



**DENEYSEL ALZHEİMER MODELİ OLUŞTURULMUŞ
SERBEST HAREKET EDEBİLEN SIÇANLARDA
AMPİSİLİN VE MEMANTİN TEDAVİLERİNİN
NÖROTRANSMİTTER DEĞİŞİMLERİ ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİ**

Muhammed Sait ERTUĞRUL
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU

Doktora Tezi-2022

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL ALZHEİMER MODELİ OLUŞTURULMUŞ
SERBEST HAREKET EDEBİLEN SIÇANLARDA
AMPİSİLİN ve MEMANTİN TEDAVİLERİNİN
NÖROTRANSMİTTER DEĞİŞİMLERİ ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİ**

Muhammed Sait ERTUĞRUL

**Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

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

ERZURUM
2022

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT.....	VI
TABLolar DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	XIII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Alzheimer Hastalığı	5
2.1.1. Alzheimer Hastalığının Tarihçesi	5
2.1.2. Alzheimer Hastalığı Epidemiyolojisi.....	6
2.1.3. Alzheimer Hastalığının Risk Faktörleri	7
2.1.4. Alzheimer Hastalığının Patogenezi	11
2.1.5. Alzheimer Hastalığının Semptomları	13
2.1.6. Tanı Yöntemleri.....	16
2.1.7. Alzheimer Hastalığında Güncel Tedavi Yaklaşımları	19
2.2. Glutamat.....	22
2.3. Glutamatın Alzheimer Hastalığındaki Rolü	25
2.4. Ampisilin'in AH ile İlişkisi	27
2.5. AH Hayvan Modelleri	27
2.6. Mikroelektrot Üretimi.....	29
2.6.1. Litografi	30
2.6.1.1. Fotolitografi	30
3. MATERYAL VE METOT.....	32

3.1. Materyal	32
3.1.1. Deney Hayvanları	32
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	32
3.2. Metot	33
3.2.1. Deney Planı	33
3.2.2. Davranış Testleri	35
3.2.2.1. Lokomotor Aktivite Testi	35
3.2.2.2. Pasif Sakınma Testi	36
3.2.2.3. Morris Su Labirenti Testi	37
3.2.6. Mikroelektrot Fabrikasyonu	39
3.2.6.1. Alttaş Temizleme	39
3.2.6.2. Fotorezist Kaplama	40
3.2.6.3. Yumuşak Pişirme	41
3.2.6.4. Pozlandırma	41
3.2.6.5. Banyo	42
3.2.6.6. Adezyon tabakası	42
3.2.6.7. Metal tabakası	43
3.2.6.8. Lift-off	43
3.2.6.9. Paketleme	43
3.2.5. İn-Vivo Voltametri	44
3.2.5.1. Kalibrasyon testleri:	45
3.2.5.2. Kanülün mikroelektrot üzerine sabitlenmesi	46
3.2.5.3. Mikroelektrodun Deney Hayvanına Yerleştirilmesi	46
3.2.5.4. Sinyal analizi	47
3.2.4. Patoloji	48

3.2.4.1. Histopatolojik Yöntem.....	48
3.2.4.1. İmmunohistokimyasal Yöntem.....	48
3.2.5. LC-MS/MS	49
3.2.6. İstatistiksel Analiz.....	49
4. BULGULAR.....	51
4.1. Davranış testi bulguları.....	51
4.1.1. Lokomotor aktivite	51
4.1.1. Pasif Sakınma	56
4.2. Morris Su labirenti.....	58
4.3. Kapton Mikroelektrot H ₂ O ₂ ölçümü.....	70
4.3. İn-Vivo Voltametri	72
4.4. Histopatolojik Bulgular.....	75
4.5. İmmunohistokimyasal Boyama	77
4.6. LC-MS/MS Bulguları	81
5. TARTIŞMA.....	90
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	99
KAYNAKÇA.....	100
EKLER	134
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	134
EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU	135

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi ve deneyimi ile beni meslek yaşantıma hazırlayan, elindeki tüm imkanları elverdiği sürece kullanmamı sağlayan, özveriyle yanımızda olan değerli danışmanım, sayın hocam Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma süresince pek çok konuda bana destek olan, tıkanıp gittiğim yerlerde yol gösteren Dr. Öğr. Üyesi Ufuk OKKAY'a, Vet. Hek. Dr. Cemil Bayram'a, Vet. Hek. Ziadoon Al-Yaqoobi'ye, Dr. Öğr. Üyesi Selma SEZEN'e, Doç. Dr. Halil ÖZCAN'a, Dr. Öğr. Üyesi Yeşim YENİ'ye ve Dr. Öğr. Üyesi Özge BALPINAR'a en içten teşekkürlerimi bir borç bilirim. LC-MS/MS ölçümlerimde bana yardımcı olan Doç. Dr. Onur ŞENOL hocama, yaptığı histopatoloji çalışmalarıyla çalışmamıza değer katan Doç. Dr. Mustafa ÖZKARACA'ya katkılarından dolayı teşekkür ederim. Tez izleme komitesi üyelerim Prof. Dr. Erol AKPINAR'a ve Prof. Dr. İbrahim Yücel ÖZBEK'e tez izleme süreci boyunca yaptıkları fikri katkılar yardımıyla tezimi olgunlaştırdıkları için ayrıca teşekkür ederim. Değerli aileme beni bu yaşa getirdikleri ve ellerindeki imkanları seferber ettikleri için özel olarak teşekkür ederim.

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

Arş. Gör. Muhmmammed Sait ERTUĞRUL

ÖZET

Deneysel Alzheimer Modeli Oluşturulmuş Serbest Hareket Edebilen Sıçanlarda İlaç Tedavilerinde Görülen Beyin Bölgelerindeki Değişikliklerin Farklı Mikroelektrot Tipleriyle Değerlendirilmesi

Amaç: Bu çalışmada STZ ile indüklenmiş deneysel Alzheimer Hastalığı oluşturulmuş sıçanlarda nörotransmitter geri alım sürelerinin ve seviyelerinin hareketli hayvanlarda in-vivo voltametri ve LC/MS-MS yöntemleriyle ölçmeyi ve yeni tedavi yaklaşımlarının iyileşme üzerindeki etkisini incelemeyi amaçladık.

Materyal ve Metot: Her bir grupta 8'er adet sıçan olacak şekilde 4 grup olarak çalışma planı oluşturuldu. Sıçanlarda Alzheimer Hastalığı oluşturmak için icv olarak STZ enjeksiyonu yapıldı. Gruplar sırasıyla kontrol, streptozotosin, streptozotosin + memantin, streptozotosin + ampisilin olarak belirlendi. Enjeksiyon öncesi ve tedavi sonrası olmak üzere iki kere davranış testleri yapıldı. Davranış testleri için lokomotor aktivite, pasif sakınma ve Morris su labirenti testleri seçildi. Deney sonu Fast voltametri sistemiyle glutamat geri alım süreleri ve LC/MS-MS yöntemiyle de glutamat, dopamin ve asetilkolin seviyelerine bakıldı. Alınan dokularda patolojik ve immunohistokimyasal incelemeler yapıldı. Patoloji çalışmalarında piknotik ve dejeneratif hücreler, immunohistokimya çalışmalarında ise Beta-amiloid, Tau ve asetilkolin esteraz incelendi. Tüm sonuçlar SPSS v 20.0 programı ile analiz edildi.

Bulgular: Davranış testleri sonuçlarına göre STZ grubunda kontrol grubuna göre davranış parametrelerinin negatif yönde değiştiği, tedavi gruplarında ise kontrol grubu değerlerine bu parametrelerin yaklaştığı tespit edildi. Glutamat geri alım süresinin STZ grubunda uzadığı tedavi sonrası geri alım süresinin normale yaklaştığı gözlemlendi. Nörotransmitter seviyelerinin de değişimlerinin STZ grubuna kıyasla normale yaklaştığı tespit edildi. Yapılan immunohistokimyasal bulguların STZ ile indüklenen Alzheimer hastalığı modeline uyduğu, tedavi sonrası bu değerlerin kontrole yaklaştığı görüldü.

Sonuçlar: Bu çalışmayla in-vivo voltametri ölçümleri Alzheimer hastalığı oluşturulmuş hareketli sıçanlarda ilk kez yapılmış oldu. Aynı zamanda ampisilin'in glutamat geri alım süresi üzerine etki ederek STZ ile indüklenen Alzheimer Hastalığı modeli üzerine olan pozitif etkisi kanıtlanmış oldu.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer Hastalığı, LC/MS-MS, Nörotransmitter, STZ, Voltametri

ABSTRACT

Objective: In this study, we aimed to measure neurotransmitter reuptake times and levels in rats with STZ-induced experimental Alzheimer's Disease by in-vivo voltammetry and LC/MS-MS methods in freely moving animals and to examine the effect of new treatment approaches on recovery.

Materials and Methods: According to the results of the behavioral tests, it was determined that the behavioral parameters in the STZ group changed negatively compared to the control group, and these parameters approached the control group values in the treatment groups. It was observed that the glutamate reuptake time was prolonged in the STZ group, and the reuptake time approached normal after the treatment. It was determined that the changes in neurotransmitter levels were close to normal compared to the STZ group. It was observed that the immunohistochemical findings were consistent with the STZ-induced Alzheimer's disease model, and these values approached the control after treatment.

Conclusion: With this study, in-vivo voltammetry measurements were made for the first time in motile rats with Alzheimer's disease. At the same time, ampicillin's positive effect on the STZ-induced Alzheimer's Disease model was proven by acting on the glutamate reuptake time.

Keywords: Alzheimer's Disease, LC/MS-MS, Neurotransmitter, STZ, Voltammetry

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 4.2. Nöronlarda görülen piknotik değişimler	75
Tablo 4.3. Nöronlarda görülen dejeneratif değişimler	75
Tablo 4.4. Tau ile yapılan immunohistokimyasal boyamalar	77
Tablo 4.5. β -Amiloid ile yapılan immunohistokimyasal boyamalar	77
Tablo 4.6. AChE ile yapılan immunohistokimyasal boyamalar	77



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Deney planı.....	35
Şekil 3.2. May Act 508 lokomotor aktivite kafesi.....	36
Şekil 3.3. May PAC-214 pasif sakınma kafesi.....	37
Şekil 3.4. Morris su labirenti	38
Şekil 3.5. Mikroelektrot fabrikasyon basamakları.....	39
Şekil 3.6. Esnek kapton film.....	40
Şekil 3.7. Döndürmeli kaplama (spinner) ile fotorezist kaplama işlemi a. Kaplama öncesi b. Kaplama sonrası.....	41
Şekil 3.8. Mask Aligner ile pozlandırma işlemi	42
Şekil 3.9. Banyo sonrası alttaş üzeri desen görünümü	42
Şekil 3.10. Platin metal tabakası.....	43
Şekil 3.11. Lift-off işlemi sonrası mikroelektrot serileri	43
Şekil 3.12. Paketlemesi yapılmış mikroelektrot	44
Şekil 3.13. Hareketli hayvan mikroelektrodu kalibrasyonu	46
Şekil 3. 14. Stereotaktik cerrahi, mikroelektrot yerleştirme işlemi ve ölçüm	47
Şekil 4.1. Locomotor aktivite stereotipik, ambulator, dinlenme zamanı verilerinin toplam aktiviteye karşı yüzde değerleri	52
Şekil 4.2. Locomotor aktivite katedilen mesafe değerleri.....	53
Şekil 4.3. Kontrol grubu örnek lokomotor aktivite Bitmap grafiği	54
Şekil 4.4. STZ grubu lokomotor örnek aktivite Bitmap grafiği	54
Şekil 4.5. STZ + MEM grubu örnek lokomotor aktivite Bitmap grafiği.....	55
Şekil 4.6. STZ + AMP grubu örnek lokomotor aktivite Bitmap grafiği	55
Şekil 4.7. Pasif sakınma testi bazal ölçüm sonuçları).....	56
Şekil 4.8. Pasif sakınma testi tedavi sonrası ölçüm sonuçları	57

Şekil 4.9. Güney yönü bazal ölçüm günlük veri grafiği.....	58
Şekil 4.10. Doğu yönü bazal ölçüm günlük tablosu	59
Şekil 4.11. Kuzey yönü bazal ölçüm günlük tablosu	60
Şekil 4.12. Batı yönü bazal ölçüm günlük tablosu	61
Şekil 4.13. Güney yönü tedavi sonrası ölçüm günlük tablosu.....	62
Şekil 4.14. Doğu yönü tedavi sonrası ölçüm günlük tablosu	63
Şekil 4.15. Kuzey yönü tedavi sonrası ölçüm günlük tablosu.....	64
Şekil 4.16. Doğu yönü tedavi sonrası ölçüm günlük tablosu	65
Şekil 4.17. Morris su labirenti testi kat edilen mesafe grafiği.....	66
Şekil 4.18. Morris su labirenti testi platformun bulunduğu kadranda bulunma süresi grafiği.....	67
Şekil 4.19. Kontrol grubu 5.gün ısı haritası grup temsili	68
Şekil 4.20. STZ grubu 5.gün ısı haritası grup temsili.....	68
Şekil 4.21. STZ + MEM grubu 5.gün ısı haritası grup temsili	69
Şekil 4.22. STZ + AMP grubu 5.gün ısı haritası grup temsili	69
Şekil 4. 23. Mikroelektrot iletkenlik ölçüm programı	70
Şekil 4.24. Kapton Mikroelektrodun H ₂ O ₂ ölçüm grafiği	71
Şekil 4.25. Ölçüm sonuçlarına göre kalibrasyon grafiği	71
Şekil 4.26. Glutamat geri alım süreleri.....	72
Şekil 4.27. Kontrol grubu örnek voltametri kayıtları	73
Şekil 4.28. STZ grubu örnek voltametri kayıtları.....	73
Şekil 4.29. STZ + MEM grubu örnek voltametri kayıtları.....	74
Şekil 4.30. STZ + AMP grubu örnek voltametri kayıtları.....	74
Şekil 4.31. Histopatoloji örnek görüntüleri	76
Şekil 4.32. Tau immunpozitifliği örnek görüntüleri.....	79

Şekil 4.33. β -Amiloid immunpozitifliği örnek görüntüleri	80
Şekil 4.34. AChE immunpozitifliği örnek görüntüleri	81
Şekil 4.35. Kontrol grubunda glutamik asidin Multiple Reaction Monitoring madunda 147.8 Prekürsör iyonunun 84.0 m/z oranına sahip fragmentör iyonuna ait kromotogramı ve Kontrol grubunda glutamik asidin MRM madunda parçalanma ürünlerine ait kütle spektrumu.....	82
Şekil 4.36. Kontrol grubunda asetilkolinin Multiple Reaction Monitoring madunda 145.9 Prekürsör iyonunun 86.9 m/z oranına sahip fragmentör iyonuna ait kromotogramı ve Kontrol grubunda asetilkolinin MRM madunda parçalanma ürünlerine ait kütle spektrumu.....	82
Şekil 4. 37. Kontrol grubunda dopaminin Multiple Reaction Monitoring madunda 153.8 Prekürsör iyonunun 136.8 m/z oranına sahip fragmentör iyonuna ait kromotogramı ve Kontrol grubunda dopaminin MRM madunda parçalanma ürünlerine ait kütle spektrumu	83
Şekil 4.38. STZ grubunda glutamik asidin Multiple Reaction Monitoring madunda 147.8 Prekürsör iyonunun 84.0 m/z oranına sahip fragmentör iyonuna ait kromotogramı ve STZ grubunda glutamik asidin MRM madunda parçalanma ürünlerine ait kütle spektrumu	83
Şekil 4.39. STZ grubunda asetilkolinin Multiple Reaction Monitoring madunda 145.9 Prekürsör iyonunun 86.9 m/z oranına sahip fragmentör iyonuna ait kromotogramı ve STZ grubunda asetilkolinin MRM madunda parçalanma ürünlerine ait kütle spektrumu	84
Şekil 4. 40. STZ grubunda dopaminin Multiple Reaction Monitoring madunda 153,8 Prekürsör iyonunun 136.8 m/z oranına sahip fragmentör iyonuna ait kromotogramı ve STZ grubunda dopaminin MRM madunda parçalanma ürünlerine ait kütle spektrumu	84
Şekil 4.41. STZ + MEM grubunda glutamik asidin Multiple Reaction Monitoring madunda 147.8 Prekürsör iyonunun 84.0 m/z oranına sahip fragmentör iyonuna ait	

kromotogramı ve STZ + MEM grubunda glutamik asidin MRM madunda parçalanma ürünlerine ait kütle spektrumu	85
Şekil 4.42. STZ + MEM grubunda asetilkolinin Mutiple Reaction Monitoring madunda 145,9 Prekürsör iyonunun 86,9 m/z oranına sahip fragmentör iyonuna ait kromotogramı ve STZ + MEM grubunda asetilkolinin MRM madunda parçalanma ürünlerine ait kütle spektrumu.....	85
Şekil 4. 43. STZ + MEM grubunda dopaminin Mutiple Reaction Monitoring madunda 153,8 Prekürsör iyonunun 136,8 m/z oranına sahip fragmentör iyonuna ait kromotogramı ve STZ + MEM grubunda dopaminin MRM madunda parçalanma ürünlerine ait kütle spektrumu.....	86
Şekil 4.44. STZ + AMP grubunda glutamik asidin Mutiple Reaction Monitoring madunda 147,8 Prekürsör iyonunun 84,0 m/z oranına sahip fragmentör iyonuna ait kromotogramı STZ + AMP grubunda glutamik asidin MRM madunda parçalanma ürünlerine ait kütle spektrumu	86
Şekil 4.45. STZ + AMP grubunda asetilkolinin Mutiple Reaction Monitoring madunda 145,9 Prekürsör iyonunun 86,9 m/z oranına sahip fragmentör iyonuna ait kromotogramı ve STZ + AMP grubunda asetilkolinin MRM madunda parçalanma ürünlerine ait kütle spektrumu.....	87
Şekil 4.46. STZ + AMP grubunda dopaminin Mutiple Reaction Monitoring madunda 153,8 Prekürsör iyonunun 136,8 m/z oranına sahip fragmentör iyonuna ait kromotogramı ve STZ + AMP grubunda dopaminin MRM madunda parçalanma ürünlerine ait kütle spektrumu.....	87
Şekil 4.47. Glutamatın standart numunelerine karşı okunan değerlerden oluşan kalibrasyon grafiği	88

Şekil 4.48. Asetilkolinin standart numunelerine karşı okunan değerlerden oluşan kalibrasyon grafiği	88
Şekil 4. 49. Dopaminin standart numunelerine karşı okunan değerlerden oluşan kalibrasyon grafiği	89



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACh	: Asetilkolin
AChE	: Asetilkolinesteraz
AChEI	: Asetilkolinesteraz İnhibitörleri
Ag	: Gümüş
AgCl	: Gümüş klorür
AH	: Alzheimer Hastalığı
Al	: Alüminyum
AMP	: Ampisilin
AMPA	: 3-Hidroksi-5-Metil-4-İzoksazolpropiyonik Asit
APOE	: Apolipoprotein E
APP	: Amiloid Prekürsör Protein
Aβ	: β -Amiloid
BChE	: Bütirilkolinesteraz
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
CA	: Cornu Ammonis
Ca²⁺	: Kalsiyum
Cd	: Kadmiyum
Cl⁻	: Klor
CO	: Karbon Monoksit
Cr	: Krom
DAB	: 3,3'-Diaminobenzidine
DAYTAM	: Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Araştırma Merkezi
EAAC	: Eksitator Aminoasit Taşıyıcı
EAAT	: Eksitator Amino Asit Transporter

FDA	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda Ve İlaç Dairesi
fMRI	: Fonksiyonel Manyetik Rezonans Görüntüleme
GABA	: γ -Aminobütirik Asidin
GLAST	: Glutamat Aspartat Transporter
GLT	: Glutamat Transporter
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
H₂SO₄	: Sülfürik Asit
HSV	: Herpes Simpleks Virüsü
IC	: Entegre Devre
IR	: İnfrared
İcv.	: İntraserebroventriküler
İp.	: İntraperitoneal
KBB	: Kan Beyin Bariyeri
LC-MS/MS	: Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
LTD	: Uzun Vadeli Depresyon
LTP	: Uzun Vadeli Potensiyalizasyon
MEM	: Memantin
MMP-9	: Matris Metalloproteinaz
MRM	: Mutiple Reaction Monitoring
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
Na⁺	: Sodyum
NAAQS	: Ulusal Ortam Hava Kalitesi Standartları
NFY	: Nörofibriler Yumak
NMDA	: N-Metil-D-Aspartat
NO_x	: Nitrojen Oksitler

O₃	: Ozon
Pb	: Kurşun
PET	: Pozitron Emisyon Tomografisi
PM	: Partikül Madde
PSEN	: Presenilin
SO₂	: Kükürt Dioksit
SP	: Senil Plak
SPECT	: Tek Foton Emisyonlu Bilgisayarlı Tomografi
STZ	: Streptozotosin
TCA	: Trikarboksilik Asit
Ti	: Titanyum
UV	: Ultraviyole
VGLUT	: Veziküler Glutamat Taşıyıcıları

1. GİRİŞ

En yaygın demans türü olan Alzheimer hastalığı (AH) kendini lokal nörolojik semptom, halüsinasyon, sanrı ve psikolojik sosyal yetersizlik ile gösteren ilerleyici bilişsel bir bozukluktur.¹ 2018 yılı verilerine göre dünya genelinde yaklaşık 50 milyon insan bu hastalıktan mustarip olmakla birlikte bu sayının 2050 yılı itibariyle 153 milyon kişiye yükseleceği düşünülmektedir.^{1,2} Genellikle 65 yaş üstü popülasyonda görülen bu hastalığın en önemli belirtisi unutkanlıktır.³ Zihinsel yetenekler giderek kötüleşmekte ve kişilik değişiklikleri ortaya çıkmaktadır.⁴ En yaygın kişilik değişiklikleri, azalan inisiyatif/artan ilgisizlik, hobilerden vazgeçme ve artan kişilik rijiditesi; en az sıklıkta görülen değişiklikler ise duygusal kontrolde bozulma, uygunsuz durumlarda neşe ve cinsel kabahatlerin ortaya çıkmasıdır. Davranışsal değişiklikler ise geniş bir anormallik yelpazesini kapsamaktadır. Bunlar, talepkâr ve aşırı eleştirel davranışlar, şüphecilik, şiddet, halüsinasyonlar, sanrılar, depresyon, öfori, rijidite, iş birliği yapmama, düzensizlik, huzursuzluk, psikomotor ajitasyon, kararsızlık, geri çekilme, hipokondriyazis, ilgisizlik, paranoya ve diğer semptomları içermektedir.⁵

1970'lerden bu yana, skopolamin gibi antikolinergik ilaçların bilişsel işlevler üzerinde olumsuz etkilerinin olduğunun gözlemlenmesiyle, kolinerjik sistemin bilişte önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir.⁶ Son zamanlarda antikolinergiklere yüksek düzeyde kümülatif maruz kalmanın, artan demans riskine karşılık geldiği gösterilmiştir.⁷ Bu nedenle Alzheimer hastalığı (AH) için mevcut ana tedavi stratejisi, asetilkolinin bozulmasını katalize eden enzim olan asetilkolinesterazı inhibe eden bileşiklerin uygulanması yoluyla asetilkolin seviyelerini arttırmaktır. Şu anda FDA (Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi) onaylı üç kolinesteraz inhibitörü vardır: rivastigmin, donepezil ve galantamin.⁸ Kolinesteraz inhibitörleri, hafif-orta derecede Alzheimer

hastalığı için klinik kullanım gösterse de, FDA'nın memantini onayladığı 2003 yılına kadar orta ila şiddetli Alzheimer hastalığı olan hastalar için mevcut tedavi bulunmamaktaydı.⁹ Memantin, glutamaterjik disfonksiyonu hedefleyerek yarışmasız bir NMDA (N-Metil-D-Aspartat) reseptör antagonisti olarak hareket ederek ve açık durumdaki NMDA reseptör kanalına bağlanarak etki göstermektedir.¹⁰ NMDA-reseptörünün normal işlevi, nörotransmisyon için kalsiyum (Ca^{2+}) akışını sağlamaktır, ancak hastalık durumunda, NMDA-reseptörünün artan aktivitesi, aşırı Ca^{2+} akışına, eksitotoksisiteye ve hücre ölümüne yol açan uzun süreli kanal açılmasına neden olabilmektedir.¹¹

Glutamat, memeli merkezi sinir sistemindeki ana uyarıcı nörotransmitterdir. Ayrıca, öğrenme ve hafıza için önerilen bir moleküler substrat olarak uzun vadeli nöronal güçlendirmede rol oynamaktadır.¹²

Modern nörobiyolojideki çok az kavram, uyarıcı amino asitlerin aşırı salınımının nöronal hasarın oluşmasına neden olduğu görüşü kadar ilgi uyandırmaktadır. Bu hipotezin ana varsayımı, glutamat tarafından örneklendiği gibi nörotransmitterlerin aşırı salınmasının ve uyarıcı amino asitlerin aşırı birikiminin, kesintisiz bir şekilde, nöronlara Ca^{2+} akışı ve hücre ölümü ile sonuçlanacak olan karmaşık bir hücresel hasar sürecini başlatmasıdır.^{13,14} Eksitotoksisite, glutamatın pre-sinaptik sinir terminallerinden ve astrositlerden hücre dışı boşluğa aşırı salınımı ve bunun sonucunda glutamat reseptörlerinin, özellikle NMDA reseptörlerinin aşırı uyarılmasıyla tetiklenmektedir. Bu reseptör aşırı uyarımı, glutamat reseptör kapılı iyon kanalları yoluyla aşırı Ca^{2+} ve sodyum (Na^{+}) akışına yol açar, bunu pasif olarak klor (Cl^{-}) ve su hareketleri izler.¹⁵ Sonuç olarak artan hücre içi hacim ve Ca^{2+} aşırı yüklenmesi kombinasyonu, çeşitli ölümcül metabolik düzensizliklere, iç organel şişmesine ve nekroza yol açan plazma zarı yetmezliğine neden olur.^{12,14}

Eksitatör amino asit taşıyıcı-2 (EAAT-2), ağırlıklı olarak astroglial hücrelerde ifade edilen başlıca glutamat taşıyıcılarından biridir ve toplam glutamat alımının %90'ından sorumludur. Glutamat taşıyıcıları, sinaptik aralıktaki glutamat konsantrasyonunu sıkı bir şekilde düzenler. EAAT-2'nin işlev bozukluğunun aşırı hücre dışı glutamat birikimi aracılığıyla Alzheimer hastalığı dahil olmak üzere çeşitli nörodejeneratif hastalıkların gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir.¹⁶ AH'de glutamat taşıyıcılarından EAAT-2 (ya da Glutamat Transoportör-1 (GLT-1))'nin immünoreaktivitesinin azaldığı eksitatör amino asit taşıyıcı-1 (EAAT-1) ve eksitatör amino asit taşıyıcı-3'ün (EAAT-3) ise etkilenmediği gözlenmiştir. Bunun sebebinin ise amiloid prekürsör proteininin anormal işleyişi sonucu olduğu gösterilmiştir.¹⁷

İlk olarak 2005 yılında betalaktam antibiyotikler üzerine yapılan bir çalışmaya kadar EAAT-2'nin nörodejeneratif hastalıklar üzerindeki etkinliğini gösteren herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bunun sebebi ise EAAT-2'nin etkinliğini sağlayan bileşiklerin bilinmemesidir. Betalaktam antibiyotiklerin bu etkinliği glutamat eksitotoksitesinin rol oynadığı nörodejeneratif hastalıklar için yeni bir tedavi yaklaşımı oluşturmaktadır.¹⁸

İntrakraniyavetriküler olarak Streptozotosin'in (STZ) sıçan beynine enjeksiyonu sonucu AH'nin erken dönem patofizyolojik bulgularını yansıtan modelleme yapılmıştır.¹⁹ Bu tez çalışmasında STZ ile oluşturulan hasarın ampisilin yardımıyla artan EAAT-2 aktivasyonu sonucu glutamatın ortamdaki uzaklaştırılması ve bu sayede glutamatın oluşturacağı nöronal hasarın önlenmesi hedeflenmiştir. Nöronal hasarın ve tedavi sonrası değişikliklerin değerlendirilmesi Morris su labirenti testi, pasif sakınma testi, immunohistokimyasal boyama ve prefrontal kortekste glutamat geri alım parametresinin voltametrik olarak incelenmesi ile yapılacaktır.

Günümüz tedavi imkanlarının yetersiz kaldığı bu hastalıkla ilgili mekanizmaları daha iyi anlayabilmek ve tedaviye farklı yaklaşımlarda bulunabilmek için bu deneysel çalışmayı planladık.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

AH, β -amiloid ($A\beta$) içeren hücre dışı plaklar ve Tau içeren hücre içi nörofibriler yumaklar ile karakterize nörodejeneratif bir hastalıktır. AH tipik olarak belirgin amnestik bilişsel bozulma ile kendini gösterir, ancak daha az sıklıkla amnestik olmayan bilişsel bozukluk olarak da ortaya çıkabilir. AH'nin kısa süreli bellek güçlüğü en yaygın olan semptomudur, ancak anlamlı konuşma, görsel-uzaysal işleme ve yürütme (zihinsel çeviklik) işlevlerinde bozulma da meydana gelebilir.²⁰ AH teşhisini takiben ortalama hayatta kalma süresinin hastanın teşhis anındaki yaşına bağlı olduğu, 65 yaşında AH teşhisi konan kişiler için yaklaşık 8.3 yıl ile 90 yaşında AH tanısı konan kişiler için yaklaşık 3.4 yıl arasında değiştiği, ortaya konulmuştur.²¹

2.1.1. Alzheimer Hastalığının Tarihçesi

Mart 1901'de, 50 yaşındaki Auguste Deter'in kocası, karısında hızlı bir ilerleme ile artan yoğunlukta uyku bozuklukları, hafıza bozuklukları, saldırganlık, ağlama ve kafa karışıklığı fark etmiştir. Bunun üzerine 51 yaşındaki hasta Frankfurt akıl hastanesinde 25 Kasım 1901'de tedavisi için yatan hasta olarak kalmaya başlamıştır. Bu tarihten itibaren kıdemli asistan Alois Alzheimer hastanın semptomlarını yıllarca derinlemesine incelemiştir. Semptomlarının zamanla giderek kötüleşmesi sebebiyle Auguste Deter, 8 Nisan 1906'daki ölümüne kadar hastanede yatan hasta olarak kalmıştır. Ölümünden sonra Alzheimer hastanın 4 yıl boyunca tutulan tıbbi kayıtları ile hastanın semptomları arasındaki ilişkiyi araştırmak için bir beyin biyopsisi yapmıştır.^{22,23} Serebral korteksin genel olarak incelendiği bulunmuştur. Hafızayı, dili, yargılamayı ve düşünmeyi kontrol eden bölgenin ciddi şekilde bozulduğu belirlenmiştir. Nöronlarda senil plak oluşumları ve nörofibriler yumaklar bulunmuştur.²³ Dönemin tıp doktorları arasındaki fikir birliği, 70 yaşının üstündeki hastalarda senil plak bulunabileceği iken, nörofibriler yumakların

da aynı hastada ortaya çıkması yeni bir gözlem olmuştur. Hastanın yaşı düşünüldüğünde, her iki bulgu da dönemin bilgileri ile çelişmektedir. Bu sonuçlar ve bunların 4 yıldan fazla bir süredir kaydedilen klinik bulgularla ilişkisi, Tübingen toplantısında Alzheimer'ın konuşmasının temelini oluşturmuştur.

Kraepelin'in teşviki üzerine, 3 Kasım 1906'da Alzheimer, Almanya'nın güneybatısında bulunan Tübingen'de düzenlenen 37. psikiyatri konferansında 51 yaşındaki Auguste Deter'in semptom ve beyin biyopsisi sonuçlarını "Serebral korteksin kendine özgü ciddi bir hastalık süreci" adlı çalışmasıyla bildirmiştir.²⁴ Ancak, bu bildiri akademi tarafından yeterli ilgiyi görmemiştir. Alzheimer, raporun içeriğini güçlendirerek bir yıl sonra bir araştırma makalesi olarak yayınlamıştır. Hastalık, 1910'da Kraepelin tarafından yayınlanan psikiyatri kitabında ilk kez AH olarak adlandırılmıştır.²⁵

2.1.2. Alzheimer Hastalığı Epidemiyolojisi

AH genellikle demans vakalarının %60 ila %80'ini oluşturan en yaygın demans alt tipi olarak kabul edilmektedir. Klinik olarak teşhis edilen AH prevalansı yüksektir ve bu durumun popülasyonun yaşlanmasıyla ilişkili olarak artması beklenmektedir.^{26,27} AH prevalansı üzerine yapılan birçok çalışmadaki tahminlere göre hastalık 60 yaş üstü popülasyonun %3-4'ünü etkilemektedir.²⁸ Çin'de yapılan bir çalışmada elde edilen prevalans tahminlerine göre prevalans 55-59 yaş aralığında %0.2 civarlarındayken 95-99 yaş aralığında %48.2 ye yükseldiği gözlenmektedir.²⁹ Ayrıca yapılan çalışmalarda AH'nın kadınlardaki prevalansının erkeklerden daha fazla olduğu belirtilmiştir. Prevalansta olduğu gibi insidansta da yaşa bağlı olarak artış gözlenmektedir. Avrupa'da yürütülen çalışmaların bir meta analizinde kadınlarda yılda her 1000 kişiden 13.3'ünde erkeklerde yılda her 1000 kişiden 7.02'sinde AH bulunmaktadır.³⁰

2.1.3. Alzheimer Hastalığının Risk Faktörleri

Hastalığın ilerlemesi ile ilişkili risk faktörlerini anlamak, hastaların gelecekleri ile ilgili kararlar vermelerine yardımcı olabileceği ve ilerlemeyi yavaşlatmak için klinik gelişime ve tedavilerin kullanımına rehberlik edebileceği düşünülmektedir.³¹

Risk faktörleri, serebrovasküler hastalıklar, diyabet, hipertansiyon, obezite, dislipidemi, tip 2 diyabet, stres, depresyon, medeni durum, yetersiz uyku, sigara ve genetik faktörler olarak sınıflandırılabilir.³² Genetik risk faktörleri; erken dönem AH genellikle amiloid prekürsör protein, presenilin 1 ve presenilin 2 genlerindeki (sırasıyla APP, PSEN1 ve PSEN2) mutasyonlar nedeniyle oluşurken, geç dönem AH esas olarak apolipoprotein E (APOE) genindeki bir polimorfizm ile ilişkili olduğu belirlenmiştir.^{33,34}

AH'deki en önemli risk faktörü yaşlanmadır. Genç bireylerde AH nadiren görülmekle birlikte çoğu AH vakası 65 yaşından sonra başlayan geç bir başlangıçlıdır.³⁵ Yaşlanma, beyin hacminde ve ağırlığında azalma, sinaps kaybı ve belirli alanlarda ventriküllerin genişlemesi ile birlikte senil plak (SP) ve nörofibriler yumak (NFY) birikimi ile birlikte birden fazla organ ve hücre sistemi yoluyla meydana gelen karmaşık ve geri dönüşü olmayan bir süreçtir.^{36,37} Ayrıca, yaşlanma sırasında glukoz hipometabolizması, kolesterol dishomeostazı, mitokondri disfonksiyonu, depresyon ve bilişsel gerileme gibi çeşitli durumlar ortaya çıktığı görülmüştür. Bu değişiklikler normal yaşlanma sürecinin doğal bir parçasıdır ve bu nedenle erken AH'deki olguların ayırt edilmesini zorlaştırmaktadır.³⁸

Hava kirliliği, kimyasal, fiziksel veya biyolojik kirleticilerin eklenmesi yoluyla atmosferin doğasının değiştirilmesiyle karakterize edilir. Hava kirliliği, solunum ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkilidir ve son zamanlarda AH ile ilişkisi de belgelenmiştir. ABD'de Ulusal Ortam Hava Kalitesi Standartları (NAAQS) tarafından ozon (O₃), nitrojen oksitler (NO_x), karbon monoksit (CO), partikül madde (PM), kükürt,

dioksit (SO₂) ve kurşun (Pb) dahil olmak üzere altı hava kirletici ajan insan sağlığına tehdit olarak tanımlanmıştır. Hayvanlar ve hücrel modeller üzerinde yapılan araştırmalar, yüksek düzeyde hava kirliliğine maruz kalmanın, AH'de gözlenen benzer şekilde frontal korteks bölgesine ek olarak olfaktörde hasara yol açabileceğini göstermiştir. Hava kirleticilerine maruz kalan bireylerde, frontal kortekste hiper-fosforile Tau ve A β plaklarının varlığı ile oksidatif stres, nöroinflamasyon ve nörodejenerasyon arasında bir bağlantı vardır. Hava kirliliğinin, A β 42 oluşumunda, birikmesinde ve bilişsel işlevlerde bozulmaya neden olabileceği düşünülmektedir.^{39,40}

Son yıllarda AH'de beslenmenin rolü üzerine yapılan çalışmaların sayısı artmıştır. Antioksidanlar, vitaminler, polifenoller ve balık yağı gibi çeşitli diyet takviyelerinin AH riskini azalttığı, doymuş yağ asitleri ve yüksek kalori alımının AH riskini artırdığı bildirilmiştir.⁴¹ Gıda işleme, ısıya duyarlı mikro besinlerin bozulmasına, büyük miktarda su kaybına ve proteinler, lipidler ve nükleik asitlerdeki serbest amino gruplarının enzimatik olmayan glikasyonundan toksik ikincil ürünlerin oluşumuna neden olmaktadır. Hücre yüzeyi reseptörlerinin ve vücut proteinlerinin yapısını ve işlevini değiştirerek oksidatif stres ve inflamasyonu indüklemeye yetenekleri ikincil glikasyon son ürünlerinin toksik etkileridir. Farklı çalışmalar, yüksek ikincil glikasyon son ürünleri serum seviyesinin, bilişsel gerileme ve AH'nin ilerlemesi ile ilişkili olduğunu göstermiştir.⁴² Yetersiz beslenmenin de AH için başka bir risk faktörü olabileceği düşünülmektedir. Folat, B₁₂ vitamini ve D vitamini gibi besinlerin eksikliği, bilişsel işlevlerde azalmaya neden olabileceği gibi, AH'li hastaların yeme ve yutma sorunları yaşamasına ve bu da malnütrisyon riskini artmasına neden olabileceği düşünülmektedir.⁴³

Metaller doğada ve biyolojik sistemlerde bulunmaktadır ve canlı organizmalarda fizyolojik işlevi olan biyo-metaller ve herhangi bir biyolojik işlevi olmayan toksikolojik metaller olarak ikiye ayrılabilir.⁴⁴ Alüminyum (Al), işlenmiş gıdalar, kozmetikler, tıbbi

müstahzarlar, ilaçlar ve diğerleri gibi endüstrilerde önemli ölçüde kullanılmaktadır. Vücutta alüminyum, plazma transferrine ve alüminyumun beyne geçişine aracılık edebilen sitrat moleküllerine bağlanır. Çalışmalar, Al'nin beyinde korteks, hipokampus ve beyincik bölgelerinde biriktiğini, burada proteinlerle etkileşime girdiğini ve AH'nin özelliği olan Tau proteini gibi yüksek oranda fosforile edilmiş proteinlerin yanlış katlanmasına, toplanmasına ve fosforilasyonuna neden olduğunu göstermiştir.⁴⁵ Kurşun (Pb), Ca^{2+} gibi biyo-metallerin bağlanma bölgesi ile rekabet eder ve kan-beyin bariyerini (KBB) hızla geçebilir, burada nöral farklılaşmayı ve sinaptogenezi değiştirebilir ve ciddi hasara neden olabilmektedir. Çalışmalar, akut Pb maruziyetinin AH ile ilişkili olduğunu ve β -sekretaz ekspresyonunda ve A β birikiminde artışa neden olduğunu ortaya koymuştur. Kadmiyum (Cd), KBB'yi geçebilen ve AH gibi nörolojik hastalıklara neden olabilen kanserojen suda çözünür bir metaldir. Yapılan çalışmalar, Cd iyonlarının AH beyinde A β plaklarının toplanmasında ve Tau'nun birikmesinde rol oynadığını göstermiştir. Metallerin beyin dokusu üzerinde etkileri ile ilgili toplanan veriler, bunların AH gelişiminde rol oynayan risk faktörleri arasında yer aldığı hipotezini desteklemektedir.⁴⁶

Merkezi sinir sistemine (MSS) yönelik kronik enfeksiyonlar, A β plaklarının ve NFY'nin birikmesine neden olabilir, bu nedenle AH'deki risk faktörleri arasında yer almaktadır. Dr. Itzhaki tarafından yapılan araştırmalar, *Herpes simplex* virüsünün (HSV-1) DNA'sının, ApoE- ϵ 4 alel taşıyıcıları olan hastalarda bulunduğunu göstermektedir. Bu durum HSV-1'in AH geliştirme riskinin yüksek olduğunu düşündürmektedir. HSV-1 beyinde çoğalabilir, bu da inflamatuvar yanıtın aktivasyonu ve A β birikiminde bir artış ile sonuçlanabilir, bu da nöronlarda hasara ve kademeli AH gelişimine neden olabilir. Öte yandan Miklossy ve Balin's tarafından yapılan çalışma sonuçları, kronik bakteriyel enfeksiyonların AH'deki rolünü ortaya koymuştur. Serebral kortekste biriken spiroket

bakterilerinin (*Treponema pallidum*) neden olduğu sifilitik demans, nörofibriler yumaklara benzer lezyonlar üretmekte ve bu da yıkıcı nörodejeneratif bozukluklara yol açmaktadır.⁴⁷⁻⁴⁹

AH'nin gelişimi ile ilgili çeşitli risk faktörleri vardır. Bu listeye ek olarak, AH'li yaşlı insanlar genellikle kardiyovasküler hastalık, obezite, diyabet ve diğerleri gibi hastalıklara da sahiptir. Bu koşulların tümü, artan AH riski ile ilişkilidir.^{50,51} Kardiyovasküler Hastalıklar, dejeneratif etkiyi artıran, amiloid ve Tau patolojisini etkileyen nöral doku kaybı nedeniyle artan demans riski ile ilişkili inme gibi AH için önemli bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Atriyal fibrilasyon felce yol açan embolilere ve bununla birlikte hafıza ve bilişsel işlevlerde azalmaya neden olmaktadır. Kalp yetmezliği kalbin pompalama işlevini etkilemektedir. Bu durum vücuda yetersiz kan temini ve beynin hipo-perfüzyonu ile sonuçlanmakta, bu da hipoksi ve nöral hasara yol açmaktadır. Koroner kalp hastalığı hipotezi, ateroskleroz, periferik arter hastalığı, hipo-perfüzyon ve embolinin artan AH riski ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Hipertansiyon, beyin kan akışını azaltan damar duvarlarının kalınlaşması ve damar lümenin daralması ile ilişkilidir ve kronik vakalarda AH için risk faktörü olarak yer alan beyin ödemine neden olabileceği düşünülmektedir.^{51,52}

Obezite, bireylerin yaktığından daha fazla kalori tüketmesi nedeniyle vücut yağının çok fazla olması durumu için kullanılan bir terimdir ve vücut kitle indeksi yöntemi kullanılarak hesaplanabilmektedir. Vücut yağının artması, beyin iskemisini, hafıza kaybını ve vasküler demansı destekleyen beyin kan akışının azalmasıyla ilişkilidir. Obezite, sağlıklı beslenme ve diğer faktörler, periferik dokuları ve kan damarlarını etkileyen hiperglisemi ile karakterize olan bozulmuş glukoz toleransına veya diyabete neden olabilmektedir. Kronik hiperglisemi, artan amiloid-beta birikimi, oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon ve nöroinflamasyonun bir sonucu olarak bilişsel bozulmaya

yol açabileceği düşünülmektedir. Obezite, makrofajları ve lenfositleri uyaran ve nihayetinde lokal ve sistemik inflamasyona yol açan adipoz dokudan proinflamatuvar sitokin salgılarının artmasıyla karakterize bir olaydır. Bu inflamasyon insülin direncini, hiperinsülinemiyi ve bunun sonucunda hiperglisemiyi teşvik etmektedir. Obezite, demans ve AH için risk faktörleri olarak tanımlanan tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser için iyi bilinen bir risk faktörüdür. Ensefalit, mikrogliada artışa neden olur ve sinaptik plastisitenin azalmasına ve nörojenezin bozulmasına neden olmaktadır. Mikroglia, insülin reseptör substratı 1'i etkileyebilir ve sinir sağlığında önemli bir rolü olan hücre içi insülin sinyalini bloke edebilir. Bu nedenle, insülin etkisindeki değişiklik A β birikimine neden olabilir ve AH ile ilişkili Tau protein yıkımını azaltabilir.^{31,53-56}

2.1.4. Alzheimer Hastalığının Patogenezi

Nöronal sitoplazmada çözünmeyen A β plaklarının, Tau fosforilasyonunun ve NFY'nin varlığı AH'nin ayırt edici özelliğidir.⁵⁷ Bilişsel gerilemeye neden olan mekanizmalar hala tartışılrsa da bu birikimlerin eksitotoksisite süreçlerinden kaynaklanan nöronların atrofisine ve ölümüne, kalsiyum homeostazında çökmeye, inflamasyona, enerjinin ve nöronal faktörlerin tükenmesine yol açtığına inanılmaktadır. Bu sürecin bir sonucu olarak, bellek, öğrenme ve diğer bilişsel işlevlerde yer alan nöronların ve sinapsların zarar görmesi, söz konusu bilişsel gerilemeye yol açmaktadır.⁵⁸

36 ila 43 aminoasit içeren A β peptidi, beyin homeostazında önemli roller oynayan fizyolojik olarak üretilen bir protein olan APP'nin enzimatik proteolizinden türetilir.^{59,60} APP işleme için iki ana yol bilinmektedir: amiloidojenik olmayan α -sekretaz aracılı yol ve amiloidojenik β - ve γ -sekretaz aracılı yol. APP'nin α -sekretaz tarafından bölünmesi, nöronların plastisitesinde ve hayatta kalmasında ve eksitotoksisiteye karşı korumada önemli roller oynayan, muhtemel nöroprotektif işlevi olan çözünür bir molekül olan sAPP α ile sonuçlanmaktadır.^{61,62} A β peptidi, bir β -sekretaz tarafından APP'nin

bölünmesiyle üretilmektedir. Bu yolda APP, çözünür bir APP parçası ve hücre zarına bağlı bir karboksi-terminal kompleksi vermek üzere β -sekretaz tarafından bölünür. Son olarak APP, 4 proteinden oluşan bir γ -sekretaz kompleksi tarafından A β peptidini oluşturmak için parçalanır: bu proteinler presenilin 1 veya 2, nikastrin, APH-1 ve PEN-2. Boyutları 38 ila 43 aminoasit arasında değişen A β peptitleri, 40 aminoasit formunun (A β 40) baskınlığı ile üretilir, bunu 42 (A β 42) takip eder. Fizyolojik koşullarda, amiloidojenik ve amiloidojenik olmayan yollar dengede bir arada bulunmaktadır.^{61,63}

A β 42 peptidi, A β 40'a göre agregasyona daha yatkındır. İmmunohistokimyasal analizler, AH hastalarında A β 42'nin başlangıçta biriktiğini ve gözlenen amiloid plaklarında daha yüksek konsantrasyonlarda bulunduğunu göstermektedir.⁶⁴

A β peptitleri, fizyolojik koşullar altında, birincil olarak sinaps koruyucu işlevi olan monomerik formlarda üretilmektedir. Ancak bu proteinin birikmesi senil plaklarda biriken fibrillerin oluşumuna yol açmaktadır. Yüksek A β seviyeleri, kolinerjik, serotonerjik, noradrenerjik ve dopaminerjik nöronların işlevine ve hayatta kalmasına müdahale ederek (hem hücre zarları ve reseptörleri ile etkileşim yoluyla hem de hücre içi süreçlere doğrudan müdahale yoluyla), amiloidojenik yol üzerindeki kontrollerini azaltarak ve çözünmeyen A β peptidinin birikmesini destekleyerek, nöronal toksisite ve dejenerasyona yol açan oligomerik ürünlerin (dimerler, trimerler, tetramerler) oluşumuna yol açabilmektedir.^{65,66}

A β peptidinin birikmesinin, hiperfosforile edilmiş Tau proteininin NFY oluşumunu desteklediği kesin mekanizma bilinmemektedir. Blurton-Jones & LaFerla dört temel mekanizma önermiştir.⁶⁷ A β peptidi, Tau proteininin hiperfosforilasyonunu katalize eden ve onun konformasyon değişikliğine ve NFY oluşumuna yol açan spesifik kinazların aktivasyonunu destekler. A β peptidinin birikmesiyle desteklenen nöroinflamasyon, Tau proteininin fosforilasyonunu uyaran proinflamatuvar sitokinlerin

üretimine yol açmaktadır. A β peptidi tarafından indüklenen bir süreçte, proteazom tarafından Tau proteininin degradasyon kapasitesinin azaltılmasına yol açmaktadır. A β peptidi tarafından indüklenen aksonal taşımadaki kusurlar, Tau proteininin ve onun haberci RNA'sının yetersiz lokalizasyonuna yol açmaktadır, bu da NFY'de hiperfosforilasyon ve kümelenmeye yol açabilmektedir.

Tau proteini, kromozom 17'de bulunan MAPT geninin alternatif eklenmesiyle üretilen mikrotübülle ilişkili bir proteindir. Bu işlemle altı Tau proteini izoformu üretilmektedir.⁶⁸ Bu proteinin bilinen başlıca fizyolojik işlevleri, tübülün polimerizasyonunun uyarılması, mikrotübül stabilizasyonu ve mikrotübüller tarafından hücre içi organellerin taşınmasıdır. Hiperfosforile edildikten sonra protein, mikrotübüllerin sentezi ve stabilizasyonundaki fonksiyonlarını kaybederek nöronal hasara yol açar ve sitotoksiteyi arttırmaktadır.⁶⁹ Histolojik analizler, beyin dokusundaki NFY'nin hem yükünün hem de dağılımının, bilişsel eksikliğin şiddeti ile A β peptit birikintilerinden daha iyi korelasyon göstermektedir.⁷⁰

2.1.5. Alzheimer Hastalığının Semptomları

AH'nın en yaygın semptomları uyku bozuklukları, ajitasyon/saldırganlık, depresyon, psikoz, apati, nöropsikiyatrik sendromdur.

Uyku bozuklukları, AH'li kişilerde en yaygın davranış bozukluklarından biridir. Hastaların %25-50'si ciddi uyku sorunlarına sahiptir ve bu hastaların neredeyse %75'i gün içinde uyumaktadır.⁷¹ Uyku bozuklukları bakım verene aşırı yüklenmeye neden olmakta ve hem bakım veren hem de bunamadan etkilenen kişide biliş ve sosyal izolasyon üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir.⁷² Uyku düzensizliğini ölçmek zorlayıcı bir durumdur. Bakıcı raporları genellikle güvenilmezdir ve bir laboratuvar ortamında polisomnografi ölçümlerinin yapılması kolay değildir.⁷³ Biyolojik saati etkilemeye yönelik ışık tedavisinin, gece uykusunu iyileştirerek ve gündüz uykusunu azaltarak

randomize, kontrollü çalışmalarda faydalı olduğu kanıtlanmıştır.^{74,75} Uykusuzluk için bilişsel davranışsal terapi de gece uyanıklığını azaltmaktadır.⁷⁶

Ajitasyon/saldırganlık AH'nin yaygın bir davranışsal semptomudur. Bir topluluk ortamında demansı olan kişilerin yaklaşık %20'sinde ve bakım tesislerinde bulunan kişilerin yaklaşık %50'sinde klinik olarak önemli bir parametredir.⁷⁷ Tedavinin ilk aşaması her zaman mümkün olduğunca ajitasyonun kaynağını ortadan kaldırmak hedeflenmelidir. Müzik, masaj terapisi veya bakıcı eğitimi gibi psikolojik ve sosyal tedaviler işe yarayabilir, ancak daha ileri vakalarda durumlarda ilaç tedavisi gerekebilir. Antipsikotiklerin mütevazı faydaları olsa da artan serebrovasküler olay riski ve mortalite gibi ciddi yan etkileri de vardır. Memantin kullanan hasta grubunda daha az ajitasyon durumu gelişimi bildirilmiştir.⁷⁸

AH'li hastalarda depresyonun teşhisi ve tedavisi karmaşıktır. AH ile ilgisi olmayan ilgisizlik ve ileri yaş depresyonu ile sıklıkla önemli ölçüde örtüşme vardır.^{79,80} AH'de depresyon tedavisi için potansiyel hedefleri ortaya çıkarabilecek patolojiler bulunmaktadır. Monoaminerjik ağlardaki nöropatoloji, hipotalamustaki kortikotropin salgılayan hormon nöronlarının sayısındaki değişiklikler gibi farklılıkların depresyonla ilişkilendirilmiştir.^{81,82} İleri yaş depresyonunda küçük hipokampal hacmin bunamayı öngördüğü bulgusu, beyin görüntülemenin de yararlı olabileceğini göstermektedir.⁸³

AH hastalarında psikozlar yaygındır. Bazı psikozlar hafif olmasına ve fazla strese neden olmadan doğal seyrini sürdürmesine rağmen, sanrılar gibi diğerleri hem hastalığı olan kişiler hem de bakıcılar için ciddi ve tehlikeli olabilir.⁸⁴ Hekimin tedaviye başlama zamanı semptomların sıklığına ve şiddetine bağlıdır. Günümüzde demansta psikozları tedavi etmek için kullanılan atipik antipsikotikler, sınırlı etkiye sahiptir ve yalnızca son çare olarak kullanılmalıdır. Demansta psikozun patofizyolojisinin çok daha iyi anlaşılması gerekmektedir.⁸⁵

Apati, AH hastalarında en sık görülen ve kalıcı nöropsikiyatrik sendromdur. Aşağıdakilerden herhangi ikisinin eşlik ettiği en az 4 hafta boyunca motivasyonun azalması olarak tanımlanır: hedefe yönelik davranışta azalma, hedefe yönelik bilişsel aktivitede azalma ve duygularda azalma.^{77,86} Her ikisi de talamik-prefrontal-subkortikal devrenin işlev bozukluğu ile ilişkili olduğundan, altta yatan nedenselliğe ı ışık tutmaya yardımcı olabilecek birçok çalışmada apati ve yürütücü işlev bozukluğu arasındaki örtüşme belirlenmiştir.⁸⁷⁻⁹⁰ AH'deki apati, ön singulat kortekste ve sol ek motor alanda gri cevher atrofi ile ilişkilidir.^{91,92} AH ve apatisi olan kişilerde ayrıca daha fazla beyaz cevher hiperintensitesi ve farklı bölgelerde azalmış ve yüksek kan akışının karışık bir modeli vardır, bu da beynin azalan kan akışını telafi etmeye çalıştığını düşündürmektedir.^{87,93} Demansı ve apatisi olan kişiler d-amfetamine karşı körelmiş bir tepki gösterirler ve bu da beyin ödül sistemi ile ilgili problemler olduğunu düşündürmektedir.⁹⁴ Nörogörüntüleme ve farmakolojinin daha iyi anlaşılması, demansta apati için tedavi yaklaşımlarının optimize edilmesine yardımcı olabilir.⁹⁵

Daha şiddetli demansı olanlarda ortaya çıkan nadir olmayan bazen yürütücü işlev bozukluğu sendromu olarak adlandırılan nöropsikiyatrik sendrom, davranışın yürütücü kontrolünün kaybindan kaynaklandığı düşünülen, engellenmemiş ve agresif davranışlardır.⁹⁶ Demansta yürütücü işlev bozukluğu sendromu için spesifik tanı kriterlerine ihtiyaç duyulmasıyla birlikte, ortaya çıktığında, yürütücü işlev bozukluğu sendromu tedavi için başka bir potansiyel hedeftir.^{96,97} Yürütücü işlev bozukluğu sendromu sıklıkla frontal-subkortikal döngü işleyişini etkileyen akut beyin hasarı olan kişilerde kendini gösterir, ancak dejeneratif bilişsel bozukluğu olan kişilerde de ortaya çıkar. Yürütücü bilişsel eksiklikler, duygusal ilgisizlik, dikkatsizlik, aşırı ve uygunsuz şakacılık, sosyal uygunsuzluk ve dürtüsellik ile karakterizedir.⁹⁸ Frontal korteksten

kaynaklanan üç spesifik “davranışsal” nöronal devreden herhangi birinde meydana gelen bozukluklar, yürütücü işlev bozukluğu sendromuna katkıda bulunabilir.^{95,96}

2.1.6. Tanı Yöntemleri

Demansı kesin olarak teşhis etmek için birçok zorluk bulunmaktadır. Bunlardan bazıları, erken semptomların değişkenliğini ve benzer bozukluklarla örtüşmesini ve ayrıca bazı durumlarda kombine veya karışık etiyolojilerin bulunması olasılığını içermektedir. Demans hastalığının teşhisi, klinik belirti ve semptomlara dayanmaktadır. Nörolojik ve psikiyatrik değerlendirme de dahil olmak üzere tıbbi öykü ve fizik muayeneden sonra, demansı teşhis etmek için kullanılan prosedürler arasında nöropsikolojik testler, laboratuvar testleri (kan ve diğer biyolojik sıvılar), beyin nörogörüntülemesi ve genetik testler yer alabilir. Beyin fonksiyonu ve fizyolojisindeki değişiklikleri saptamaya yönelik yöntemler, bazı klinik deneylerde kan biyobelirteçleriyle birlikte kullanılmış olan pozitron emisyon tomografisi (PET) ve tek foton emisyonlu bilgisayarlı tomografidir (SPECT).⁹⁹ Bazı durumlarda yapısal ve fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme (fMRI) ve daha az ölçüde bilgisayarlı tomografi (BT) de kullanılmaktadır. PET nörogörüntüleme ve diğer biyobelirteçler (genomik ve proteomik) dahil olmak üzere yeni teknolojiler, gözden geçirilmiş tanı kriterlerine dahil edilmektedir.¹⁰⁰

Herhangi bir tanı testi yapılmadan önce, hasta öyküsü, fizik muayene ve laboratuvar bulguları ile aileden alınan bilgiler dikkate alınmalıdır, çünkü bu faktörler demans tanısında çok önemlidir. İleri yaş, düşük eğitim seviyesi, cinsiyet ve ailede AH öyküsü dahil olmak üzere AH için mevcut olabilecek tüm risk faktörleri dikkate alınmalıdır. AH'yi teşhis etmek için hafızadaki bozulmayı ve ilgili semptomları açıklayabilecek diğer tıbbi, nörolojik veya psikiyatrik bozukluklar araştırılmalıdır.¹⁰¹

Demansın başlangıcından önce gelen ve demans için önemli ipuçları sağlayabilecek bedensel değişiklikler de vardır. Bunlar; hızlı kilo kaybı, yürüme bozuklukları, fiziksel zayıflık ve yavaşlamış psikomotor hız.^{102,103}

AH için 10 anahtar uyarı işareti olarak Alzheimer Derneği şunları listeler:

- Hafıza kaybı
- Bilinen görevleri gerçekleştirmede zorluk
- Dille ilgili sorunlar
- Zamana ve yere yönelim bozukluğu
- Yetersiz veya azalmış muhakeme
- Soyut düşünceyle ilgili sorunlar
- Eşyaları yanlış yerleştirme
- Ruh hali veya davranıştaki değişiklikler
- Kişilikteki değişiklikler
- İnisiyatif kaybı

Birçok hastada, AH'nin klinik olarak en belirgin özelliği, epizodik hafızanın erken bozulmasıyla birlikte bilişsel işlevdeki azalmadır. Hafıza şikâyetleri bu nedenle erken AH belirtilerini test etmek için en güvenilir ve en kolay olanıdır.¹⁰⁴

Hastayı demans açısından değerlendirmenin 2 temel yolu vardır.

İlk yaklaşım, bir testin uygulandığı ve puanlandığı bir performans ölçümüdür. Skor daha sonra yayınlanmış bir norm ile karşılaştırılmaktadır. Bu yöntem, hastanın diğer benzer yaş aralığındaki bireylere göre nasıl bir performans gösterdiğini belirlemek için

kullanılır ve puanlar zaman içinde takip edilebilir; ancak, daha önce başlangıç testi yapılmadığı sürece, skor klinisyene hastanın bilişsel yeteneklerinin değişip değişmediği veya bozukluğun günlük aktiviteleri engelleyip etkilemediği hakkında bilgi vermez. Ek olarak, kısa performans ölçümleri hastanın yaş, ırk, cinsiyet, eğitim ve sosyoekonomik durumu tarafından etkilenmiş olabileceği düşünülmektedir.¹⁰⁵

İkinci bir yaklaşım, bilgi veren bir görüşmedir. Gözlemci bir bilgi verici, hastanın bilişsel yeteneklerinin nasıl değiştiği ve değişikliğin günlük aktivitelere etki edip etmediği hakkında bilgi sağlayabilir. Her hasta kendi kontrolü olarak hizmet ettiğinden, bu değerlendirmeler önyargılardan daha az etkilenir. Bununla birlikte, bu yöntemi sınırlandıran faktör kendi başlarına veya vasıflı bakım tesislerinde yaşayan yaşlı yetişkinler için bir gözlemci bulmak olabilir. Bilgi veren ve performans ölçümü içeren bir kombinasyon yaklaşımı, demansı en erken aşamalarda tespit etme becerisini arttırabilir.^{105,106}

AH spektrumu boyunca demansı daha erken tespit etmek ve demans ayırıcı tanısını ayırt etmek amacıyla çeşitli nörogörüntüleme modaliteleri geliştirilmiştir.¹⁰⁷ Önde gelen nörogörüntüleme yöntemleri PET ve MRI olsa da BT gibi diğer modaliteler de kullanılmaktadır.^{108,109} Demans araştırmalarında BT'nin MRI'dan daha az duyarlı olduğu düşünülse de BT özellikle kemik lezyonlarını ve yeni kanamayı saptamak için yararlıdır. BT'nin MRI'ya göre diğer avantajları arasında daha düşük maliyet, daha kısa sonuç edinme süresi ve klostrofobi veya kalp pili gibi implante metalik cihazlarla kontrendikasyon olmaması yer alır. BT ve radyoaktif izleyicileri entegre eden bir nükleer görüntüleme tekniği olan SPECT, örneğin fronto-temporal demansın Jakob-Creutzfeldt Hastalığından ayırt edilmesi demans tanısında da kullanılmaktadır.¹¹⁰ fMRI, kan oksijenasyonundaki değişiklikler yoluyla dolaylı olarak beyin aktivitesini ölçen, invazif olmayan bir tekniktir. fMRI, AH'nin prodromal evrelerinde beyin ağlarının bütünlüğünü

değerlendirmede, böylece hafif bilişsel bozukluğu tespit etmede^{111,112} ve Lewy cisimcikli demansı AH'den ayırt etmede¹¹³ faydalıdır.¹⁰⁰

2.1.7. Alzheimer Hastalığında Güncel Tedavi Yaklaşımları

Kolinesteraz enzimi inhibitörleri (doğal olarak türetilmiş, sentetik ve hibrit analogları) ve N-metil d-aspartat (NMDA) antagonistleri dahil olmak üzere AH'nı tedavi etmek için onaylanmış yalnızca iki ilaç sınıfı vardır. AH'daki çeşitli fizyolojik süreçler, asetilkolin (ACh) üreten beyin hücrelerini yok ederek kolinerjik iletimi azaltmaktadır. Geri-dönüşümlü, geri-dönüşümsüz ve yarışmalı olarak sınıflandırılan asetilkolinesteraz inhibitörleri (AChEI'ler), kolinesteraz enzimlerinin (asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirikolinesteraz (BChE)) ACh'yi parçalamasını bloke ederek etki gösterir. Bu da sinaptik aralıkta ACh seviyelerinin artmasına neden olmaktadır.^{114,115} Öte yandan, NMDA reseptörünün aşırı aktivasyonu, hücre ölümünü ve sinaptik disfonksiyonu teşvik eden artan Ca^{2+} seviyelerine yol açmaktadır. NMDA reseptör antagonisti, NMDA reseptörünün aşırı aktivasyonunu ve dolayısıyla hücre içine Ca^{2+} girişini önler ve nöronun aktivitesini eski haline getirmektedir. Bu iki sınıfın terapötik etkisine rağmen, yalnızca AH semptomlarının tedavisinde etkilidirler, hastalığı iyileştirmez veya önlemezler.¹¹⁶ Ne yazık ki, son on yılda AH üzerine sadece birkaç klinik çalışma başlatılmış olup henüz olumlu bir sonuç alınamamıştır. Anormal Tau protein metabolizması, β -amiloid, inflamatuvar yanıt, kolinerjik ve serbest radikal hasarını içeren yolları değiştirmek ve başarılı tedaviler geliştirmek amacıyla AH patolojisini açıklayacak çeşitli mekanizmalar üzerinde çalışılmıştır.¹¹⁷ Öte yandan, kardiyovasküler hastalıklar veya yaşam tarzı alışkanlıkları gibi değiştirilebilir risk faktörlerinin çoğu tıbbi müdahale olmaksızın AH'yi önlenebilmektedir. Çalışmalar, fiziksel aktivitenin beyin damarlanmasını, plastisiteyi, nörojenezini aktive ederek, A β üretimini ve inflamasyonu azaltarak beyin sağlığını iyileştirebileceğini ve AH'nin prevalansını azaltabileceğini göstermiştir, bu da yaşlı

insanlarda bilişsel işlevi iyileştirmeye sağlamaktadır. Ayrıca, Akdeniz diyeti, entelektüel aktivite ve yüksek eğitim, AH'nin ilerlemesini ve hafıza kaybını azaltabileceği ve beyin kapasitesini, bilişsel işlevleri artırabileceği varsayılmaktadır.¹¹⁸

Kolinerjik hipoteze göre AH, ACh biyosentezindeki azalmadan kaynaklanmaktadır. AChE inhibe ederek kolinerjik seviyelerin artırılması, bilişsel ve nöral hücre fonksiyonunu artıran terapötik stratejilerden biri olarak kabul edilmektedir. AChEI'ler, sürekli ACh birikimi ve kolinerjik reseptörlerin aktivasyonu ile sonuçlanan sinapslarda asetilkolin bozulmasını inhibe etmek için kullanılmaktadır. Takrin, muskarinik nöronlarda ACh'yi artırarak etki gösteren AH tedavisi için FDA onaylı ilk kolinesteraz inhibitörü ilaçtı, ancak piyasaya sürüldükten hemen sonra hepatotoksisite gibi yan etkilerin yüksek insidansı ve birkaç denemede gözlemlenen fayda eksikliği nedeniyle piyasadan çekilmiştir. Daha sonra donepezil, rivastigmin ve galantamin gibi birkaç AChEI tanıtılmıştır ve günümüzde bu ilaçlar AH'nin semptomatik tedavisinde kullanılmaktadır.^{115,119-121}

Donepezil bir indanonbenzilpiperidin türevi ve ikinci nesil AChEI'dir ve AH tedavisi için önde gelen ilaç olarak kabul edilmektedir. Donepezil, asetilkolinesteraza geri dönüşümlü olarak bağlanır ve asetilkolin hidrolizini inhibe eder, bu da sinapslarda daha yüksek ACh konsantrasyonuna yol açmaktadır. İlaç, gastrointestinal ve sinir sistemleri ile ilgili hafif ve geçici kolinerjik yan etkilerle iyi tolere edilir. Donepezilin, AH ilerlemesini değiştirmeden biliş ve davranışı iyileştirme gibi AH semptomlarını tedavi etmek için kullanıldığına dikkat edilmelidir.¹²²⁻¹²⁴

Rivastigmin, AChE'nin iki aktif bölgesine (anyonik ve estearik bölgeler) bağlanarak etki gösteren ve ACh metabolizmasının önlenmesine neden olan, AChE ve BChE yalancı geri dönüşümsüz bir inhibitördür. İlaç hafif ila orta dereceli AH vakalarında kullanılmaktadır. Bilişsel işlevleri ve günlük yaşam aktivitelerini

geliştirmektedir. İlacın oral yoldan verilmesi bulantı, kusma, hazımsızlık, asteni, iştahsızlık ve kilo kaybı gibi yan etkilere neden olur. Çoğu durumda, bu yan etkiler ilacı almayı bırakmanın ana nedenidir, ancak zamanla düzelebilmekte ve sonuç olarak ilaç daha fazla tolere edilmektedir.^{125–128}

Galantamin, hafif ila orta dereceli AH vakaları için standart bir birinci basamak ilaç olarak kabul edilmektedir. Galantamin, AChE'nin yarışmalı bir inhibitörü olarak hareket ettiği ve nikotinik asetilkolin reseptörlerinin α -alt birimine allosterik olarak bağlanıp aktive edebildiği ikili bir etki mekanizmasına sahip seçici bir üçüncül izokinolin alkaloiddir. Galantamin, diğer AChE inhibitörlerine benzer şekilde, iyi etkinlik ve tolere edilebilirlik ile davranışsal semptomlarını, günlük yaşam aktivitelerini ve bilişsel performansı iyileştirebilir.^{129–132}

NMDA reseptörünün AH'nin patofizyolojisinde baskın bir rolü olduğuna inanılmaktadır. NMDA reseptör stimülasyonu, sinyal iletimini aktive eden Ca^{2+} akışı ile sonuçlanır ve sonuç olarak, sinaptik sinir iletimi, plastisite ve hafıza oluşumu için önemli olan uzun vadeli bir potansiyelizasyonun oluşumu için gerekli olan gen transkripsiyonunu tetiklemektedir. NMDA reseptörlerinin aşırı aktivasyonu, anormal düzeyde Ca^{2+} salınmasına ve MSS'deki birincil eksitator amino asit olan glutamatın aşırı uyarılmasına neden olmakta, bu da eksitotoksiste, sinaptik işlev bozukluğu, nöronal hücre ölümü ve bilişsel işlevlerde düşüş ile sonuçlanmaktadır. Birkaç rekabetçi olmayan NMDA reseptör antagonisti geliştirilmiş ve klinik deneylere girmiştir, ancak bunların çoğu düşük etkinlik ve yan etkiler nedeniyle başarısız olmuştur. Memantin, orta ila şiddetli AH'yi tedavi etmek için bu kategoride onaylanmış tek ilaçtır.^{133–135}

Memantin, AH vakalarında nörotoksisitede rol oynayan glutaminerjik sistemin aşırı aktivasyonunu önleyen bir glutamat reseptör alt tipi olan NMDA reseptörünün düşük afiniteli, yarışmasız bir antagonistidir. Memantin, tek başına veya AChEI ile

kombinasyon halinde orta ila şiddetli AH'nin tedavisinde kullanılmaktadır. İlaç güvenlidir ve iyi tolere edilir, memantinin düşük afinitesi nedeniyle normal sinaptik iletimi engellemeden uyarıcı reseptörü bloke eder.^{31,136,137}

Bu ilaçlar, AH'deki en iyi farmakolojik tedaviyi temsil etmelerine ve nispeten etkili olmalarına karşın altta yatan nörodejeneratif sürecin gidişatını değiştirmezler.¹¹⁷

2.2.Glutamat

Tüm amino asitler gibi, glutamat da bir C-ucuna ve bir N-ucuna sahiptir; C-terminali ve karbon omurgası glikozdan türemiştir. Glikoz, astrositik uç ayaklar yoluyla kan-beyin bariyerini geçer ve hücre içinde glikoliz yoluyla sitozolde pirüvik aside parçalanmaktadır. Pirüvik asit, α -ketoglutarat üreten ve daha sonra dallı zincirli bir amino asit donörü ve çeşitli amino grubu donörlerinden bir amino grubu almak üzere transaminasyona tabi tutulan trikarboksilik asit (TCA) döngüsüne girmektedir.¹³⁸

Nörotransmitter rolüne ek olarak, glutamatın ayrıca γ -aminobütirik asidin (GABA) metabolik bir öncüsü ve çeşitli amino asit bazlı türevlerin bir bileşeni olarak hizmet etmektedir. Glutamatın beyin fizyolojisinin çeşitli yönlerindeki kilit rolüyle uyumlu olarak, metabolik çalışmalarda, MSS'ye giren neredeyse tüm glikozun sonunda glutamata dönüştürüldüğünü belirlenmiştir.¹³⁹

Sitozolik glutamat, veziküler glutamat taşıyıcılarının (VGLUT) aktivitesi yoluyla veziküler membranı geçmektedir.¹⁴⁰ VGLUT'lar multimerik proton/glutamat antiporterlarıdır. Bugüne kadar, üç VGLUT klonlanmıştır. VGLUT-1 ve VGLUT-2 öncelikle glutamaterjik nöronlarda eksprese edilir; oysa VGLUT-3, GABAerjik, kolinerjik ve monoaminerjik nöronlarda saptanması bakımından biraz benzersizdir, ancak VGLUT-3'ün bu glutamaterjik olmayan nöronal popülasyonlardaki işlevi belirsizdir.¹⁴¹

VGLUT-1 ve VGLUT-2 ayrıca glial hücrelerde eksprese edilir ve depolarize astrositlerden glutamat salınımında rol oynayabilir.^{142,143}

Yüksek konsantrasyonlarda ekstraselüler glutamat ve özellikle ekstrasinaptik glutamat seviyelerinin artmasıyla sonuçlanan düzensiz uyarıcı nörotransmisyon, hücrel hasara yol açmaktadır.¹⁴⁴⁻¹⁴⁸ Bu nedenle, hücrel hasarını önlemek için hücre dışı glutamatın hızlı bir şekilde ortamdan uzaklaştırılmasının milisaniyelik bir zaman ölçeğinde gerçekleşmesi gerekmektedir. Glutamat, sinaptik aralıktan aktif olarak uzaklaştırılır ve öncelikle sinaptik olarak ilişkili astrositik süreçlerde bulunan EAAT'ler yoluyla konsantrasyon gradyanına karşı sitozole taşınmaktadır. Bugüne kadar bu tür beş yüksek afiniteli taşıyıcı tanımlanmıştır.¹⁴⁹ EAAT-1, neokorteks ve beyincikte bol miktarda tespit edilir, ancak astrositlerle sınırlı gibi görünmektedir. Ön beyindeki başlıca glutamat taşıyıcısı olan EAAT-2, çoğunlukla astrositlerde ve ayrıca sınırlı bir ölçüde nöronlarda ifade edilmektedir. EAAT-3, nörona özgüdür ve GABAerjik presinaptik sinir uçlarında zenginleştirilmiştir. EAAT-4 sadece serebellar Purkinje nöronlarının dendritlerinde tespit edilmiştir. Son olarak, EAAT-5 retinaya özgüdür. Kemirgenlerde, EAAT1-3'ün homologları sırasıyla Glutamat Aspartat Transporter (GLAST), GLT-1 ve eksitator aminoasit taşıyıcı (EAAC-1) olarak adlandırılmıştır.¹⁵⁰

Sitozole girdikten sonra, bir astrosit ve oligodendrosite özgü enzim olan glutamin sentetaz, amonyak ile adenosin trifosfat (ATP) gerektiren bir reaksiyonda glutamati glutamine dönüştürmektedir. Hem astrositler hem de nöronlar, uygun elektrofizyolojik koşullar altında glutamin alışverişine yol açan glutamin taşıyıcıları içermektedir. Nöronlarda, mitokondriyal fosfata özgü enzim olan glutaminaz, daha sonra sinaptik veziküllere yeniden paketlenmek üzere inert glutamin'i glutamata dönüştürmektedir. Nöronal glutamat üretimi için iki yol bulunmaktadır: (1) enerji metabolizması yoluyla glukoz ve amino asit türevlerinden glutamatın yeniden üretimi ve (2) glutamat geri alımı

yoluyla glutamatın geri dönüşümü, glutaminazın enzimatik aktivitesi ve glutamin taşıyıcılarının faaliyetleri.¹⁵¹

Glutamaterjik sinapslar, presinaptik sinir terminalleri ile postsinaptik dendritik dikenler (akso-dendritik sinapslar) veya bitişik sinir uçları (akso-aksonal sinapslar) arasında uyarıcı röle istasyonları olarak hizmet etmektedir. Glutamat reseptörleri iki geniş kategoriye ayrılabilir: iyonotropik ve metabotropik reseptörler. İyonotropik glutamat reseptörleri, katyonları (Ca^{2+} , Na^{+}) akıtan iyon kanallarıdır. Konformasyonel değişiklikler, agonist bağlanmasına yanıt olarak kanalı açmaktadır. Metabotropik reseptörler ise, aynı kökenli G proteinleri ile etkileşimler yoluyla ikinci haberci sistemlerini aktive eder veya inhibe etmektedir.¹⁵²

NMDA reseptörleri (NMDAR), glutamat için en yüksek afiniteye sahiptir. NMDAR alt birimlerinin üç ailesi tanımlanmıştır: (1.) NR1 (2.) NR2A-D (3.) NR3A-B. Yerinde hibridizasyon çalışmaları yoluyla, NR1 ekspresyonu beyinde her yerde ve zorunlu olarak görünmektedir; nörogelişim için kritik öneme sahiptir.¹⁵³ NR2A ifadesi neokorteks ve hipokampusta baskındır, NR2B ise esas olarak ön beyinde ifade edilir.¹⁵⁴ Buna karşılık, NR2C ve NR2D, serebellum ve diensefalon/alt beyin sapında yoğun olarak eksprese edilir.¹⁵⁵ NR3A ağırlıklı olarak neokortekste eksprese edilir ve nörogelişimsel düzenleme gösterir.¹⁵⁶ Son olarak, NR3B mRNA ifadesi, omuriliğin beyin sapı ve alfa motor nöronlarında belirgindir.^{157,158} Son zamanlarda, beyincik ve hipokampusta da NR3B tespit edilmiştir.¹⁵⁹⁻¹⁶³ NMDA reseptörleri, memeli beyinde en sıkı şekilde düzenlenen reseptörler arasındadır ve aktivasyon için ko-agonistleri gerektirmesi bakımından benzersizdir. İyon kanalı açılma olasılığını düzenleyen en az altı bağlanma bölgesi tanımlanmıştır.^{164,165}

α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit (AMPA) reseptörleri de memeli MSS’de yaygın olarak eksprese edilir ve glutamat bağlanmasına yanıt olarak hızlı

uyarıcı nörotransmisyonu aracılık etmektedir.¹⁶⁶ AMPA reseptör alt birimleri, GluR1–4 olarak adlandırılır; kainat reseptörü alt birimleri, GluR5–7 ve KA1–2’dir. Küçük ve kısa glutamat konsantrasyonlarının bile sinaptik yarığa salınması, güçlü uyarıcı postsinaptik potansiyeller üretmektedir. AMPA aracılı akımlar, hızlı bir yukarı vuruş ve hızlı akım düşüşü oluştururken, NMDAR aktivasyonu, birkaç yüz milisaniye sürebilen daha uzun süreli bir depolarizasyon fazı sağlamaktadır.^{152,167–169}

2.3. Glutamatın Alzheimer Hastalığındaki Rolü

Yetersiz sinaptik NMDAR sinyali, nöronal hücre sağ kalımını tehlikeye atmaktadır. Bununla birlikte, glutamaterjik sinyallemenin aşırı uyarılması, sinir hücrelerinin hasar gördüğü veya öldüğü eksitotoksikite veya felç gibi nörolojik travma ile sonuçlanmaktadır. Akut etkilerin yanı sıra, birçok çalışma gecikmiş yavaş gelişen nörodejenerasyonda glutamat eksitotoksitesinin bir rolü olduğunu göstermektedir.

Biriken kanıtlar, NMDAR’ların diğer iGluR’lara kıyasla kalsiyum iyonları için çok daha yüksek bir geçirgenliğe sahip olması nedeniyle, toksisitenin başlıca NMDAR’lar yoluyla aşırı Ca^{2+} girişinin aracılık ettiğini göstermektedir.^{170–174} Bu bağlamda, postsinaptik membranın orta düzeyde depolarizasyonu ve Mg^{2+} blokajını hafifleten diğer faktörler, NMDAR’ları hafif ve kronik bir şekilde aktive edebilir, bu da postsinaptik nörona uzun süreli Ca^{2+} akışına neden olmaktadır.^{175,176}

Dejenerasyon katabolik enzimlerin aktivasyonu yoluyla olabilir.^{174,177} Kalpain I, nöronal yapısal proteinler olan fodrin, spektrin, tübülin, mikrotübül ilişkili protein 2 ve çok sayıda nörofilament polipeptidini bozmakta ve hücre iskeleti yıkımına neden olmaktadır.¹⁷⁸ Hücre zarını parçalayabilen ve araşidonik asidi serbest bırakabilen fosfolipazlar aktive edilmektedir.¹⁷⁹ Araşidonik asit metabolizmasında hücresel oksidazlar tarafından serbest oksijen radikalleri üretir ve bu da lipid membranların bozulmasına neden olmaktadır. Genomik DNA’yı parçalayan endonükleazlar aktive

edilebilir.¹⁸⁰ Yükseltiilmiş sitozolik Ca^{2+} , Ca^{2+} 'ya duyarlı protein kinazları aktive etmek için diasilgliserol ile hareket edebilir, bu da Tau ve ubikuitin dahil olmak üzere hücre iskeleti proteinlerinin hiper-fosforilasyonuna neden olmaktadır.^{181,182} Hiper-fosforile Tau ve ubikuitin, nörofibriler yumakların bileşenleridir. Hücre içi Ca^{2+} depolarından salıverilmeyle artırılan hücre dışı Ca^{2+} akışı, sinaptik etkinliği ve nöronal uyarılabilirliği artırmak için pozitif bir geri besleme mekanizması yoluyla hareket ederek L-glutamatın daha fazla salınmasına neden olabilir.^{177,183} Özetle, Ca^{2+} sinyalinin patolojik seviyesi, sinaptik fonksiyonun kademeli olarak kaybına ve nihai nöronal hücre ölümüne yol açmaktadır. Bu, klinik olarak bilişsel/hafızadaki ilerleyici düşüş ve AH hastalarında görülen patolojik nöral anatomisinin gelişimi ile ilişkilidir.¹⁸⁴

Bu nedenle, NMDAR'ların hücrenin hayatta kalması için de önemli olduğu gerçeği göz önüne alındığında, NMDAR sinyalleme seviyesinin, nöronal hayatta kalmayı teşvik etmek için yeterli olması, ancak AH'de meydana geldiği gibi nörodejenerasyona sebep olacak kadar zararlı olmaması için uygun bir seviyede muhafaza edilmesi gerekmektedir. AH'de NMDAR sinyalini etkileyen başlıca faktörler arasında glutamat mevcudiyeti ve NMDAR kanal fonksiyonlarının modülasyonu yer almaktadır.^{175,176,185}

Glutamat alımı ve geri dönüşüm sistemi, sinyalleşme süreçleri için glutamatın kullanılabilirliğini belirleyen önemli bir faktördür. Ne yazık ki, AH'de bu sistem ciddi şekilde zayıflayabilir. AH hastasında glutamat taşıyıcı kapasitesinde ve protein ekspresyonunda azalma ve VGLUT'ların seçici kaybı görülmüştür.¹⁸⁶⁻¹⁸⁸ Ayrıca, esas olarak presinaptik astrositlerde bulunan EAAT-2'nin AH'de fonksiyonunun bozulduğu bildirilmiştir.¹⁸⁹ Nöronal hücre kültüründe çeşitli A β peptit türlerini kullanan çalışmalar, toksik A β 'nin glutamat alımı/geri dönüşüm mekanizmalarını bozarak daha fazla glutamat mevcudiyetine izin verebileceği fikrini destekler görünmektedir.¹⁹⁰⁻¹⁹² Bu artmış

glutamat arzının, AH ile ilişkili eksitotoksisite ve nörodejenerasyona katkıda bulunması muhtemeldir.¹¹⁶

2.4. Ampisilin'in AH ile İlişkisi

β -laktam antibiyotikler, hem Gram-negatif hem de Gram-pozitif bakterilerde peptidoglikan çapraz bağlanmasının son basamaklarında yer alan enzimler olan temel penisilin bağlayıcı proteinlere kovalent bağlanmanın bir sonucu olarak bakteri hücre duvarı oluşumunu engelleyen bakterisidal ajanlardır.¹⁹³

Geniş kapsamlı bir çalışmada, nöronları eksitotoksik nöronal hasardan koruyan GLT-1'in transkripsiyonunu ve ekspresyonunu β -laktam antibiyotiklerin modüle edebildiğini göstermektedir.¹⁹⁴ β -laktam antibiyotikler ayrıca amiloid parçalayıcı enzimlerin mRNA ekspresyonunu modüle ederek A β metabolizması ve klerensi üzerinde olumlu etkiler göstermiştir.¹⁹⁵ Bir çalışmada ise, seftriaksonun kinaz katalitik bölgesinde bağlanma için ATP ile rekabet ederek etki ettiğini ve Tau hiperfosforilasyonunu inhibe ettiğini ileri sürmektedir.¹⁹⁶ Bu nedenle β -laktam antibiyotikler, GLT-1 ekspresyonunu upregüle ederek ve kinaz (CDK-5 ve GSK-3 β) yollarının aktivasyonunu inhibe ederek, optimal Tau fosforilasyonunun korunmasına yardımcı olmaktadır.¹⁹⁷⁻¹⁹⁹ Ayrıca GLT-1 ekspresyonunun artması neticesiyle beyin iskemisi modelinde oluşan oksidatif stres azalttığı kanıtlanmıştır.²⁰⁰

Ampisilin, yapılan literatür araştırmalarında sıçanlarda beyin iskemisi, kokain ve alkol bağımlılığı üzerinde çalışılmıştır. Bu çalışmaların sonucunda GLT-1 ekspresyonunu artırması özelliği aracılığıyla olumlu sonuçlar alınmıştır.²⁰¹⁻²⁰³

2.5. AH Hayvan Modelleri

DeneySEL hayvan modelleri, ilaç geliştirme sürecinin temel taşıdır. İşlevleri, insanlarda hastalığı veya hastalığın bir yönünü yakından taklit etmek ve *in-vitro* olarak

elde edilen sonuçları klinik uygulamalara dönüştürmektir. MSS'ni etkileyen patolojilerin deneysel hayvan modellerine duyulan ihtiyaç 1980'den beri kabul edilmiştir.²⁰⁴ Aynı yıl bu tür deneysel hayvan modelleri için kriterler oluşturma girişiminde bulunulmuştur.²⁰⁵

1980'lerin başında, kolinerjik nörotransmisyonun ilerleyici dejenerasyonunun, AH'nin kaynağı değilse de patolojik yol olduğu ve en azından hastalığa önemli bir katkıda bulunduğu düşünülmekteydi. Bu on yıl boyunca, kliniklerde görülen bilişsel performans değişikliklerini yeniden üretmek için merkezi kolinerjik işlevin bozulmasına dayalı olarak AH'nin ilk hayvan modelleri geliştirildi.²⁰⁶ Önde gelen strateji, birçok durumda kolin hardalı aziridium AF64A'nın kullanılmasıydı.²⁰⁷⁻²⁰⁹ Başka bir yöntem ise kolinerjik nöronların bir alt popülasyonunun eksitotoksik dejenerasyonunu indüklemek için bir glutamaterjik agonist kullanmaktan ibaretti.²¹⁰ 1990'larda başlatılan değişim, geliştirilen sıçan modellerinin çoğunun amiloidojenik kaskad ve ilgili amiloid peptid patolojik yollarını yeniden üretme girişimini yansıttığı sonraki on yılda tam şeklini almıştır. Genel ilke, hayvanın kliniklerde belgelenen bir veya birkaç patolojik özelliği geliştirmesi için sıçan beynine bir tür amiloid peptidi enjekte etmekten oluşmaktadır.²¹¹⁻²¹⁴

2000'li yıllarda geliştirilen başka bir strateji, AH'nin tip 3 diyabet olabileceği hipotezine dayanıyordu.²¹⁵ Bu hipotez, insülin, insülin benzeri büyüme faktörü ve bunlara karşılık gelen reseptörlerin ekspresyonunda tutarlı bir azalma gösteren AH hastalarının beyinlerinin ölüm sonrası histolojik bulgularına dayanmaktadır.²¹⁵ Daha sonra pankreatik β hücreleri için toksik olan bir glukozamin nitrozüre türevi olan streptozotosinin sıçan beynine enjekte edilmesinin de aynı modelle sonuçlanacağı varsayıldı. Streptozotosin uygulaması, Tau proteininin fosforilasyonunu, amiloid birikimlerini, bilişsel bozukluğu, insülin duyarsızlaşmasını ve nöron ölümünü indüklediği gözlenmiştir.^{206,216,217}

2.6. Mikroelektrot Üretimi

Mikroelektrot teknolojisi in-vivo ölçümlere imkân tanınması dolayısıyla yaklaşık 35 yıldır üzerine çalışılan bir teknolojidir.^{218,219} Mikroelektrotlardan elde edilen sinyaller Alzheimer, Parkinson gibi hastalıkların oluşturduğu nörotransmitter değişikliklerini incelemek için kullanılmaktadır. Bu sebeple son yıllarda alttaş malzemeleri, kayıt bölgelerinin geometrisi, kanallar ve kayıt bölgelerinde kullanılan metallerle ilgili yapılan çalışmalar son yıllarda artmaktadır.²²⁰ Yapılan bir çalışmada seramik tabanlı mikroelektrotların silikon tabanlılara göre hassaslık, seçicilik ve cevap sürelerinin daha iyi olduğu söylenmektedir.^{221,222} Birçok nörolojik rahatsızlığın etki mekanizmalarından biri olduğu düşünülen glutamatın tayini için genellikle mikrodializ yöntemi kullanılmaktadır. Fakat bu yöntemde hedef kimyasalın algılanmasında sorunlar yaşanmakla birlikte anlık değişimlerin izlenmesi mümkün değildir. Mikroelektrot teknolojisiyle bu sorun aşılmıştır.^{223,224} Elektrot geometrisi üzerine yapılan bir çalışmada Yoon ve arkadaşları plazma ve ıslak aşındırma yöntemi kullanarak mikroelektrot kalınlıklarını ortalama 5-90 µm aralığında tutmayı başarmışlardır. İnce üretilen elektrotların dokuya daha az hasar verdiği tespit edilmiştir.²²⁵ Frey ve arkadaşları 6-5 mm uzunluğunda 50 × 150 µm Pt kayıt bölgelerine sahip silikon alttaşlı elektrodu kuru aşındırma yöntemiyle üretmişlerdir. Bu çalışmada farklı analitlerin ölçümü cross talk olmadan yapılabilmektedir.²²⁶ Başka bir çalışmada mikroelektrot uzunluğu arttırılarak istenen bölgeye daha iyi yerleşimi sağlanmıştır.²²⁷ Bir başka çalışmada ise nikel elektrokaplama yöntemi ile nikel tabanlı multielektrotlar üretilmiş bağlantı için de parylene kablo kullanılmıştır. Parylene kablo paketleme problemlerini azaltmış ve elektriksel bağlantıyı kolaylaştırmıştır.²²⁸ Son yıllarda ince yapıları ile daha az hasara yol açan ve esneklikleri dolayısıyla dayanımları daha iyi olan film tabanlı elektrotların üzerine yapılan çalışmalar artmıştır.²²⁹

2.6.1. Litografi

On yıllardır, mikro ve nanolitografi teknolojisi, entegre devrelerin (IC) ve mikroçiplerin imalatına katkıda bulunmuştur. Mikro ve nanolitografi, birkaç nanometreden onlarca milimetreye kadar değişen özellik boyutuna sahip desenler oluşturmak için kullanılan teknolojidir. Litografi teknikleri, maske veya şablon kullanımına göre iki türe ayrılır: maskeli litografi ve maskesiz litografi. Maskeli litografi, desenleri aynı anda geniş bir alana aktarmak için maskeleri veya kalıpları kullanmaktadır. Maskeli litografi biçimleri arasında fotolitografi, yumuşak litografi ve nano baskılı litografi bulunmaktadır. Öte yandan, elektron ışını litografisi, odaklanmış iyon ışını litografisi ve taramalı sonda litografisi gibi maskesiz litografi, maske kullanmadan seri yazı ile isteğe bağlı desenler üretir.²³⁰⁻²³²

Nanobilim ve mühendislik, mevcut teknik engellerin üstesinden gelmek için alternatif yollar açarak geleneksel teknolojilere giderek daha fazla katkıda bulunmuştur. Bunlardan birkaçını saymak gerekirse nano tıpta, kanserler, kalp hastalıkları ve AH dahil birçok hastalığın teşhis ve tedavisi için yüksek hassasiyetli ve yüksek çözünürlüklü algılama ve manipülasyon için nanoelektromekanik sistemler ve ultra düşük konsantrasyon ve tek moleküler algılama için nanobiyosensörler litografi yardımıyla geliştirilmiştir.^{233,234}

2.6.1.1. Fotolitografi

Bu teknik, istenen bir deseni tanımlamak için ışığa duyarlı bir polimerin ultraviyole (UV) ışığa maruz bırakılmasını kullanmaktadır. Başlangıçta, opak özelliklere sahip bir fotomaske, substrat üzerine kaplanmış foto-rezistör üzerinde pozlama yapmak için 193-436 nm aralığında dalga boylarına sahip UV ışığı ile aydınlatılmaktadır.^{219,221} Maruz kalan alanda, foto-dirençli polimer zincirleri bozulur ve geliştirici adı verilen kimyasal bir çözeltide daha fazla çözünür hale gelmektedir. Daha sonra, maruz kalan

foto-direnç, arzu edilen foto-direnç modelini oluşturmak için bir geliştirici içinde kaldırılmaktadır. Bu desenli foto-direnç, alt tabaka üzerinde topografi oluşturmak için sonraki aşındırma veya biriktirme işlemlerinde koruyucu bir katman olarak kullanılabilir.²³⁵



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu tez çalışması, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Sinir Bilim ve Davranış Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.1.1. Deney Hayvanları

Deney hayvanı olarak Sprague Dawley cinsi 250-300 yaklaşık gram arası 32 adet dişi sıçan Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edilmiştir. Çalışma süresi içerisinde sıçanların normal oda sıcaklıkları altında ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) 12 saatlik döngüler halinde aydınlık ve karanlık ortamda kalması ve ad libitum beslenmesi sağlanmıştır. İlgili olan tez çalışmasının etik kurul kararı Atatürk Üniversitesi Yerel Etik Kurulu tarafından 26.09.2019 tarihli 11 sayılı toplantıda 42190979-000-E.1900268900 numaralı karar ile onaylanmıştır.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez çalışması sırasında cerrahi işlemler için anestezi indüksiyonu amacıyla İ.E. Ulagay İlaç Sanayi A.Ş., Türkiye’den temin edilen Tiyopental Sodyum (Pental Sodyum IV Flakon) sıçanlara 40 mg/kg dozunda intraperitoneal (ip.) olarak verilmiştir. Deney sonunda aynı anestezi madde 80 mg/kg dozunda ötenazi için kullanılmıştır.

Tez çalışması sırasında cerrahi işlemlerin başlangıç ve bitişinde insizyon bölgesinin sterilizasyonu amacıyla Batiqon’dan temin edilen %10’luk povidon iyot çözeltisi kullanılmıştır.

Sigma-Aldrich Co. LLC, Almanya’dan temin edilen streptozotosin (STZ), STZ ile indüklenmiş Alzheimer hastalığı modeli oluşturmak amacıyla sıçanların lateral ventriküllerine toplam 10µl’lık hacimde bilateral olarak Hamilton şırıngası yardımıyla 3 mg/kg dozunda intraserebroventriküler (icv) olarak uygulanmıştır.

STZ enjeksiyonu sırasında ortamın ozmotik dengesini korumak amacıyla Sigma-Aldrich Co. LLC, Almanya'dan temin edilen sodyum sitrat ve sitrik asit kullanılarak pH 4.5 ayarlanmış sitrat tamponu kullanılmıştır.

Sigma-Aldrich Co. LLC, Almanya'dan temin edilen Memantin hidroklorür rutin tedaviyi taklit etmek amacıyla 24 gün boyunca streptozotosin + memantin (STZ+MEM) grubuna 10 mg/kg dozunda ip. olarak uygulanmıştır.

İ.E. Ulagay İlaç Sanayi A.Ş., Türkiye'den temin edilen Ampisilin (Penbisin 1000 mg flakon), streptozotosin + ampisilin (STZ+AMP) grubuna 24 gün boyunca 200 mg/kg dozunda ip. olarak uygulanmıştır.

İn-vivo voltametrik ölçümler için Center for Microelectrode Technology Lexington, Kentucky, Amerika Birleşik Devletleri'nden S2-FM model hareketli hayvan elektrodları temin edilmiştir.

Hareketli hayvan elektrotlarının sıçan kranial kemikleri üzerine sabitlenmesi için İntegra marka soğuk akrilik karışımı kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Deney Planı

Grup başına 8 hayvan içeren 4 deney grubu olacak şekilde toplam 32 adet dişi Spraque Dawley sıçan kullanılarak deney planlaması yapıldı. Bu gruplar aşağıda belirtilmiştir.

Grup 1: Kontrol grubu. Bazal ölçümler tamamlandıktan sonra ilk günde bilateral olarak icv pH 4.5 sitrat tamponu enjeksiyonu yapılmış olan grup.

Grup 2 (STZ): Streptozotosin grubu. Bazal ölçümler tamamlandıktan sonra 2. günde bilateral olarak icv streptozotosin enjeksiyonu yapılmış olan grup.

Grup 3 (STZ + MEM): Streptozotosin + Memantin grubu. Streptozotosin enjeksiyonunu takiben 24 gün boyunca memantin tedavisi (10 mg/kg) verilen grup.

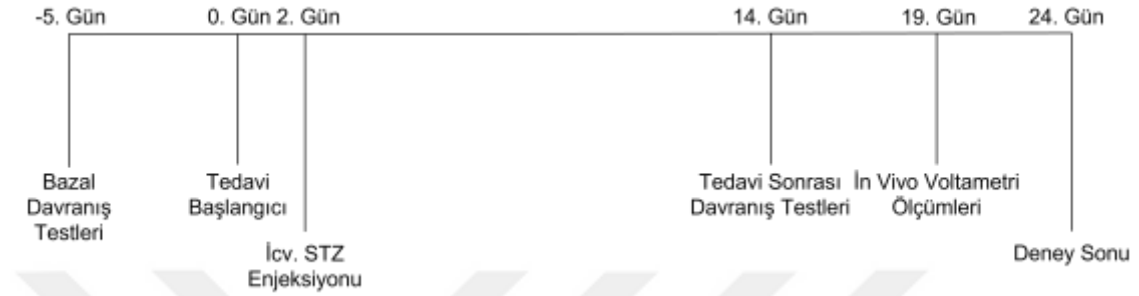
Grup 4 (STZ + AMP): Streptozotosin + Ampisilin grubu. Streptozotosin enjeksiyonunu takiben 24 gün boyunca ampisilin tedavisi (200 mg/kg) verilen grup.

Grup dağılımları yapıldıktan sonra Morris su labirenti, pasif sakınma ve lokomotor aktivite testleri bazal ölçümleri belirlemek için yapıldı. Tedavinin 0. günde sırasıyla kontrol, STZ, STZ + MEM, STZ + AMP gruplarına ilk iki gruba salın olacak şekilde, memantin 10 mg/kg ve ampisilin 200 mg/kg enjeksiyonları i.p. olarak yapıldı ve enjeksiyonlar hayvanlar sakrifiye edilene kadar 24 gün boyunca devam etti.

İcv. enjeksiyon koordinatları sıçan beyin atlasına bakılarak belirlendi. Koordinatlar sırası ile 0.8 mm anterioposterior; 1.5 mm mediolateral ve 3.6 mm dorsoventral olmak üzere her iki ventrikülün yeri bilateral olarak tespit edildi. Deneyin 2. gününde tiyopental sodyum ile 40 mg/kg dozunda anestezi sağlandıktan sonra sıçanlar stereotaksi cihazına başları hareket etmeyecek şekilde kuralına uygun olarak sabitlendi. Sabitleme işlemini takiben %10'luk povidon iyot çözeltisi ile insizyon yapılacak bölge temizlendi. Temizlenen bölgede steril bir bistüri yardımıyla insizyon yapıldı. İnsizyon sonrası temizlenen bölge üzerinde sıçan beyin atlası yardımıyla belirlenen koordinatlar işaretlendi ve dişçi turu yardımıyla beyin yüzeyine zarar vermeyecek hassasiyetle işaretli bölgeler delindi. Delinen bölgelerde bulunan beyin zarları ince bir iğne yardımıyla kaldırılıp Hamilton şırıngası içerisinde doldurulan 10 uL hacmindeki STZ çözeltisi kilograma 3 mg gelecek şekilde bilateral olarak ventriküller içine enjekte edildi. Kontrol grubunda ise belirlenen bu koordinatlara pH 4.5'te hazırlanan sitrat tamponu enjekte edildi. İşlemler bittikten sonra insizyon bölgesi 3/0 iplik yardımıyla sütüre edildi. Tüm işlemler bittikten ve tedavi ilaç enjeksiyonları 14. gününe ulaştıktan sonra Morris su labirenti, pasif sakınma ve lokomotor aktivite testleri tekrar edildi. Davranış testleri

bittikten sonra AP 3.6, ML 3.8, DV 3.6 koordinatları dişçi turu yardımıyla delinerek mikroelettrotların yerleştirilmesi sağlandı.

Tüm ölçümlerin sonunda sıçanlar dokuları alınmak üzere 80 mg/kg tiyopental sodyum çözeltisi ile sakrifiye edildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Deney planı

3.2.2. Davranış Testleri

3.2.2.1. Lokomotor Aktivite Testi

Lokomotor aktivite testi için May Act 508 lokomotor aktivite kafesleri kullanılmıştır. Bu kafesler 42 cm × 42 cm × 42 cm boyutunda ve şeffaf pleksiglas malzemeden üretilmiştir. Pleksiglas kafesler çift yönlü 5 cm ve 15 cm yükseklikte infrared (IR) sensorlar içeren düzeneğin içerisine konulmuştur (Şekil 3.2). Düzenek IR ışınların sıçan hareketleri tarafından kesilmesiyle oluşan konum bilgisiyle sıçanın horizontal aktivite, dinlenme süresi, toplam katettiği mesafe ve ambulatori, stereotipik hareketleri hakkında bilgi verir. Test süresi boyunca sıçanların çevre ile etkileşimleri kesilmiştir. Deney sırasında 10 dakikaya ayarlanan zaman sayacı boyunca kafes içerisine bırakılan sıçanın hareketleri kaydedilmiştir. Her bir sıçan değişiminden sonra ortam %70'lik etanol yardımıyla bir önceki sıçanın kalıntılarından ve kokusundan temizlenmiştir.



Şekil 3.2. May Act 508 lokomotor aktivite kafesi

3.2.2.2. Pasif Sakınma Testi

Aydınlık ve karanlık olmak üzere iki bölgeden oluşan pasif sakınma düzeneği bu testin yapılması için kullanılmıştır. İki bölge arasında sıçanın aydınlık bölgede bulunmasıyla ve karanlık bölgeye girmesiyle açılıp kapanan, daha sonra da karanlık bölgede geçirdiği sürenin sonunda tekrar açılan koyu renkli bir kapı bulunmaktadır. Bölgelerin zemininde birbirine paralel olarak bulunan iletken metal çubuklar bulunmaktadır. Bu metal çubuktaki kısa süreli elektriksel iletim karanlık bölgede hareketin olmasıyla bölgelerarası kapının kapanmasıyla başlar. Süre sonunda kapı otomatik olarak açılır ve aydınlık bölgede oluşan harekete bağlı olarak deney sonlanır (Şekil 3.3).

Sıçan aydınlık bölgeye bırakıldıktan sonra kamera yardımıyla görüntü işleyen program bölgelerarası kapıyı açar ve sıçan içgüdüsel olarak karanlık bölgeye geçer. Sıçanın karanlık bölgeye geçişini takiben bölgelerarası kapı kapanır ve 3 saniye boyunca 1 mA olacak şekilde metal çubuklara akım verilir. Verilen akımdan etkilenen sıçan süre sonunda açılan kapıdan aydınlık bölgeye geçer ve deney sonlanır. Bir gün sonra aynı test tekrar edilir. Sıçanların karanlık bölgeye geçiş süreleri kaydedilir. Eğer karanlık bölgeye

geçiş olmazsa deney otomatik olarak 5 dakika sonra sonlanır ve bu süre ilgili sıçan için kaydedilir. Bu süreler vasıtasıyla deney hayvanlarının öğrenme durumu gözlenir.



Şekil 3.3. May PAC-214 pasif sakınma kafesi

3.2.2.3. Morris Su Labirenti Testi

1,5 metre çapta ve 0,6 metre yüksekliğe sahip kalın siyah renkli plastikten imal edilmiş yuvarlak yüzme labirenti içinde bulunan 40 cm boyundaki siyah platformun görünmemesi için granül boya ile siyah renge boyanacak olan su ile 42 cm yüksekliğe kadar doldurulur. Suyun sıcaklığı labirentin tabanında bulunan rezistanslar ve labirentin kenarında bulunan ısı sensörü vasıtasıyla 25 °C'ye erişene kadar ısıtılır. Tank yüzeyi belirlenen yönler arasında 4 eşit parçaya labirentin tepesinde labirentin tamamını gören bir kamera yardımıyla bölünür. Yönler kuzey, güney, doğu ve batı olmak üzere program vasıtasıyla isimlendirilir. Su labirenti üzerindeki yönler bu deney sırasında gerçek coğrafik yönlerle belirlenmiştir. Belirlenen 3 yön için farklı renkte ve farklı şekilde

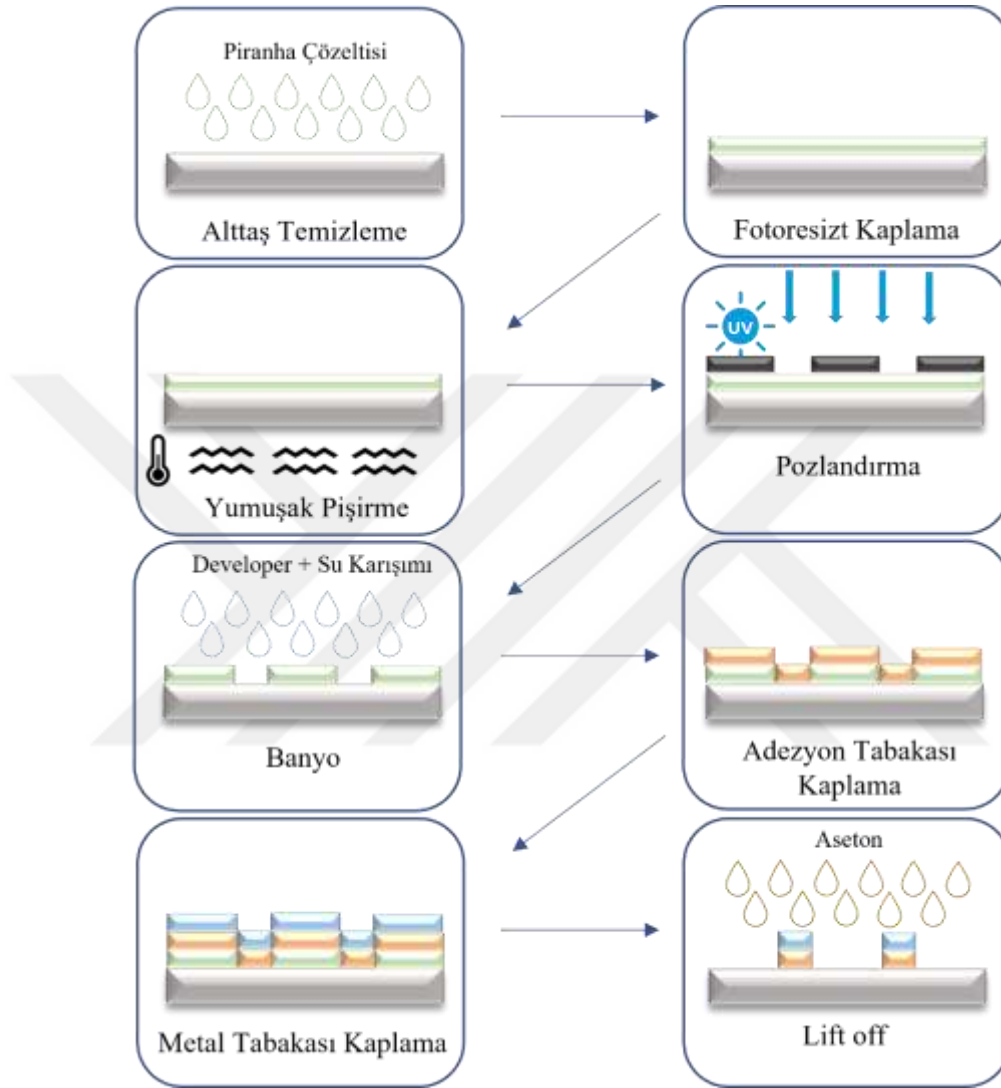
kesilen kartonlar ilgili yönler yerleştirilir. Boşta kalan yönde ise araştırmacı bulunur. Yüzey alanı 12.5 cm × 12.5 cm olan platform yönler arasında kalacak şekilde belirlenen bölgeye yerleştirilir. Bu bölge bu deney süresince kuzeybatı olarak belirlenmiştir (Şekil 3.4). Tüm sıçanların belirlenen yönlerden birer kez olmak üzere 4 gün boyunca tüm yönlerden yüzmesi sağlanır. Deney sırasında sıçanların platformu bulması süresi her gün her yön için kaydedilir. Eğer sıçan 90 saniye içerisinde platformu bulamazsa deney otomatik olarak sonlanır. 5. günde ise sıçanlar içinden platformu çıkarılmış su labirenti içerisine bırakılır ve platformun bulunması gereken alanda geçirdikleri süre ve hareketleri boyunca hedef bölgede bulunmaları ısı haritasıyla analiz edilir.



Şekil 3.4. Morris su labirenti

3.2.6. Mikroelektrot Fabrikasyonu

Mikroelektrot fabrikasyonu işleminde sırasıyla Şekil 3.5'teki basamaklar izlenmektedir.



Şekil 3.5. Mikroelektrot fabrikasyon basamakları

3.2.6.1. Alttaş Temizleme

Alttaş olarak kapton film kullanılmıştır. Alttaş üzerinde bulunan kirler ve kalıntıların temizlenmesi için alttaş temizlenme işlemi yapılmıştır. Bu işlem sırasında temizleme çözeltisi olarak Piranha çözeltisi (30 ml sülfürik asit (H_2SO_4) ve 10 ml hidrojen peroksit (H_2O_2) karışımı) kullanılmıştır. Alttaş olarak kullanılan kapton film 2 dk boyunca Piranha çözeltisi içerisinde bekletilmiş, bekleme süresi sonunda deiyonize su ile

yıkayıp azot tabancası ile kurutulmuştur. Daha sonra fotorezist kaplaması için dehidrasyon işlemi 120 °C’de 5 dk boyunca uygulanmıştır.

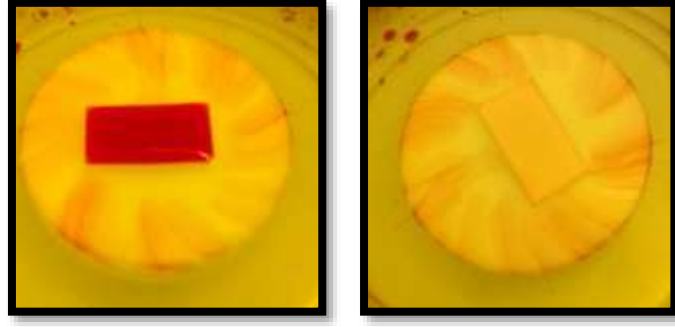
3.2.6.2. Fotorezist Kaplama

Fotolitografi, önceden hazırlanmış bir maske kullanarak alttaş üzerinde kaplı olan fotorezistin şekillendirilmesi işlemidir. Fotorezistin ışık gören kısımlarının developer’da çözünüp yok olması için pozitif fotorezist kullanılırken, tersi ise negatif resist kullanarak sağlanmaktadır. Bu çalışmada fotorezist olarak kaplama işleminde AZ5214E pozitif fotorezist ve esnek olması dolayısı ile kapton alttaş kullanılmıştır (Şekil 3.6). Kapton alttaşlar elektronikte uzun yıllarda beri kullanılmasına rağmen özellikle son yıllarda esnek olmaları, termal ve elektrik özellikleri dolayısı ile esnek elektronik alanında da en yaygın kullanılan alttaşlardan birisidir.



Şekil 3.6. Esnek kapton film

Kaplama için yüzeyi tamamen kaplayacak miktarda fotorezist kapton alttaş üzerine pipet ya da şırınga yardımıyla eklenmiş ve spinner cihazı yardımıyla peş peşe olacak şekilde önce 500 rpm’de 5 saniye, sonra 4500 rpm’de 50 saniye boyunca fotorezistin yüzeyde ince tabaka olarak yayılması sağlanmıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Döndürmeli kaplama (spinner) ile fotorezist kaplama işlemi a. Kaplama öncesi b. Kaplama sonrası

3.2.6.3. Yumuşak Pişirme

Yumuşak pişirme işleminde alttaşın fotorezistin UV ışınlarına daha duyarlı hale gelmesini ve alttaşa daha iyi yapışmasını sağlamak amacıyla 50 saniye boyunca 100 °C’de hotplate üzerinde ısıya maruz bırakılmıştır.

3.2.6.4. Pozlandırma

Litografi işleminin yapılabilmesi için maske hizalayıcılar temel cihazlardan biridir. Litografide maske hizalayıcı olarak ve alttaş üzerine kaplanmış üzerindeki fotorezist materyalini istenilen bölgenin UV ışığa istenilen süre kadar maruz bırakmak amacıyla kullanılmaktadır. Bu çalışmada Süss Microtec MBJ4 maske hizalayıcı kullanılmıştır. Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Araştırma Merkezi (DAYTAM) bünyesinde bulunan maske hizalayıcı; kontak, Hard (1µm), Soft (2µm), Vakum (0.8µm) modlarına sahiptir ve ayrıca titreşim yalıtımı masası mevcuttur. Bu maske hizalayıcı ile 1.0 µm veya daha küçük çözünürlük gerçekleştirilebilmektedir. Mask Aligner cihazına (Şekil 3.8) yerleştirilen fotorezist kaplı kapton alttaş, istenilen desendeki maske ile hizalandıktan sonra 365 nm dalga boyunda UV ışığa 25 saniye boyunca maruz bırakılmıştır.



Şekil 3.8. Mask Aligner ile pozlandırma işlemi

3.2.6.5. Banyo

UV ışığa maruz kalan bölgede asidik özelliğe sahip olan fotorezistin alttaş üzerinden temizlenmesi için bazik özellikte olan developer kullanılmıştır. Banyo işlemi için 10 ml developer ve 40 ml distile su karışımı kullanılmıştır (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Banyo sonrası alttaş üzeri desen görünümü

3.2.6.6. Adezyon tabakası

Bu çalışmada kimyasallarla bağ yapmayan inert metallerden platin (Pt) bağlantı yolları ve kayıt bölgeleri için metal tabaka olarak seçilmiştir. Ancak önceki çalışmalar Pt'in kapton yüzeyine yeteri kuvvette tutunmadığı bilinmektedir.²³⁶ Bu nedenle kapton film ile Pt arasına tutunmayı sağlama için titanyum (Ti) ve krom (Cr) gibi adhezyon tabakasının kaplanması literatürde önerilmektedir.^{237,238} Metal tabakasının alttaşa iyi

tutunması için alttaş DC saçırmalı kaplama (sputter coating) cihazı yardımıyla 10 µm kalınlığında titanyum veya krom ile kaplanmıştır.

3.2.6.7. Metal tabakası

Bağlantı yollarının, kayıt ve bağlantı bölgelerinin oluşması için adezyon tabakasının üzeri metal ile kaplanmıştır. Yapılan çalışmada iletkenliğinin iyi olması ve inert metal olması nedeniyle platin kullanılmıştır (şekil 3.10).



şekil 3.10. Platin metal tabakası

3.2.6.8. Lift-off

Metal kaplama aşamasından sonra alttaş aseton içine konularak istenmeyen bölgelerdeki metal tabakasının kalkması sağlanmıştır. Lift-off işleminden sonra, aynı anda birçok mikroelettrodun paralel bir şekilde üretimi gerçekleştirilmiştir (şekil 3.11).



şekil 3.11. Lift-off işlemi sonrası mikroelettrot serileri

3.2.6.9. Paketleme

Mikroelettrodun fabrikasyonu bittikten sonra üretilen kapton mikroelettrot uçları kesme ve PCB ile birleştirme aşamalarını içeren paketleme işlemine alınmıştır. Paketleme

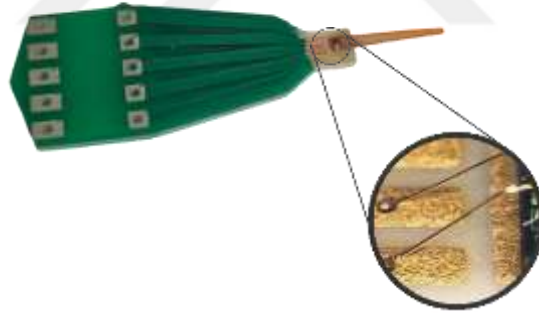
işleminde sırasıyla kesme, yapıştırma, wire bonding ve epoksi damlatılması işlemleri yapılmıştır (Şekil 3.12).

Kesme: Paralel olarak maske yardımıyla üretilen 20-30 adet mikroelettrot, dilimleme cihazı (dicer) yardımıyla kesilmiştir.

Yapıştırma: PCB ve kapton film mikroelettrodun endüstriyel yapıştırıcı kullanılarak yapıştırılmasını içerir. Bu sayede wire bonding yapılacak alanın hareketsizliği sağlanmıştır.

Wire Bonding: Wire bonding cihazı kullanılarak altın tel ile yapılan elektrot kanallarının PCB kanallarına bağlanması işlemidir.

Epoxy: Altın telleri izole etmek ve mikroelettrot PCB bağlantısını sağlamlaştırmak amacıyla yapılmıştır.



Şekil 3.12. Paketlemesi yapılmış mikroelettrot

3.2.5. İn-Vivo Voltametri

İn-vivo voltametri testlerinde kullanılmak üzere yüzeyleri glutamat oksidaz ve nafyonla kaplı olan S2-FM model hareketli hayvan elektrotları Center for Microelectrode Technology Lexington, Kentucky, Amerika Birleşik Devletleri'nden temin edildi. Bu elektrotların seçicilik ve hassasiyetlerinin belirlenmesi için kalibrasyon testlerine tabi

tutuldu. Kalibrasyon testlerinde yeterli seçicilik ve hassasiyet gösteren mikroelettrotlar deneyde kullanılmak üzere ayrıldı.

3.2.5.1. Kalibrasyon testleri:

Kalibrasyonu yapılacak olan mikroelettrot ucunun üçte ikisi 37°C 0.05M 40 ml PBS çözeltisi içerisinde bulunacak şekilde 1 saat bekletildi. Mikroelettroda bütünleşmiş halde bulunan Ag/AgCl referans elektrotu PBS çözeltisi içerisine mikroelettroda temas etmeyecek şekilde daldırıldı. Fast16 mkIV (Quanteon LLC, Nicholasville, Kentucky, Amerika Birleşik Devletleri) sistemine bağlı bulunan mikroelettrodun ve içinde bulunduğu ortamın konfigürasyon verileri Fast2014 (Quanteon LLC, Nicholasville, Kentucky, Amerika Birleşik Devletleri) programına kullanılacak olan elektrodun seri numarası ile girildi. Hazırlıklar tamamlandıktan sonra sistem çalıştırıldı. Sistem redoks reaksiyonunu sağlamak için mikroelettrot ucuna 0.7 Voltluk bir gerilim uyguladı. Sistemin mikroelettrodun 4 kanalı üzerinden okuduğu akım değerleri sabit bir temel seviyeye gelene kadar beklendi ve bu konuma gelindiğinde temel seviyeyi belirtmek için baseline butonuna basıldı. Elektrotun nasyon tabakasının işlevselliğini anlamak için 500 uL 20mM askorbik asit çözeltisi PBS çözeltisi bulunan beherin içine eklendi. Tekrar sabit bir akım değerine ulaşıldığında interferent butonuna basıldı. Daha sonra kalibrasyon grafiği çıkarmak ve glutamat oksidazın işlevselliğini değerlendirmek amacıyla ortama minimum 3 kez olarak 40 uL 20 mM glutamat çözeltisi her eklemenin ardından sabit bir akım seviyesine ulaşıldığı anda analit butonuna basılmak kaydıyla ardışık olarak eklendi. Bu işlemlerin sonunda kalibrasyon prosedürü sonlandırıldı (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. Hareketli hayvan mikroeletrodu kalibrasyonu

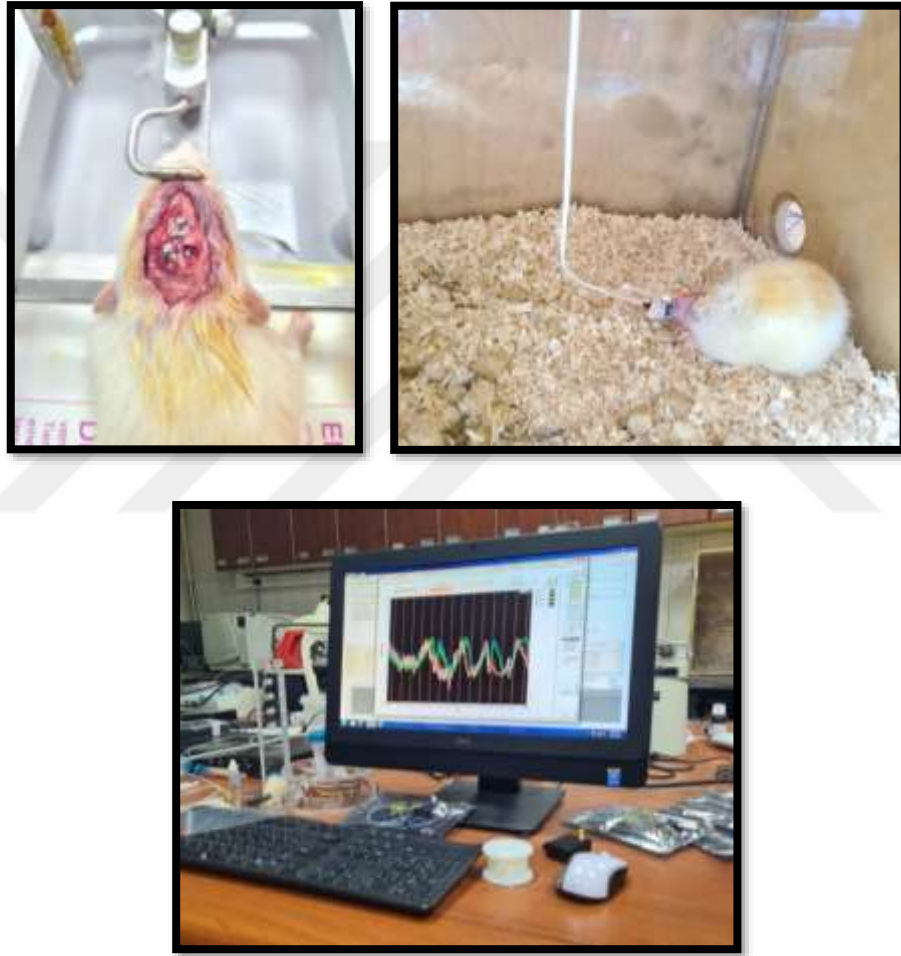
3.2.5.2. Kanülün mikroeletrot üzerine sabitlenmesi:

Quanteon LLC, Nicholasville, Kentucky, Amerika Birleşik Devletleri'nden temin edilen kanül yaklaşık 30-40 mikrometre aralığında mikroeletrot yüzeyine değmeyecek şekilde mikroeletrot yüzeyine sabitlendi. İn-Vivo voltametrik ölçümler için hazırlanan 200 mM glutamat çözeltisi kanülün bağlı olduğu kanala dolduruldu ve Pikospitzer yardımıyla enjeksiyon sistemi test edildi.

3.2.5.3. Mikroeletrodun Deney Hayvanına Yerleştirilmesi

Sıçanlar başları hareket etmeyecek bir şekilde stereotaksi yardımıyla sabitlendi. CA3 bölgesinden in-vivo voltametrik ölçüm için yeniden belirlenen 3.6 mm anterioposterior; 3.8 mm mediolateral ve 3.6 mm dorsoventral koordinatları sıçan beyin atlası yardımıyla belirlendi. Ve bu koordinatlara unilateral bir şekilde delik açılarak elektrotun belirlenen bölgeye erişimi sağlandı. Gümüş/gümüş klorür (Ag/AgCl) referans elektrotun ortama yerleştirilebilmesi için mikroeletrottan farklı bir konumda ek bir delik daha açıldı. Ayrıca elektrotu bölgeye sabitlemek için kullanılacak olan akrilik

malzemenin tutulabilmesi için küçük vidaların sığabileceği daha küçük delikler açıldı. Öncelikle vidalar sabitlendi ve ardından elektrot istenilen koordinata stereotaksi yardımıyla yerleştirildi. Ardından hazırlanan soğuk akrilik hedef alana uygulanarak kranial kemikler üzerinde bulunan vidalar yardımıyla yüzey ve elektrotun birbirine sıkı bir şekilde tutunmasını sağladı. Fast mkIV cihazına bağlanan mikroelettrot, Fast2014 programı kullanılarak iv vivo voltametrik ölçümler yapıldı (Şekil 3.14).



Şekil 3. 14. Stereotaktik cerrahi, mikroelettrot yerleştirme işlemi ve ölçüm

3.2.5.4. Sinyal analizi:

Fast2014 programı yardımıyla elde edilen glutamat seviyelerindeki değişim ve geri alım süreleri aynı program yardımıyla analiz edilerek t80 süreleri hesaplandı.

3.2.4. Patoloji

3.2.4.1. Histopatolojik Yöntem

Nektropsileri yapılan sıçanlardan alınan beyin dokuları %10 nötral formalin çözeltisi ile tespit edildi. Dokular parafin bloklara alınmak üzere rutin alkol-ksilol takip işleminden geçirildi. 5µ'luk kesitler poly-lysinli lamlara alındıktan sonra hematoksil-eozin ile boyandı. Korteks, cornu ammonis (CA1, CA2, CA3) bölgelerindeki nöronlarda görülen piknotik ve dejeneratif değişimler semikantitatif olarak (yok (-), hafif (+), orta (++) , şiddetli (+++)) değerlendirildi.

3.2.4.1. İmmunohistokimyasal Yöntem

Nektropsileri yapılan sıçanlardan alınan beyin dokuları %10 nötral formalin çözeltisi ile tespit edildi. Dokular parafin bloklara alınmak üzere rutin alkol-ksilol takip işleminden geçirildi. 5µ'luk kesitler poly-lysinli lamlara alındıktan sonra PBS ile yıkandı. Bu işlemi takiben %3'lük H₂O₂' de 10 dk. tutularak endojen peroksidaz inaktivasyonu sağlandı. Antijen retrieval solüsyonu ile dokulardaki antijeni ortaya çıkarmak için 2×5 dk süresince 500 watt'da muamele edildi. Daha sonra 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 sıcaklığında 45 dk. inkübasyona bırakıldı. Sekonder olarak; Large Volume Detection System: anti-Polyvalent, HRP (Thermofischer, Katalog no: TP-125-HL) üretici firmanın kit prosedürüne göre kullanıldı. Kromojen olarak DAB (3,3'-Diaminobenzidine) kullanıldı. Mayer's Hematoksil-eozin ile zıt boya yapıldıktan sonra entellan ile kapatılarak ışık mikroskopunda incelendi. Korteks, CA1, CA2, CA3 bölgelerindeki nöronlarda görülen immünopozitiflikler semikantitatif olarak (yok (-), hafif (+), orta (++) , şiddetli (+++), çok şiddetli (++++)) değerlendirildi.

3.2.5. LC-MS/MS

Serotonin, dopamin, glutamik asit ve asetil kolin miktarını tespit edebilmek amacıyla 200 mg beyin örneği alındı. Daha sonra bu örnekler TissueLyzer 2.0 cihazında 2 dakika boyunca çelik bilyeler yardımıyla 1 mL asetonitril içerisinde homojenize edildi. Ekstraktlar 1 saat boyunca -20 °C inkübe edildi. Daha sonra örnekler 12000 rpm'de santrifüje edildi. 45 mikron por çapına sahip filtrelerden geçirilen örnekler kantitatif analiz için hazır hale getirildi.

Örneklerin analizi için pozitif iyon madunda AJS ESI iyon kaynağına sahip Agilent 6460 sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS/MS) cihazı kullanıldı. Multiple Reaction Monitoring madunda serotonin, dopamin, asetilkolin ve glutamik asit için optimum prekürsör ve produkt iyonlar (177->159.8, 153.8->136.8, 147.8->129.9, 145.9->86.9) tercih edildi. Nebulizer basıncı 35 PSI olarak ayarlandı. Kapiler voltaj 4500 olarak belirlendi. Yöntemin enjeksiyon hacmi 5 µL olarak saptandı. Mobil faz olarak %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. olarak belirlendi. 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.

3.2.6. İstatistiksel Analiz

Davranışsal, voltametrik veriler ve LC-MS/MS verileri SPSS v.20.0 programı kullanılarak One-Way ANOVA testi ile ortalama ve standart sapmalar verilecek şekilde hesaplanmıştır. P<0.05 anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Histopatolojik ve immunohistokimyasal veriler SPSS 20.00 programı ile analiz edildi. Gruplar arası farklılık nonparametrik testlerden olan Kruskal Wallis ile farklılığı oluşturan grup ise Mann Whitney U testi ile belirlendi. ($p < 0.05$).



4. BULGULAR

4.1. Davranış testi bulguları

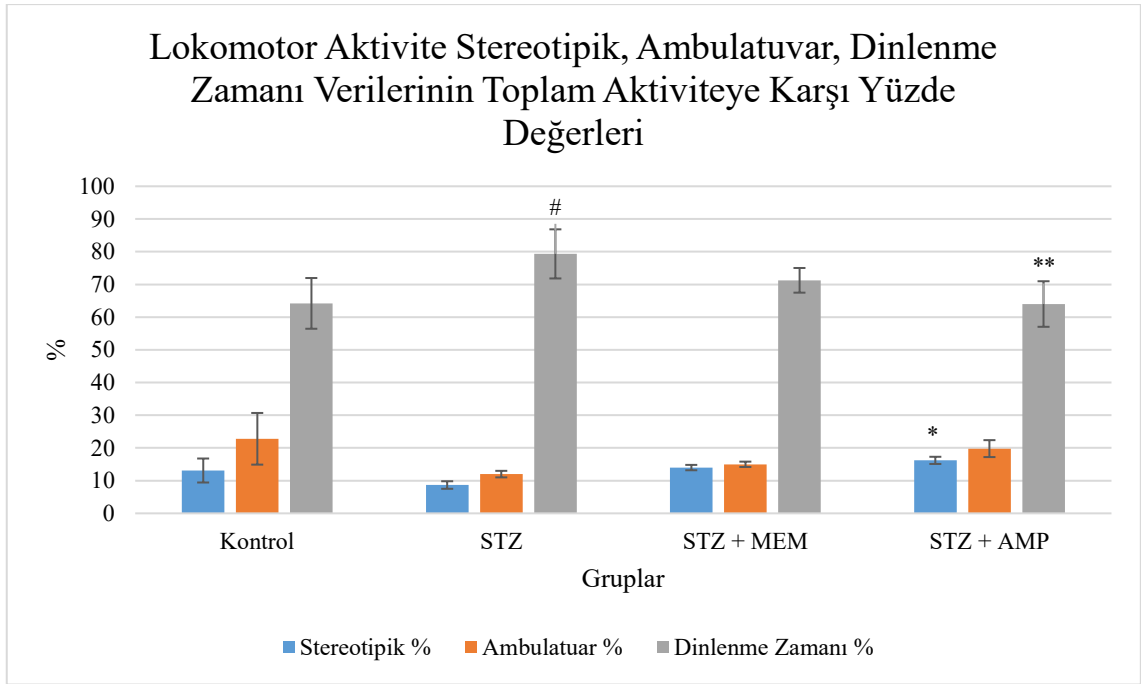
4.1.1. Lokomotor aktivite

Lokomotor aktivite testi STZ enjeksiyonundan sonra 15. günde gerçekleştirilmiştir. Lokomotor aktivite testinde stereotipik, ambulatuvar hareket, dinlenme zamanı yüzdelerine ve kat edilen mesafeye bakılmıştır.

Davranış yüzdeleri dikkate alındığında stereotipik hareket için Kontrol (13.10 ± 4.00) ve STZ grubu (8.67 ± 1.00) arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır. STZ grubu ile yalnızca STZ + AMP grubu (16.20 ± 1.00) arasında istatistiksel olarak anlamlı sayılan bir fark gözlenmiştir. STZ + MEM grubu (14.00 ± 1.00) stereotipik harekette kontrol grubu verilerini yakın bir şekilde stereotipik hareket göstermiştir.

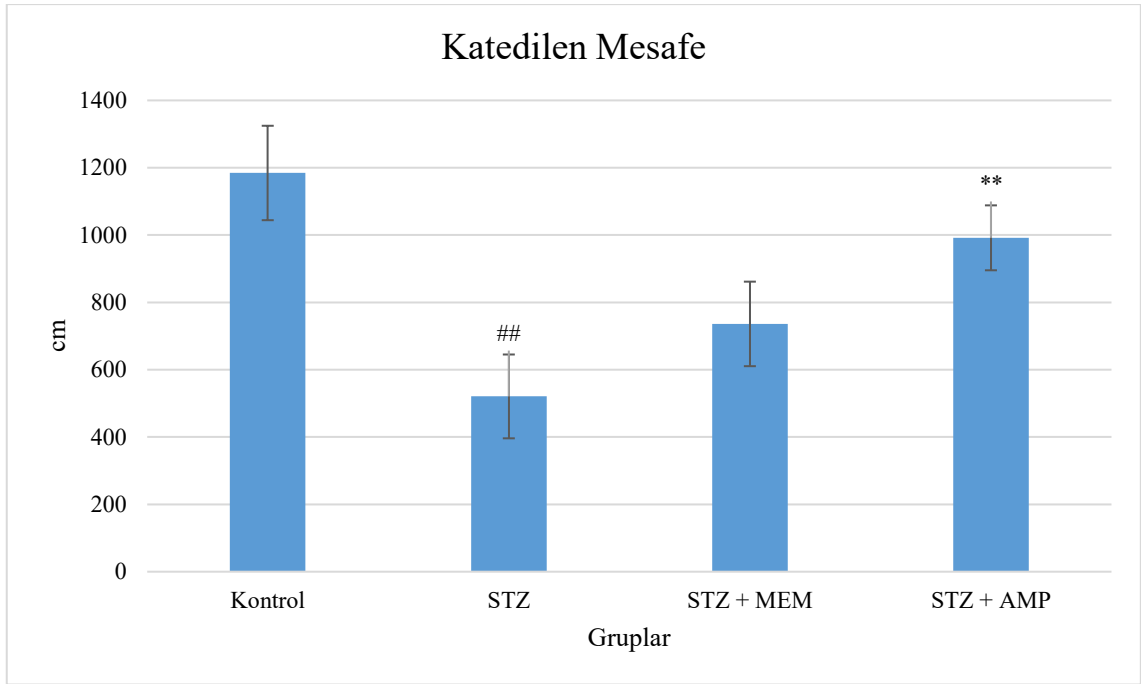
Ambulatuvar hareket yüzdeleri dikkate alındığında herhangi bir grup için anlamlı derecede farklılık saptanmamıştır. (Kontrol: 22.80 ± 8.00 , STZ: 12.00 ± 1.00 , STZ + MEM: 15.00 ± 1.00 , STZ + AMP: 19.80 ± 3.00)

Dinlenme zaman yüzdeleri dikkate alındığında ise kontrol (64.20 ± 8.00) ile STZ grubu (79.33 ± 8.00) arasında istatistiksel olarak çok anlamlı bir fark saptanmıştır. STZ grubu ile STZ + AMP grubu (64.00 ± 7.00) kıyaslamasında da benzer derecede farklılık saptanmıştır. STZ + MEM grubu (71.25 ± 4.00) dinlenme yüzdeleri kıyaslamasında STZ ve kontrol grubu arasında bir dinlenme yüzdesine sahip olup herhangi bir anlamlılık taşımamaktadır (Şekil 4.1).



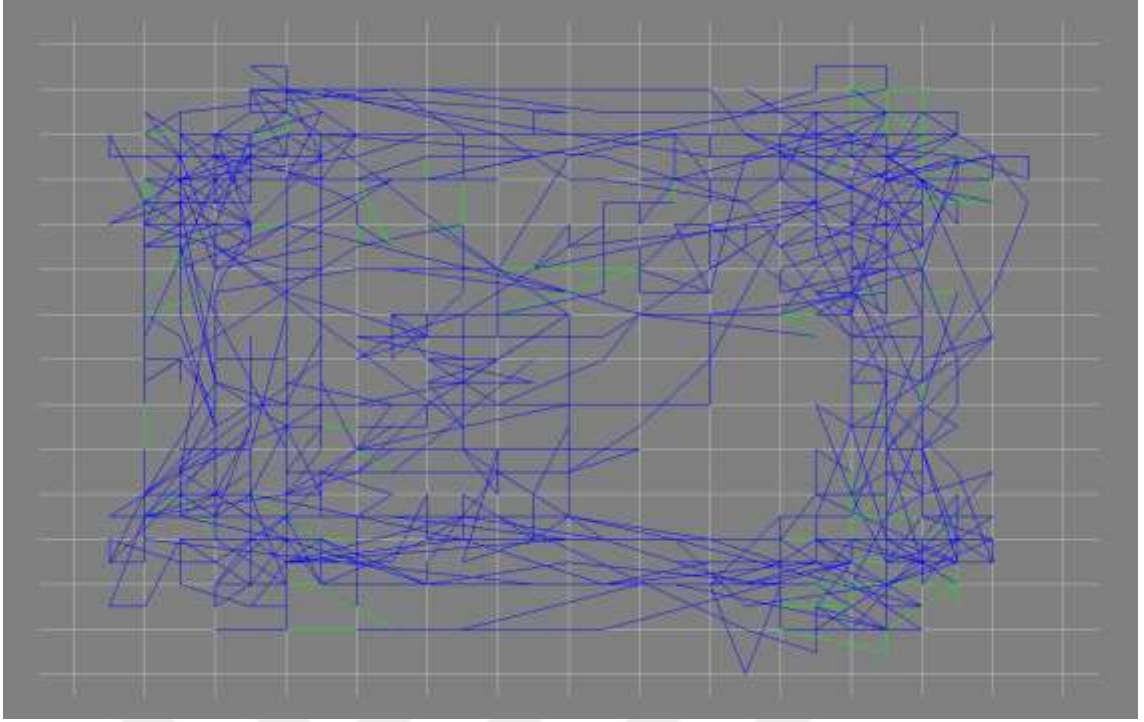
Şekil 4.1. Lokomotor aktivite stereotipik, ambulatuvar, dinlenme zamanı verilerinin toplam aktiviteye karşı yüzde değerleri (İstatiksel anlamlılıklar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$ #, $p < 0.01$ ##; STZ grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ ** olarak verilmiştir.)

Lokomotor aktivite kafesinde deney hayvanlarının 10 dakika boyunca kat ettikleri mesafe incelendiğinde kontrol grubu (1184.40 ± 140.00 cm) ve STZ grubu (520.70 ± 124.00 cm) arasında çok anlamlı sayılacak derecede düşüş gözlenmiştir. STZ grubu ile tedavi gruplarının kıyaslamasında ise STZ + MEM grubunda (736.02 ± 126.00 cm) yükseliş olmasına rağmen anlamlılık gözlenmemiş, STZ + AMP grubunda (991.79 ± 96.00 cm) ise çok anlamlı derecede artış gözlenmiştir (Şekil 4.2).

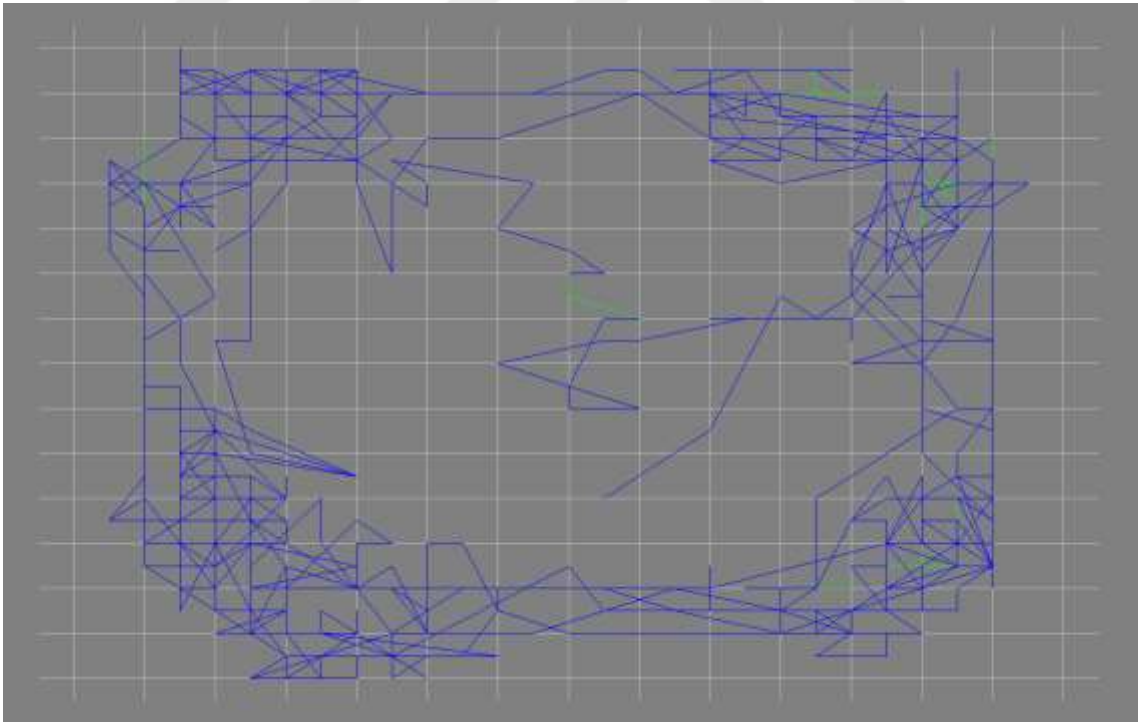


Şekil 4.2. Lokomotor aktivite katedilen mesafe değerleri (İstatiksel anlamlılıklar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$ #, $p < 0.01$ ##; STZ grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ ** olarak verilmiştir.)

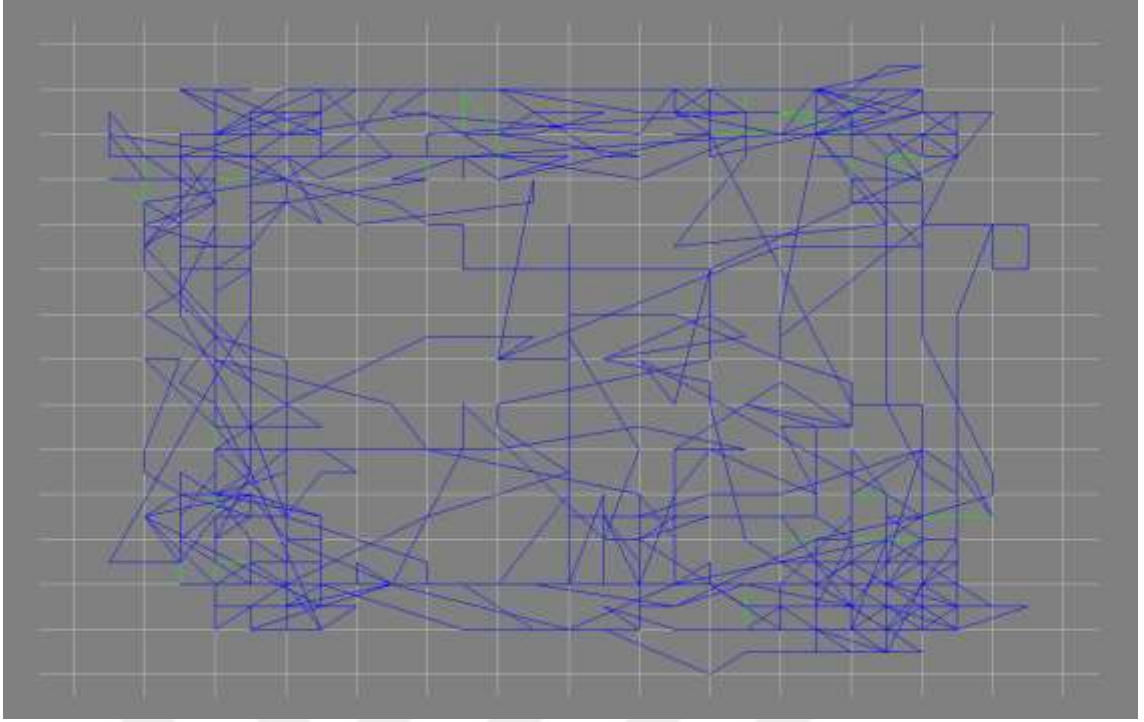
Lokomotor aktivite testleri sonrası tüm grupların Bitmap görüntüleri sırasıyla kontrol, STZ, STZ + MEM, STZ + AMP olarak şekil 4.3 ile şekil 4.6 arasında gösterilmiştir. Mavi çizgiler ambulatuvar hareketi temsil ederken yeşil çizgiler de vertikal hareketi temsil etmektedir.



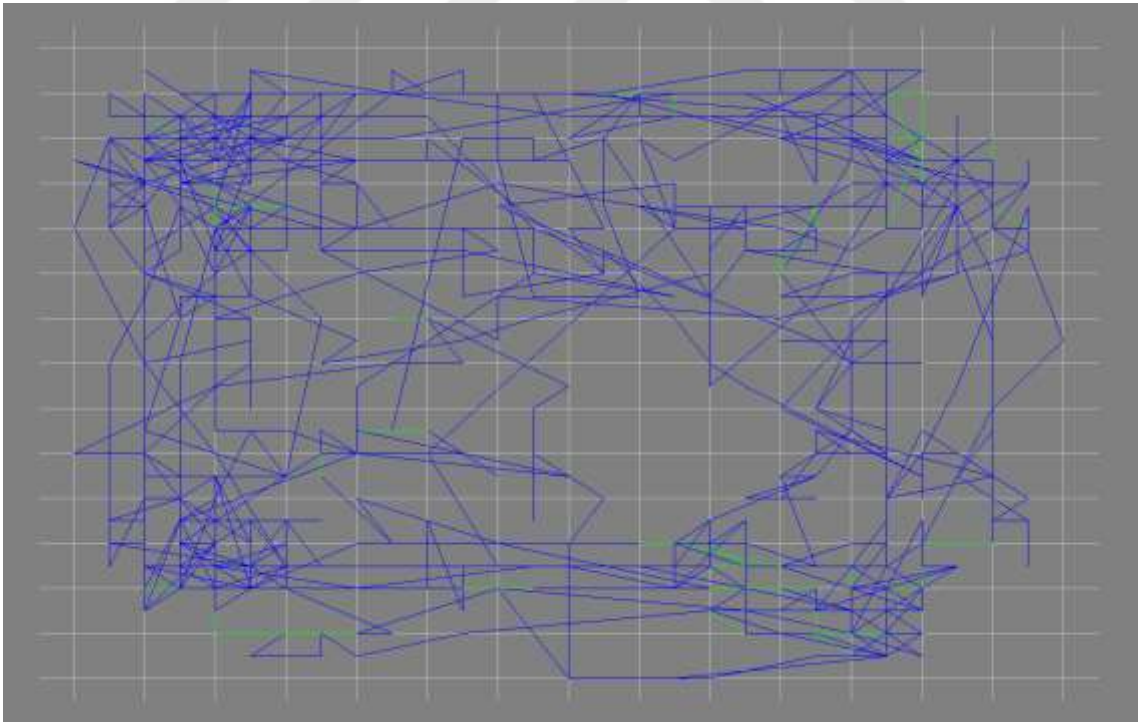
Şekil 4.3. Kontrol grubu örnek lokomotor aktivite Bitmap grafiği



Şekil 4.4. STZ grubu lokomotor örnek aktivite Bitmap grafiği



Şekil 4.5. STZ + MEM grubu örnek lokomotor aktivite Bitmap grafiği

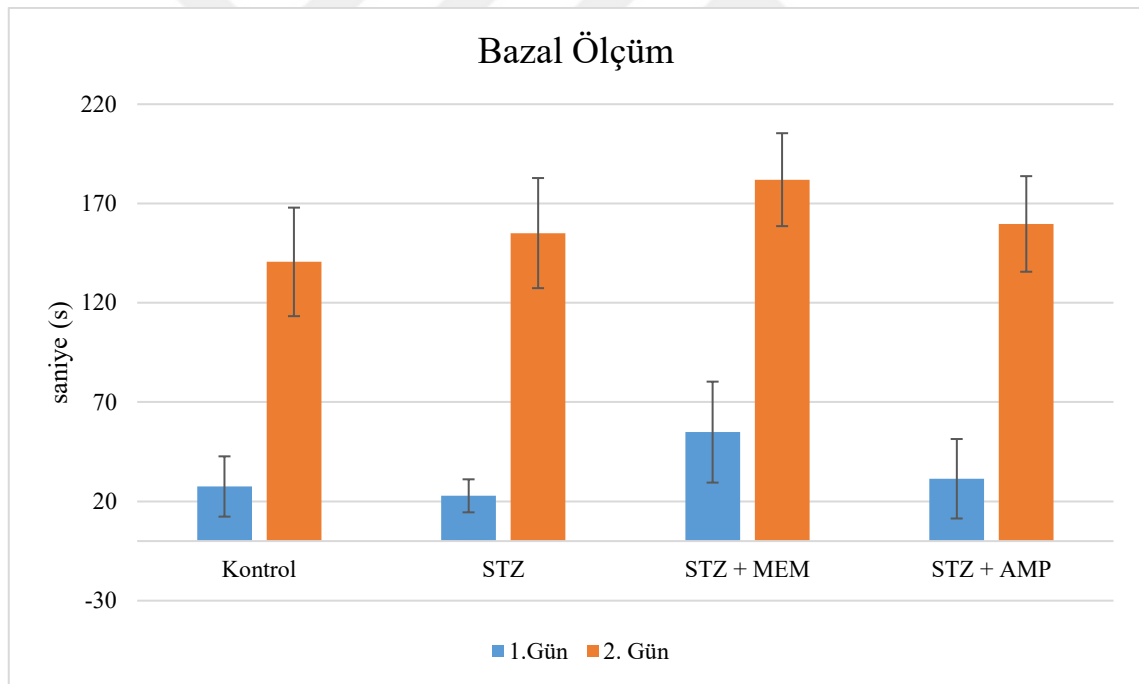


Şekil 4.6. STZ + AMP grubu örnek lokomotor aktivite Bitmap grafiği

4.1.1. Pasif Sakınma

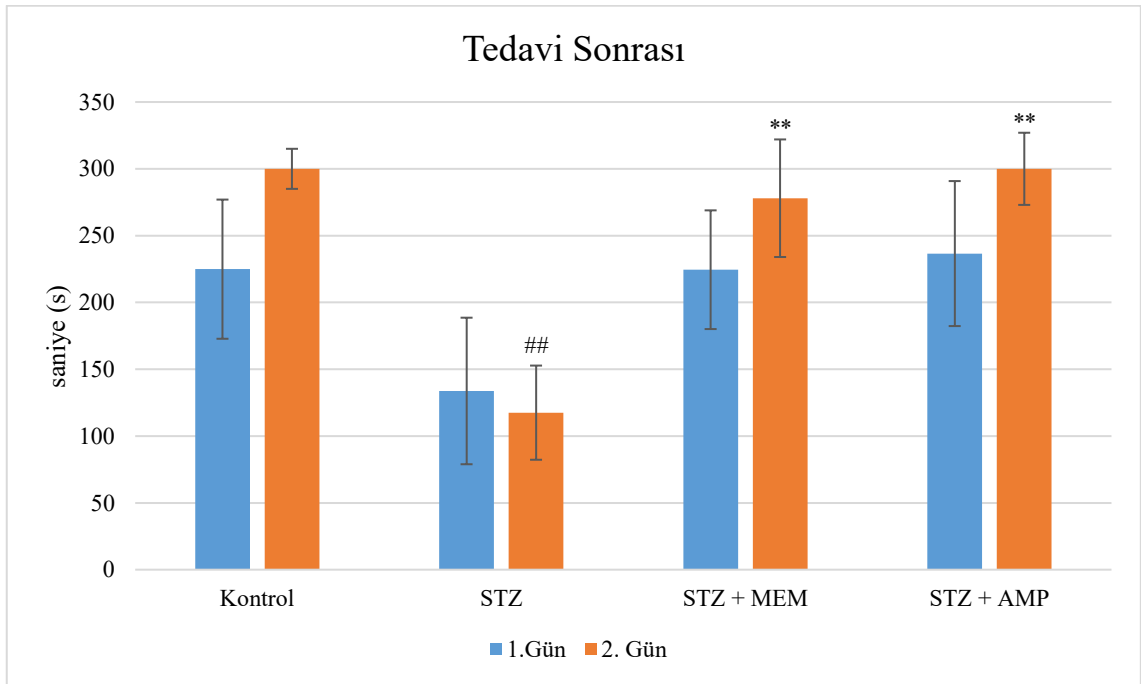
Pasif sakınma testi deneyin başlangıcında ve ilaç tedavisinin 15. gününden sonra öğrenme ve kısa süreli hafıza değerlendirmesi yapmak amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Bazal ölçümler sonucunda 1. günde karanlık alana geçiş süresi kontrol grubunda 27.50 ± 15.17 s, STZ grubunda 22.80 ± 8.31 s, STZ + MEM grubunda 54.87 ± 25.42 s, STZ + AMP grubunda 31.40 ± 20.01 s olarak hesaplanmıştır. 2. günde karanlık alana geçiş süresi kontrol grubunda $140,6 \pm 27.33$ s, STZ grubunda 155.80 ± 27.72 s, STZ + MEM grubunda 182.00 ± 23.40 s, STZ + AMP grubunda 159.7 ± 23.07 s olarak hesaplanmıştır. Gruplar arası herhangi bir istatistiksel anlamlılık bulunmamaktadır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Pasif sakınma testi bazal ölçüm sonuçları (İstatistiksel anlamlılıklar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$ #, $p < 0.01$ ##; STZ grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ ** olarak verilmiştir.)

Tedavi sonrası ölçümler sonucunda 1. günde karanlık alana geçiş süresi kontrol grubunda 224.90 ± 52.09 s, STZ grubunda 133.75 ± 54.84 s, STZ + MEM grubunda 224.50 ± 44.43 s, STZ + AMP grubunda 236.57 ± 54.26 s olarak hesaplanmıştır. 2. günde karanlık alana geçiş süresi kontrol grubunda 300.00 ± 15.00 s, STZ grubunda 117.50 ± 35.25 s, STZ + MEM grubunda 278.00 ± 44.00 s, STZ + AMP grubunda 300.00 ± 27.00 s olarak hesaplanmıştır. 2. Gün verilerinin istatistiksel analizi sonucunda STZ + MEM ve STZ + AMP grupları STZ grubuna göre anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.8).

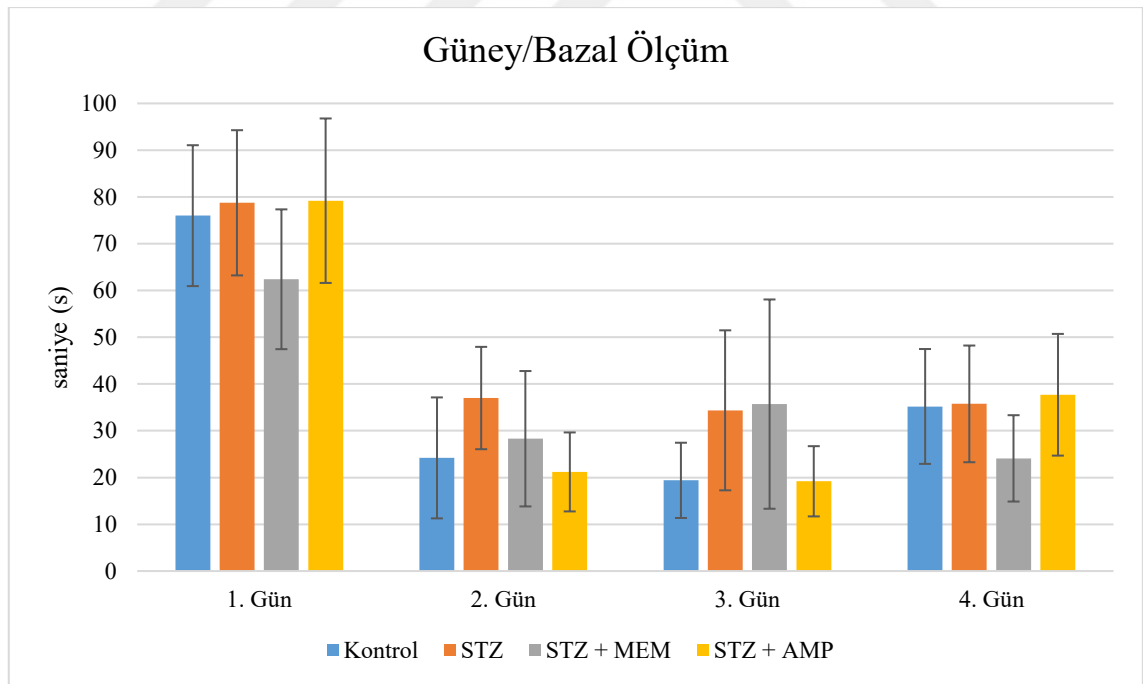


Şekil 4.8. Pasif sakınma testi tedavi sonrası ölçüm sonuçları (İstatistiksel anlamlılıklar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$ #, $p < 0.01$ ##; STZ grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ ** olarak verilmiştir.)

4.2. Morris Su Labirenti

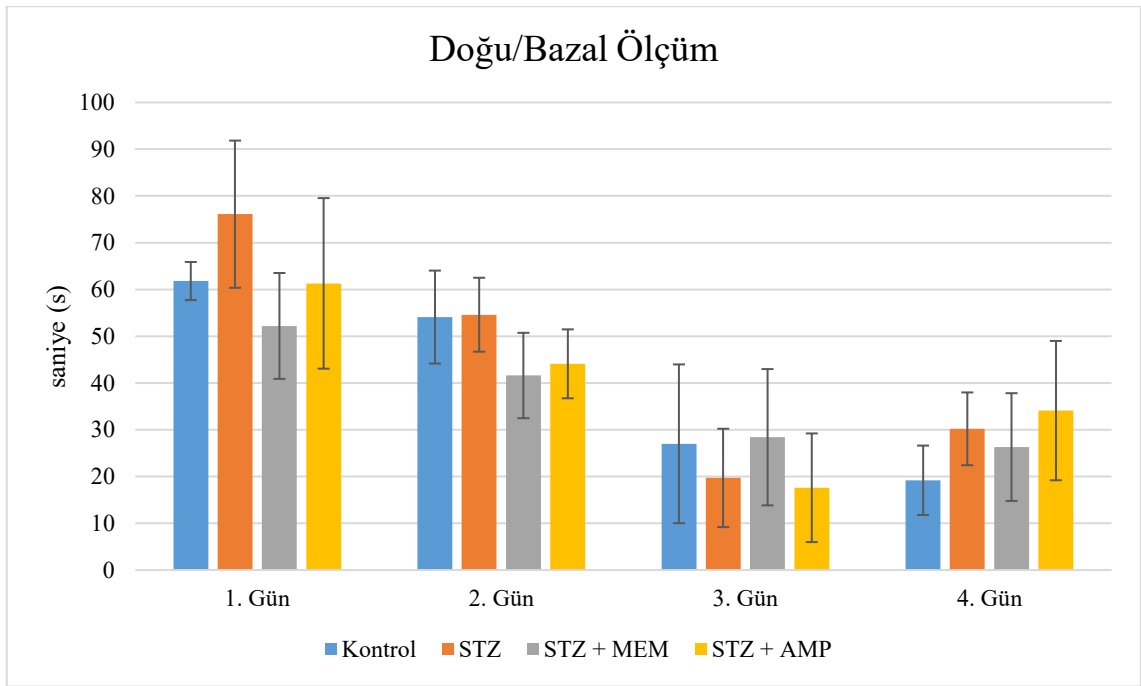
Morris su labirenti testleri deney başlangıcında ve tedavi süresinin 15. gününden sonra öğrenme ve hafızayı test etmek için 4'er defa farklı yönlerden uygulanmıştır. Tedavi sonrası uygulanan davranış testinde platformuz olarak ısı haritası oluşturmak amacıyla 5. gün deneyleri gerçekleştirilmiştir. Platformu bulma süreleri sıçanların su labirentine bırakılma yönleri baz alınarak karşılaştırılmıştır.

Güney yönü platformu bulma süreleri 1 ile 4. gün arasında kısalma eğilimindedir. Platformu bulma süreleri sırasıyla 1.günden başlayarak 4. güne kadar kontrol için 76.00 ± 15.06 , 24.20 ± 12.93 , 19.40 ± 8.04 , 35.20 ± 12.28 ; STZ grubu için 90.00 ± 0.00 , 52.00 ± 9.70 , 34.38 ± 17.10 , 35.75 ± 12.48 ; STZ + MEM grubu için 62.40 ± 14.95 , 28.30 ± 14.48 , 35.70 ± 22.38 , 24.10 ± 9.23 ; STZ + AMP grubu için 79.20 ± 17.59 , 21.20 ± 8.44 , 19.20 ± 7.51 , 37.70 ± 13.01 olarak bulunmuştur (Şekil 4.9).



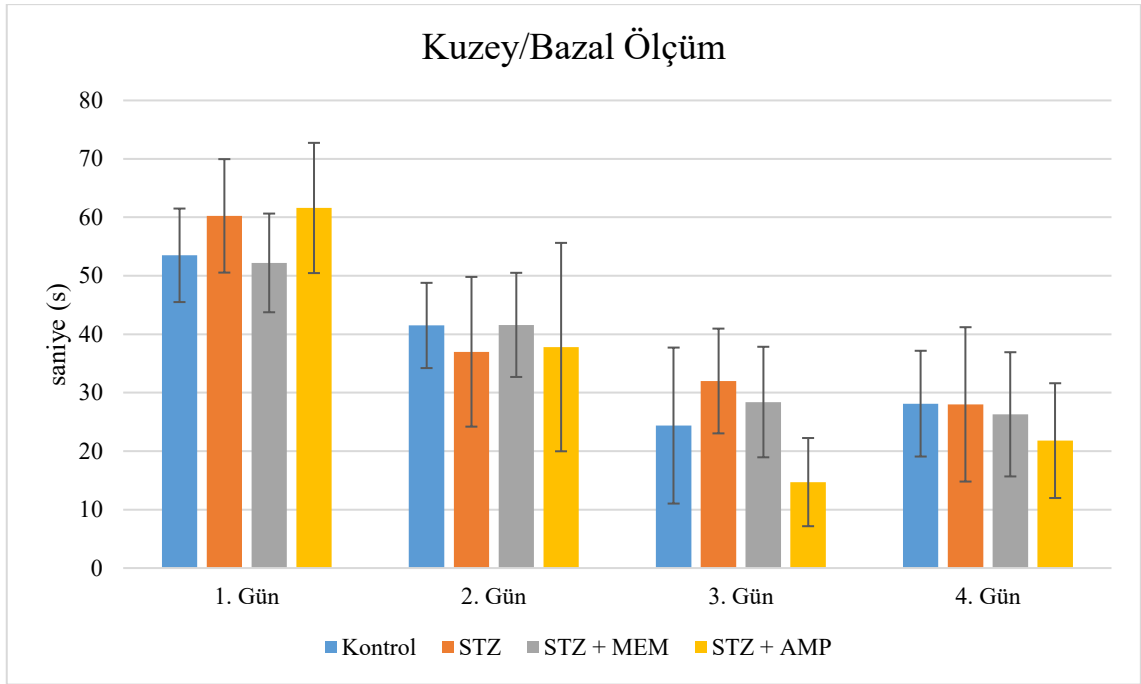
Şekil 4.9. Güney yönü bazal ölçüm günlük veri grafiği (İstatiksel anlamlılıklar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$ #, $p < 0.01$ ##; STZ grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ ** olarak verilmiştir.)

Doğu yönü platformu bulma süreleri 1 ile 4. gün arasında kısalma eğilimindedir. Platformu bulma süreleri sırasıyla 1.günden başlayarak 4. güne kadar kontrol için 61.80 ± 4.08 , 54.10 ± 9.94 , 27.00 ± 16.98 , 19.20 ± 7.42 ; STZ grubu için 82.10 ± 13.89 , 54.60 ± 7.90 , 19.70 ± 10.52 , 30.20 ± 7.79 ; STZ + MEM grubu için 48.20 ± 11.20 , 41.60 ± 9.13 , 28.40 ± 14.58 , 26.30 ± 11.52 ; AMP grubu için 61.30 ± 18.24 , 44.10 ± 7.37 , 17.60 ± 11.62 , 34.10 ± 14.90 olarak bulunmuştur (Şekil 4.10).



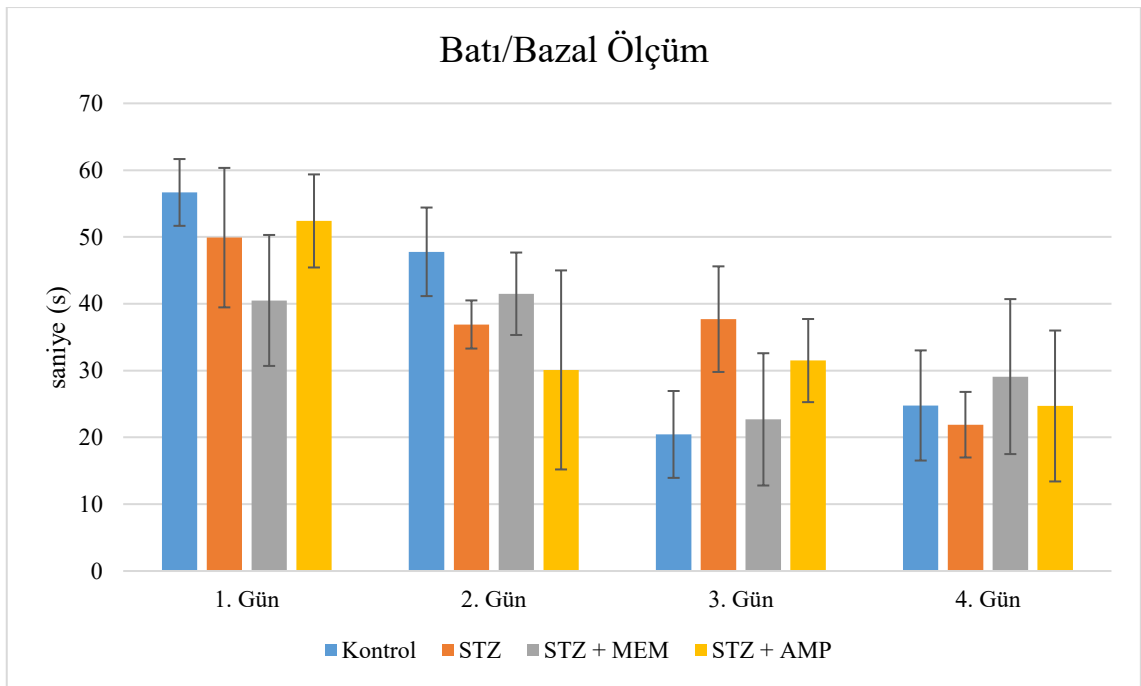
Şekil 4.10. Doğu yönü bazal ölçüm günlük tablosu (İstatiksel anlamlılıklar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$ #, $p < 0.01$ ##; STZ grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ ** olarak verilmiştir.)

Kuzey yönü platformu bulma süreleri 1 ile 4. gün arasında kısalma eğilimindedir. Platformu bulma süreleri sırasıyla 1. günden başlayarak 4. güne kadar kontrol için 53.50 ± 8.00 , 41.50 ± 7.29 , 24.38 ± 13.34 , 28.13 ± 9.05 ; STZ grubu için 60.25 ± 9.71 , 37.00 ± 12.81 , 39.50 ± 12.14 , 28.00 ± 13.20 ; STZ + MEM grubu için 49.80 ± 8.44 , 22.40 ± 8.91 , 26.50 ± 9.46 , 21.30 ± 10.63 ; AMP grubu için 61.60 ± 11.14 , 37.80 ± 17.83 , 14.70 ± 7.54 , 21.80 ± 9.82 olarak bulunmuştur (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Kuzey yönü bazal ölçüm günlük tablosu (İstatiksel anlamlılıklar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$ #, $p < 0.01$ ##; STZ grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ ** olarak verilmiştir.)

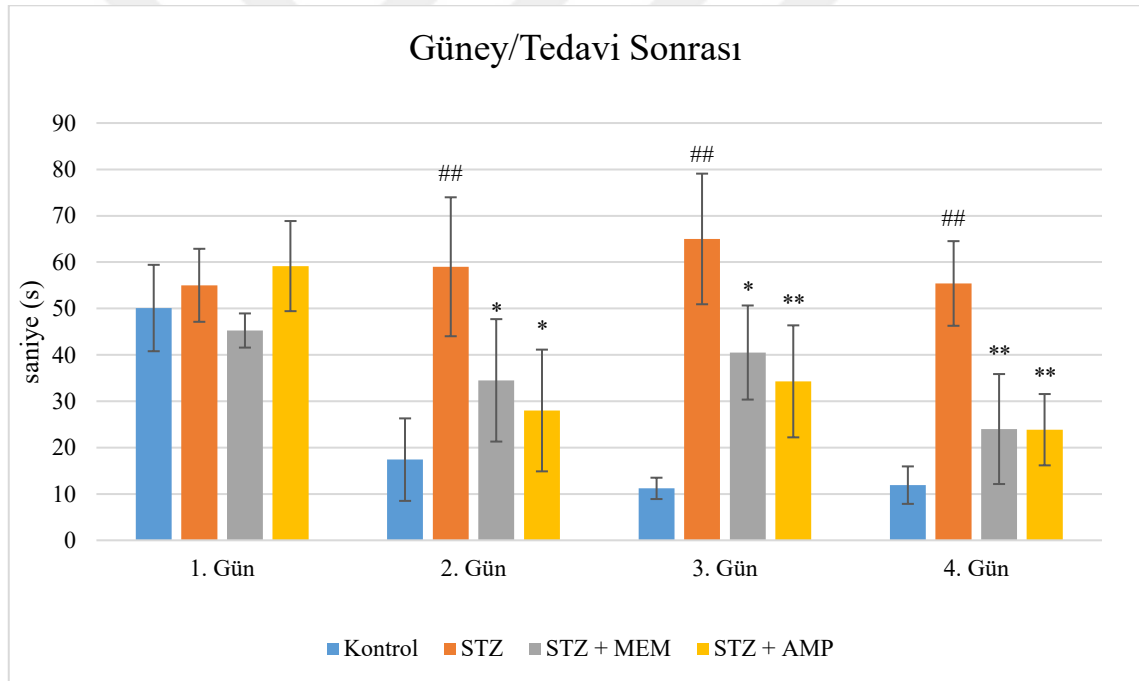
Batı yönü platformu bulma süreleri 1 ile 4. gün arasında kısalma eğilimindedir. Platformu bulma süreleri sırasıyla 1. günden başlayarak 4. güne kadar kontrol için 56.67 ± 5.00 , 47.78 ± 6.63 , 20.44 ± 6.50 , 24.78 ± 8.24 ; STZ grubu için 49.90 ± 10.44 , 36.90 ± 3.60 , 47.70 ± 6.62 , 21.90 ± 4.91 ; STZ + MEM grubu için 30.50 ± 15.07 , 35.50 ± 10.76 , 22.70 ± 9.90 , 29.10 ± 11.60 ; AMP grubu için 52.40 ± 6.96 , 30.10 ± 14.90 , 31.50 ± 6.22 , 24.70 ± 11.30 olarak bulunmuştur (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Batı yönü bazal ölçüm günlük tablosu (İstatiksel anlamlılıklar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$ #, $p < 0.01$ ##; STZ grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ ** olarak verilmiştir.)

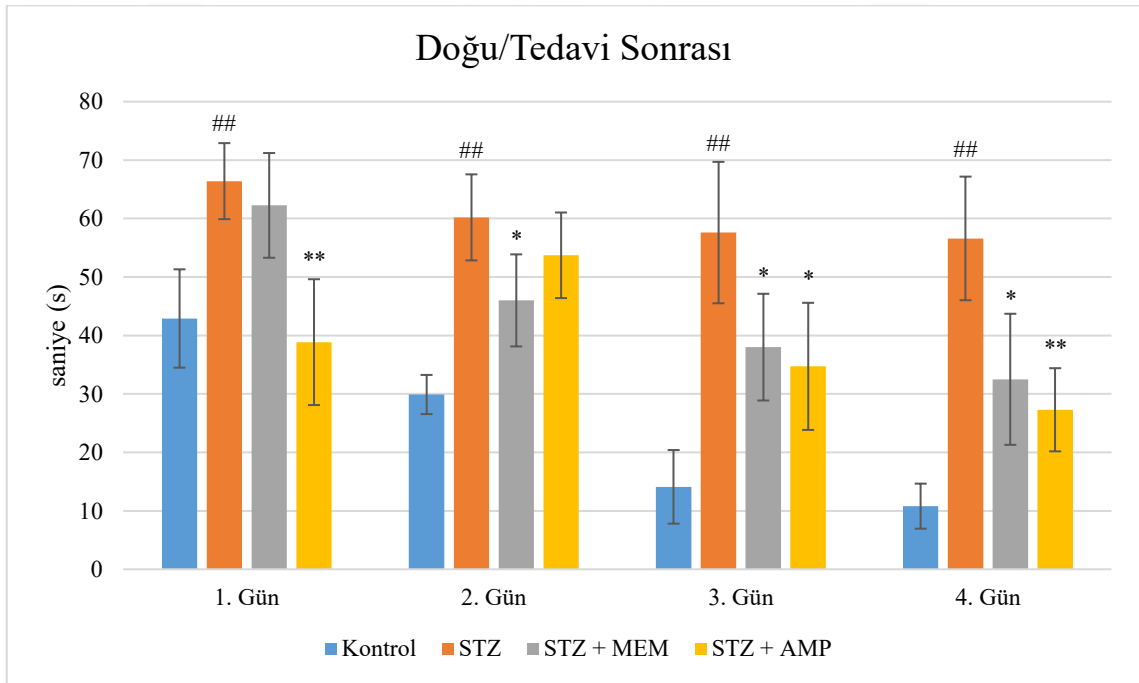
Tedavi sonrası Morris su labirenti testleri ilk 4 gün için her yön ayrı değerlendirilmeye alınarak anlamlılık hesaplanmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre güney yönü verilerinde 2. günden itibaren STZ grubu kontrol grubuna göre oldukça anlamlı bulunmuştur. 2. günden sonra tedavi gruplarının kıyaslanmasında; 2. günde STZ + MEM (34.50 ± 13.20 s) ve STZ + AMP (28.00 ± 13.13 s) grupları STZ'ye göre (59.00 ± 14.98 s) anlamlı, 3. Günde STZ'ye göre (65.00 ± 14.09 s) STZ + MEM (40.50 ± 10.15 s) grubu anlamlı ve STZ + AMP (34.29 ± 12.08 s) grubu çok anlamlı, 4. günde ise STZ + MEM (24.00 ± 11.86 s) ve STZ + AMP (23.86 ± 7.69 s) grupları STZ'ye göre (55.40 ± 9.13 s) çok anlamlı olarak bulunmuştur (Şekil 4.13).



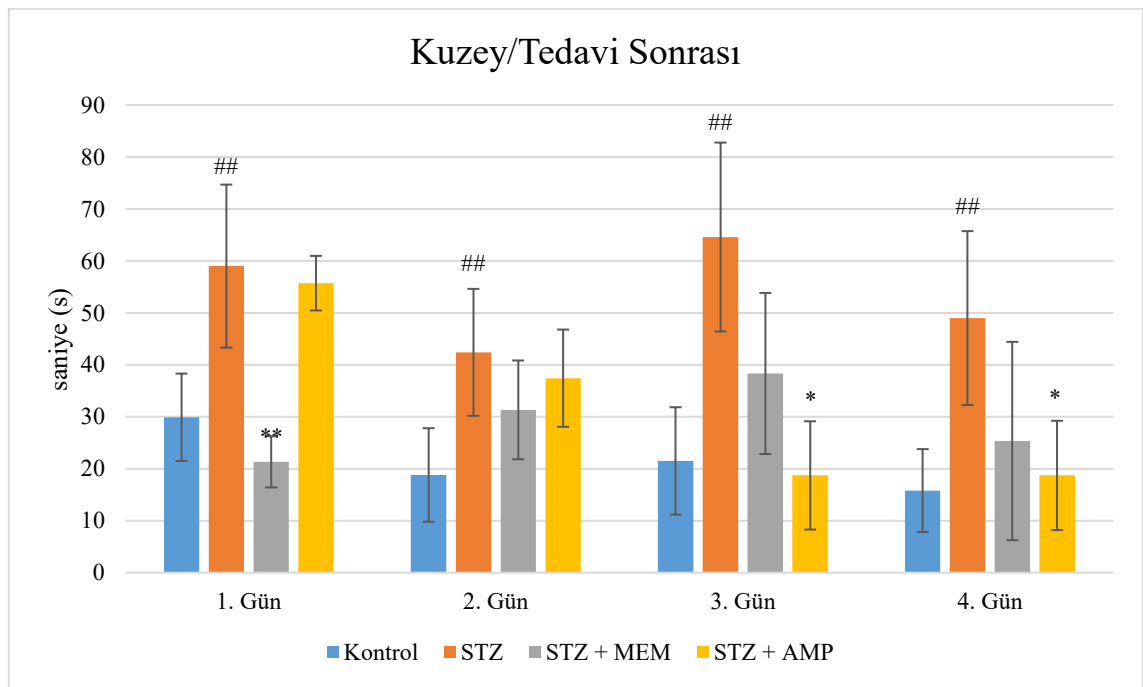
Şekil 4.13. Güney yönü tedavi sonrası ölçüm günlük tablosu (İstatiksel anlamlılıklar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p<0.05$ #, $p<0.01$ ##; STZ grubuyla karşılaştırıldığında $p<0.05$ *, $p<0.01$ ** olarak verilmiştir.)

Doğu yönü verilerinde ise 1. günden itibaren STZ grubu kontrol grubuna göre oldukça anlamlı bulunmuştur. Tüm günlerin tedavi gruplarının kıyaslanmasında; 1. günde sadece STZ + AMP (38.86 ± 10.76 s) grubu STZ'ye göre (66.40 ± 6.50 s) çok anlamlı olarak bulunmuştur. 2. günde STZ + MEM (46.00 ± 7.87 s) grubu STZ'ye göre (60.20 ± 6.50 s) anlamlı, 3. Günde STZ'ye göre (57.60 ± 12.10 s) STZ + MEM (38.00 ± 9.13 s) ve STZ + AMP (34.71 ± 10.87 s) grupları anlamlı, 4. günde ise STZ'ye göre (56.60 ± 10.57 s) STZ + MEM (32.50 ± 11.21 s) grubu anlamlı ve STZ + AMP (27.29 ± 7.11 s) grubu çok anlamlı olarak bulunmuştur (Şekil 4.14).



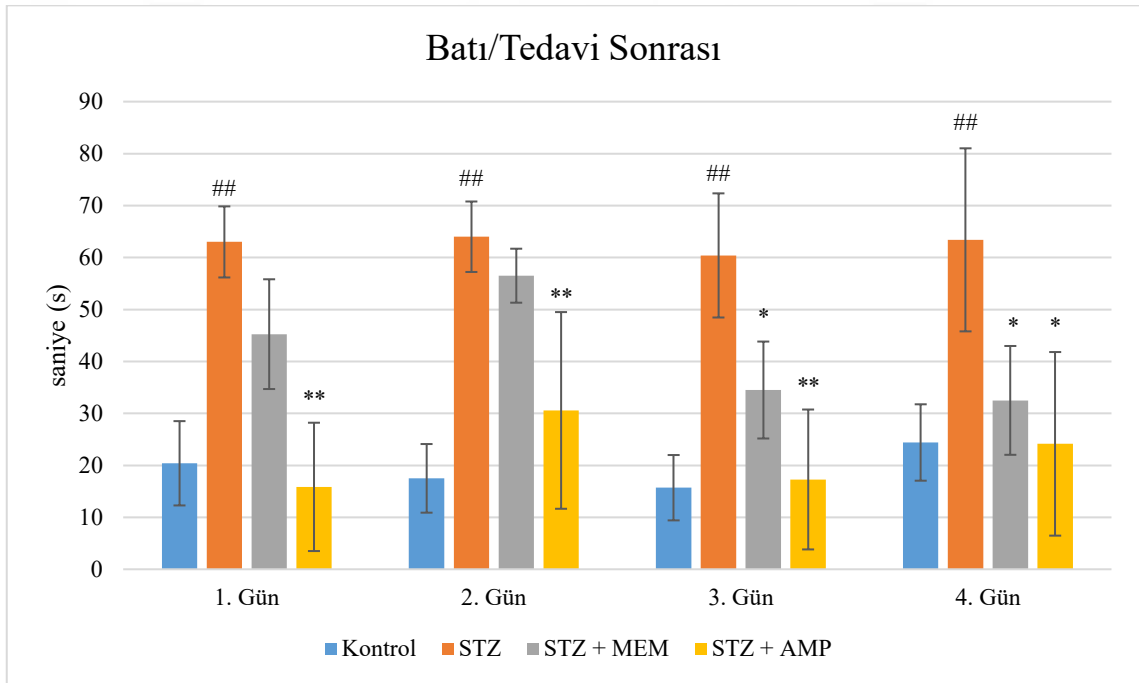
Şekil 4.14. Doğu yönü tedavi sonrası ölçüm günlük tablosu (İstatiksel anlamlılıklar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$ #, $p < 0.01$ ##; STZ grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ ** olarak verilmiştir.)

Kuzey yönü verilerinde ise 1. günden itibaren STZ grubu kontrol grubuna göre oldukça anlamlı bulunmuştur. Tüm günlerin tedavi gruplarının kıyaslanmasında; 1. günde sadece STZ + MEM (21.33 ± 4.93 s) grubu STZ'ye göre (59.00 ± 15.68 s) anlamlı olarak bulunmuştur. 2. günde STZ ile kıyasla tedavi grupları arasında herhangi bir anlamlılık bulunmamıştır. 3. günde STZ'ye göre (64.60 ± 18.17 s) STZ + AMP (18.71 ± 10.42 s) grubu anlamlı, 4. günde ise STZ + AMP (18.71 ± 10.52 s) grubu STZ'ye göre (49.00 ± 17.73 s) anlamlı olarak bulunmuştur (Şekil 4.15).



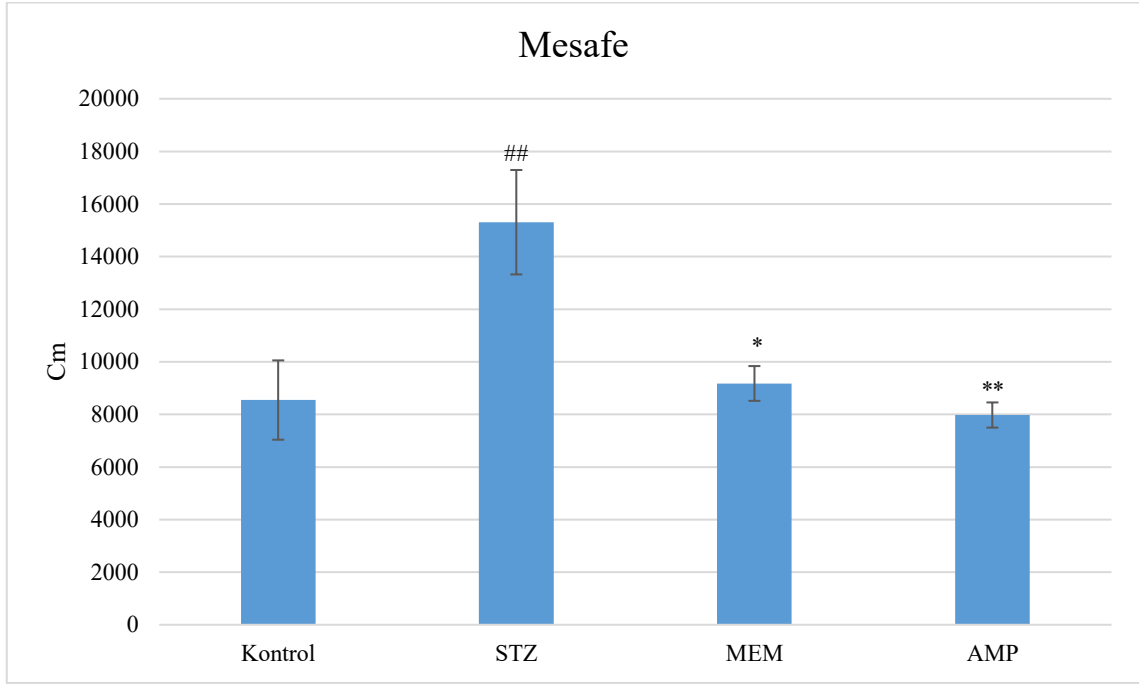
Şekil 4.15. Kuzey yönü tedavi sonrası ölçüm günlük tablosu (İstatiksel anlamlılıklar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$ #, $p < 0.01$ ##; STZ grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ ** olarak verilmiştir.)

Batı yönü verilerinde ise 1. günden itibaren STZ grubu kontrol grubuna göre oldukça anlamlı bulunmuştur. Tüm günlerin tedavi gruplarının kıyaslanmasında; 1. günde sadece STZ + AMP (15.86 ± 12.35 s) grubu STZ'ye göre (63.00 ± 6.84 s) çok anlamlı olarak bulunmuştur. 2. günde STZ + AMP (30.57 ± 18.93 s) grubu STZ'ye göre (64.00 ± 6.78 s) çok anlamlı, 3. günde STZ'ye göre (60.40 ± 11.95 s) STZ + MEM (34.50 ± 9.33 s) grubu anlamlı ve STZ + AMP (17.29 ± 13.46 s) grubu çok anlamlı, 4. günde ise STZ'ye göre (63.40 ± 17.61 s) STZ + MEM (32.50 ± 10.47 s) grubu anlamlı ve STZ + AMP (24.14 ± 17.67 s) grubu çok anlamlı olarak bulunmuştur (Şekil 4.16).



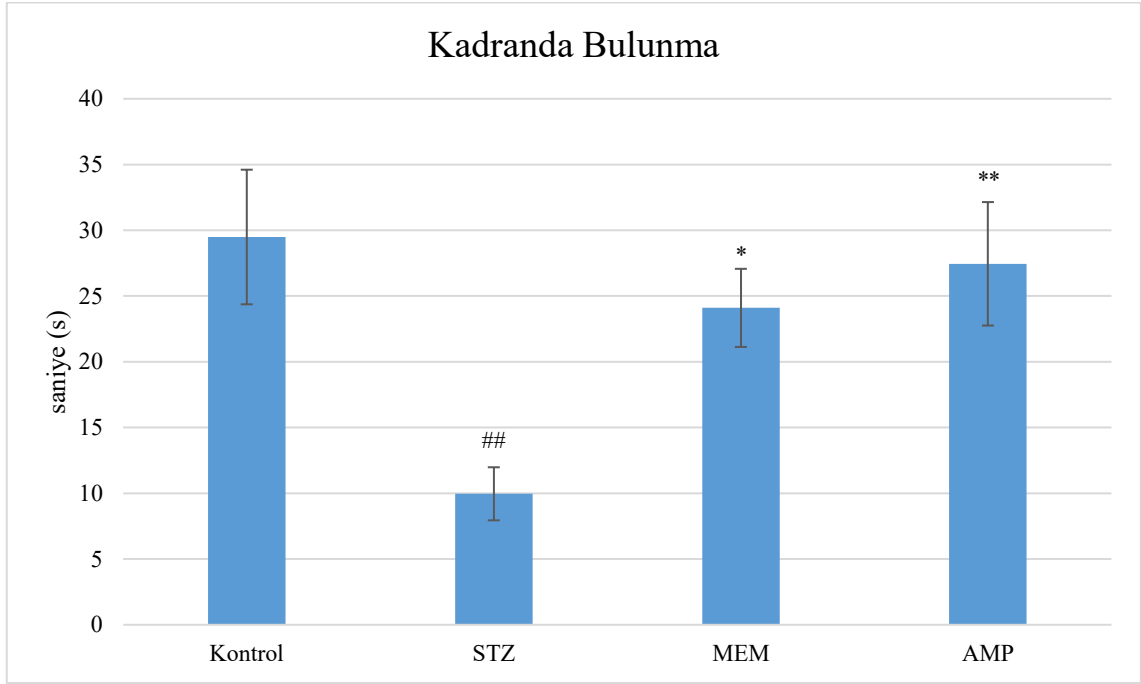
Şekil 4.16. Doğu yönü tedavi sonrası ölçüm günlük tablosu (İstatiksel anlamlılıklar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$ #, $p < 0.01$ ##; STZ grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ ** olarak verilmiştir.)

Deney sonu ısı haritalarında tüm grupların toplam kat ettiği mesafe incelendiğinde STZ grubu (15307.70 ± 1985.37 cm) kontrol grubuna (8544.84 ± 1508.62 cm) göre çok anlamlı derecede farklılık göstermiştir. STZ + MEM grubu (9175.42 ± 611.09 cm) STZ ye göre anlamlı $p<0,05$, STZ + AMP grubu (7976.11 ± 478.56 cm) ise çok anlamlı $p<0,01$ olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.17).



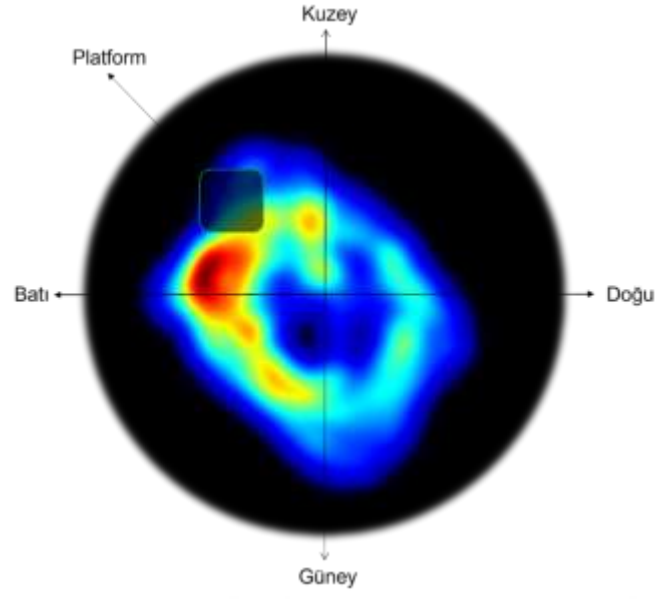
Şekil 4.17. Morris su labirenti testi kat edilen mesafe grafiği (İstatiksel anlamlılıklar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p<0.05$ #, $p<0.01$ ##; STZ grubuyla karşılaştırıldığında $p<0.05$ *, $p<0.01$ ** olarak verilmiştir.)

Platformun bulunduğu kadranda bulunma süreleri kıyaslandığında STZ grubu (9.96 ± 2.02 s) kontrol grubuna (29.49 ± 5.12 s) göre çok anlamlı derecede farklılık göstermiştir. Tedavi gruplarının STZ grubu ile kıyaslanmasında ise STZ + MEM grubu (24.10 ± 2.97 s) anlamlı, STZ + AMP grubu (27.45 ± 4.69 s) çok anlamlı olacak derecede farklılık göstermiştir (Şekil 4.18).

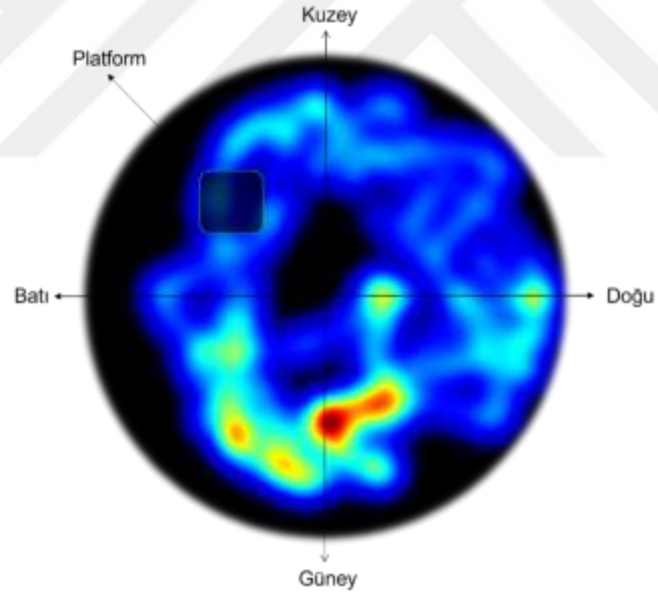


Şekil 4.18. Morris su labirenti testi platformun bulunduğu kadranda bulunma süresi grafiği (İstatiksel anlamlılıklar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$ #, $p < 0.01$ ##; STZ grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ ** olarak verilmiştir.)

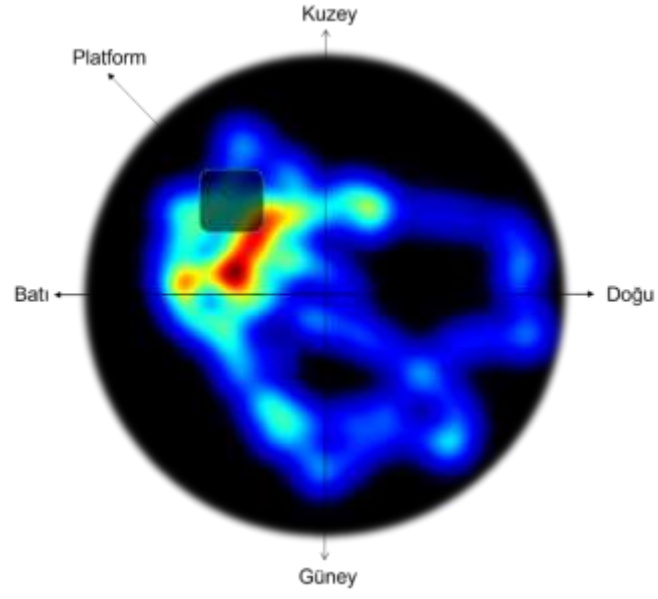
Kontrol, STZ, STZ + MEM ve STZ + AMP gruplarının ısı haritaları görüntüleri Şekil 4.19 ile Şekil 4.22 arasında verilmiştir. Isı haritaları incelendiğinde de kadranda bulunma süreleri ile benzer bir görüntü elde edilmiştir.



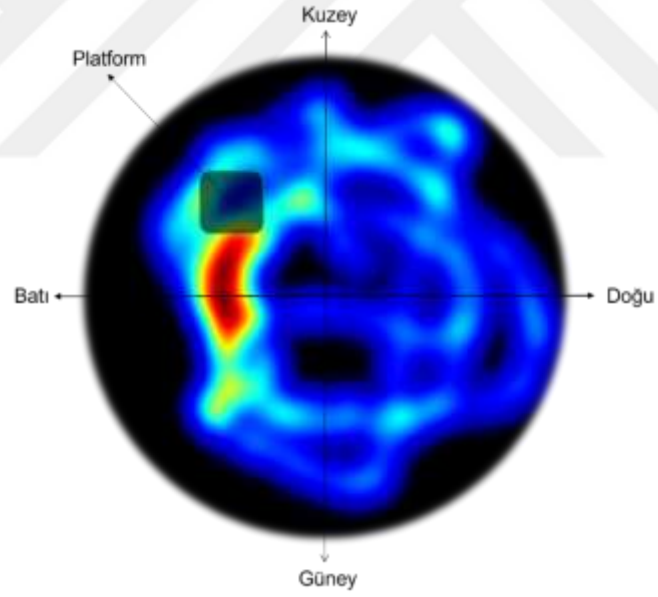
Şekil 4.19. Kontrol grubu 5.gün ısı haritası grup temsili



Şekil 4.20. STZ grubu 5.gün ısı haritası grup temsili



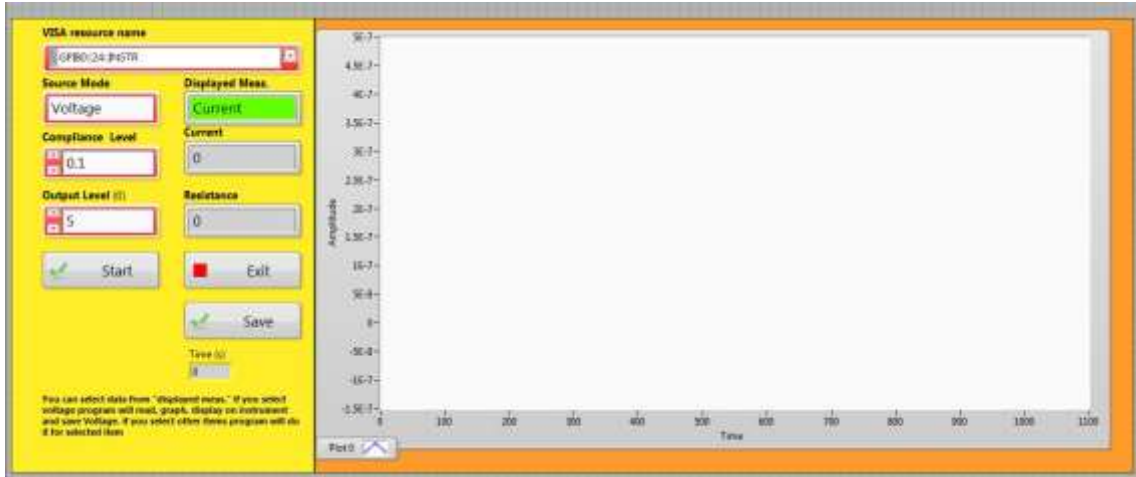
Şekil 4.21. STZ + MEM grubu 5.gün ısı haritası grup temsili



Şekil 4.22. STZ + AMP grubu 5.gün ısı haritası grup temsili

4.3. Kapton Mikroelektrot H_2O_2 ölçümü

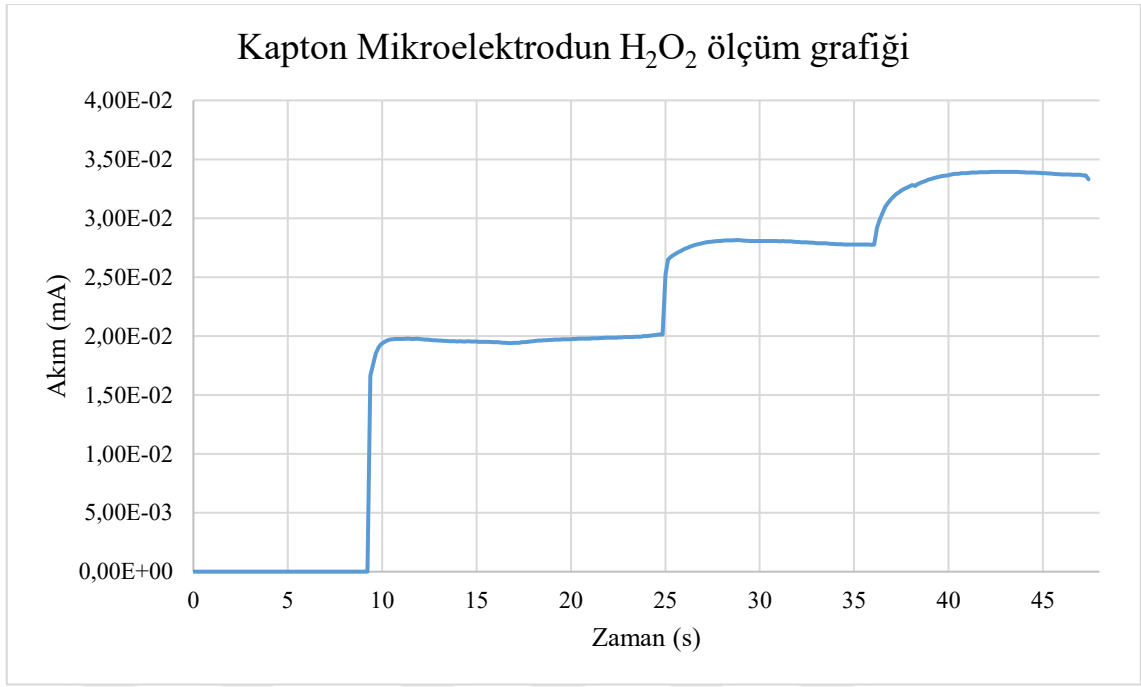
Fotolitografi yöntemiyle üretilen kapton mikroelektrodun ölçüm testleri Keithley 2400 cihazı yardımıyla 20 mM H_2O_2 karşısında ölçülmüştür. Ölçüm sistemi homemade olup elektronik Mühendisliğinde bulunan Sensör Teknolojileri laboratuvarında bulunmaktadır (Şekil 4.23).



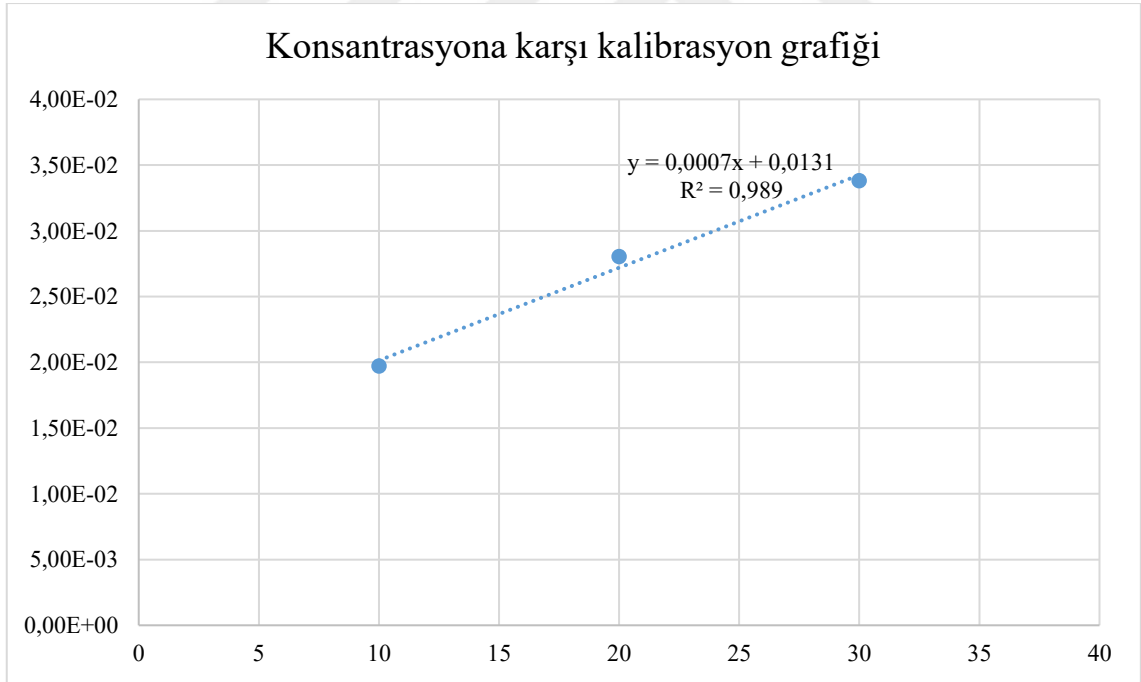
Şekil 4. 23. Mikroelektrot iletkenlik ölçüm programı

Bu sistemde sabit akım veya sabit voltaj madunda ölçüm yapılabilir. Sabit voltaj madunda ± 200 V aralığında ve ± 1 A'e kadar ölçümler yapılabilir. Voltaj rezolüsyonu 100 nV ve akım rezolüsyonu ise 1pA'dır. Bu tezde 0.7 V sabit gerilim uygulanmış ve H_2O_2 ilavesine karşın zamanla akım değişimi ölçülmüştür. Böylece geliştirdiğimiz sensörün performansını test edilmiştir (Şekil 4.24).

Elde edilen ölçümler konsantrasyon-akım grafiğine dönüştürülmüş ve Kalibrasyon denklemi elde edilmiştir (Şekil 4.25). R^2 değeri 0.989 bulunmuştur.



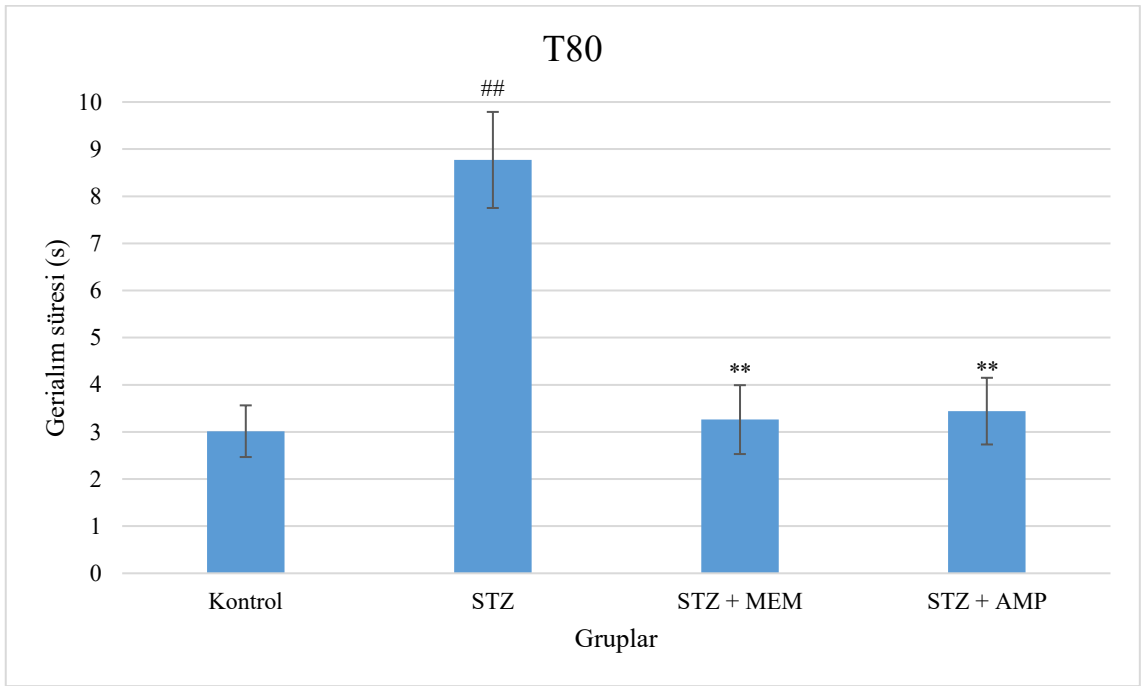
Şekil 4.24. Kapton Mikroelektrodun H₂O₂ ölçüm grafiği



Şekil 4.25. Ölçüm sonuçlarına göre kalibrasyon grafiği

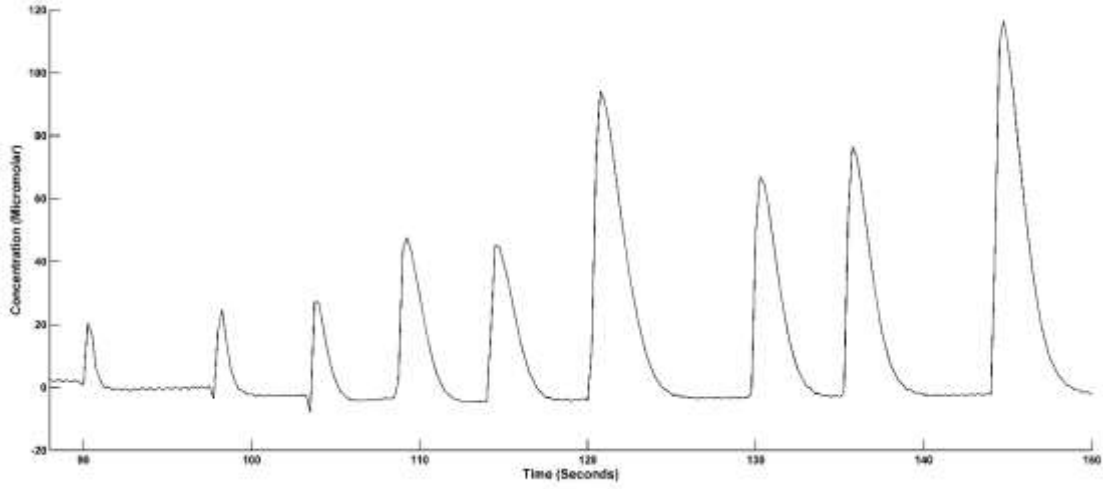
4.3. İn-Vivo Voltametri

Glutamat oksidaz kaplı mikroelettrotlarla yapılan in-vivo voltametri analizleri sonucunda glutamat geri alım sürelerinin saniye bazlı değerlendirilmesinde STZ grubu ile kontrol grubu (3.01 ± 0.55 s) kıyaslamasında STZ grubu (8.77 ± 1.02 s) önemli derecede anlamlılık ifade etmektedir. STZ grubu ile STZ + MEM (3.26 ± 0.73 s) ve STZ + AMP (3.44 ± 0.71 s) gruplarının kıyaslanmasında da bu iki grubun STZ grubuna göre önemli derecede anlamlı farklılık gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.26).

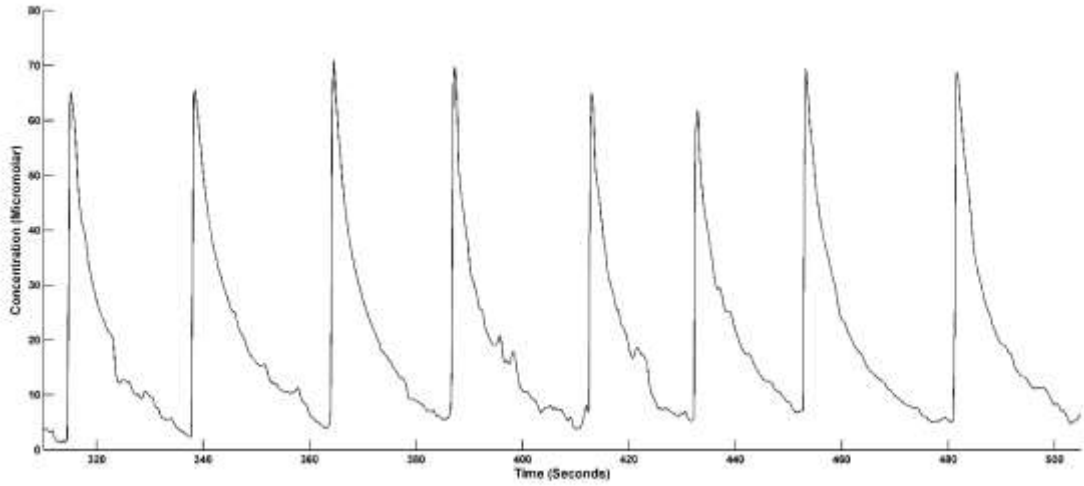


Şekil 4.26. Glutamat geri alım süreleri (İstatiksel anlamlılıklar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$ #, $p < 0.01$ ##; STZ grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ ** olarak verilmiştir.)

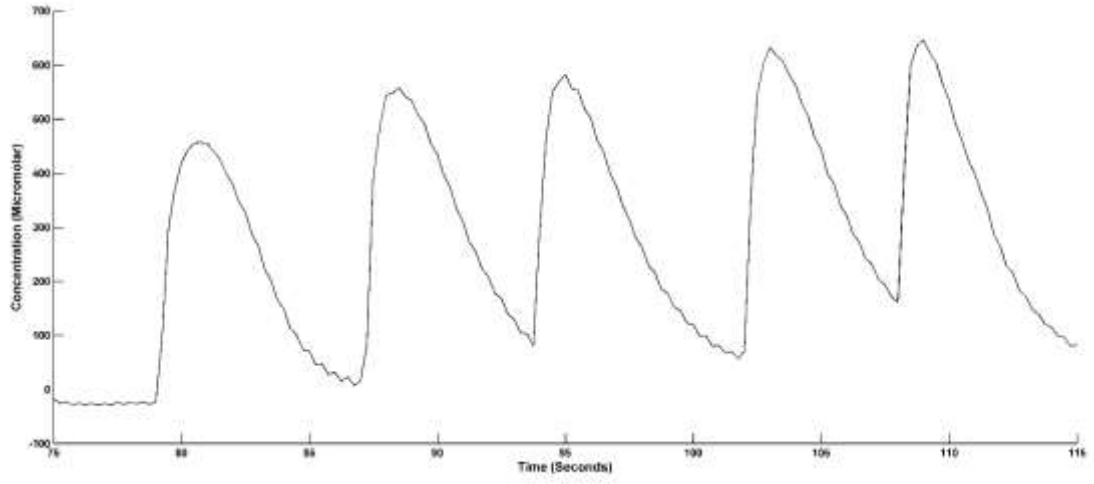
Glutamat geri alım sürelerinin voltametrik kayıtlarına ait temsili görüntüler sırası ile kontrol, STZ, STZ + MEM, STZ + AMP olmak üzere Şekil 4.27 ile Şekil 4.30 arasında verilmiştir.



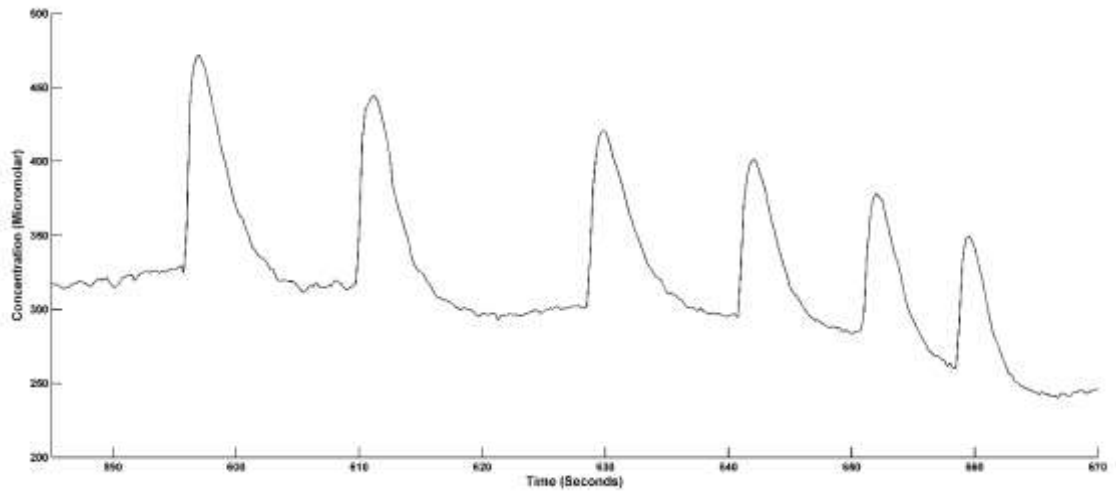
Şekil 4.27. Kontrol grubu örnek voltametri kayıtları



Şekil 4.28. STZ grubu örnek voltametri kayıtları



Şekil 4.29. STZ + MEM grubu örnek voltametri kayıtları



Şekil 4.30. STZ + AMP grubu örnek voltametri kayıtları

4.4. Histopatolojik Bulgular

Histopatolojik değerlendirmede gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar tespit edildi (Tablo 4.2-3, $p < 0.05$).

Tablo 4.1. Nöronlarda görülen piknotik değişimler (Aynı sütundaki gruplar arası farklılık ^{a, b, c, d} ile gösterilmektedir ($p < 0.05$), aynı satırdaki gruplar arası farklılık ^{A, B, C} ile gösterilmektedir ($p < 0.05$))

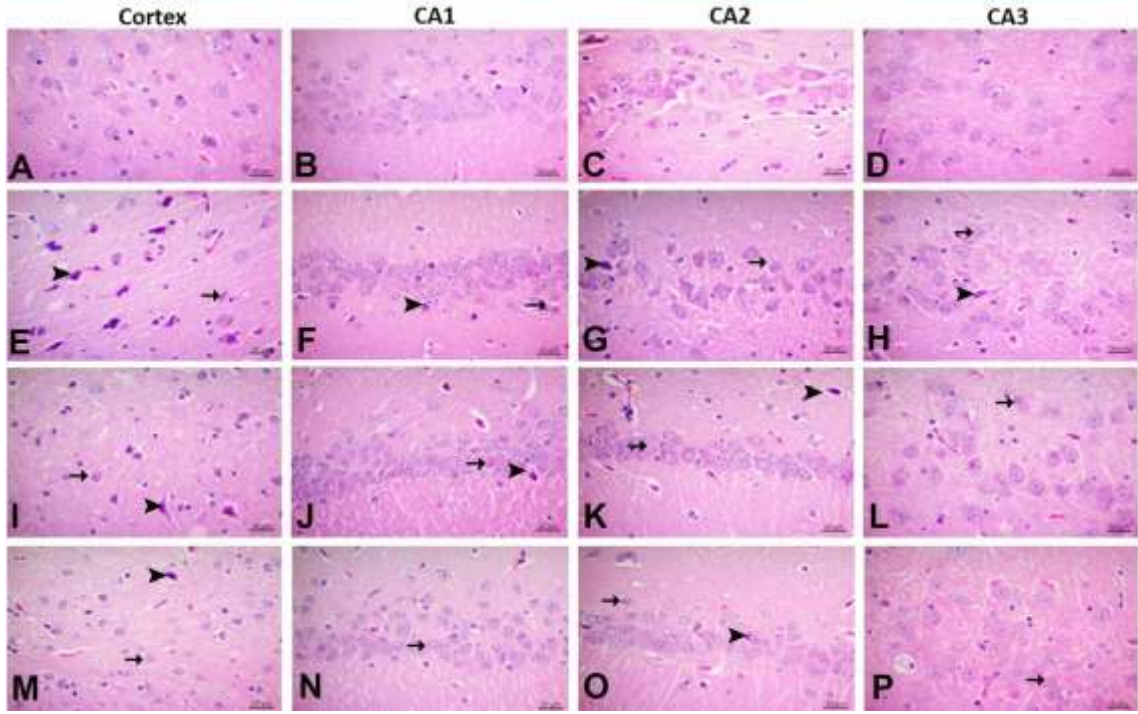
Gruplar	Korteks	CA1	CA2	CA3
Kontrol	0.36 ± 0.55^{aA}	0.17 ± 0.43^{aA}	0.36 ± 0.55^{aA}	0.36 ± 0.55^{aA}
STZ	3.05 ± 0.43^{bA}	2.75 ± 0.00^{bB}	1.25 ± 0.43^{bC}	1.08 ± 0.00^{bC}
STZ + MEM	2.32 ± 0.43^{cA}	0.89 ± 0.43^{cB}	1.25 ± 0.43^{bB}	0.36 ± 0.55^{aC}
STZ + AMP	1.25 ± 0.43^{dA}	0.36 ± 0.55^{aB}	1.08 ± 0.00^{bA}	0.36 ± 0.55^{aB}

Tablo 4.2. Nöronlarda görülen dejeneratif değişimler (Aynı sütundaki gruplar arası farklılık ^{a, b, c, d} ile gösterilmektedir ($p < 0.05$), aynı satırdaki gruplar arası farklılık ^{A, B, C} ile gösterilmektedir ($p < 0.05$))

Gruplar	Korteks	CA1	CA2	CA3
Kontrol	0.36 ± 0.43^{aA}	0.36 ± 0.55^{aA}	0.36 ± 0.55^{aA}	0.17 ± 0.43^{aA}
STZ	2.15 ± 0.00^{bA}	2.32 ± 0.43^{bB}	3.05 ± 0.43^{bB}	2.86 ± 0.55^{bC}
STZ + MEM	1.08 ± 0.00^{cA}	1.25 ± 0.43^{bA}	1.25 ± 0.43^{cB}	2.15 ± 0.00^{cC}
STZ + AMP	1.25 ± 0.43^{cA}	1.80 ± 0.00^{cB}	1.08 ± 0.00^{cB}	1.25 ± 0.43^{dC}

Histopatolojik incelemede piknotik değişimler en fazla beynin korteks kısmında gözlemlendi. Bu değişimler STZ grubunda şiddetli iken, STZ+MEM grubunda orta, STZ+AMP grubunda ise hafif düzeydeydi. Cornu ammonis'teki piknotik değişimler STZ grubunda CA1 kısmında orta düzeyde, CA2 ve CA3 kısmında hafif düzeyde olduğu belirlendi. Diğer uygulama gruplarından STZ + MEM grubunda kortekste orta düzeyde, CA1 ve CA2 kısmında hafif düzeyde piknotik değişimler gözlemlendi. STZ + AMP grubunda ise piknotik değişimler korteks ve CA2 kısmında hafif düzeydeydi. CA1 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 ve CA3 kısmında ise şiddetli düzeyde dejeneratif nöronlara rastlandı. Diğer uygulama grupları olan STZ + MEM ve STZ + AMP’de ise genel olarak hafif düzeyde dejeneratif değişimler gözlemlendi (Şekil 4.31).



Şekil 4.31. Histopatoloji örnek görüntüleri (**Kontrol grubu (A, B, C, D).** Normal histolojik görünümde, **STZ grubu (E, F, G, H).** Korteks’te şiddetli düzeyde piknotik ve orta düzeyde dejeneratif nöronlar, CA1’de orta düzeyde piknotik, dejeneratif nöronlar CA2 ve CA3’te hafif düzeyde piknotik ve şiddetli düzeyde dejeneratif nöronlar, **STZ + MEM grubu (I, J, K, L).** Korteks’te orta düzeyde piknotik ve hafif düzeyde dejeneratif nöronlar, CA1 ve CA2’de hafif düzeyde piknotik ve dejeneratif nöronlar, CA3’te orta düzeyde dejeneratif nöronlar, **STZ + AMP grubu (M, N, O, P).** Korteks’te hafif düzeyde piknotik ve dejeneratif nöronlar, CA1’de hafif düzeyde dejeneratif nöronlar ve CA2’de hafif düzeyde piknotik ve dejeneratif nöronlar, CA3’te hafif düzeyde dejeneratif nöronlar, (► = piknotik nöron, → = dejeneratif nöron), H-E.)

4.5. İmmunohistokimyasal Boyama

Tau, β -Amiloid ve AChE yönünden yapılan immunohistokimyasal boyamalarda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar tespit edildi (Tablo 4.4-6), $p < 0.05$).

Tablo 4.3. Tau ile yapılan immunohistokimyasal boyamalar (Aynı sütundaki gruplar arası farklılık ^{a, b, c} ile gösterilmektedir ($p < 0.05$), aynı satırdaki gruplar arası farklılık ^{A, B, C, D} ile gösterilmektedir ($p < 0.05$))

Gruplar	Korteks	CA1	CA2	CA3
Kontrol	0.36 ± 0.55^{aA}	0.89 ± 0.43^{aB}	1.97 ± 0.43^{ac}	3.23 ± 0.00^{aD}
STZ	4.12 ± 0.43^{bA}	2.86 ± 0.55^{bB}	3.94 ± 0.55^{bA}	4.12 ± 0.43^{bA}
STZ + MEM	3.23 ± 0.00^{cA}	1.97 ± 0.43^{cB}	2.86 ± 0.55^{cA}	3.05 ± 0.43^{aA}
STZ + AMP	0.36 ± 0.55^{aA}	0.89 ± 0.43^{aB}	3.05 ± 0.43^{cC}	2.15 ± 0.00^{cD}

Tablo 4.4. β -Amiloid ile yapılan immunohistokimyasal boyamalar (Aynı sütundaki gruplar arası farklılık ^{a, b, c, d} ile gösterilmektedir ($p < 0.05$), aynı satırdaki gruplar arası farklılık ^{A, B, C} ile gösterilmektedir ($p < 0.05$))

Gruplar	Korteks	CA1	CA2	CA3
Kontrol	0.17 ± 0.43^{aA}	1.79 ± 0.55^{aB}	1.97 ± 0.43^{aB}	2.32 ± 0.43^{aB}
STZ	3.05 ± 0.43^{bA}	4.12 ± 0.46^{bB}	3.94 ± 0.43^{bB}	3.94 ± 0.55^{bB}
STZ + MEM	2.15 ± 0.00^{cA}	2.86 ± 0.55^{cB}	30.5 ± 0.4^{cB}	2.86 ± 0.55^{cB}
STZ + AMP	1.43 ± 0.55^{dA}	3.05 ± 0.43^{cB}	1.97 ± 0.43^{dC}	2.15 ± 0.00^{aC}

Tablo 4.5. AChE ile yapılan immunohistokimyasal boyamalar (Aynı sütundaki gruplar arası farklılık ^{a, b, c} ile gösterilmektedir ($p < 0.05$), aynı satırdaki gruplar arası farklılık ^{A, B} ile gösterilmektedir ($p < 0.05$))

Gruplar	Korteks	CA1	CA2	CA3
Kontrol	0.17 ± 0.43^{aA}	0.89 ± 0.54^{aB}	1.08 ± 0.00^{aB}	1.25 ± 0.43^{aB}
STZ	2.86 ± 0.55^{bA}	3.94 ± 0.55^{bB}	4.12 ± 0.43^{bB}	4.12 ± 0.43^{bB}
STZ + MEM	1.25 ± 0.43^{cA}	2.15 ± 0.00^{cB}	2.15 ± 0.00^{cB}	2.32 ± 0.43^{cB}
STZ + AMP	1.08 ± 0.00^{cA}	2.32 ± 0.43^{cB}	1.25 ± 0.43^{aA}	1.00 ± 0.00^{aA}

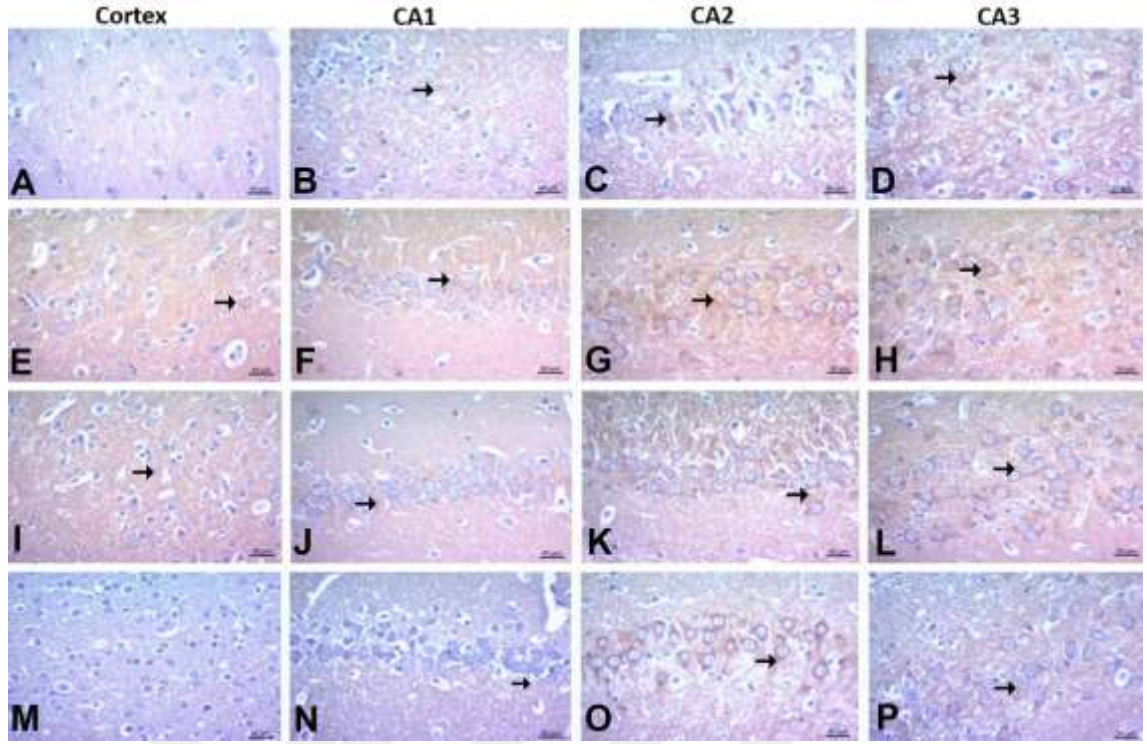
Tau ile yapılan immunohistokimyasal boyamalarda kontrol grubunun CA1 kısmında hafif, CA2 kısmında orta, CA3 kısımlarında şiddetli düzeyde immunpozitiflik tespit edilirken, korteks kısmında immunpozitifliklere önemli düzeyde rastlanmadı. STZ

grubunda korteks, CA2 ve CA3 kısmında çok şiddetli düzeyde CA1 kısmında ise şiddetli düzeyde immunpozitiflikler tespit edildi. STZ + MEM grubunda CA1 kısmında orta düzeyde, korteks, CA2 ve CA3 kısımlarında şiddetli düzeyde immunpozitifliğe rastlandı.

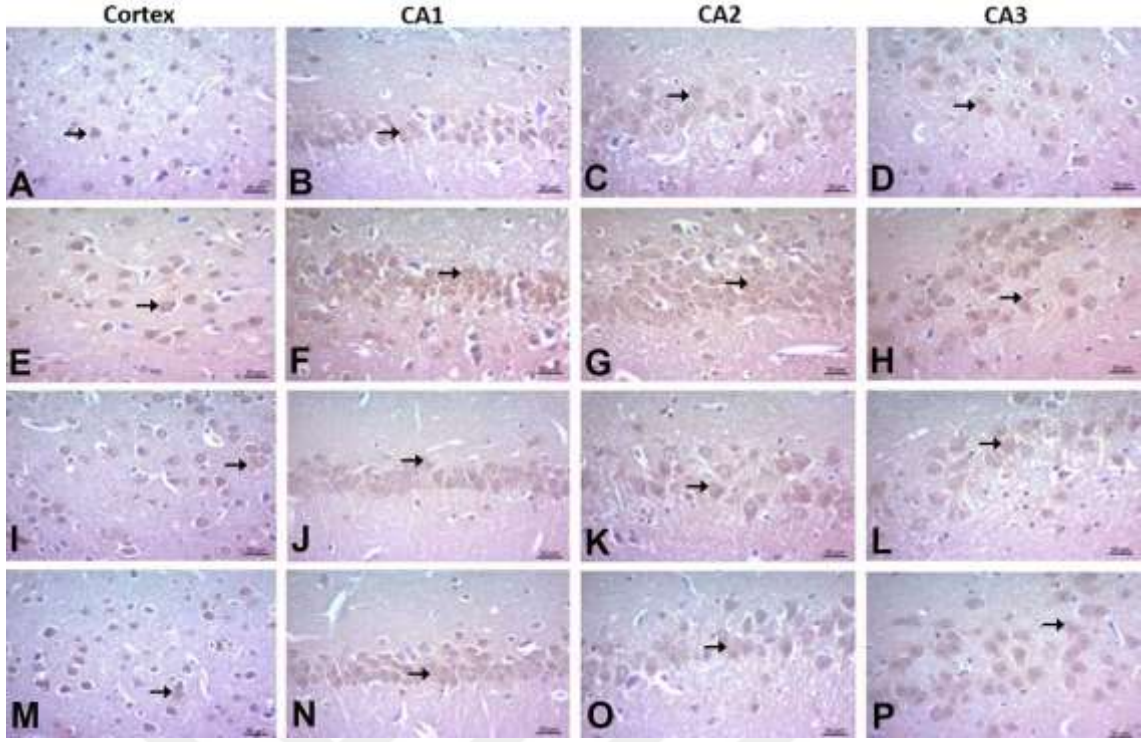
STZ + AMP grubu ise genel olarak Tau immunpozitifliğinin en az olduğu uygulama grubuydu. Bu grupta CA1 kısmında hafif, CA2 kısmında şiddetli, CA3 kısmında orta düzeyde immunpozitifliklere rastlandı. Korteks kısmında ise önemli düzeyde pozitifliğe rastlanmadı (Şekil 4.32).

β -Amiloid immunpozitifliğine kontrol grubunun korteks'inde hafif düzeyde, cornu ammonis'inde ise orta düzeyde rastlandı. β -Amiloid immunpozitifliğinin en fazla olduğu grup STZ grubuydu. Bu grupta CA1, CA2 ve CA3'te çok şiddetli düzeyde, korteks'te ise şiddetli düzeyde immunpozitiflikler görüldü. STZ + MEM grubunda β -Amiloid daha hafif seviyedeydi. CA1, CA2 ve CA3'te şiddetli düzeyde, korteks'te ise orta düzeyde immunpozitifliklerin olduğu belirlendi. β -Amiloid pozitifliğinin en az olduğu grup STZ + AMP grubuydu. Bu grupta cornu ammonis'in CA1 kısmında şiddetli, CA2 ve CA3 kısmında orta düzeyde, korteks'te ise hafif düzeyde pozitifliklere rastlandı (Şekil 4.33).

Kontrol grubunda AChE immunpozitifliğine korteks kısmı hariç cornu ammonis'in tüm kısımlarında hafif düzeyde rastlandı. Uygulama gruplarından AChE immunpozitifliği en fazla STZ grubunda belirlendi ve bu grupta korteks'te şiddetli, CA1, CA2 ile CA3'te çok şiddetli düzeydeydi. Diğer uygulama gruplarından STZ + MEM grubunda cornu commonis'te orta düzeyde, korteks'te hafif düzeydeydi. STZ + AMP grubunda ise korteks, CA2 ve CA3'te hafif düzeyde, CA1'de ise orta düzeyde pozitifliklere rastlandı (Şekil 4.34).

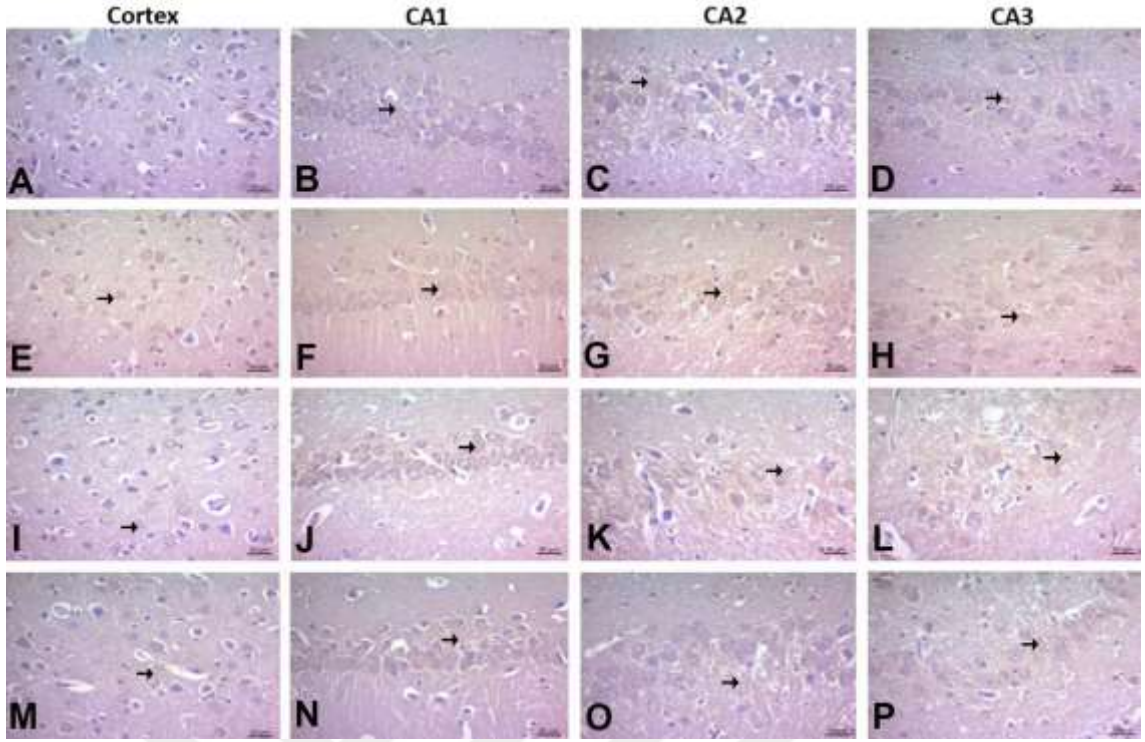


Şekil 4.32. Tau immunpozitifliği örnek görüntüleri (**Kontrol grubu (A, B, C, D).** Korteks, CA1, CA2 ve CA3 kısımlarında sırasıyla; yok, hafif, orta, şiddetli, **STZ grubu (E, F, G, H).** Korteks, CA1, CA2 ve CA3 kısımlarında sırasıyla; çok şiddetli, şiddetli, çok şiddetli, çok şiddetli, **STZ + MEM grubu (I, J, K, L).** Korteks, CA1, CA2 ve CA3 kısımlarında sırasıyla; şiddetli, orta, şiddetli, şiddetli, **STZ + AMP grubu (M, N, O, P).** Korteks, CA1, CA2 ve CA3 kısımlarında sırasıyla; yok, hafif, şiddetli, orta düzeyde immunpozitiflikler (→), IHC.)



Şekil 4.33. β -Amiloid immunpozitifliği örnek görüntüleri (Kontrol grubu (A, B, C, D).

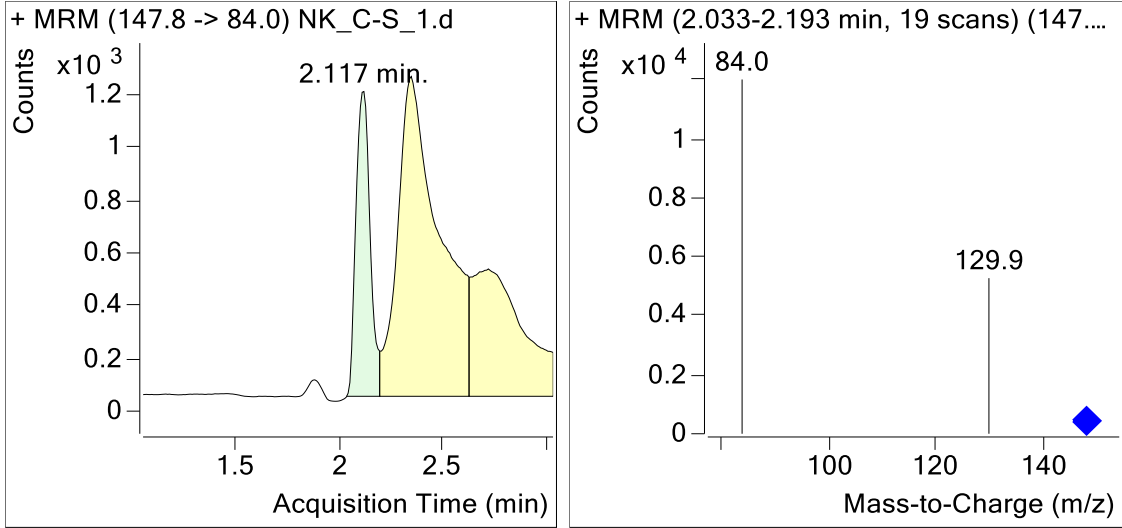
Korteks, CA1, CA2 ve CA3 kısımlarında sırasıyla; yok, orta, orta, orta, **STZ grubu (E, F, G, H).** Korteks, CA1, CA2 ve CA3 kısımlarında sırasıyla; şiddetli, çok şiddetli, çok şiddetli, çok şiddetli, **STZ + MEM grubu (I, J, K, L).** Korteks, CA1, CA2 ve CA3 kısımlarında sırasıyla; orta, şiddetli, şiddetli, şiddetli, **STZ + AMP grubu (M, N, O, P).** Korteks, CA1, CA2 ve CA3 kısımlarında sırasıyla; hafif, şiddetli, orta, orta düzeyde immunpozitiflikler (→), IHC.)



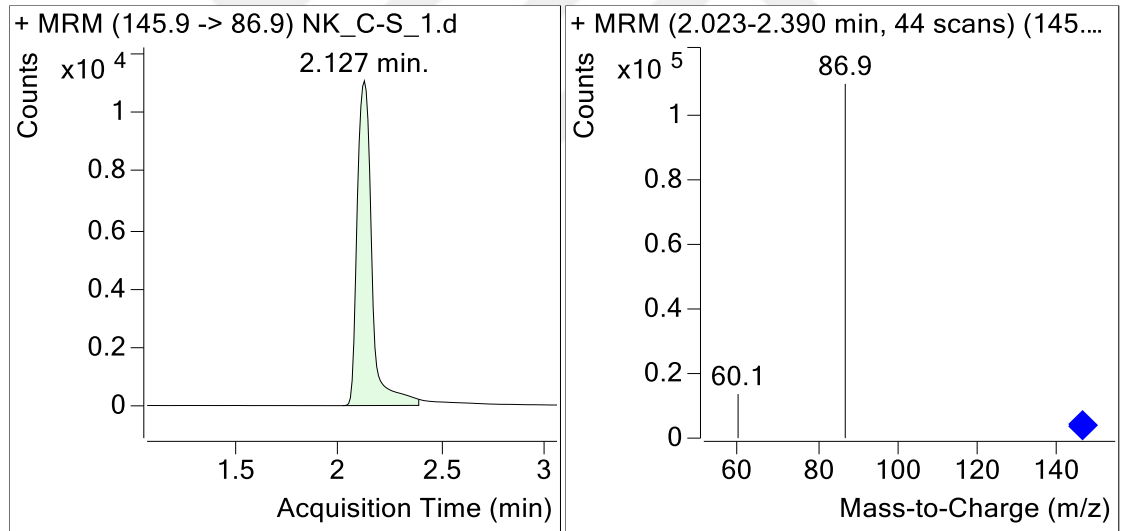
Şekil 4.34. AChE immunpozitifliği örnek görüntüleri (**Kontrol grubu (A, B, C, D).** Korteks, CA1, CA2 ve CA3 kısımlarında sırasıyla; yok, hafif, hafif, hafif, **STZ grubu (E, F, G, H).** Korteks, CA1, CA2 ve CA3 kısımlarında sırasıyla; şiddetli, çok şiddetli, çok şiddetli, çok şiddetli, **STZ + MEM grubu (I, J, K, L).** Korteks, CA1, CA2 ve CA3 kısımlarında sırasıyla; hafif, orta, orta, orta, **STZ + AMP grubu (M, N, O, P).** Korteks, CA1, CA2 ve CA3 kısımlarında sırasıyla; yok, orta, hafif, hafif düzeyde immunpozitiflikler (→), IHC.)

4.6. LC-MS/MS Bulguları

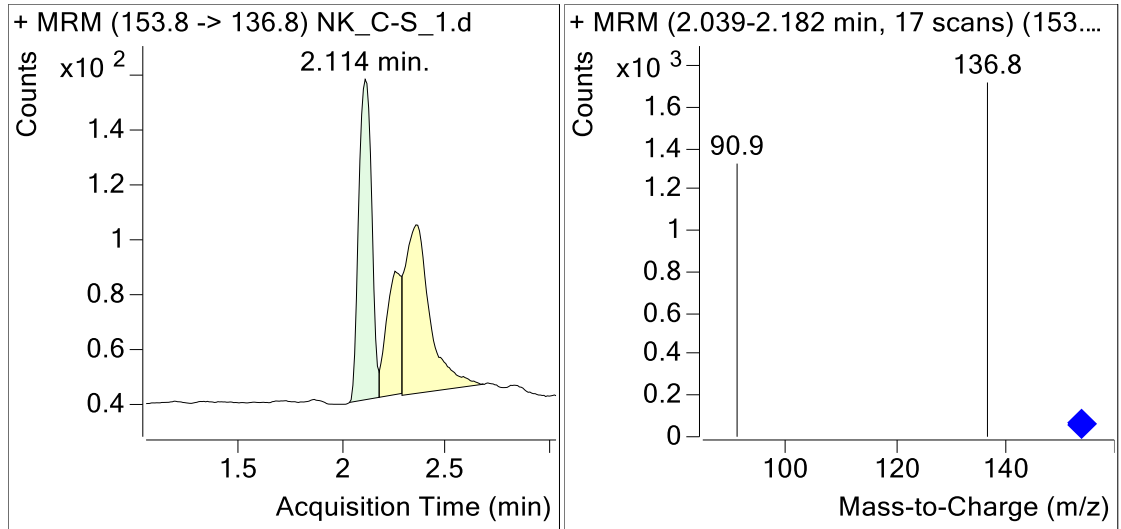
Beyin ekstreleri üzerinde yapılan LC-MS/MS çalışmaları sonucunda glutamat, dopamin ve asetilkolin seviyeleri incelenmiştir. İncelenen nörotransmitterlerin Mutiple Reaction Monitoring (MRM) madunda kromotogramlarına ve MRM madunda parçalanma ürünlerinin kütle spektrumlarına bakılmış ve kalibrasyon grafiklerine göre ppm seviyesinde miktar hesaplamaları yapılmıştır (Şekil 4.35-49).



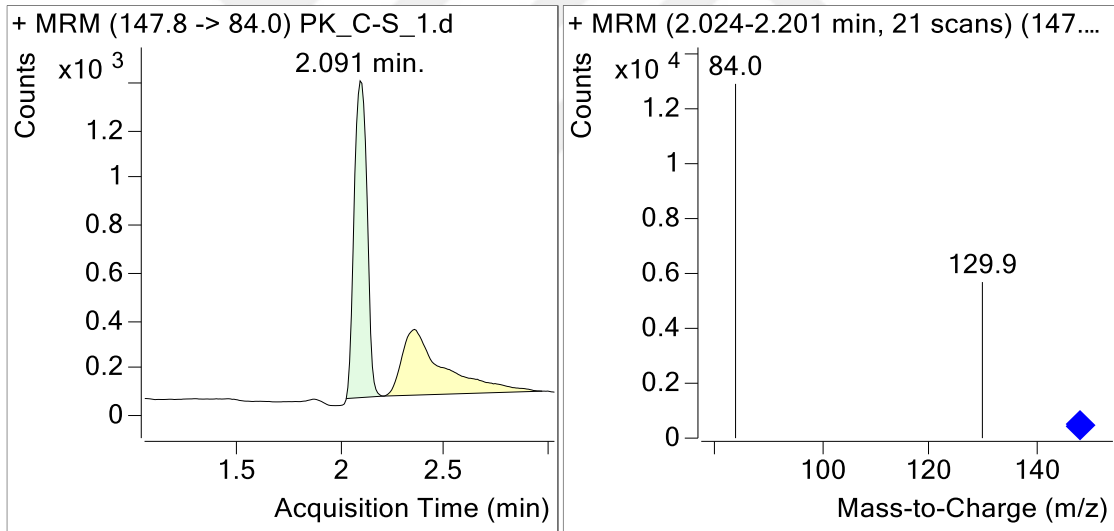
Şekil 4.35. Kontrol grubunda glutamik asidin Multiple Reaction Monitoring madunda 147.8 Prekürsör iyonunun 84.0 m/z oranına sahip fragmentör iyonuna ait kromotogramı ve Kontrol grubunda glutamik asidin MRM madunda parçalanma ürünlerine ait kütle spektrumu



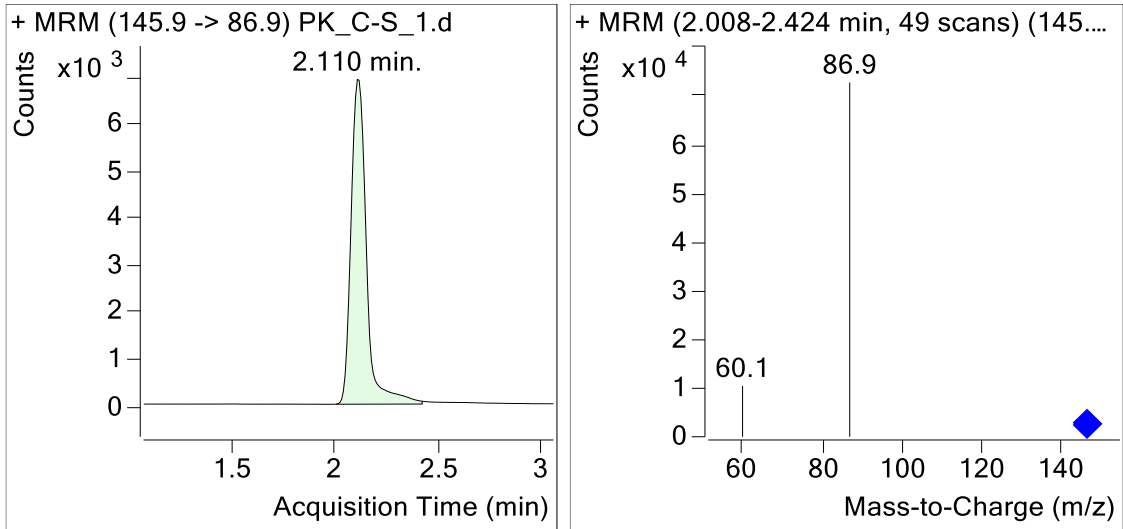
Şekil 4.36. Kontrol grubunda asetilkolinin Multiple Reaction Monitoring madunda 145.9 Prekürsör iyonunun 86.9 m/z oranına sahip fragmentör iyonuna ait kromotogramı ve Kontrol grubunda asetilkolinin MRM madunda parçalanma ürünlerine ait kütle spektrumu



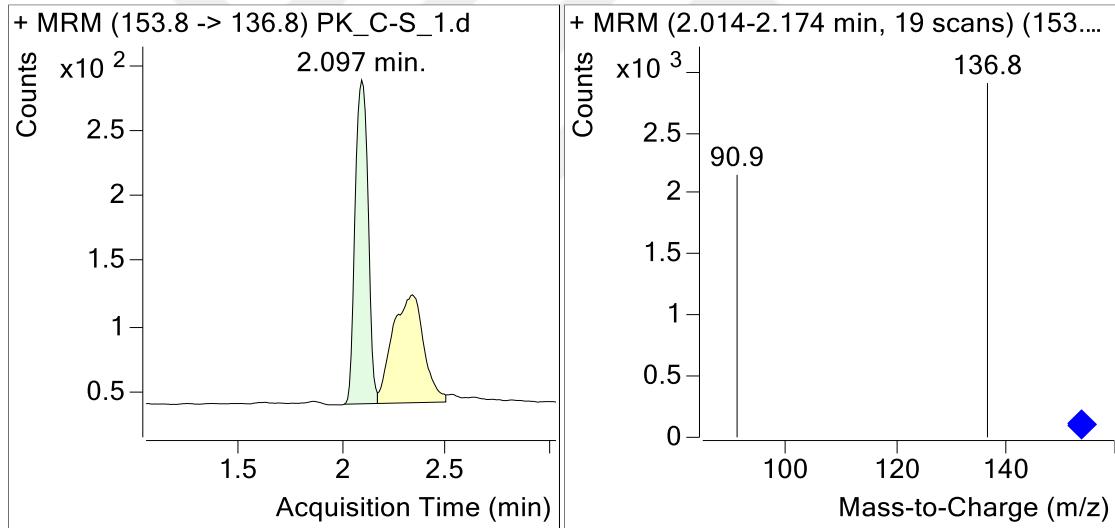
Şekil 4.37. Kontrol grubunda dopaminin Mutiple Reaction Monitoring madunda 153.8 Prekürsör iyonunun 136.8 m/z oranına sahip fragmentör iyonuna ait kromotogramı ve Kontrol grubunda dopaminin MRM madunda parçalanma ürünlerine ait kütle spektrumu



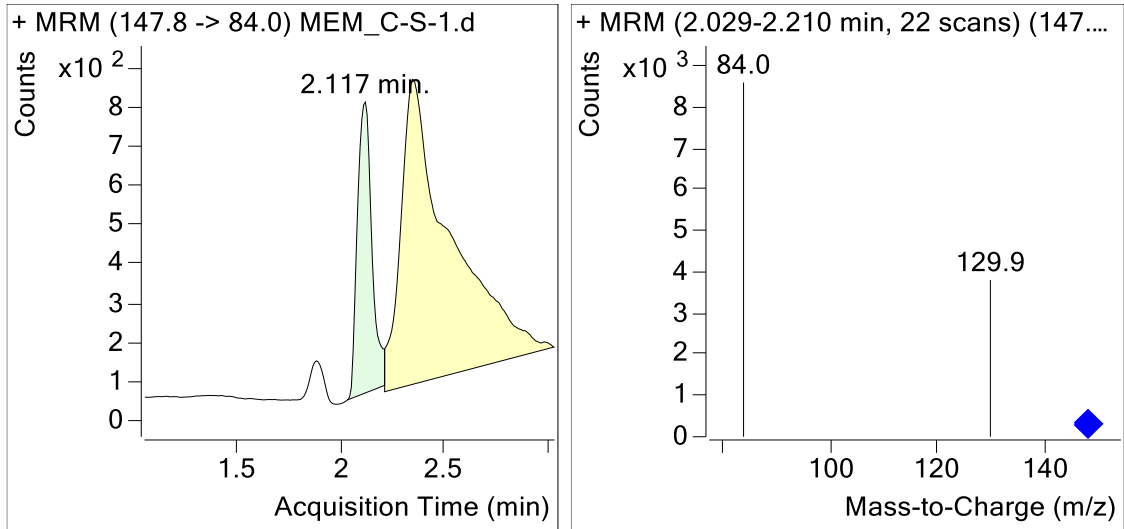
Şekil 4.38. STZ grubunda glutamik asidin Mutiple Reaction Monitoring madunda 147.8 Prekürsör iyonunun 84.0 m/z oranına sahip fragmentör iyonuna ait kromotogramı ve STZ grubunda glutamik asidin MRM madunda parçalanma ürünlerine ait kütle spektrumu



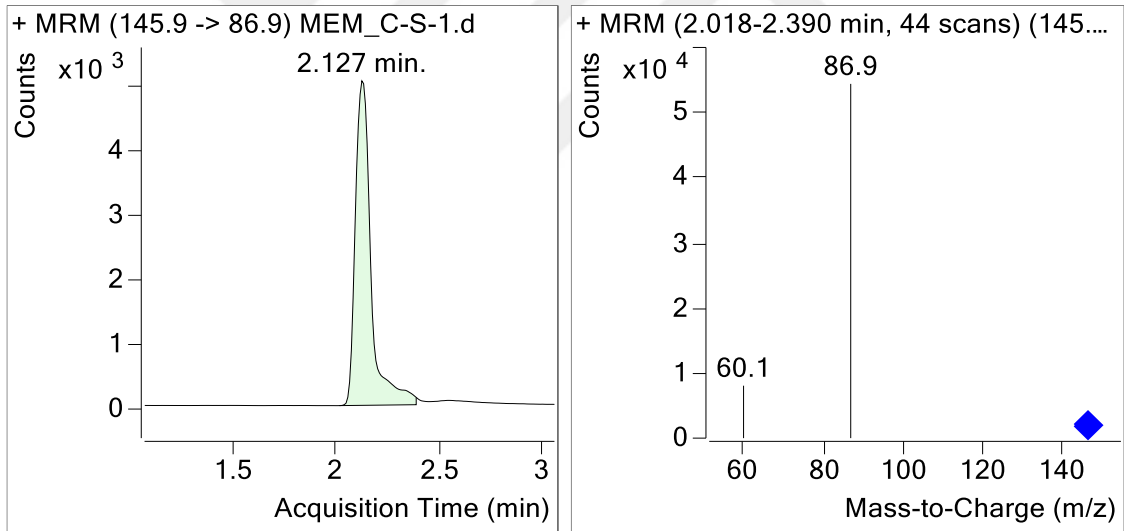
Şekil 4.39. STZ grubunda asetilkolinin Mutiple Reaction Monitoring madunda 145.9 Prekürsör iyonunun 86.9 m/z oranına sahip fragmantör iyonuna ait kromotogramı ve STZ grubunda asetilkolinin MRM madunda parçalanma ürünlerine ait kütle spektrumu



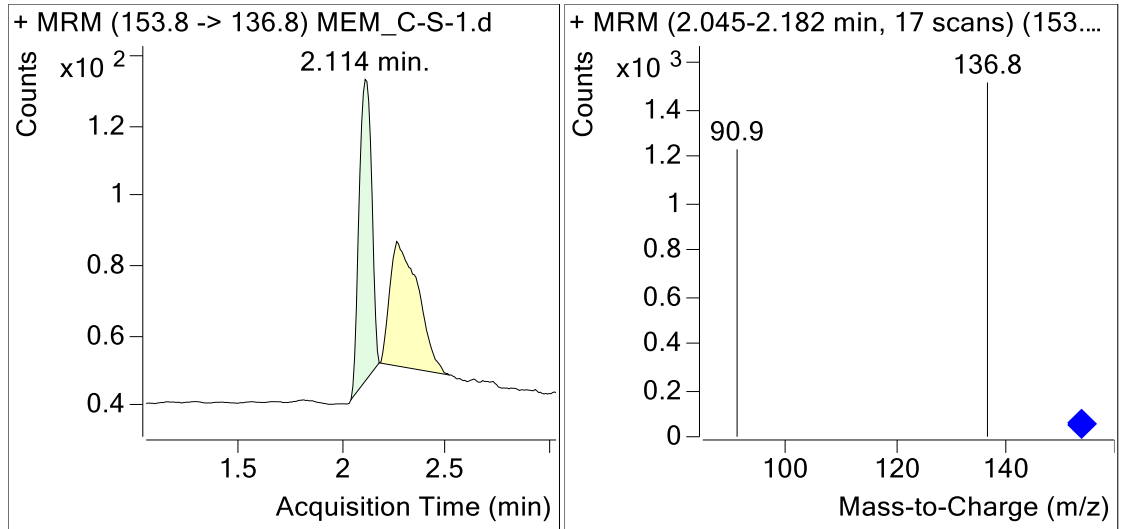
Şekil 4. 40. STZ grubunda dopaminin Mutiple Reaction Monitoring madunda 153,8 Prekürsör iyonunun 136.8 m/z oranına sahip fragmantör iyonuna ait kromotogramı ve STZ grubunda dopaminin MRM madunda parçalanma ürünlerine ait kütle spektrumu



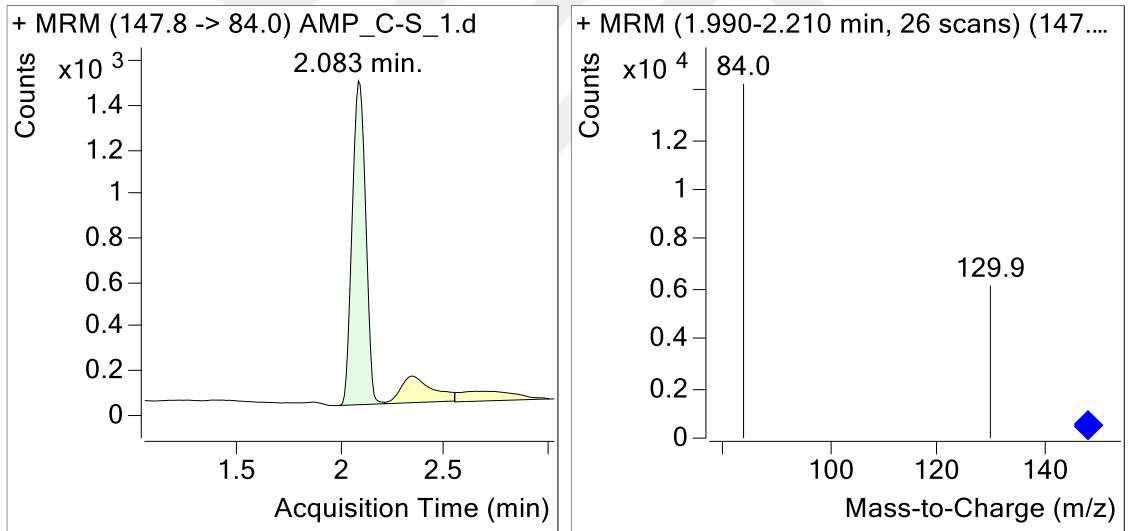
Şekil 4.41. STZ + MEM grubunda glutamik asidin Mutiple Reaction Monitoring madunda 147.8 Prekürsör iyonunun 84.0 m/z oranına sahip fragmentör iyonuna ait kromotogramı ve STZ + MEM grubunda glutamik asidin MRM madunda parçalanma ürünlerine ait kütle spektrumu



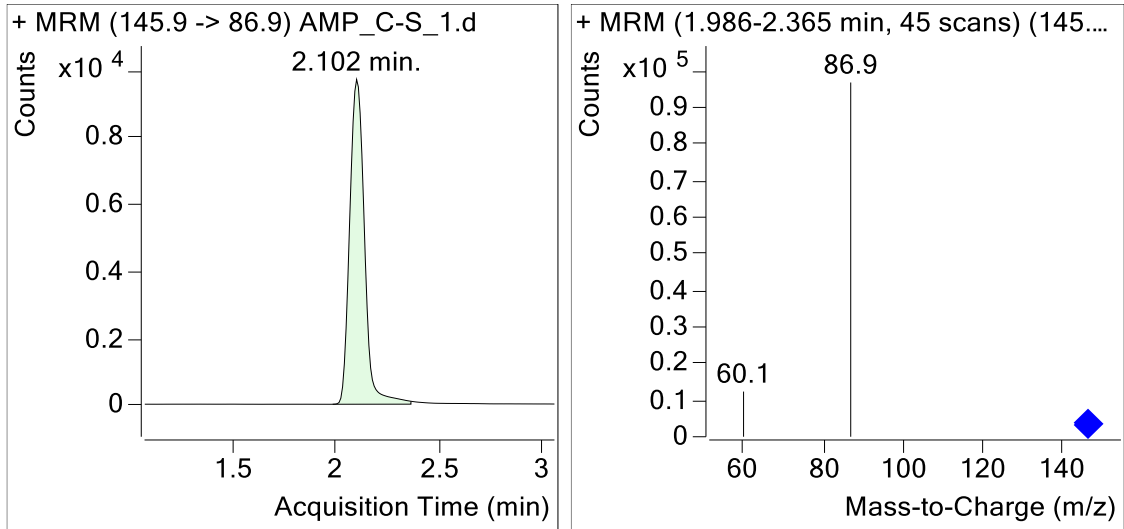
Şekil 4.42. STZ + MEM grubunda asetilkolinin Mutiple Reaction Monitoring madunda 145.9 Prekürsör iyonunun 86.9 m/z oranına sahip fragmentör iyonuna ait kromotogramı ve STZ + MEM grubunda asetilkolinin MRM madunda parçalanma ürünlerine ait kütle spektrumu



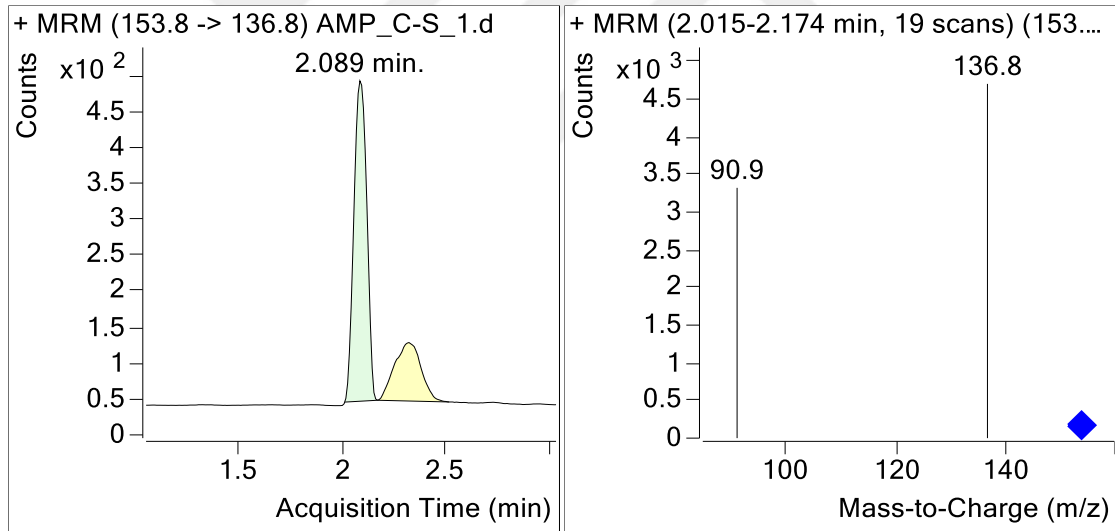
Şekil 4.43. STZ + MEM grubunda dopaminin Mutiple Reaction Monitoring madunda 153,8 Prekürsör iyonunun 136,8 m/z oranına sahip fragmentör iyonuna ait kromotogramı ve STZ + MEM grubunda dopaminin MRM madunda parçalanma ürünlerine ait kütle spektrumu



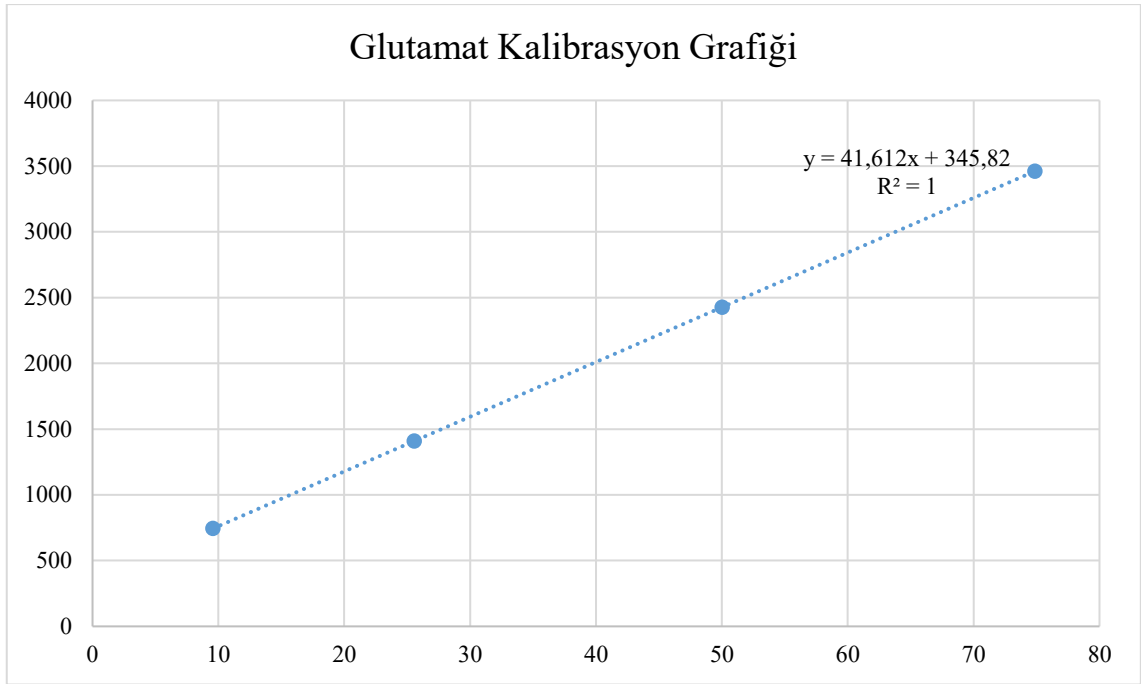
Şekil 4.44. STZ + AMP grubunda glutamik asidin Mutiple Reaction Monitoring madunda 147,8 Prekürsör iyonunun 84,0 m/z oranına sahip fragmentör iyonuna ait kromotogramı STZ + AMP grubunda glutamik asidin MRM madunda parçalanma ürünlerine ait kütle spektrumu



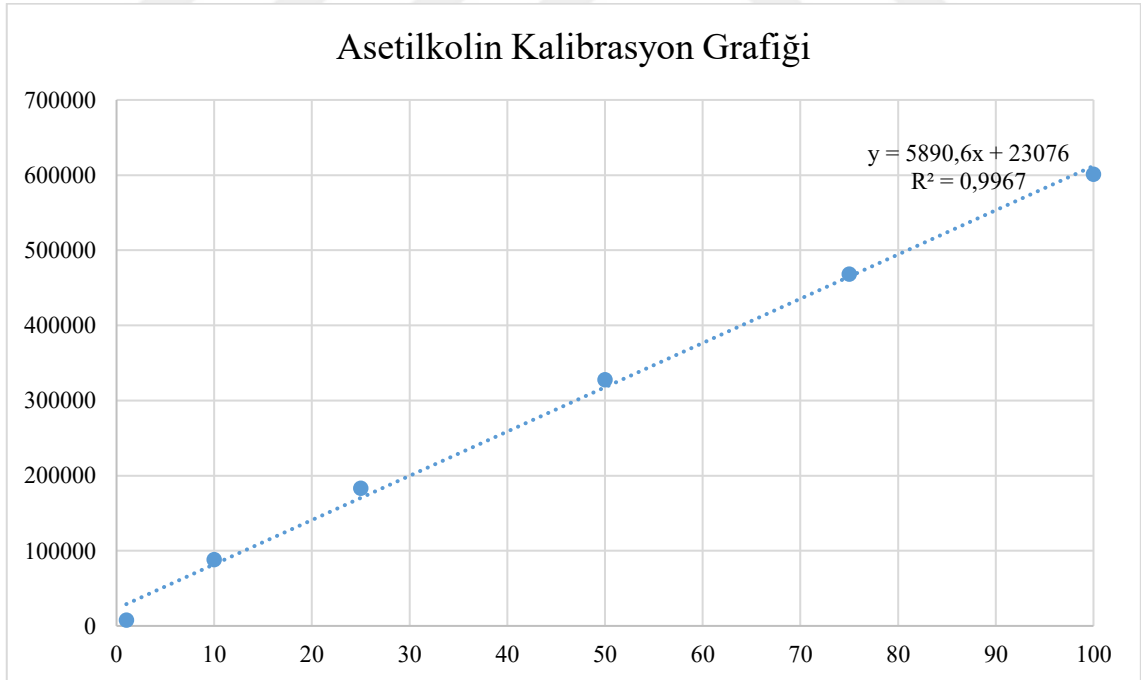
Şekil 4.45. STZ + AMP grubunda asetilkolinin Mutiple Reaction Monitoring madunda 145.9 Prekürsör iyonunun 86.9 m/z oranına sahip fragmantör iyonuna ait kromotogramı ve STZ + AMP grubunda asetilkolinin MRM madunda parçalanma ürünlerine ait kütle spektrumu



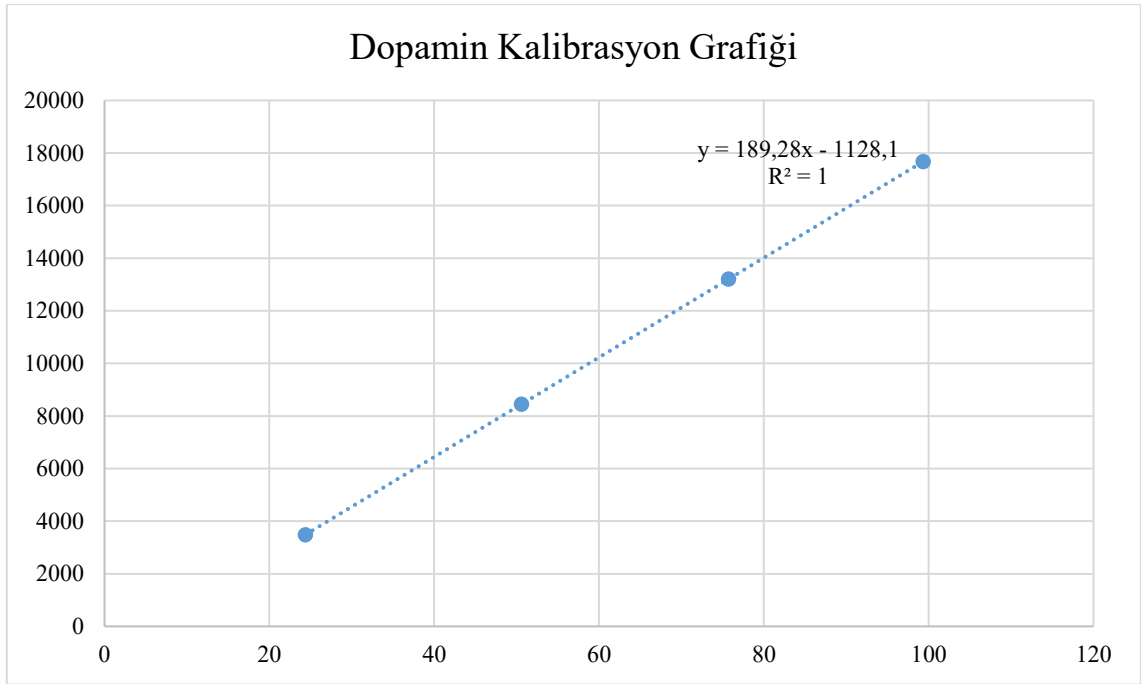
Şekil 4.46. STZ + AMP grubunda dopaminin Mutiple Reaction Monitoring madunda 153.8 Prekürsör iyonunun 136.8 m/z oranına sahip fragmantör iyonuna ait kromotogramı ve STZ + AMP grubunda dopaminin MRM madunda parçalanma ürünlerine ait kütle spektrumu



Şekil 4.47. Glutamatın standart numunelerine karşı okunan değlerden oluşan kalibrasyon grafiği



Şekil 4.48. Asetilkolinin standart numunelerine karşı okunan değlerden oluşan kalibrasyon grafiği



Şekil 4. 49. Dopaminin standart numunelerine karşı okunan değerlerden oluşan kalibrasyon grafiği

Elde edilen verilere göre kontrol grubunda glutamat seviyesi 122.87 ± 0.96 ppm iken bu seviyeler STZ grubunda 129.34 ± 2.54 ppm, STZ + MEM grubunda 79.89 ± 0.90 ppm, STZ + AMP grubunda ise 126.54 ± 2.36 ppm olarak hesaplanmıştır. Asetilkolin seviyeleri ise kontrol grubunda 4.80 ± 0.53 ppm, STZ grubunda 2.32 ± 0.46 ppm, STZ + MEM grubunda 4.65 ± 0.10 ppm, STZ + AMP grubunda ise 3.77 ± 0.48 ppm olarak hesaplanmıştır. Dopamin seviyesi ise kontrol grubunda 7.98 ± 0.91 ppm, STZ grubunda 6.58 ± 0.11 ppm, STZ + MEM grubunda 8.04 ± 0.24 ppm, STZ + AMP grubunda ise 6.81 ± 0.21 ppm olarak bulunmuştur.

5. TARTIŞMA

Yüz yıldan fazla süredir tanımlanmış olan AH için onaylanmış az sayıda tedavi bulunmaktadır. Bu tedaviler hastalığın seyrini değiştirmek yerine yalnızca semptomları kontrol altına almayı sağlamaktadır. Hastalık üzerindeki çalışmalar klinik olarak AH tanısı almış bireylerde yapılmıştır. Fakat hastalığın patolojik bulguları hastalık başlangıcından birkaç sene öncesine dayanmaktadır. Bu durum erken teşhisi ve erken teşhise bağlı olarak hastalığın seyrini değiştirici tedavilerin bulunmasını zorlaştırmakta ve araştırmalar için önemli bir kısıtlama olmaktadır. Yaptığımız bu çalışmada temel hedefimiz, AH'nin sinaptik aralıkta glutamat geri alım sürelerinde yaptığı değişiklikleri ortaya koymak, tedavide kullanılan ilaçların ve glutamat reuptake hızlandırıcı ilaçların faydalı etkilerini test etmektir.

İcv STZ enjeksiyonu ile oluşturulan AH modelinin öncüsü Profesör Sigfried Hoyer'dir.²³⁹ Modelin temeli, AH'li kişilerin beyinde hem oksijen hem de glikozun tüketiminde düşüş olmasına dayanmaktadır. Gözlemler ışığında hastalığın temel biyokimyasal parametrelerinin bozulmasının serebral insülin reseptörü sinyalleşmesinin değişimi aracılığıyla glukoz metabolizmasıyla alakalı olduğu hipotezi ortaya atılmıştır.²⁴⁰ Bu amaçla icv olarak STZ uygulaması yapılarak glukoz metabolizması üzerine etki edilerek AH'nin patolojisi taklit edilmeye çalışılmıştır.²⁴¹ STZ'nin lateral ventriküllere uygulanması sonucu frontal ve parietal kortekste enerji yük potansiyelinin azaldığı gösterilmiştir.²⁴² Yakın zamanlı bir incelemede, icv STZ enjeksiyonunun tetiklediği bilişsel ve nörokimyasal değişikliklerin, üç aşamadan oluşan zamana bağlı bir model izlediği belirtilmektedir.²⁴³ 1 ay içinde akut yanıt gelişimi, 1-3 ayda normal değerlere dönme eğilimi ve son olarak 6-9 ayda yavaş ve ilerleyici bir şiddetlenme ile dekompanseasyon fazı oluşumu fark edilmiştir.²⁴⁴ Bu durum transgenik hayvan modellerinde olmayan, AH'nin ilerleyici aşamasını taklit etmektedir. Tek doz bilateral

icv STZ enjeksiyonundan (3 mg/kg) beş hafta sonra Coreia ve ark. beyin ağırlığında azalma, bilişsel fonksiyonlarda bozulma, hipokampal A β 'de önemli bir artış ve hem hipokampal hem de kortikal hiperfosforile Tau düzeylerinde artış bulmuşlardır.²⁴⁵ Sıçan icv STZ modelinin AH hastalarının beyinlerindeki bulgulara benzeyen bir diğer önemli özelliği, beyin dokusu oksidatif stres belirtileri²⁴⁶ ve kaspaz aracılı apoptotik hücre ölümüne neden olabilen beyin mitokondriyal anormallikleridir.^{247,248}

Tüm bu patolojik özelliklere ek olarak AH'nin erken dönem bulgularını yansıtabildiği için protektif yaklaşımla hazırlanan bu tezde AH modeli için 3 mg/kg icv STZ enjeksiyonu uygun bulunmuştur.

Son yıllardaki homeostaz ağının çökmesi hipotezi, MSS'deki uyarım ve inhibisyon arasındaki dengesizliğin, nöronal ağların düzensizliğine yol açmasının, AH etyopatolojisini alevlendiren ve hatta neden olan bir faktör olabileceğini düşündürmektedir.^{249–252} Nöronların inhibisyonu ve uyarılması arasındaki dengedeki değişikliklere paralel olarak, mikrogial fonksiyonda düzensizlik meydana gelebileceği düşünülmektedir.^{253–255} Glial hücreler, nörotransmitterler için birçok reseptör eksprese etmekte ve nöronal aktiviteye aktif olarak cevap vermektedir. Son veriler, nöronlar ve gliaların, sinyal yollarının bazı bileşenlerini paylaştığını ve aralarındaki çapraz sinyalleşmenin, MSS'nin gelişimi ve işlevinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir.^{256,257} MSS'deki önemli nörotransmitterden biri olan glutamat, nöronlarda ve glial hücrelerde glikoz ve α -ketoglutarat'tan sentezlenen ve beyinde kolayca dağılan esansiyel olmayan bir amino asittir. MSS'deki glutamat seviyesi, KBB'ni geçmediği için periferik organlardaki glutamat varlığından etkilenmemektedir.²⁵⁸

Glutamat, zıt işlevlere sahip diğer önemli nörotransmitter olan GABA'nın öncüsüdür. Bu iki nörotransmitter aracılı sinyal yolu arasındaki denge, normal beyin fonksiyonu için gereklidir.²⁵⁸ Glutamaterjik iletimin en önemli rollerinden biri, nitrik

oksite, arasıdonik asit, eikosanoitler ve dokosanoitler gibi farklı metabolitlerinin kalsiyuma bağlı olarak serbest bırakılmasıyla uzun vadeli potensiyalizasyon (LTP) veya uzun vadeli depresyon (LTD) aktivasyonu yoluyla biliş, öğrenme ve hafızanın düzenlenmesidir.²⁵⁹

Bununla birlikte, nöroinflamasyon ve AH, anormal düzeyde nörotransmitterlerin sadece nöronal sinapslardan değil, aynı zamanda mikroglia ve astrositlerden salınmasına da yol açmaktadır. Fazla miktarda glutamat, glial hücreler ve uyarıcı amino asit taşıyıcıları (EAAT1, EAAT2) tarafından hızla uzaklaştırılır. Astrositlerde glutamat, nöronal presinaptik kısım tarafından salınan ve alınan glutamine dönüştürölür ve glutamata metabolize edilir, daha sonra veziköler glutamat taşıyıcıları (VGLUT1/VGLUT2) tarafından sinaptik veziköllerde birikir ve nörotransmisyon sürecinde salınır. En önemli glutamat taşıyıcısı, ön beyin glutamat alımının yaklaşık %90'ından ve yetişkin beyindeki homeostazından sorumlu olan GLT-1/EAAT2'dir.²⁶⁰ Mikroglia tarafından aşırı salınımıyla birlikte glutamat klirensinin işlevsizliği, eksitotoksisiteye ve anormal ekstrasinaptik sinyalleşmeye ve sinaptik işlev bozukluğuna ve ardından sinaptoz, nöronal ölüm ve davranışsal değişikliklere yol açmaktadır.²⁶¹

Birkaç çalışma hem yaşlanma hem de AH'da beyin dokusunda GLT-1 ekspresyonunun azaldığını bildirmiştir. Ayrıca, Aβ'nin astrosit glutamat alımını doğrudan bozduğu ve GLT-1'in yüzey ifadesini azalttığı gösterilmiştir. Çalışmalar ayrıca, AH'nin APP/PS1 fare modelinde GLT-1 ekspresyonunun azaltılmasının bilişsel işlev bozukluğunu şiddetlendirdiğini ve astrositik veya nöronal GLT-1'in silinmesinin bilişsel bozukluklara yol açtığını göstermiştir.²⁵⁸

Sinaptik aralık glutamat seviye yüksekliğinin AH'da önemli bir patoloji olması, glutamatı ortamdan uzaklaştırabilen taşıyıcılardan biri olan GLT-1 seviyelerinin upregölle edilmesinin, AH'nin tedavisi için umut verici olabileceği düşünölmektedir.

İn-vivo voltametri ve mikrodializ nörotransmitter seviyelerini yaşayan sıçanlarda ölçebilmek için kullanılan önemli yöntemlerden biridir. Mikrodializ çalışmalarında kullanılan kanül boyutu yaklaşık 300 µm çapındadır. Bu boyut beyinde bulunan hücresel yapılara ve kılcal kan damarlarına göre oldukça büyüktür. Prob büyüklüğünün beyin dokusunda oluşturduğu hasarın dokuda yaralanma benzeri tablo oluşturduğu ve bu yaralanma sonucu nörotransmitter seviyelerinde değişikliklere sebep olduğu yapılan bir çalışmada belirlenmiştir.^{262,263} Mikrodializ yöntemi pikomolar düzeyindeki ölçüm kabiliyetleriyle avantajlı olmalarıyla beraber nanomolar seviyesinde bulunan nörotransmitterlerin ölçümünde herhangi bir avantaj sağlamamaktadır. Mikrodializ problemleri deney başlangıcından daha önce yerleştirilmeli ve belirli bir bekleme süresinin geçmesi deneye başlanması için beklenmelidir. Örnek analiz süresi voltametri yöntemine kıyasla çok daha uzundur (1-20 dk).²⁶³⁻²⁶⁵

İn-vivo voltametri yönteminde ise mikroelettrot boyutları oldukça küçük olmasıyla birlikte çevre dokuya verdiği hasar bu özelliklerinden dolayı yok sayılabilecek derecede azdır. Bu durum hasarın sebep olduğu nörotransmitter salınımını minimize eder. Mikroelettrotlar üzerlerine kaplanan bariyerler aracılı ölçüm yapan akım iletici araçlardır. Bu yöntemin kısıtlayan unsuru tek seferde tek bir analit ölçümü yapılmasına karşın mikrodializ yönteminde elde edilemeyen nörotransmitter geri alım süreleri gibi verilerin elde edilmesini sağlar ve ölçüm anlık olarak sağlanmaktadır. Geri alım süresi hakkında yapılan bu çalışma için oldukça önemli bir yer taşımaktadır.

Çalışmamızda GLT-1 ekspresyonunu arttırdığı başka bir çalışma tarafınca kanıtlanmış AMP kullanılmıştır.²⁰⁰ AMP ilacı verilen grupta glutamat geri alım sürelerinin kontrol grubuna yaklaşması hem bu veriyi kanıtlayacak düzeyde bir destekleyici veri olurken hem de ortamdan GLT'nin uzaklaştırılmasının AH için önemli bir parametre olduğunu göstermektedir. Bu çalışmamızda in-vivo voltametri ile elde

ettiğimiz glutamat geri alım değerleri, LC-MS/MS vasıtasıyla da bu çalışmada konfirme edilmiştir.

Yapılan davranış testleri incelendiğinde, pasif sakınma testi için bazal ölçümler değerlendirildiğinde tüm sıçanlarda benzer geçiş süreleri hem birinci hem de ikinci günde gözlemlenmiştir (Şekil 4.7, Şekil 4.8). Bazal ölçümler sonucunda tüm grupların pasif sakınma durumunu öğrendiği düşünülmektedir. Tedavi sonrası ölçümlerde STZ grubu karanlık ortama geçiş süreleri her iki günde de benzer şekilde diğer gruplara göre anlamlı derecede kısa olduğu gözlenmiştir. Tedavi grupları olan STZ + AMP ve STZ + MEM gruplarında karanlık ortama geçiş süresinin kontrol değerlerine yaklaştığı gözlemlenmektedir. Daha önce yapılan bir literatür çalışmasında da benzer şekilde STZ ile indüklenen AH modelinde benzer şekilde karanlık ortama geçiş süresinin STZ grubunda düştüğü görülmektedir.²⁶⁶ Elde edilen bu veri ışığında STZ + AMP grubunun AH üzerinde etkinliği olduğu ve bu etkinin artan GLT-1 ekspresyonu artışı sebebiyle glutamatın ortamdan uzaklaşmasının hızlanması aracılığıyla olduğu düşünülebilir.¹⁹⁴

Aynı zamanda Morris su labirenti testinde tedavi sonrası yapılan testlerden elde edilen sonuçlar gün gün ele alındığında ilk günden son güne yaklaşıldığında STZ grubunda anlamlı bir değişim gözlenemezken STZ + AMP grubunda anlamlı farklılığın gözlenmesi pasif sakınma testinden elde edilen sonucu kanıtlar niteliktedir (Şekil 4.13-4.16). Nitekim aynı testin kat edilen mesafe ve platformun bulunduğu kadranda bulunma süreleri dikkate alındığında tüm verilerin birbiri içerisinde korelasyon gösterdiği fark edilmektedir. Yang W. ve arkadaşlarının²⁶⁷ yaptığı STZ ile indüklenen AH modeli çalışmasında da platformu bulma sürelerinin tedavi gruplarında kontrol grubuna yaklaşıp azaldığı STZ grubunda ise platformu bulma süresinin diğer gruplara göre uzun olduğu görülmektedir. Aynı çalışmada Platformun bulunduğu kadranda geçirilen sürenin tedavi gruplarında arttığı görülmektedir. Yapılan bir başka çalışmada ise Morris su

labirenti testinde kat edilen mesafeler incelendiğinde STZ grubu kat edilen mesafesinin diğer gruplardan oldukça yüksek olduğu ve tedavi gruplarının kontrol grubuna yaklaştığı görülmüştür.²⁶⁸ Bu sonuçlar kıyaslandığında STZ + AMP grubunun AH'de etkili olduğu görülmüştür.

Davranış testlerinden lokomotor aktivite testi incelenmesinde STZ grubunda hareketliliğin azaldığı görülmektedir. Bu veri hem % stereotipik, % ambulator ve % dinlenme zamanı verileriyle ve aynı zamanda kat edilen mesafe grafiklerinden anlaşılacağı gibi Bitmap görselleri vasıtasıyla da fark edilebilir (Şekil 4.1, Şekil 4.2). Bu durumun dopamin seviyelerinin düşmesiyle bağlantılı olduğu düşünülebilir. Literatürde yer alan bilgilere göre AH'de de Parkinson hastalarında olduğu gibi dopaminerjik işlev bozukluğu görüldüğü bildirilmiştir. Bu bozukluğun sonucunda dopamin seviyeleri için her iki yönlü değişkenlikler gözlenmiş olsa da genel olarak dopamin seviyelerinin azaldığı belirtilmiştir.²⁶⁹ Nitekim deneysel Parkinson modeli oluşturulmuş sıçanlarda literatürde de benzer davranışsal değişiklikler gözlenmiştir.

Model ve tedavi uygulamalarının nörotransmitter üzerine etkileri için yapılan LC-MS/MS çalışmalarında STZ grubunda glutamat seviyelerinin arttığı ve asetilkolin ve dopamin seviyelerinin düştüğü gözlemlenmiştir. Gözlenen bu durum AH'nin doğal patofizyolojisini yansıtmaktadır.²⁷⁰ Denenen tedavi grubu olan STZ + AMP grubunda ise bu değerlerin normalleşme eğiliminde olduğu gözlenmektedir. GLT seviyelerinin azalmasının GLT-1 ekspresyonundaki artışla ilişkili olduğu düşünülebilir.²⁰⁰ STZ + AMP'nin ACh üzerindeki artış yönlü etkisinin ise ampisilinin yarı yarışmalı AChE inhibisyonuna bağlı olduğu düşünülebilir.²⁷¹

El-Shiekh ve arkadaşlarının²⁷² yaptığı bir AH çalışmasında yapılan histopatolojik incelemelerde STZ grubunda hem kortekste hem de hipokampusta kontrol grubuna göre piknotik ve dejeneratif hücre sayılarında artış gözlenmiştir. Glutamat seviye yüksekliği

sonucu oluşan nörodejenerasyon piknotik ve dejeneratif hücre varlığının artmasına sebep olmuştur. Histopatolojik bulgular incelendiğinde piknotik ve dejeneratif hücre varlığının STZ grubunda kontrole kıyasla arttığı, hedef tedavi grubunda ise klinik tedavi grubunda da olduğu gibi azaldığı gözlenmektedir (şekil 4.31). AMP'nin hücre dışı matrisin, matris metalloproteinaz (MMP-9) tarafından bozulmasını önleyerek mitokondriyal zar bütünlüğünü koruduğu ve çeşitli apoptozu indükleyen faktörlerin sitozol ve çekirdeğe translokasyonunu engellediği literatürde bildirilmiştir.²⁰² Bu yolak üzerinden elde edilen protektif etki ile AMP verilen gruplarda piknotik ve dejeneratif hücre oluşumunun engellendiği düşünülebilir.

Yapılan birkaç çalışmada A  ekspresyonları immunohistokimyasal olarak incelenmiş ve STZ ile indüklenmiş AH modelinde A  seviyelerinin arttığı gözlenmiştir.^{272,273} çalışmamızda elde edilen STZ grubundaki A  immunpozitifliği bu çalışmayla benzerlik göstermiş AMP ve MEM ile tedavi edilen gruplarda kontrol değerine yaklaştığı gözlenmiştir (şekil 4.33). Bu durum AMP'nin Alzheimer patolojisi oluşumunu yavaşlattığını d ş nd rebilir.  -laktam antibiyotiklerden seftriaksonun  -sekrataz inhibisyonu aracılı APP'nin A 42 ye dönüşümünün engellendiği literatürde bildirilmiştir.²⁷⁴ Benzer yolak üzerinden AMP'nin de bu etkiyi göstererek A  birikimini engellediği düşünülmektedir.

Başka bir çalışmada ise Tau seviyelerinin STZ ile indüklenmiş AH modelinde arttığı tespit edilmiştir.^{273,275} Bu durumun GLT-1 down-regülasyonu aracılı Tau fosforilasyonunun artışına bağlı olduğu Zumkehr ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada belirlenmiştir.²⁷⁶ İmmunohistokimyasal bulgular incelendiğinde Tau immunpozitifliğinin kontrole kıyasla STZ grubunda arttığı gözlenmiştir (şekil 4.32). Hedef tedavi sonucunda ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna yaklaştığı gözlenmiştir. A  immunpozitifliğindeki değişimlerde olduğu gibi Tau immunpozitifliği üzerinde de

patolojiyi yavaşlattığı görülmüştür. β -laktam antibiyotiklerin GLT-1 ekspresyonunu yükselterek ve kinaz (CDK-5 ve GSK-3 β) yollarının aktivasyonunu inhibe ederek, optimal Tau fosforilasyonunun korunmasına yardımcı olduğu literatürde belirtilmiştir.¹⁹⁴ Ampisilinin de diğer β -laktam antibiyotikler gibi bu yolak üzerinden etki ettiği düşünülebilir.

AChE immunpozitifliği kontrole kıyasla STZ grubunda artmışken tedavi gruplarında bu durum kontrole yaklaşarak normalize olmuştur (Şekil 4.34). Fakat AChE immunpozitifliğindeki azalmanın AMP'nin yarı yarışmalı AChE blokajıyla çeliştiği görülmektedir.²⁷¹ AChE blokajına bağlı olarak homeostazisin sağlanabilmesi için AChE seviyelerinin artması gerekmektedir. Elde edilen veriler ışığında artan ACh ve azalan AChE seviyeleri düşünüldüğünde bunun AChE inhibisyonunun yanı sıra AChE ekspresyonu üzerine etki eden bir süreç daha olduğu düşünülebilir.

Konvansiyonel mikroelettrot uçları Al₂O₃ alttaşlardan yapılmaktadır. Bu alttaş kullanılarak yapılan mikroelettrotların fiziksel dayanımı maddenin kırılabilirliğinden dolayı oldukça fazladır. Bu tezde ülkemizde ilk kez kapton tabanlı esnek mikroelettrot fabrikasyonu yapılarak bu mikroelettrotların tıbbi uygulamalarda kullanılması durumunun incelenmesi de amaçlanmıştır. Bu amaçla 4 kanallı esnek mikroelettrotların fabrikasyonu litografi ile gerçekleştirilmiş ve mikroelettrotlar paketlenerek ve mikroelettrotların fonksiyonelliği test edilmiştir. Mikroelettrotların öncelikle kapton alttaş üzerine iletken yollar yapılmış ve mikroelettrot kayıt bölgeleri L-edit programı ile maskeleri tasarlanmıştır. Elektrotlar üzerindeki akım taşıma yolları PCB üzerindeki akım taşıma yollarına tel bağlama cihazı ile altın tellerle birbirine bağlanmıştır. Daha sonra bu tellerin titreşim vb. mekanik ve kimyasal etkilerden muhafaza etmek için epoksi ile yüzeyleri kaplanmış ve ölçüme hazır hale getirilmişlerdir. Mikroelettrotların performanslarını ortaya koyabilmek için Mühendislik fakültesi Elektrik-Elektronik

Mühendisliğinde bulunan Sensör Teknolojileri Araştırma Laboratuvarında bulunan ve homemade olarak geliştirilen test sistemi ve yazılımı kullanılmıştır. Testler sonucunda hazırlanan mikroeletrotların büyük bir çoğunluğunun fonksiyonel olduğu görülmüş ancak bazı elektrotların ise cevap süresi gibi hedeflenen performans değerlerini yakalayamadığı gözlenmiştir. Bu elektronik aygıt fabrikasyonunda karşılaşılan bir durum olup aygıt üretim veriminin %80'in üzerinde olduğu görülmüştür. Testler sonucunda elde edilen analit konsantrasyonunun zamana karşı elektrot cevabını gösteren grafikden (Şekil 4.24) görüleceği üzere üretilen elektrotların her bir kanalı H_2O_2 değişimine anında tepki vermiş ve H_2O_2 konsantrasyonu ile cevap değerlerinde doğrusal değişimler olmuştur (Şekil 4.25). Ayrıca üretilen elektrotların doğrusallık değerleri (0.989) de 1'e yakındır.

Bu sonuçlar üretilen elektrotların tıbbi uygulamalar ve araştırma çalışmaları için kullanılabileceğini göstermektedir. Diğer taraftan üretilen elektrotların iyileştirilme potansiyeli vardır. Yakın gelecekte gelişen mikroeletrot üretim teknolojisiyle hastalıkların tanı ve tedavilerinde implante elektrotların kullanılabileceği düşünülebilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

AH insan ömrünün artışına bağlı olarak prevalansı gün geçtikçe artan bir hastalık olması sebebiyle gelecekte önde gelen sağlık sorunlarından biridir. Hastalığın önemine rağmen klinik tedavide kullanılan çeşitlilik ve bu tedavilerin hedef olarak farklılıkları oldukça azdır. Bu çalışmada ilk kez AH oluşturulmuş hayvanlarda denenen AMP tedavisinin temel olarak GLT-1 upregülasyonu ile eksitotoksisiteyi engelleyebileceği ve buna bağlı olarak tedaviye yeni bir yön kazandırabileceği düşünülmüştür. Yapılan bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlara göre AMP; GLT-1 upregülasyonu, olası yarı-yarışmalı AChE inhibisyonu, β -sekretaz ve MMP-9 inhibisyonu aracılığıyla AH'da davranış testlerinden elde edilen verilerde, histopatolojik ve immünohistokimyasal incelemelerde, nörotransmitter seviyelerinin anlık ve post-mortem ölçümlerinde nörodejenerasyonu engelleyebildiği gösterilmiştir. Bu veriler ışığında, AH'da GLT taşıyıcılarının önemi bir kez daha gösterilmiş olup bu taşıyıcılar üzerine ileri düzeyde araştırmaların gerekliliği anlaşılmıştır.

STZ ile indüklenen AH oluşturulmuş serbest hareket edebilen sıçanlarda ilk kez *in-vivo* voltametri tekniği kullanılmıştır. Bu yöntem sayesinde uzun dönemli voltametrik kayıtların alınabileceği kanıtlanmıştır. Bu durum hastalığın normal hayat şartlarında değişiminin incelenmesi açısından önemlidir.

Gelişen elektrot teknolojisi sayesinde hareketli organizmalarda *in-vivo* voltametri yönteminin kolaylaşacağı, hastalık seyirlerinin uzun süreli takipleriyle fizyolojik değişikliklerin daha rahat anlaşılacağı ve tedavi yaklaşımlarına yenilikler getirebileceği düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

1. Yang HD, Kim DH, Lee SB, Young LD. History of Alzheimer's Disease. *Dement Neurocogn Disord*. 2016,15(4):115-121.
2. Roda A, Serra-Mir G, Montoliu-Gaya L, Tiessler L, Villegas S. Amyloid-beta peptide and tau protein crosstalk in Alzheimer's disease. *Neural Regen Res*. 2022,17(8):1666.
3. Nichols E, Steinmetz JD, Vollset SE, et al. 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(2):e105-e125.
4. Richter RW, Richter BZoeller. Alzheimer's disease: a physician's guide to practical management. Published online 2004:479. Accessed April 18, 2022. https://books.google.com/books/about/Alzheimer_s_Disease.html?hl=tr&id=e9lrAAAAMAAJ
5. Bózzola FC, Gorelick PB, Freels S. Personality Changes in Alzheimer's Disease. *Arch Neurol*. 1992,49(3):297-300.
6. Drachman DA, Leavitt J. Human Memory and the Cholinergic System: A Relationship to Aging? *Arch Neurol*. 1974,30(2):113-121.
7. Gray SL, Anderson ML, Dublin S, et al. Cumulative Use of Strong Anticholinergics and Incident Dementia: A Prospective Cohort Study. *JAMA Intern Med*. 2015,175(3):401-407.
8. Hampel H, Mesulam MM, Cuello AC, et al. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain*. 2018,141(7):1917-1933.

9. Lipton SA. Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: Memantine and beyond. *Nature Reviews Drug Discovery* 2006 5:2. 2006,5(2):160-170.
10. Chen HSV, Pellegrini JW, Aggarwal SK, et al. Open-channel block of N-methyl-D-aspartate (NMDA) responses by memantine: therapeutic advantage against NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *Journal of Neuroscience*. 1992,12(11):4427-4436.
11. Epstein FH, Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory Amino Acids as a Final Common Pathway for Neurologic Disorders. 2010,330(9):613-622.
12. Platt SR. The role of glutamate in central nervous system health and disease – A review. *The Veterinary Journal*. 2007,173(2):278-286.
13. Gagliardi RJ. Neuroprotection, excitotoxicity and nmda antagonists. *Arq Neuropsiquiatr*. 2000,58(2 B):583-588.
14. Mody I, MacDonald JF. NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca²⁺ release. *Trends Pharmacol Sci*. 1995,16(10):356-359.
15. Koh JY, Choi DW. Effect of anticonvulsant drugs on glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *Neurology*. 1987,37(2):319-319.
16. Kim K, Lee SG, Kegelman TP, et al. Role of Excitatory Amino Acid Transporter-2 (EAAT2) and glutamate in neurodegeneration: Opportunities for developing novel therapeutics. *J Cell Physiol*. 2011,226(10):2484-2493.
17. Li S, Mallory M, Alford M, Tanaka S, Masliah E. Glutamate Transporter Alterations in Alzheimer Disease Are Possibly Associated with Abnormal APP Expression. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1997,56(8):901-911.

18. Rothstein JD, Patel S, Regan MR, et al. β -Lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* 2004 433:7021. 2005,433(7021):73-77.
19. Gao C, Liu Y, Jiang Y, Ding J, Li L. Geniposide Ameliorates Learning Memory Deficits, Reduces Tau Phosphorylation and Decreases Apoptosis via GSK3 β Pathway in Streptozotocin-Induced Alzheimer Rat Model. *Brain Pathology*. 2014,24(3):261-269.
20. Knopman DS, Amieva H, Petersen RC, et al. Alzheimer disease. *Nature Reviews Disease Primers* 2021 7:1. 2021,7(1):1-21.
21. Larson EB, Shadlen MF, Wang L, et al. Survival after Initial Diagnosis of Alzheimer Disease. *Ann Intern Med*. 2004,140(7).
22. Maurer K, Volk S, Gerbaldo H. Auguste D and Alzheimer's disease. *The Lancet*. 1997,349(9064):1546-1549.
23. Kennedy-Malone LM, Fletcher K. Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci*. 2000,2(2):163-168.
24. Stelzmann RA, Norman Schnitzlein H, Reed Murtagh F. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde." *Clin Anat*. 1995,8(6):429-431.
25. Hippus H, Neundörfer G. The discovery of Alzheimer's disease. 2022,5(1):101-108.
26. Asada T. Epidemiology of Dementia in Japan. *Neuroimaging Diagnosis for Alzheimer's Disease and Other Dementias*. Published online August 29, 2017:1-10.

27. 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. *Clinicoecon Outcomes Res.* 2018;10:13.
28. Fiest KM, Roberts JI, Maxwell CJ, et al. The Prevalence and Incidence of Dementia Due to Alzheimer's Disease: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Canadian Journal of Neurological Sciences.* 2016;43(S1):S51-S82.
29. Chan KY, Wu JJ, Liu L, et al. Epidemiology of Alzheimer's disease and other forms of dementia in China, 1990-2010: a systematic review and analysis. *Lancet.* 2013;381(9882):2016-2023.
30. Tahami Monfared AA, Byrnes MJ, White LA, Zhang Q. Alzheimer's Disease: Epidemiology and Clinical Progression. *Neurol Ther.* Published online March 14, 2022:1-17.
31. Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules.* 2020;25(24).
32. Silva MVF, Loures CDMG, Alves LCV, de Souza LC, Borges KBG, Carvalho MDG. Alzheimer's disease: risk factors and potentially protective measures. *Journal of Biomedical Science* 2019 26:1. 2019;26(1):1-11.
33. Giri M, Zhang M, Lü Y. Genes associated with Alzheimer's disease: an overview and current status. *Clin Interv Aging.* 2016;11:665-681.
34. Cacace R, Sleegers K, van Broeckhoven C. Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. *Alzheimers Dement.* 2016;12(6):733-748.

35. Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW. Review article: Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 2010;23(4):213-227.
36. Hou Y, Dan X, Babbar M, et al. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*. 2019;15(10):565-581.
37. Guerreiro R, Bras J. The age factor in Alzheimer's disease. *Genome Med*. 2015;7(1):1-3.
38. van Cauwenberghe C, van Broeckhoven C, Sleegers K. The genetic landscape of Alzheimer disease: Clinical implications and perspectives. *Genetics in Medicine*. 2016;18(5):421-430.
39. Croze ML, Zimmer L. Ozone Atmospheric Pollution and Alzheimer's Disease: From Epidemiological Facts to Molecular Mechanisms. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2018;62(2):503-522.
40. Moulton PV, Yang W. Air pollution, oxidative stress, and alzheimer's disease. *J Environ Public Health*. 2012;2012.
41. Hu N, Yu JT, Tan L, Wang YL, Sun L, Tan L. Nutrition and the risk of alzheimer's disease. *Biomed Res Int*. 2013;2013.
42. Abate G, Marziano M, Rungratanawanich W, Memo M, Uberti D. Nutrition and AGE-ing: Focusing on Alzheimer's Disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017.
43. Koyama A, Hashimoto M, Tanaka H, et al. Malnutrition in Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies, and frontotemporal lobar degeneration: Comparison using serum albumin, total protein, and hemoglobin level. *PLoS One*. 2016;11(6).
44. Adlard PA, Bush AI. Metals and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2006;10(2-3):145-163.

45. Colomina MT, Peris-Sampedro F. Aluminum and Alzheimer's Disease. *Adv Neurobiol.* 2017,18:183-197.
46. Huat TJ, Camats-Perna J, Newcombe EA, Valmas N, Kitazawa M, Medeiros R. Metal Toxicity Links to Alzheimer's Disease and Neuroinflammation. *J Mol Biol.* 2019,431(9):1843-1868.
47. Muzambi R, Bhaskaran K, Brayne C, Smeeth L, Warren-Gash C. Common bacterial infections and risk of incident cognitive decline or dementia: A systematic review protocol. *BMJ Open.* 2019,9(9).
48. Fülöp T, Itzhaki RF, Balin BJ, Miklossy J, Barron AE. Role of microbes in the development of Alzheimer's disease: State of the Art- An International Symposium Presented at the 2017 IAGG Congress in San Francisco. *Front Genet.* 2018,9(SEP).
49. Sochocka M, Zwolińska K, Leszek J. The Infectious Etiology of Alzheimer's Disease. *Curr Neuropharmacol.* 2017,15(7).
50. Santos CY, Snyder PJ, Wu WC, Zhang M, Echeverria A, Alber J. Pathophysiologic relationship between Alzheimer's disease, cerebrovascular disease, and cardiovascular risk: A review and synthesis. *Alzheimer's and Dementia: Diagnosis, Assessment and Disease Monitoring.* 2017,7:69-87.
51. Stampfer MJ. Cardiovascular disease and Alzheimer's disease: Common links. *J Intern Med.* 2006,260(3):211-223.
52. de Bruijn RFAG, Ikram MA. Cardiovascular risk factors and future risk of Alzheimer's disease. *BMC Med.* 2014,12(1).

53. Anjum I, Fayyaz M, Wajid A, Sohail W, Ali A. Does Obesity Increase the Risk of Dementia: A Literature Review. *Cureus*. Published online May 21, 2018.
54. Alford S, Patel D, Perakakis N, Mantzoros CS. Obesity as a risk factor for Alzheimer's disease: weighing the evidence. *Obesity Reviews*. 2018,19(2):269-280.
55. Pegueroles J, Jiménez A, Vilaplana E, et al. Obesity and Alzheimer's disease, does the obesity paradox really exist? A magnetic resonance imaging study. *Oncotarget*. 2018,9(78):34691-34698.
56. Lee HJ, Seo HI, Cha HY, Yang YJ, Kwon SH, Yang SJ. Diabetes and Alzheimer's Disease: Mechanisms and Nutritional Aspects. *Clin Nutr Res*. 2018,7(4):229.
57. Kang S, Lee YH, Lee JE. Metabolism-centric overview of the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Yonsei Med J*. 2017,58(3):479-488.
58. Mucke L. Neuroscience: Alzheimer's disease. *Nature*. 2009,461(7266):895-897.
59. Müller UC, Deller T, Korte M. Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nat Rev Neurosci*. 2017,18(5):281-298.
60. Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2010,362(4):329-344.
61. Zhang YW, Thompson R, Zhang H, Xu H. APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain*. 2011,4(1):3.
62. Gupta A, Goyal R. Amyloid beta plaque: a culprit for neurodegeneration. *Acta Neurol Belg*. 2016,116(4):445-450.

63. Zhang H, Ma Q, Zhang YW, Xu H. Proteolytic processing of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein. *J Neurochem*. 2012,120(Suppl 1):9-21.
64. Näslund J, Haroutunian V, Mohs R, et al. Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA*. 2000,283(12):1571-1577.
65. Martorana A, di Lorenzo F, Belli L, et al. Cerebrospinal fluid Abeta42 levels: when physiological become pathological state. *CNS Neurosci Ther*. 2015,21(12):921-925.
66. Lee SJC, Nam E, Lee HJ, Savelieff MG, Lim MH. Towards an understanding of amyloid-beta oligomers: characterization, toxicity mechanisms, and inhibitors. *Chem Soc Rev*. 2017,46(2):310-323.
67. Blurton-Jones M, LaFerla F. Pathways by which Abeta facilitates tau pathology. *Curr Alzheimer Res*. 2006,3(5):437-448.
68. Kovacs GG. Invited review: neuropathology of tauopathies: principles and practice. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2015,41(1):3-23. d
69. Khan SS, Bloom GS. Tau: The Center of a Signaling Nexus in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci*. 2016,10(FEB).
70. Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, et al. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2012,71(5):362-381.
71. David R, Zeitzer J, Friedman L, et al. Non-pharmacologic management of sleep disturbance in Alzheimer's disease. *The journal of nutrition, health & aging* 2010 14:3. 2010,14(3):203-206.

72. Lee DR, Thomas AJ. Sleep in dementia and caregiving – assessment and treatment implications: a review. *Int Psychogeriatr*. 2011;23(2):190-201.
73. McCurry SM, Pike KC, Vitiello M v., Logsdon RG, Teri L. Factors Associated with Concordance and Variability of Sleep Quality in Persons with Alzheimer's Disease and their Caregivers. *Sleep*. 2008;31(5):741-748.
74. Most EIS, Scheltens P, van Someren EJW. Prevention of depression and sleep disturbances in elderly with memory-problems by activation of the biological clock with light - a randomized clinical trial. *Trials*. 2010;11(1):1-9.
75. Burns A, Allen H, Tomenson B, Duignan D, Byrne J. Bright light therapy for agitation in dementia: a randomized controlled trial. *Int Psychogeriatr*. 2009;21(4):711-721.
76. Fiorentino L, Martin JL. Awake at 4 a.m.: treatment of insomnia with early morning awakenings among older adults. *J Clin Psychol*. 2010;66(11):1161-1174.
77. Lyketsos CG, Lopez O, Jones B, Fitzpatrick AL, Breitner J, Dekosky S. Prevalence of Neuropsychiatric Symptoms in Dementia and Mild Cognitive Impairment: Results From the Cardiovascular Health Study. *JAMA*. 2002;288(12):1475-1483.
78. Ownby RL. Citalopram versus risperidone for behavioral problems in dementia - PubMed. *Curr Psychiatry Rep*. 2008;1(10):8-9.
79. Starkstein SE, Ingram L, Garau ML, Mizrahi R. On the overlap between apathy and depression in dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005;76(8):1070-1074.

80. Olin JT, Schneider LS, Katz IR, et al. Provisional Diagnostic Criteria for Depression of Alzheimer Disease. *The American Journal of Geriatric Psychiatry*. 2002,10(2):125-128.
81. Zubenko GS, Kopp U, Moossy J. Neurochemical Correlates of Major Depression in Primary Dementia. *Arch Neurol*. 1990,47(2):209-214.
82. Meynen G, Unmehopa UA, Hofman MA, Swaab DF, Hoogendijk WJG. Relation between Corticotropin-Releasing Hormone Neuron Number in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus and Depressive State in Alzheimer's Disease. *Neuroendocrinology*. 2007,85(1):37-44.
83. Steffens DC, Payne ME, Greenberg DL, et al. Hippocampal Volume and Incident Dementia in Geriatric Depression. *The American Journal of Geriatric Psychiatry*. 2002,10(1):62-71.
84. Ballard C, Psych MRC, Holmes C, et al. Psychiatric Morbidity in Dementia With Lewy Bodies: A Prospective Clinical and Neuropathological Comparative Study With Alzheimer's Disease. *Am J Psychiatry*. 1999,156:7.
85. Ballard CG, Gauthier S, Cummings JL, et al. Management of agitation and aggression associated with Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology* 2009 5:5. 2009,5(5):245-255.
86. Mega MS, Cummings JL, Fiorello T, Gornbein J. The spectrum of behavioral changes in Alzheimer's disease. *Neurology*. 1996,46(1):130-135.
87. Jonsson M, Edman Å, Lind K, Rolstad S, Sjögren M, Wallin A. Apathy is a prominent neuropsychiatric feature of radiological white-matter changes in patients with dementia. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2010,25(6):588-595.

88. Nakaaki S, Murata Y, Sato J, et al. Association between apathy/depression and executive function in patients with Alzheimer's disease. *Int Psychogeriatr*. 2008;20(5):964-975.
89. McPherson S, Fairbanks L, Tiken S, Cummings JL, Back-Madruga C. Apathy and executive function in Alzheimer's disease. *Journal of the International Neuropsychological Society*. 2002;8(3):373-381.
90. Gauthier S, Feldman H, Hecker J, et al. Efficacy of Donepezil on Behavioral Symptoms in Patients With Moderate to Severe Alzheimer's Disease. *Int Psychogeriatr*. 2002;14(4):389-404.
91. Tunnard C, Whitehead D, Hurt C, et al. Apathy and cortical atrophy in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2011;26(7):741-748.
92. Apostolova LG, Akopyan GG, Partiali N, et al. Structural Correlates of Apathy in Alzheimer's Disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2007;24(2):91-97.
93. Starkstein SE, Mizrahi R, Capizzano AA, Acion L, Brockman S, Power BD. Neuroimaging correlates of apathy and depression in Alzheimer's disease. *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*. 2009;21(3):259-265.
94. Lanctôt KL, Herrmann N, Black SE, et al. Apathy Associated with Alzheimer Disease: Use of Dextroamphetamine Challenge. *The American Journal of Geriatric Psychiatry*. 2008;16(7):551-557.
95. Lyketsos CG, Carrillo MC, Ryan JM, et al. Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*. 2011;7(5):532-539.
96. Lyketsos C. Forgotten Frontal Lobe Syndrome or "Executive Dysfunction Syndrome." *Psychosomatics*. 2004; 45(3):247-55.

- .
97. Drayton SJ, Davies K, Steinberg M, Leroi I, Rosenblatt A, Lyketsos CG. Amantadine for Executive Dysfunction Syndrome in Patients With Dementia. *Psychosomatics*. 2004,45(3):205-209.
 98. Kertesz A, Nadkarni N, Davidson W, Thomas AW. The Frontal Behavioral Inventory in the differential diagnosis of frontotemporal dementia. *Journal of the International Neuropsychological Society*. 2000,6(4):460-468.
 99. Pietrzak K, Czarnecka K, Mikiciuk-Olasik E, Szymanski P. New Perspectives of Alzheimer Disease Diagnosis – the Most Popular and Future Methods. *Med Chem*. 2018,14(1):34-43.
 100. Turner RS, Stubbs T, Davies DA, Albensi BC. Potential New Approaches for Diagnosis of Alzheimer’s Disease and Related Dementias. *Front Neurol*. 2020,11:496.
 101. Practical treatment strategies for patients with Alzheimer’s disease. *J Fam Pract*. 2007,56(12):17-23.
 102. Johnson DK, Wilkins CH, Morris JC. Accelerated Weight Loss May Precede Diagnosis in Alzheimer Disease. *Arch Neurol*. 2006,63(9):1312-1317.
 103. Buchman AS, Schneider JA, Leurgans S, Bennett DA. Physical frailty in older persons is associated with Alzheimer disease pathology. *Neurology*. 2008,71(7):499-504.
 104. Salloway S, Correia S. Alzheimer disease: time to improve its diagnosis and treatment. *Cleve Clin J Med*. 2009,76(1):49-58.

105. Galvin JE, Powlishta KK, Wilkins K, et al. Predictors of Preclinical Alzheimer Disease and Dementia: A Clinicopathologic Study. *Arch Neurol.* 2005;62(5):758-765.
106. Galvin JE, Sadowsky CH. Practical Guidelines for the Recognition and Diagnosis of Dementia. *The Journal of the American Board of Family Medicine.* 2012;25(3):367-382.
107. Mueller SG, Weiner MW, Thal LJ, et al. Ways toward an early diagnosis in Alzheimer's disease: The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI). *Alzheimer's & Dementia.* 2005;1(1):55-66.
108. Pasi M, Poggesi A, Pantoni L. The use of CT in dementia. *Int Psychogeriatr.* 2011;23(S2):S6-S12.
109. Berti V, Pupi A, Mosconi L. PET/CT in diagnosis of dementia. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1228(1):81-92.
110. Read SL, Miller BL, Mena I, Kim R, Itabashi H, Darby A. SPECT in Dementia: Clinical and Pathological Correlation. *J Am Geriatr Soc.* 1995;43(11):1243-1247.
111. Hojjati SH, Ebrahimzadeh A, Khazaei A, Babajani-Feremi A. Predicting conversion from MCI to AD by integrating rs-fMRI and structural MRI. *Comput Biol Med.* 2018;102:30-39.
112. Machulda MM, Ward HA, Borowski B, et al. Comparison of memory fMRI response among normal, MCI, and Alzheimer's patients. *Neurology.* 2003;61(4):500-506.

113. Galvin JE, Price JL, Yan Z, Morris JC, Sheline YI. Resting bold fMRI differentiates dementia with Lewy bodies vs Alzheimer disease. *Neurology*. 2011;76(21):1797-1803.
114. 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.
115. Sharma K. Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics (Review). *Mol Med Rep*. 2019;20(2):1479-1487.
116. Wang R, Reddy PH. Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2017;57(4):1041-1048.
117. Briggs R, Kennelly SP, O'Neill D. Drug treatments in Alzheimer's disease. *Clinical Medicine*. 2016;16(3):247-253.
118. Crous-Bou M, Minguillón C, Gramunt N, Molinuevo JL. Alzheimer's disease prevention: from risk factors to early intervention. *Alzheimers Res Ther*. 2017;9(1).
119. Anand P, Singh B. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Archives of Pharmacal Research* 2013 36:4. 2013;36(4):375-399.
120. Crismon ML. Tacrine: First drug approved for alzheimer's disease. *Annals of Pharmacotherapy*. 1994;28(6):744-751.
121. Qizilbash N, Birks J, Lopez Arrieta J, Lewington S, Szeto S. Tacrine for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2000;2:CD000202.

122. Cacabelos R. Donepezil in Alzheimer's disease: From conventional trials to pharmacogenetics. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2007,3(3):303-333.
123. Asiri YA, Mostafa GAE. Donepezil. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol.* 2021,35:117-150.
124. Dooley M, Lamb HM. Donepezil: a review of its use in Alzheimer's disease. *Drugs Aging.* 2000,16(3):199-226.
125. Annicchiarico R, Federici A, Pettenati C, Caltagirone C. Rivastigmine in Alzheimer's disease: Cognitive function and quality of life. *Ther Clin Risk Manag.* 2007,3(6):1113-1123.
126. Müller T. Rivastigmine in the treatment of patients with Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2007,3(2):211-218.
127. Khoury R, Rajamanickam J, Grossberg GT. An update on the safety of current therapies for Alzheimer's disease: focus on rivastigmine. *Ther Adv Drug Saf.* 2018,9(3):171-178.
128. Birks J, Evans JG, Iakovidou V, Tsolaki M. Rivastigmine for Alzheimer's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2009,2015(9):CD001191.
129. Scott LJ, Goa KL. Galantamine: a review of its use in Alzheimer's disease. *Drugs.* 2000,60(5):1095-1122.
130. Prvulovic D, Hampel H, Pantel J. Galantamine for Alzheimer's disease. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2010,6(3):345-354.
131. Kim JK, Park SU. Pharmacological aspects of galantamine for the treatment of Alzheimer's disease. *EXCLI J.* 2017,16:35-49.

132. Wahba SMR, Darwish AS, Kamal SM. Ceria-containing uncoated and coated hydroxyapatite-based galantamine nanocomposites for formidable treatment of Alzheimer's disease in ovariectomized albino-rat model. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016;65:151-163.
133. Liu J, Chang L, Song Y, Li H, Wu Y. The Role of NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci*. 2019;13:43.
134. Huang YJ, Lin CH, Lane HY, E. Tsaid G. NMDA Neurotransmission Dysfunction in Behavioral and Psychological Symptoms of Alzheimer's Disease. *Curr Neuroparmacol*. 2012;10(3):272-285.
135. Companys-Aleman J, Turcu AL, Bellver-Sanchis A, et al. A Novel NMDA Receptor Antagonist Protects against Cognitive Decline Presented by Senescent Mice. *Pharmaceutics*. 2020;12(3):284-301.
136. Williams BS, Buvanendran A. Memantine. *The Essence of Analgesia and Analgesics*. Published online September 14, 2021:319-321.
137. Folch J, Busquets O, Etcheto M, et al. Memantine for the Treatment of Dementia: A Review on its Current and Future Applications. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2018;62(3):1223-1240.
138. Pellerin L, Magistretti PJ. Neuroenergetics: calling upon astrocytes to satisfy hungry neurons. *Neuroscientist*. 2004;10(1):53-62.
139. Shen J, Petersen KF, Behar KL, et al. Determination of the rate of the glutamate/glutamine cycle in the human brain by in vivo ¹³C NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(14):8235-8240.

140. Takamori S. VGLUTs: “exciting” times for glutamatergic research? *Neurosci Res.* 2006,55(4):343-351.
141. Fremeau RT, Voglmaier S, Seal RP, Edwards RH. VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. *Trends Neurosci.* 2004,27(2):98-103.
142. Bezzi P, Gundersen V, Galbete JL, et al. Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci.* 2004,7(6):613-620.
143. Montana V, Ni Y, Sunjara V, Hua X, Parpura V. Vesicular Glutamate Transporter-Dependent Glutamate Release from Astrocytes. *The Journal of Neuroscience.* 2004,24(11):2633-2642.
144. Xu J, Kurup P, Zhang Y, et al. Extrasynaptic NMDA Receptors Couple Preferentially to Excitotoxicity via Calpain-Mediated Cleavage of STEP. *The Journal of Neuroscience.* 2009,29(29):9330-9343.
145. Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci.* 2002,5(5):405-414.
146. Ivanov A, Pellegrino C, Rama S, et al. Opposing role of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in regulation of the extracellular signal-regulated kinases (ERK) activity in cultured rat hippocampal neurons. *J Physiol.* 2006,572(Pt 3):789-798.

147. Léveillé F, Gaamouch F el, Gouix E, et al. Neuronal viability is controlled by a functional relation between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors. *FASEB J.* 2008,22(12):4258-4271.
148. Vanhoutte P, Bading H. Opposing roles of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in neuronal calcium signalling and BDNF gene regulation. *Curr Opin Neurobiol.* 2003,13(3):366-371.
149. O'Shea RD. Roles and regulation of glutamate transporters in the central nervous system. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2002,29(11):1018-1023.
150. Zheng K, Scimemi A, Rusakov DA. Receptor Actions of Synaptically Released Glutamate: The Role of Transporters on the Scale from Nanometers to Microns. *Biophys J.* 2008,95(10):4584-4596.
151. Erecińska M, Silver IA. Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Prog Neurobiol.* 1990,35(4):245-296.
152. Niciu MJ, Kelmendi B, Sanacora G. Overview of Glutamatergic Neurotransmission in the Nervous System. *Pharmacol Biochem Behav.* 2012,100(4):656-664.
153. Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell.* 1996,87(7):1327-1338.
154. Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron.* 1994,12(3):529-540.

155. Nakanishi S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science*. 1992,258(5082):597-603.
156. Andersson O, Stenqvist A, Attersand A, von Euler G. Nucleotide sequence, genomic organization, and chromosomal localization of genes encoding the human NMDA receptor subunits NR3A and NR3B. *Genomics*. 2001,78(3):178-184.
157. Das S, Sasaki YF, Rothe T, et al. Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature*. 1998,393(6683):377-381.
158. Henson MA, Roberts AC, Salimi K, et al. Developmental Regulation of the NMDA Receptor Subunits, NR3A and NR1, in Human Prefrontal Cortex. *Cerebral Cortex (New York, NY)*. 2008,18(11):2560-2573.
159. Chatterton JE, Awobuluyi M, Premkumar LS, et al. Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature*. 2002,415(6873):793-798.
160. Matsuda K, Fletcher M, Kamiya Y, Yuzaki M. Specific Assembly with the NMDA Receptor 3B Subunit Controls Surface Expression and Calcium Permeability of NMDA Receptors. *The Journal of Neuroscience*. 2003,23(31):10064-10073.
161. Matsuda K, Kamiya Y, Matsuda S, Yuzaki M. Cloning and characterization of a novel NMDA receptor subunit NR3B: a dominant subunit that reduces calcium permeability. *Brain Res Mol Brain Res*. 2002,100(1-2):43-52.

162. Nishi M, Hinds H, Lu HP, Kawata M, Hayashi Y. Motoneuron-Specific Expression of NR3B, a Novel NMDA-Type Glutamate Receptor Subunit That Works in a Dominant-Negative Manner. *The Journal of Neuroscience*. 2001,21(23):RC185.
163. Bendel O, Meijer B, Hurd Y, von Euler G. Cloning and expression of the human NMDA receptor subunit NR3B in the adult human hippocampus. *Neurosci Lett*. 2005,377(1):31-36.
164. Mayer ML. Glutamate receptor ion channels. *Curr Opin Neurobiol*. 2005,15(3 SPEC. ISS.):282-288.
165. Kleckner NW, Dingledine R. Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science*. 1988,241(4867):835-837.
166. Palmer CL, Cotton L, Henley JM. The Molecular Pharmacology and Cell Biology of α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid Receptors. *Pharmacol Rev*. 2005,57(2):253-277.
167. Alt A, Weiss B, Ogden AM, et al. Pharmacological characterization of glutamatergic agonists and antagonists at recombinant human homomeric and heteromeric kainate receptors in vitro. *Neuropharmacology*. 2004,46(6):793-806.
168. Herb A, Burnashev N, Werner P, Sakmann B, Wisden W, Seeburg PH. The KA-2 subunit of excitatory amino acid receptors shows widespread expression in brain and forms ion channels with distantly related subunits. *Neuron*. 1992,8(4):775-785.

169. Howe JR. Homomeric and heteromeric ion channels formed from the kainate-type subunits GluR6 and KA2 have very small, but different, unitary conductances. *J Neurophysiol.* 1996,76(1):510-519.
170. Choi DW. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *The Journal of Neuroscience.* 1987,7(2):369-379.
171. Choi DW, Koh -y. J, Peters S. Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. *The Journal of Neuroscience.* 1988,8(1):185-196.
172. Koh J young, Choi DW. Selective blockade of non-NMDA receptors does not block rapidly triggered glutamate-induced neuronal death. *Brain Res.* 1991,548(1-2):318-321.
173. Tymianski M, Charlton MP, Carlen PL, Tator CH. Source specificity of early calcium neurotoxicity in cultured embryonic spinal neurons. *The Journal of Neuroscience.* 1993,13(5):2085-2104.
174. Choi DW. Excitotoxic cell death. *J Neurobiol.* 1992,23(9):1261-1276.
175. Danysz W, Parsons CG, Möbius HJö, Stöffler A, Quack Gü. Neuroprotective and symptomatological action of memantine relevant for Alzheimer's disease--a unified glutamatergic hypothesis on the mechanism of action. *Neurotox Res.* 2000,2(2-3):85-97.
176. Danysz W, Parsons CG. The NMDA receptor antagonist memantine as a symptomatological and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease: preclinical evidence. *Int J Geriatr Psychiatry.* 2003,18(Suppl 1):23-32.

177. Choi DW. Methods for antagonizing glutamate neurotoxicity. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 1990,2(2):105-147.
178. Siman R, Carl Noszek J. Excitatory amino acids activate calpain I and induce structural protein breakdown in vivo. *Neuron.* 1988,1(4):279-287.
179. Lazarewicz JW, Wroblewski JT, Costa E. N-Methyl-d-Aspartate-Sensitive Glutamate Receptors Induce Calcium-Mediated Arachidonic Acid Release in Primary Cultures of Cerebellar Granule Cells. *J Neurochem.* 1990,55(6):1875-1881.
180. Chan PH, Fishman RA. Brain Edema: Induction in Cortical Slices by Polyunsaturated Fatty Acids. *Science (1979).* 1978,201(4353):358-360.
181. Lee VMY, Balin BJ, Otvos L, Trojanowski JQ. A68: a Major Subunit of Paired Helical Filaments and Derivatized Forms of Normal Tau. *Science (1979).* 1991,251(4994):675-678.
182. Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I, Rydel RE. beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *Journal of Neuroscience.* 1992,12(2):376-389.
183. Strijbos PJLM, Leach MJ, Garthwaite J. Vicious Cycle Involving Na⁺ Channels, Glutamate Release, and NMDA Receptors Mediates Delayed Neurodegeneration through Nitric Oxide Formation. *Journal of Neuroscience.* 1996,16(16):5004-5013.
184. Hynd MR, Scott HL, Dodd PR. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 2004,45(5):583-595.

185. Wenk GL. Neuropathologic changes in Alzheimer's disease: potential targets for treatment - PubMed. *J Clin Psychiatry*. 2006,67(3):3-7.
186. Masliah E, Alford M, DeTeresa R, Mallory M, Hansen L. Deficient glutamate transport is associated with neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1996,40(5):759-766.
187. Li S, Mallory M, Alford M, Tanaka S, Masliah E. Glutamate transporter alterations in Alzheimer disease are possibly associated with abnormal APP expression. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1997,56(8):901-911.
188. Kirvell SL, Esiri M, Francis PT. Down-regulation of vesicular glutamate transporters precedes cell loss and pathology in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2006,98(3):939-950.
189. Scott HA, Gebhardt FM, Mitrovic AD, Vandenberg RJ, Dodd PR. Glutamate transporter variants reduce glutamate uptake in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2011,32(3):553.e1-553.e11.
190. Arias C, Arrieta I, Tapia R. beta-Amyloid peptide fragment 25-35 potentiates the calcium-dependent release of excitatory amino acids from depolarized hippocampal slices. *J Neurosci Res*. 1995,41(4):561-566.
191. Parpura-Gill A, Beitz D, Uemura E. The inhibitory effects of beta-amyloid on glutamate and glucose uptakes by cultured astrocytes. *Brain Res*. 1997,754(1-2):65-71.
192. Fernández-Tomé P, Brera B, Arévalo MA, de Ceballos ML. Beta-amyloid25-35 inhibits glutamate uptake in cultured neurons and astrocytes: modulation of uptake as a survival mechanism. *Neurobiol Dis*. 2004,15(3):580-589.

193. Bush K, Bradford PA. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016,6(8):a025247.
194. Kumari S, Deshmukh R. β -lactam antibiotics to tame down molecular pathways of Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol.* 2021,895:173877.
195. Feng Q, Luo Y, Zhang XN, et al. MAPT/Tau accumulation represses autophagy flux by disrupting IST1-regulated ESCRT-III complex formation: a vicious cycle in Alzheimer neurodegeneration. *Autophagy.* 2020,16(4):641-658.
196. Smaga I, Fierro D, Mesa J, Filip M, Knackstedt LA. Molecular changes evoked by the beta-lactam antibiotic ceftriaxone across rodent models of substance use disorder and neurological disease. *Neurosci Biobehav Rev.* 2020,115:116-130.
197. Dhavan R, Tsai LH. A decade of CDK5. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2001 2:10. 2001,2(10):749-759.
198. McQuade A, Blurton-Jones M. Microglia in Alzheimer's Disease: Exploring How Genetics and Phenotype Influence Risk. *J Mol Biol.* 2019,431(9):1805-1817.
199. Anggono V, Tsai LH, Götz J. Glutamate Receptors in Alzheimer's Disease: Mechanisms and Therapies. *Neural Plast.* 2016,2016.
200. Rothstein JD, Patel S, Regan MR, et al. β -Lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* 2004 433:7021. 2005,433(7021):73-77.
201. Rao PSS, Goodwani S, Bell RL, Wei Y, Boddu SHS, Sari Y. Effects of ampicillin, cefazolin and cefoperazone treatments on GLT1 expressions in the

- mesocorticolimbic system and ethanol intake in alcohol-preferring rats. *Neuroscience*. 2015,295:164-174.
202. Lee KE, Cho KO, Choi YS, Kim SY. The neuroprotective mechanism of ampicillin in a mouse model of transient forebrain ischemia. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2016,20(2):185-192.
203. Lee KE, Kim SK, Cho KO, Kim SY. Pre-ischemic Treatment with Ampicillin Reduces Neuronal Damage in the Mouse Hippocampus and Neostriatum after Transient Forebrain Ischemia. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2008,12(6):287-291.
204. Vogel FS. Needs for animal models of human diseases of the nervous system. *Am J Pathol*. 1980,101(3):201-212.
205. Hadlow WJ. Criteria for development of animal models of diseases of the nervous system. *Am J Pathol*. 1980,101(3):213-220.
206. Lecanu L, Papadopoulos V. Modeling Alzheimer's disease with non-transgenic rat models. *Alzheimers Res Ther*. 2013,5(3):17.
207. Colhoun EH, Myles LA, Rylett RJ. An attempt to produce cholinergic hypofunction in rat brain using choline mustard aziridinium ion: neurochemical and histological parameters. *Can J Neurol Sci*. 1986,13(4 Suppl):517-520.
208. Stephens PH, Tagari P, Cuello AC. Ethylcholine mustard aziridinium ion lesions of the rat cortex result in retrograde degeneration of basal forebrain cholinergic neurons: implications for animal models of neurodegenerative disease. *Neurochem Res*. 1987,12(7):613-618.

209. Nakahara N, Iga Y, Mizobe F, Kawanishi G. Effects of intracerebroventricular injection of AF64A on learning behaviors in rats. *Jpn J Pharmacol.* 1988,48(1):121-130.
210. Olney JW, Adamo NJ, Ratner A. Monosodium glutamate effects. *Science.* 1971,172(3980):294.
211. Nakamura S, Murayama N, Noshita T, Annoura H, Ohno T. Progressive brain dysfunction following intracerebroventricular infusion of beta(1-42)-amyloid peptide. *Brain Res.* 2001,912(2):128-136.
212. Lecanu L, Greeson J, Papadopoulos V. Beta-amyloid and oxidative stress jointly induce neuronal death, amyloid deposits, gliosis, and memory impairment in the rat brain. *Pharmacology.* 2006,76(1):19-33.
213. Stéphan A, Laroche S, Davis S. Generation of Aggregated β -Amyloid in the Rat Hippocampus Impairs Synaptic Transmission and Plasticity and Causes Memory Deficits. *The Journal of Neuroscience.* 2001,21(15):5703-5714.
214. Malin DH, Crothers MK, Lake JR, et al. Hippocampal injections of amyloid beta-peptide 1-40 impair subsequent one-trial/day reward learning. *Neurobiol Learn Mem.* 2001,76(2):125-137.
215. Pilcher H. Alzheimer's disease could be "type 3 diabetes." *Lancet Neurol.* 2006,5(5):388-389.
216. de La Monte SM, Tong M. Mechanisms Of Nitrosamine-Mediated Neurodegeneration: Potential Relevance To Sporadic Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease.* 2009,17(4):817-825.

217. Grünblatt E, Hoyer S, Riederer P. Gene expression profile in streptozotocin rat model for sporadic Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna)*. 2004,111(3):367-386.
218. Liu R, Feng ZY, Li D, Jin B, Lan Y, Meng LY. Recent trends in carbon-based microelectrodes as electrochemical sensors for neurotransmitter detection: A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2022,148:116541.
219. Bilimleri Enstitüsü Dergisi F, Makalesi A, Merve ACAR L. Microelectrode Fabrication for Quantitative and Qualitative Analysis of Neurotransmitters. *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. 2021,14(2):677-685.
220. Marinesco S, Dale N. *Microelectrode Biosensors*. Vol 80. (Marinesco S, Dale N, eds.). Humana Press, 2013.
221. Burmeister JJ, Moxon K, Gerhardt GA. Ceramic-based multisite microelectrodes for electrochemical recordings. *Anal Chem*. 2000,72(1):187-192.
222. Talauliker PM, Price DA, Burmeister JJ, et al. Ceramic-based microelectrode arrays: recording surface characteristics and topographical analysis. *J Neurosci Methods*. 2011,198(2):222-229.
223. 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. *Anal Chem*. 2001,1,73(5):1037-1042.
224. 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. *J Neurosci Methods*. 2002,119(2):163-171.

225. Hwan Yoon T, Jung Hwang E, Yong Shin D, et al. A Micromachined Silicon Depth Probe for Multichannel Neural Recording. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2000,47(8):1082-1088.
226. Frey O, Holtzman T, Mcnamara RM, et al. Enzyme-based choline and l-glutamate biosensor electrodes on silicon microprobe arrays. *Biosens Bioelectron.* 2010,26(2):477-484.
227. Márton G, Fekete Z, Fiáth R, et al. In Vivo Measurements With Robust Silicon-Based Multielectrode Arrays With Extreme Shaft Lengths. *IEEE Sens J.* 2013,13(9):3263-3269.
228. Yu H, Zheng N, Wang W, Wang S, Zheng X, Li Z. Electroplated nickel multielectrode microprobes with flexible parylene cable for neural recording and stimulation. *Journal of Microelectromechanical Systems.* 2013,22(5):1199-1206.
229. Sperry ZJ, Na K, Parizi SS, et al. Flexible microelectrode array for interfacing with the surface of neural ganglia. *J Neural Eng.* 2018,15(3):036027.
230. Pease RF, Chou SY. Lithography and other patterning techniques for future electronics. *Proceedings of the IEEE.* 2008,96(2):248-270.
231. Gates BD, Xu Q, Stewart M, Ryan D, Willson CG, Whitesides GM. New approaches to nanofabrication: Molding, printing, and other techniques. *Chem Rev.* 2005,105(4):1171-1196.
232. Menon R, Patel A, Gil D, Smith HI. Maskless lithography. *Materials Today.* 2005,8(2):26-33. doi:10.1016/S1369-7021(05)00699-1
233. Eaton WP, Smith JH. Micromachined pressure sensors: review and recent developments. *Smart Mater Struct.* 1997,6(5):530-542.

234. Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an Emerging Platform for Cancer Therapy. *Nano-Enabled Medical Applications*. 2020,2:751-760.
235. Pimpin A, Srituravanich W. Review on Micro- and Nanolithography Techniques and Their Applications. *Engineering Journal*. 2011,16(1):37-56.
236. Pernstich KP, Schenker M, Weibel F, Rossi A, Caseri WR. Electroless Plating of Ultrathin Films and Mirrors of Platinum Nanoparticles onto Polymers, Metals, and Ceramics. 2010,2(3):639-643.
237. Siva Vadla S, Bandyopadhyay P, John S, Ghosh P, Roy SC. TiO₂ Nanotube Arrays on Flexible Kapton Substrates for Photo-Electrochemical Solar Energy Conversion. *ACS Appl Nano Mater*. 2020,3(12):11715-11724.
238. RongYu T, WeiHua P, SanYuan C, et al. Fabrication of strongly adherent platinum black coatings on microelectrodes array. 2014,57(042402):1-10.
239. Hoyer S, Muller D, Plaschke K. Desensitization of brain insulin receptor. Effect on glucose/energy and related metabolism. *J Neural Transm Suppl*. 1994,44(44):259-268.
240. Hoyer S, Prem L, Sorbi S, Amaducci L. Stimulation of glycolytic key enzymes in cerebral cortex by insulin. *Neuroreport*. 1993,4(7):991-993.
241. Duelli R, Schröck H, Kuschinsky W, Hoyer S. Intracerebroventricular injection of streptozotocin induces discrete local changes in cerebral glucose utilization in rats. *Int J Dev Neurosci*. 1994,12(8):737-743.

242. Nitsch R, Hoyer S. Local action of the diabetogenic drug, streptozotocin, on glucose and energy metabolism in rat brain cortex. *Neurosci Lett*. 1991;128(2):199-202.
243. Hoyer S, Kyung Lee SAE, Löffler T, Schliebs R. Inhibition of the neuronal insulin receptor. An in vivo model for sporadic Alzheimer disease? *Ann N Y Acad Sci*. 2000;920:256-258.
244. Grieb P. Intracerebroventricular Streptozotocin Injections as a Model of Alzheimer's Disease: in Search of a Relevant Mechanism. *Mol Neurobiol*. 2016;53(3):1741-1752.
245. C. Correia S, X. Santos R, S. Santos M, et al. Mitochondrial abnormalities in a streptozotocin-induced rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2013;10(4):406-419.
246. Tiwari V, Kuhad A, Bishnoi M, Chopra K. Chronic treatment with tocotrienol, an isoform of vitamin E, prevents intracerebroventricular streptozotocin-induced cognitive impairment and oxidative-nitrosative stress in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2009;93(2):183-189.
247. 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(1):50-57.
248. Chen Y, Liang Z, Blanchard J, et al. A non-transgenic mouse model (icv-STZ mouse) of Alzheimer's disease: Similarities to and differences from the transgenic model (3xTg-AD mouse). *Mol Neurobiol*. 2013;47(2):711-725.

249. Frere S, Slutsky I. Alzheimer's Disease: From Firing Instability to Homeostasis Network Collapse. *Neuron*. 2018,97(1):32-58.
250. Vico Varela E, Etter G, Williams S. Excitatory-inhibitory imbalance in Alzheimer's disease and therapeutic significance. *Neurobiol Dis*. 2019,127:605-615.
251. Styr B, Slutsky I. Imbalance between firing homeostasis and synaptic plasticity drives early-phase Alzheimer's disease. *Nat Neurosci*. 2018,21(4):463-473.
252. Palop JJ, Chin J, Roberson ED, et al. Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease. *Neuron*. 2007,55(5):697-711.
253. Stolero N, Frenkel D. The dialog between neurons and microglia in Alzheimer's disease: The neurotransmitters view. *J Neurochem*. 2021,158(6):1412-1424.
254. Younger D, Murugan M, Rama Rao K v., Wu LJ, Chandra N. Microglia Receptors in Animal Models of Traumatic Brain Injury. *Mol Neurobiol*. 2019,56(7):5202-5228.
255. Zhang X, Wang D, Zhang B, Zhu J, Zhou Z, Cui L. Regulation of microglia by glutamate and its signal pathway in neurodegenerative diseases. *Drug Discov Today*. 2020,25(6):1074-1085.
256. Vélez-Fort M, Audinat E, Angulo MC. Central role of GABA in neuron-glia interactions. *Neuroscientist*. 2012,18(3):237-250.
257. Hodo TW, de Aquino MTP, Shimamoto A, Shanker A. Critical Neurotransmitters in the Neuroimmune Network. *Front Immunol*. 2020,11:1869.

258. Czapski GA, Strosznajder JB. Glutamate and GABA in Microglia-Neuron Cross-Talk in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 2021,22(21):11677.
259. Lazarewicz JW, Salinska E, Wroblewski JT. NMDA receptor-mediated arachidonic acid release in neurons: role in signal transduction and pathological aspects. *Adv Exp Med Biol.* 1992,318:73-89.
260. Dömötör E, Sipos I, Kittel A, Abbott NJ, Adam-Vizi V. The family of sodium-dependent glutamate transporters: a focus on the GLT-1/EAAT2 subtype. *Neurochem Int.* 1998,33(6):473-478.
261. Haroon E, Miller AH, Sanacora G. Inflammation, Glutamate, and Glia: A Trio of Trouble in Mood Disorders. *Neuropsychopharmacology.* 2017,42(1):193-215.
262. Clapp-Lilly KL, Roberts RC, Duffy LK, Irons KP, Hu Y, Drew KL. An ultrastructural analysis of tissue surrounding a microdialysis probe. *J Neurosci Methods.* 1999,90(2):129-142.
263. Zhou F, Zhu X, Castellani RJ, et al. Hibernation, a Model of Neuroprotection. *Am J Pathol.* 2001,158(6):2145-2151.
264. Santiago M, Westerink BHC. Characterization of the in vivo release of dopamine as recorded by different types of intracerebral microdialysis probes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1990,342(4):407-414.
265. DeBoer P, Abercrombie ED. Physiological release of striatal acetylcholine in vivo: modulation by D1 and D2 dopamine receptor subtypes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 1996,277(2):775-783.

266. Nazir S, Anwar F, Saleem U, et al. Drotaverine Inhibitor of PDE4: Reverses the Streptozotocin Induced Alzheimer's Disease in Mice. *Neurochem Res.* 2021,46(7):1814-1829.
267. 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.
268. 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. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2021,43(6):758-766.
269. Pan X, Kaminga AC, Wen SW, Wu X, Acheampong K, Liu A. Dopamine and Dopamine Receptors in Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Front Aging Neurosci.* 2019,11(11):175.
270. Francis PT. The interplay of neurotransmitters in Alzheimer's disease. *CNS Spectr.* 2005,10(11 SUPPL. 18):6-9.
271. Ahmad Tariq S, Khan H, Muhammad N, Zada Khan A, Haleemi A. Inhibition of erythrocytic actylcholinesterase by Ampicillin and Cephalexin: Possible role of uncompetitive inhibition. *Molecular & Clinical Pharmacology.* 2013,2013(1):38-43.
272. El-Shiekh RA, Ashour RM, Abd El-Haleim EA, Ahmed KA, Abdel-Sattar E. Hibiscus sabdariffa L.: A potent natural neuroprotective agent for the prevention of streptozotocin-induced Alzheimer's disease in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2020,128:110303.

273. Lu Y, Dong Y, Tucker D, et al. 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(4):1469-1484.
274. Smaga I, Fierro D, Mesa J, Filip M, Knackstedt LA. Molecular changes evoked by the beta-lactam antibiotic ceftriaxone across rodent models of substance use disorder and neurological disease. *Neurosci Biobehav Rev*. 2020,115:116-130.
275. Kamsrijai U, Wongchitrat P, Nopparat C, Satayavivad J, Govitrapong P. Melatonin attenuates streptozotocin-induced Alzheimer-like features in hyperglycemic rats. *Neurochem Int*. 2020,132:104601.
276. Zumkehr J, Rodriguez-Ortiz CJ, Cheng D, et al. Ceftriaxone ameliorates tau pathology and cognitive decline via restoration of glial glutamate transporter in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2015,36(7):2260-2271.

EKLER

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	Muhammed Sait ERTUĞRUL	
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	%3	% 35
III. Materyal ve Metot	%5	% 35
IV. Bulgular	%9	% 15
V. Tartışma	%4	% 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>		
Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı	

EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Rektörlük



Sayı : 75296309-050.01.04-E.1900280642
Konu : HADYEK Kararı.

02.10.2019

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

İlgi : 23.09.2019 tarihli ve 42190979-000-E.1900268900 sayılı belge.

İlgide kayıtlı yazınız, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 26.09.2019 tarih ve 11 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 153 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 Müdürlüğü'nün, Hayvanları Koruma Bilgi Sistemi (HAYBİS)'ne girilebilmesi için ekte sunulan "HADYEK 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 : 26.09.2019

TOPLANTI SAYISI : 11

KARAR N0 153: 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 Oluşturulmuş Serbest Hareket Edebilen Sıçanlarda İlaç Tedavilerinde Görülen Beyin Bölgelerindeki Değişikliklerin Farklı Mikroeletrot Tipleriyle Değerlendirilmesi"** isimli araştırma çalışması ile ilgili Tıp Fakültesi Dekanlığının 23.09.2019 tarih ve 42190979-000-E.1900268900 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, çalışma sonucunun Başkanlığımıza bildirilmesine, 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.

