordinasyon gibi işlevlerin düzenlenmesinde rol alır. Amiloid plakların artmasına bağlı olarak glutamatın sinaptik aralığa salınımı artarken geri alınması yavaşlar. Sinaptik aralıkta biriken glutamat eksitotoksitaya sebep olarak nöronal hasar meydana getirir ve gelişen nörodejenerasyon sonucunda demans açığa çıkar. Glutamat taşıyıcılarının eksitotoksisteki rolleri önemlidir. Üçüncü kuşak sefalosporin olan seftriaksonun EAAT-2'in biyokimyasal ve fonksiyonel aktivitesini artırdığı ve embriyonik korteks kültürlerinde, oksijen-glikoz yoksunluğunu azalttığı tespit edilmiştir.²³⁻²⁵ Üçüncü kuşak sefalosporinler kan beyin bariyerini hızlıca geçerek nöroprotektif etki gösterirler. Ayrıca bu gruptaki ilaçların bir kısmı EAAT-2 aktivasyonu yaparak, glutamat eksitotoksitesini engellemektedir.¹⁸ Glutamat geri alım aktivatörü olan ilaçların tedavide kullanılmaya başlanmasıyla beraber, AH için yeni tedavi umutları doğmuştur. Glutamaterjik sinaps çevresinde yerleşmiş olan glutamat taşıyıcıları, eksitotoksiteyi engelleyerek hastalığın ilerlemesini durdurmaktadır.²⁶⁻²⁸ Sefiksime ilacı da üçüncü kuşak sefalosporin grubundan bir antibiyotiktir.²⁹ Çalışmamızda sefiksimi kullanarak, bu ilaç vasıtasıyla sinaptik aralıktaki glutamatın geri alımını hızlandırıp eksitotoksitenin engellemeyi ve serbest hareket edebilen sıçanlarda *in vivo* voltametri (bundan sonra voltametri olarak anılacaktır) tekniğiyle glutamatın anlık salınım ve geri alımını ölçerek hastalığın mekanizmasının anlaşılmasına katkı sağlamayı hedefledik.

AH'nin sebebi tam olarak bilinmese de iki proteinin hastalıktan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Birincisi senil plakların yapısında bulunan amiloid beta (A β) diğeri ise nörofibriler yumağın yapısındaki Tau proteinidir. Erimeyen senil plakların oluşturduğu çökeltiler ile Tau proteininin hiperfosforilasyonu hastalığın patofizyolojisinde önemli rol oynamaktadır. Bunlara ek olarak mitokondri hasarları, oksidatif stres ve inflamasyon etkenleri de hastalığın oluşumuna katkı sunmaktadır. Yapılan çalışmalarla bahsedilen amiloidlerin kendi kendini kopyalaması, hücreden hücreye geçişi ve toksisitesi üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Hastalık hipokampüste belirgin dejenerasyonlara sebep olur ve bu dejenerasyonlar sonucunda hastalığın semptomları ortaya çıkmaktadır.^{7, 30-34}

Voltametri tekniği, beyinde ilgili bölgeye yerleştirilen elektrotlar vasıtasıyla sinaptik aralıkta bulunan nörotransmitterlerin davranışını saniye bazlı olarak ölçmeye yarayan bir akım ölçme tekniğidir. Voltametri tekniğiyle yapılan çalışmalar çoğunlukla anestezi altındaki sıçanlarda uygulanmıştır.³⁵⁻³⁹ AH'nin glutamat ile ilişkisi ise, voltametri tekniğiyle serbest hareket edebilen sıçanlarda daha önce araştırılmamıştır. Bu çalışmada AH'de sefiksimin glutamat aracılı eksitotoksisiteyi azaltıp azaltmadığı histopatoloji, sıvı kromatografisi/tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) ve davranış testleri ile araştırılacak ve serbest hareket edebilen sıçanlarda glutamat ilişkili voltametri ölçüm tekniği ilk kez uygulanacaktır. Bu tekniğin kullanılması, sıçanların uyanık haldeyken nörotransmitter seviyelerindeki değişiminin anlık olarak tespit edilebilmesi açısından çalışmamızı özgün kılmakta ve gelecek çalışmalar için çok önemli basamak teşkil etmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nörodejeneratif Hastalıklar

Nörodejeneratif hastalıklar nörolojik fonksiyon kaybı sonucu klinik olarak ortaya çıkan, merkezi sinir sisteminde bulunan sinir hücrelerinin ilerleyici dejenerasyonu ile karakterize edilen, tedavi edilemeyen, bilişsel ve motor fonksiyonlarda ciddi bozulmalara neden olarak, hayat kalitesini düşüren hastalıklardır. Cinsiyet, hormonal bozukluklar ve yaşlanma bu hastalıklar için en önemli risk faktörleridir. Toplam 2611 (1550'si kadın, 1061'i erkek) bilişsel durumu sağlam olan katılımcının araştırıldığı çalışmada, Framingham çalışmasına göre 65 yaşındaki bir erkek için kalan yaşam boyu AH riskinin %6.3, herhangi bir bunama hastalığına yakalanma riskinin ise %10.9 olduğu tespit edilmiştir. Aynı yaştaki kadınların kalan yaşam süresi için ise bu değerler iki katına çıkarak %12 ve %19 olarak tespit edilmiştir. Cinsiyet hormonları, hücre sağlığı ile ilgili birçok hücre içi sinyal yolağını etkileyebildiği gibi, genomik transkripsiyonu da etkileyebilmektedir.^{2, 3, 40}

Çeşitli nedenlerden kaynaklanan oksidatif stres hücre sağlığının olumsuz etkilenmesine neden olurken, cinsiyet hormonları düşük oksidatif stres seviyelerinde nöroprotektif olabilir. Testosteronun önemli bir metaboliti olan dihidrotestosteron (DHT), genomik etki mekanizması ya da genomik olmayan sinyal yolları aracılığıyla hücresel büyüme, farklılaşma, canlılığını koruma ya da ölümünü düzenleyebilir.⁴¹ Yaşlanma, cinsiyet hormonlarının sinyallerini değiştirerek onları etkisiz ya da zararlı hale getirebilir. Androjenler, nöronları kainik asit toksisitesi, A β toksisitesi ve serum yoksunluğu gibi sorunlardan koruyarak, hücre korumasıyla ilişkili ERK/MAPK yolunu hızlıca aktive edebilir.⁴²⁻⁴⁵ Öte yandan suprafizyolojik testosteron dozlarının nöronal apoptozu attırdığı tespit edilmiştir.⁴⁶ DHT oksidatif stres seviyesini artırabilir. Oksidatif stres seviyesi düşükse androjenler beyni korurken, oksidatif stres seviyesi yüksekken

androjenler oksidatif stresi şiddetlendirebilir.⁴⁷ Buna bağlı olarak, androjenlerin beyni nasıl etkileyeceği, beynin sağlıklı olup olmamasına bağlıdır. Öte yandan dişi temel cinsiyet hormonu olan östrojen, antioksidan aktiviteye sahiptir ve nörodejeneratif hastalıklara karşı koruyucu etkisi vardır.^{48, 49} Membran androjen reseptörleri (mAR), dopaminerjik hücreler, hipokampal hücreler ve beyin kortikal hücreleri gibi çeşitli tipteki hücrelerde, endositoz ya da hücre içi çeşitli kaskadlar gibi hücresel sinyalleşme yer alan, kolesterol açısından zengin bir bölge olan plazma zarı lipid bölgesinde lokalize yapılarıdır.⁵⁰ mAR, oksidatif stresi indükleyerek nörodejenerasyona sebep olabilir. Menopoza girmemiş kadınlarda östrojen miktarı androjenlerden daha fazladır fakat menopoz sırasında kadınlarda 17 β -estradiol'ün azalması/kaybı, östrojen miktarının çok düşmesine sebep olur. Yaşlanan erkeklerde ise durum daha farklıdır. Yaşlı erkeklerde androjenler östrojene dönüştürüldüğü için, yaşlı erkeklerdeki östrojen miktarı menopozdaki kadınlardan daha yüksektir. mAR önemli bir enzim olan NADPH oksidaz ile kompleks oluşturarak oksidatif streste önemli bir rol üstlenir. mAR aracılı endositoz ve apoptoz, oksidatif stres ile ilişkili nörodejeneratif hastalıklarda rol oynayabilmekte ve yüksek oksidatif strese sahip erkeklerde testosteron bilişsel bozulmaya sebep olabilmektedir. Bu sebeplerden ötürü, menopozdaki kadınlarda mAR daha fazla aktive olarak oksidatif stresi tetikleyebilmekte ve ileri yaştaki kadınlarda nörodejeneratif hastalıkların daha fazla ortaya çıkmasına sebep olmaktadır.⁵¹⁻⁵⁵ Son yıllarda yapılan ciddi çalışmalar ve ilaç araştırmalarına rağmen, nörodejeneratif hastalıklar için radikal bir tedavi ilacı geliştirilememiştir. Bu hastalıklar ilerleyici nöron kaybı ile karakteristiktir ve yaşlılıkla ilişkilendirilmektedir. Ortalama yaşam süresiyle ilişkili olarak, gelecekte bu hastalıklardan etkilenecek nüfusun da artması beklenmektedir. Mevcut durumda nörodejeneratif hastalıklar küresel sağlık sorunlarının %6,3'ünü oluşturmaktadır. Nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için yeni ilaçların yanı sıra farklı hastalıkların

tedavisinde uzun zamandır kullanılmakta olan antibiyotiklerin de dâhil olduğu farklı ilaç grupları araştırılmaya başlanmıştır. Nörodejeneratif hastalıklar dünya çapında artan bir prevalansa sahiptir. Bu durumun önümüzdeki yıllarda yaşlı nüfusunun artmasına bağlı olarak ciddi bir halk sağlığı sorunu olacağı öngörülmektedir.^{56, 57} AH, PH, ALS, huntington hastalığı ve lewy cisimciği demansı gibi hastalıklar nörodejeneratif hastalıklardır. Nörodejeneratif hastalıkların patogenezi açıklamak için yedi ana önermeden oluşan bir hipotez bulunmaktadır. (I) Çoklu risk faktörleri nörodejenerasyona sebep olurlar. (II) Yaşlanma, en önemli risk faktörüdür. (III) Yaşlanma, nöroanatomik yolları farklı mekanizmalarla etkiler. (IV) Bu yollarda meydana gelen dejenerasyon, patojenik proteinlerin meydana gelmesine sebep olur. (V) Patojenik proteinler bu nöroanatomik yollar boyunca yayılım gösterir. (VI) Ailesel ya da bireysel nörodejeneratif hastalıkların fenotipi benzerdir. (VII) Bu hastalıklar, çoklu patolojik bulgular ve benzer fenotipik görüntülerle karakterize edilirler.³¹

Demans, popülasyonu gittikçe artan önemli bir halk sağlığı sorunudur. Tedavi ilacı bulmak amacıyla yapılan tüm çalışmalar sonuçsuz kalmıştır. Mevcut demans tedavileri ise sadece kısa süreli ve küçük rahatlama sağlamaktadır. Epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen bulgulara göre, demansın en büyük etkenleri AH ve vasküler demanstır. AH bu popülasyon içinde en yüksek orana sahiptir. AH ve vasküler demansın risk faktörleri üzerine araştırmalar yapılmaya devam edilirken, genetik olmayan hipertansiyon, hiperlipidemi, sigara tüketimi ve obezite gibi risk faktörleri için de araştırmalar yapılmaktadır. Fakat bu risk faktörlerine karşı önlem alınmasının fayda sağlayıp sağlamayacağı konusu hala belirsizdir. Demanstan etkilenen insan sayısı sürekli artarak devam etmekte, global olarak pandemik boyutlara doğru ilerlemektedir. 20 senede bir hasta sayısının ikiye katlanacak olması, önemli endişeleri beraberinde getirmektedir. 2040 yılına kadar hasta sayısının 80 milyona ulaşması beklenmektedir.⁵⁸⁻⁶¹

2.2. Alzheimer Hastalığı

AH, yaşlılıkla ilişkili olan çok yaygın bir nörodejeneratif hastalıktır. DSÖ, dünya genelinde 50 milyon AH'li hastanın olduğunu tahmin etmekte ve 2050 yılına kadar bu sayının 150 milyonu aşacağını öngörmektedir. DSÖ 2022 yılı raporunda, AH'nin tüm demans olgularının %60-75'inden sorumlu olduğu bildirilmiştir.⁶²⁻⁶⁴ Tüm dünyada ölüm nedenleri arasında demans yedinci sıradadır ve sadece hastaları değil bakıcıları, aileleri ve toplumu sosyal, psikolojik ve ekonomik olarak etkileyen bir hastalıktır. Demans esas olarak yaşlıları etkilese de yaşlanma sonucu kaçınılmaz olarak yaşanacak bir olgu değildir. Doğurganlığın azalması, gelişen tıp ve teknolojik imkanlar nedeniyle ortalama yaşam süresinin uzaması yaşlı nüfusun artmasına neden olmuştur. Buna bağlı olarak AH gibi nörodejeneratif hastalıklardan mustarip bireylerin sayısı da artmaktadır. Henüz radikal bir tedavisi bulunmamakla birlikte AH'nin semptomatik tedavisi pahalıdır ve sağlık giderleri için önemli bir yük oluşturmaktadır. Sağlık giderlerinin azaltılması için öncelikle hastalığın oluşumuna neden olan faktörlerin belirlenmesi, koruyucu önlemlerin araştırılması ve daha düşük maliyetli ilaçların geliştirilmesi önem arz etmektedir.⁶²⁻⁶⁶

AH'nin kliniği dört evre olarak sınıflandırılmaktadır. İlk evre, günlük aktivitelerde herhangi bir işlevsel bozulma olmaksızın, hafif hafıza kaybı, korteks ve hipokampüste erken patolojik değişiklikler ile karakterizedir. AH bu evrede klinik semptom göstermediği için preklinik (pre-semptomatik) evre olarak isimlendirilmektedir. Bu aşamalar birkaç yıl veya daha uzun sürebilmektedir. İkinci evre, AH'nin hafif veya erken aşaması olarak kabul edilir. Bu evrede, konsantrasyon bozukluğu, hafıza kaybı, yer ve zaman algısı bozukluğu, duygu durum değişikliği ve depresyon gelişimi gibi semptomlar yüzünden hastanın günlük hayatında sorunlar oluşmaya başlamaktadır. Hastalığın üçüncü evresinde lezyonlar serebral korteks bölgesine yayılmıştır. Hasta ailesini ve arkadaşlarını tanımada güçlük çeker, dürtü kontrolünü kaybeder, okuma, yazma ve konuşma

güçlüğüyle beraber hafıza kaybı ile sonuçlanmaktadır. Hastalığın dördüncü evresi, şiddetli AH veya geç evre olarak kabul edilir. Bu evrede ağır nöritik plaklar ve nörofibriler yumak (NFY) birikimi ile hastalık tüm korteks alanına yayılmıştır. İlerleyici şekilde işlevsel ve bilişsel bozuklukların ortaya çıktığı bu evrede hasta ailesini hiç tanıyamaz, idrara çıkma, yutkunma gibi hayati görevleri yerine getiremeyebilir ve yatalak olabilir.⁶⁷⁻⁶⁹

2.3. Tarihçe

Tarih boyunca insanların yaşamını etkilemiş olsa da AH klinik olarak ilk defa yirminci yüzyılın başında teşhis edilmiştir. Alman psikiyatrist ve nöropatolog olan Alois Alzheimer (1864–1915), 1901 yılında tüm bakıcı yardımlarını reddeden, bellek bozukluğu olan ve okuma yazma zorluğu yaşayan August Deter isimli 51 yaşındaki kadını 1906 yılına kadar klinik olarak takip etmiştir. 1906 yılında vefat eden Deter'in otopsisini yapabilmek için Frankfurt'taki klinikten hasta kayıtlarını ve Deter'in beynini Münih'e getirtmiştir. Yaptığı mikroskobik incelemede korteksin normale göre daha incelendiğini belirlemiş ayrıca iki yeni oluşum tespit etmiştir. Bunlardan ilkinin senil plaklar olarak adlandırılmıştır ve daha önce yaşlılarda tanımlanmıştır. İkinci yapı ise daha önce hastalarda tanımlanmamış olan NFY'lerdir. Daha önce tanımlanmamış bu yapı yeni bir hastalığa işaret ediyordu. Alzheimer bu hastalığı 1906 yılında kongrede “Serebral Korteksin Tuhaf Bir Hastalığı” ismiyle sunmuştur ve ilk defa presenil demans olarak tanımlamıştır. Alzheimer'ın çalışma arkadaşı olan Emil Kraepelin 1910 yılında Klinik Psikiyatri kitabında AH'den ilk kez bahsetmiştir. Hastalığın yeterince tanınmamış olması nedeniyle Alzheimer'ın yayımlamış olduğu makale yeterince ilgi görmemiştir. Nöropsikiyatrik araştırmaların artması ve 70'li yıllarda hastalığın tanınmaya başlamasıyla birlikte makale dikkat çekmiştir. Çünkü hastalık hakkındaki modern anlayış ve hastalığın sebep olduğu nöropsikiyatrik sorunlar ancak bu yıllara gelindiğinde

anlaşılmaya başlanmıştır. 1980'lerden itibaren AH araştırmaları ciddi bir şekilde yükseliş gösterdi ve hastalığın özellikleri, olası tedavileri ve nedenleri hakkında birçok bildiri yayımlanmıştır.^{8, 70-72} Glenner ve Wong, 1984 yılında AH'li hastaların meninks damarlarından β -amiloid ($A\beta$) izolasyonunu ve kısmi sekansını gerçekleştirmişlerdir.⁷³ Down sendromlu bireylerin önemli bir kısmı 50 yaşına gelmeden AH'ye yakalanmaktadır.⁷⁴ Glenner ve Wong, aynı sene down sendromlu bir hastadan aldıkları örneklerden elde ettikleri sekansları saflaştırmışlar ve bu sekansların $A\beta$ 'nin homoloğu olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışma ile Glenner ve Wong down sendromu ve AH arasında kimyasal bir ilişki olduğunu ilk kez ortaya koymuştur.⁷³ 1987 yılında amiloid prekürsör proteinlerin (APP) klonlanması ve AH'li bireylerin ailelerinde genetik analizin yapılmasıyla birlikte AH hakkında önemli bilgiler de elde edilmiştir.⁷⁵ Sonraki çalışmalarda AH demansının diğer demanslardan farkı ortaya koyulmuştur. 90'lara gelindiğinde bu çalışmalara ek olarak, bilişsel mekanizmalar üzerine de araştırmalar ve tanımlamalar yapılmaya başlanmıştır. 2000'li yıllarda hastalığın ilk evresi aydınlatılmaya çalışılmıştır. Son 20 yılda ise hastalığı karakterize edebilecek görüntüleme yöntemlerinde gelişmeler kaydedilmiş ve potansiyel tedavi yöntemleri yayımlanmaya başlamıştır.^{8, 70-72}

2.4. Epidemiyoloji

Klinik olarak AH demansının prevalansı yüksektir ve yaşlanan popülasyonla birlikte daha da artacağı öngörülmektedir.^{6, 76, 77} Farklı araştırmalarda, çalışma yıllarının sonuna gelmiş kişiler, emekliler ya da rutin hayatlarında uğraşları azalmış kişilerin %3 ila 4'ünde AH demansının olduğu tespit edilmiştir.⁷⁸⁻⁸² 2010 yılında Çin'de yapılan bir çalışmada, 55-59 yaş arasındaki AH prevalansı %0,2 iken 95-99 yaşları arasında bu oran %48,2'ye yükseldiği bildirilmiştir.⁸³ Cinsiyet üzerine yapılan bir meta analizde, kadınların %7,13'ü hastalığa yakalanırken bu durum erkeklerde %3,31 olarak tespit edilmiştir. Bu analiz ile kadınların daha yüksek oranda AH'ye yakalanma riski olduğu

tespit edilmiştir.⁷⁹ Çin’de yapılan başka bir çalışmada yaş, iş yerinde çalışma süresi ve kentsel-kırsal bölge gibi faktörler değerlendirildiğinde kadınların AH demansına sahip olma oranı iki kat daha fazla bulundu.⁸³ ABD, Avrupa, Japonya ve Çin’de yapılan klinik tanı testlerinde yıllık her 1000 kişiden 2 ilâ 16.8’inin AH’ye yakalandığı tespit edilmiştir.^{77-80, 83, 84} Avrupa’da ise klinik olarak AH insidansını araştıran bir meta analizde, yaşın artmasına bağlı olarak hastalığın ortaya çıkışında artışın olduğu tespit edilmiştir. Bu araştırmaya göre 65-74 yaş aralığında hastalığa yakalanma riski %3.4 iken, 75-84’te %13.8, 85 yaş üstünde ise bu oran %35.8’dir.⁷⁹ Yapılan çalışmaların çoğunda AH’nin ortaya çıkma insidansının yaşla birlikte arttığı gösterilmiştir.^{80, 85, 86}

2.5. Risk Faktörleri

AH, artan yaş, genetik faktörler, kafa travmaları, damar rahatsızlıkları, inflamasyonlar ve ağır metal birikimi gibi çevresel faktörlerle ilişkili çok faktörlü bir hastalıktır. AH’deki A β , NFY’ler ve sinaptik kayıp gibi patolojik değişikliklerin nedeni hâlâ tam olarak bilinmemektedir. AH’nin ana nedenlerine ilişkin farklı hipotezler öne sürülmüştür ancak kolinerjik ve amiloid hipotezler dikkat çekmiştir. Kolinerjik fonksiyondaki bir bozulmanın AH için kritik bir risk faktörü olduğunu savunanlar olduğu gibi, A β proteinindeki değişimin AH’nin ana faktörü olduğunu savunulmaktadır. Tüm bu teoriler üzerinde araştırmalar devam ederken, AH patogenezi açıklayabilecek kabul edilmiş bir teori yoktur.^{87, 88} AH’ye sebep olan risk faktörleri; kardiyovasküler riskler, diyabet, hipertansiyon, dislipidemi, metabolik sendromlar ve obezite, sigara tüketimi, düşük fiziksel aktivite, serebral hipoperfüzyon, inme veya serebrovasküler travmalar, depresyon, şiddetli kafa travmaları ya da beyin hasarları, duyma kayıpları, düşük eğitim, zekâ, meslek ya da sosyal kazanım, düşük sosyal etkileşim, yaşlanma, cinsiyet (kadın > erkek), aile öyküsü (ilk veya ikinci dereceden akrabalarda olan AH), ırk, down sendromu ve Apoe-e4 allelidir.^{6, 87, 89, 90}

2.6. Alzheimer Hastalığı ile İlgili Hipotezler

2.6.1. Kolinerjik Hipotez

Yapılan çalışmalarda, kolinerjik hipotezin neokortikal ve presinaptik kolinerjik eksikliklerin, ACh sentezinden sorumlu kolin asetiltransferaz (ChAT) enzimi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. ACh kolinerjik nöronların sitoplazmasında, kolin ve asetil-koenzim A'dan ChAT enzimi vasıtasıyla sentezlenir ve sinaptik veziküllere taşınmaktadır. ACh hafıza, dikkat, duyuşsal bilgi, öğrenme ve birçok kritik fizyolojik işlevde önemli rol oynaması bu hipotezin ortaya atılmasına neden olmuştur. AH'de yapılan araştırmalarda, kolinerjik nöronlarda meydana gelen dejenerasyon sonucu, bilişsel işlevlerde bozukluk ve hafıza kaybı ortaya çıktığı tespit edildi. A β , kolinerjik nörotransmisyonu bozarak kolin Emilimini azaltır, bunun sonucunda ACh sentezi ve salınımı da azalır. Presinaptik kolinerjik terminallerde bulunan nikotinik ve muskarinik (M2) reseptörlerde azalma, birçok kortikal alanda glutamat konsantrasyonunun ve D-aspartat Emiliminin azalması, eksitator aminoasit nörotransmisyonunda bozukluklar oluşması gibi faktörlerin AH'nin ilerlemesine katkıda bulunduğı bildirilmiştir.⁹¹⁻⁹³

2.6.2. Amiloid Hipotezi

Keşfinden bu yana, MSS'de β -tabakalarının normal olmayan birikiminin demans ile güçlü bir ilişkisi olduğu kabul edilmiş ve amiloid hipotezinin geliştirilmesini sağlamıştır. Fakat, yaşlanmayla birlikte sağlıklı beyinlerde de amiloid plakların biriktiğinin bulunması, amiloid plak birikiminin AH'nin başlamasından sorumlu olup olmadığı sorusunu gündeme getirmiştir. Bununla birlikte amiloid hipotezi, patolojik mekanizma yönüyle yaygın olarak kabul görmektedir. Amiloid hipotezinde, APP'den β -sekretaz ve γ -sekretaz enzimleri tarafından türetilen A β 'nın parçalanmasının, yaş veya patolojik koşullar sebebiyle azaldığını ve bu yüzden A β peptitlerinin (A β 40 ve A β 42) birikmesine yol açtığını öne sürülmektedir. A β 42/A β 40 oranının artması ise, amiloid

fibril oluşumunu indükleyerek nörotoksositeye ve tau patolojisinin indüksiyonuna yol açmakta ve sonuç olarak nöronal hücre ölümü ve nörodejenerasyon meydana getirmektedir. APP, PSEN1 ve PSEN2 gibi birkaç gende meydana gelen mutasyonların, A β katabolizmasını ve anabolizmasını etkilediği tespit edilmiştir. Bu durumun da nörodejenerasyonun hızlı ilerlemesine ve A β birikimine neden olduğu bulunmuştur.⁹⁴⁻⁹⁶

2.7. Tanı Yöntemleri

AH semptomları gösteren bir hastada, nörolojik muayene, sinir sisteminin manyetik rezonans görüntüleme (MRI) yöntemiyle incelenmesi, B12 vitamini eksikliğinin incelenmesi, tıbbi geçmiş ve ailedeki hastalık öyküsünün incelenmesi gibi uygulamalar yapılmalıdır.⁹⁷ B12 eksikliğinin nöronal kayıplara neden olduğu ve bazı durumlarda AH ile ilişkisi bilinmektedir. Homosistein seviyelerinde artışa neden olan B12 vitamini eksikliği, oksidatif stres, kalsiyum akışının artışı ve hücre apoptozu gibi belirteçler yoluyla beyin hasarına yol açmaktadır.^{98,99}

1984 yılında AH için klinik tanı kriteri oluşturmak amacıyla Ulusal Nörolojik ve İletişimsel Bozukluklar ve İnme Enstitüsü (NINCDS) ile AH ve İlişkili Bozukluklar Derneği (ADRDA) ortak bir çalışma grubu kurmuştur.^{100, 101} Bu çalışma grubu belirledikleri kriterleri 7 başlık altında toplamışlardır: (I) Nöropsikolojik testler ile doğrulanan demans, ilerleyici hafıza kaybı, iki veya daha fazla bilişsel alanda kayıplar, bilinç bozukluğu gibi semptomlar ve 40-90 yaşları arasında genelde 65+ yaşta görülen hafıza ve biliş eksikliği muhtemel AH olabilir. (II) Günlük yaşam aktivitesinde bozulma, aile öyküsü ve geçmiş hastalıkların tetiklediği hasarlar, EEG, CT gibi laboratuvar bulguları ve dil bozukluğu (afazi), motor beceri bozukluğu (apraksi) gibi diğer semptomlarla AH teşhis edilebilir. (III) Delüzyon, uyku bozukluğu, depresyon belirtileri, idrar kaçırma, yanılsamalar ve sanrılar, sözselsel ya da fiziksel duygu patlamaları ve kilo kaybı AH için muhtemel tanılar olabilir. (IV) Erken evrede vücudun bir yarısında bulunan

kaslarda meydana gelen kuvvetsizlik (hemiparezi), duyuşsal kayıplar, görme alanında azalmalar, koordinasyon bozuklukları ve hastalığın çok erken safhalarında görülen nöbetler AH'yi belirsiz ya da tanımlanamaz hale getirebilir. (V) Tanımlanabilir başka nedenin yokluğunda, kademeli olarak ilerleyen ciddi bilişsel eksiklik durumunda hastalık klinik olarak kabul edilebilir. (VI) Biyopsi veya otopsi ile elde edilen histopatolojik bulgular AH'nin kesin tanısı için gereken kriterlerdir. (VII) Ailesel öykü, 65 yaşından önce başlama, PH gibi durumların varlığı, AH'yi sınıflandırmak için ihtiyaç duyulan kriterlerdir.^{100, 101} 2011 yılında Ulusal Yaşlanma Enstitüsü ve Alzheimer Derneği bazı değişiklikler yaparak, daha yüksek özgüllük ve duyarlılık kriterleri ortaya koymuştur. Bu kriterler; A β birikimi, pozitron emisyon tomografisi (PET) ile amiloid görüntüleme, beyin omurilik sıvısı TAU/fosforile TAU miktarı, hipokampal hacim, beyin atrofi oranı, biyokimyasal değişiklikler, sitokin gibi inflamatuvar belirteçler ve hücre ölümü gibi birtakım sinaptik hasar ve nörodejenerasyon belirteçleridir.¹⁰²

2.8. Patofizyoloji

2.8.1. A β Plakları ve Nörofibriler Yumaklar

Amiloid plaklar, AH'de görülen patolojik bulguların başında gelir. APP'nin proteolitik yıkımı sonucunda oluşan ve AH ile ilişkilendirilen, 40 ve 42 aminoasit uzunluğunda olan A β peptitleri tanımlanmıştır.¹⁰³ Anormal oluşumlar olan A β ve NFY'lerin nasıl geliştiğinin iyi belgelenmiş olması, AH hakkında daha anlaşılır bilgilere sahip olmamızı sağlamıştır. A β plakları, 4kDa moleküler ağırlıkta olup 36-43 amino asitlik amiloid peptitlerden oluşur.¹⁰⁴ 21'inci kromozom üzerinde bulunan amiloid öncü proteininin APP geni tarafından bölünmesiyle üretilirler. Genetik olarak AH'ye sahip bireylerin çoğunluğunda APP geninde mutasyonlar vardır. Ayrıca down sendromlularda 21'inci kromozomun fazladan olan kopyası daha fazla APP üreteceği için, erken dönemde AH'nin klinik ve patolojik bulgularını gösterdiği bilinmektedir. Transmembran proteini

olan APP, 3 proteolitik enzim (α -sekretaz, β -sekretaz ve γ -sekretaz) ile metabolize edilir. APP ilk olarak α -sekretaz (nörotoksik olmayan) veya β sekretaz (nörotoksik) enzimlerinden birisiyle kesilir. α -sekretaz ile nörotoksik olmayan normal kesim sonucunda sAPP α parçası ekstraselüler boşluğa salınırken, C83 parçası ise hücre zarında kalır. β sekretaz ile nörotoksik olan kesim sonucundaysa, sAPP β parçası ekstraselüler boşluğa salınırken, C99 parçası hücre zarında kalır. İkinci basamakta ise diğer bir enzim olan γ -sekretaz devreye girerek, β -sekretaz ile kesim sonucu hücre zarında kalan C99'dan, A β ve APP intraselüler domain (AICD) parçalarını oluşturur. γ -sekretaz ile kesim heterojen olup, bu nörotoksik kesim sonucunda A β 40'ın oluşma miktarı A β 42'nin oluşma miktarına göre daha fazladır. A β 42, A β 40'a kıyasla daha uzundur ve ayrıca fibriler forma dönüşmeye daha yatkın olan hidrofobik bir peptittir. Bundan dolayı A β 42, amiloid plakları oluşturan ve bu plaklarda çökme eğilimi olan amiloiddir.^{103, 105} AH sadece APP geninden kaynaklı mutasyonlarla değil, presenilin-1 (PSEN1) ve presenilin-2 (PSEN2) genlerinden kaynaklanan mutasyonlardan dolayı da şekillenebilir. Bu sebeple multifaktöriyel bir hastalıktır. Presenilin, APP'den A β peptidini ayıran gama-sekretazın alt birimi olarak çalıştığı için APP işlenmesinde görev alır ve bu yüzden önemlidir.¹⁰⁶ A β birikimi sonucu plaklar hakkındaki bilgi arttıkça, AH'nin ilerleyişi konusunda amiloid kaskad hipotezi ortaya atıldı. Bu hipoteze göre, APP ve PSEN genlerinde meydana gelen mutasyonlar, AH'ye genetik olarak sahip olan bireylerde amiloid peptitlerin beta kıvrımlı bir yapıya dönüşmesini ve tabaka halinde beyinde birikmesini öne sürer. Bu hipotez ayrıca şu alternatif görüşü de ortaya koyar. A β peptitlerinin klirensini sağlayan dış faktörlerin etkinliğinin azalmasına bağlı olarak bu peptitlerin birikimi artar ve sporadik AH meydana gelebilir. Örneğin, astrositlerde ekspresyonu yapılan aquaporin-4'ün (AQP4) ekspresyonu sekteye uğrar veya bozulursa, beyinde A β 'yi temizleyen glifatik yolda aksamalar olur ve A β birikimi hızlanır.¹⁰⁷⁻¹¹⁰ Her iki şekilde de senil plakların

oluşumuna neden olan A β peptitlerinin birikimi oluşur ve sinapslarda dejenerasyon, inflamatuvar reaksiyonlar, plak birikimi, TAU proteini hiperfosforilasyonu ve nöron ölümü de dahil olmak üzere bir seri olaylar gelişir.¹¹¹

2.8.2. Yaşlanma

AH yaşlanmayla ortaya çıktığı iyi bilinen bir durumdur. Beynin kompleks yapısı yaşlanmayla beraber gittikçe azalır. Buna ek olarak dendritlerin karmaşık iletişimi, sinapsların yoğunluğu ve astrositlerin fonksiyonlarının da azalması da yaşlanmanın etkilerindendir. AH'nin ortaya çıkabilmesini tetikleyen bir dizi olayın ortaya çıktığı öne sürülmüştür. İlk sırada, yaşlanmaya bağlı olarak beynimiz nöronal koruma yeteneğini yavaş yavaş kaybeder ve inme ya da travmatik beyin hasarı gibi bir hastalıkta beyinde meydana gelen bozukluklar patolojik olarak AH gelişimine sebep olabilir.¹¹¹ İkinci sırada ise inflamasyon vardır. Kronik inflamasyon olgularının AH'ye sebep olduğu bilinmektedir. Çalışmalar, non-steroid anti inflamatuvar ilaçların uzun süreli kullanımında AH riskinin %30 ile %60 arasında azaltılabileceğini göstermiştir.¹¹² Üçüncü olay ise, uzun süreli inflamasyona bağlı olarak nöronal fizyolojinin değişmesini içerir. Stres altında bulunan nöronlar tekrardan bölünme sirkülasyonuna girerler fakat DNA replikasyonu sonrası bölünmeyi durdur ve geri döndüremez. Sonuç olarak bu duruma gelmiş hücrelerde bir kopya DNA materyali oluşur ve hücrede dramatik değişikliklere sebebiyet verir. Bu kopya DNA, sinaptik fonksiyonları bozar, nöronal kayıplara sebep olur ve nörotransmitter miktarını azaltarak AH'nin ortaya çıkmasına sebep olur.¹¹³

2.8.3. Oksidatif Stres

Solunum yoluyla alınan oksijenin vücutta kullanılması ve metabolize olması sırasında birtakım serbest radikaller açığa çıkar. Vücudumuz normal şartlar altında bu radikalleri kontrol eder fakat bazı durumlarda kontrol mekanizması aksar ve aşırı şekilde serbest radikaller oluşur. Bu duruma oksidatif stres olarak adlandırılır. Hücresel

reaksiyonların çoğunun yürütülebilmesi için gerekli olan enerji, mitokondri içinde aerobik şartlarda glikozun oksidasyonu ile üretilir. Beyin vücut ağırlığının %2'sine sahip olmasına rağmen, üretilen enerjinin yaklaşık olarak %20'sini tüketir. Bu kadar yüksek enerji tüketimine sahip olması, beyni diğer organlardan daha fazla olarak oksidatif stres altına sokar.¹¹⁴

Hücrelerde güç merkezi olarak görev alan mitokondriler, reaktif oksijen türleri (ROS) ile reaktif azot türlerinin (RNS) üretilmesinde kilit görev alırlar. Serbest radikal olarak adlandırılan bu ürünlerin, düşük miktarlarda kanserle ve enfeksiyonla mücadele etmek gibi işlevleri vardır. Mitokondri membranları hücre sitoplazmasında giren ve metabolizma sonucu su veya oksijene dönüştürülebilen bu ürünler için aşırı geçirgendir. Böylece, aşırı üretildikleri zaman mitokondrilerin kendisi ya da dismutaz enzimleri bu ürünleri parçalayarak hücre hasarını engelleyebilir. Eğer mitokondri işlevinde aksamalar meydana gelirse ROS üretimi artarak nöronal hasarlara ve AH'ye sebebiyet verebilir. Aβ'nın mitokondriyum disfonksiyonuna sebep olacağı öne sürülmüş, bir çalışmada ise mitokondriyumda lokalize olmuş Aβ'nın serbest radikallerin üretilmesini artırdığı ve nöronlarda hasar oluşturduğu bildirilmiştir.¹¹⁵

Aβ, APP proteinin proteolitik olarak işlenmesi sonucu oluşur ve Aβ birikimi oksidatif stres oluşturan hücresel değişiklikler meydana getirebilir. AH için ayırt edici bir molekül olan NFY'leri oluşturan hiperfosforile tau proteininin oksidatif stres mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Tau proteini, mikrotübüllerin polimerizasyonu ile stabilizasyonundan sorumlu olan bir nöronal iskelet proteindir. Tau proteininin mikrotübüllere bağlanmasını GSK-3β sağlar ve bu bağlanma işlemi protein kinazlar tarafından fosforilasyon yoluyla sağlanır. Yapılan çalışmalar bu proteinlerin mitojen aktive edici protein kinaz gibi hücresel yollar üzerinde oksidatif stresi tetiklediğini ve hücresel hasara sebep olduğunu bildirmiştir.¹¹⁶ İnsülin reseptörlerindeki bozulma ya da

insülin üretimindeki aksaklıklar sonucunda hiperglisemi meydana gelir. Bunun durum serbest radikallerin (süperoksit, H₂O₂ vb) üretimine neden olarak beyinde lipid peroksidasyonuna ve hücre hasarına sebep olur.¹¹⁷ İnsan beyni oksidatif strese karşı oldukça hassas bir yapıdadır. Bunun sebebi, perokside olma potansiyeli olan çoklu doymamış yağ asitlerinin aşırı miktarda bulunması ve antioksidanlar ile enzimlerin miktarının bu asitlerin miktarına kıyasla görece daha az olmasından dolayıdır. Aβ birikimini, TAU proteininin hiperfosforilasyonu ve bu olayları takip eden nöronal kayıplardan dolayı oksidatif stres AH'yi oluşturan patolojik süreçlerin arasına katılır.¹¹⁴ Tüm bunlardan ötürü, antioksidanların AH tedavisinde yararlı olabileceği açıktır.

2.9. Nöropatoloji

AH'de, hastalığın ilerlemesi ve semptomları hakkında kesin kanıt elde etmemizi sağlayan ve iki tür nöropatolojik değişiklik vardır: (1) NFY'ler, amiloid plaklar, distrofik nöritler, nöropil ipliklerinin birikmesi ile karakterize edilen pozitif lezyonlar (birikme), ve AH hastalarının beyinlerinde bulunan diğer tortulardır (2) Nöral, nöropil ve sinaptik kayıp nedeniyle meydana gelen büyük atrofi ile karakterize negatif lezyonlardır.⁷ Ayrıca nöroinflamasyon, oksidatif stres ve kolinerjik nöronların yaralanması gibi diğer faktörler de nörodejenerasyona neden olabilmektedir. AH hastalarının beyinlerinde bu patolojilerin gelişimi hafıza kaybı, depresyon ve anksiyete gibi bilişsel ve davranışsal değişikliklere yol açmaktadır.¹¹⁸ Senil plaklar, farklı morfolojik formlara (nöritik, yaygın, yoğun çekirdekli, klasik veya kompakt tip) sahip olan Aβ proteininin ekstraselüler birikintileridir. Aβ, nörotoksisite ve nöronal fonksiyonlarda önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle hipokampus, amigdala ve beyin korteksinde fazlaca birikmeleri sonucu bilişsel bozukluklara ek olarak astrosit ve mikrogliaların uyarılmasına, akson/dendrit hasarlarına ve sinaps kayıplarına yol açarlar.^{119, 120} NFY'ler, hiperfosforile edilmiş tau proteininin anormal filamentleridir. Bazı aşamalarda çift sarmal filament oluşturmak üzere birbiri

etrafında bükülebilir ve nöral sitoplazmada, aksonlarda ve dendritlerde birikerek sitoskeletal mikrotübüllerin ve tübülünle ilişkili proteinlerin kaybına neden olmaktadır. Hiperfosforile tau proteini, AH hastalarının beyinlerindeki NFY'lerin ana bileşenidir ve tau'nun gelişimi NFY'lerin morfolojik aşamalarını yansıtabilmektedir. İlk aşama, NFY'nin bir türü olan, fosforile edilmiş tau proteinlerinin vücutta biriktiği ve çift sarmal filaman yapısı olmayan ön yumak fazıdır. İkincil aşama, taun proteininin filament agregasyonu sonucu çekirdeğin periferine kayması ile karakterize olan olgunlaşmış NFY'lerdir. Son olarak, proteolize karşı kısmi direnç kazanmış olan, büyük filamentli tau proteini birikmesine bağlı ekstraselüler yumak aşamasıdır.^{121, 122} Bu kimyasal değişikliklere ek olarak sinaptik kayıplar da hastalığın nöropatolojisinde rol oynamaktadır. Neokorteks ve limbik sistemdeki bir sinaptik hasar, hafıza bozukluğuna sebep olur ve çoğunlukla AH'nin erken evrelerinde görülmektedir. Sinaptik kayıp mekanizmaları, aksonal taşımadaki kusurları, mitokondriyal hasarı, oksidatif stresi ve sinaptik bölgelerde A β ve tau birikimi gibi küçük fraksiyonlara katkıda bulunabilecek diğer süreçleri içermektedir. Bu süreçler, sonuç olarak dendritik dikenler ile presinaptik terminallerin kaybına ve aksonal distrofiye yol açar. AH, beyinde hipokampus, subkortikal çekirdekler, substantia nigra, ventral tegmental alan gibi birçok bölgeyi etkilemektedir.^{123, 124} Afferent nöronların dejenere olması, mitokondriyal birtakım anormallikler ve monoaminerjik hücrelerin apoptozu gibi olaylar bu bölgelerdeki hasarın ortaya çıkmasına sebep olabilmektedir. Bununla birlikte bu olayların AH'ye sebep olup olmadığı net olarak anlaşılamamıştır. A β klirensinin olmaması ve beyinde birikimi, yaşlanan nöronların oksidatif strese daha duyarlı hale gelmesine sebep olmakta ve buna bağlı olarak fonksiyon bozukluğu geliştirdiği düşünülmektedir.¹²⁵

2.10. Beyinde Bulunan Nörotransmitter Sistemi ve Disfonksiyonları

Beyinde bulunan ve nörotransmitter olarak adlandırılan endojen sinyal

moleküllerinin nöronlar arasında sinyal ilettiği süreçlere nörotransmisyon denilir.¹²⁶ Dendritlerinde aksiyon potansiyeli oluşmuş ve bunu aksonlarına ulaştırmış olan bir nöronun akson uçlarından salınan nörotransmitterler sinaptik aralığa boşalır ve bu yarıktan geçerek başka bir nöronun dendriti üzerinde bulunan reseptörlere bağlanır. Bu bağlanma sonucu bu nöron hücresinde de aksiyon potansiyeli oluşur. Nörotransmitterlerin döküldüğü ve dendritlere bağlanarak nöronlar arası iletişimin sağlandığı sinaptik aralık; aksonlar, dendritler ve bu yapıların çevresinde bulunan glial hücrelerin arasında kalan boşluk yapısıdır. Astrositler başta olmak üzere glial hücreler, geri bildirim mekanizmalarını kullanarak nörotransmisyonu önemli ölçüde düzenlerler.¹²⁷ Presinaptik nöronlardan gelen iletim, postsinaptik nöronlarda bulunan reseptörlere iletilir ve sinyal iletimi sağlanır. Postsinaptik reseptörler metabotropik veya iyonotropik reseptör olabilirler. Metabotropik reseptörler sinyal iletimini G proteini gibi mekanizmalarla sağlarken iyonotropik reseptörler ise ligand kapılı iyon kanalları vasıtasıyla sinyal iletimi sağlarlar.¹¹⁷ Nörotransmitterler, monoaminerjik ve kolinerjik nörotransmitterler dahil olmak üzere çeşitli tiplerde sınıflandırılabilir. AH patogenezinde önemli monoaminerjik nörotransmitterler arasında dopamin (DA), serotonin (5-HT) ve histamin yer alırken, önemli kolinerjik nörotransmitterler arasında gama aminobütirik asit (GABA) ve ACh bulunur.^{123, 128} İlginç bir şekilde, son yıllarda melatonin, alternatif bir nörotransmitter bazlı terapötik ilaç olarak önerilmiştir.¹²⁵

2.10.1. Asetilkolin

AH ile ilişkisi en iyi bilinen nörotransmitter asetilkolindir (ACh). ACh beyinde iyi şekilde dağılmıştır. ACh üretimini devralan nöronlar da yaygın şekilde bulunur beyinde bulunan nöronların çoğunu innerve ederler. ACh'nin bu kadar yaygın olması ve diğer nöronlarla etkileşimi göz önüne alındığında, ACh'nin AH'yi etkileyen stres gibi olayların yanı sıra, hafıza ve öğrenme gibi birçok fizyolojik olaydan da sorumludur.⁹² Yapılan

çalışmalarda Ach ile AH'nin doğrudan ilişkisi olduğu kanıtlanmıştır.¹²⁹⁻¹³¹ AH'de, asetilkolinesteraz inhibitörleri (AChEI) donepezil, rivastigmin, memantin ve galantamin gibi nörotransmitter inhibitörlerinin terapötik potansiyeli iyi bir şekilde belirlenmiştir.¹¹⁷ Bu ilaçlar, kolinerjik iletimi iyileştiren, hafızada ve öğrenmede uzun süreli güçlenmeyi indükleyen asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesini inhibe ederek ACh bozulmasını önleyerek etki göstermektedir. Ancak AChEI'ları AH semptomlarını hafifletmekle birlikte hastalığın ilerlemesini durduramazlar. AH'li hastalarda serotonerjik ve dopaminerjik sistemler de dahil olmak üzere monoaminerjik sistemler, kolinerjik sistemler (ACh, GABA) ve glutamaterjik sistemlerin nörotransmisyonu bozulmaktadır.¹³²

2.10.2. Gama Aminobütirik Asit (GABA)

AH ile ilişkisi olan başka bir nörotransmitter ise GABA'dır. GABA sisteminin biliş, bellek, öğrenme, motor fonksiyonlar, günlük biyolojik saat (sirkadiyen ritim) ve nöronal gelişme gibi faktörler üzerinde etkinliği vardır.¹³³ Bu nedenlerden ötürü GABA'daki bozuklukların da AH oluşumuna etkisi olacağı düşünölmektedir. GABA'nın tespiti için ölüm sonrasında alınan dokulardan glutamik asit dekarboksilazın aktivitesi ölçölmektedir fakat bu enzim içinde bulunduğu ortamdan kolaylıkla etkilenmesi nedeniyle yanlış ölçömler ortaya çıkabilmektedir. Bundan dolayı GABA ile AH arasındaki ilişki net olarak ortaya konulamamıştır.¹³⁴

2.10.3. Glutamat Reseptörleri

İyonotropik ve metabotropik reseptörler olmak üzere iki grup glutamat reseptörü vardır. İyonotropik reseptörler hızlı sinyal iletmekten sorumludurlar ve 3 alt gruba ayrılırlar: α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit (AMPA), N-metil-D-aspartat (NMDA) ve Kâinat reseptörleridir. Metabotropik reseptörlerin ise, metabotropik glutamat reseptörü 1'den (mGluR1) mGluR8'e kadar tipleri vardır. İyonotropik

reseptörler, ortamda glutamat varken Na^{+2} , K^{+} ve Ca^{+2} gibi iyonların membrandan geçmesine izin vererek depolarizasyona sebep olarak aksiyon potansiyeli oluştururlar. mGluR'lar ise, G proteini yapısındadır ve etkilerini ikinci ulaklar vasıtasıyla gerçekleştirirler. Bu sebeple iyonotropik reseptörlerin oluşturduğu sinyaller metabotropiklerin oluşturduğu sinyallere göre çok daha hızlıdır. mGluR'lar nöronal uyarılabilirlik, sinaptik plastisite ve nörotransmitter salınımının modülasyonunda önemli rol almaktadır.¹³⁵⁻¹³⁷ mGluR'ların çoğu (mGluR1 ve 5 hariç) presinaptik nöronda yerleşmiş durumdadır. mGluR1'ler NMDAr'ı aktive ederek kalsiyum salınımına ve eksitotoksisteye sebep olabilmektedir.^{138, 139} Öte yandan NMDAr iyonotropik reseptörlerin en kompleksi olup, psikiyatrik bozukluklar için öncü terapötik hedeftir ve memeli beyinde iyonotropik glutamat reseptörlerinin ana sınıfıdır.^{140, 141} NMDAr postsinaptik yerleşimlidir, diğer reseptörlerden farklı olarak voltaj ve liganda (glutamat) duyarlıdır.¹⁴² NMDAr nöronal farklılaşma, sinaps konsolidasyonu, aktiviteye bağlı sinaps plastisitesi ve kalıcı olarak öğrenme sağlanabilmesi için beyinde gerçekleşmesi gereken uzun süreli güçlendirme (Long-term potentiation) olaylarının temel reseptörüdür.¹⁴³⁻¹⁴⁵

2.10.3.1. Glutamat, Alzheimer Hastalığı ilişkisi ve Eksitotoksistesi

Presinaptik terminallerden salınan glutamat, eksitator aminoasit taşıyıcıları (EAAT) vasıtasıyla ortamdan uzaklaştırılır ve çevre dokulara taşınır. Burada glutamin sentetaz vasıtasıyla glutamine dönüştürülür ve ekstraselüler aralığa gönderilir. Presinaptik aralığa taşınan glutamin, glutaminaz enzimi aracılığıyla glutamata dönüştürülür ve veziküler glutamat taşıyıcıları (VGLUT) ile sinaptik veziküllere taşınırlar. Presinaptik nöronun uyarım alması halinde VGLUT'lar nöron zarına ilerleyerek glutamatla dolu vezikülü sinaptik aralığa bırakır. Bu sistemin devam edebilmesi ve yeni uyarımların iletebilmesi için glutamatın sinaptik aralıktan tekrar uzaklaştırılması gereklidir. Glutamat glutamin döngüsü olarak bilinen bu olay hayati

önem taşımaktadır.¹⁴⁶ Glutamat ana eksitatör nörotransmitterdir. Glutamat, glutamat dekarboksilaz enzimi aracılığıyla GABA'ya dönüştürülmektedir.¹¹⁷ Glutamat uyarıcı bir nörotransmitter iken GABA inhibe edici nörotransmitterdir. Glutamatın biliş, bellek ve öğrenme üzerine önemli etkileri olduğu bilinmektedir.¹⁴⁷ Ekstra-sinaptik ve sinaptik aralıkta bulunan N-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamaterjik reseptörün, AH'de sürekli olarak anormal aktivasyona sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.^{148, 149} Ekstra-sinaptik NMDA reseptörlerinin aşırı uyarılması, reseptörün uzun süreli aktivasyonuna, mitokondriyal membran potansiyeli kaybına, Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarının akışına ve eksitotoksisteye sebep olmaktadır.¹⁵⁰ Glutamaterjik bir nöronda depolarizasyon geliştiği zaman presinaptik terminalden glutamat salınır ve sinaptik aralığı çevreleyen presinaptik, postsinaptik ve glial hücrelerin farklı reseptörlerini aktive eder. Bu reseptörler metabotropik ya da iyonotropik olabilirler. Glutamaterjik sistemde glutamatın ortamdaki uzaklaştırılmasını sağlayan EAAT vardır, bunlar merkezi sinir sisteminde glutamat taşınmasının birincil elemanlarıdır. EAAT1'den EAAT5'e olan bu taşıyıcılar farklı yerlerde görev almaktadır. Bu taşıyıcıların kemiricilerde homologu olan taşıyıcılar; GLAST, GLT-1, EAAC1, EAAT4 ve EAAT5.¹⁵¹ Nöronal depolarizasyon sonucu sinaptik aralığa dökülen glutamatın bir kısmı astrositlerde bulunan EAAT1-2 tarafından ve presinaptik terminaldeki EAAT2-5 vasıtasıyla ekstraselüler ortamdaki uzaklaştırılır.¹⁵² Ekstraselüler ortamdaki uzaklaştırılan glutamat, sentez yolağına tekrar katılıp yeni bir uyarım için presinaptik nöronlarda depolanmaktadır. EAAT ekspresyonunda azalma ya da glutamat salımının EAAT'nin taşıyabileceği miktarı aşması durumunda glutamat birikimi olur ve bu eksitotoksisteye sebep olur.¹⁵³ Yapılan çalışmalarda, AH'li bireylerde A β birikiminin glutamatın ortamdaki uzaklaştırılıp geri dönüşüme katılmasını kısıtlayarak ortamda glutamat miktarını arttırdığı, astrositlerden glutamatın salınmasını indüklediğini ve NMDA grubu reseptörlerin elektrofizyolojik

fonksiyonunu doğrudan düzenlediği göstermiştir.¹⁵³⁻¹⁵⁵ Önerilen bir teoriye göre NMDA reseptörlerinin aşırı uyarılması, bir döngü içinde sürekli uyarılma ile reseptörü kısır döngüye sebep olabileceği ileri sürülmüştür. A β , transmembran protein yapısındaki bir prekürsör proteinin (APP) proteolitik yolla metabolize olması sonucu meydana gelmektedir. Bu proteini parçalayan 3 enzimden yalnızca α -sekretaz nöronlar için zararsız moleküller açığa çıkarır. Diğer iki enzim olan β enzimi proteinin hücre dışında kalan amino grubundan parça keserken, γ enzimi bu proteinin hücre içinde kalan karboksi grubundan parça bölerek A β üretmektedir. Bu teoriye göre, NMDA reseptörü aktive olduğu zaman α -sekretaz etkinliği düşerek β -sekretaz etkinliği artar, bu da A β üretimine ve birikimine neden olmaktadır. Bu durum NMDA reseptörünün nörotransmisyonunda meydana gelebilecek herhangi bir düzensizlikte A β 'nin aşırı salınımının indükleyeceğine işaret etmektedir.¹⁵³ Böylece hücreyi hayatta tutmayı sağlayan NMDA aracılı sinyaller bastırılır ve hücre ölümü için birtakım sinyaller tetiklenir. Tüm bunlar sinaptik ve ekstra-sinaptik NMDA reseptörlerinin işlevini ve aralarındaki dengeyi bozarak sinaptik hasar meydana getirir ve neticede hücre ölümüne yol açmaktadır.¹⁵⁶

2.11. Alzheimer Hastalığında Tedavi

Yaşlı nüfusun ve tedavi maliyetlerinin artması göz önüne alındığında, gelecekte AH'nin sağlık harcamaları yönüyle önemli bir ekonomik yük oluşturacağı ön görülmektedir. Günümüzde AH'yi tedavi etmek amacıyla, kolinesteraz inhibitörleri ve NMDA antagonistleri kullanılmaktadır. Bu ilaçlar sadece AH'nin semptomlarının iyileştirilmesinde etkilidir. Hastalığın oluşumunu engellemediği gibi iyileşmesini de sağlamazlar.^{157, 158} Öte yandan, AH'ye sebep olan kardiyovasküler rahatsızlıklar ve yaşam biçimi gibi faktörler, ilaç tedavisine ihtiyaç duyulmadan düzeltilebilir. Fiziksel aktivite beyinde damarlanmayı ve nörojenezi aktive ederken, A β üretimini baskılayarak inflamasyonu ve AH riskini azaltmaktadır. Bunlara ek olarak eğitim düzeyi, entelektüel

aktivite ve uygun diyet de yaşlılarda bilişsel iyileşmeye katkı sağladığı belirlenmiştir.^{159,}
¹⁶⁰ AH'deki birtakım fizyolojik süreçler ACh üreten hücreleri yok ederek kolinerjik iletimi sekteye uğratmaktadır. AChEI, kolinesteraz enzimlerinin ACh'yi parçalamasını bloke ederler, bunun sonucunda sinaptik aralıkta ACh seviyelerinin artmasına neden olmaktadır.^{161, 162} Diğer yandan NMDAr'ın aşırı uyarılması sonucu Ca^{+2} seviyelerinde artış yaşanır ve bu durum sinaptik disfonksiyonla beraber hücre ölümünü de beraberinde getirmektedir. NMDAr antagonistleri aşırı aktivasyonu engelleyerek Ca^{+2} girişini önler ve reseptörün normal aktiviteye dönmesini sağlar. Bu iki sınıfın terapötik etkinliklerinin iyi olmasına rağmen hastalığı iyileştirmez veya önlemezler sadece AH semptomlarının tedavisinde etkilidir. 2010 yılı sonrasında AH üzerinde yapılan klinik çalışmalarda ne yazık ki başarılı sonuçlar alınamamıştır. AH patolojisini anlamak için, tau proteininin anormal metabolizması, A β yapısı, inflamatuvar yanıt, kolinerjik hasar ve oksidatif stres gibi faktörler için çeşitli mekanizmalar önerilmiştir.¹⁵⁶

2.11.1. Güncel Tedaviler

2.11.1.1. Farmakolojik Uygulamalar

2.11.1.1.1. Kolinesteraz inhibitörleri

Kolinerjik hipoteze göre AH, ACh sentezindeki azalmadan kaynaklanmaktadır. Kolinesteraz inhibitörleri, ACh'yi parçalayan AChE'yi inhibe ederek kolinerjik seviyeleri artırır. Böylece stratejiyle bilişsel ve nöronal hücre fonksiyonları artırılmış olur. Kolinesteraz inhibitörlerinin amacı, sinaptik aralıkta ACh'nin yıkılmasını önleyerek kolinerjik aktivitenin devamlılığını sağlamaktır. AH tedavisi için ekstra yardımcı olacağı düşünülen bir strateji ise, ACh sentezinde yapıtaşı olarak kullanılan kolinin geri alımını artırmak ve presinaptik terminallerde ACh biyosentezini artırmaktır. Takrin (tetrahydroaminoakridin), Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından AH'nin tedavisi için onaylanan ilk kolinesteraz inhibitör ilacıdır. Bu ilaç, muskarinik nöronlarda

ACh'yi artırarak etki eder. Bu ilaçla ilgili yapılan çalışmalarda yeterli faydanın bulunamamış olması ve hepatotoksisite gibi yan etkilerin yüksek olması nedeniyle, hemen piyasadan geri çekilmiştir. Bu ilaçtan sonra, günümüzde hala kullanımda olan donepezil, Rivastigmin ve galantamin gibi farklı kolinesteraz inhibitörleri üretilmiştir ve AH'nin semptomatik tedavisi için kullanılmaktadır.^{88, 162}

2.11.1.1.1. Donepezil

AH tedavisi için öncü ilaç olarak kabul edilen donepezil, bir indanonbenzilpiperidin türevi olup ikinci nesil kolinesteraz inhibitörüdür. Donepezil AChE'ye geri dönüşümlü olarak bağlanır ve ACh hidrolizini inhibe ederek sinaptik aralıkta ACh konsantrasyonunun artmasını sağlamaktadır. İlacın sinir sistemi ve gastrointestinal sistem üzerinde hafif ve geçici kolinerjik yan etkileri vardır ama iyi tolere edilmektedir. Donepezil AH'nin ilerleyişini değiştirmeden, biliş ve davranış gibi semptomlarını iyileştirmektedir. Donepezil yalnızca AH kaynaklı demans için değil, duygudurum bozukluğu, otistik spektrum bozukluğu, PH demansı ve vasküler demans gibi hastalıklarda da kullanılmaktadır.^{163, 164}

2.11.1.1.2. Rivastigmin

AChE ile bütirilkolinesteraz'ın (BuChE) anyonik ve esteratik bölgelerine bağlanarak etki eden ve ACh metabolizmasını önleyen geri dönüşümlü bir antikolinesterazdır. Rivastigmin AChE'den daha yavaş ayrıştığı için yalancı geri dönüşümsüz olarak adlandırılmaktadır ve sinaptik aralıkta AChE ile BuChE tarafından metabolize edilmektedir. Plazma esteraz ya da psödokolinesteraz olarak da bilinen BuChE, karaciğerde üretildikten sonra kan plazmasına aktarılmaktadır. Normal bir beyinde çoğunlukla glial hücrelerde bulunan BuChE'nin aktivitesi AChE'nin %10'u kadarken, AH'li beyinde bu oran %40-90'lara kadar ulaşmaktadır ve BuChE aktivitesi artarken AChE aktivitesi de eş zamanlı olarak düşmektedir. Bu durum, BuChE'nin orta

ile şiddetli demansa sebep olabileceğini işaret ediyor olabilir. Rivastigmin hafif/orta dereceli AH'li hastalarda kullanılmaktadır ve bilişsel işlevlerle günlük yaşam aktivitelerini geliştirmektedir. İlaç oral yoldan verildiği zaman hazımsızlık, iştahsızlık, bulantı kusma ve kilo kaybı gibi yan etkiler oluşturduğu için hastalarda uyunç sorunu ortaya çıkmakta ve ilaç alımı sekteye uğrayabilmektedir. Bunu önlemek amacıyla ilaç transdermal yamalar şeklinde uygulanabilir. Bu yamalar sayesinde hem sürekli hem de kontrollü bir salınım yakalanabileceği için ilaç dozu düşürülerek yan etkilerin azalması da sağlanabilmektedir. AH'li hastaların yaşadığı hafıza sorunları nedeniyle ilaç alımını unutmasını önlemek için transdermal uygulamalar en uygun yöntem olarak kabul edilmektedir.¹⁶⁵⁻¹⁶⁸

2.11.1.1.1.3. Galantamin

Hafif/orta dereceli AH'li hastalarda kullanılan birinci basamak bir ilaçtır. Galantamin seçici bir üçüncül izokinolin alkaloiddir. Nikotinik ACh reseptörlerinin α alt birimine allosterik bağlanıp reseptörü aktive ederken, AChE'nin de rekabetçi bir inhibitörü olarak hareket etmektedir. Bu sebeple ikili etki mekanizmasına sahiptir. Galantamin diğer AChE'ler gibi davranışsal semptomları, bilişsel performansı ve günlük aktiviteyi iyileştirmektedir. Bununla birlikte ilaç iyi tolere edilir ve etkilidir.¹⁶⁹

2.11.1.1.2. NMDA Reseptör Antagonistleri

NMDAr'ın AH patofizyolojisinde önemli bir rolü olduğuna düşünülmektedir. NMDAr'ın uyarılması sonucu Ca^{+2} akışı meydana gelir ve bu durum sinyal iletimini aktive eder. Bunun sonucunda sinapslarda sinir iletimi, nöroplastisite ve hafızanın oluşumu gibi faktörler için gen transkripsiyonu tetiklenir. NMDAr'ların aşırı şekilde aktivasyonu, Ca^{+2} sinyallerinde anormalleşmeye ve MSS'deki ana eksitatör nörotransmitter olan glutamatın aşırı uyarılmasına neden olmaktadır. Bu durum eksitotoksisite, sinaptik işlevlerin bozulması, nöronal ölümler ve bilişsel aktivitelerde

düşüş ile sonuçlanmaktadır. Orta ve şiddetli AH'nin tedavisinde kullanılmak üzere onaylanan tek NMDAr antagonisti, memantindir.¹⁷⁰⁻¹⁷²

2.11.1.1.2.1. Memantin

Ya tek başına ya da diğer AChE inhibitörleri ile kombine edilerek kullanılmaktadır. Memantin, NMDAr'ın düşük afiniteli rekabetçi olmayan bir antagonistidir. AH'li hastalarda glutaminerjik sistemin aşırı aktivasyonunu önleyerek nörotoksisiteyi engellenmektedir. İyi tolere edilen güvenli bir ilaçtır. Afinitesi düşük olduğu için normal sinaptik iletimi engellemeden eksitatör reseptörü bloke eder. Rekabetçi olmayan birkaç NMDAr antagonisti geliştirilmiş ve klinik deneylere dahil edilmiştir, fakat bunların çoğu düşük etkinlik ya da yan tesirleri nedeniyle başarısız olmuştur. Polisiklik amin yapısında olan RL-208, yeni geliştirilen rekabetçi olmayan bir NMDAr antagonistidir ve yaşa bağlı bilişsel fonksiyon problemlerinde ümit verici sonuçlar göstermiştir. Buna benzer yeni NMDAr antagonistlerin geliştirilmesi amacıyla araştırmalar devam etmektedir.^{156, 170, 172}

2.11.1.2. Farmakolojik Olmayan Uygulamalar

AH'li hastaların %85-90'ı hastalık süresinde bilişsel olmayan, davranışsal veya nöropsikiyatrik semptomlar göstermektedir. Bu problemler çoğunlukla yüksek stres, düşük yaşam kalitesi, sağlık hizmetinin maliyeti gibi faktörlerle ilişkilidir.¹⁷³ Farmakolojik olmayan müdahaleler, demans durumunda ortaya çıkan ajitasyon, sanrı, ilgisizlik gibi nöropsikiyatrik semptomları ve istifçilik, takıntı, bakıcıya zorluk çıkarma gibi davranışsal bozuklukları iyileştirme amacıyla tercih edilmektedir.¹⁷⁴ Bu nöropsikiyatrik problemler hasta ve bakıcı için aşırı zorlu bir süreçtir bu nedenle genelde tedavi edilmeden bırakılır. Ancak ilerleyen dönemde hasta ve bakıcı açısından durum daha da başa çıkılmaz olurken bakım maliyeti de yükselmektedir. AH'nin ortaya çıkmasına sebep olan bu muhtemel problemlerden korunmak için, psikiyatrik sorunların

tetiklenmesinden kaçınma, çevresel değişiklikler, iletişimin artırılması, görevlerin basitleştirilmesi ve hasta uyum probleminin çözülmesi gibi stratejiler belirlemek gerekmektedir.^{173, 175}

2.11.2. Antibiyotikle Tedavi

Başarısızlık ihtimali, yüksek harcama kalemleri, kısıtlı zaman gibi negatif durumlardan dolayı araştırmacılar yeni ilaç tasarlamasının yanı sıra mevcut ilaçların bilinmeyen endikasyonlarını da araştırmaya yönelmiştir. Bu tarz araştırmalarda, piyasadan çekilmiş ilaçların da araştırmaya dahil edilmesi gibi sayısız avantaj vardır. Farmakokinetiği bilinen, üretim sorunları çözülmüş ve güvenlik araştırmaları yapılmış ilaçlarla yeni endikasyon araştırmalarında hızlıca yol alınabilmektedir.^{176, 177} β -laktam antibiyotikler, AH tedavisi için yeniden tasarlanmışlardır. Özellikle üçüncü sınıf sefalosporinler olmak üzere β -laktam antibiyotiklerin AH patolojik yolakları üzerinde belirgin etkileri olduğu gösterilmiştir.

Glutamatın sinaptik aralıkta birikimi, eksitotoksositeye sebep olmaktadır. Bu nedenle presinaptik nörondan glutamat salınımını takiben hızlıca ortamda uzaklaştırılması gereklidir. İnsan ve sıçan astrositlerinden eksprese edilen EAAT-2 (sıçanda GLT-1), ekstraselüler glutamatın %90'ının geri alımını sağlar. EAAT-2 ekspresyonunun artması, glutamatın olumsuz etkilerini azaltmayı sağlar fakat mevcut ilaçlar içinde EAAT-2 aktivasyonu yapan ilaç sayısı kısıtlıdır. β -laktam antibiyotikler, EAAT-2 aktivasyonu yaparak glutamat geri alınımını hızlandırmaktadır.^{18, 25, 178}

2.11.2.1. Beta Laktam Antibiyotikler

Antibiyotikler, patojenik mikroorganizmalarla mücadele dışında önemli işlevlerde de sahiptir. 80 yılı aşkın süredir kullanılan antibiyotikler içinde, 3. Kuşak sefalosporinler son kırk yıldır hayatımızdadır. Bu grup içinde en sık reçete edilen ilaç, daha önce AH çalışmalarında da kullanılmış olan seftriaksondur.^{19, 179} Bu grup ilaçlar

beyin omurilik sıvısına iyi penetre olmaktadır. β -laktam antibiyotiklerin EAAT-2 transkripsiyonu ve ekspresyonunu artırarak, glutamat birikimini önlediği ve eksitotoksisiteyi engellediği bilinmektedir.¹⁸ Glutamat agregasyonuna bağlı olarak gelişen eksitotoksisite, AH'de dahil birçok nörodejeneratif hastalığın başlıca sebeplerinden biridir.¹⁸⁰ β -laktam antibiyotiklerin önde gelen ilaçları penisilin, sefalosporinler, monobaktamlar ve karbapenemlerdir. Monobaktamlar ve karbapenemler süperenfeksiyon riskini artırdığı için, sinir sistemi araştırmalarında diğer ilaçlara göre daha geri planda kalmışlardır. Penisilin türevleri olan amfisilin, amoksisilin ve nafsilin gibi ilaçlar yapılan bir ALS çalışmasında eksitotoksisiteyi engellediği belirlenmiştir. Bu sebeple diğer nörodejeneratif hastalıklarda da etkili olabileceği düşünülmüştür.^{28, 181} β -laktam grubu ilaçlarla yapılan bazı çalışmalarda birtakım olumsuz sonuçların alınması, araştırmacıları sefalosporinler üzerine çalışmaya yönlendirmiştir.^{16, 17} Sefalosporinler AH'nin yanı sıra menenjitte, inmede, ALS'de ve PH'de faydalı bulunmuştur.¹⁸⁻²²

2.11.2.1.1. Sefiksim

Üçüncü sınıf bir sefalosporin olan sefiksim, günümüzde idrar yolu enfeksiyonları, üst solunum yolu enfeksiyonları ve erken dönem frengi gibi hastalıklarda reçete edilmektedir.^{182, 183} Nöroinflamasyon, eksitotoksisite ve travma gibi durumlar glutamat salınımında, sinaptik iletimde, glial ve nöronal fonksiyonları etkileyerek bilişsel bozukluğa sebep olabilmektedir.¹⁸⁴⁻¹⁸⁶ Bu bağlamda inflamasyonun engellenmesi, biliş ve hafıza üzerine olumlu etkiler oluşturmaktadır.^{187, 188} Araştırmacılar sefiksimin bu olumsuz etkileri ortadan kaldırarak nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için yeni bir endikasyon sunabileceğini düşünülmektedir. Glutamatın MSS'de önemli işlevlerde bulunması, nörodejeneratif hastalıklarla doğrudan bağlantısı olabileceğini göstermektedir. Otizm nörobiyolojisi incelendiği zaman, inhibitör/eksitator (GABA/glutamat) sistemlerinde anormal bir dengesizlik olduğu tespit edilmiştir. Bu

sebeple glutamat nörotoksisitesinin otizme sebep olabileceği bildirilmiştir.¹⁸⁹⁻¹⁹¹ Ghanizadeh ve ark. (2015) tarafından yapılan geriye dönük bir vaka incelemesinde 4 yaşından beri epilepsi tedavisi gören 7 yaşındaki otizimli bir çocuğa tedavisi devam ederken, ishal nedeniyle 200 mg/gün sefiksim reçete edilmiştir. Sefiksim tedavisinin üçüncü gününden itibaren nöbetlerde önemli bir düzeyde düşüş yaşandığı ve 5 ay boyunca nöbetler kontrol altına alınabildiği bildirilmiştir. 5 ay sonra nöbetler tekrar artmaya başlamasından sonra ailesi tarafından tekrar 200 mg/gün sefiksim uygulanmıştır. Üçüncü günden itibaren tekrar belirgin bir şekilde düzelme olduğu ve nöbetlerin kontrol edilebildiğini bildirmişlerdir. Çocuğun anne ve babası 2 yıl boyunca 3-5 gün uygulanan bu sefiksim kürü sayesinde, nöbetleri ve agresif davranışları kontrol altında tutabildiklerini bildirmiştir. Durumu değerlendiren doktorlar iyileşmeyi teyit ederek, fiziki muayenede, laboratuvar ve diğer tetkiklerde anormal ya da kayda değer bulguya rastlamadıklarını bildirmişlerdir.¹⁹²

Üçüncü kuşak sefalosporin olan seftriaksonun EAAT-2 ekspresyonu yaparak nörotransmitter taşıyıcısının aktivasyonunu artırması,^{178, 193} aynı grupta olan sefiksimin de benzer bir mekanizmaya sahip olabileceğinin olası bir açıklamasıdır.

2.11.3. Gelecek Tedavi Yaklaşımları

AH sağlık sistemi açısından en zahmetli hastalıklardan biridir. Mevcut olarak kullanılan ilaçlar; amiloid seviyesini azaltmak, amiloid kümeleşmesi ile toksisitesinin azaltmak ve tau proteininin hiperfosforile olmasını engellemeye yönelik işlev görmektedir. Kolinesterazın beyindeki işlevinin önemi anlaşıldıkça, araştırmalar yeni nesil asetil ve bütiril kolinesterazların keşfi üzerine yoğunlaşmıştır. Bu araştırmaların yanı sıra, AH'yi tedavi etmek veya ilerleyişini yavaşlatmak amacıyla anti-inflamatuarlar, kolesterol düşürücü ilaçlar, antioksidanlar, hormon tedavileri ve aşılama gibi alternatif tedavi stratejileri üzerine yapılan arayışlar da hız kazanmıştır. Erken tanı koyabilmedeki

başarı, hastalığın daha iyi takip edilmesi ve yeni stratejilerin geliştirilmesi için önemlidir. AH'nin akademik araştırması üç basamaktan oluşmaktadır. İlk adım olarak, önceki jenerasyonda hastalık öyküsü olan yüksek riskli bir popülasyon belirleyerek hastalığa yakalanmalarını önlemek. Bu aşamadaki amaç, değiştirilebilir risk faktörlerini (Çevresel faktörler, diyet vs.) kontrol etmektir. Klinik öncesi evrede semptomlar yaklaşık olarak 10-20 yıl önce görülmektedir. İkinci adım, bu semptomlar ortaya çıkmadan önce potansiyel hastaları teşhis edebilmeyi kapsamaktadır. Bunun için mevcut teşhis yöntemlerinin geliştirilmeye ihtiyacı vardır. Üçüncü adımdaki amaç hastalığa sebep olan moleküller üzerine yoğunlaşarak, amiloid plakların ekstraselüler, tau proteinden oluşan NFY'lerin ise intraselüler agregasyonunu engellemektir. ACh sentezi için kolin taşımaktan sorumlu olan kolin taşıyıcılarının (CHT1) hızlandırılması, AH'nin gelecekteki tedavisi için çözümler arasında yer alabilir.^{92, 194, 195}

2.12. Deneysel Alzheimer Modelleri

Deneysel hayvan modelleri, hastalıkların potansiyelini daha iyi kavrayabilmek ve birtakım yeni tedaviler geliştirebilmek adına önemli bir yere sahiptir. AH araştırmalarında kullanılan deneysel hayvan modelleri genellikle ailesel AH'nin projeksiyonu olan transgenik modellerdir. AH'ye sebep olan etmenlerin çeşitliliği ve klinik çalışmalardaki başarının düşük olmasından dolayı farklı modeller geliştirilmiştir.^{196, 197} AH modelleri yalnızca memelilerde değil, meyve sineği (*Drosophila melanogaster*) ve yuvarlak solucan (*Caenorhabditis elegans*) gibi omurgasızlarda ya da zebra balığı gibi omurgalı hayvanlarda da uygulanmaktadır fakat fizyolojilerinin farklılığından dolayı bu modeller kısıtlamalara sahiptir.¹⁹⁸⁻²⁰⁰ İlk kez 1995 yılında bir transgenik fare modellemesi yapılmış ve o zamandan bu yana birçok yeni model geliştirilmiştir.^{197, 201-203} Hem transgenik hem de fizyolojik hayvan modellerinin çoğu, yalnızca amiloid birikimine sebep olur. Bu modellerde nöronal ve bilişsel kayıplara

sebebiyet veren NFY gelişimi gibi patolojik özellikler bulunmaz. AH'nin yaygın metabolizması ya da patolojisini bu modellerde görmek zor olduğu için, insanlardaki AH bulgularıyla korelasyon gösteren hayvan modellerinde çalışmak ve hastalığın nöropatolojisini iyi anlamak gereklidir.^{196, 202, 204}

2.12.1. Sıçan Modelleri

Fare modelleriyle karşılaştırıldığında geliştirilen sıçan modeli sayısı daha azdır. Daha büyük beyne sahip olmaları nedeniyle, beyin omurilik sıvısı toplama, elektrofizyolojik ölçümler ve görüntüleme teknikleri daha kolay uygulanmaktadır. Farelere göre daha zengin davranışsal hareketleri olması nedeniyle daha geniş analiz imkânı sunmaktadır. Davranışlarının bu kadar çeşitli olmasının sebebi, farelerin aksine sıçanlarda da insanlar gibi doğumdan sonra beynin gelişmeye devam etmesi gösterilmektedir. Ayrıca fizyolojik, morfolojik ve genetik özellikleri açısından da insanlara benzerlikleri daha fazladır.²⁰⁵ Sıçan ve insan ApoE aminoasit dizilişleri arasında benzerlik de AH'de sıçanların tercih edilmesindeki sebeplerden biridir. Ayrıca sıçanlarda da insanlardaki gibi tau'nun 6 izoformu bulunmaktadır. Fakat tau izoformlarının 4R/3R oranında farklılık yüksektir. İnsanda bu oran 1:1 iken sıçanda 9:1'dir.²⁰⁶

2.12.2. Fare Modelleri

Yabani fareler ve insanlardaki APP geninin %97 dizi benzerliğinden dolayı (695 izoform), AH ile ilgili bilimsel çalışmaların büyük çoğunluğunda transgenik fareler kullanılmaktadır. Fareler ve insanların A β dizisi içinde 3 amino asidi kapsayan (R5G, Y10F ve H13R) önemli bir farklılık vardır ve bu farklılık A β agregasyonunu ve plakların oluşumunu engellemektedir. Bundan dolayı, farelerde amiloid plakların oluşumu için insan APP'sinin ekspresyonu gereklidir. Plak oluşumunu sağlayabilmek adına farelerdeki modeller genelde transgenik model üzerine kurgulanmıştır.^{207, 208} Bununla birlikte transgenik farelerdeki en büyük sorun, yaygın nörodejenerasyon ve lokal beyin atrofisinin

görülmemesidir. Bir diğer problem ise fareler ve insanlardaki tau proteininin yalnızca %88 homoloji göstermesinden dolayı farelerde hiperfosforile tau'ya sahip olmalarına rağmen NFY oluşmamasıdır.²⁰⁹⁻²¹²

2.12.3. Omurgasız Hayvan Modelleri

Drosophila melanogaster, *Caenorhabditis elegans* gibi omurgasızlar da AH araştırmalarında kullanılmıştır fakat sinir sistemleri ve davranışları insanlarda görülen karmaşıklıkla yoksundur, bu da insan hastalıklarıyla karşılaştırmayı çok zorlaştırmaktadır. Düşük maliyetli olmaları, yaşam döngülerinin kısa olması ve deneysel uygulamalarının kolay olması gibi önemli avantajları vardır. Yine de bu modelleri kullanırken insanla olan büyük farklılıklar göz önüne alındığında sonuçların titizlikle yorumlanmasına ve insana daha benzer modeller kullanılarak doğrulanmasına ihtiyaç vardır.^{199, 213-215}

2.12.4. İntraserebroventriküler Streptozotosin (ICV-STZ) Modeli

Kemirgenlerde yaygın olarak kullanılan deneysel bir modeldir. İntraserebroventriküler (i.c.v.) olarak uygulanan STZ, uzamsal ve tersine öğrenme, hafıza ve yönetimsel fonksiyonların bozulmasına neden olmaktadır. Araştırmacılar STZ'nin öğrenme ve hafıza üzerindeki etkisinin birden fazla yolla gerçekleştiğine dair güçlü kanıtlar elde etmiştir. Bazı çalışmalarda ISV-STZ uygulamasının beyinde nitrozo-oksitatif stres, AChE aktivitesi ve sitokin üretiminde artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca A β agregasyonunu indüklediği ve taupatiyi artırdığı bildirilmiştir.²¹⁶⁻²¹⁹ Bilişsel işlevlerde oluşan bozukluğun sıçan hipokampusünde Ras/ERK, CREB, cAMP ve BDNF sinyal yollarında fosforilasyonun inhibe olmasıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir.^{220, 221} Uzamsal öğrenmenin ise NMDAr ile ilişkili Ca²⁺/kalmodulin-bağımlı protein kinaz II (CaM kinaz II ya da CaMKII) ekspresyonunun azalmasına bağlı olarak bozulma olduğu gösterilmiştir.^{29, 222} Ayrıca diğer çalışmalarda STZ uygulamasının hipokampüste

Akt/GSK-3 β sinyalinin bozulmasına bağı olarak hafıza bozuklukları meydana getirdiği de öne sürülmüştür.^{223, 224} STZ uygulaması sıçan beyinde TNF- α , IL-6, iNOS NF- κ B, ve siklooksijenaz-2 gibi nöro inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonlarını indüklemektedir, bu durum hafıza ve öğrenmeyle ilişkili diğer yollara ek olarak nöroinflamasyonun da indüklendiğini göstermektedir.^{219, 225-227} STZ ile modellenen AH'de AChE aktivitesinin artmasının da öğrenme ve bellek problemleri oluşturduğu belirlenmiştir.^{218, 228}

Diyabetli hastaların yarısından fazlasında AH ortaya çıkmaktadır. Bu iki hastalık arasındaki ana benzerlik insülin direnci ve inflamatuvar yollardır. Son on yılda yaşlı insanlarda yapılan deneylerden elde edilen bulgular neticesinde AH için Tip 3 diyabet tanımı önerilmiştir. Bunun sebebi, Tip 1 ve Tip 2 diyabette bulunan insülin direncine benzer ortak molekül ve hücrel özelliklerin AH'de de bulunmasıdır. İnsülin, amiloid plakların oluşmasında rol alır. Ayrıca NFY'lerin oluşmasında önemli rolleri bulunan tau proteininin hiperfosforile olmasına sebep olan glikojen sentaz kinaz 3 β 'nın (GSK-3 β) aktivasyonunda da görev alır. Nöronlarda çok fazla sayıda insülin reseptörü vardır. Özellikle de hipokampus ve serebral korteks bölgelerinde fazlaca yoğunlaşmışlardır.¹¹⁷ Ayrıca STZ ile indüklenmiş AH deneylerinde STZ grupları diğer gruplara göre daha fazla kilo kaybettiği çalışmalarla gösterilmiştir.^{229, 230}

2.12.5. İntraperitoneal Alüminyum Klorür Modeli

Alüminyum nörotoksik bir maddedir ve çevrede serbestçe bulunur.²³¹ Sıklıkla beyinde birikerek hipokampüse kan akışını bloklar ve AH semptomlarının ortaya çıkmasına sebep olmaktadır.^{232, 233} Model oluşturulurken alüminyum klorür, D-galaktoz içinde verilmektedir. D-galaktoz beyinde APP proteininin ekspresyonunu artırır, bilişsel eksikliklere, oksidatif strese ve inflamasyon ile kolinerjik disfonksiyona sebep olmaktadır.²³⁴ Alüminyum klorürün 30 gün boyunca 5 mg/kg/i.p. uygulanması, AH modelinin gelişmesini sağlar. Alüminyumun beyinde Na⁺/K⁺ ATPaz ve Ca²⁺ ATPaz

miktarını azaltarak anti-oksidatif yetenekte bir azalmaya yol açtığı da bildirilmiştir.^{235, 236}

2.12.6. İntraperitoneal Skopolamin Modeli

Bu modeli uygulamak amacıyla, i.p. olarak 2 mg/kg dozda 10 gün boyunca muskarinik reseptör antagonisti olan skopolamin isimli tropan alkaloidi uygulanır. Skopolamin uygulamasından sonra kolinerjik nörotransmitter sisteminde blokajlar meydana gelir ve kolinerjik yetmezliği takip eden hafıza bozukluğu oluşur. Skopolamin ile indüklenen AH modelinde, meydana gelen hafıza kaybı oksidatif strese neden olmaktadır. Bunun yanı sıra skopolamin uygulaması, hipokampus hücrelerinde apoptoz meydana getirmektedir.^{237, 238}

2.15. Davranış Testleri

2.15.1. Lokomotor Aktivite Testi

Lokomotor aktivite testi, sıçanların motor aktivitelerinde meydana gelen farklılıkları ve anksiyete ile ilgili davranışları test etmek için kullanılan bir sistemdir. Kızılötesi ışınlarla taranan sistemde sıçanın konumu, yer değiştirmesi, stereotipik, süslenme ya da dinlenme hareketlerinin her biri sayısallaştırılarak bilgisayar çıktısına dönüştürülür. Bu çıktılar değerlendirilerek hayvanın yeni ortama alışması, merak duygusunun devamı ya da anksiyetesi hakkında yorumlanmaya ihtiyaç duyulan bilgiler verir.²³⁹ Açık alan testinden farklı olarak bu çalışmada aktivite ölçümü yapılır ve bağımsız bir gözlemci yerine tüm kayıtları bilgisayar otomatik olarak kaydeder.

2.15.3. Morris Su Labirenti (Morris Water Maze) Testi

Öğrenme ve hafıza için kullanılan en yaygın testlerden biridir. Hayvanların yüzmeyi sevmemeleri ve sudan kaçma eğilimlerine dayanarak oluşturulmuş bir deneydir. Dört eşit kadrana bölünmüş olan uygun sıcaklık ve derinlikteki bir havuzda, hayvanların yön bulma, öğrenme ve hafıza yeteneklerinin ölçüldüğü bir sistemdir. Uzamsal akıl yürütme, uzaysal öğrenme ve hafıza gibi olgular, onlarca yıldır araştırmacılar tarafından

merakla incelenmekte ve insanlar ile hayvanların çevrelerinde nasıl gezindiği ile ilgilenilmektedir.^{240, 241} Hayatta kalmak için ihtiyaç duyulan bu yetenek; yiyecek, barınak ve eş bulma gibi arayışlarında canlılara yardımcı olmaktadır. Canlılar uzamsal zekâları ile renk, şekil, boyut, konum ve birbirleriyle olan ilişkileri açısından zihinlerinde ilişki kurabilmektedir ve çevrelerinde bulunan 2-3 boyutlu cisimleri ve şekilleri zihinsel boyutta düzenlemektedirler.^{242, 243} Elde edilen verilere dayanarak, Morris su labirentinde (MSL) deneye alınan sıçanların hareketleri incelendiğinde, labirenti çözmek için uzaysal bir çözümleme yaptıkları anlaşılmaktadır. Sıçanlar havuz içinde platform arayışları süresince su yüzeyinden 15 cm yukarıda bulunan ipuçlarını kullanmakta ve bu ipuçlarından yola çıkarak platformun yerini tespit etmektedir. Bu durum, sıçanların havuzu 3 boyutlu olarak anlamaları ve çözümlemeleri sonucunu doğurmaktadır.^{241, 242, 244-248}

2.15.2. Pasif Sakınma Testi

Hafıza, davranış ve öğrenme yeteneklerinin araştırıldığı, tabanı elektroşok uygulayabilen çubuklarla kaplı 2 odadan (aydınlık/karanlık) oluşan bir sistemdir. Bu sistem hayvanda öğrenme yeteneğini korku güdümlü olarak koşullu kaçınmayı test eden bir sistemdir. Bu testte, hayvanın elektroşok odasına (karanlık oda) girmekten kaçınmayı öğrenmesi beklenmektedir. Sıçanlar noktürnal hayvanlardır. Doğaları gereği gündüz uyuyup gece aktif olurlar. Her ne kadar sıçanlar ışıktan korkmasa da aydınlık ortamdan rahatsız oldukları için de genelde karanlık bölmelerde yaşamaktadır. Pasif sakınma sisteminde aydınlık bölmenin led ışıklarla yüksek lümenli ışıkla aydınlatılması, hayvanlar için rahatsız edici bir ortam oluşturur ve kapalı bölmeye geçmek isterler. Burada maruz kaldıkları düşük şiddetteki elektroşok caydırıcı bir uyarana sebep olur ve sıçanların sistemin nasıl çalıştığını anlamalarını ve öğrenmelerini sağlar. Deney prosedürü bu anlama ve öğrenme yetenekleri üzerine kurulmuştur.²⁴⁹⁻²⁵¹

2.13. *In vivo* Voltametri

Nörotransmitterler, sinir sisteminde sinyal iletmek, bilgi aktarmak ve hücrelerin korunması gibi sorumluluklar taşırlar. Aynı hastalık üzerinde birden fazla nörotransmitter işlev görebilir fakat bazı nörodejeneratif hastalıklar da birkaç nörotransmitter öne çıkmaktadır. Bu nörotransmitterlerin tespiti amacıyla çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Temelde nörotransmitter ölçümü mikrodializ tekniğiyle yapılmaktadır ve sonrasında genellikle kromatografik yöntemlerle desteklenmektedir. Ayrıca floresan, optik yoğunluk, elektrokimya veya daha karmaşık başka tespit sistemleri kullanılabilmektedir. Bu yöntemlerin dezavantajı, genelde sakrifiye işleminde sonra yapılması veya belirli periyotlarla (60 sn, 5 dk aralıklarla vs.) ölçüm alınmasıdır. Bu durum, nörotransmitter ölçümünde zaman çözünürlüğünü ortadan kaldırmaktadır. Ayrıca nörotransmitterlerin spontan olarak yıkıma uğraması ya da beyin omurilik sıvısının düşük miktarlarda toplanmasından ötürü kesin sonuç alınamaması, bu yöntemlerin en önemli dezavantajlarıdır. Voltametri tekniği ile, anestezi altında ya da serbest hareket edebilen sıçanlarda beyne yerleştirilen mikroelettrotlar sayesinde saniyelik ölçümler alabilmekte ve istenilen süre boyunca ölçüm yapılabilmektedir.²⁵²⁻²⁵⁷

Mikroelettrot ve referans elettrot arasında +0.7 voltluk bir akım oluşturulduğu zaman, yeni şekillenen peroksit oksitlenir ve platin yüzeye transfer olan elektron vasıtasıyla bir akım oluşur ve bilgisayar bu değişikliği ölçer. Mikroelettrotlar üzerinde kayıt alan kanalların olduğu yüzey, platin veya karbon gibi inert bir metalden oluşmaktadır. Bu yapı belirli bileşikler okside edebilmekte ya da indirgeyebilmektedir. MSS'nin ekstraselüler boşluğunda bulunan askorbik asit, dopamin, nöradrenalin, serotonin, homovanilik asit, nitrik oksit ve ürik asit gibi nörokimyasallar, platin yüzey üzerinde elektrokimyasal olarak düşük veya yüksek oksidasyon potansiyeline sahiptir.

Potansiyostatları içeren düşük gürültülü bir başlık (headstage), mikroelettrot ile iyonik temas halindeki bir referans elektroduna (Ag/AgCl) karşı bir potansiyel uygulamaktadır. Bu potansiyeller, tek bir mikroelettrot üzerindeki farklı kanallardan ya da simültane çalışabilen ve çoklu girişe sahip mikroelettrotlardan alınan veriyi bilgisayara aktarmaktadır. Mikroelettrot yüzeyinde oluşan potansiyel yeterli seviyedeysse, elektrot yüzeyindeki moleküller ya oksitlenir ya da elektrokimyasal özelliklerine bağlı olarak indirgenir. Oksitlenme sırasında moleküller kayıt yüzeyine elektron aktarırken, indirgenme sırasında bu yüzeyden elektron ayırırlar. Bu Faradaik reaksiyonlar sonucu oluşan akım, mikroelettrodun içinde bulunduğu dokularda bulunan elektro aktif moleküllerin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Tüm bu temel özellikler, in-vivo çalışmalar yapabilmek için in-vitro kalibrasyon yapılmasına olanak sağlamaktadır. Elektrokimyasal ölçüm teknikleri arasındaki en basit yöntem amperometri ölçümüdür. Bu teknik, akımın sürekli olarak sabit bir potansiyelde ve 1 milisaniyeden daha küçük sürelerde ölçülebilmesini sağlamaktadır. Elektrota sürekli olarak voltaj uygulanabildiği için, Faradaik olmayan arka plan akımları ana ölçümü etkilemez ve elektrokimyasal olarak aktif olan molekülün hassas olarak ölçümüne izin vermektedir. MSS’de bulunan nörokimyasalları ölçebilmek amacıyla elektrot yüzeyine enzim uygulanmaktadır ve bu enzimler sayesinde elektrokimyasal olarak aktif olmayan moleküller de ölçülebilmektedir. Kullanılan enzimler ölçülmek istenen moleküle spesifik olarak seçilmektedir (Tablo 2.1). Oksidaz enzimleri için kofaktör olarak oksijen gereklidir. Bu nedenle oksidaz enzimlerinin kullanıldığı oksijensiz ortamlarda ölçüm yapılamaz. Bu durumda hidrojen peroksit kullanılır ve hidrojen peroksidin oksidasyonu sonucu devam eden reaksiyonların ihtiyacı olan oksijenin bir kısmı üretilir. Tekli mikroelettrotların en önemli dezavantajı, yalnızca mikronlarla ölçülebilecek alanlardan ölçüm alabilmeleridir. MSS’de küçük bir alan taranacaksa bu durum avantaj haline gelebilmektedir. Bazı

hastalıklarla doğrudan ilişkili bölgelere yerleştirilecek elektrottan, oldukça verimli sonuçlar alınabilir. Amperometrik yöntemlerle harmanlanmış mikroelettrotlar sayesinde, ilgili analitlerin 1-1000 milisaniyelik ölçümleriyle nörotransmitter salınım ve geri alım miktarları rahatlıkla incelenebilmektedir.^{36, 39, 258-263}

Tablo 2.1. Voltametri testinde kullanılan enzimler ve kullanım amaçları.

Enzim	Substrat	Ürün	Kullanım Amacı	Referans
AChE	ACh	Kolin, Asetik asit	Kolin ölçümü	36, 258-262
Glutaminaz	Glutamin	NH ₄ ⁺ , L-glutamat	Glutamin ölçümü	36, 258-262
Askorbat oksidaz	Askorbat, O ₂	Dehidroaskorbat	Askorbat çıkarılması	36, 258-262
Katalaz	H ₂ O ₂	O ₂	H ₂ O ₂ çıkarılması	36, 258-262
Kolin oksidaz	Kolin, O ₂	H ₂ O ₂ , Betain	Kolin Ölçümü	36, 258-262
L-glutamat oksidaz	L-glutamat, O ₂	H ₂ O ₂ , α-ketoglutarat	L-glutamat ölçümü	36, 258-262

2.14. LC-MS/MS

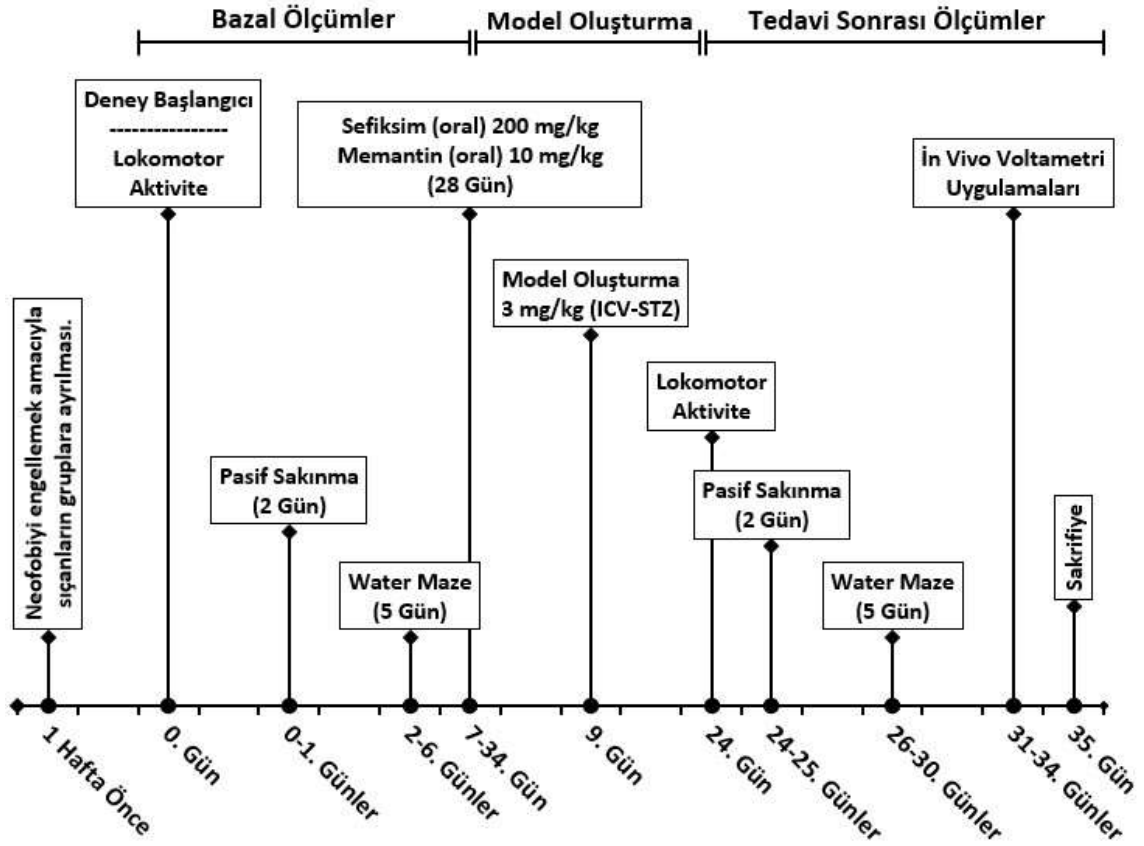
Nörotransmitterler ve bunların metabolizma ürünleri davranış, ruhsal durum ve biliş kontrolü gibi beynin birçok fizyolojik fonksiyonuyla doğrudan ilişkilidir. MSS'de bulunan nörotransmitterlerin (dopamin, glutamat, serotonin vs) metabolik yolları, AH, depresyon, PH ve anksiyete gibi nöropsikiyatrik hastalıkların oluşumunda ya da önlenmesinde önemli rollere sahiptirler.²⁵²⁻²⁵⁵ Mikrodiyaliz, nörotransmitterler ve bunların metabolitlerinin ekstraselüler sıvıdaki konsantrasyonlarını düzenli bir şekilde izleyebilmek için kullanılabilecek, güvenilir bir örnekleme yöntemidir.²⁵⁶ Mikrodiyaliz minimal bir invazyon tekniği olduğu için, hayvanlar serbestçe ve bilinçleri açık şekilde hareket halindeyken örnek toplanabilir, bu örneklerden nörotransmitter seviyeleri ve dalgalanması doğru bir şekilde ölçülebilir. Mikrodiyaliz, diğer yöntemlere nispeten daha temiz örnekler sunar ve rahat bir şekilde kontaminasyon ile dilüsyon gibi hataların önüne geçilebilir.^{256, 257} Nörotransmitter tayini için ultraviyole saptama, floresan saptama, elektrokimyasal tespit (ECD) ve kütle spektrometresi (MS) gibi yöntemlerle birlikte yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) veya kılcal elektroforez (CE) yöntemleri

sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak ultraviyole (UV) tespitin monoaminlere duyarsız olması, floresan tespitin zayıf seçiciliğe sahip olması veya elektrokimyasal tespit yönteminde elektrot kirlenmesine bağlı tekrarlanabilir olmaması gibi sorunlardan ötürü bu yöntemlerin birtakım kısıtlamaları vardır. Bu sorunları aşabilmek amacıyla, analitik seçicilikte avantajları olan kütle spektrometrik yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerde, moleküler kütle ve belirli bir analitin iyonizasyon ve parçalanma davranışları incelenerek tespit yapılmaktadır.²⁶⁴⁻²⁶⁹ Bu sebeple günümüzde gaz kromatografisi/MS (GC-MS), kılcal elektroforez/ MS (CE-MS), sıvı kromatografisi/MS (LC-MS) ve LC-MS/MS teknikleri geliştirilmiş ve rağbet görmüştür. LC-MS/MS yöntemi diğer numune hazırlama yöntemleriyle birleştirildiği zaman, nörotransmitterlerin nicel olarak ölçülmesindeki duyarlılık artırılmaktadır. Bu teknikler sayesinde, MSS’de meydana gelen karmaşık nörobiyoloji daha kolay anlaşılacak, ilaç araştırmaları, nörolojik ve psikiyatrik araştırmalarda yaygın olarak kullanılacaktır.^{256, 257,}

266, 267, 270-277

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Deney Protokolü



Şekil 3.1. Deney protokolü

Hayvanlar

Araştırmada Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (ATADEM) temin edilen 40 adet 270-300 gr. ağırlığında, dişi *Sprague dawley* sıçanlar kullanıldı. Deney süresince sıçanların su ve yeme erişimi serbest bırakıldı ve 12 saatlik aydınlık/karanlık döngüde uygun sıcaklık ve nemde barındırıldılar. Bir haftalık adaptasyonu takiben hayvanlar rastgele dağıtılarak deney grupları oluşturuldu. Deney hayvanları kafeslerine dağıtıldıktan sonra, neofobi engellemek amacıyla her günde birer dakika boyunca denekler elde tutularak araştırmacılara ve ortama alıştırıldı. Bu çalışmanın bütün süreçlerinin etik uygulama kurallarına uygun olduğu "Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu" (HADYEK) tarafından verilen

23.12.2019 tarihli 42190979-000-E.1900368826 sayılı belge ve 249 numaralı karar ile onaylanmıştır.

Deney Grupları

Her biri 10 hayvandan oluşan 4 gruplu çalışmamızda, gruplarımız şu şekilde planlanmıştır.

Grup 1 Kontrol: Sağlıklı Kontrol grubu

Grup 2 (STZ): 3 mg/kg STZ uygulanan AH Kontrol Grubu.

Grup 3 (STZ+MEM): 3 mg/kg STZ + 28 gün boyunca 10 mg/kg Memantin uygulanan tedavi grubu.

Grup 4 (STZ+SEF): 3 mg/kg STZ + 28 gün boyunca 200 mg/kg Sefiksime uygulanan tedavi grubu.

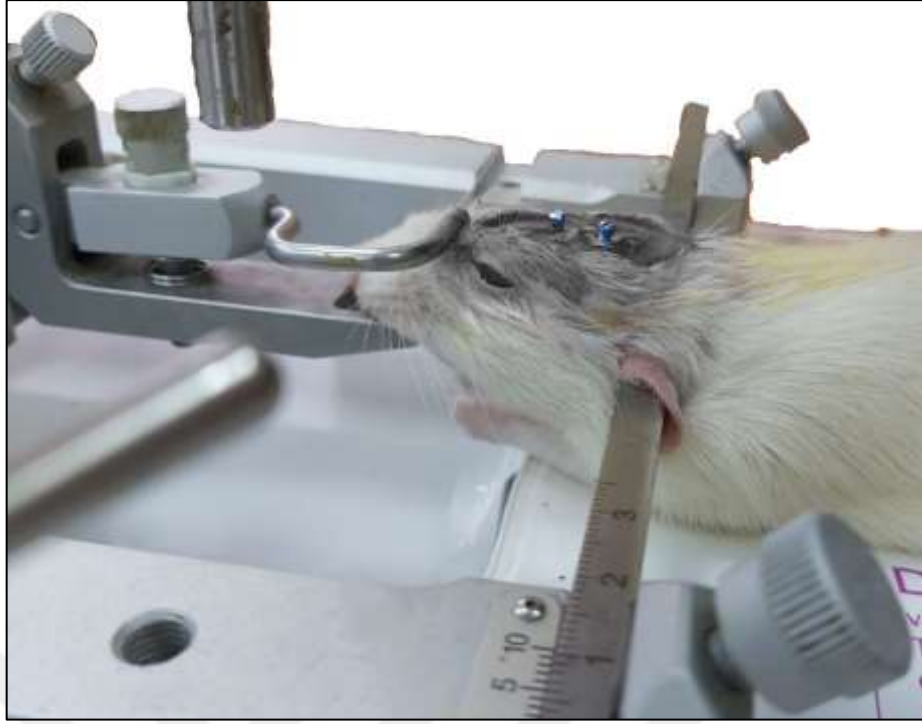
3.2. Deneysel Alzheimer Modelinin Oluşturulması ve Uygulamalar

Deneysel AH modelimizi oluşturabilmek amacıyla deney hayvanlarına i.c.v. enjeksiyon yoluyla, bilateral 3 mg/kg STZ uygulaması yapıldı. STZ, 4.5 pH'lık 0.05 M sitrat tamponunda çözülmüştür. Sitrat tamponu, 0.0228 M sodyum sitrat dihidrat ve 0.0272 M sitrik asit ile hazırlanmıştır. Sıçanlar tiyopental sodyum (50 mg/kg i.p.) ile anesteziye alındı. Anestezi altındaki sıçanların kafa derisinde bulunan kıllar önce tıraş makinesi sonra jiletle tıraş edilip temizlendi. Stereotaksi cihazında (Stoelting Co., USA, Şekil 3.2) yapılacak uygulama sırasında, hipotermiden korumak amacıyla sıçanlar ısıtıcı ped üzerine yüzüstü yatırıldı. Sıçanların kafatasının düz durabilmesi için üst kesici dişleri stereotaksi üzerinde bulunan ve rostrum bölgesini sabit tutmaya yarayan aparata yerleştirilip bu bölge sabitlendi. Daha sonra kulak yoluna yerleştirilen ve üzeri milimetrik cetvelle işaretlenmiş özel çubuklar kullanılarak neurocranium bölgesi de stereotaksi cihazı üzerinde hareketsiz şekilde sabitlendi (Şekil 3.3). Tıraş edilen kafa derisi povidon iyotla dezenfekte edildi. Göz hizasından oksipital kemiğe kadar olan kafa derisi, sagittal

crest hattı boyunca 3-3,5 cm uzunluk civarında bistüri ile tam katlı olarak kesildi. Deri kenarları iki yana açılarak uygulama alanı açığa çıkarıldı. Kafatası üzerinde bulunan yumuşak dokular ve periost kunt diseksiyon ile dikkatli bir şekilde tamamen temizlenerek kafatası ortaya çıkarıldı. Açığa çıkmış olan kafatası üzerinde bregma ve lambda noktaları tespit edildikten sonra stereotaksi cihazına sabitlenmiş işaretleyici, bregma üzerine getirildi ve bu nokta sıfır noktası olarak elektronik koordinat ölçer ile sabitlendi.²⁷⁸



Şekil 3.2. Stereotaksi cihazı ve CA3 bölgesi koordinatları



Şekil 3.3. Stereotaksi üzerinde sabitlenmiş bir sıçan.

Akrilik çimentoyu sabitlemek kullanılan mikro vidalar, rostrum bölgesini sabitlemeye yarayan ön aparat ve neurocranium bölgesini sabitlemeyi sağlayan kulak çubukları görülmektedir.

Koordinat ölçer yardımıyla bregma noktasında; anteroposterior (AP) 0,8 mm ve bilateral (mediolateral, ML) 1,5 mm noktaları işaretlenerek dişçi frezesiyle (Portable Dental Unit, DU893, Shanghai Int. Corp., Hamburg, Germany) kafatasında iki delik açıldı. 3 mg/kg STZ ile yüklenmiş Hamilton enjektörünün uç kısmı, açılmış olan bu deliğin periost kısmına getirilerek elektronik koordinat ölçer üzerinde Z noktası sıfırlandı ve Hamilton enjektörü beynin zarar görmesini ve postürünü kaybetmesini engellemek amacıyla yavaşça (60 saniyede) kafatası yüzeyinden dorsoventral (DV) 3,6 mm noktasına indirilerek toplamda 3 mg/kg STZ enjeksiyonu yapıldı (Şekil 3.4). Enjekte edilen STZ solüsyonunun çevre dokular tarafından emilebilmesi amacıyla 3 µl/dk hızında enjeksiyon yapıldı. İlaç tamamen yayıldıktan sonra bölgede bulunan ilaç solüsyonunun Hamilton enjektörünün yolunu takip ederek geri akışını engellemek amacıyla bazı bölgelerde 30 saniye bekletilerek yavaşça dışarı çıkarıldı.²⁷⁸



Şekil 3.4. Hamilton şırıngası ile STZ enjeksiyonu.

Fotoğrafta üstte elektronik koordinat ölçer ve Hamilton enjektörü görülmektedir. Koordinat ölçer üzerinde, STZ enjeksiyonu yapılan lateral ventriküllerin koordinatları görünmektedir. Yakınlaştırılmış olan alt görüntüde ise, bilateral açılan enjeksiyon delikleriyle beraber, sagittal crest hizasında aşağıda (fotoğrafta solda) lambda bölgesi ve fotoğrafta sağda bregma noktası görülmektedir.

Stereotaksi cihazından ayırdığımız sıçan bekletilmeden sütür masasına iletildi ve 3/0 ipek iplik ile kafa derisi basit ayrı dikiş tekniğiyle dikildi. Lokal enfeksiyon oluşumunu engellemek amacıyla sütür hattı povidon iyotlu çözeltiyle muamele edildi ve tüm hayvanlara %0,9'luk fizyolojik serum ve laktatlı ringer kokteyli ile i.p. sıvı replasmanı yapıldı. Deney sonrası sedasyonu uzayan ve beslenme problemi yaşayan sıçanlara takviye laktatlı ringer solüsyonu enjekte edildi. Sıçanların harder bezlerinden salınan porfirinli sıvının kuruyup göz/burun çevresinde birikmesi anesteziden çıkan sıçanın burayı temizleyememesine sebep olur. Bu problemi yaşayan hayvanların göz ve

burun çevreleri ılık suyla nemlendirilmiş pamukla temizlenip sıçanların bir an önce rutin yaşamlarına dönmeleri sağlanmıştır. Sıçanların kafesleri her gün temizlenerek altlık materyalleri değiştirilmiştir. Aşırı kilo kaybı, ağrı belirtisi veya insizyon hattında enfeksiyon durumlarına karşı sıçanlar sürekli kontrol altında tutuldu. Bellek işlevlerindeki değişiklikler tipik olarak ICV-STZ (intracerebroventriküler STZ enjeksiyonu) enjeksiyonundan 15 gün sonra başlar. ICV-STZ enjeksiyonu ile model oluşturulduktan sonra 15 günlük tedavi ilacı uygulanmış ve nöroprotektif etkinin kıyaslanabilmesi amacıyla tedavi sonrası ölçümleri alınmıştır. Tedavi sonrası ölçümler 7 gün, voltametri ölçümleri 4 gün sürdüğü için glutamat geri alım süresinde değişiklikler olmaması adına bu ölçümler sırasında ilaç uygulaması devam etmiştir.²⁷⁹⁻²⁸³

3.3. Davranış Modelleri

3.3.1. Lokomotor Aktivite Testi

42x42x42 cm ebatlarında saydam pleksiglas kafeslerde ambulator ve vertikal kızıllötesi ışınlarının 250 ms'lik aralıklarla hayvanların konumunu ve hareketini kaydettiği bir sistemdir (MAY ACT 508, Commat, Ankara, Türkiye, Şekil 3.5). Bu sistemde sıçanların birbirini ya da dikkatlerini dağıtabilecek objeleri görmelerini engellemek amacıyla opak cisimlerle kafes etrafı çevrilir. Sıçanlar nokturnal canlılar olduklarından dolayı ölçümlerini alabilmek için karanlık bir ortama ihtiyaç duyulduğundan, sıçanların duyarsız olduğu kırmızı ışıkla aydınlatılan bir laboratuvar da ölçümler alındı.

Tüm sıçanlar kafesin orta noktasından deneye başlatılır ve 10 dakika kafes içinde tutulduktan sonra test sonlandırılır. Her sıçandan sonra kafes içerisindeki koku, idrar ya da dışkı gibi etmenlerden arındırmak amacıyla kafes içi %70'lik etanol ile temizlenir. Test yapılan ortamda ses ve koku gibi dış uyaranlardan sakınmak amacıyla araştırmacılar deney süresince başka odada bekler. Kafes sistemi otomatik ölçüm yapan bir bilgisayara

bağlıdır ve her ölçüm neticesinde gezinme, stereotipik, dinlenme, kat edilen mesafe, dikey ve yatay hareketler olmak üzere 6 parametre otomatik olarak ölçülür ve ayrı olarak kaydedilir. Tüm sıçanlara ait ayrı ayrı gezinme ve rota hareketlerini gösteren birer harita oluşturulur. Sıçanların anksiyete durumu, fiziksel kuvveti ve lokomotor aktivitelerinin hafızayla ilişkisinin test edildiği bu düzenekte, sıçanların bazal ve tedavi sonrası ölçümleri alınarak hastalığın gelişip gelişmediği ve deneyin etkinliği araştırılmaktadır.^{281,}

284



Şekil 3.5. Lokomotor aktivite ölçüm cihazı (MAY ACT 508)

3.3.2. Morris Su Labirenti Testi:

MSL ölçümleri yapabilmek amacıyla 150 cm çap, 60 cm derinlik, sıçanların üzerine çıkabileceği 10x10 cm ebatlarında bir platform ve otomatik ayarlamalı ısıtıcılara sahip olan bir havuz kullanılmaktadır (MAY WM-150, Commat, Ankara, Türkiye) (Şekil 3.6). Video takip programı (Noldus Ethovision XT 10) ve kızılötesi tarama yapan sistem ile, sıçanın anlık konumu ve yer değiştirmesi tespit edilebilmekte ve su tankındaki

hareketleri kaydedilebilmektedir.

Tank ve platform siyah renklidir. Tanka doldurulan su ise granül boyası ile siyaha boyanır, bu sayede beyaz renkli sıçanın tank içindeki takibi kolaylaşmaktadır. Havuzun bulunduğu oda sabit bir ışık kaynağıyla aydınlatılır ve deneklerin dış uyarıma maruz kalmaması için deney süresince odadaki işaret ve şekiller sabit bırakılır. Dört eşit kadrana bölünmüş olan tankın doğu, batı ve kuzey köşelerine farklı renklerde geometrik şekiller yerleştirilir. Sıçanların bu şekilleri referans alarak, kuzeybatı kadranda bulunan ve havuz duvarından 30 cm uzağa yerleştirilen platformu bulmaları amaçlanır. Platformun duvardan 30 cm uzağa konulmasının sebebi, havuz duvarına tutunarak yüzen sıçanların rastgele bir şekilde platformu bulmalarını engellemektir. Bazal ve tedavi sonrası olmak üzere iki farklı zamanda ölçüm alınmıştır. Bazal ölçümlerden elde edilen sonuçlara göre, deney için uygun olmayan sıçanlar deney dışı bırakılmıştır. Tüm gruplar STZ grubuyla kıyaslanmıştır.



Şekil 3.6. Morris su labirenti tankı (MAY WM-150)

MSL ölçümleri altı gün sürmektedir. İlk ölçümler model oluşturulmadan önce alınmış, sonraki ölçümler ise tedavi ilaçları verildikten sonra alınmıştır. Her iki ölçüm

zamanından önce deneklere alıştırma yzdrmesi yapılmıştır. İlk gün suya alışmaları için 60 saniyelik yzdrme yapılır. Sonraki gün su siyaha boyanır ve 2-5'inci günlerde eēitim yzdrmeleri yapılarak sıçanların platformu buldukları süreler kaydedilir. Eēitim yzdrmelerinin olduēu 4 günlük sürede tüm hayvanlar her gün bir sonraki noktadan başlayacak şekilde güney, doēu, kuzey ve batı yönlerinden havuza bırakılıp 90 saniyelik süre boyunca platformu ararlar. Sıçanların hedef kadranda (kuzeybatı) bulunan platformu bulup üzerinde 5 sn durması ya da platformu bulmaksızın tank içinde 90 sn boyunca yüzmesi durumunda, deney otomatik olarak bilgisayar tarafından sonlandırılır ve bir diēer deneēe geçilir. 90 saniye boyunca platformu bulamayan sıçanlar elle platform üzerine yönlendirilir ve 15 saniye süreyle burayı tanımalarına müsaade edilir. Sıçanların platformu bulma süresinin gün geçtikçe kısalması, ērenme ve biliş üzerindeki olumlu sonuçları göstermektedir. 6'ncı gün platform çıkarılır ve tankta 90 saniye yzdrlen sıçanın hedef kadranda geirdiēi süre kaydedilir. Bu aşamada sıçanların hangi kadranda ne kadar süre geirdiēi ve platformun olduēu hedef kadranı hatırlayıp hatırlamadıēı araştırılmıştır.^{281, 282, 285}

3.3.3. Pasif Sakınma Testi

Bu deney, aydınlık ve karanlık iki bölmenin giyotin kapıyla ayrıldıēı özel bir sistemde yapılmaktadır (MAY PAC-214, Commat, Ankara, Türkiye) (şekil 3.7). Sistem tabanı, aralarında 1 cm boşluk bulunan ve sıçanlara 1 mA elektrik verebilen demir çubuklarla kaplıdır. Aydınlık bölmeyi oluşturan pleksiglas duvarlar opak beyaz renklidir ve bölmenin iini yüksek lümenli beyaz ışıkla aydınlatan led ışıklar vardır. Karanlık bölmenin duvarları ise siyah renkli olup, kızılötesi görüntüleme yapmaya olanak saēlayan kırmızı renkli bir pleksiglas kapak ile kapalıdır. Sistemin tepesinde bulunan kamera, aydınlık ve karanlık bölmeleri görebilecek yükseklikte sisteme entegre olarak çalışmaktadır ve kızılötesi tarama yaparak sıçanların konumunu tespit etmektedir.

Deney Prosedürü: Bazal ve tedavi sonrası olmak üzere iki farklı zamanda, tüm sıçanlardan ardışık ikişer gün 300 saniyelik periyotlar halinde ölçüm alınmıştır. Hayvanlar aydınlık bölmeye konulduktan sonra 10 saniyelik alışma sürecine bırakılır. Alışma sürecinden sonra deney başlatılır. Aydınlık bölmeye led lambalar vasıtasıyla yüksek lümenli ışık verildikten hemen sonra giyotin kapı açılır. Sıçan karanlık bölmeye geçerse, giyotin kapı otomatik olarak kapanır ve ayak tabanlarına 2 saniye boyunca 1 mA elektrik akımı verilir. Elektroşok işleminden hemen sonra otomatik kapı açılır ve deneklerin aydınlık alana geçmesi sonucu deney sonlandırılarak geçiş süresi kaydedilir. İkinci gün aynı süreç tekrarlanır. Sıçanlar aydınlık bölmeye konur ve 300 saniyelik süreç başlatılır. Aydınlık alanda geçirilen sürenin uzaması, sıçanların elektroşok varlığını öğrendiği şeklinde yorumlanır.^{283, 285, 286}



Şekil 3.7. Pasif sakınma testi ölçüm cihazı (MAY PAC-214)

3.4. *In Vivo* Voltametri Testi

28 günlük tedavilerinin ardından denek hayvanları stereotaksi cihazı ile sabitlendi ve beyinlerinde AH ile ilişkili olan CA3 bölgesinden FAST (Fast Analytical Sensor Technology, Quanteon L.L.C, FAST-16) cihazı yardımıyla glutamat geri alım süreleri ölçüldü. Gruplar arası farklılıklar istatistiksel olarak ölçülerek tedavinin etkili olup olmadığı ortaya konuldu. Anlık olarak alınan kayıtlar bilgisayarda program vasıtasıyla işlenmiştir, elde edilen ham veriler tarafımızdan analiz edilmiştir. Bu analizler, glutamatın CA3 bölgesinde geri alım süreleri hakkında fikir elde etmemize olanak sağlamıştır. Denekler voltametri ölçümüne alınmadan önce elektrotların birtakım hazırlıklardan geçmesi gereklidir. Glutamatın ne kadar sürede geri alındığını tespit edebilmemiz için, belirli oranda hazırlanmış glutamatın ortama dışarıdan eklenmesi gereklidir. Bu ekleme işlemini yapabilmek için cam mikro kanüller kullanmaktayız. Bu kanüllerin etrafında mikro vidalar vardır ve bu vasıta ile kafatasına sabitlenebilmektedir. Bu kanüller ile beyin dokusuna 10 nanolitreye kadar ilaç vermemiz mümkün hale gelmektedir. 20 µm çaplı bu kanüller, elektrodun ölçüm yüzeyine 50 µm mesafede olacak şekilde sabitlenir. Elektrot ile mesafesi düzgünce ayarlanmış olan kanül içine 200 mM glutamat solüsyonu doldurulur.²⁸⁷

Kalibrasyon

Elektrotlar beyne yerleştirilmeden önce elektrokimyasal özelliklerinin tespiti amacıyla in-vitro ortamda testlere tabii tutulur. Kalibrasyon işlemleri FAST-16 cihazında 0.7'lik sabit bir voltajla yapılır. Bu cihaz, elektrokimyasal verilerle beraber elektrot üzerindeki 4 kanalın glutamat aktivitesi hakkında bilgi verir. Elektroda entegre olarak gelen AgCl referans elektrodu ölçümün hassas çalışmasına yardımcı olur. 0,1 M olarak hazırlanan PBS solüsyonundan 40 ml behere konulur ve kalibrasyon işlemleri bu solüsyon içinde yapılır. Manyetik karıştırıcı ile sürekli olarak karıştırılan solüsyona 500

µl askorbik asit eklenerek elektrodun tepki verip vermediği ölçülür. Tepki vermiyorsa 40 µl glutamat çözeltisi eklenir ve selektivitesi ölçülür. Bu aşamada elektrodun askorbik asit gibi interferentlere karşı tepki vermeyip yalnızca glutamatı ölçmesi hedeflenir. Tespit limiti (Limit of Detection, LOD) 1 µl altında ve selektivite değeri en az 100 olan elektrotlar, çalışmaya hazır demektir. Kalibrasyon testlerini başarılı şekilde tamamlayan elektrot, hayvan deneyine alınır.

Deneklerin hazırlanması

Hayvanlar tiyopental sodyum (50 mg/kg) ile anestezi edilir, gerekirse inhale anestezik ile idamesi yapılır. Hipotermiyi engellemek amacıyla ısıtıcı ped üzerine yatırılan sıçanın vücut ısısı 37.5 °C'de sabit kalması sağlanır. Tıraşlı kafa derisi 3-3.5 cm uzunluğunda, tam katlı olarak kesilir. Kafatası üzerinde bulunan dokular temizlenir. Kafatası üzerinde herhangi bir mikro kanama noktası varsa buraya mum sürülerek kanama durdurulur. Koordinatlar belirlenerek, elektrot ve kanülün girebileceği genişlikte dura mater de dahil olacak şekilde dişçi frezesi ile kontrollü bir şekilde delik açılır. Kanamayı engellemek amacıyla çok özenli şekilde çalışılmalıdır.

***In Vivo* Voltametri Ölçümü**

Elektronik koordinat ölçer ile kafatası yüzeyi sıfır olarak ayarlanır. Elektrot, referans elektrot ve içi 200 mM glutamat ile doldurulmuş olan kanül stereotaksi cihazında sabitlenir ve bu sistem sağ hemisferde kafatası yüzeyinden bregma noktasına göre AP 3.6 mm, ML 3.8 mm ve DV 3.6 mm (hipokampus CA3) noktasına indirilir.²⁸⁰

Stereotaksi cihazı sayesinde hareketsiz duran elektrot, hayvanın kafatasına sabitlenir. Sabitleme işlemi için akrilik çimento kullanılır (Blau Cryl, Efes Dental Medikal, Bursa, Türkiye). Akrilik çimentonun kafatasını tutabilmesi için kafatası üzerinde farklı iki noktaya vidalama işlemi yapılır (Şekil 3.8) ve akrilik çimento bu vidalara tutunarak elektrot ve kanülü hayvanın başında sabit tutar.

Akriliğin tamamen sabitlenebilmesi için, çimentonun kafatası yüzeyinde çevreye doğru biraz genişletilmesi gereklidir. Sabitleme işlemi tamamlanınca nitrojen pompasıyla (Picospritzer III-Parker Hannifan, Corporation) 10-50 nanolitre glutamat çözeltisi beyne verilerek elektrodun kontrol ölçümleri yapılır. Kontrol ölçümleri tamamlanan sıçan deney kafesine alınır ve burada uyanması beklenir. Uyanan ve hareket halinde olan hayvandan ölçümler yapılırken, elektroda bağlı FAST-16 sistemi 0.7 V sabit voltaj uygular. Sabit ilerleyen bir baseline elde edebilmek için bir müddet beklenir. Baseline oluşunca ölçümler yapılır. Verilen glutamat miktarı ve glutamat geri alım süreleri ölçülerek not edilir. Beyne verilen glutamat miktarı, stereomikroskop (Meiji EMZ Zoom, Labtek Inc) vasıtasıyla ölçülür. FAST-16 cihazının elektrottan aldığı veriyi bilgisayara aktarması sonucunda ise program vasıtasıyla glutamat geri alım süresi ölçülerek tespit edilir. Hayvanın tüm voltametrik ölçümleri alındıktan sonra 100 mg/kg yüksek doz tiyopental sodyum anestezisiyle ötenazisi yapıp beyinleri çıkarılır. Kanül yerleşimleri uygun olmayan sıçanlar deney dışı bırakılır.²⁸⁷



Şekil 3.8. Sıçan kafatasının sabitlenmesi ve mikro vidaların yerleştirilmesi.

1-2: ICV-STZ enjeksiyonu yapılan lateral ventrikül koordinatları, **3:** Voltametri ölçümü yapılan Hipokampüs CA3 koordinatları, **4-5:** Akrilik çimentoyu sabit tutmaya yarayan mikro vidalar.

3.5. LC-MS/MS

Hassas ve basit bir şekilde, sıçan hipokampusünden alınan örneklerde istenilen miktarda nörotransmitterin analizi yapılabildiği için tercih edilen bir yöntemdir. Oksidasyon olasılığını elimine etmek ve numunelerin bozulmasını engellemek amacıyla, sıçan hipokampus ve korteks örnekleri azami hassaslıkla izole edilir. AH hastalarının beyinlerinde glutamaterjik, dopaminerjik ve kolinerjik sistemlerde etkili olan patolojik farklılıklar ortaya konulmuş ve her bir nörotransmitter için kantitatif analiz yapılmıştır. Dopamin, glutamik asit ve ACh miktarını tespit edebilmek amacıyla hipokampus ve korteks bölgelerinden 200 mg örnek alındı. Daha sonra bu örnekler TissueLyser II (Qiagen, Almanya) cihazında 2 dakika boyunca çelik bilyeler yardımıyla 1 ml asetonitril içerisinde homojenize edildi. Ekstraktlar 1 saat boyunca -20 °C’de inkübasyon işlemine tabi tutulduktan sonra ultra santrifüj yardımıyla 12000 rpm’de santrifüj edildi. 45 mikron por çapına sahip filtrelerden geçirilen örnekler kantitatif analiz için hazır hale getirildi.

Örneklerin analizi için pozitif iyon modunda AJS ESI iyon kaynağına sahip Agilent 6460 LC-MS/MS cihazı kullanıldı. Multiple Reaction Monitoring (MRM) modunda dopamin, ACh ve glutamik asit için optimum prekürsör ve produkt iyonlar (153.8 → 136.8, 147.8 → 84.0, 145.9 → 86.9) tercih edildi. Nebülizatör basıncı 35 psi olarak ayarlanırken, kapiller voltaj 4500 olarak belirlendi. Yöntemin enjeksiyon hacmi 5 µL olarak saptandı. Mobil faz olarak kullanmak amacıyla %0.1 formik asit içeren deiyonize su-asetonitril (70-30; h/h) karışımı optimize edildi. Kolon sıcaklığının 30 °C olarak belirlendiği ölçümlerde InfinityLab Poroshell 120 SB-AQ (3.0 x 150mm, 2.7-Micron) ile bütün numunelerde kromatografik separasyon gerçekleştirildi. Yöntemin akış hızı 0.3 ml/dk. ayarlandı. Toplam analiz süresi 4 dakika olarak tespit edildi. Her bir madde için kalibrasyon eğrileri çizildi. Referans numuneler ile çizilen eğrinin lineer olduğu regresyon analizi ile tespit edildi. Kantitatif analiz sonuçları verildi.^{277, 288-292}

3.7. Patolojik İncelemeler

3.7.1. Histopatolojik İnceleme

Sıçanların nekropsileri yapıldıktan sonra, beyin dokuları %10 nötral formalin solüsyonunda tespit edildi. Alınan dokular rutin alkol-ksilol serisinden geçirilerek parafin bloklara alındı. Pozitif şarjlı (Polilisinli) lamlara aktarılan 5 µ'luk kesitler Hematoksilen & Eosin (H-E) ile boyanarak korteks, cornu ammonis (CA1, CA2, CA3) kısımlarındaki nöronlarda görülen piknotik ve dejeneratif değişimler yönünden semi kantitatif olarak yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirildi.²⁹³

3.7.2. İmmunohistokimyasal İnceleme

Sıçanların nekropsileri yapıldıktan sonra, beyin dokuları %10 nötral formalin solüsyonunda tespit edildi. Alınan dokular rutin alkol-ksilol serisinden geçirilerek parafin bloklara alındı. Pozitif şarjlı lamlara alınan 5 µ'luk kesitler ksilol-alkol serilerinden geçirilip PBS ile yıkama işleminden sonra %3'lük H₂O₂ ile 10 dk. Muamele edilerek endojen peroksidaz inaktive edildi. Dokularda bulunan antijeni açığa çıkarmak için antijen retrieval solüsyonuyla 2 kez 5 dk. boyunca 500 watt ile muamele edildi. Sonra tekrar PBS ile yıkanan dokular Tau (Santa Cruz, Katalog No. sc-32274 1/1500 dilüsyon oranı), β-Amiloid (Santa cruz, Katalog No. sc-28365, 1/100 dilüsyon oranı) ve AChE (Santa cruz, Katalog No. sc-373901, 1/100 dilüsyon oranı) primer antikorları ile oda sıcaklığı ortamında 45 dk. boyunca inkübasyona bırakıldı. Sekonder antikor olarak, Large Volume Detection System: anti-Polyvalent, HRP (Thermofischer, Katalog no: TP-125-HL) üretici firmanın kit prosedürüne göre kullanıldı. Kromojen amacıyla ise DAB (3,3'-Diaminobenzidine) kullanıldı. Mayer's Hematoksilen ile zıt boyama yapıldıktan sonra entellan ile kapatılarak ışık mikroskopunda incelendi. İnceleme beyin dokularının korteks, CA1, CA2 ve CA3 kısımlarındaki immunopozitiflikler semi kantitatif olarak yok (-), hafif (+), orta (++) , şiddetli (+++) ve çok şiddetli (++++) olarak değerlendirildi.²⁹⁴⁻²⁹⁶

3.8. İstatistiksel Analiz

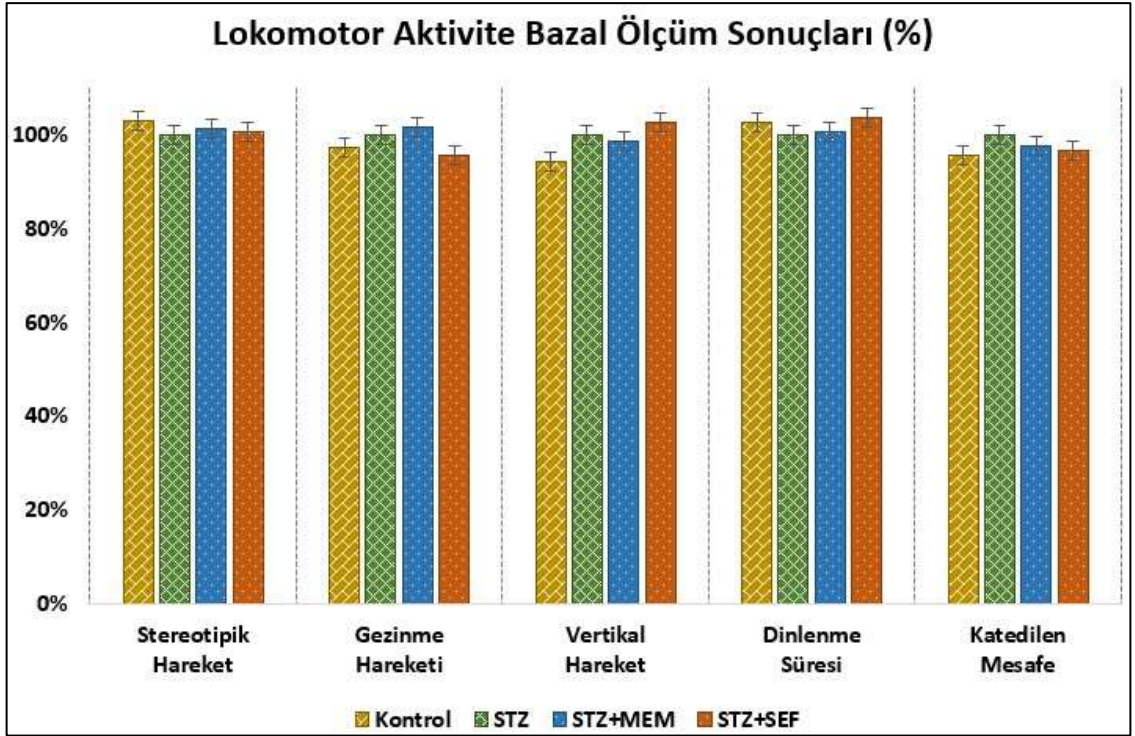
Deney sonucunda elde edilen tüm veriler SPSS yazılımı (IBM SPSS Statistic version 20.0) ile analiz edildi. Gruplar arasındaki farklılık, parametrik testlerde One Way ANOVA, Post-Hoc Tukey testine göre yapılmıştır. Patolojik analizler ise non-parametrik test olan Kruskal Wallis testi ile ölçülmüş olup, gruplar arası farklılık ise Mann-Whitney U testi ile belirlenmiştir.



4. BULGULAR

4.1. Lokomotor Aktivite Testi Bulguları

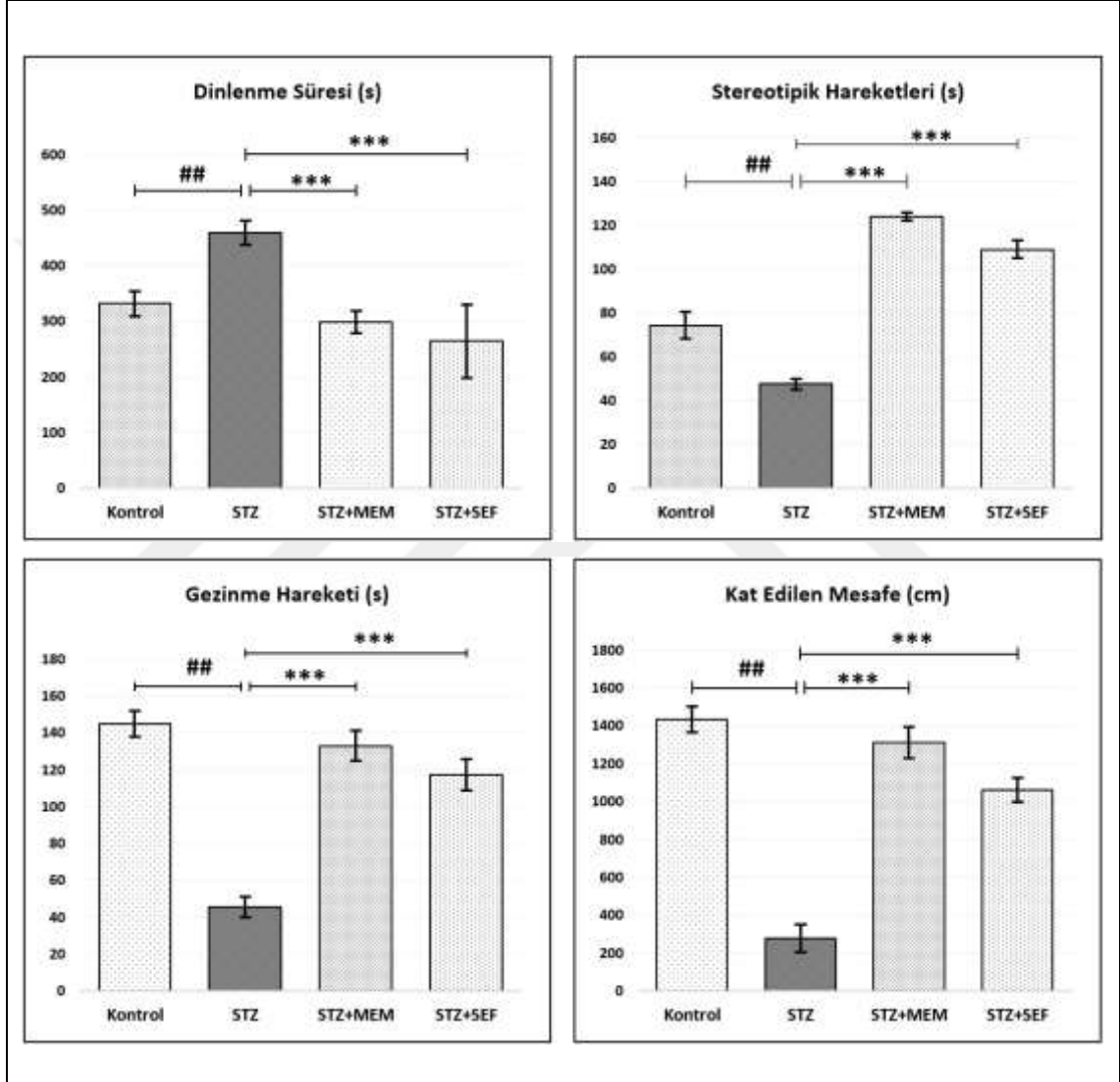
Aktivite ölçer ile lokomotor aktiviteleri ölçülen sıçanların dinlenme süreleri, süslenme ve temizlenme süreleri (stereotipik), gezinme hareketleri ve kat ettikleri mesafeleri ölçülmüştür. Elde edilen bazal ölçüm sonuçları Şekil 4.1’de, tedavi sonrası ölçüm sonuçları ise Şekil 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Lokomotor aktivite bazal ölçüm sonuçları

Grupların lokomotor aktivite bazal ölçüm sonuçlarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır. Tedavi sonrasında alınan ölçümlerde ise Dinlenme süreleri kıyaslandığında Kontrol 331.64 ± 22.73 sn, STZ grubu ise 459.43 ± 22.31 sn olarak yüksek anlamlılığa ($p < 0.001$) sahip olduğu bulunmuştur. STZ grubuyla karşılaştırılan tedavi grupları sırasıyla STZ+SEF 264.17 ± 65.4 sn ve STZ+MEM 298.73 ± 20.43 bulunarak yüksek anlamlılığa ($p < 0.001$) sahip oldukları görülmüştür. Stereotipik hareketleri incelenen sıçanların değerleri sırasıyla Kontrol 74.38 ± 6.23 sn, STZ 47.52 ± 2.51 sn,

STZ+SEF 109.05±3.98 ve STZ+MEM 124±2 sn olarak bulunmuştur. STZ grubuyla karşılaştırılan tüm gruplar, yüksek anlamlılığa ($p<0.001$) sahiptir. Sıçanların gezinme (ambulator) hareketleri Kontrol 144.86±7.17 sn, STZ 45.5±5.51 sn, STZ+SEF 117.24±8.64 sn, STZ+MEM 132.89±8.24 sn olarak bulunmuştur. Kontrol ve tedavi grupları STZ grubuna kıyasla yüksek anlamlılığa ($p<0.001$) sahiptir.



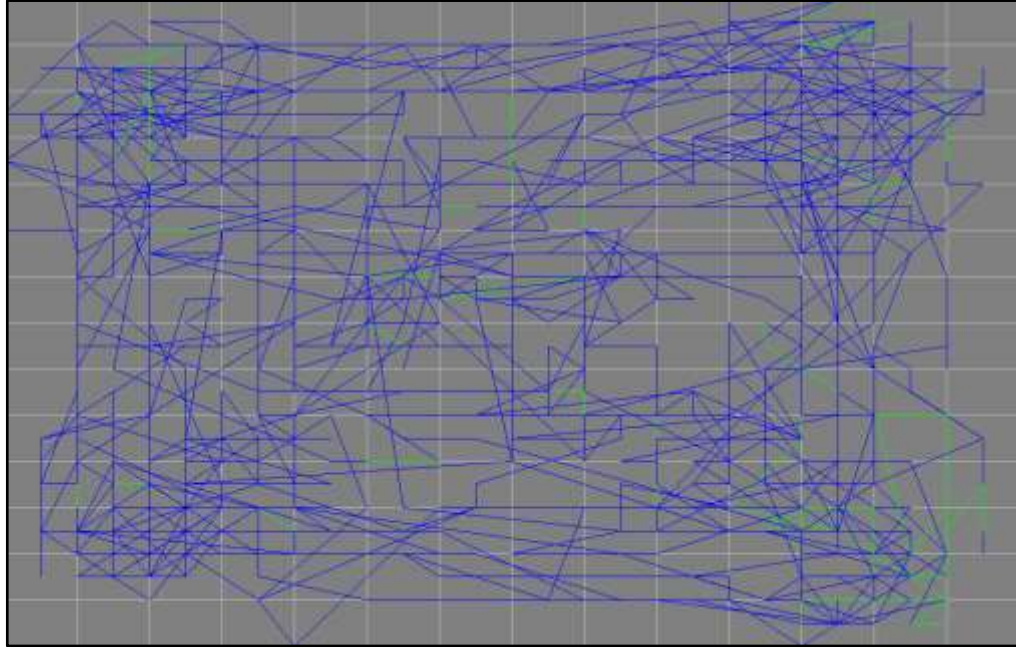
Şekil 4.2. Lokomotor aktivite tedavi sonrası ölçüm sonuçları.

##, Kontrol grubuna kıyasla STZ grubunun ($p<0.001$),
 *** ise STZ grubuna kıyasla tedavi gruplarının anlamlılığını ($p<0.001$) göstermektedir.

Sıçanların kat ettikleri mesafe açısından da çok anlamlı değerlere sahip olduğu bulunmuştur. Kontrol grubu kafes içinde 1435.18±68.65 cm yol kat ederken, STZ

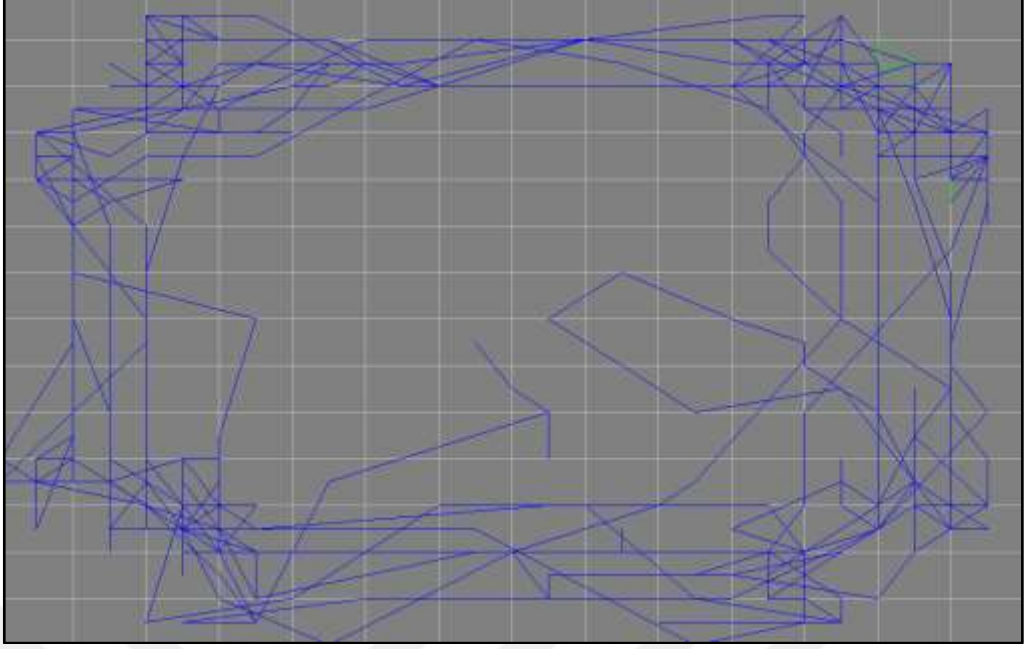
278.36±74.34 cm yol kat etmiştir. Tedavi grupları da STZ grubuna kıyasla çok anlamlı ($p<0.001$) olacak şekilde yüksek mesafe kat etmişlerdir. Değerleri sırasıyla STZ+MEM 1311.67±81.71 cm ve STZ+SEF 1060.31±62.78 cm'dir. STZ grubuna kıyasla tüm grupların her bir parametre için yüksek anlamlılığa ($p<0.001$) sahip oldukları görülmüştür. Tüm bu değerler anksiyete açısından Kontrol ve tedavi gruplarının STZ grubundan daha iyi durumda olduğunu göstermektedir.

Lokomotor aktiviteleri ölçülen grupların kafes içinde bulundukları sırada bilgisayar tarafından elde edilen gezinme hareketleri (ambulatoriyer, mavi) ile dik durma hareketlerinden (vertikal, yeşil) bir aktivite haritası oluşturulmaktadır. Bu haritalar her gruptan birer örnek olacak şekilde Kontrol, STZ, STZ+SEF ve STZ+MEM olarak sırasıyla aşağıda verilmiştir (Şekil 4.3, 4.4, 4.5 ve 4.6).



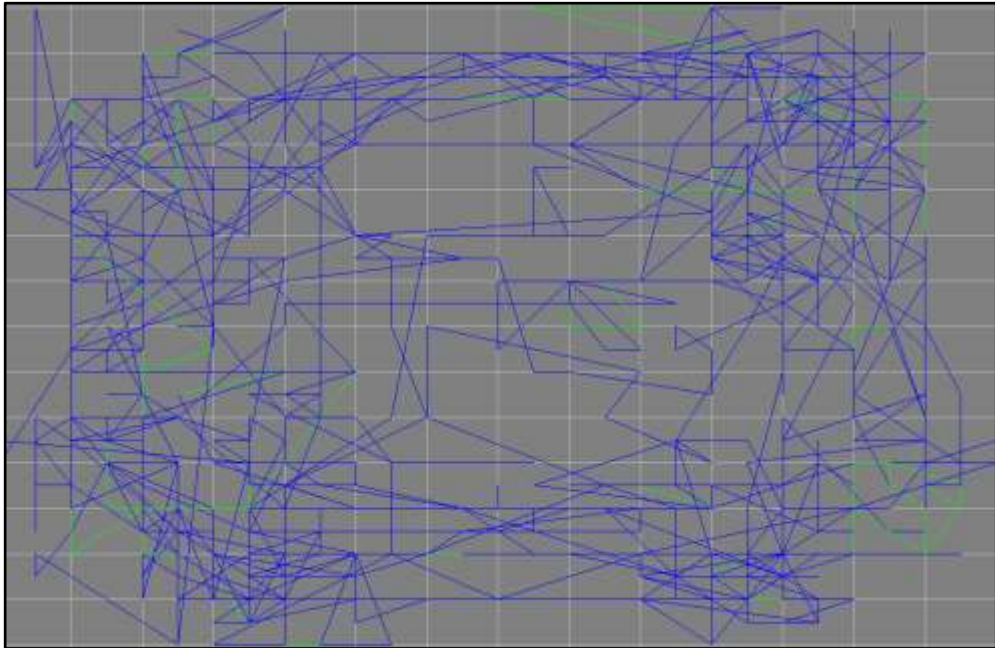
Şekil 4.3. Kontrol grubuna ait örnek lokomotor aktivite haritası.

Kontrol ve tedavi gruplarının alanın her tarafını eşit şekilde kullandığı görülürken, STZ grubu sıçanların merkezi noktaya uğramaktan çekindikleri ve köşelerde bulunmayı tercih ettiği görülmektedir. STZ grubunun kat ettiği mesafe ve gezinme hareketlerinin de az olduğu Şekil 4.4'te görülmektedir.

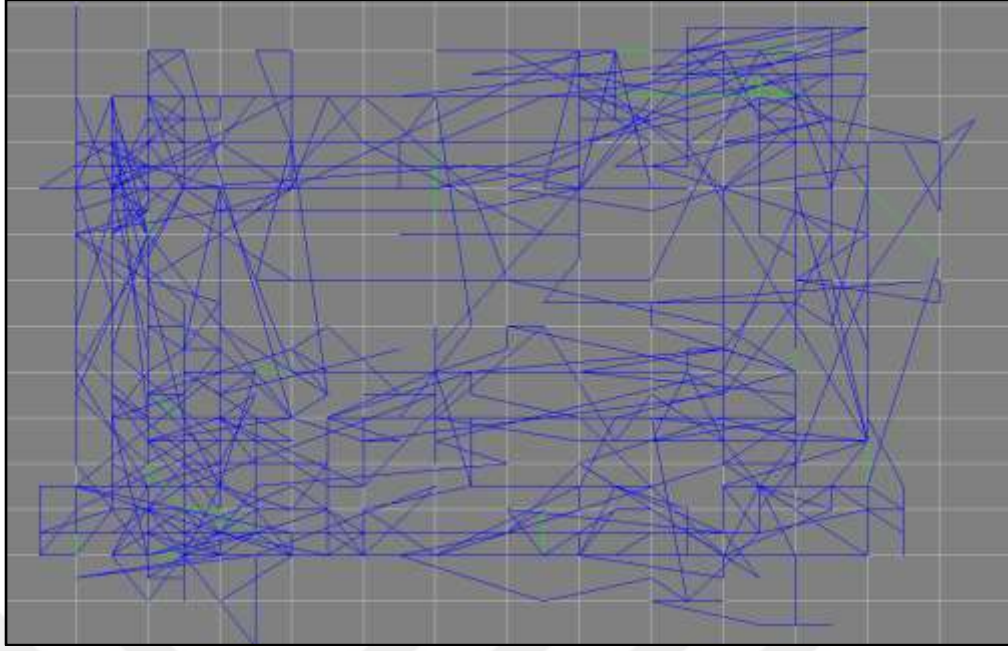


Şekil 4.4. STZ grubuna ait örnek lokomotor aktivite haritası.

Tedavi gruplarını (STZ+SEF ve STZ+MEM) temsil eden sıçanların lokomotor aktivite haritalarında ambulator (mavi) ve vertikal (yeşil) çizgilerin yoğunluğu, kafes içinde her alanı kullandıklarını göstermektedir (Şekil 4.5 ile Şekil 4.6).



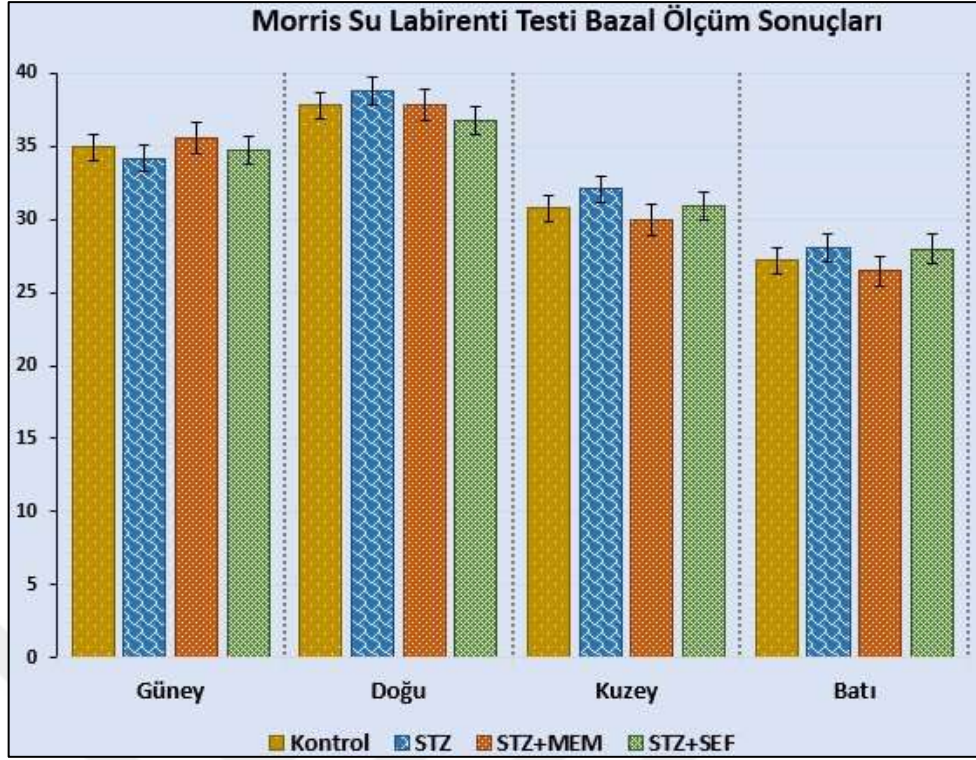
Şekil 4.5. STZ+MEM grubuna ait örnek lokomotor aktivite haritası.



Şekil 4.6. STZ+SEF grubuna ait örnek lokomotor aktivite haritası.

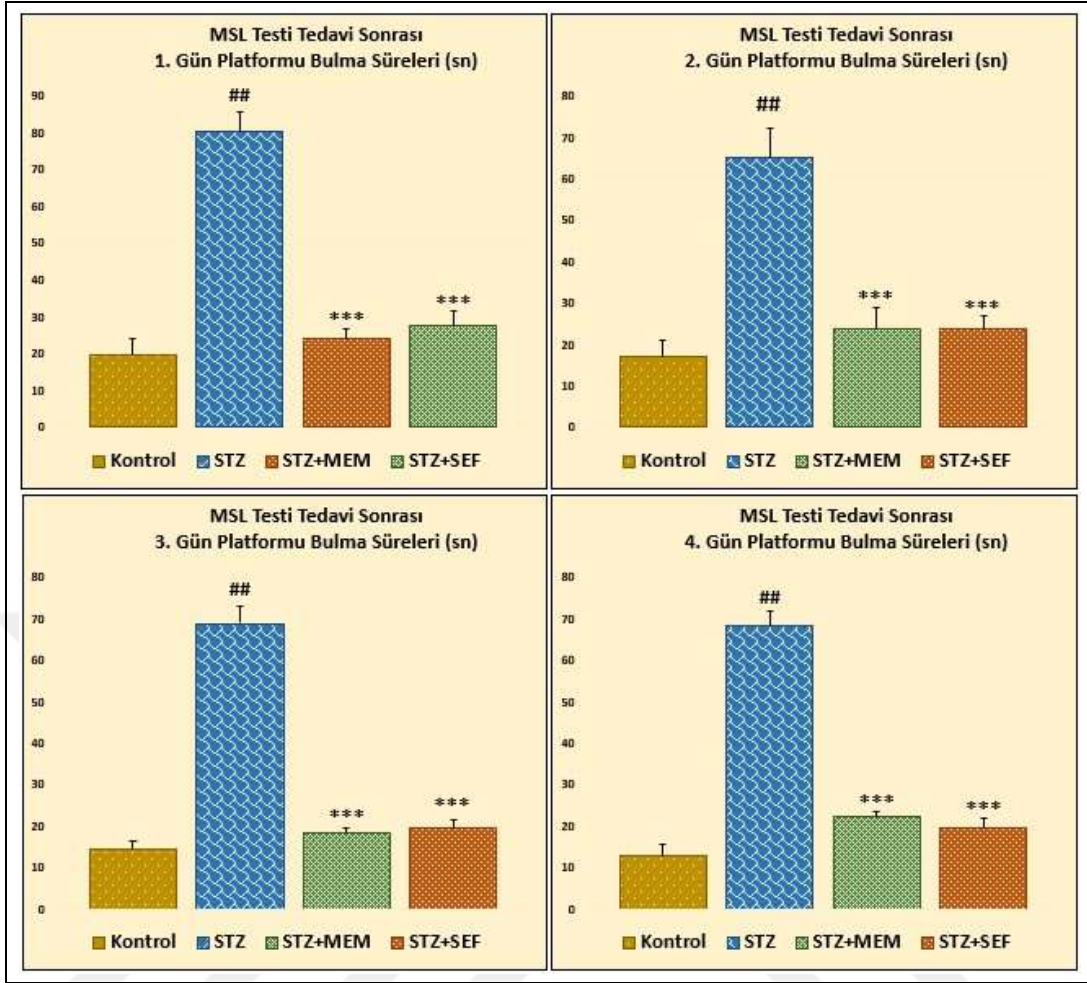
4.2. Morris Su Labirenti Testi Bulguları

MSL testi, bazal ölçüm platformu bulma süreleri (kaçış süresi) 4 günün ortalaması olacak şekilde yönler göre sırasıyla güney, doğu, kuzey ve batı olacak şekilde verilmiştir. Kontrol grubu güney 34.93 ± 5.46 sn, doğu 37.8 ± 1.54 sn, kuzey 30.75 ± 13.44 sn ve batı 27.3 ± 6.54 sn. STZ grubu güney 34.2 ± 6.57 sn, doğu 38.82 ± 3.95 sn, kuzey 32.07 ± 10.37 sn ve batı 28.1 ± 6.17 sn. STZ+MEM grubu güney 35.6 ± 10.92 sn, doğu 37.84 ± 10.66 sn, kuzey 29.97 ± 8.04 sn ve batı 26.5 ± 14.75 sn. STZ+SEF grubu ise güney 34.7 ± 10.44 sn, doğu 36.72 ± 9.41 sn, kuzey 30.95 ± 10.97 sn ve batı 28 ± 11.36 sn olarak tespit edilmiştir. Yönler arasında anlamlı bir farklılık bulunmamış, sıçanların bazal ölçüm kaçış süresi ortalamalarının birbirlerine yakın değerlerde olduğu tespit edilmiştir. Platformun kuzeybatı kadranında bulunmasından dolayı, Batı noktasından havuza bırakılan sıçanların kaçış süresi diğer yönlerle kıyasla daha kısa sürmüştür. Doğu noktası platforma en uzak noktada olmasından dolayı, o bölgeden bırakılan sıçanların kaçış süresi diğer bölgelere göre daha uzun sürmüştür (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Morris su labirenti testi bazal ölçüm sonuçları

MSL testinde sıçanların tedavi sonrası ilk 4 gün havuzda bulunan platformu bulma süreleri karşılaştırıldığında, ilk günün ölçüm sonuçları Kontrol grubunda 19.9 ± 4.34 sn, STZ grubunda 80.48 ± 4.98 sn bulunarak Kontrol grubunun STZ grubuna kıyasla yüksek anlamlılığa ($p < 0.001$) sahip olduğu tespit edilmiştir. Tedavi grupları ise STZ+MEM 23.94 ± 2.67 sn ve STZ+SEF 27.75 ± 4.03 sn olarak STZ grubuna karşılık yüksek anlamlılığa ($p < 0.001$) sahip olduğu bulunmuştur. Diğer günlerde yapılan ölçümler ise şu şekilde bulunmuştur. İkinci gün Kontrol 17.03 ± 3.89 sn, STZ 65.32 ± 7.02 sn, STZ+MEM 23.88 ± 4.91 sn ve STZ+SEF 23.87 ± 3.01 sn olarak bulunmuştur. Üçüncü gün Kontrol 14.53 ± 1.88 sn, STZ 68.95 ± 3.97 sn, STZ+MEM 18.32 ± 1.25 sn ve STZ+SEF 19.5 ± 2.02 sn olarak bulunmuştur. Dördüncü gün ise Kontrol 12.73 ± 2.81 sn, STZ 68.45 ± 3.52 sn, STZ+MEM 22.44 ± 1.09 sn ve STZ+SEF 19.46 ± 2.4 sn olarak bulunmuştur. Alıştırma yüzdürmelerinin olduğu ilk 4 günde tüm gruplar STZ grubu ile kıyaslanmış ve tüm günlerde STZ grubuna karşılık $p < 0.001$ yüksek anlamlılık tespit edilmiştir (Şekil 4.8).



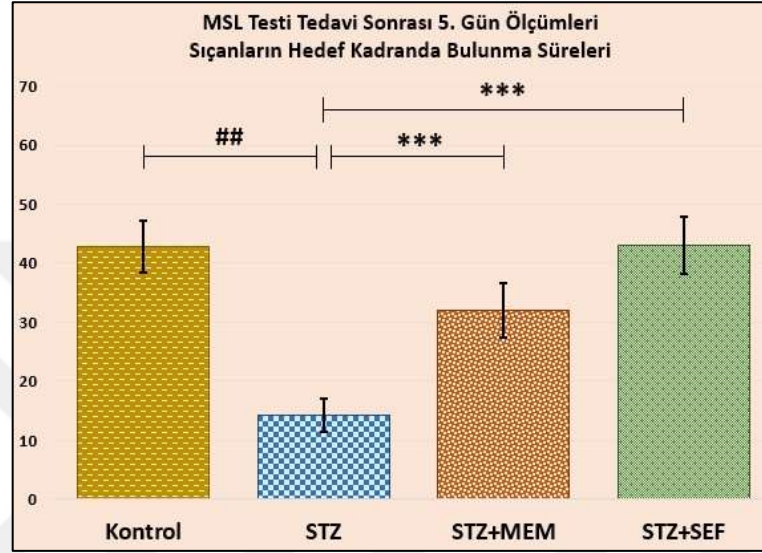
Şekil 4.8. Morris su labirenti testi alıştırma yüzdürmesi sonuçları.

Değerler tedavi sonrası ölçümlere aittir. Grafiklerdeki ilk 4 günlük değerler, havuz içinde kuzeybatı kadranda (hedef kadrana) bulunan platformu bulma süreleridir.

MSL testinde öğrenmenin test edildiği beşinci gün platformsuz olarak yüzdürülen sıçanların, platformun 4 gün durduğu kuzeybatı kadranda geçirdikleri süreler karşılaştırılmıştır. Deney sonuçları Kontrol 42.8 ± 4.42 sn, STZ 14.25 ± 2.88 sn, STZ+MEM 32 ± 4.59 sn ve STZ+SEF 43 ± 4.84 sn olarak bulunmuştur. Kontrol ve tedavi gruplarının STZ grubuna kıyasla $p < 0.001$ yüksek anlamlılığa sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.9). Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

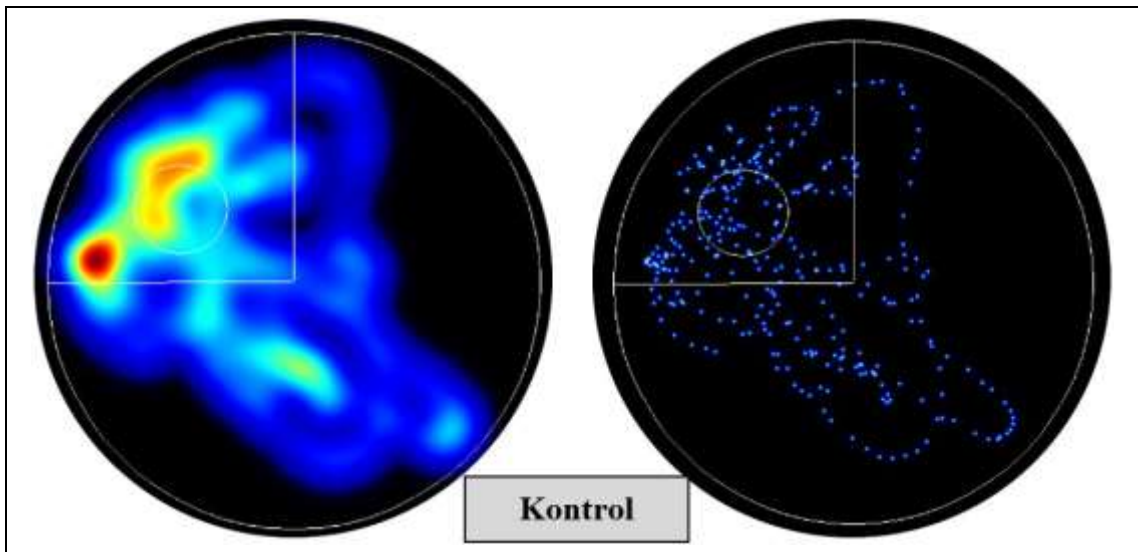
Sıçanların öğrenmenin test edildiği beşinci gün elde edilen Kontrol ve STZ gruplarına ait sıcaklık haritaları (solda) ve gezinme rotaları (sağda) Şekil 4.10 ve 4.11’de, STZ+SEF ve STZ+MEM gruplarına ait haritalar ise Şekil 4.12’de verilmiştir. Sıcaklık

haritalarında ve gezinme rotalarında Kontrol ve tedavi gruplarının platformun bulunduğu kuzeybatı kadranda (beyaz üçgen) ve özellikle platformun olduğu alanda (beyaz çember) platformu aradıkları anlaşılmaktadır. Öte yandan AH'li sıçanlar, labirentin her tarafını aramış ve platformun bulunduğu kadranda diğer gruplara kıyasla çok az vakit geçirmiştir. Kırmızı yoğunluk, sıçanların en çok vakit geçirdiği bölgeyi göstermektedir.

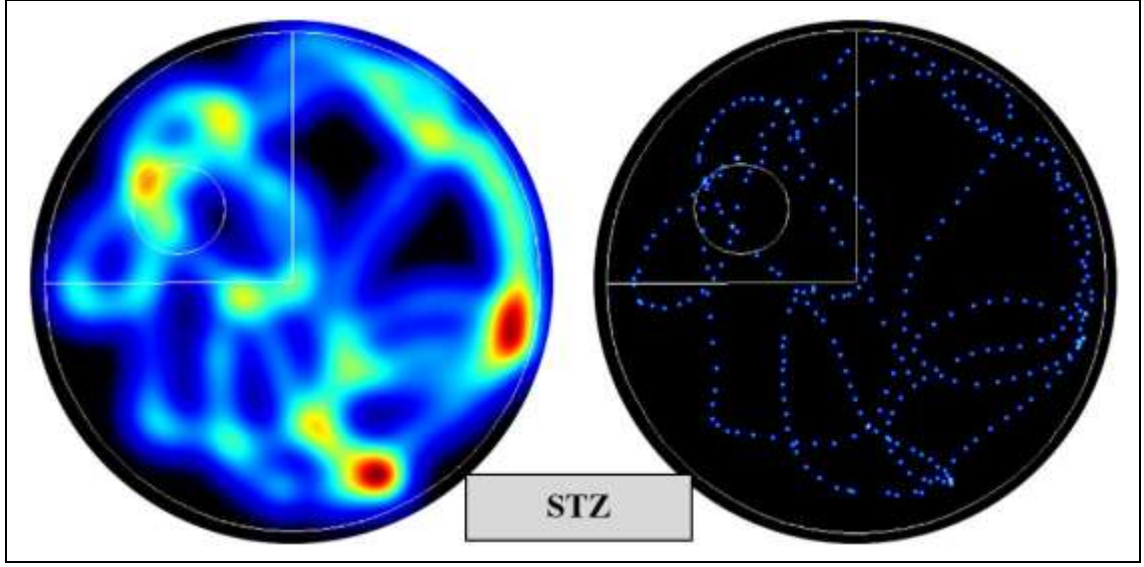


Şekil 4.9. Morris su labirenti testi öğrenme yüzdürmesi sonuçları.

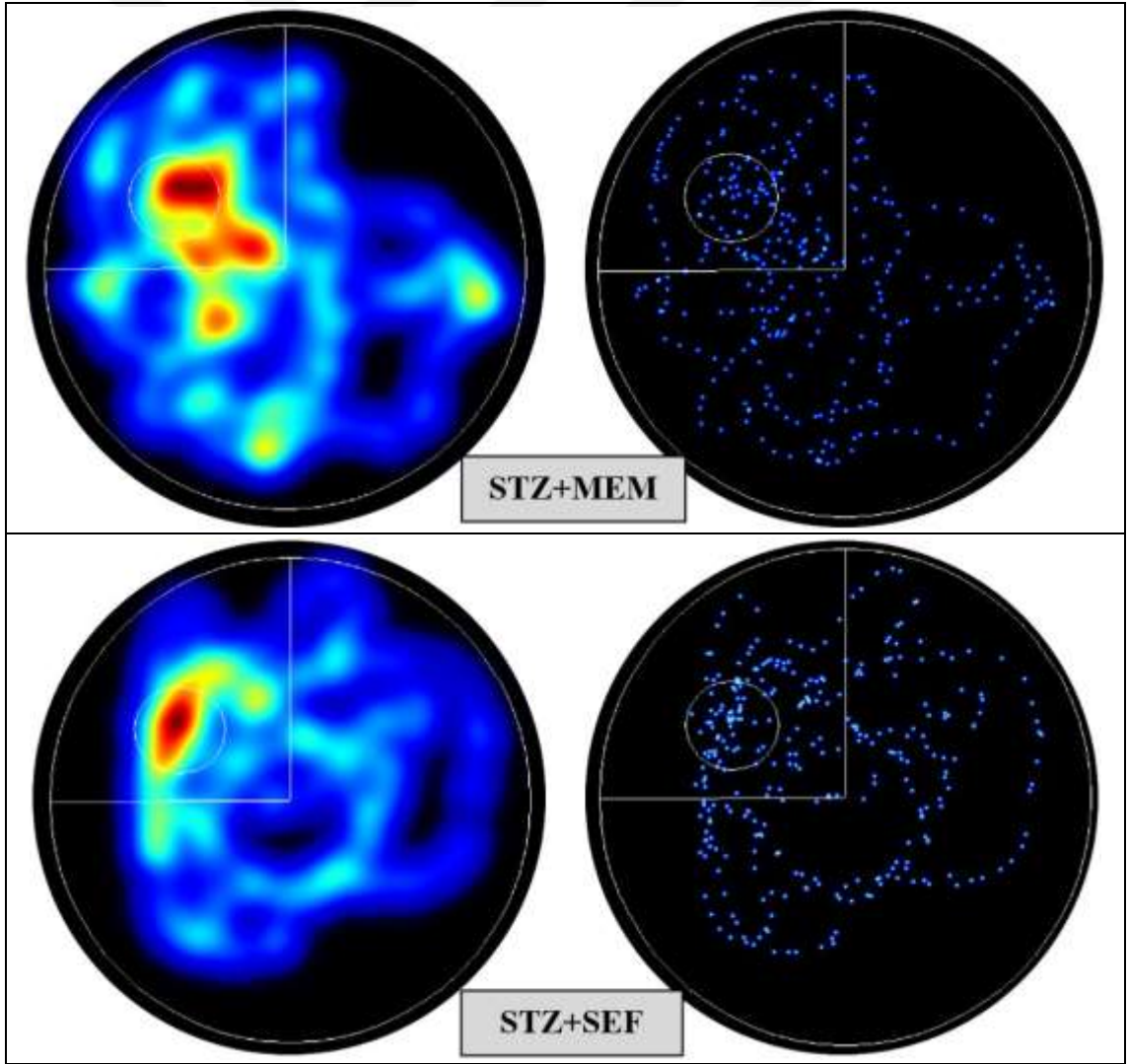
Tedavi sonrası beşinci gün alınan değerde, platformsuz havuzda sıçanların kuzeybatı kadranda geçirdikleri süreler verilmiştir. Veriler “ortalama $\pm$ standart sapma” olarak verilmiştir. #, Kontrol grubuna karşılık $p < 0.001$ anlamlılığı gösterir. *, STZ grubuna karşılık $p < 0.001$ anlamlılığı gösterir.



Şekil 4.10. MSL testi Kontrol grubunun örnek sıcaklık haritası ve gezinme rotası

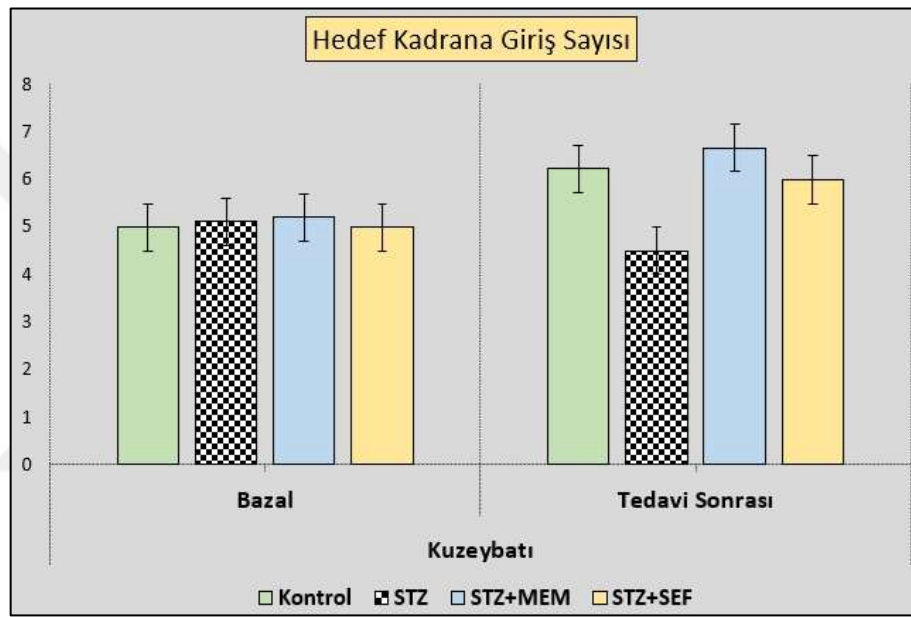


Şekil 4.11. MSL testi STZ grubunun örnek sıcaklık haritası ve gezinme rotası.



Şekil 4.12. MSL testi tedavi gruplarının örnek sıcaklık haritaları ve gezinme rotaları.

Hedef kadrana (kuzeybatı) giriş frekansı Şekil 4.13'te verilmiştir. Bazal ölçümde; Kontrol grubu hedef kadrana 5 ± 1 kez, STZ 5.12 ± 1.91 kez, STZ+MEM 5.2 ± 1.1 kez ve STZ+SEF 5 ± 1 kez giriş yapmıştır. Bazal ölçümlerde gruplar arası anlamlı bir farklılık yoktur. Tedavi sonrası ölçümlerde ise; Kontrol 6.23 ± 1.86 kez, STZ 4.5 ± 1.3 kez, STZ+MEM 6.67 ± 2.52 kez ve STZ+SEF 6 ± 0.82 kez hedef kadrana giriş yapmıştır. Hedef kadrana giriş sayıları açısından Kontrol ve tedavi grupları STZ grubuna karşı yüksek anlamlılığa ($p < 0.001$) sahiptir.

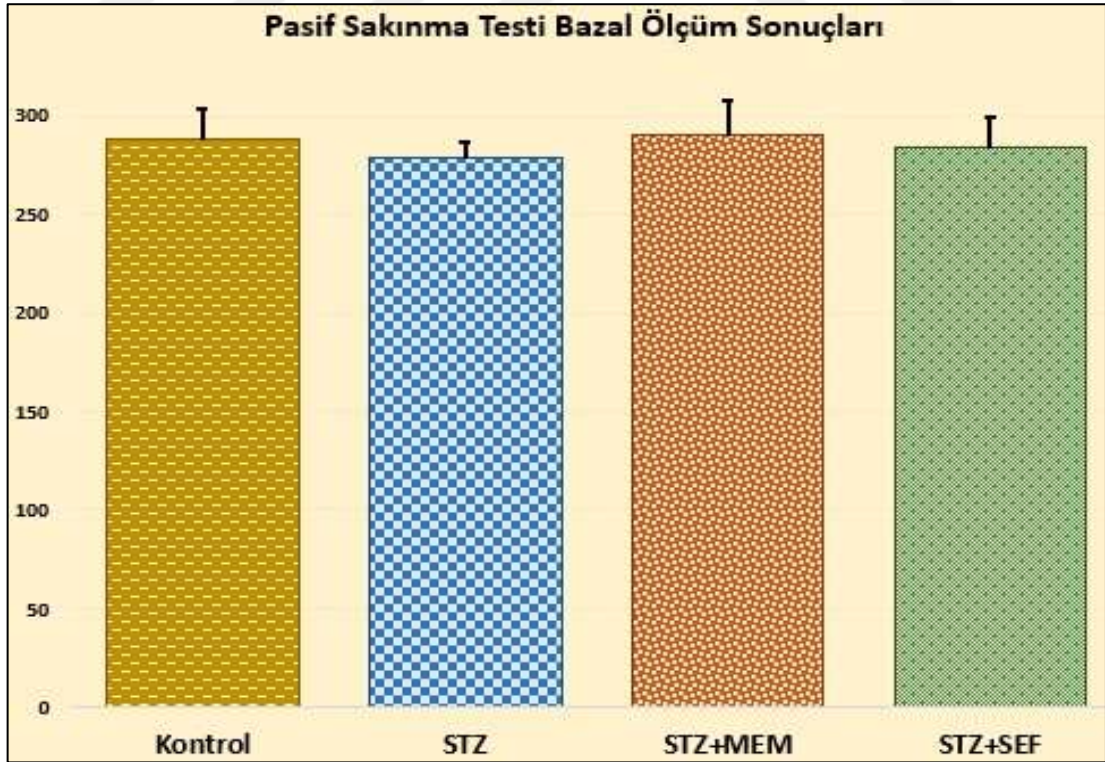


Şekil 4.13. Moris su labirenti grupların kadrarlarda geçirdiği süre.

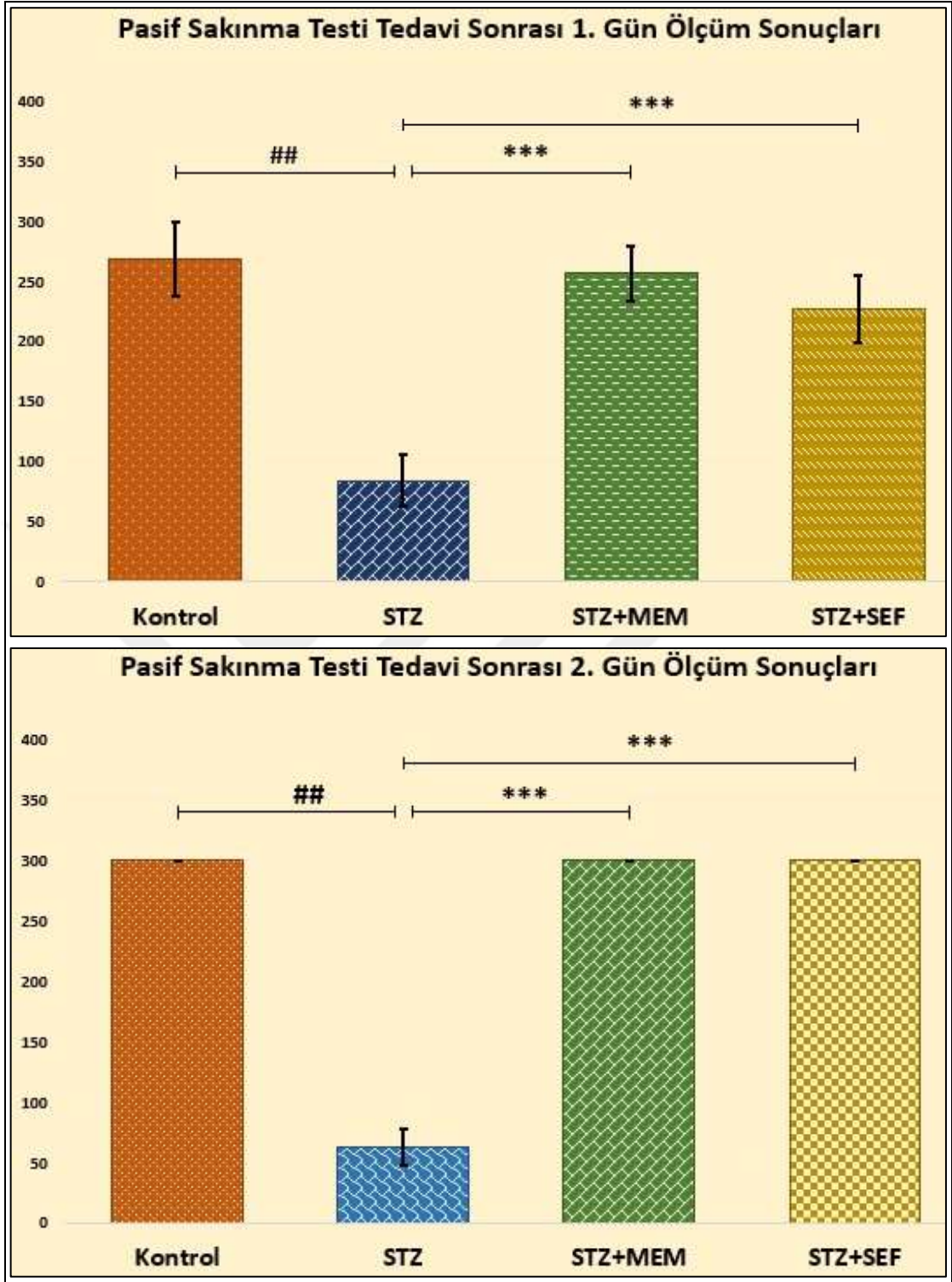
4.3. Pasif Sakınma Testi Bulguları

Sıçanların öğrenmelerinin test edildiği ve ardışık iki gün ölçülen pasif sakınma testinde, STZ grubuyla kıyaslanan Kontrol grubunun karanlık alana geçme süresinin çok uzadığı ve yüksek anlamlılığa ($p < 0.001$) sahip olduğu bulunmuştur. Hem bazal hem de tedavi sonrası ölçümleri şekillerde verilmiştir (Şekil 4.14, Şekil 4.15). Alınan bazal ölçümlerde grupların değerleri sırasıyla Kontrol 287.5 ± 15.55 sn, STZ 278.33 ± 7.64 sn, STZ+MEM 290 ± 16.96 sn ve STZ+SEF 283.33 ± 16.07 sn olarak anlamlı farklılık oluşturmamıştır (Şekil 4.14).

Tedavi sonrasında alınan ölçümlerde, grupların aydınlık bölmede geçirdikleri süreler iki gün ayrı olarak verilmiştir (Şekil 4.15). İlk günün değerleri Kontrol 268.63 ± 30.53 sn, STZ 84.33 ± 22.05 sn, STZ+MEM 256.67 ± 23.09 sn ve STZ+SEF 227.0 ± 28.46 sn olarak bulunmuştur. Tedavi sonrası ikinci gün değerleri ise; Kontrol 300.0 ± 0.0 sn, STZ 62.33 ± 15.0 sn, STZ+MEM 300.0 ± 0.0 sn ve STZ+SEF 300.0 ± 0.0 sn olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre Kontrol ve tedavi gruplarının karanlık bölmeye geçme isteği azalmış STZ grubu ise diğer tüm grupların aksine karanlık bölmeye geçiş süresinin kısaldığı tek grup olmuştur. Karanlık alana geçme süresi tüm gruplarda STZ grubuna kıyasla yüksek anlamlılığa ($p < 0.001$) sahip olduğu tespit edilmiştir. Sıçanlardan alınan bazal ve tedavi sonrası ölçümlerde, bazal ölçüme kıyasla tedavi sonrası ölçümlerinde karanlık alana geçiş süresi tüm gruplarda uzamış bir tek STZ grubu elektrik akımını hatırlayamayarak karanlık alana geçiş süresini kısaltmıştır. Bu durum, öğrenme ve hafızanın STZ grubunda diğer gruplara kıyasla daha zayıf olduğunun bir göstergesidir.



Şekil 4.14. Pasif sakınma testi bazal ölçüm sonuçları.



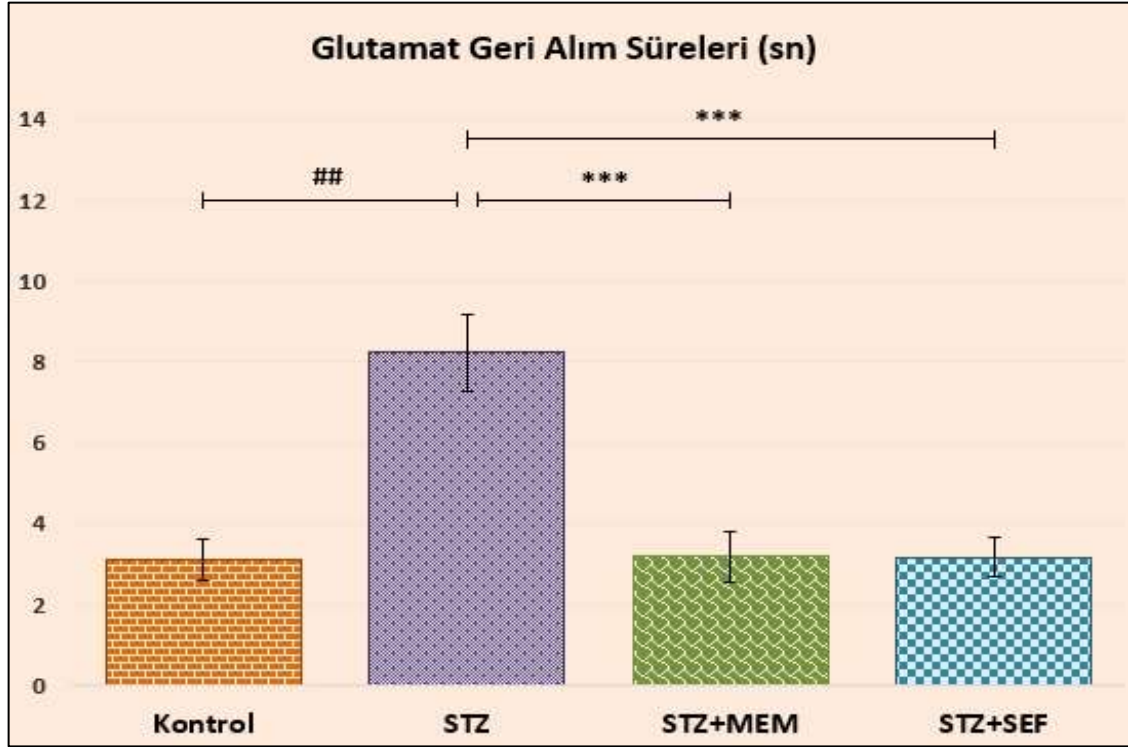
Şekil 4.15. Pasif sakınma testi tedavi sonrası ölçüm sonuçları.

##, Kontrol grubuna karşı $p < 0.001$ anlamlılığı.
***, STZ grubuna karşı $p < 0.001$ anlamlılığı göstermektedir.

4.4. *In Vivo* Voltametri Testi Bulguları

Sıçanların beyinlerine yerleştirilen mikroelettrotlar yardımıyla sıçanlar hareket

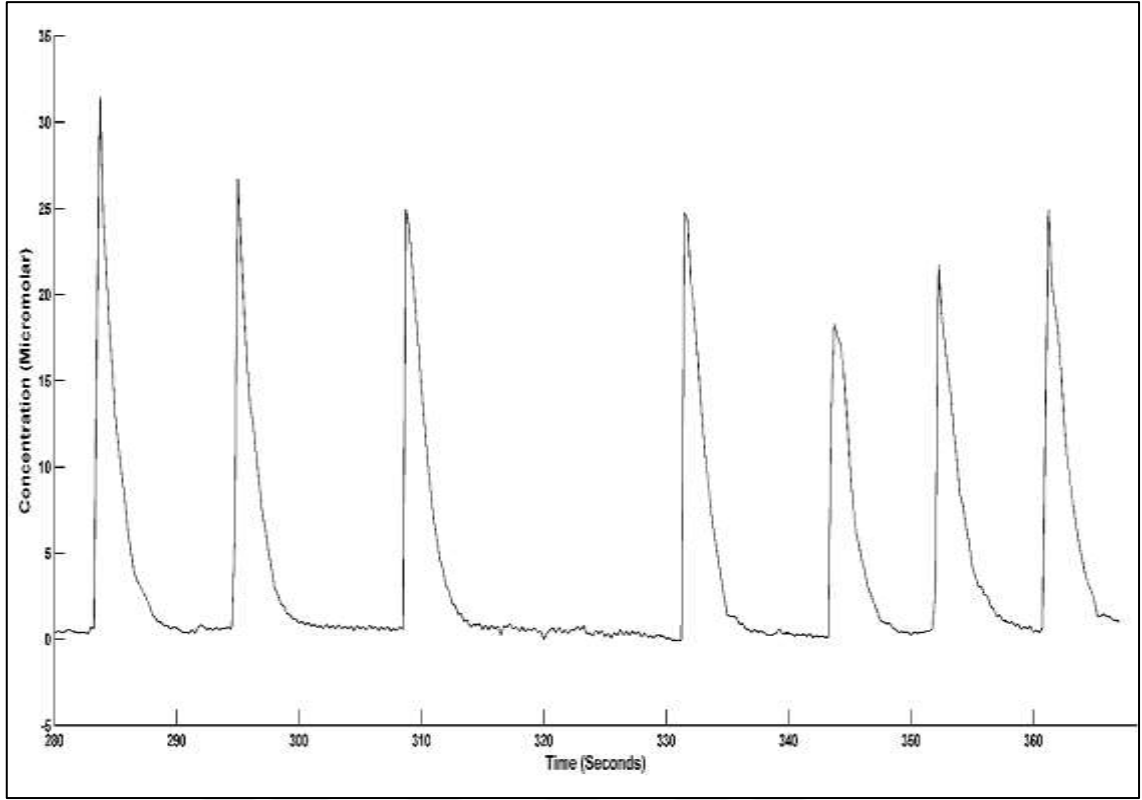
halindeyken voltametri tekniğiyle glutamat geri alım süreleri ölçülmüştür (Şekil 4.16). Hipokampus CA3 bölgesinden alınan voltametrik kayıtlarda, AH grubunun glutamat geri alım süresinin Kontrol grubuna göre önemli ölçüde arttığı ve aralarında istatistiksel olarak yüksek anlamlılık ($p<0.001$) olduğu tespit edilmiştir.



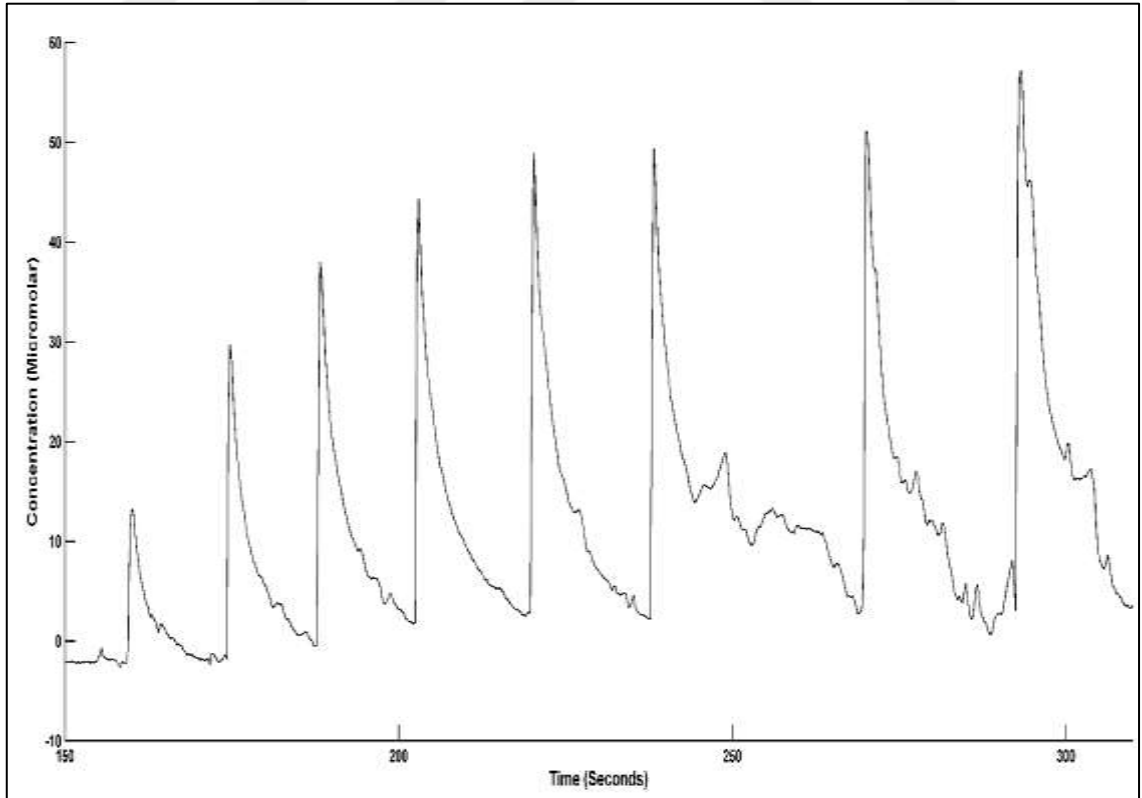
Şekil 4.16. Voltametri testinde CA3 bölgesinde glutamat geri alım süreleri.

Sonuçlar saniye cinsinden verilmiştir. ## Kontrol grubuna karşı $p<0.001$ anlamlılığı gösterir.
*** STZ grubuna karşı $p<0.001$ anlamlılığı gösterir.

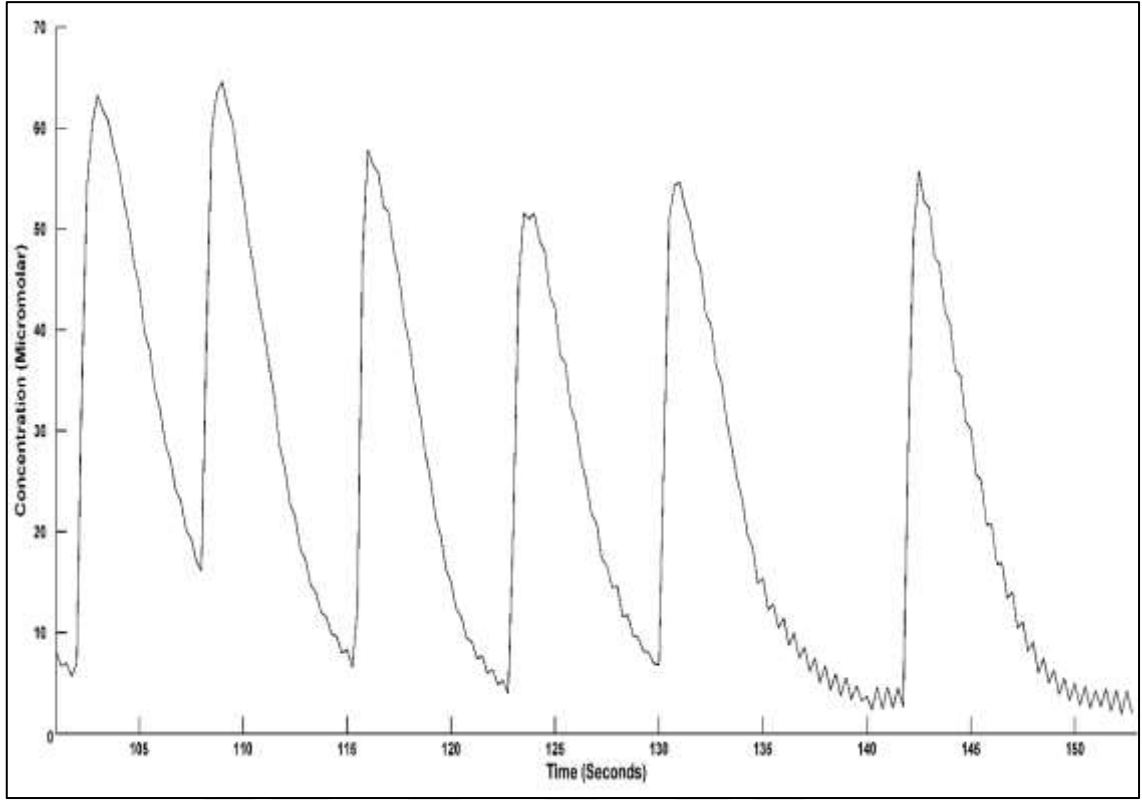
Kontrol grubunun glutamat geri alım süresinin %80'i (t80) 3.12 ± 0.51 sn iken AH'li grubumuz olan STZ grubunda bu süre çok yükselerek 8.23 ± 0.95 sn olarak bulunmuştur. Öte yandan tedavi gruplarımızda da STZ grubuna kıyasla t80 sürelerinde yüksek anlamlılık ($p<0.001$) tespit edilmiştir. Tedavi gruplarının t80 süreleri STZ+MEM 3.19 ± 0.63 sn ve STZ+SEF 3.17 ± 0.49 sn olarak bulunmuştur. Tedavi gruplarından elde edilen sonuçlar, glutamat geri alımını hızlandırma konusunda ilacımızın AH'li STZ grubuna kıyasla yüksek anlamlılığa ($p<0.001$) sahip olduğunu göstermektedir. Tüm gruplardan alınan örnek voltametrik kayıtlar, Şekil 4.17 – Şekil 4.20'de verilmiştir.



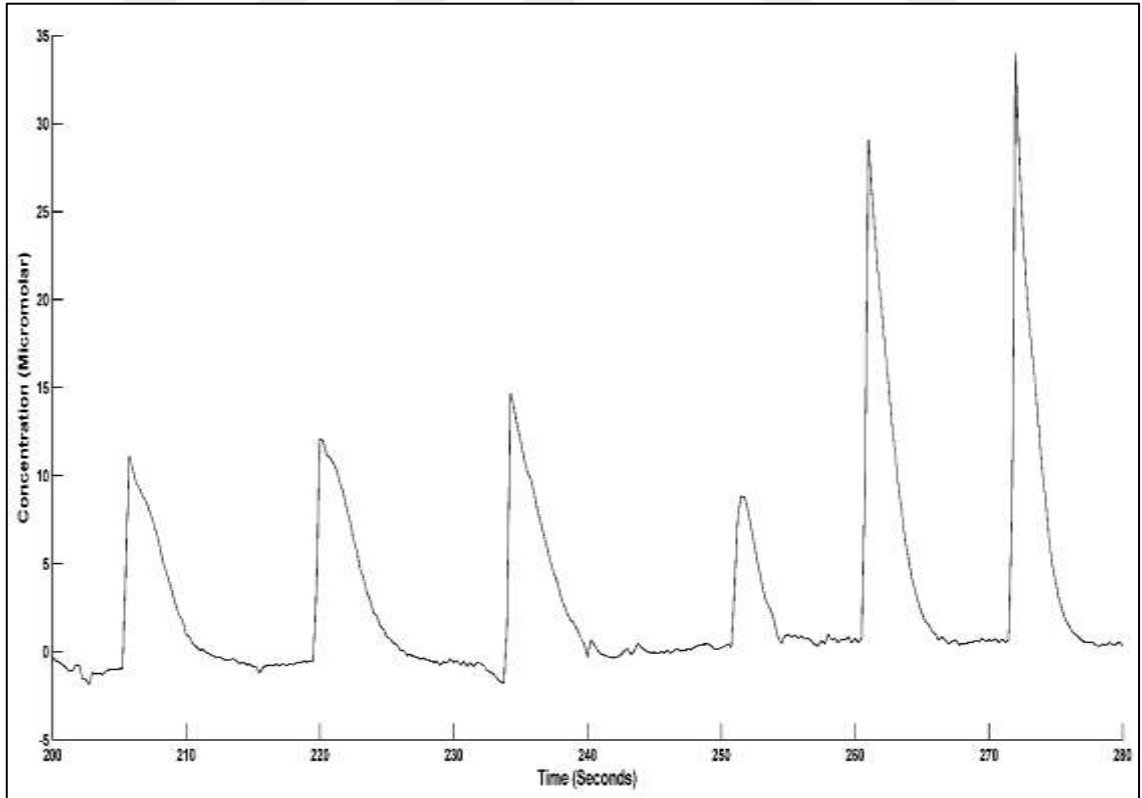
Şekil 4.17. Voltametri testi Kontrol grubu örnek kaydı



Şekil 4.18. Voltametri testi STZ grubu örnek kaydı



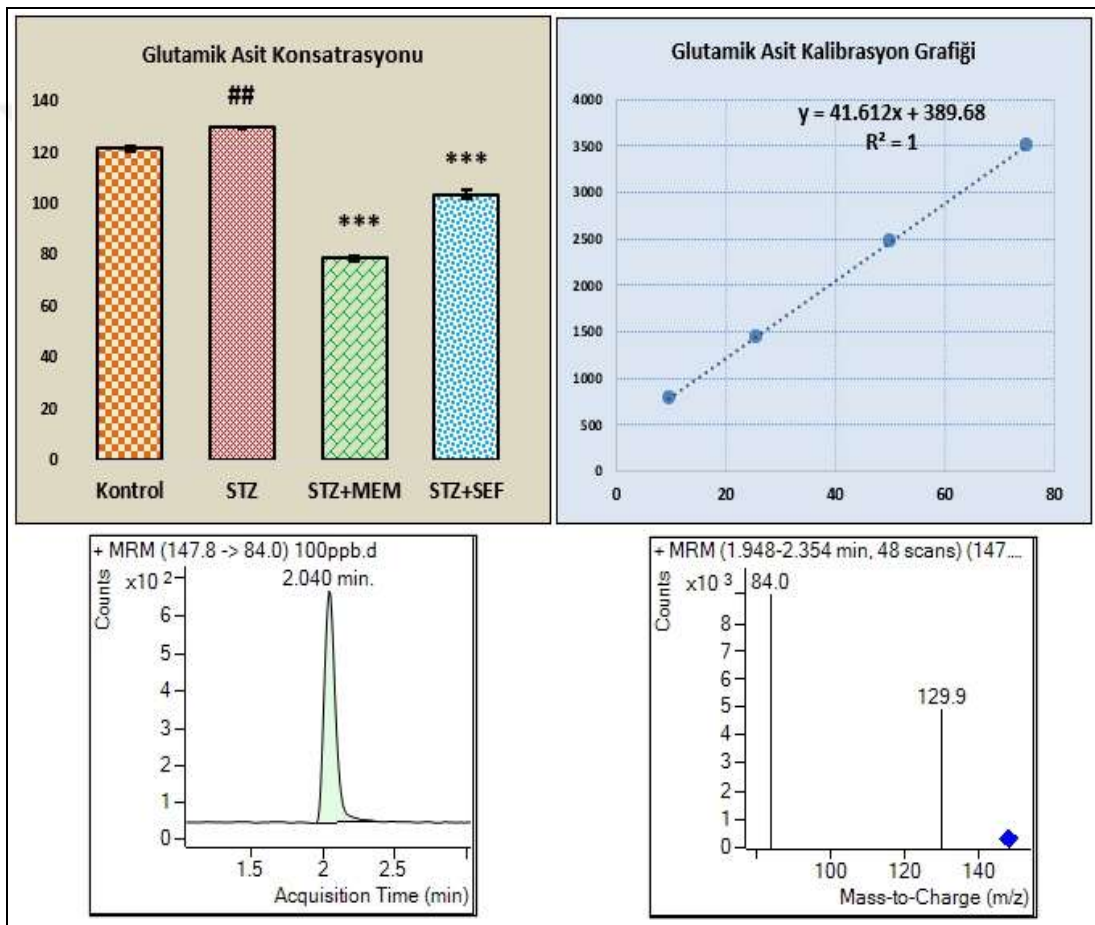
Şekil 4.19. Voltametri testi STZ+MEM grubu örnek kaydı



Şekil 4.20. Voltametri testi STZ+SEF grubu örnek kaydı

4.5. LC-MS/MS Testi Bulguları

Homojenize edilen CA3 ve korteks bölgelerinden örnekler alınmıştır. MRM tarama modunda glutamik asidin prekürsör ve ürün iyonları için optimum değerler (147.8 → 84.0) tercih edilmiştir. Kantitatif analiz sonuçları her bir nörotransmitter için ayrı olarak hesaplanmıştır. Glutamik asidin MRM modunda parçalanma ürünlerine ait kütle spektrum, kromatogram, konsantrasyon ve kalibrasyon grafiklerine ait bulgular Şekil 4.21’de gösterilmiştir.



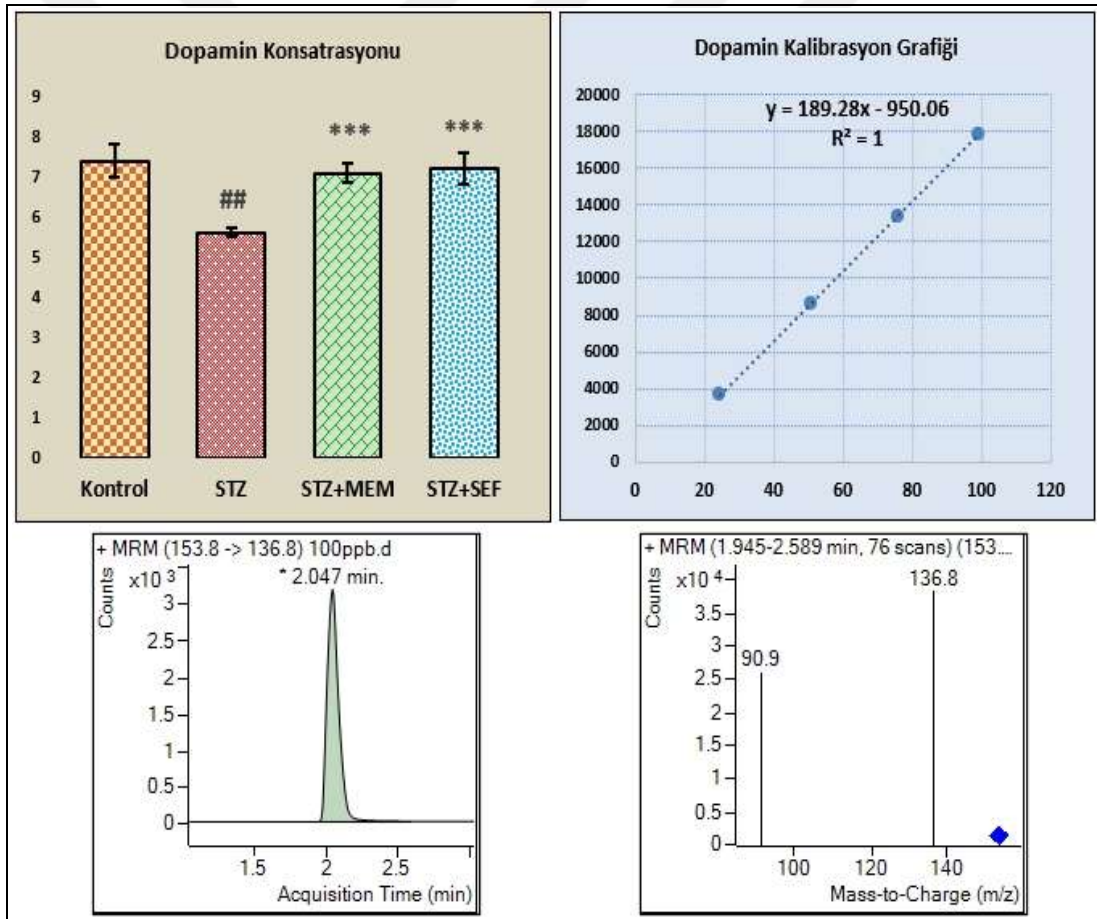
Şekil 4.21. LC-MS/MS Glutamik asit grafikleri.

Sol üstte konsantrasyon, sağ üstte kalibrasyon, sol altta kromatogram ve sağ altta kütle spektrumu grafikleri verilmiştir. # Kontrol grubuna, ***, STZ grubuna kıyasla $p < 0.001$ anlamlılığı ifade etmektedir.

MRM tarama modunda yapılan analizlerde, Kontrol grubunun değeri 121.82 ± 0.97 elde edilirken, STZ grubu 130.05 ± 0.06 değeri vererek glutamik asidin dokudaki miktarını sağlıklı hayvanlara kıyasla artırdığını ve Kontrol grubunun STZ grubuna kıyasla yüksek

anlamlılığa ($p<0.001$) sahip olduğunu göstermiştir. Tedavi gruplarının sonuçları da sırasıyla STZ+MEM 78.84 ± 0.89 ve STZ+SEF 103.66 ± 1.65 olarak bulunmuştur. Kontrol ve tedavi grupları STZ grubuyla kıyaslandığı zaman, dokularında bulunan glutamik asit miktarının çok azaldığı ve STZ grubuna kıyasla yüksek anlamlılığa ($p<0.001$) sahip oldukları görülmüştür.

Dopamin için MRM tarama modunda 153.8 prekürsör iyonunun 136.8 m/e oranına sahip fragmentör iyonuna ait kromatogramı sonucunda analiz yapılmıştır. Dopaminin MRM modunda parçalanma ürünlerine ait kütle spektrum, kromatogram, konsantrasyon ve kalibrasyon grafiklerine ait bulgular Şekil 4.22’de gösterilmiştir.

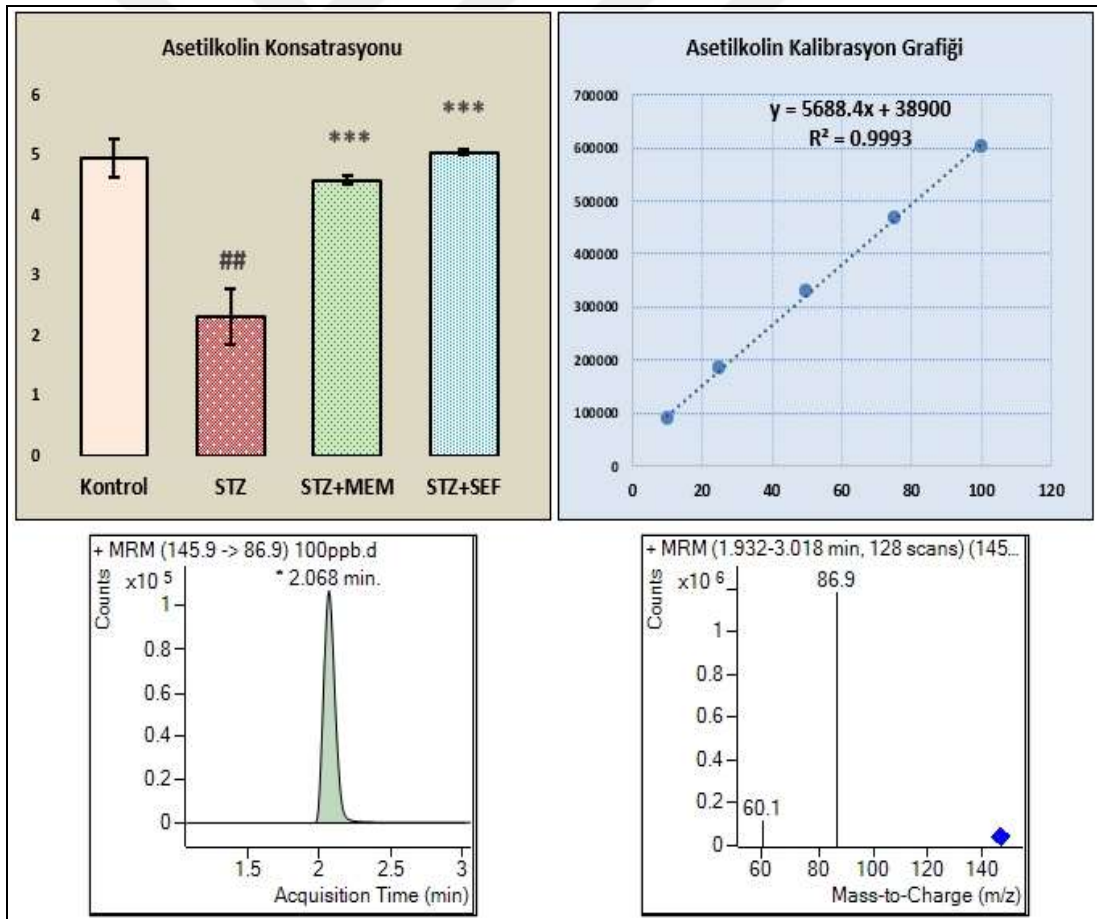


Şekil 4.22. LC-MS/MS Dopamin grafikleri.

Sol üstte konsantrasyon, sağ üstte kalibrasyon, sol altta kromatogram ve sağ altta kütle spektrumu grafikleri verilmiştir. # Kontrol grubuna, ***, STZ grubuna kıyasla $p<0.001$ anlamlılığı ifade etmektedir.

MRM tarama modunda yapılan analizlerde, Kontrol 7.42 ± 0.42 elde edilirken, STZ grubu 5.64 ± 0.11 değeri vererek dopaminin dokudaki miktarı açısından AH'li hayvanlara kıyasla arttığını göstermiştir. Kontrol grubu STZ grubuna kıyasla dopaminin dokulardaki miktarını artırma açısından yüksek anlamlılığa ($p < 0.001$) sahiptir. Tedavi gruplarının sonuçları da sırasıyla STZ+MEM 7.12 ± 0.24 ve STZ+SEF 7.22 ± 0.4 olarak bulunmuştur. Tedavi grupları incelendiğinde, doku dopamin miktarlarının çok arttığı ve STZ grubuna karşı yüksek anlamlılığa ($p < 0.001$) sahip oldukları görülmüştür.

ACh için MRM tarama modunda 145.9 Prekürsör iyonunun 86.9 m/e oranına sahip fragmentör iyonuna ait kromatogramı sonucunda analizler yapılmıştır. ACh'nin MRM modunda parçalanma ürünlerine ait bulgular Şekil 4.23'te gösterilmiştir.



Şekil 4.23. LC-MS/MS Asetilkolin grafikleri.

Sol üstte konsantrasyon, sağ üstte kalibrasyon, sol altta kromatogram ve sağ altta kütle spektrumu grafikleri verilmiştir. # Kontrol grubuna, ***, STZ grubuna kıyasla $p < 0.001$ anlamlılığı ifade etmektedir.

MRM tarama modunda yapılan analizlerde, Kontrol grubunda dokudaki ACh miktarı 4.95 ± 0.32 olarak elde edilirken, STZ grubunda bu oran 2.32 ± 0.47 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar STZ grubunun ACh'nin dokudaki miktarını sağlıklı hayvanlara kıyasla azalttığını göstermiştir. ACh'nin dokudaki miktarı açısından Kontrol grubu STZ grubuna kıyasla yüksek anlamlılığa ($p < 0.001$) sahiptir. Tedavi gruplarının dokudaki ACh miktarı sonuçları da sırasıyla STZ+MEM 4.59 ± 0.08 ve STZ+SEF 5.06 ± 0.04 bulunmuştur. STZ+SEF grubu tüm gruplar içinde en yüksek ACh miktarına sahipken ($p < 0.001$), STZ grubunun tüm gruplar içinde en düşük ACh miktarına sahip olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

4.7. Histopatolojik Boyama Bulguları

Sıçanların beyinlerinden alınan dört farklı noktadan yapılan boyamalarda tüm gruplardan alınan korteks, CA1, CA2 ve CA3 bölgeleri piknotik (çekirdeğin büzüşmesi) ve dejenerasyon odaklarına göre kıyaslanmıştır. Histopatolojik değerlendirmede gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar ($p < 0.05$) olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.1 ve Tablo 4.2).

Histopatolojik incelemede piknotik değişimler en fazla beynin korteks kısmında gözlemlendi. Bu değişimler STZ grubunda şiddetli iken, STZ+MEM grubunda orta, STZ+SEF grubunda ise hafif düzeydeydi. Hipokampüsteki piknotik değişimlerin STZ grubunda CA1 ve CA2 kısmında hafif düzeyde olduğu belirlendi. Diğer uygulama gruplarından STZ+MEM grubunda kortekste orta düzeyde, CA1 kısmında ise hafif düzeyde piknotik değişimler gözlemlendi. STZ+SEF grubunda ise piknotik değişimler sadece korteks kısmında ve hafif düzeydeydi. CA1, CA2 ve CA3 kısmında ise önemli düzeyde piknoza rastlanmadı. Piknotik nöronlardaki çekirdekler koyu ve büzüşmüş haldeydi.

Tespit edilen diğer bir diğer histopatolojik bulgu ise dejeneratif görünümdeki

nöronların bulunmasıydı. Bu şekildeki nöronların histopatolojik olarak sitoplazma ve çekirdek sınırları kaybolmaya başladığı ve daha fazla eozinofilik bir görünüm kazandığı belirlendi.

Dejeneratif nöronlara en fazla STZ grubunda rastlandı. Bu grupta korteks ve CA1 kısmında orta, CA2 kısmında hafif, CA3 kısmında ise şiddetli düzeyde dejeneratif nöronlara rastlandı. Diğer uygulama gruplarından olan STZ+MEM’de CA1 ve CA3 kısmında orta, CA2 ve korteks kısmında ise hafif düzeyde dejeneratif değişimler tespit edildi.

STZ+SEF grubu en hafif dejeneratif değişimlerin gözlemlendiği gruptu. Bu grupta hafif düzeyde dejeneratif değişimlere rastlandı. Kontrol grubu (A, B, C, D) normal histolojik görünümde, STZ grubu (E, F, G, H) kortekste şiddetli düzeyde piknotik ve orta düzeyde dejeneratif nöronlar, CA1’de hafif düzeyde piknotik ve orta düzeyde dejeneratif nöronlar, CA2’de hafif düzeyde piknotik ve dejeneratif nöronlar ve CA3’te şiddetli düzeyde dejeneratif nöronlar görülmüştür.

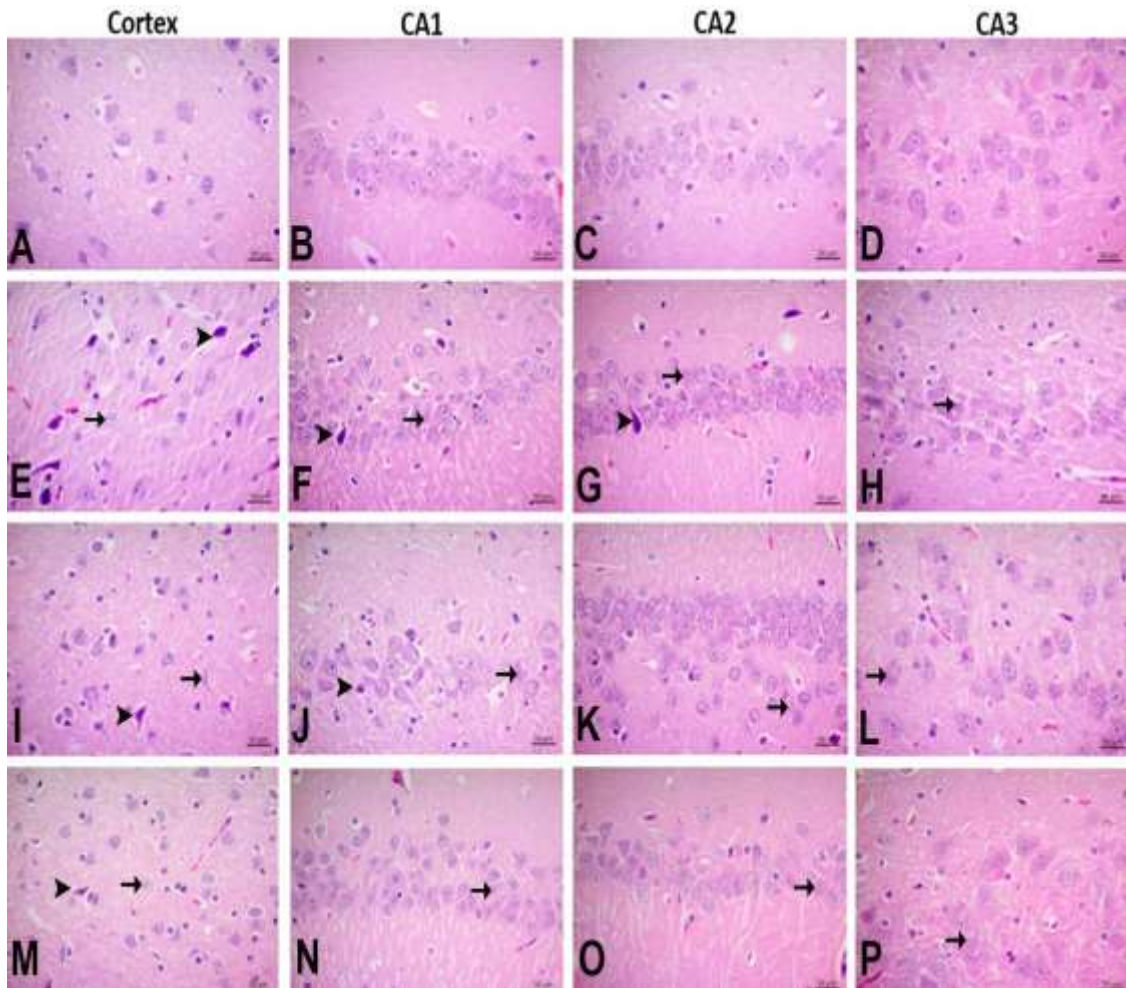
STZ+MEM grubunda (I, J, K, L) Korteks’te orta düzeyde piknotik ve hafif düzeyde dejeneratif nöronlar, CA1’de hafif düzeyde piknotik ve orta düzeyde dejeneratif nöronlar, CA2’de hafif düzeyde dejeneratif nöronlar, CA3’te orta düzeyde dejeneratif nöronlar, STZ+SEF grubu (M, N, O, P). Korteks’te hafif düzeyde piknotik ve dejeneratif nöronlar, CA1, CA2 ve CA3’te hafif düzeyde dejeneratif nöronlar, (► = piknotik nöron, → =dejeneratif nöron, Şekil 4.24).

Tablo 4.1. Nöronlarda görülen piknotik değişimler. ^{a,b,c,d} Aynı sütunda bulunan gruplar arasındaki farklılığı gösterir (p <0.05). ^{A,B,C} Aynı satırda bulunan gruplar arası farklılığı gösterir (p <0.05).

	Korteks	CA1	CA2	CA3
Kontrol	0.16 ± 0.40 ^{aA}	0.33 ± 0.51 ^{aA}	0.16 ± 0.40 ^{aA}	0.16 ± 0.40 ^{aA}
STZ	2.83 ± 0.40 ^{bA}	1.16 ± 0.40 ^{bB}	0.83 ± 0.40 ^{bB}	0.16 ± 0.40 ^{aC}
STZ+MEM	2.00 ± 0.40 ^{cA}	0.83 ± 0.40 ^{bB}	0.16 ± 0.40 ^{aC}	0.16 ± 0.40 ^{aC}
STZ+SEF	1.16 ± 0.40 ^{dA}	0.16 ± 0.40 ^{cB}	0.33 ± 0.51 ^{aB}	0.33 ± 0.51 ^{aB}

Tablo 4.2. Nöronlarda görülen dejeneratif değişimler. ^{a,b,c,d} Aynı sütunda bulunan gruplar arasındaki farklılığı gösterir (p <0.05). ^{A,B,C} Aynı satırda bulunan gruplar arası farklılığı gösterir (p <0.05).

	Korteks	CA1	CA2	CA3
Kontrol	0.16 ± 0.40 ^{aA}	0.33 ± 0.51 ^{aA}	0.16 ± 0.40 ^{aA}	0.16 ± 0.40 ^{aA}
STZ	2.16 ± 0.40 ^{bA}	2.16 ± 0.40 ^{bA}	1.16 ± 0.40 ^{bB}	2.83 ± 0.40 ^{bC}
STZ+MEM	1.16 ± 0.40 ^{cA}	2.00 ± 0.00 ^{bB}	0.83 ± 0.40 ^{bA}	1.83 ± 0.40 ^{cB}
STZ+SEF	1.00 ± 0.00 ^{cA}	1.16 ± 0.40 ^{cA}	1.00 ± 0.00 ^{bA}	1.00 ± 0.00 ^{dA}



Şekil 4.24. Hematoksilen-Eozin örnek boyamaları (H&E).

4.8. İmmunohistokimyasal Boyama Bulguları

Tau, β -Amiloid ve AChE yönünden yapılan immunohistokimyasal boyamalarda, tedavi ve kontrol gruplarının birbirine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05) farklara sahip olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.3 ve Tablo 4.5).

Tablo 4.3. Tau ile yapılan immunohistokimyasal boyama. ^{a,b,c,d} Aynı sütunda bulunan gruplar arasındaki farklılığı gösterir. ^{A,B,C} Aynı satırda bulunan gruplar arası farklılığı gösterir (p <0.05).

	Korteks	CA1	CA2	CA3
Kontrol	0.16 ± 0.40 ^{aA}	1.00 ± 0.00 ^{aB}	1.83 ± 0.40 ^{ac}	2.16 ± 0.40 ^{aC}
STZ	3.66 ± 0.51 ^{ba}	2.83 ± 0.40 ^{bB}	3.83 ± 0.40 ^{ba}	3.66 ± 0.51 ^{ba}
STZ+MEM	2.16 ± 0.40 ^{ca}	2.00 ± 0.00 ^{ca}	2.83 ± 0.40 ^{cB}	2.16 ± 0.40 ^{aA}
STZ+SEF	0.33 ± 0.51 ^{aA}	1.16 ± 0.40 ^{aB}	2.83 ± 0.40 ^{cC}	2.00 ± 0.00 ^{aD}

Tablo 4.4. β-Amiloid ile yapılan immunohistokimyasal boyama. ^{a,b,c,d} Aynı sütunda bulunan gruplar arasındaki farklılığı gösterir. ^{A,B,C} Aynı satırda bulunan gruplar arası farklılığı gösterir (p <0.05).

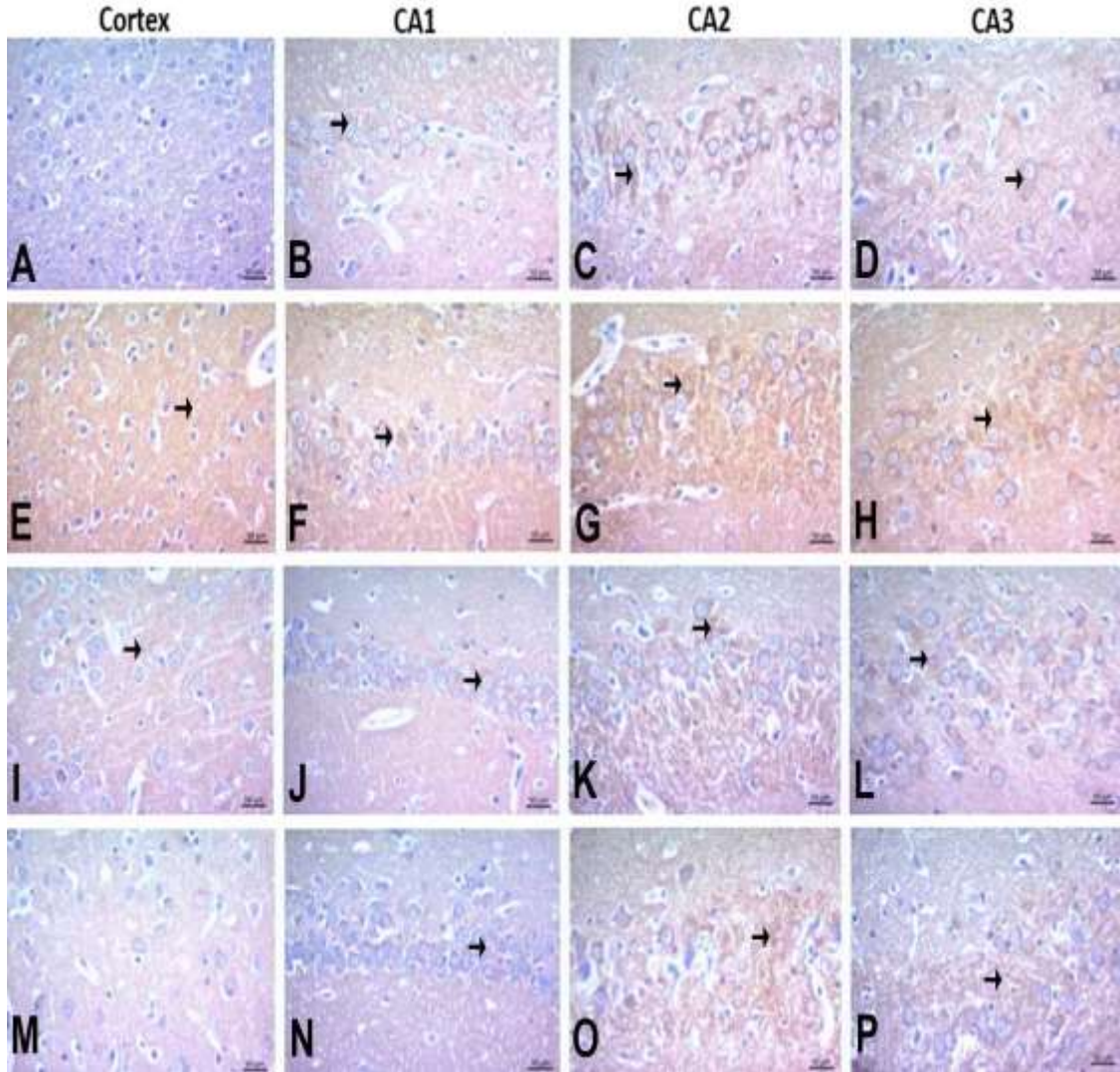
	Korteks	CA1	CA2	CA3
Kontrol	0.16 ± 0.40 ^{aA}	1.83 ± 0.40 ^{aB}	0.83 ± 0.40 ^{aC}	1.16 ± 0.40 ^{aC}
STZ	2.66 ± 0.51 ^{ba}	3.66 ± 0.51 ^{bB}	3.00 ± 0.00 ^{ba}	2.83 ± 0.40 ^{ba}
STZ+MEM	1.16 ± 0.40 ^{ca}	2.83 ± 0.40 ^{cB}	2.16 ± 0.40 ^{cC}	2.00 ± 0.00 ^{cC}
STZ+SEF	1.00 ± 0.00 ^{ca}	2.00 ± 0.00 ^{dB}	2.00 ± 0.00 ^{cB}	2.16 ± 0.40 ^{cB}

Tablo 4.5. AChE ile yapılan immunohistokimyasal boyama. ^{a,b,c,d} Aynı sütunda bulunan gruplar arasındaki farklılığı gösterir. ^{A,B,C} Aynı satırda bulunan gruplar arası farklılığı gösterir (p <0.05).

	Korteks	CA1	CA2	CA3
Kontrol	0.33 ± 0.51 ^{aA}	1.00 ± 0.00 ^{aB}	0.83 ± 0.40 ^{aB}	1.00 ± 0.00 ^{aB}
STZ	2.83 ± 0.40 ^{ba}	3.83 ± 0.40 ^{bB}	3.66 ± 0.51 ^{ba}	3.66 ± 0.51 ^{ba}
STZ+MEM	1.16 ± 0.40 ^{ca}	2.83 ± 0.40 ^{cB}	2.83 ± 0.40 ^{cB}	3.00 ± 0.00 ^{cB}
STZ+SEF	0.33 ± 0.51 ^{aA}	2.00 ± 0.00 ^{dB}	2.16 ± 0.40 ^{da}	1.00 ± 0.00 ^{da}

Tau ile yapılan immunohistokimyasal boyamalarda kontrol grubunun CA1 kısmında hafif, CA2 kısmında orta, CA3 kısımlarında şiddetli düzeyde immunopozitiflik tespit edilirken, korteks kısmında immunopozitifliklere önemli düzeyde rastlanmadı. STZ grubunda korteks, CA2 ve CA3 kısmında çok şiddetli düzeyde, CA1 kısmında ise şiddetli düzeyde immunopozitiflikler tespit edildi. STZ+MEM grubunda korteks, CA1 ve CA3 kısmında orta düzeyde, CA2 kısmında şiddetli düzeyde immunopozitifliğe rastlandı. STZ+SEF grubu ise genel olarak Tau immunopozitifliğinin en az olduğu uygulama

grubuydu. Bu grupta CA1 kısmında hafif, CA2 kısmında şiddetli, CA3 kısmında orta düzeyde immunopozitifliklere rastlandı. Korteks kısmında ise önemli düzeyde pozitifliğe rastlanmadı (Şekil 4.25).

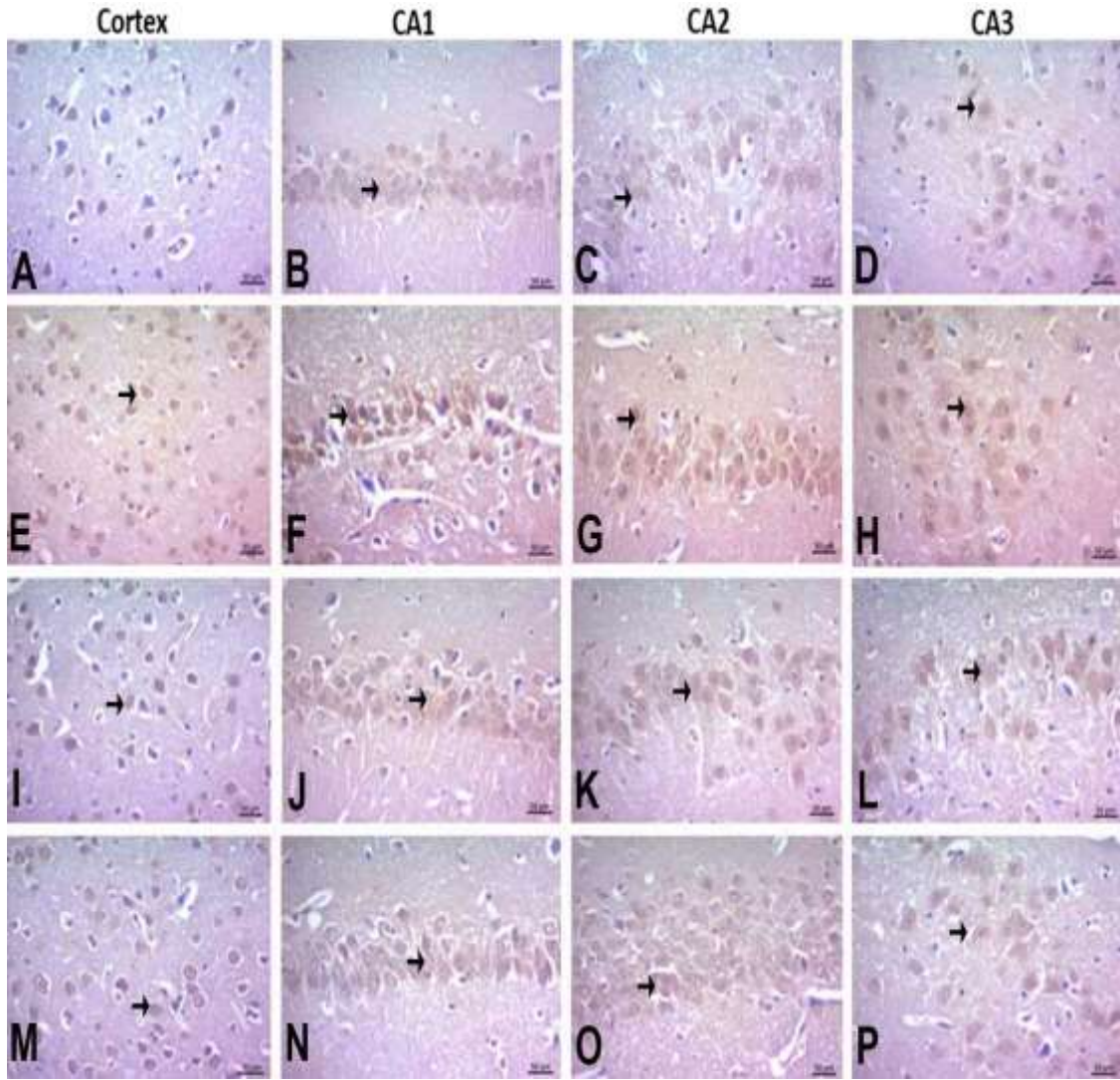


Şekil 4.25. İmmunohistokimyasal örnek boyamada Tau immunopozitifliği.

Kontrol grubu (A, B, C, D). Korteks, CA1, CA2 ve CA3 kısımlarında sırasıyla; yok, hafif, orta, şiddetli, STZ grubu (E, F, G, H). Korteks, CA1, CA2 ve CA3 kısımlarında sırasıyla; çok şiddetli, şiddetli, çok şiddetli, çok şiddetli, STZ+MEM grubu (I, J, K, L). Korteks, CA1, CA2 ve CA3 kısımlarında sırasıyla; orta, orta, şiddetli, orta, STZ+SEF grubu (M, N, O, P). Korteks, CA1, CA2 ve CA3 kısımlarında sırasıyla; yok, hafif, şiddetli, orta düzeyde immunopozitiflikler (→).

β -Amiloid immunopozitifliğine kontrol grubunun korteksinde hafif düzeyde, cornu ammonisin CA1 kısmında orta düzeyde, CA2 ve CA3 kısmında ise hafif düzeyde rastlandı. β -Amiloid immunopozitifliğinin en fazla olduğu grup STZ grubuydu. Bu grupta

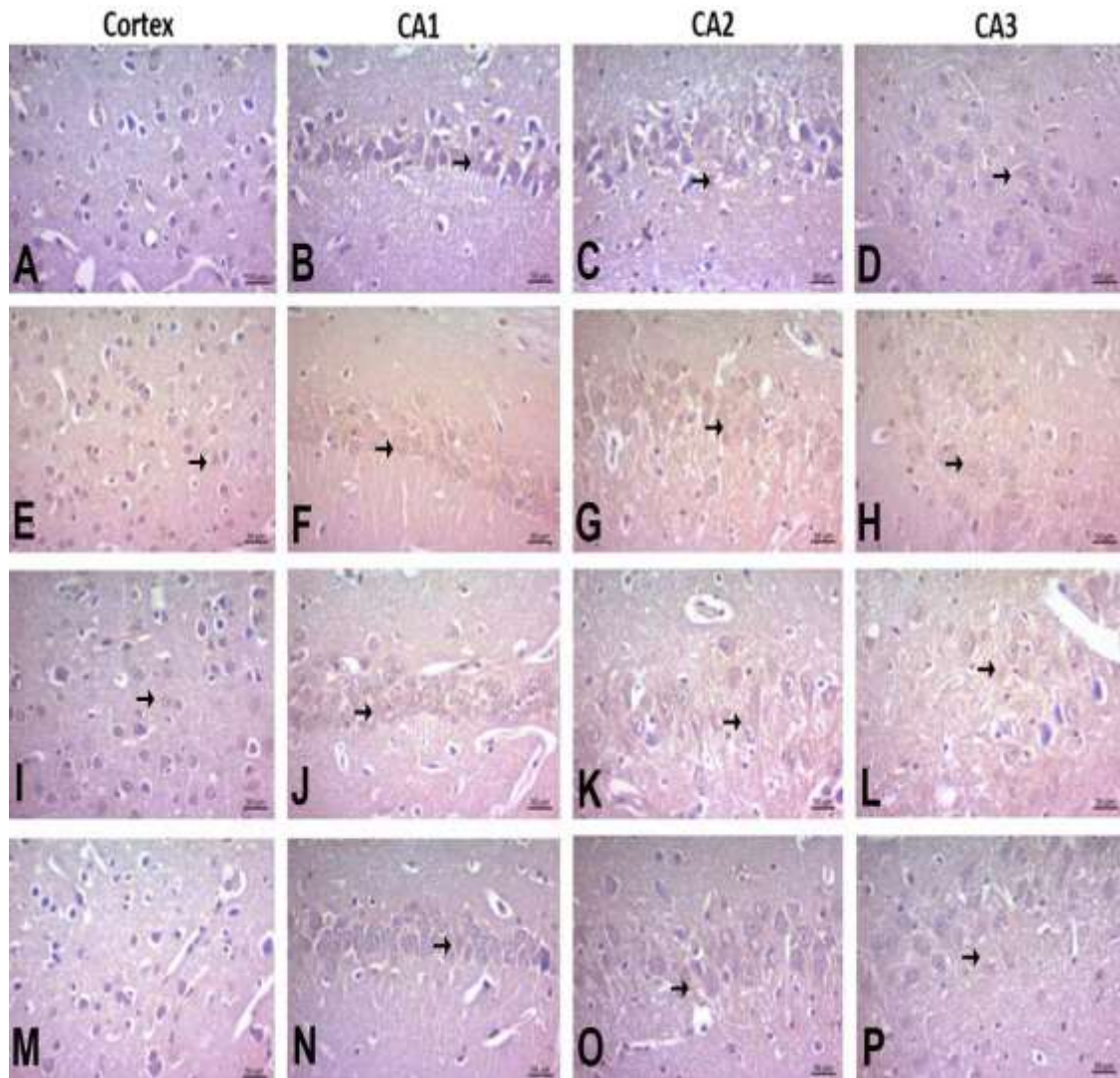
CA1’de çok şiddetli düzeyde, korteks, CA2 ve CA3’te şiddetli düzeyde olduğu belirlendi. STZ+MEM grubunda β -Amiloid daha hafif seviyede idi. CA1 kısmında şiddetli, CA2 ve CA3 kısmında orta seviyede, kortekste ise hafif seviyede immunopozitifliklerin bulunduğu tespit edilmiştir. β -Amiloid pozitifliğinin en az olduğu grup STZ+SEF grubuydu. Bu grupta cornu ammonisin tüm kısımlarında orta düzeyde, kortekste ise hafif düzeyde pozitifliklere rastlandı (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. İmmunohistokimyasal örnek boyamada β -Amiloid immunopozitifliği.

Kontrol grubu (A, B, C, D). Korteks, CA1, CA2 ve CA3 kısımlarında sırasıyla; yok, orta, hafif, hafif, STZ grubu (E, F, G, H). Korteks, CA1, CA2 ve CA3 kısımlarında sırasıyla; şiddetli, çok şiddetli, şiddetli, şiddetli, STZ+MEM grubu (I, J, K, L). Korteks, CA1, CA2 ve CA3 kısımlarında sırasıyla; hafif, şiddetli, orta, orta, STZ+SEF grubu (M, N, O, P). Korteks, CA1, CA2 ve CA3 kısımlarında sırasıyla; hafif, orta, orta, orta düzeyde immunopozitiflikler (→).

Kontrol grubunda AChE immunopozitifliğine korteks kısmı hariç cornu ammonisin tüm kısımlarında hafif düzeyde rastlandı. Uygulama gruplarından AChE immunopozitifliği en fazla STZ grubunda belirlendi ve bu grupta kortekste şiddetli, CA1, CA2 ile CA3'te çok şiddetli düzeydeydi. Diğer uygulama gruplarından STZ+MEM grubunda cornu commoniste şiddetli düzeyde, korteks'te hafif düzeydeydi. STZ+SEF grubunda ise kortekste immunopozitiflikler gözlenmezken, CA1 ve CA2'de orta düzeyde, CA3'te hafif düzeyde pozitiflikler gözlendi (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. İmmunohistokimyasal örnek boyamada AChE immunopozitifliği.

Kontrol grubu (A, B, C, D). Korteks, CA1, CA2 ve CA3 kısımlarında sırasıyla; yok, hafif, hafif, hafif, STZ grubu (E, F, G, H). Korteks, CA1, CA2 ve CA3 kısımlarında sırasıyla; şiddetli, çok şiddetli, çok şiddetli, çok şiddetli, STZ+MEM grubu (I, J, K, L). Korteks, CA1, CA2 ve CA3 kısımlarında sırasıyla; hafif, şiddetli, şiddetli, şiddetli, STZ+SEF grubu (M, N, O, P). Korteks, CA1, CA2 ve CA3 kısımlarında sırasıyla; yok, orta, hafif, hafif düzeyde immunopozitiflikler (→).

5. TARTIŞMA

Yaşlı nüfusu etkileyen, klinik olarak bilişsel fonksiyonlarda ve hafızada zayıflıklara neden olan AH, A β plak birikimi ve tau hiperfosforilasyonu ile karakterize önemli bir kamu yükü oluşturan ilerleyici ve klinik seyir gösteren nörodejeneratif bir hastalıktır. Dünya üzerinde doğurganlığın azalması ve insanların yaşam sürelerini artırmaya yönelik çabaları sonucu yaşlı nüfus gittikçe artmakta ve bu artışa bağlı olarak AH gibi demans olgularında da artış görülmektedir. 2050 yılına kadarki onar yıllık süreç için yapılan epidemiyolojik araştırmalarda, hastalığın prevalansının sürekli artacağı ve 2050 yılındaki hasta sayısının şu anki AH'li popülasyonun 2 katına ulaşacağı öngörülmektedir. AH, tedavisi pahalı bir hastalıktır ve kamu harcamalarına ekstra bir yük oluşturmaktadır. Bu giderlerin azaltılması için öncelikle hastalığın oluşumunu önleyecek yaklaşımların geliştirilmesine ve daha düşük maliyetli ilaçların üretilmesine ihtiyaç vardır. ²⁹⁷⁻²⁹⁹ Bir çalışmada, enfeksiyonların demanslı hastalarda deliryuma neden olabileceği tespit edilmiştir. Nörolojik hastalığa sahip hastalarda enfeksiyona bağlı nöronal kayıplarda, hafıza fonksiyonu kaybının hızlandığı görülmüştür. ³⁰⁰⁻³⁰²

STZ, *Streptomyces achromogenes* kültürlerinden elde edilen ve pankreasın insülin üretim merkezi olan beta hücreleri için toksik özellikte olan bir nitroz üre bileşiğidir. ³⁰³ AH modelini oluşturmak için sıçan lateral ventriküllerine ICV olarak uygulanmaktadır. ICV-STZ modeli A β plak birikimine neden olması, tau hiperfosforilasyonu takip eden NFY patolojisine sebep olması ve nöroinflamasyon oluşturmaları nedeniyle mevcut modeller içinde en iyi klinik ve patolojik modeldir. Ayrıca sıçan AH modelinde insanlardakine benzer şekilde beyinde oksijen ve glikoz tüketiminde azalma görülmüştür. ICV-STZ enjeksiyonu yapılan sıçanların, bozulmuş bir öğrenme ve hafıza performansı gösterdiği bildirilmiştir. ^{282, 304} ICV-STZ enjeksiyonu, ciddi nöron dejenerasyonuna ve sıçanlarda AH benzeri semptomlara neden olur. Tek taraflı veya iki taraflı STZ

enjeksiyonu, A β birikimi ve tau hiperfosforilasyonu gibi patofizyolojilerin ortaya çıkmasına sebep olur.³⁰⁵⁻³⁰⁷ ICV-STZ uygulaması ayrıca oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon ve insülin direnci nedeniyle tau patofizyolojisi ve nörodejenerasyon ile karakterize sporadik AH'ye neden olur.³⁰⁸⁻³¹⁰ Çalışmamızda dördüncü ventriküle yapılan bilateral STZ uygulaması sonucunda sıçanların bilişsel fonksiyonlarında azalma, kolinerjik yetersizlik, lokomotor davranışların bozulması ve glutamat geri alım sürelerinde aksamalar tespit edilmiştir. ICV-STZ infüzyonu sonrası ortaya çıkan bilişsel bozuklukların mekanizmaları kesin olarak tespit edilememiştir. Bu bozukluklara insülin reseptörlerinin disfonksiyonları ve oksidatif stres gibi faktörlerin sebep olduğu düşünülmektedir.^{311, 312}

Son on yılda yaşlı bireylerin dahil edildiği çalışmalardan elde edilen bulgular neticesinde AH için Tip 3 diyabet tanımı önerilmiştir. Bunun sebebi, Tip 1 ve Tip 2 diyabette bulunan insülin direncine benzer ortak molekül ve hücresel özelliklerin AH' de de bulunmasıdır.³¹³⁻³¹⁵ İnsülin, amiloid plakların oluşmasında rol oynamaktadır. Ayrıca NFY'lerin oluşmasında önemli rolleri bulunan tau proteininin hiperfosforile olmasına sebep olan glikojen sentaz kinaz 3 β 'nın (GSK-3 β) aktivasyonunda da görev almaktadır. Nöronlarda çok fazla sayıda insülin reseptörü vardır. Özellikle de hipokampus ve serebral korteks bölgelerinde fazlaca yoğunlaşmışlardır. STZ ile indüklenmiş AH deneylerinde STZ grupları diğer gruplara göre daha fazla kilo kaybettiği çalışmalarla gösterilmiştir.^{117, 229, 230}

DeneySEL AH modelinde en yaygın olarak kullanılan ICV-STZ dozu iki gün arayla enjekte edilen bilateral 1.5 mg/kg iki doza bölünmüş 3 mg/kg'lık uygulamasıdır.³¹⁶⁻³²⁴ Tek günde uygulanan farklı doz rejimleri de vardır. Bu dozlar 1 mg/kg,^{325, 326} 1.5 mg/kg,³²⁷⁻³²⁹ 2 mg/kg³³⁰ ve 3 mg/kg'dır.³³¹⁻³³⁶ Bu çalışmada tek gün iki doza bölünmüş 3 mg/kg bilateral ICV-STZ infüzyonunu temel alan deneySEL AH modeli tercih edilmiştir.

ICV-STZ sonrası bekleme süreleri arasında farklı süreler tercih edilmiştir. Literatürde yer alan çalışmaların önemli bir bölümü ICV-STZ uygulamasından sonra modelin oluşması için 30 gün beklenmiştir.^{321, 332, 335, 337, 338} 2-3 haftalık daha kısa sürelerde bekleyen çalışmaların yanı sıra^{316, 324, 327-329} 3 ay gibi çok daha uzun süre bekleyen çalışmalar da mevcuttur.^{34, 319, 320, 322, 326, 334, 339, 340} Tüm bunların dışında, modelin tüm detaylarını incelemek için 9 aylık bir model takip süresini izleyen çalışmalar da vardır.^{333, 339} Bu çalışmada model oluşturma süresi, davranış testlerinin uygulanabilirliği gibi faktörlerin yanı sıra, antibiyotik sınıfından olan sefiksim ilacına sıçanların bedenlerinin dayanabileceği optimal sürenin de hesaba katılması sonucu 30 günlük model tercih edilmiştir. Sefiksimin literatürde kullanılan dozları 15-200 mg/kg arasında geniş bir aralıkta denenmiştir. Denekleri ishal kaynaklı dehidrasyon gibi faktörlerden korumak amacıyla, düşük dozların kullanılması daha avantajlı olacaktır.

Davranış testleri, biyokimyasal bulgular ve elektrokimyasal verilerimizin literatürde yer alan verilerle uyumlu olması, deneysel AH modelinin başarıyla oluşturulduğunu göstermektedir.³⁴¹ Cerrahi operasyonun hayvanların lokomotor davranışlarını bozarak anksiyete oluşturabileceği endişesini ortadan kaldırmak için, cerrahi operasyondan sonraki 15 gün herhangi bir davranış testi uygulanmamıştır.

STZ'nin CA3 bölgesinde apoptozisi artırarak nöronlarda atrofiye neden olduğu gösterilmiştir.³⁴² *Wistar albino* sıçanlarıyla ICV-STZ infüzyonundan 21 gün sonra alınan yapılan bir açık alan testinde, STZ grubu sıçanların stereotipik hareketleri olan süslenme, şahlanma ve yer değiştirme hareketleri azalmıştır.³⁴³ Öte yandan birçok çalışma bu bulguların aksini gösteren sonuçlara ulaşmıştır. 14, 21, 22 günlük ve 10 haftalık farklı deneylerden alınan sonuçlarda sıçanların stereotipik, vertikal ve yer değiştirme hareketlerinde önemli bir farklılık bulunamamıştır.³⁴⁴⁻³⁴⁷ Bu çalışmalarda anksiyete ile ilgili yapılan incelemede, STZ model grubunun ölçüm alanının merkezinde çok az vakit

geçirdiği ve daha fazla dışkıladığı tespit edilmiştir. Açık alan testlerinden elde edilen verilerin, test alanının geometrik şekli, boyutu, ekipmanların konumu, sıçanın arenaya kendi isteğiyle mi zorla mı sokulduğu, test süresi ve arenanın renginden etkilenecek deneyler arası farklılığa sebep olabileceği bildirilmiştir.³⁴⁸⁻³⁵⁰ Kontrol grubundaki 7.42 ± 0.42 'lik değerine karşılık STZ grubu 5.64 ± 0.11 değeriyle, dokudaki dopamin seviyesinin düştüğünü göstermiştir. LC-MS/MS analizi ile STZ grubunda gösterdiğimiz dopamin miktarının düşüşü, bu çalışmadaki AH'li sıçanlarda tespit edilen lokomotor aktivitelerinin azalmasının sebebi olarak yorumlanmıştır. Yapılan çalışmalarda dopaminerjik yoksunluğun, sıçanların lokomotor aktivitelerinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir.³⁵¹⁻³⁵⁴ Bazı çalışmalara göre ise motor aktivitedeki değişimin sebebinin, kolinerjik sistemde meydana gelen bozukluklardan da kaynaklanabileceği bildirilmiştir.³⁵⁵⁻³⁵⁷ Sıçanların anksiyete seviyelerini ölçüp, cerrahi operasyonun oluşturduğu stresin AH üzerinde ki etkisini gösteren stereotipik hareket, dikey hareket, gezinme hareketi, kat edilen mesafe ve dinlenme gibi açık alan testiyle uyumlu parametrelerde sonuçlar elde edilmiştir. Önceki çalışmalarda lokomotor aktiviteleri ölçülen gruplarda bu çalışmadan farklı olarak herhangi bir parametrede anlamlı farklılık gösterilmemiştir.^{317, 318, 358}

Yaptığımız davranış testlerinde STZ grubu sıçanların lokomotor aktivitelerinin olumsuz etkilendiği, ICV-STZ uygulamasının toplam lokomotor aktiviteyi etkilediği tespit edilmiştir. Kontrol grubunun dinlenme süresi 331.64 ± 22.73 sn bulunurken STZ grubunda bu değer 459.43 ± 22.31 sn olarak bulunmuştur. Dinlenme süresiyle benzer şekilde gezinme, stereotipik ve kat edilen mesafe değerlerimizde de STZ grubu literatüre uygun olacak şekilde yüksek anlamlı değerler vermiştir. Gezinme (ambulator) hareket ölçümünde Kontrol 144.86 ± 7.17 sn, STZ 45.5 ± 5.51 sn bulunmuştur. Stereotipik harekette Kontrol 74.38 ± 6.23 sn, STZ 47.52 ± 2.51 sn olarak bulunmuştur. Son olarak kat

edilen mesafe incelendiğinde Kontrol grubu kafes içinde 1435.18 ± 68.65 cm yol kat ederken, STZ grubu 278.36 ± 74.34 cm yol kat etmiştir. Tüm bu değerler anksiyete açısından Kontrol ve tedavi gruplarının STZ'den daha iyi durumda olduğunu göstermektedir.

Sıçanların uzamsal belleklerini, uzun süreli hafıza ve öğrenmelerini test etmek amacıyla MSL testi uygulanmıştır. Yapılan çalışmalarda, ICV-STZ enjeksiyonundan sonraki 15-20 günlük sürede biliş, öğrenme ve hafıza üzerinde kalıcı hasarların meydana geldiği MSL testi ile gösterilmiştir.^{317-319, 323-325, 334, 338, 359-361} MSL testi, sıçanların mekâna bağlı ipuçlarını kullanarak, görsel-uzamsal hafıza ve uzun süreli bellek performanslarını değerlendirmeye yarayan bilişsel fonksiyon testidir. Dış uyarandan arındırılmış bir ortamda, sıçanların 90 saniye içinde havuz kenarlarına yerleştirilmiş farklı renklerdeki şekilleri tanıyarak suyun 5 cm altında gizlenmiş olan platformu bulması esasına dayanır. Sıçanın gizlenmiş platformu arama iç güdüsü ve bulduğu süre, kaçış gecikmesi olarak değerlendirilir ve süre kısaltıkça sıçanın hafızasının daha iyi durumda olduğu anlaşılmış olur. Ardışık günlerde tekrarlı şekilde uygulanan testte kaçış gecikmesi azalırsa, öğrenme fonksiyonunun bozulmadığı ve hafıza fonksiyonunun düzgün çalıştığı gösterilmiş olur.³⁶² Kaçış gecikmesinin azalması aynı zamanda tank içinde kat edilen mesafenin de azalması anlamına gelmektedir.

Sıçanların hedef kadranda geçirdikleri süre, uzamsal öğrenmelerinin test edilmesini sağlar. Farklı çalışmalarda bu çalışmaya uyumlu olacak şekilde uzamsal öğrenmelerinin değerlendirildiği deneylerde, AH'li gruplara kıyasla anlamlı farklılıklar ortaya konmuştur.^{317, 319, 324, 363-369} Daha önce yapılan çalışmalarda AH'li sıçanların kaçış süreleri önemli ölçüde uzamıştır. Kaçış süresinin değerlendirildiği önceki çalışmalarda, Tedavi ve sağlıklı gruplarda AH'li gruba kıyasla anlamlı farklılık olduğu gösterilmiştir.^{317, 319, 324, 358, 364-369}

Bu çalışmada STZ grubunun platformu bulma süresi gün geçtikçe önemli bir farklılık göstermezken, Kontrol ve tedavi gruplarında bulunan sıçanların platformu bulma süreleri ve havuz içinde kat ettikleri mesafe azalarak devam etmiştir. Buna karşın platformsuz yüzdürülen gün, sıçanların hedef kadranda geçirdikleri süre önemli oranda artmıştır. STZ+SEF grubunun platformu bulma süresi önemli oranda kısalarak STZ grubuna kıyasla yüksek anlamlılığa ($p<0.001$) sahiptir. AH'nin rutin tedavisinde kullanılan memantin grubunda (STZ+MEM) ise STZ+SEF grubuna benzer şekilde kaçış süresi gün geçtikçe azalmış, STZ grubuyla karşılaştırıldığında yüksek anlamlılığa sahip olduğu görülmüştür ($p<0.001$). Aynı yönden havuza bırakılan ve havuzda eşit süre vakit geçiren sıçanlar incelendiğinde, STZ grubu sıçanların kuzeybatı kadrana diğer kadranslardan daha fazla sayıda giriş yapmadığı, tüm kadranslarda geçirdiği sürenin birbirine yaklaşık olduğu ve platform bölgesini hatırlamadığı anlaşılmıştır. Kontrol grubu sıçanlarının son gün havuzdaki davranışları incelendiğinde, STZ grubundan farklı olarak hedef kadranda diğer kadranslara kıyasla daha uzun süre geçirdiği ve platformu aradığı tespit edilmiştir. Kontrol grubu hedef kadranda 42.8 ± 4.42 sn bulunurken STZ grubu bu kadranda 14.25 ± 2.88 sn süre geçirmiştir. Tedavi grupları da Kontrol grubuna benzer şekilde hedef kadranda STZ grubundan çok daha uzun süre geçirmiştir. Hedef kadrana giriş süresi de Kontrol ve tedavi gruplarında STZ grubundan daha fazla olmuştur. Bu veriler STZ grubunun aksine Kontrol grubunda bilişsel fonksiyonların kaybolmadığı, hafızanın yerinde olduğu ve öğrenmenin gerçekleştiği şeklinde yorumlanmıştır. Mementin ile tedavi edilen sıçanlar ile bu alanda ilk defa kullanılan Sefiksim ilacının sonuçlarının Kontrol grubuyla korelasyon gösterdiği, hafıza ve öğrenme fonksiyonlarının STZ grubuna kıyasla daha iyi durumda olduğu tespit edilmiştir.

Pasif sakınma deneyi sıçanların korku koşullanmasına dayanan uzun süreli hafızalarını ve öğrenmelerini test eden bir deneydir. Bilişsel bozulmaların ICV-STZ

enjeksiyonundan sonraki 2-3 haftada ortaya çıktığı bu test ile gösterilmiştir.^{316, 317, 327, 329, 334, 339, 370, 371} STZ grubu sıçanlar ilk gün alıştırma testinde ve öğrenmenin test edildiği ikinci günlerde karanlık bölmeye en kısa sürede geçerek modelin başarısını göstermekle beraber, bu gruptaki sıçanların hafıza ve bellek sorunları yaşadıklarını ortaya koymuştur. Diğer gruplarımızda karanlık bölmeye geçme sürelerinin çok uzun sürmesi ya da hiç olmaması, değerlerin yüksek anlamlılığa ($p<0.001$) sahip olduğunu göstermiştir.

Yapılan çalışmalarda ilk gün alıştırma ve ikinci gün öğrenme testlerinin kıyaslanması sonucu bu çalışmalarda da AH'li denekler karanlık bölmeye daha kısa sürede geçerek öğrenme ve hafızalarının kötü durumda olduğunu göstermiştir.^{279, 317, 319, 321, 322, 369} Bu çalışmada da literatüre uygun şekilde, Kontrol ve tedavi grupları 300 sn boyunca aydınlık alanda bekleyerek karanlık alana hiç geçmemişlerdir. STZ grubu ise 62.33 ± 15.0 sn'lik değeriyle bu gruplara kıyasla yüksek anlamlı bir fark ortaya koymuş, hafıza ve biliş sorunları yaşadığını göstermiştir.

Nöroinflamasyon, beyin hücreleri olan nöron, astrosit ve mikrogliaların hasarlanmaları sonucunda ortaya çıkan ve onları koruyan konjenital bir bağışıklık durumudur. Nöroinflamasyon gerçekleştiği zaman, mikroglia ve astrositler aktive olduktan sonra TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi inflamatuvar sitokinlerin salınmasına sebep olur. Böylelikle AH'li hastalarda sinaptik disfonksiyon ve nöronal ölüm gerçekleşir.³⁷² Diğer bir çalışma, nöroinflamasyon ile bilişsel fonksiyonların ters orantılı olduğunu, inflamasyon arttıkça mikroglia ve astrositlere bağlı olarak bilişsel performansın düştüğünü bildirmiştir.³⁷³

AH ile bilişsel fonksiyonlardaki bozukluğun öncelikle beynin korteks ve hipokampusünde meydana gelen lezyonlar ile ilgisi olduğu, uzun yıllardır yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.³⁷⁴ Kolinerjik nörotransmisyonun artırılması için, asetilkolini metabolize eden AChE enziminin beynin korteks ve hipokampus bölgelerinde

aktivitesinin inhibe edilmesi gerekmektedir. AChE aynı zamanda beyinde lokal kan akımını, çeşitli proteinlerin aktivitelerini, tau proteinin fosforilasyonunu ve A β kaskadını modüle ederek AH'nin ilerleme seviyesini etkileyebilir.³⁷⁵ Bunlardan dolayı, AH'nin semptomatik tedavisinde AChE inhibitörlerinin kullanımı en etkili olan tedavi yaklaşımıdır.³⁷⁶

Amiloid kaskad hipotezine göre A β 'nın hücre içi ve dışında birikmesi sonucu bilişsel fonksiyonlarda tükenme, sinaptik ve nöronal hasarların ilerlemesi gibi olayların tetiklendiği savunulur.⁹⁵ Tau proteini, olgun nöronlarda bulunan ve iskelet vazifesi gören mikrotübüllerin düzgün çalışmasını sağlar.³⁷⁷ AH'de tau proteinleri normalden daha fazla hiperfosforile olduğu için mikrotübüllere bağlanma yeteneklerini kaybederler ve daha sonra polimerize olarak NFY'leri oluştururlar.³⁷⁸ Tau proteini ve A β seviyesi STZ grubunda diğer gruplara kıyasla 3 kat artmıştır. Bu çalışmada AH'ye sebep proteinlerin seviyesi Kontrol ve tedavi gruplarında düşük seviyede çıkarak STZ grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık oluşturduğu görülmüştür ($p < 0.05$).

Subdiyabetojenik dozlarda ICV-STZ infüzyonunun, hipokampus ve serebral kortekste A β 'nın nörotoksisite meydana getirdiğini bildirilmiştir.³⁷⁹ ICV-STZ uygulamasından sonra AH benzeri tau patolojisinin oluşması, önceki çalışmalarda geniş çapta gösterilmiştir.^{325, 380-385} Yapılan çalışmalarda ICV-STZ uygulanmış *Sprague dawley* sıçanlarda, hiperfosforile tau seviyesinde bir aydan daha kısa sürede artış olduğu tespit edilmiştir.^{383, 386, 387} Aynı bulgu *Wistar albino* sıçanlarında da gösterilmiştir.^{343, 388} Önceki çalışmalardan farklı olarak, bir çalışmada hipokampal hiperfosforile tau miktarı aynı yaştaki kontrol sıçanlarında ikinci haftada azalırken, üç ve altıncı aylarda önemli bir seviyede artış tespit edilmiştir.³³³

Elde ettiğimiz histopatolojik verilere göre, STZ grubunun hipokampus (CA1-3) ve serebral korteks dokularında A β , AChE ve hiperfosforile tau proteini miktarı diğer

gruplara kıyasla 3 kat artmıştır. 28 günlük tedavi sonrasında STZ+SEF ve STZ+MEM gruplarında da AH patolojisine yol açan protein miktarları açısından STZ grubuna kıyasla anlamlı ($p<0.05$) bir farklılık vardır. Kontrol grubu da tedavi gruplarıyla benzer şekilde STZ grubuna kıyasla $p<0.05$ anlamlılığa sahiptir.

Çalışmalarda HE boyamada beyin kesitlerinde belirgin yapısal bozulmaların ve hipokampus ile kortekste, davranış ve bilişsel fonksiyonlardaki bozulmayı açıklayabilecek önemli sayıda nöronal kayıpların olduğu bildirilmiştir.^{63, 389} Yapılan çalışmalarda, kortikal ve hipokampal hasarlar, uzaysal ve nesne tanıma belleğindeki bozulmalarla ilişkilendirilmiştir.³⁶⁷ Bu çalışmanın histopatolojik incelemesinde, STZ grubunun beyin kesitlerinde korteks, CA1-3 bölgeleri HE boyama ile incelenmiş olup, hücre yapısında belirgin bozulmaların olduğu gözlenmiştir. Thioflavine-S ve Congo kırmızısı ile beyin dokuları boyanan sıçanlarda, A β birikiminin AH'li sıçanlarda daha fazla olduğu yapılan çalışmayla gösterilmiştir.^{320, 326} İmmünofloresan boyama ile yapılan bir deneysel AH modelinde, fosforile tau miktarının AH'li gruplarda diğer gruplara kıyasla yüksek oranda arttığı bildirilmiştir.³⁹⁰ Yapılan histopatolojik çalışmalarda AH'li deneklerin hipokampus ve korteksinde bu çalışmaya benzer şekilde A β birikiminde ve AChE aktivitesinde artma tespit edilmiştir.^{358, 365, 366, 391, 392} Nörodejeneratif yönden incelenen CA1-3 ve dorsal gangliyonda AH'li sıçanlarda yüksek dejenerasyon görülmüştür.³²³ CA1-3 bölgelerinde yaptığımız H&E boyamada benzer bulgulara ulaşılmıştır. Bu çalışmada yaptığımız immunohistokimyasal boyamada beyin korteks ve CA1-3 bölgeleri tau, A β ve AChE yönünden incelenmek amacıyla ilgili antikorlarla boyanarak farklılıklar ortaya konmuştur. AH'li grubumuz her üç parametrede ve beynin farklı bölgelerinde yapılan boyamalarda, AH'nin derinliğini artıran ve hafıza ve bilişsel sorunlara neden olan bu parametrelerde en yüksek değerde çıkararak tedavi ve kontrol gruplarına karşı anlamlı farklılıklar ($p<0.05$) oluşturmuştur.

Günümüzde kullanılan tedavi seçenekleri, AH'nin klinik semptomlarını yavaşlatabilmekte fakat hastalığın patolojisinde yeterli bir iyileşme sağlayamamaktadır. Bu durum yeni terapötik ajanların ya da mevcut ilaçların endikasyonlarının araştırılmasını hızlandırmıştır. AH'nin kliniğini artıran, nöronal ölümlere sebep olan A β ve tau hiperfosforilasyonu gibi durumlar için geliştirilen ilaçların klinik denemeleri başarısız olmuştur. β -laktam antibiyotikler, AH tedavisi için yeniden tasarlanmış ilaçlardır. Özellikle üçüncü sınıf sefalosporinler olmak üzere β -laktam antibiyotiklerin AH patolojik yolakları üzerinde belirgin etkileri olduğu gösterilmiştir. Sinaptik aralıkta glutamat birikimi, eksitotoksositeye sebep olmaktadır. Bu nedenle presinaptik nörondan glutamat salınımını takiben hızlıca ortamda uzaklaştırılması gereklidir. β -laktam antibiyotikler, EAAT-2 aktivasyonu yaparak glutamat geri alınımını hızlandırmaktadır.^{18, 25, 178} Öte yandan, penisilinin hipokampüse tek bir enjeksiyonundan sonra biliş üzerinde nörotoksik bir etki ürettiği, sıçanlarda iki yönlü aktif kaçınma davranışı ortaya çıkardığı gösterilmiştir.^{16, 393, 394} Hipokampüste penisilin tarafından indüklenen epileptojenik odakları olan hayvanlar da algılama/idrak üzerinde olumsuz etkiler göstermiştir.³⁹⁵ Penisilin sınıfının diğer yarı sentetik türevleri (klokasilin, tikarsilin, penisilin-G) incelenmiş, bunların bilişi zayıflattığı ve çeşitli deneysel modellerde nörotoksosite ürettiği gösterilmiştir.¹⁶ Penisilinlerin AH mekanizması üzerindeki olumsuz etkileri kesin olarak açıklanmamasına rağmen, yukarıdaki çalışmalar bilişsel fonksiyonlarda penisilinlerin kötü sonuçlarını göstermiştir. Penisilinlerin anti-mikrobiyal etkileri için hala altın standart olmasına rağmen, düşük kanıtlanmış nöroprotektif etkileri ve artan toksisiteleri, beta laktam grubunda bulunan diğer bir antibiyotik sınıfı olan sefalosporinleri artık AH denemelerinde tercih edilen ilaç seçimi haline getirmektedir.¹⁷ Nörodejeneratif hastalıklar için günümüzde net ve güçlü bir tedavi bulunamamıştır. Seftriakson gibi β -laktam antibiyotiklerle yapılan çalışmalarda sefiksimin AH için bir ilaç seçeneği olabileceği

öngörülmekte fakat daha ileri moleküler ve klinik araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

LC-MS/MS, davranış testleri, voltametrik ölçümler ve genetik analizi ile AH'li hastalarda sefiksimin beyin nörotransmitterleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. ACh, öğrenme ve hafıza süreçlerinde kolinerjik sistemde kilit bir öneme sahiptir.³⁹⁶ MSS'de ana eksitator nörokimyasal olan glutamat seviyesinin artışı, eksitotoksik nöronal hasarlara ve bilişsel işlevde kayıplara neden olur.^{397, 398} Bu çalışmada ICV-STZ kaynaklı bilişsel bozukluğun bir belirteci olarak, glutamat seviyesinde artış ve ACh seviyelerinde bir düşüş tespit edilmiştir. Glutamik asit seviyesi bu çalışmada Kontrol grubunda 121.82 ± 0.97 elde edilirken, STZ grubu 130.05 ± 0.06 sonucu vermiştir. ACh miktarı 4.95 ± 0.32 olarak elde edilirken, STZ grubunda bu oran 2.32 ± 0.47 olarak tespit edilmiştir. Her iki durum STZ grubundaki biliş problemiminin olası bir nedeni şeklinde yorumlanmıştır.

Kontrol grubunun dokudaki dopamin seviyesi 7.42 ± 0.42 olarak tespit edilirken, STZ grubu 5.64 ± 0.11 değeri vermiştir. Bu durum, STZ grubunun lokomotor aktivitelerinde meydana gelen düşüşün sebebinin, dopamin seviyesindeki düşüşe bağlı olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Sefiksim ilacımız ICV-STZ ile indüklenen deneysel AH modelimizde hafıza ve bilişten sorumlu nörotransmitterlerin seviyelerini Kontrol grubuna benzer seviyelere taşıyarak, ümit verici sonuçlar elde edilmesini sağlamıştır. Ellman metoduyla yapılan bir analizde AH'li gruplarda AChE seviyesinin önemli derecede yükseldiği, kontrol ve tedavi gruplarına karşı yüksek anlamlılığa ($p < 0.05$) sahip olduğunu bildirmişlerdir.³¹⁸ Aynı yöntemle yapılan başka çalışmalarda da benzer sonuçlar bulunmuş, AChE seviyesi AH'li deneklerde diğer tüm gruplara kıyasla çok yüksek anlamlılığa sahip olduğu görülmüştür.^{324, 369} Diğer bir çalışmada benzer bir sonuç elde edilerek ACh sentezinde görev alan kolin asetil transferaz seviyesinin STZ grubunda düştüğü gösterilmiştir.³²⁷ Bir çalışmada Western blot yöntemiyle tayini yapılan tau proteini analizinde AH'li grupta tau proteini seviyesi kontrol grubuna göre yüksek oranda

artarak anlamlı farklılık oluşturmıştır.³²⁵ Aβ1-42 ile indüklenmiş AH modelinde yapılan çalışmada korteks ve hipokampus kaynaklı ACh, dopamin ve bunların metabolitlerinin miktarı da azalmıştır. Bu bölgelerde ölçülen norepinefrin ve metabolitleri incelendiği zaman ise, yalnızca hipokampüste analit sayısının azaldığı görülmüştür.^{358, 365}

Aβ ve fosforile tau patolojisi ICV-STZ enjeksiyonunda 14 gün sonra gözlenmektedir. Western blot ve immun boyama yöntemleri bu analitleri 14 günde gösterebilmektedir. 45 gün sonra bu analitlerin daha da artışı ELISA, western blot ve immunohistokimyasal boyamalarla gösterilebilmektedir.^{34, 319, 322, 325, 326, 330, 332-335, 337-339, 399-403} Kongo kırmızısı ya da immün boyama ile amiloid plaklar ilk olarak 3 ay sonra görüntülenebilirken, altıncı ve dokuzuncu aylarda bu boyamalarla miktarları daha da belirgin hale gelmektedir.^{320, 326, 339, 345} Biz LC-MS/MS yöntemi ve immunohistokimyasal antikor boyama yöntemlerini tercih ederek daha kısa sürede analitleri ve dejenerasyonları göstermeyi hedefledik.

Voltametri tekniğinde, beyne yerleştirilen elektrotlar vasıtasıyla elektrodun kaplı olduğu enzim sayesinde herhangi bir nörotransmitter saniyelik değişimlerle ölçülebilmektedir. Çalışma elektrodu redoks akımını oluşturur, referans elektrodu bu akımı geçirirken öte yandan voltaj farkını engellemek amacıyla sabit bir potansiyeli korur. Voltametri ölçümü sırasında, çalışma elektrodunun kaplı olduğu enzim vasıtasıyla ilgili nörotransmitter oksitlenir ve elektronlarını elektrot yüzeyine bırakır, böylece bir akım meydana gelir. Bu akımlar ölçülerek nörotransmitterin geri emilim süresi hakkında veriler elde edilir.⁴⁰⁴ Dopamin, norepinefrin, serotonin, ACh ve glutamat gibi nörotransmitterlerin sinyalleşme dinamikleri araştırmacılar tarafından mikroelettrot ölçümleriyle belirlenmiştir. Voltametri tekniği, mikrodializ yöntemine kıyasla nörotransmitterlerin dinamik özelliklerinin çok daha hızlı ölçülmesine olanak sağlar. Ancak glutamat gibi analitler için mikrodializin önemli bir avantajı vardır. Elektrotlarla

nörotransmitterlerin tespiti için 25-30 nM miktarındaki saptama limitine kıyasla mikrodializ yönteminde bu oran pikomolar seviyesindedir. Yine de mikroelettrotların nörotransmitterlerde meydana gelme ihtimali olan nörokimyasal değışikliklerin üstesinden gelerek anlık ölçüm alabilmesi nedeniyle mikrodializ yönteminin kısıtlamalarını aşabildiğı gösterilmiştir.^{405, 406} Mikrodializ, elektrokimya, spektroskopi, pozitron emisyon tomografisi (PET) ve nükleer manyetik rezonans (NMR) yöntemlerinin uzaysal ve zamansal çözünürlükleri nispeten zayıftır. Nörotransmitter analizi yapmak için kullanılan yöntemler içinde, voltametri tekniğı diğer yöntemlere kıyasla yüksek uzaysal ve zamansal çözünürlüğe sahiptir.^{258, 407, 408} PET ve NMR hem analiz maliyeti yüksektir hem de büyük ölçekli ekipmana ihtiyaç duymaktadırlar. Ayrıca gerçek zamanlı sürekli ölçüm almak bu yöntemlerde zordur. NMR invaziv olmayan bir yöntemdir ve nörotransmitterlerin yaklaşık miktarı ve konumunu bildirmek için kullanılır. NMR tarafından raporu yapılan analitlerin konsantrasyonu çoğunlukla milimolar seviyesindedir. Bu sebeple, hastalık modellerinde nanomolar ya da mikromolar seviyesindeki nörotransmitterlerin dinamik analizinde kullanılamamaktadır.⁴⁰⁹ Beynin karmaşık yapısı, uzaysal/zamansal çözünürlük ve biyouyumluluk gibi engellerden dolayı MSS'deki nörokimyasalların gerçek zamanlı ve kendi konumlarında izlenmesi çok büyük zorluktur. Ayrıca serbest hareketli hayvanda yapılacak uzun süreli *in vivo* analizlerde, sensörlerin pasifleşmesine sebep olabilecek biyolojik kontaminasyon gibi güçlükler de karşımıza çıkabilmektedir. Nörotransmitter ölçümleri fizyolojik veya patolojik süreçler devam ederken yapılmak zorundadır. Bu sebeple sensör performansını artırmak için, uygun algılama yöntemleri tercih edilerek teknolojik iyileştirmeler yapılmalıdır.

Her bir nörotransmitter algılama teknolojisinin avantaj ve dezavantajları vardır. Elektrokimyasal ölçümler hem özelleştirilebilir olmaları hem de kullanılan cihaz ve sarf malzemelerin uygun maliyetli olması nedeniyle oldukça popüler bir kullanıma sahiptir.

Bu yöntemde nörotransmitterler yüksek zamansal çözünürlük ve düşük tespit limitine sahiptirler. Fakat bu yöntemin en önemli kısıtlaması, elektrotların zamanla performans kaybına uğraması ve ölçümü yapılan analitin ekstraselüler sıvı içinde dağılması sonucu sadece sıvı içindeki ortalama konsantrasyonunun ölçülebilmesidir. Bu durum hücresel düzeyde nörokimyasal ölçümünü zorlaştırmaktadır. Ayrıca invaziv yöntemlerde her ne kadar minimal elektrotlar uygulansa da doku hasarı oluşabilmektedir.^{35, 410-412} Optik yöntemlerin zamansal çözünürlükleri elektrokimyasal yöntemlere benzemekle beraber, uzaysal çözünürlükleri son derece yüksek olmaktadır. Bu yöntem, belirli hücre grubunun tespitinde uygun sonuçlar vermektedir. Floresan görüntülemeye ise penetrasyon derinliği için floroforun emisyon dalga boyu çok önemlidir ve ihtiyaç duyulan mühendislik biyobelirteçlerinin kimyasal özgüllüğünün olmaması önemli bir sorun oluşturabilmektedir. Derin beyin bölgelerinde bulunan belirli maddeleri tespit edebilmek amacıyla fiber optik görüntüleme veya yakın kızılötesi spektroskopi iyi sonuç vermektedir. Öte yandan, HPLC gibi kalitatif analiz yapabilen çok çeşitli yöntemleri de birleştirerek çalışabildiği için, mikrodializ yöntemi çok esnek bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Birden fazla analitin tespiti çalışmalarında özellikle çok avantajlıdır. Fakat yüksek doku hasarı oluşturmamasının yanı sıra in-situ analizini *in vivo* gerçekleştiremediği için, zayıf zamansal çözünürlüğe sahiptir. Son olarak PET ve NMR yöntemleri invaziv olmamalarına rağmen, zayıf uzaysal çözünürlüğe sahiptir ve pahalı ekipmana ihtiyaç duymaktadırlar. Voltametri tekniği 1/6 saniyede işlem çözünürlüğüne sahipken, mikrodializ ancak uzun zamanlı ölçeklerde çoklu analit tayini yapılabilir.^{35, 412-414} Daha önce yapılan canlı hayvanda nörotransmitter ölçümü analizlerinin birkaç floresan çevrimiçi algılama yöntemi dışındaki birçoğu optik algılama yöntemi kullanılarak yapılmıştır.⁴¹⁵⁻⁴¹⁸ Serbest hareket edebilen AH'li sıçanlarda voltametri tekniğiyle anlık olarak glutamat tayini ilk kez bu çalışmada uygulanmıştır. Bu çalışmada olduğu gibi

enzim bazlı elektrokimyasal biyosensör kullanımı yaygın olarak kullanılmaktadır. Glutamat oksidaz enzimi, glutamat ölçmek amacıyla biyosensörlere kaplanmıştır ve çeşitli çalışmalarda ayrıntılı olarak incelenmiştir.⁴¹⁹⁻⁴²³ Glutamat ölçümü için enzimsiz veya karbon, nikel, platin gibi farklı materyallerden üretilmiş elektrotları kullanan çalışmalar da olmuştur.^{412, 421, 422, 424} Govindrajan ve ark (2013) glutamat tespiti yapabilmek için, glutamat oksidaz enzimine daldırılmış 125 µm çapındaki platin mikrodisk bazlı amperometrik biyosensör imal etmişlerdir. Seçiciliği artırmak için, askorbatı engelleyen fosfatidiletanolamin tabakası ile kaplanmış ve bu şekilde o-fenilendiamin polimer matrisinde bekletilmiştir.⁴²⁵ Salazar ve ark (2016) grubu ise Prusya mavisi modifiye karbon fiber elektrot kullanarak glutamat ölçümü yapmıştır. Hazırlanan elektrot o-fenilendiamin/sığır serum albümini içinde elektropolimerize edildikten sonra modifiye karbon fiber elektrot yüzeyi glutamat oksidaz ile immobilize edilmiştir.⁴²⁶ Özel ve ark (2014) grubu da glutamat oksidaz bazlı platin elektrotlarda glutamat tespit etmişlerdir. Elektrot diğer gruplarda olduğu gibi sığır serum albümini içinde o-fenilendiamin ile elektro kaplandıktan sonra ince, sızdırmaz ve seçici geçirgen bir film tabakası elde edilmiştir. Oksijenli ve oksijensiz ortamlarda glutamat algılaması ölçülen elektrodun, oksijenli ortamdaki tespit süresi 2 sn çıkarken oksijensiz ortamda bu oran 5 sn'ye yükselmiştir.⁴²⁷ Enzim bazlı biyosensörler dönüştürücü tipine göre 4'e ayrılırlar. Bunlar elektrokimyasal, optik, termal/kalorimetrik ve piezoelektrik sensörlerdir. Elektrokimyasal biyosensörlerde en sık kullanılan dönüştürücü türleri ise amperometri, potansiyometri, kondüktometri ve impedimetridir. Bu çalışmada kullandığımız elektrokimyasal biyosensörlerin çalışma mekanizmaları, dönüştürücü ve analitlerin elektrokimyasal özelliklerine dayanan ve en yaygın olarak kullanılan biyosensörlerden biridir.^{423, 428, 429} Anestezi derinliği, deney hayvanının vücut sıcaklığı gibi faktörlerden de etkilenen nörotransmitter ölçümü, deneyler arasında ortam farklılığına göre farklı sonuçlar

verebilmektedir. 1984 yılında yayımlanan bir raporda, glutamat seviyesinin tespit aralığı 2-40 μM olarak bildirilmiştir.⁴³⁰ Anestezi seviyesi ne kadar derin olursa, sensörlerin akım çıkışı o kadar düşük olur.⁴²² Bu sebeple anestezi altında yapılan hareketsiz hayvan ölçümlerinde farklı sonuçlar alınmıştır. Bu yöntemle yapılan ölçümlerde, Oldenziel ve ark. (2006) striatumda glutamat miktarını $18.2 \pm 9.3 \mu\text{M}$, Kulagina ve ark. (1999) aynı bölgede glutamat seviyesini $29 \pm 9.0 \mu\text{M}$, Rahman ve ark. (2005) ise bu bölgede $2.0 \pm 0.5 \mu\text{M}$ olarak tespit etmiştir.^{37, 38, 431} Serbest hareket edebilen AH'li sıçanlarda voltametri tekniğiyle anlık olarak glutamat tayini bu çalışmada ilk kez uygulanmıştır. Anestezi altında yapılan bir AH çalışmasında, glutamat t80 süresi AH'li grupta 7.69 ± 0.68 sn, Kontrol grubunda ise 2.95 ± 0.40 olarak tespit edilmiştir. Serbest hareket edebilen sıçanlarda yapılan bu çalışmada ise, AH'li grupta glutamat t80 süresi 8.23 ± 0.95 sn bulunurken, Kontrol grubunda bu değer 3.12 ± 0.51 sn'ye kadar düşerek, STZ grubundaki biliş ve hafıza sorunlarının eksitotoksisite kaynaklı olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. STZ grubuyla kıyaslanınca Kontrol ve tedavi gruplarının t80 süreleri yüksek anlamlılığa ($p < 0.001$) sahiptir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

AH yaşa bağlı demansların en sık sebebidir. Bu hastalık progresif, dejeneratif yaygın bir santral sinir sistemi hastalığıdır. Tedavisi için çeşitli ajanlar bilinmesine rağmen daha güçlü veya kesin bir tedavi henüz bulunamamıştır. Üçüncü kuşak sefalosporin olan sefiksimin antimikrobiyal etkinliği bilinmekte ve kullanılmaktadır fakat bu ilacın AH'nin davranışsal, biyokimyasal, elektrokimyasal ve nöroprotektif etkileri üzerine herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Çalışmamızda AH'nin davranışsal ve elektrokimyasal negatif etkilerinin sefiksim ile yavaşlatıldığını gösterdik. İlk defa serbest hareket eden AH'li sıçanlarda glutamatın anlık geri alımını ölçerek sefiksimin olumlu etkilerini tespit ettik.

Bu çalışmada ICV-STZ ile uzamsal öğrenmeleri bozulan sıçanların, sefiksim uygulaması ile beraber öğrenme davranışlarında istatistiksel olarak anlamlı bir düzelme görülmüştür. Sefiksim ayrıca, beynin korteks ve CA1-3 bölgelerindeki apoptotik nöronal kaybını önemli derecede azaltmıştır. Sonuç olarak sefiksim, hipokampus nöron kaybına karşı nöroprotektif etki göstermiş ve buna paralel olarak sıçanların uzamsal öğrenme davranışını korumuştur. Bu çalışma, sefiksimin AH'de kullanılması amacıyla, gelecek çalışmalarda moleküler, biyokimyasal, elektrokimyasal ve klinik çalışmalar için önemli bir kaynak olacaktır.

KAYNAKLAR

1. İşbilen N, Küçükkilinç TT. Folat Metabolizmasının Nörodejeneratif Hastalıklardaki Rolü. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2020, 45: 243-252.
2. Abramov AY. Redox biology in neurodegenerative disorders. *Free Radic Biol Med*, 2022, 188: 24-25.
3. Erekat NS. Apoptosis and its therapeutic implications in neurodegenerative diseases. *Clin Anat*, 2022, 35: 65-78.
4. Sahoo AK, Dandapat J, Dash UC, Kanhar S. Features and outcomes of drugs for combination therapy as multi-targets strategy to combat Alzheimer's disease. *Journal of Ethnopharmacology*, 2018, 215: 42-73.
5. Limbad C, Oron TR, Alimirah F, Davalos AR, Tracy TE, Gan L, Desprez PY, Campisi J. Astrocyte senescence promotes glutamate toxicity in cortical neurons. *PloS one*, 2020, 15: e0227887.
6. Association As. 2021 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*, 2021, 17: 327-406.
7. Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules*, 2020, 25.
8. Lopez OL, Kuller LH. Epidemiology of aging and associated cognitive disorders: Prevalence and incidence of Alzheimer's disease and other dementias. *Handbook of clinical neurology*, 2019, 167: 139-148.
9. Hung S-Y, Fu W-M. Drug candidates in clinical trials for Alzheimer's disease. *Journal of biomedical science*, 2017, 24: 1-12.

10. Nagata T, Shinagawa S, Nakajima S, Noda Y, Mimura M. Pharmacotherapeutic combinations for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2022, 23: 727-737.
11. Cronin A, Greal M. Neuroprotective and neuro-restorative effects of minocycline and rasagiline in a zebrafish 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 2017, 367: 34-46.
12. Appleby BS, Nacopoulos D, Milano N, Zhong K, Cummings JL. A review: treatment of Alzheimer's disease discovered in repurposed agents. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 2013, 35: 1-22.
13. McGeer PL, Harada N, Kimura H, McGeer EG, Schulzer M. Prevalence of dementia amongst elderly Japanese with leprosy: apparent effect of chronic drug therapy. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 1992, 3: 146-149.
14. Zhu S, Stavrovskaya IG, Drozda M, Kim BY, Ona V, Li M, Sarang S, Liu AS, Hartley DM, Wu DC, Gullans S, Ferrante RJ, Przedborski S, Kristal BS, and Friedlander RM. Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature*, 2002, 417: 74-78.
15. Li W, Chai Q, Zhang H, Ma J, Xu C, Dong J, Wei X, Wang Z, Zhang K. High doses of minocycline may induce delayed activation of microglia in aged rats and thus cannot prevent postoperative cognitive dysfunction. *Journal of International Medical Research*, 2018, 46: 1404-1413.
16. Khalifa A. Antiinfective agents affecting cognition: a review. *Journal of chemotherapy*, 2007, 19: 620-631.
17. Arumugham VB, Gujarathi R, Cascella M. Third generation cephalosporins. 2019.
18. Rothstein JD, Patel S, Regan MR, Haenggeli C, Huang YH, Bergles DE, Jin L, Dykes Hoberg M, Vidensky S, Chung DS. β -Lactam antibiotics offer

- neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature*, 2005, 433: 73-77.
19. Fan S, Li L, Xian X, Liu L, Gao J, Li W. Ceftriaxone regulates glutamate production and vesicular assembly in presynaptic terminals through GLT-1 in APP/PS1 mice. *Neurobiol Learn Mem*, 2021, 183: 107480.
 20. Muri L, Perny M, Zemp J, Grandgirard D, Leib SL. Combining ceftriaxone with doxycycline and daptomycin reduces mortality, neuroinflammation, brain damage, and hearing loss in infant rat pneumococcal meningitis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2019, 63: e00220-00219.
 21. Bisht R, Kaur B, Gupta H, Prakash A. Ceftriaxone mediated rescue of nigral oxidative damage and motor deficits in MPTP model of Parkinson's disease in rats. *Neurotoxicology*, 2014, 44: 71-79.
 22. Ji H-F, Shen L, Zhang H-Y. β -Lactam antibiotics are multipotent agents to combat neurological diseases. *Biochemical and biophysical research communications*, 2005, 333: 661-663.
 23. Okay U, Ferah Okay I, Aydin IC, Bayram C, Ertugrul MS, Gezer A, Hacimuftuoglu A. Effects of *Achillea millefolium* on cisplatin induced ocular toxicity: an experimental study. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 2021, 40: 214-220.
 24. Hardman J, Limbird L, Goodman-Gilman A. The pharmacological basis of therapeutics, McGraw Hill. *New York*, 2001: 1295-1312.
 25. Lipski J, Wan C, Bai J, Pi R, Li D, Donnelly D. Neuroprotective potential of ceftriaxone in in vitro models of stroke. *Neuroscience*, 2007, 146: 617-629.
 26. Fontana AC. Current approaches to enhance glutamate transporter function and expression. *J Neurochem*, 2015, 134: 982-1007.

27. Tian G, Lai L, Guo H, Lin Y, Butchbach ME, Chang Y, Lin CL. Translational control of glial glutamate transporter EAAT2 expression. *J Biol Chem*, 2007, 282: 1727-1737.
28. Guo H, Lai L, Butchbach ME, Stockinger MP, Shan X, Bishop GA, Lin C-IG. Increased expression of the glial glutamate transporter EAAT2 modulates excitotoxicity and delays the onset but not the outcome of ALS in mice. *Human molecular genetics*, 2003, 12: 2519-2532.
29. Wang L, Wang C, Liu Q, Meng Q, Huo X, Sun P, Yang X, Sun H, Zhen Y, Peng J, Ma X, Liu K. PEPT1- and OAT1/3-mediated drug-drug interactions between bestatin and cefixime in vivo and in vitro in rats, and in vitro in human. *Eur J Pharm Sci*, 2014, 63: 77-86.
30. Riek R, Eisenberg DS. The activities of amyloids from a structural perspective. *Nature*, 2016, 539: 227-235.
31. Armstrong R. What causes neurodegenerative disease? *Folia Neuropathol*, 2020, 58: 93-112.
32. Soria Lopez JA, Gonzalez HM, Leger GC. Alzheimer's disease. *Handb Clin Neurol*, 2019, 167: 231-255.
33. Long JM, Holtzman DM. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell*, 2019, 179: 312-339.
34. Ilieva K, Tchekalarova J, Atanasova D, Kortenska L, Atanasova M. Antidepressant agomelatine attenuates behavioral deficits and concomitant pathology observed in streptozotocin-induced model of Alzheimer's disease in male rats. *Hormones and Behavior*, 2019, 107: 11-19.

35. Zeynaloo E, Yang Y-P, Dikici E, Landgraf R, Bachas LG, Daunert S. Design of a mediator-free, non-enzymatic electrochemical biosensor for glutamate detection. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2021, 31: 102305.
36. Gerhardt GA, Burmeister JJ. Voltammetry in vivo for chemical analysis of the nervous system. *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation*, 2006.
37. Rahman MA, Kwon NH, Won MS, Choe ES, Shim YB. Functionalized conducting polymer as an enzyme-immobilizing substrate: an amperometric glutamate microbiosensor for in vivo measurements. *Anal Chem*, 2005, 77: 4854-4860.
38. Kulagina NV, Shankar L, Michael AC. Monitoring glutamate and ascorbate in the extracellular space of brain tissue with electrochemical microsenors. *Anal Chem*, 1999, 71: 5093-5100.
39. Kawagoe KT, Zimmerman JB, Wightman RM. Principles of voltammetry and microelectrode surface states. *Journal of neuroscience methods*, 1993, 48: 225-240.
40. Seshadri S, Wolf PA, Beiser A, Au R, McNulty K, White R, D'agostino R. Lifetime risk of dementia and Alzheimer's disease: the impact of mortality on risk estimates in the Framingham Study. *Neurology*, 1997, 49: 1498-1504.
41. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, 1995, 83: 835.
42. Hammond J, Le Q, Goodyer C, Gelfand M, Trifiro M, LeBlanc A. Testosterone-mediated neuroprotection through the androgen receptor in human primary neurons. *Journal of neurochemistry*, 2001, 77: 1319-1326.

43. Nguyen TVV, Yao M, Pike CJ. Androgens activate mitogen-activated protein kinase signaling: Role in neuroprotection. *Journal of neurochemistry*, 2005, 94: 1639-1651.
44. Ramsden M, Nyborg A, Murphy M, Chang L, Stanczyk F, Golde T, Pike C. Androgens modulate β -amyloid levels in male rat brain. *Journal of neurochemistry*, 2003, 87: 1052-1055.
45. Ramsden M, Shin T, Pike C. Androgens modulate neuronal vulnerability to kainate lesion. *Neuroscience*, 2003, 122: 573-578.
46. Estrada M, Varshney A, Ehrlich BE. Elevated testosterone induces apoptosis in neuronal cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281: 25492-25501.
47. Duong P, Tenkorang MA, Trieu J, McCuiston C, Rybalchenko N, Cunningham RL. Neuroprotective and neurotoxic outcomes of androgens and estrogens in an oxidative stress environment. *Biology of sex differences*, 2020, 11: 1-18.
48. Borrás C, Gambini J, López-Grueso R, Pallardó FV, Viña J. Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2010, 1802: 205-211.
49. Moosmann B, Behl C. The antioxidant neuroprotective effects of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, 96: 8867-8872.
50. Lajoie P, Nabi IR. Lipid rafts, caveolae, and their endocytosis. *International review of cell and molecular biology*, 2010, 282: 135-163.
51. Cunningham RL, Singh M, O'Bryant SE, Hall JR, Barber RC. Oxidative stress, testosterone, and cognition among Caucasian and Mexican-American men with and without Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease*, 2014, 40: 563-573.

52. Tenkorang MA, Duong P, Cunningham RL. NADPH Oxidase Mediates Membrane Androgen Receptor–Induced Neurodegeneration. *Endocrinology*, 2019, 160: 947-963.
53. Sumien N, Cunningham JT, Davis DL, Engelland R, Fadeyibi O, Farmer GE, Mabry S, Mensah-Kane P, Trinh OT, Vann PH. Neurodegenerative Disease: Roles for Sex, Hormones, and Oxidative Stress. *Endocrinology*, 2021, 162: bqab185.
54. Slavich GM, Sacher J. Stress, sex hormones, inflammation, and major depressive disorder: Extending Social Signal Transduction Theory of Depression to account for sex differences in mood disorders. *Psychopharmacology (Berl)*, 2019, 236: 3063-3079.
55. Vegeto E, Villa A, Della Torre S, Crippa V, Rusmini P, Cristofani R, Galbiati M, Maggi A, Poletti A. The Role of Sex and Sex Hormones in Neurodegenerative Diseases. *Endocr Rev*, 2020, 41: 273-319.
56. Misra A, Ganesh S, Shahiwala A, Shah SP. Drug delivery to the central nervous system: a review. *J Pharm Pharm Sci*, 2003, 6: 252-273.
57. Hou Y, Dan X, Babbar M, Wei Y, Hasselbalch SG, Croteau DL, Bohr VA. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*, 2019, 15: 565-581.
58. Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *The lancet*, 2005, 366: 2112-2117.
59. Esiri M, Matthews F, Brayne C, Ince P, Matthews F, Xuereb J, Broome J, McKenzie J, Rossi M, McKeith I. Pathological correlates of late-onset dementia in a multicentre, community-based population in England and Wales. *Lancet*, 2001.

60. Bennett D, Schneider J, Arvanitakis Z, Kelly J, Aggarwal N, Shah R, Wilson R. Neuropathology of older persons without cognitive impairment from two community-based studies. *Neurology*, 2006, 66: 1837-1844.
61. Korczyn AD. The complex nosological concept of vascular dementia. *Journal of the neurological sciences*, 2002, 203: 3-6.
62. Shin J-H. Dementia Epidemiology Fact Sheet 2022. *Annals of Rehabilitation Medicine*, 2022, 46: 53.
63. Lin L-F, Jhao Y-T, Chiu C-H, Sun L-H, Chou T-K, Shiue C-Y, Cheng C-Y, Ma K-H. Bezafibrate Exerts Neuroprotective Effects in a Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease. *Pharmaceuticals*, 2022, 15: 109.
64. You W, Henneberg M. Large household reduces dementia mortality: A cross-sectional data analysis of 183 populations. *PloS one*, 2022, 17: e0263309.
65. Roy J, Tsui KC, Ng J, Fung M-L, Lim LW. Regulation of Melatonin and Neurotransmission in Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22: 6841.
66. Organization WH. Global status report on the public health response to dementia. 2021.
67. Apostolova LG. Alzheimer disease. *Continuum: Lifelong Learning in Neurology*, 2016, 22: 419.
68. Wattmo C, Minthon L, Wallin ÅK. Mild versus moderate stages of Alzheimer's disease: three-year outcomes in a routine clinical setting of cholinesterase inhibitor therapy. *Alzheimer's research & therapy*, 2016, 8: 1-15.
69. Dubois B, Hampel H, Feldman HH, Scheltens P, Aisen P, Andrieu S, Bakardjian H, Benali H, Bertram L, Blennow K. Preclinical Alzheimer's disease: definition, natural history, and diagnostic criteria. *Alzheimer's & Dementia*, 2016, 12: 292-323.

70. Zilka N, Novak M. The tangled story of Alois Alzheimer. *Bratislavské lekárske listy*, 2006, 107: 343.
71. Tonkonogy J, Moak GS. Alois Alzheimer on presenile dementia. *Topics in geriatrics*, 1988, 1: 199-206.
72. Kreutzberg GW, Gudden W. Alois Alzheimer. 1988.
73. Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and biophysical research communications*, 1984, 120: 885-890.
74. Hamadelseed O, Elkhidir IH, Skutella T. Psychosocial Risk Factors for Alzheimer's Disease in Patients with Down Syndrome and Their Association with Brain Changes: A Narrative Review. *Neurology and Therapy*, 2022: 1-23.
75. Hardy J. The discovery of Alzheimer-causing mutations in the APP gene and the formulation of the "amyloid cascade hypothesis". *The FEBS journal*, 2017, 284: 1040-1044.
76. Asada T. Epidemiology of dementia in Japan. İçinde: *Neuroimaging Diagnosis for Alzheimer's Disease and Other Dementias*, Springer, 2017: 1-10.
77. Montgomery W, Ueda K, Jorgensen M, Stathis S, Cheng Y, Nakamura T. Epidemiology, associated burden, and current clinical practice for the diagnosis and management of Alzheimer's disease in Japan. *ClinicoEconomics and outcomes research: CEOR*, 2018, 10: 13.
78. Fiest KM, Roberts JI, Maxwell CJ, Hogan DB, Smith EE, Frolkis A, Cohen A, Kirk A, Pearson D, Pringsheim T. The prevalence and incidence of dementia due to Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 2016, 43: S51-S82.

79. Niu H, Álvarez-Álvarez I, Guillén-Grima F, Aguinaga-Ontoso I. Prevalence and incidence of Alzheimer's disease in Europe: A meta-analysis. *Neurología (English Edition)*, 2017, 32: 523-532.
80. Takizawa C, Thompson PL, van Walssem A, Faure C, Maier WC. Epidemiological and economic burden of Alzheimer's disease: a systematic literature review of data across Europe and the United States of America. *Journal of Alzheimer's disease*, 2015, 43: 1271-1284.
81. Cui L, Hou N-N, Wu H-M, Zuo X, Lian Y-Z, Zhang C-N, Wang Z-F, Zhang X, Zhu J-H. Prevalence of Alzheimer's disease and Parkinson's disease in China: an updated systematical analysis. *Frontiers in aging neuroscience*, 2020, 12: 603854.
82. Zhao X, Li X. The prevalence of Alzheimer's disease in the Chinese Han population: a meta-analysis. *Neurological Research*, 2020, 42: 291-298.
83. Chan KY, Wang W, Wu JJ, Liu L, Theodoratou E, Car J, Middleton L, Russ TC, Deary IJ, Campbell H. Epidemiology of Alzheimer's disease and other forms of dementia in China, 1990–2010: a systematic review and analysis. *The lancet*, 2013, 381: 2016-2023.
84. Rajan KB, Weuve J, Barnes LL, Wilson RS, Evans DA. Prevalence and incidence of clinically diagnosed Alzheimer's disease dementia from 1994 to 2012 in a population study. *Alzheimer's & Dementia*, 2019, 15: 1-7.
85. Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Public Health*, 2022, 7: e105-e125.
86. van Bussel EF, Richard E, Arts DL, Nooyens AC, Coloma PM, de Waal MW, van den Akker M, Biermans MC, Nielen MM, van Boven K, Smeets H, Matthews FE, Brayne C, Busschers WB, van Gool WA, Moll van Charante EP. Dementia

- incidence trend over 1992-2014 in the Netherlands: Analysis of primary care data. *PLoS Med*, 2017, 14: e1002235.
87. Armstrong RA. Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathologica*, 2019, 57: 87-105.
 88. Anand P, Singh B. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Archives of pharmacal research*, 2013, 36: 375-399.
 89. Crous-Bou M, Minguillón C, Gramunt N, Molinuevo JL. Alzheimer's disease prevention: from risk factors to early intervention. *Alzheimer's research & therapy*, 2017, 9: 1-9.
 90. Falsetti L, Viticchi G, Zaccane V, Guerrieri E, Moroncini G, Luzzi S, Silvestrini M. Shared molecular mechanisms among Alzheimer's disease, neurovascular unit dysfunction and vascular risk factors: A narrative review. *Biomedicines*, 2022, 10: 439.
 91. Babic T. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 1999, 67: 558-558.
 92. H Ferreira-Vieira T, M Guimaraes I, R Silva F, M Ribeiro F. Alzheimer's disease: targeting the cholinergic system. *Current neuropharmacology*, 2016, 14: 101-115.
 93. Monczor M. Diagnosis and treatment of Alzheimer's disease. *Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents*, 2005, 5: 5-13.
 94. Paroni G, Bisceglia P, Seripa D. Understanding the amyloid hypothesis in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease*, 2019, 68: 493-510.
 95. Kametani F, Hasegawa M. Reconsideration of amyloid hypothesis and tau hypothesis in Alzheimer's disease. *Frontiers in neuroscience*, 2018: 25.
 96. Ricciarelli R, Fedele E. The amyloid cascade hypothesis in Alzheimer's disease: it's time to change our mind. *Current neuropharmacology*, 2017, 15: 926-935.

97. Schachter AS, Davis KL. Alzheimer's disease. *Current Treatment Options in Neurology*, 2000, 2: 51-60.
98. Cho HS, Huang LK, Lee YT, Chan L, Hong CT. Suboptimal baseline serum vitamin B12 is associated with cognitive decline in people with Alzheimer's disease undergoing cholinesterase inhibitor treatment. *Frontiers in neurology*, 2018, 9: 325.
99. Jatoi S, Hafeez A, Riaz SU, Ali A, Ghauri MI, Zehra M. Low Vitamin B12 Levels: An Underestimated Cause Of Minimal Cognitive Impairment And Dementia. *Cureus*, 2020, 12: e6976.
100. MCKHANN G. Report of the NINCDS-ADRDA work group under the auspices of department of health and human service task force on Alzheimer's disease. *Neurology*, 1984, 34: 939-944.
101. Bier J-C. Dementia: Diagnostics and criteria. 2022.
102. Yaari R, Fleisher AS, Tariot PN. Updates to diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *The Primary Care Companion for CNS Disorders*, 2011, 13: 26971.
103. Bekris LM, Yu C-E, Bird TD, Tsuang D. The Genetics of Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *Neurochemical Mechanisms in Disease*, 2011: 695-755.
104. Lahiri DK. Melatonin affects the metabolism of the β -amyloid precursor protein in different cell types. *Journal of pineal research*, 1999, 26: 137-146.
105. Çelik T, Uzbay T. Alzheimer hastalığının farmakolojik tedavisinde yeni gelişmeler. *Demans Dergisi*, 2003, 3: 48-58.
106. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *science*, 2002, 297: 353-356.
107. Iliff JJ, Chen MJ, Plog BA, Zeppenfeld DM, Soltero M, Yang L, Singh I, Deane R, Nedergaard M. Impairment of glymphatic pathway function promotes tau

- pathology after traumatic brain injury. *Journal of Neuroscience*, 2014, 34: 16180-16193.
- 108.Mestre H, Hablitz LM, Xavier AL, Feng W, Zou W, Pu T, Monai H, Murlidharan G, Rivera RMC, Simon MJ. Aquaporin-4-dependent glymphatic solute transport in the rodent brain. *Elife*, 2018, 7: e40070.
- 109.Kitchen P, Salman MM, Halsey AM, Clarke-Bland C, MacDonald JA, Ishida H, Vogel HJ, Almutiri S, Logan A, Kreida S. Targeting aquaporin-4 subcellular localization to treat central nervous system edema. *Cell*, 2020, 181: 784-799. e719.
- 110.Sylvain NJ, Salman MM, Pushie MJ, Hou H, Meher V, Herlo R, Peeling L, Kelly ME. The effects of trifluoperazine on brain edema, aquaporin-4 expression and metabolic markers during the acute phase of stroke using photothrombotic mouse model. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2021, 1863: 183573.
- 111.Herrup K. Reimagining Alzheimer's disease—an age-based hypothesis. *Journal of Neuroscience*, 2010, 30: 16755-16762.
- 112.Vlad SC, Miller DR, Kowall NW, Felson DT. Protective effects of NSAIDs on the development of Alzheimer disease. *Neurology*, 2008, 70: 1672-1677.
- 113.Yang Y, Mufson EJ, Herrup K. Neuronal cell death is preceded by cell cycle events at all stages of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 2003, 23: 2557-2563.
- 114.Tönnies E, Trushina E. Oxidative stress, synaptic dysfunction, and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease*, 2017, 57: 1105-1121.
- 115.Reddy PH, Beal MF. Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends in molecular medicine*, 2008, 14: 45-53.
- 116.Lipinski B. Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and its Complications*, 2001, 15: 203-210.

- 117.Kandimalla R, Thirumala V, Reddy PH. Is Alzheimer's disease a type 3 diabetes?
A critical appraisal. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2017, 1863: 1078-1089.
- 118.Bature F, Guinn B-a, Pang D, Pappas Y. Signs and symptoms preceding the
diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic scoping review of literature from
1937 to 2016. *BMJ open*, 2017, 7: e015746.
- 119.Armstrong RA. The molecular biology of senile plaques and neurofibrillary tangles
in Alzheimer's disease. *Folia Neuropathologica*, 2009, 47: 289-299.
- 120.Tabaton M, Piccini A. Role of water-soluble amyloid- β in the pathogenesis of
Alzheimer's disease. *International journal of experimental pathology*, 2005, 86:
139-145.
- 121.Brion J-P. Neurofibrillary tangles and Alzheimer's disease. *European neurology*,
1998, 40: 130-140.
- 122.Metaxas A, Kempf SJ. Neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease: elucidation
of the molecular mechanism by immunohistochemistry and tau protein phospho-
proteomics. *Neural regeneration research*, 2016, 11: 1579.
- 123.Reddy PH. A critical assessment of research on neurotransmitters in Alzheimer's
disease. *Journal of Alzheimer's disease*, 2017, 57: 969-974.
- 124.Weerasinghe-Mudiyanselage PDE, Ang MJ, Kang S, Kim JS, Moon C. Structural
Plasticity of the Hippocampus in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci*, 2022,
23.
- 125.Manczak M, Calkins MJ, Reddy PH. Impaired mitochondrial dynamics and
abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons
from patients with Alzheimer's disease: implications for neuronal damage. *Human
molecular genetics*, 2011, 20: 2495-2509.

126. Ayaz M, Nawaz A, Naz F, Ullah F, Sadiq A, Islam ZU. Phytochemicals-based Therapeutics against Alzheimer's Disease: An Update. *Curr Top Med Chem*, 2022.
127. Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in neurosciences*, 1999, 22: 208-215.
128. Wong KY, Roy J, Fung ML, Heng BC, Zhang C, Lim LW. Relationships between mitochondrial dysfunction and neurotransmission failure in Alzheimer's disease. *Aging and disease*, 2020, 11: 1291.
129. Watanabe T, Yamagata N, Takasaki K, Sano K, Hayakawa K, Katsurabayashi S, Egashira N, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M. Decreased acetylcholine release is correlated to memory impairment in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Research*, 2009, 1249: 222-228.
130. Bales KR, Tzavara ET, Wu S, Wade MR, Bymaster FP, Paul SM, Nomikos GG. Cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer disease is reversed by an anti-A β antibody. *The Journal of clinical investigation*, 2006, 116: 825-832.
131. Ramos-Rodriguez JJ, Pacheco-Herrero M, Thyssen D, Murillo-Carretero MI, Berrocoso E, Spires-Jones TL, Bacskai BJ, Garcia-Alloza M. Rapid β -amyloid deposition and cognitive impairment after cholinergic denervation in APP/PS1 mice. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 2013, 72: 272-285.
132. Šimić G, Leko MB, Wray S, Harrington CR, Delalle I, Jovanov-Milošević N, Bažadona D, Buée L, De Silva R, Di Giovanni G. Monoaminergic neuropathology in Alzheimer's disease. *Progress in neurobiology*, 2017, 151: 101-138.
133. Govindpani K, Calvo-Flores Guzmán B, Vinnakota C, Waldvogel HJ, Faull RL, Kwakowsky A. Towards a better understanding of GABAergic remodeling in Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18: 1813.

- 134.Mandal PK, Kansara K, Dabas A. The GABA–working memory relationship in Alzheimer’s disease. *Journal of Alzheimer's Disease Reports*, 2017, 1: 43-45.
- 135.Conn PJ. Metabotropic glutamate receptors. *SCIENCE AND MEDICINE*, 1999, 6: 28-37.
- 136.Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological reviews*, 2010, 62: 405-496.
- 137.Niciu MJ, Kelmendi B, Sanacora G. Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2012, 100: 656-664.
- 138.Shigemoto R, Kinoshita A, Wada E, Nomura S, Ohishi H, Takada M, Flor PJ, Neki A, Abe T, Nakanishi S. Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 1997, 17: 7503-7522.
- 139.Skeberdis VA, Lan J-y, Opitz T, Zheng X, Bennett MV, Zukin RS. mGluR1-mediated potentiation of NMDA receptors involves a rise in intracellular calcium and activation of protein kinase C. *Neuropharmacology*, 2001, 40: 856-865.
- 140.Shoham S, Javitt DC, Heresco-Levy U. Chronic high-dose glycine nutrition: effects on rat brain cell morphology. *Biological psychiatry*, 2001, 49: 876-885.
- 141.Yelshanskaya M, Sobolevsky A. Structural Insights into Function of Ionotropic Glutamate Receptors. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 2022, 16: 190-206.
- 142.Nicoll RA. Expression mechanisms underlying long-term potentiation: a postsynaptic view. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 2003, 358: 721-726.

143. Mercier MS, Magloire V, Cornford JH, Kullmann DM. Long-term potentiation in neurogliaform interneurons modulates excitation-inhibition balance in the temporoammonic pathway. *J Physiol*, 2022.
144. Chang W, An J, Seol GH, Han SH, Yee J, Min SS. Trans-Anethole Alleviates Trimethyltin Chloride-Induced Impairments in Long-Term Potentiation. *Pharmaceutics*, 2022, 14.
145. Cao LX, Bing YH, Xu YH, Zhang GJ, Chu CP, Hong L, Qiu DL. Nicotine Facilitates Facial Stimulation-Evoked Mossy Fiber-Granule Cell Long-Term Potentiation in vivo in Mice. *Front Cell Neurosci*, 2022, 16: 905724.
146. Prasansuklab A, Brimson JM, Tencomnao T. Potential Thai medicinal plants for neurodegenerative diseases: A review focusing on the anti-glutamate toxicity effect. *J Tradit Complement Med*, 2020, 10: 301-308.
147. Butterfield DA, Pocernich CB. The glutamatergic system and Alzheimer's disease. *CNS drugs*, 2003, 17: 641-652.
148. Wenk GL. Neuropathologic changes in Alzheimer's disease: potential targets for treatment. *Journal of Clinical Psychiatry*, 2006, 67: 3.
149. Zhang L, Qin Z, Sharmin F, Lin W, Ricke KM, Zasloff MA, Stewart AF, Chen H-H. Tyrosine phosphatase PTP1B impairs presynaptic NMDA receptor-mediated plasticity in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of disease*, 2021, 156: 105402.
150. Ferreira IL, Ferreira E, Schmidt J, Cardoso JM, Pereira CM, Carvalho AL, Oliveira CR, Rego AC. A β and NMDAR activation cause mitochondrial dysfunction involving ER calcium release. *Neurobiology of aging*, 2015, 36: 680-692.

151. Magi S, Piccirillo S, Amoroso S. The dual face of glutamate: from a neurotoxin to a potential survival factor—metabolic implications in health and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2019, 76: 1473-1488.
152. Corlew R, Brasier DJ, Feldman DE, Philpot BD. Presynaptic NMDA receptors: newly appreciated roles in cortical synaptic function and plasticity. *The Neuroscientist*, 2008, 14: 609-625.
153. Zhang Y, Li P, Feng J, Wu M. Dysfunction of NMDA receptors in Alzheimer's disease. *Neurological Sciences*, 2016, 37: 1039-1047.
154. Talantova M, Sanz-Blasco S, Zhang X, Xia P, Akhtar MW, Okamoto S-i, Dzieczapolski G, Nakamura T, Cao G, Pratt AE. A β induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110: E2518-E2527.
155. Fernández-Tomé P, Brera B, Arévalo Ma-A, de Ceballos MaL. β -Amyloid₂₅₋₃₅ inhibits glutamate uptake in cultured neurons and astrocytes: Modulation of uptake as a survival mechanism. *Neurobiology of disease*, 2004, 15: 580-589.
156. Wang R, Reddy PH. Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, 2017, 57: 1041-1048.
157. Livingston G, Huntley J, Sommerlad A, Ames D, Ballard C, Banerjee S, Brayne C, Burns A, Cohen-Mansfield J, Cooper C. Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *The lancet*, 2020, 396: 413-446.
158. Yiannopoulou KG, Papageorgiou SG. Current and Future Treatments in Alzheimer Disease: An Update. *J Cent Nerv Syst Dis*, 2020, 12: 1179573520907397.
159. De la Rosa A, Olaso-Gonzalez G, Arc-Chagnaud C, Millan F, Salvador-Pascual A, García-Lucerga C, Blasco-Lafarga C, Garcia-Dominguez E, Carretero A, Correas

- AG. Physical exercise in the prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Journal of sport and health science*, 2020, 9: 394-404.
- 160.Jia R-x, Liang J-h, Xu Y, Wang Y-q. Effects of physical activity and exercise on the cognitive function of patients with Alzheimer disease: a meta-analysis. *BMC geriatrics*, 2019, 19: 1-14.
- 161.Eldufani J, Blaise G. The role of acetylcholinesterase inhibitors such as neostigmine and rivastigmine on chronic pain and cognitive function in aging: A review of recent clinical applications. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 2019, 5: 175-183.
- 162.Sharma K. Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics. *Molecular Medicine Reports*, 2019, 20: 1479-1487.
- 163.Marucci G, Buccioni M, Dal Ben D, Lambertucci C, Volpini R, Amenta F. Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, 2021, 190: 108352.
- 164.Pooladgar P, Sakhabakhsh M, Taghva A, Soleiman-Meigooni S. Donepezil Beyond Alzheimer's Disease? A Narrative Review of Therapeutic Potentials of Donepezil in Different Diseases. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2022, 21.
- 165.Annicchiario R, Federici A, Pettenati C, Caltagirone C. Rivastigmine in Alzheimer's disease: Cognitive function and quality of life. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 2007, 3: 1113.
- 166.Müller T. Rivastigmine in the treatment of patients with Alzheimer's disease. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 2007, 3: 211.
- 167.Khoury R, Rajamanickam J, Grossberg GT. An update on the safety of current therapies for Alzheimer's disease: focus on rivastigmine. *Therapeutic advances in drug safety*, 2018, 9: 171-178.

168. Birks JS, Evans JG. Rivastigmine for Alzheimer's disease. *Cochrane Database of systematic reviews*, 2015.
169. Zeng F, Lu T, Wang J, Nie X, Xiong W, Yin Z, Peng D. Design, Synthesis and Bioactivity Evaluation of Coumarin–BMT Hybrids as New Acetylcholinesterase Inhibitors. *Molecules*, 2022, 27: 2142.
170. Babaei P. NMDA and AMPA receptors dysregulation in Alzheimer's disease. *European journal of pharmacology*, 2021, 908: 174310.
171. Athar T, Al Balushi K, Khan SA. Recent advances on drug development and emerging therapeutic agents for Alzheimer's disease. *Molecular biology reports*, 2021, 48: 5629-5645.
172. Gayathri S, Raghu CH, Fayaz S. Phytotherapeutics against Alzheimer's Disease: Mechanism, Molecular Targets and Challenges for Drug Development. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, 2022, 21: 409-426.
173. Okura T, Plassman BL, Steffens DC, Llewellyn DJ, Potter GG, Langa KM. Neuropsychiatric symptoms and the risk of institutionalization and death: the aging, demographics, and memory study. *Journal of the American Geriatrics Society*, 2011, 59: 473-481.
174. Bhalerao S, Seyfried LS, Kim HM, Chiang C, Kavanagh J, Kales HC. Mortality risk with the use of atypical antipsychotics in later-life bipolar disorder. *Journal of geriatric psychiatry and neurology*, 2012, 25: 29-36.
175. Kales HC, Chen P, Blow FC, Welsh DE, Mellow AM. Rates of clinical depression diagnosis, functional impairment, and nursing home placement in coexisting dementia and depression. *The American Journal of Geriatric Psychiatry*, 2005, 13: 441-449.

- 176.Mehla J. Repurposing clinically used antibiotics for the treatment of Alzheimer's disease. *J Pharmacol Rep*, 2017, 2: e102.
- 177.Parvathaneni V, Kulkarni NS, Muth A, Gupta V. Drug repurposing: a promising tool to accelerate the drug discovery process. *Drug discovery today*, 2019, 24: 2076-2085.
- 178.Rawls SM, Zielinski M, Patel H, Sacavage S, Baron DA, Patel D. Beta-lactam antibiotic reduces morphine analgesic tolerance in rats through GLT-1 transporter activation. *Drug Alcohol Depend*, 2010, 107: 261-263.
- 179.Yimer EM, Hishe HZ, Tuem KB. Repurposing of the β -Lactam Antibiotic, Ceftriaxone for Neurological Disorders: A Review. *Front Neurosci*, 2019, 13: 236.
- 180.Gonçalves-Ribeiro J, Pina CC, Sebastião AM, Vaz SH. Glutamate transporters in hippocampal LTD/LTP: not just prevention of excitotoxicity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2019, 13: 357.
- 181.Bush K, Bradford PA. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2016, 6.
- 182.Stafylis C, Keith K, Mehta S, Tellalian D, Burian P, Millner C, Klausner JD. Clinical Efficacy of Cefixime for the Treatment of Early Syphilis. *Clin Infect Dis*, 2021, 73: 907-910.
- 183.Mehta SN, Stafylis C, Tellalian DM, Burian PL, Okada CM, Millner CE, Mejia CM, Klausner JD. Clinical trial protocol to evaluate the efficacy of cefixime in the treatment of early syphilis. *Trials*, 2020, 21: 1009.
- 184.Calsolaro V, Edison P. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: current evidence and future directions. *Alzheimers Dement* 12: 719–732. 2016.
- 185.Britschgi M, Wyss-Coray T. Systemic and acquired immune responses in Alzheimer's disease. *International review of neurobiology*, 2007, 82: 205-233.

- 186.Paouri E, Georgopoulos S. Systemic and CNS inflammation crosstalk: implications for Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, 2019, 16: 559-574.
- 187.Zeron MM, Fernandes HB, Krebs C, Shehadeh J, Wellington CL, Leavitt BR, Baimbridge KG, Hayden MR, Raymond LA. Potentiation of NMDA receptor-mediated excitotoxicity linked with intrinsic apoptotic pathway in YAC transgenic mouse model of Huntington's disease. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 2004, 25: 469-479.
- 188.Cheung NS, Beart PM, Pascoe CJ, John CA, Bernard O. Human Bcl-2 protects against AMPA receptor-mediated apoptosis. *Journal of neurochemistry*, 2000, 74: 1613-1620.
- 189.Zott B, Konnerth A. Impairments of glutamatergic synaptic transmission in Alzheimer's disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2022.
- 190.Royo M, Escolano BA, Madrigal MP, Jurado S. AMPA Receptor Function in Hypothalamic Synapses. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 2022: 1.
- 191.Bernardino I, Dionísio A, Violante IR, Monteiro R, Castelo-Branco M. Motor Cortex Excitation/Inhibition Imbalance in Young Adults With Autism Spectrum Disorder: A MRS-TMS Approach. *Frontiers in Psychiatry*, 2022, 13.
- 192.Ghanizadeh A, Berk M. Beta-lactam antibiotics as a possible novel therapy for managing epilepsy and autism, a case report and review of literature. *Iran J Child Neurol*, 2015, 9: 99-102.
- 193.Wilkie CM, Barron JC, Brymer KJ, Barnes JR, Nafar F, Parsons MP. The Effect of GLT-1 Upregulation on Extracellular Glutamate Dynamics. *Front Cell Neurosci*, 2021, 15: 661412.

194. Norton S, Matthews FE, Barnes DE, Yaffe K, Brayne C. Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: an analysis of population-based data. *The Lancet Neurology*, 2014, 13: 788-794.
195. Qaseem A, Snow V, Cross Jr JT, Forciea MA, Hopkins Jr R, Shekelle P, Adelman A, Mehr D, Schellhase K, Campos-Outcalt D. Current pharmacologic treatment of dementia: a clinical practice guideline from the American College of Physicians and the American Academy of Family Physicians. *Annals of internal medicine*, 2008, 148: 370-378.
196. Drummond E, Wisniewski T. Alzheimer's disease: experimental models and reality. *Acta neuropathologica*, 2017, 133: 155-175.
197. Wisniewski T, Goñi F. Immunotherapeutic approaches for Alzheimer's disease. *Neuron*, 2015, 85: 1162-1176.
198. Bouleau S, Tricoire H. Drosophila models of Alzheimer's disease: advances, limits, and perspectives. *Journal of Alzheimer's disease*, 2015, 45: 1015-1038.
199. Hannan SB, Dräger NM, Rasse TM, Voigt A, Jahn TR. Cellular and molecular modifier pathways in tauopathies: the big picture from screening invertebrate models. *Journal of neurochemistry*, 2016, 137: 12-25.
200. Newman M, Ebrahimie E, Lardelli M. Using the zebrafish model for Alzheimer's disease research. *Frontiers in genetics*, 2014, 5: 189.
201. Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Borthette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β -amyloid precursor protein. *Nature*, 1995, 373: 523-527.

202. Dujardin S, Colin M, Buée L. Invited review: Animal models of tauopathies and their implications for research/translation into the clinic. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2015, 41: 59-80.
203. Puzzo D, Gulisano W, Palmeri A, Arancio O. Rodent models for Alzheimer's disease drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*, 2015, 10: 703-711.
204. Banik A, Brown RE, Bamburg J, Lahiri DK, Khurana D, Friedland RP, Chen W, Ding Y, Mudher A, Padjen AL. Translation of pre-clinical studies into successful clinical trials for Alzheimer's disease: what are the roadblocks and how can they be overcome? *Journal of Alzheimer's disease*, 2015, 47: 815-843.
205. Do Carmo S, Cuello AC. Modeling Alzheimer's disease in transgenic rats. *Molecular neurodegeneration*, 2013, 8: 1-11.
206. Tran TN, Kim SH, Gallo C, Amaya M, Kyees J, Narayanaswami V. Biochemical and biophysical characterization of recombinant rat apolipoprotein E: similarities to human apolipoprotein E3. *Arch Biochem Biophys*, 2013, 529: 18-25.
207. Tanzi R, Gusella J, Watkins P, Bruns GAP, St. George-Hyslop P., Van Keuren ML, Patterson D., Pagan S. *Kurnit DM, and Neve E. L*, 1987: 880-884.
208. Xu G, Ran Y, Fromholt SE, Fu C, Yachnis AT, Golde TE, Borchelt DR. Murine A β over-production produces diffuse and compact Alzheimer-type amyloid deposits. *Acta neuropathologica communications*, 2015, 3: 1-15.
209. Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoft J, Van Eldik L. Intraneuronal β -amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *Journal of Neuroscience*, 2006, 26: 10129-10140.

210. Radde R, Bolmont T, Kaeser SA, Coomaraswamy J, Lindau D, Stoltze L, Calhoun ME, Jäggi F, Wolburg H, Gengler S. A β 42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO reports*, 2006, 7: 940-946.
211. Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold K-H, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Bürki K, Frey P, Paganetti PA. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997, 94: 13287-13292.
212. Tomiyama T, Matsuyama S, Iso H, Umeda T, Takuma H, Ohnishi K, Ishibashi K, Teraoka R, Sakama N, Yamashita T. A mouse model of amyloid β oligomers: their contribution to synaptic alteration, abnormal tau phosphorylation, glial activation, and neuronal loss in vivo. *Journal of Neuroscience*, 2010, 30: 4845-4856.
213. Alexander AG, Marfil V, Li C. Use of *Caenorhabditis elegans* as a model to study Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Frontiers in genetics*, 2014, 5: 279.
214. Fernandez-Funez P, de Mena L, Rincon-Limas DE. Modeling the complex pathology of Alzheimer's disease in *Drosophila*. *Experimental neurology*, 2015, 274: 58-71.
215. Paquet D, Bhat R, Sydow A, Mandelkow E-M, Berg S, Hellberg S, Färling J, Distel M, Köster RW, Schmid B. A zebrafish model of tauopathy allows in vivo imaging of neuronal cell death and drug evaluation. *The Journal of clinical investigation*, 2009, 119: 1382-1395.
216. Paidi RK, Nthenge-Ngumbau DN, Singh R, Kankanala T, Mehta H, Mohanakumar KP. Mitochondrial Deficits Accompany Cognitive Decline Following Single

- Bilateral Intracerebroventricular Streptozotocin. *Curr Alzheimer Res*, 2015, 12: 785-795.
217. Hassanzadeh G, Hosseini A, Pasbakhsh P, Akbari M, Ghaffarpour M, Takzare N, Zahmatkesh M. Trimetazidine prevents oxidative changes induced in a rat model of sporadic type of Alzheimer's disease. *Acta Med Iran*, 2015, 53: 17-24.
218. Sharma B, Singh N, Singh M. Modulation of celecoxib- and streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's disease by pitavastatin and donepezil. *J Psychopharmacol*, 2008, 22: 162-171.
219. Singh B, Sharma B, Jaggi AS, Singh N. Attenuating effect of lisinopril and telmisartan in intracerebroventricular streptozotocin induced experimental dementia of Alzheimer's disease type: possible involvement of PPAR- γ agonistic property. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2013, 14: 124-136.
220. Liu P, Zou L, Jiao Q, Chi T, Ji X, Qi Y, Xu Q, Wang L. Xanthoceraside attenuates learning and memory deficits via improving insulin signaling in STZ-induced AD rats. *Neurosci Lett*, 2013, 543: 115-120.
221. Zhang L, Jin C, Lu X, Yang J, Wu S, Liu Q, Chen R, Bai C, Zhang D, Zheng L, Du Y, Cai Y. Aluminium chloride impairs long-term memory and downregulates cAMP-PKA-CREB signalling in rats. *Toxicology*, 2014, 323: 95-108.
222. Gardoni F, Kamal A, Bellone C, Biessels GJ, Ramakers GM, Cattabeni F, Gispen WH, Di Luca M. Effects of streptozotocin-diabetes on the hippocampal NMDA receptor complex in rats. *J Neurochem*, 2002, 80: 438-447.
223. Moosavi M, Zarifkar AH, Farbood Y, Dianat M, Sarkaki A, Ghasemi R. Agmatine protects against intracerebroventricular streptozotocin-induced water maze memory deficit, hippocampal apoptosis and Akt/GSK3 β signaling disruption. *Eur J Pharmacol*, 2014, 736: 107-114.

224. Zhao HH, Di J, Liu WS, Liu HL, Lai H, Lü YL. Involvement of GSK3 and PP2A in ginsenoside Rb1's attenuation of aluminum-induced tau hyperphosphorylation. *Behav Brain Res*, 2013, 241: 228-234.
225. Kumar A, Sharma S, Prashar A, Deshmukh R. Effect of licofelone--a dual COX/5-LOX inhibitor in intracerebroventricular streptozotocin-induced behavioral and biochemical abnormalities in rats. *J Mol Neurosci*, 2015, 55: 749-759.
226. Zaky A, Mohammad B, Moftah M, Kandeel KM, Bassiouny AR. Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 is a key modulator of aluminum-induced neuroinflammation. *BMC Neurosci*, 2013, 14: 26.
227. Javed H, Vaibhav K, Ahmed ME, Khan A, Tabassum R, Islam F, Safhi MM, Islam F. Effect of hesperidin on neurobehavioral, neuroinflammation, oxidative stress and lipid alteration in intracerebroventricular streptozotocin induced cognitive impairment in mice. *J Neurol Sci*, 2015, 348: 51-59.
228. Fadl NN, Ahmed HH, Booles HF, Sayed AH. Serrapeptase and nattokinase intervention for relieving Alzheimer's disease pathophysiology in rat model. *Hum Exp Toxicol*, 2013, 32: 721-735.
229. Thomson M, Al-Qattan KK, Js D, Ali M. Anti-diabetic and anti-oxidant potential of aged garlic extract (AGE) in streptozotocin-induced diabetic rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 16: 1-9.
230. Liu C, Song J, Teng M, Zheng X, Li X, Tian Y, Pan M, Li Y, Lee RJ, Wang D. Antidiabetic and antinephritic activities of aqueous extract of Cordyceps militaris fruit body in diet-streptozotocin-induced diabetic Sprague Dawley rats. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016, 2016.
231. Exley C. What is the risk of aluminium as a neurotoxin? *Expert Rev Neurother*, 2014, 14: 589-591.

- 232.Lidsky TI. Is the Aluminum Hypothesis dead? *J Occup Environ Med*, 2014, 56: S73-79.
- 233.Bhattacharjee S, Zhao Y, Hill JM, Culicchia F, Kruck TP, Percy ME, Pogue AI, Walton JR, Lukiw WJ. Selective accumulation of aluminum in cerebral arteries in Alzheimer's disease (AD). *J Inorg Biochem*, 2013, 126: 35-37.
- 234.Xian YF, Lin ZX, Zhao M, Mao QQ, Ip SP, Che CT. Uncaria rhynchophylla ameliorates cognitive deficits induced by D-galactose in mice. *Planta Med*, 2011, 77: 1977-1983.
- 235.Sumathi T, Shobana C, Thangarajeswari M, Usha R. Protective effect of L-Theanine against aluminium induced neurotoxicity in cerebral cortex, hippocampus and cerebellum of rat brain - histopathological, and biochemical approach. *Drug Chem Toxicol*, 2015, 38: 22-31.
- 236.Ahmed IM, Dai H, Zheng W, Cao F, Zhang G, Sun D, Wu F. Genotypic differences in physiological characteristics in the tolerance to drought and salinity combined stress between Tibetan wild and cultivated barley. *Plant Physiol Biochem*, 2013, 63: 49-60.
- 237.El-Marasy SA, Abd-Elsalam RM, Ahmed-Farid OA. Ameliorative Effect of Silymarin on Scopolamine-induced Dementia in Rats. *Open Access Maced J Med Sci*, 2018, 6: 1215-1224.
- 238.Sathya S, Manogari BG, Thamaraiselvi K, Vaidevi S, Ruckmani K, Devi KP. Phytol loaded PLGA nanoparticles ameliorate scopolamine-induced cognitive dysfunction by attenuating cholinesterase activity, oxidative stress and apoptosis in Wistar rat. *Nutr Neurosci*, 2022, 25: 485-501.

239. Lu Y, Sareddy GR, Wang J, Wang R, Li Y, Dong Y, Zhang Q, Liu J, O'Connor JC, Xu J, Vadlamudi RK, Brann DW. Neuron-Derived Estrogen Regulates Synaptic Plasticity and Memory. *J Neurosci*, 2019, 39: 2792-2809.
240. D'Hooze R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain research reviews*, 2001, 36: 60-90.
241. Ramirez G, Gunderson EA, Levine SC, Beilock SL. Spatial anxiety relates to spatial abilities as a function of working memory in children. *Q J Exp Psychol (Hove)*, 2012, 65: 474-487.
242. Crawley JN. Behavioral phenotyping strategies for mutant mice. *Neuron*, 2008, 57: 809-818.
243. Olkun S, Altun A. İlköğretim öğrencilerinin bilgisayar deneyimleri ile uzamsal düşünme ve geometri başarıları arasındaki ilişki. *The Turkish Online Journal of Educational Technology*, 2003, 2: 86-91.
244. Yang D, Kim KH, Phimister A, Bachstetter AD, Ward TR, Stackman RW, Mervis RF, Wisniewski AB, Klein SL, Kodavanti PRS. Developmental exposure to polychlorinated biphenyls interferes with experience-dependent dendritic plasticity and ryanodine receptor expression in weanling rats. *Environmental health perspectives*, 2009, 117: 426-435.
245. Salmaso N, Silbereis J, Komitova M, Mitchell P, Chapman K, Ment LR, Schwartz ML, Vaccarino FM. Environmental enrichment increases the GFAP+ stem cell pool and reverses hypoxia-induced cognitive deficits in juvenile mice. *Journal of Neuroscience*, 2012, 32: 8930-8939.
246. Moser M-B, Trommald M, Andersen P. An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests

- the formation of new synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994, 91: 12673-12675.
- 247.Clements DH. Geometric and spatial thinking in early childhood education. *Engaging young children in mathematics: Standards for early childhood mathematics education*, 2004: 267-297.
- 248.Croos C, Woods T, Schweingruber H. Mathematics learning in early childhood. *Washington, DC: National Academies*, 2009.
- 249.Giménez De Béjar V, Caballero Bleda M, Popović N, Popović M. Verapamil Blocks Scopolamine Enhancement Effect on Memory Consolidation in Passive Avoidance Task in Rats. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 566.
- 250.Hosseini N, Alaei H, Reisi P, Radahmadi M. The effect of treadmill running on passive avoidance learning in animal model of Alzheimer disease. *Int J Prev Med*, 2013, 4: 187-192.
- 251.Wu C, Yang L, Li Y, Dong Y, Yang B, Tucker LD, Zong X, Zhang Q. Effects of Exercise Training on Anxious-Depressive-like Behavior in Alzheimer Rat. *Med Sci Sports Exerc*, 2020, 52: 1456-1469.
- 252.Kurian MA, Gissen P, Smith M, Heales SJR, Clayton PT. The monoamine neurotransmitter disorders: an expanding range of neurological syndromes. *The Lancet Neurology*, 2011, 10: 721-733.
- 253.Muller N, Myint A-M, J Schwarz M. Kynurenine pathway in schizophrenia: pathophysiological and therapeutic aspects. *Current pharmaceutical design*, 2011, 17: 130-136.
- 254.Nutt DJ. Relationship of neurotransmitters to the symptoms of major depressive disorder. *J Clin psychiatry*, 2008, 69: 4-7.

- 255.Ng J, Papandreou A, Heales SJ, Kurian MA. Monoamine neurotransmitter disorders—clinical advances and future perspectives. *Nature Reviews Neurology*, 2015, 11: 567-584.
- 256.Yu B, Ruan M, Cui X-b, Guo J-M, Xu L, Dong X-P. Effects of borneol on the pharmacokinetics of geniposide in cortex, hippocampus, hypothalamus and striatum of conscious rat by simultaneous brain microdialysis coupled with UPLC–MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2013, 77: 128-132.
- 257.Greco S, Danysz W, Zivkovic A, Gross R, Stark H. Microdialysate analysis of monoamine neurotransmitters—a versatile and sensitive LC–MS/MS method. *Analytica chimica acta*, 2013, 771: 65-72.
- 258.Burmeister JJ, Pomerleau F, Palmer M, Day BK, Huettl P, Gerhardt GA. Improved ceramic-based multisite microelectrode for rapid measurements of L-glutamate in the CNS. *Journal of neuroscience methods*, 2002, 119: 163-171.
- 259.Burmeister JJ, Gerhardt GA. Self-referencing ceramic-based multisite microelectrodes for the detection and elimination of interferences from the measurement of L-glutamate and other analytes. *Analytical chemistry*, 2001, 73: 1037-1042.
- 260.Pomerleau F, Day B, Huettl P, Burmeister J, Gerhardt G. Real time in vivo measures of l-glutamate in the rat central nervous system using ceramic-based multisite microelectrode arrays. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2003, 1003: 454-457.
- 261.Nickell J, Pomerleau F, Allen J, Gerhardt G. Age-related changes in the dynamics of potassium-evoked L-glutamate release in the striatum of Fischer 344 rats. *Journal of Neural Transmission*, 2005, 112: 87-96.

262. Day BK, Pomerleau F, Burmeister JJ, Huettl P, Gerhardt GA. Microelectrode array studies of basal and potassium-evoked release of L-glutamate in the anesthetized rat brain. *J Neurochem*, 2006, 96: 1626-1635.
263. Cahill PS, Walker QD, Finnegan JM, Mickelson GE, Travis ER, Wightman RM. Microelectrodes for the measurement of catecholamines in biological systems. *Analytical chemistry*, 1996, 68: 3180-3186.
264. Yoshitake T, Fujino K, Kehr J, Ishida J, Nohta H, Yamaguchi M. Simultaneous determination of norepinephrine, serotonin, and 5-hydroxyindole-3-acetic acid in microdialysis samples from rat brain by microbore column liquid chromatography with fluorescence detection following derivatization with benzylamine. *Analytical biochemistry*, 2003, 312: 125-133.
265. Ferry B, Gifu E-P, Sandu I, Denoroy L, Parrot S. Analysis of microdialysate monoamines, including noradrenaline, dopamine and serotonin, using capillary ultra-high performance liquid chromatography and electrochemical detection. *Journal of chromatography B*, 2014, 951: 52-57.
266. Song P, Mabrouk OS, Hershey ND, Kennedy RT. In vivo neurochemical monitoring using benzoyl chloride derivatization and liquid chromatography–mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 2012, 84: 412-419.
267. Nirogi R, Komarneni P, Kandikere V, Boggavarapu R, Bhyrapuneni G, Benade V, Gorentla S. A sensitive and selective quantification of catecholamine neurotransmitters in rat microdialysates by pre-column dansyl chloride derivatization using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography B*, 2013, 913: 41-47.

- 268.Sandlin ZD, Shou M, Shackman JG, Kennedy RT. Microfluidic electrophoresis chip coupled to microdialysis for in vivo monitoring of amino acid neurotransmitters. *Anal Chem*, 2005, 77: 7702-7708.
- 269.Liu G, Chen J, Ma Y. Simultaneous determination of catecholamines and polyamines in PC-12 cell extracts by micellar electrokinetic capillary chromatography with ultraviolet absorbance detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2004, 805: 281-288.
- 270.Sano M, Ferchaud-Roucher V, Nael C, Aguesse A, Poupeau G, Castellano B, Darmaun D. Simultaneous detection of stable isotope-labeled and unlabeled L-tryptophan and of its main metabolites, L-kynurenine, serotonin and quinolinic acid, by gas chromatography/negative ion chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 2014, 49: 128-135.
- 271.Moini M, Schultz CL, Mahmood H. CE/electrospray ionization-MS analysis of underivatized d/l-amino acids and several small neurotransmitters at attomole levels through the use of 18-crown-6-tetracarboxylic acid as a complexation reagent/background electrolyte. *Analytical chemistry*, 2003, 75: 6282-6287.
- 272.Rangiah K, Palakodeti D. Comprehensive analysis of neurotransmitters from regenerating planarian extract using an ultrahigh-performance liquid chromatography/mass spectrometry/selected reaction monitoring method. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2013, 27: 2439-2452.
- 273.Zhang X, Rauch A, Lee H, Xiao H, Rainer G, Logothetis NK. Capillary hydrophilic interaction chromatography/mass spectrometry for simultaneous determination of multiple neurotransmitters in primate cerebral cortex. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry*, 2007, 21: 3621-3628.

- 274.Qu K, Zhao L, Luo X, Zhang C, Hou P, Bi K, Chen X. An LC–MS method for simultaneous determination of five iridoids from Zhi-zi-chi Decoction in rat brain microdialysates and tissue homogenates: towards an in depth study for its antidepressive activity. *Journal of chromatography B*, 2014, 965: 206-215.
- 275.Cai H-L, Zhu R-H. Determination of dansylated monoamine and amino acid neurotransmitters and their metabolites in human plasma by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical biochemistry*, 2010, 396: 103-111.
- 276.Eckstein JA, Ammerman GM, Reveles JM, Ackermann BL. Analysis of glutamine, glutamate, pyroglutamate, and GABA in cerebrospinal fluid using ion pairing HPLC with positive electrospray LC/MS/MS. *Journal of neuroscience methods*, 2008, 171: 190-196.
- 277.Zheng X, Kang A, Dai C, Liang Y, Xie T, Xie L, Peng Y, Wang G, Hao H. Quantitative analysis of neurochemical panel in rat brain and plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 2012, 84: 10044-10051.
- 278.Okay U. Deneysel Alzheimer modeli oluşturulmuş sıçanlarda glutamat geri alımın parametre değişimi ve yeni tedavi önerileri. Tıbbi farmakoloji. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, 2017.
- 279.Gáspár A, Hutka B, Ernyey AJ, Tajti BT, Varga BT, Zádori ZS, Gyertyán I. Intracerebroventricularly Injected Streptozotocin Exerts Subtle Effects on the Cognitive Performance of Long-Evans Rats. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 662173.
- 280.Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. p472. *Amsterdam: Academic Press.*, 2013.

281. Moreira AP, Vizuete AFK, Zin LEF, de Marques CO, Pacheco RF, Leal MB, Gonçalves C-A. The Methylglyoxal/RAGE/NOX-2 Pathway is Persistently Activated in the Hippocampus of Rats with STZ-Induced Sporadic Alzheimer's Disease. *Neurotoxicity Research*, 2022, 40: 395-409.
282. Noor NA, Hosny EN, Khadrawy YA, Mourad IM, Othman AI, Aboul Ezz HS, Mohammed HS. Effect of curcumin nanoparticles on streptozotocin-induced male Wistar rat model of Alzheimer's disease. *Metabolic Brain Disease*, 2022, 37: 343-357.
283. Liu Z, Kumar M, Kabra A. Cucurbitacin B exerts neuroprotection in a murine Alzheimer's disease model by modulating oxidative stress, inflammation, and neurotransmitter levels. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 2022, 27: 71.
284. Su RJ, Zhen JL, Wang W, Zhang JL, Zheng Y, Wang XM. Time-course behavioral features are correlated with Parkinson's disease-associated pathology in a 6-hydroxydopamine hemiparkinsonian rat model. *Molecular Medicine Reports*, 2018, 17: 3356-3363.
285. Alavi MS, Fanoudi S, Hosseini M, Sadeghnia HR. Beneficial effects of levetiracetam in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. *Metabolic Brain Disease*, 2022, 37: 689-700.
286. Erdogan MA, Kirazlar M, Yigitturk G, Erbas O. Digoxin Exhibits Neuroprotective Properties in a Rat Model of Dementia. *Neurochemical Research*, 2022, 47: 1290-1298.
287. Hacımüftüoğlu A, Okay U, Sağsöz E, Taşpınar M. Deneysel Alzheimer Hastalığı Modelinde Optogenetik ve Davranışsal Farklılıkların Glutamat Transporter Aktivatörleriyle Düzeltilmesi. 2019.

- 288.Munley KM, Wade KL, Pradhan DS. Uncovering the seasonal brain: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) as a biochemical approach for studying seasonal social behaviors. *Hormones and Behavior*, 2022, 142: 105161.
- 289.Guimaraes G, Yuan L, Li P. Antisense oligonucleotide in vitro protein binding determination in plasma, brain, and cerebral spinal fluid using hybridization LC-MS/MS. *Drug Metabolism and Disposition*, 2022, 50: 268-276.
- 290.van der Vorm LN, Le Goff C, Peeters S, Makris K, Cavalier E, Heijboer AC. 25-OH Vitamin D concentrations measured by LC-MS/MS are equivalent in serum and EDTA plasma. *Steroids*, 2022, 187: 109096.
- 291.He B, Bi K, Jia Y, Wang J, Lv C, Liu R, Zhao L, Xu H, Chen X, Li Q. Rapid analysis of neurotransmitters in rat brain using ultra-fast liquid chromatography and tandem mass spectrometry: application to a comparative study in normal and insomnic rats. *Journal of Mass Spectrometry*, 2013, 48: 969-978.
- 292.Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 1999, 66: 137-147.
- 293.Sun L, Liu R, Yang H, Yu T, Wu J, Wang Q. Characteristics of Epileptiform Spike-wave Discharges and Chronic Histopathology in Controlled Cortical Impact Model of Sprague–Dawley Rats. *Neurochemical Research*, 2022: 1-12.
- 294.Elsaeed E, Hamad A, Erfan O, El-Shahat MA, Ebrahim FA. Effect of exenatide on apoptosis, autophagy, and necroptosis in the hippocampus of STZ-induced diabetic female rats: an immunohistochemical study. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, D. Histology & Histochemistry*, 2022, 14: 1-25.

295. Khozhai L. Immunohistochemical Detection of GABA and $\alpha 1$ -Subunit of GABAA-Receptor in Cells of the Subventricular Zone of the Rat Brain in the Neonatal Period. *Cell and Tissue Biology*, 2022, 16: 38-44.
296. Gledacheva V, Pencheva M, Nikolova S, Stefanova I. Ability of 2-Chloro-N-(1-(3, 4-dimethoxyphenyl) propan-2-yl)-2-phenylacetamide to Stimulate Endogenous Nitric Oxide Synthesis. *Applied Sciences*, 2022, 12: 4473.
297. Karikari TK, Ashton NJ, Brinkmalm G, Brum WS, Benedet AL, Montoliu-Gaya L, Lantero-Rodriguez J, Pascoal TA, Suárez-Calvet M, Rosa-Neto P. Blood phospho-tau in Alzheimer disease: analysis, interpretation, and clinical utility. *Nature Reviews Neurology*, 2022: 1-19.
298. Nandi A, Counts N, Chen S, Seligman B, Tortorice D, Vigo D, Bloom DE. Global and regional projections of the economic burden of Alzheimer's disease and related dementias from 2019 to 2050: A value of statistical life approach. *EClinicalMedicine*, 2022, 51: 101580.
299. Podcasy JL, Epperson CN. Considering sex and gender in Alzheimer disease and other dementias. *Dialogues in clinical neuroscience*, 2022.
300. Masdeu JC, Pascual B, Fujita M. Imaging neuroinflammation in neurodegenerative disorders. *Journal of Nuclear Medicine*, 2022, 63: 45S-52S.
301. Maggio MG, Piazzitta D, Andaloro A, Latella D, Sciarrone F, Casella C, Naro A, Manuli A, Calabrò RS. Embodied cognition in neurodegenerative disorders: What do we know so far? A narrative review focusing on the mirror neuron system and clinical applications. *Journal of Clinical Neuroscience*, 2022, 98: 66-72.
302. Fong TG, Inouye SK. The inter-relationship between delirium and dementia: the importance of delirium prevention. *Nature Reviews Neurology*, 2022: 1-18.

303. Zhu BT. Pathogenic Mechanism of Autoimmune Diabetes Mellitus in Humans: Potential Role of Streptozotocin-Induced Selective Autoimmunity against Human Islet β -Cells. *Cells*, 2022, 11: 492.
304. Halawany AME, Sayed NS, Abdallah HM, Dine RSE. Protective effects of gingerol on streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's disease: emphasis on inhibition of β -amyloid, COX-2, alpha-, beta-secretases and A β 1a. *Scientific Reports*, 2017, 7: 1-11.
305. Grieb P. Intracerebroventricular streptozotocin injections as a model of Alzheimer's disease: in search of a relevant mechanism. *Molecular neurobiology*, 2016, 53: 1741-1752.
306. Guo Z, Chen Y, Mao Y-F, Zheng T, Jiang Y, Yan Y, Yin X, Zhang B. Long-term treatment with intranasal insulin ameliorates cognitive impairment, tau hyperphosphorylation, and microglial activation in a streptozotocin-induced Alzheimer's rat model. *Scientific Reports*, 2017, 7: 1-12.
307. Kamat PK, Kalani A, Rai S, Tota SK, Kumar A, Ahmad AS. Streptozotocin intracerebroventricular-induced neurotoxicity and brain insulin resistance: a therapeutic intervention for treatment of sporadic Alzheimer's disease (sAD)-like pathology. *Molecular neurobiology*, 2016, 53: 4548-4562.
308. Akhtar A, Dhaliwal J, Sah SP. 7, 8-Dihydroxyflavone improves cognitive functions in ICV-STZ rat model of sporadic Alzheimer's disease by reversing oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and insulin resistance. *Psychopharmacology*, 2021, 238: 1991-2009.
309. Chen Y, Tian Z, Liang Z, Sun S, Dai C-l, Lee MH, LaFerla FM, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Liu F. Brain gene expression of a sporadic (icv-STZ Mouse) and a familial mouse model (3xTg-AD mouse) of Alzheimer's disease. *PloS one*, 2012, 7: e51432.

310. Moosavi M, Hooshmandi E, Javadpour P, Maghsoudi N, Katinger H, Ghasemi R. Effect of carbamylated erythropoietin Fc fusion protein (CEPO-Fc) on learning and memory impairment and hippocampal apoptosis induced by intracerebroventricular administration of streptozotocin in rats. *Behavioural brain research*, 2020, 384: 112554.
311. Deshmukh R, Kaundal M, Bansal V, Samardeep. Caffeic acid attenuates oxidative stress, learning and memory deficit in intra-cerebroventricular streptozotocin induced experimental dementia in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2016, 81: 56-62.
312. Wickens AP. Ageing and the free radical theory. *Respiration physiology*, 2001, 128: 379-391.
313. Michailidis M, Moraitou D, Tata DA, Kalinderi K, Papamitsou T, Papaliagkas V. Alzheimer's Disease as Type 3 Diabetes: Common Pathophysiological Mechanisms between Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23: 2687.
314. Lynn J, Park M, Ogunwale C, Acquah-Mensah GK. A tale of two diseases: Exploring mechanisms linking diabetes mellitus with Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease*, 2022, 85: 485-501.
315. Tang B, Wang Y, Jiang X, Thambisetty M, Ferrucci L, Johnell K, Hägg S. Genetic Variation in Targets of Anti-diabetic Drugs and Alzheimer Disease Risk: A Mendelian Randomization Study. *Neurology*, 2022.
316. Sonkusare S, Srinivasan K, Kaul C, Ramarao P. Effect of donepezil and lercanidipine on memory impairment induced by intracerebroventricular streptozotocin in rats. *Life sciences*, 2005, 77: 1-14.

317. Pathan AR, Viswanad B, Sonkusare SK, Ramarao P. Chronic administration of pioglitazone attenuates intracerebroventricular streptozotocin induced-memory impairment in rats. *Life sciences*, 2006, 79: 2209-2216.
318. Kumar Prakash A, Kumar A. Effect of chronic treatment of carvedilol on oxidative stress in an intracerebroventricular streptozotocin induced model of dementia in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2009, 61: 1665-1672.
319. Salkovic-Petrisic M, Knezovic A, Osmanovic-Barilar J, Smailovic U, Trkulja V, Riederer P, Amit T, Mandel S, Youdim MB. Multi-target iron-chelators improve memory loss in a rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Life sciences*, 2015, 136: 108-119.
320. Salkovic-Petrisic M, Osmanovic-Barilar J, Brückner MK, Hoyer S, Arendt T, Riederer P. Cerebral amyloid angiopathy in streptozotocin rat model of sporadic Alzheimer's disease: a long-term follow up study. *Journal of Neural Transmission*, 2011, 118: 765-772.
321. Hashemi-Firouzi N, Shahidi S, Soleimani-Asl S, Komaki A. 5-Hydroxytryptamine receptor 6 antagonist, SB258585 exerts neuroprotection in a rat model of Streptozotocin-induced Alzheimer's disease. *Metabolic Brain Disease*, 2018, 33: 1243-1253.
322. Knezovic A, Barilar JO, Babic A, Bagaric R, Farkas V, Riederer P, Salkovic-Petrisic M. Glucagon-like peptide-1 mediates effects of oral galactose in streptozotocin-induced rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, 2018, 135: 48-62.
323. Majkutewicz I, Kurowska E, Podlacha M, Myślińska D, Grembecka B, Ruciński J, Pierzynowska K, Wrona D. Age-dependent effects of dimethyl fumarate on

- cognitive and neuropathological features in the streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. *Brain Research*, 2018, 1686: 19-33.
- 324.Yamini P, Ray R, Chopra K. Vitamin D3 attenuates cognitive deficits and neuroinflammatory responses in ICV-STZ induced sporadic Alzheimer's disease. *Inflammopharmacology*, 2018, 26: 39-55.
- 325.Grünblatt E, Salkovic-Petrisic M, Osmanovic J, Riederer P, Hoyer S. Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. *Journal of neurochemistry*, 2007, 101: 757-770.
- 326.Salkovic-Petrisic M, Tribl F, Schmidt M, Hoyer S, Riederer P. Alzheimer-like changes in protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 in rat frontal cortex and hippocampus after damage to the insulin signalling pathway. *Journal of neurochemistry*, 2006, 96: 1005-1015.
- 327.Blokland A, Jolles J. Spatial learning deficit and reduced hippocampal ChAT activity in rats after an ICV injection of streptozotocin. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 1993.
- 328.Deng Y, Li B, Liu Y, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong C-X. Dysregulation of insulin signaling, glucose transporters, O-GlcNAcylation, and phosphorylation of tau and neurofilaments in the brain: Implication for Alzheimer's disease. *The American journal of pathology*, 2009, 175: 2089-2098.
- 329.Jee Y-S, Ko I-G, Sung Y-H, Lee J-W, Kim Y-S, Kim S-E, Kim B-K, Seo J-H, Shin M-S, Lee H-H. Effects of treadmill exercise on memory and c-Fos expression in the hippocampus of the rats with intracerebroventricular injection of streptozotocin. *Neuroscience letters*, 2008, 443: 188-192.

330. Moreira-Silva D, Carrettiero DC, Oliveira AS, Rodrigues S, dos Santos-Lopes J, Canas PM, Cunha RA, Almeida MC, Ferreira TL. Anandamide effects in a streptozotocin-induced Alzheimer's disease-like sporadic dementia in rats. *Frontiers in neuroscience*, 2018, 12: 653.
331. Rodrigues L, Dutra MF, Ilha J, Biasibetti R, Quincozes-Santos A, Leite MC, Marcuzzo S, Achaval M, Gonçalves C-A. Treadmill training restores spatial cognitive deficits and neurochemical alterations in the hippocampus of rats submitted to an intracerebroventricular administration of streptozotocin. *Journal of Neural Transmission*, 2010, 117: 1295-1305.
332. C Correia S, X Santos R, S Santos M, Casadesus G, C LaManna J, Perry G, A Smith M, I Moreira P. Mitochondrial abnormalities in a streptozotocin-induced rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, 2013, 10: 406-419.
333. Osmanovic Barilar J, Knezovic A, Grünblatt E, Riederer P, Salkovic-Petrisic M. Nine-month follow-up of the insulin receptor signalling cascade in the brain of streptozotocin rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, 2015, 122: 565-576.
334. Samy DM, Ismail CA, Nassra RA, Zeitoun TM, Nomair AM. Downstream modulation of extrinsic apoptotic pathway in streptozotocin-induced Alzheimer's dementia in rats: erythropoietin versus curcumin. *European journal of pharmacology*, 2016, 770: 52-60.
335. Zappa Villar MF, López Hanotte J, Falomir Lockhart E, Trípodí LS, Morel GR, Reggiani PC. Intracerebroventricular streptozotocin induces impaired Barnes maze spatial memory and reduces astrocyte branching in the CA1 and CA3 hippocampal regions. *Journal of Neural Transmission*, 2018, 125: 1787-1803.

336. Bavarsad K, Hadjzadeh M-A-R, Hosseini M, Pakdel R, Beheshti F, Bafadam S, Ashaari Z. Effects of levothyroxine on learning and memory deficits in a rat model of Alzheimer's disease: the role of BDNF and oxidative stress. *Drug and chemical toxicology*, 2020, 43: 57-63.
337. Li L, Zhang Z-F, Holscher C, Gao C, Jiang Y-H, Liu Y-Z. (Val8) glucagon-like peptide-1 prevents tau hyperphosphorylation, impairment of spatial learning and ultra-structural cellular damage induced by streptozotocin in rat brains. *European journal of pharmacology*, 2012, 674: 280-286.
338. Zhou S, Yu G, Chi L, Zhu J, Zhang W, Zhang Y, Zhang L. Neuroprotective effects of edaravone on cognitive deficit, oxidative stress and tau hyperphosphorylation induced by intracerebroventricular streptozotocin in rats. *Neurotoxicology*, 2013, 38: 136-145.
339. Knezovic A, Osmanovic-Barilar J, Curlin M, Hof PR, Simic G, Riederer P, Salkovic-Petrisic M. Staging of cognitive deficits and neuropathological and ultrastructural changes in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, 2015, 122: 577-592.
340. Voronkov D, Stavrovskaya A, Stelmashook E, Genrikhs E, Isaev N. Neurodegenerative changes in rat brain in streptozotocin model of Alzheimer's disease. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2019, 166: 793-796.
341. Steen E, Terry BM, J Rivera E, Cannon JL, Neely TR, Tavares R, Xu XJ, Wands JR, de la Monte SM. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease—is this type 3 diabetes? *Journal of Alzheimer's disease*, 2005, 7: 63-80.

342. Ayuob NN, Firgany AE-DL, El-Mansy AA, Ali S. Can *Ocimum basilicum* relieve chronic unpredictable mild stress-induced depression in mice? *Experimental and molecular pathology*, 2017, 103: 153-161.
343. Zhu L, Zhang Z, Hou X-j, Wang Y-f, Yang J-y, Wu C-f. Inhibition of PDE5 attenuates streptozotocin-induced neuroinflammation and tau hyperphosphorylation in a streptozotocin-treated rat model. *Brain Research*, 2019, 1722: 146344.
344. Akhtar A, Bishnoi M, Sah SP. Sodium orthovanadate improves learning and memory in intracerebroventricular-streptozotocin rat model of Alzheimer's disease through modulation of brain insulin resistance induced tau pathology. *Brain Research Bulletin*, 2020, 164: 83-97.
345. Bloch K, Gil-Ad I, Vanichkin A, Hornfeld SH, Koroukhov N, Taler M, Vardi P, Weizman A. Intracerebroventricular streptozotocin induces obesity and dementia in Lewis rats. *Journal of Alzheimer's disease*, 2017, 60: 121-136.
346. Murtishaw AS, Heaney CF, Bolton MM, Sabbagh JJ, Langhardt MA, Kinney JW. Effect of acute lipopolysaccharide-induced inflammation in intracerebroventricular-streptozotocin injected rats. *Neuropharmacology*, 2016, 101: 110-122.
347. Rostami F, Javan M, Moghimi A, Haddad-Mashadrizheh A, Fereidoni M. Streptozotocin-induced hippocampal astrogliosis and insulin signaling malfunction as experimental scales for subclinical sporadic Alzheimer model. *Life sciences*, 2017, 188: 172-185.
348. Kuleshkaya N, Voikar V. Assessment of mouse anxiety-like behavior in the light–dark box and open-field arena: role of equipment and procedure. *Physiology & behavior*, 2014, 133: 30-38.

349. Deacon RM. Housing, husbandry and handling of rodents for behavioral experiments. *Nature protocols*, 2006, 1: 936-946.
350. Crusio WE. The genetics of exploratory behavior. *Behavioral Genetics of the Mouse*, 2013, 1: 148-154.
351. Hornykiewicz O. Dopamine and its physiological significance in brain function. İçinde: *Structure and Physiology*, Elsevier, 1972: 367-415.
352. Shimizu H, Shimomura Y, Satou N, Ohshima K, Mori M, Kobayashi I, Kobayashi S, Hayashi T, Tadokoro S. Locomotor activity and dopamine turnover rate in the streptozotocin-injected rats. *J Jpn Diabetes Soc*, 1986, 28: 539-541.
353. Smythe G, Grunstein H, Bradshaw J, Nicholson M, Compton P. Relationships between brain noradrenergic activity and blood glucose. *Nature*, 1984, 308: 65-67.
354. Trulsson M, Himmel C. Decreased brain dopamine synthesis rate and increased [3H] spiroperidol binding in streptozotocin-diabetic rats. *Journal of neurochemistry*, 1983, 40: 1456-1459.
355. Bailey EL, Overstreet DH, Crocker AD. Effects of intrahippocampal injections of the cholinergic neurotoxin AF64A on open-field activity and avoidance learning in the rat. *Behavioral and neural biology*, 1986, 45: 263-274.
356. Carey RJ. Septal lesions augment locomotor hyperactivity induced by amphetamine and not scopolamine. *Psychopharmacology*, 1982, 76: 96-97.
357. Roth RH, Bunney BS. Interaction of cholinergic neurons with other chemically defined neuronal systems in the CNS. İçinde: *Biology of cholinergic function*, Raven Press New York, 1976: 379-394.
358. Wu C-R, Lin H-C, Su M-H. Reversal by aqueous extracts of *Cistanche tubulosa* from behavioral deficits in Alzheimer's disease-like rat model: relevance for

- amyloid deposition and central neurotransmitter function. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 14: 1-11.
- 359.Saxena G, Patro IK, Nath C. ICV STZ induced impairment in memory and neuronal mitochondrial function: A protective role of nicotinic receptor. *Behavioural brain research*, 2011, 224: 50-57.
- 360.Agrawal R, Tyagi E, Shukla R, Nath C. Insulin receptor signaling in rat hippocampus: a study in STZ (ICV) induced memory deficit model. *European Neuropsychopharmacology*, 2011, 21: 261-273.
- 361.Rajasekar N, Nath C, Hanif K, Shukla R. Intranasal insulin improves cerebral blood flow, Nrf-2 expression and BDNF in STZ (ICV)-induced memory impaired rats. *Life sciences*, 2017, 173: 1-10.
- 362.Liu C, Wu Y, Zha S, Liu M, Wang Y, Yang G, Ma K, Fei Y, Zhang Y, Hu X. Treatment effects of tanshinone IIA against intracerebroventricular streptozotocin induced memory deficits in mice. *Brain Research*, 2016, 1631: 137-146.
- 363.Yang W, Liu Y, Xu QQ, Xian YF, Lin ZX. Sulforaphene Ameliorates Neuroinflammation and Hyperphosphorylated Tau Protein via Regulating the PI3K/Akt/GSK-3 β Pathway in Experimental Models of Alzheimer's Disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 4754195.
- 364.Ding H, Chen H, Jiang Y, TU P, MA J, Zhang W. Effect of echinacoside on monoamine neurotransmitters in hippocampus and cortex of rats with Alzheimer' s disease. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2014: 1564-1568, 1569.
- 365.Shiao Y-J, Su M-H, Lin H-C, Wu C-R. Echinacoside ameliorates the memory impairment and cholinergic deficit induced by amyloid beta peptides via the inhibition of amyloid deposition and toxicology. *Food & function*, 2017, 8: 2283-2294.

366. Yamada K, Tanaka T, Mamiya T, Shiotani T, Kameyama T, Nabeshima T. Improvement by nefiracetam of β -amyloid-(1-42)-induced learning and memory impairments in rats. *British journal of pharmacology*, 1999, 126: 235-244.
367. Song L, Piao Z, Yao L, Zhang L, Lu Y. Schisandrin ameliorates cognitive deficits, endoplasmic reticulum stress and neuroinflammation in streptozotocin (STZ)-induced Alzheimer's disease rats. *Exp Anim*, 2020, 69: 363-373.
368. Akbarnejad Z, Esmaeilpour K, Shabani M, Asadi-Shekaari M, Saeedi Goraghani M, Ahmadi-Zeidabadi M. Spatial memory recovery in Alzheimer's rat model by electromagnetic field exposure. *Int J Neurosci*, 2018, 128: 691-696.
369. Reeta KH, Singh D, Gupta YK. Edaravone attenuates intracerebroventricular streptozotocin-induced cognitive impairment in rats. *Eur J Neurosci*, 2017, 45: 987-997.
370. Lannert H, Hoyer S. Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. *Behavioral neuroscience*, 1998, 112: 1199.
371. Sharma M, Gupta Y. Effect of chronic treatment of melatonin on learning, memory and oxidative deficiencies induced by intracerebroventricular streptozotocin in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2001, 70: 325-331.
372. Kurochkin IV, Goto S. Alzheimer's β -amyloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme. *FEBS letters*, 1994, 345: 33-37.
373. Ferretti MT, Bruno MA, Ducatenzeiler A, Klein WL, Cuellar AC. Intracellular A β -oligomers and early inflammation in a model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 2012, 33: 1329-1342.

374. Sugimoto H. The new approach in development of anti-Alzheimer's disease drugs via the cholinergic hypothesis. *Chemico-Biological Interactions*, 2008, 175: 204-208.
375. Thenmozhi AJ, Raja TRW, Janakiraman U, Manivasagam T. Neuroprotective effect of hesperidin on aluminium chloride induced Alzheimer's disease in Wistar rats. *Neurochemical Research*, 2015, 40: 767-776.
376. Racchi M, Mazzucchelli M, Porrello E, Lanni C, Govoni S. Acetylcholinesterase inhibitors: novel activities of old molecules. *Pharmacological research*, 2004, 50: 441-451.
377. Iqbal K, Liu F, Gong C-X, Grundke-Iqbal I. Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. *Current Alzheimer Research*, 2010, 7: 656-664.
378. Kiris E, Ventimiglia D, Feinstein SC. Quantitative Analysis of MAP-Mediated Regulation of Microtubule Dynamic Instability In Vitro: Focus on Tau. *Methods in cell biology*, 2010, 95: 481-503.
379. Dalla Y, Singh N, Jaggi AS, Singh D. Memory restorative role of statins in experimental dementia: an evidence of their cholesterol dependent and independent actions. *Pharmacological reports*, 2010, 62: 784-796.
380. Qu Z, Jiao Z, Sun X, Zhao Y, Ren J, Xu G. Effects of streptozotocin-induced diabetes on tau phosphorylation in the rat brain. *Brain Research*, 2011, 1383: 300-306.
381. Peng D, Pan X, Cui J, Ren Y, Zhang J. Hyperphosphorylation of tau protein in hippocampus of central insulin-resistant rats is associated with cognitive impairment. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2013, 32: 1417-1425.
382. Lee C-W, Shih Y-H, Wu S-Y, Yang T, Lin C, Kuo Y-M. Hypoglycemia induces tau hyperphosphorylation. *Current Alzheimer Research*, 2013, 10: 298-308.

383. Shi L, Zhang Z, Li L, Hölscher C. A novel dual GLP-1/GIP receptor agonist alleviates cognitive decline by re-sensitizing insulin signaling in the Alzheimer icv. STZ rat model. *Behavioural brain research*, 2017, 327: 65-74.
384. Gupta S, Yadav K, Mantri SS, Singhal NK, Ganesh S, Sandhir R. Evidence for compromised insulin signaling and neuronal vulnerability in experimental model of sporadic Alzheimer's disease. *Molecular neurobiology*, 2018, 55: 8916-8935.
385. Mishra SK, Singh S, Shukla S, Shukla R. Intracerebroventricular streptozotocin impairs adult neurogenesis and cognitive functions via regulating neuroinflammation and insulin signaling in adult rats. *Neurochemistry International*, 2018, 113: 56-68.
386. Li C, Liu W, Li X, Zhang Z, Qi H, Liu S, Yan N, Xing Y, Hölscher C, Wang Z. The novel GLP-1/GIP analogue DA5-CH reduces tau phosphorylation and normalizes theta rhythm in the icv. STZ rat model of AD. *Brain and Behavior*, 2020, 10: e01505.
387. Li Y, Xu P, Shan J, Sun W, Ji X, Chi T, Liu P, Zou L. Interaction between hyperphosphorylated tau and pyroptosis in forskolin and streptozotocin induced AD models. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 121: 109618.
388. Dehghan-Shasaltaneh M, Naghdi N, Choopani S, Alizadeh L, Bolouri B, Masoudi-Nejad A, Riazi GH. Determination of the best concentration of streptozotocin to create a diabetic brain using histological techniques. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2016, 59: 24-35.
389. Block ML, Zecca L, Hong J-S. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nature Reviews Neuroscience*, 2007, 8: 57-69.
390. Karkhah A, Saadi M, Pourabdolhossein F, Saleki K, Nouri HR. Indomethacin attenuates neuroinflammation and memory impairment in an STZ-induced model

- of Alzheimer's like disease. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 2021, 43: 758-766.
- 391.Nabeshima T, Nitta A. Memory impairment and neuronal dysfunction induced by β -amyloid protein in rats. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 1994, 174: 241-249.
- 392.Jazi R, Lalonde R, Qian S, Strazielle C. Regional brain evaluation of acetylcholinesterase activity in PS1/A246E transgenic mice. *Neuroscience Research*, 2009, 63: 106-114.
- 393.Raichle ME, Kutt H, Louis S, McDowell F. Neurotoxicity of intravenously administered penicillin G. *Archives of neurology*, 1971, 25: 232-239.
- 394.Snavely SRH, Gleen R. The neurotoxicity of antibacterial agents. *Annals of internal medicine*, 1984, 101: 92-104.
- 395.Gelinas JN, Khodagholy D, Thesen T, Devinsky O, Buzsáki G. Interictal epileptiform discharges induce hippocampal–cortical coupling in temporal lobe epilepsy. *Nature medicine*, 2016, 22: 641-648.
- 396.Chen L-E, Wu F, Zhao A, Ge H, Zhan H. Protection efficacy of the extract of Ginkgo biloba against the learning and memory damage of rats under repeated high sustained+ Gz exposure. *Evidence-based complementary and Alternative Medicine*, 2016, 2016.
- 397.Arora R, Deshmukh R. Embelin attenuates intracerebroventricular streptozotocin-induced behavioral, biochemical, and neurochemical abnormalities in rats. *Molecular neurobiology*, 2017, 54: 6670-6680.
- 398.Jackson WS. Selective vulnerability to neurodegenerative disease: the curious case of Prion Protein. *Disease models & mechanisms*, 2014, 7: 21-29.

- 399.Kosaraju J, Gali CC, Khatwal RB, Dubala A, Chinni S, Holsinger RD, Madhunapantula VSR, Nataraj SKM, Basavan D. Saxagliptin: a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor ameliorates streptozotocin induced Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, 2013, 72: 291-300.
- 400.Lu Y, Dong Y, Tucker D, Wang R, Ahmed ME, Brann D, Zhang Q. Treadmill exercise exerts neuroprotection and regulates microglial polarization and oxidative stress in a streptozotocin-induced rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease*, 2017, 56: 1469-1484.
- 401.Wu C, Yang L, Tucker D, Dong Y, Zhu L, Duan R, Liu TC-Y, Zhang Q. Beneficial effects of exercise pretreatment in a sporadic Alzheimer's rat model. *Medicine and science in sports and exercise*, 2018, 50: 945.
- 402.Choi DH, Kwon IS, Koo JH, Jang YC, Kang EB, Byun JE, Um HS, Park HS, Yeom DC, Cho IH. The effect of treadmill exercise on inflammatory responses in rat model of streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's type. *Journal of exercise nutrition & biochemistry*, 2014, 18: 225.
- 403.Kang EB, Cho JY. Effects of treadmill exercise on brain insulin signaling and β -amyloid in intracerebroventricular streptozotocin induced-memory impairment in rats. *Journal of exercise nutrition & biochemistry*, 2014, 18: 89.
- 404.Burmeister JJ, Moxon K, Gerhardt GA. Ceramic-based multisite microelectrodes for electrochemical recordings. *Analytical chemistry*, 2000, 72: 187-192.
- 405.Robinson DL, Hermans A, Seipel AT, Wightman RM. Monitoring rapid chemical communication in the brain. *Chemical reviews*, 2008, 108: 2554-2584.
- 406.Kasasbeh A, Lee K, Bieber A, Bennet K, Chang S-Y. Wireless neurochemical monitoring in humans. *Stereotactic and functional neurosurgery*, 2013, 91: 141-147.

407. Adams RN. In vivo electrochemical measurements in the CNS. *Progress in neurobiology*, 1990, 35: 297-311.
408. Bortz D, Mikkelsen J, Bruno J. Localized infusions of the partial $\alpha 7$ nicotinic receptor agonist SSR180711 evoke rapid and transient increases in prefrontal glutamate release. *Neuroscience*, 2013, 255: 55-67.
409. Cassidy CM, Zucca FA, Girgis RR, Baker SC, Weinstein JJ, Sharp ME, Bellei C, Valmadre A, Vanegas N, Kegeles LS. Neuromelanin-sensitive MRI as a noninvasive proxy measure of dopamine function in the human brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2019, 116: 5108-5117.
410. Liu Y, Liu Z, Zhao F, Tian Y. Long-Term Tracking and Dynamically Quantifying of Reversible Changes of Extracellular Ca^{2+} in Multiple Brain Regions of Freely Moving Animals. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60: 14429-14437.
411. Zhang C, Liu Z, Zhang L, Zhu A, Liao F, Wan J, Zhou J, Tian Y. A Robust $\text{Au}-\text{C}\equiv\text{C}$ Functionalized Surface: Toward Real-Time Mapping and Accurate Quantification of Fe^{2+} in the Brains of Live AD Mouse Models. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, 59: 20499-20507.
412. Shadlaghani A, Farzaneh M, Kinser D, Reid RC. Direct electrochemical detection of glutamate, acetylcholine, choline, and adenosine using non-enzymatic electrodes. *Sensors*, 2019, 19: 447.
413. Zhang J, Jaquins-Gerstl A, Nesbitt KM, Rutan SC, Michael AC, Weber SG. In Vivo Monitoring of Serotonin in the Striatum of Freely Moving Rats with One Minute Temporal Resolution by Online Microdialysis–Capillary High-Performance Liquid Chromatography at Elevated Temperature and Pressure. *Analytical chemistry*, 2013, 85: 9889-9897.

- 414.Da Y, Luo S, Tian Y. Real-Time Monitoring of Neurotransmitters in the Brain of Living Animals. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2022.
- 415.Zhu X, Xu L, Wu T, Xu A, Zhao M, Liu S. Continuous monitoring of bisulfide variation in microdialysis effluents by on-line droplet-based microfluidic fluorescent sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 55: 438-445.
- 416.Cheng H, Zhang L, He J, Guo W, Zhou Z, Zhang X, Nie S, Wei H. Integrated nanozymes with nanoscale proximity for in vivo neurochemical monitoring in living brains. *Analytical chemistry*, 2016, 88: 5489-5497.
- 417.Wang C, Bi X, Zhao X, Zhou M, Ding Y, Lin Y. In Vivo and Online Optical Ascorbic Acid Monitoring in Living Rat Brains Using a Brightfield Microscope-Based Online Detection Platform. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2019, 7: 3715-3721.
- 418.Gu F, Zhou X, Zhu X, Zhao M, Hao J, Yu P, Mao L. In vivo and continuous measurement of bisulfide in the hippocampus of rat's brain by an on-line integrated microdialysis/droplet-based microfluidic system. *Analyst*, 2015, 140: 3814-3819.
- 419.Schultz J, Uddin Z, Singh G, Howlader MM. Glutamate sensing in biofluids: Recent advances and research challenges of electrochemical sensors. *Analyst*, 2020, 145: 321-347.
- 420.Hughes G, Pemberton R, Fielden PR, Hart JP. The design, development and application of electrochemical glutamate biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2016, 79: 106-113.
- 421.Jamal M, Chakrabarty S, Shao H, McNulty D, Yousuf MA, Furukawa H, Khosla A, Razeeb KM. A non enzymatic glutamate sensor based on nickel oxide nanoparticle. *Microsystem Technologies*, 2018, 24: 4217-4223.

422. Jamal M, Chakrabarty S, Yousuf MA, Khosla A, Razeed KM. Micro and nanostructure based electrochemical sensor platform for glutamate detection. *Microsystem Technologies*, 2018, 24: 4193-4206.
423. Nguyen HH, Lee SH, Lee UJ, Fermin CD, Kim M. Immobilized enzymes in biosensor applications. *Materials*, 2019, 12: 121.
424. Jamal M, Hasan M, Mathewson A, Razeed KM. Disposable sensor based on enzyme-free Ni nanowire array electrode to detect glutamate. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 40: 213-218.
425. Govindarajan S, McNeil CJ, Lowry JP, McMahon CP, O'Neill RD. Highly selective and stable microdisc biosensors for l-glutamate monitoring. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2013, 178: 606-614.
426. Salazar P, Martín M, O'Neill R, González-Mora J. Glutamate microbiosensors based on Prussian Blue modified carbon fiber electrodes for neuroscience applications: In-vitro characterization. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2016, 235: 117-125.
427. Özel RE, Ispas C, Ganesana M, Leiter J, Andreescu S. Glutamate oxidase biosensor based on mixed ceria and titania nanoparticles for the detection of glutamate in hypoxic environments. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 52: 397-402.
428. Kurbanoglu S, Zafar MN, Tasca F, Aslam I, Spadiut O, Leech D, Haltrich D, Gorton L. Amperometric flow injection analysis of glucose and galactose based on engineered pyranose 2-oxidases and osmium polymers for biosensor applications. *Electroanalysis*, 2018, 30: 1496-1504.
429. Bollella P, Gorton L. Enzyme based amperometric biosensors. *Current opinion in Electrochemistry*, 2018, 10: 157-173.

430. Gerhardt GA, Oke AF, Nagy G, Moghaddam B, Adams RN. Nafion-coated electrodes with high selectivity for CNS electrochemistry. *Brain Res*, 1984, 290: 390-395.
431. Oldenziel WH, Dijkstra G, Cremers TI, Westerink BH. In vivo monitoring of extracellular glutamate in the brain with a microsensor. *Brain Res*, 2006, 1118: 34-42.



EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

	SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ Graduate School of Health Sciences	
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU¹		
Öğrencinin Adı ve Soyadı	Cemil BAYRAM	
Ana Bilim Dalı	Tıbbi Farmakoloji	
Öğrencinin Kayıtlı Olduğu Program Türü	Doktora	
Yukarıda bilgileri verilen tezin intihal tespit yazılımıyla (Turnitin) yapılan tarama sonucunda elde edilen benzerlik oranları aşağıdaki gibidir. Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi hâlde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.		
Bölümler	Benzerlik Oranı	Maksimum Benzerlik Oranları
I. Giriş	% 0	% 15
II. Genel Bilgiler	% 2	% 35
III. Materyal ve Metod	% 5	% 35
IV. Bulgular	% 5	% 15
V. Tartışma	% 0	% 20
<i>Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5 'den büyük olmaması gerekir.</i>		

EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Rektörlük



Sayı : 75296309-050.01.04-E.1900378966
Konu : HADYЕК Kararı.

31.12.2019

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

İlgi : 23.12.2019 tarihli ve 42190979-000-E.1900368826 sayılı belge.

İlgide kayıtlı yazınız; Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 26.12.2019 tarih ve 16 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 249 no'lu kararı ile sözkonusu araştırma çalışmasının yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğuna, mevcut oy birliği ile karar verilmiş olup, çalışmanın Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülmesine ve taahhütname hükümlerine göre çalışmada kullanılan hayvanlara ait bilgilerin, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğünün, Hayvanları Koruma Bilgi Sistemi (HAYBİS)'ne girilebilmesi için ekte sunulan "HADYЕК Sonuç Raporu"nun Başkanlığımıza gönderilmesi hususunda;

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi 25240 Erzurum
Tel: +90 442 2317222
Elektronik Ağ: <http://www.atauni.edu.tr/#?birim=veteriner-fakultesi>

Kep Adresi: atauni@hs01.kep.tr

Bilgi: Mehmet KOCA
Faks: +90 442 2317244
E-Posta: vetfak@atauni.edu.tr



TOPLANTI TARİHİ : 26.12.2019

TOPLANTI SAYISI : 16

KARAR N0 249: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Dahili Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU'nun yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülecek olan **“Deneysel Alzheimer Modeli Oluşturulan ve Serbest Hareket Edebilen Sıçanlarda Glutamatın Geri Alınım Sürelerinin İn Vivo Voltametri Tekniği ile Değerlendirilmesi”** isimli araştırma çalışması ile ilgili Tıp Fakültesi Dekanlığının 23.12.2019 tarihli ve 42190979-000-E.1900368826 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, çalışma sonucunun Başkanlığımıza bildirilmesinin, mevcut oy birliği ile kabulüne; **(Yönetmeliğin 8.maddesinin 8/h bendi gereğince, Prof.Dr.Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU, görüşmeye katılmadı ve oy kullanmadı).** karar verildi.

Ek : Sonuç Raporu. 1 Adet.

