

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FENOTİYAZİN YAPILI BİLEŞİKLERİN AMİLOİD
PREKÜRSÖR PROTEİN VE AMİLOİD BETA
PEPTİTLER ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Uzm. Bio. Melike YÜKSEL

**Biyokimya Programı
DOKTORA TEZİ**

ANKARA

2017

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FENOTİYAZİN YAPILI BİLEŞİKLERİN AMİLOİD
PREKÜRSÖR PROTEİN VE AMİLOİD BETA PEPTİTLER
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Uzm. Bio. Melike YÜKSEL

**Biyokimya Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Özden TACAL**

**ANKARA
2017**

**FENOTİYAZİN YAPILI BİLEŞİKLERİN AMİLOİD PREKÜRSÖR
PROTEİN VE AMİLOİD BETA PEPTİTLER ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Uzm. Bio. Melike YÜKSEL

Bu çalışma 05.09.2017 tarihinde jürimiz tarafından “Biyokimya Programı” nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Ediz DEMİRPENÇE
TOBB ETÜ Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya AD

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Özden TACAL
Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fak. Biyokimya AD

Üye: Prof. Dr. K. Gonca AKBULUT
Gazi Üniversitesi Tıp Fak. Fizyoloji AD

Üye: Prof. Dr. E. Pelin KELİCEN UĞUR
Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fak. Farmakoloji AD

Üye: Prof. Dr. Yasemin AKSOY
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya AD

e. tanrı
Özden
gonca
Pelin
Yasemin

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

Tarih 25 Eylül 2017

Diclehan

Prof. Dr. Diclehan ORHAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- o **Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir)

- o **Tezimin/Raporumun 25/09/2022 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)

- o **Tezimin/Raporumun.....tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

- o **Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

25/09/2017

Melike YÜKSEL

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında zgn olduğunu, Prof. Dr. Özden TACAL danışmanlığında tarafımdan retildeđini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Uzm.Bio. Melike YÜKSEL

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca değerli bilgileriyle bana yol gösteren, fikirlerimi destekleyerek çalışmalarımda beni cesaretlendiren, dürüst, akılcı, sabırlı bilim anlayışı ve pozitifliği ile bana her zaman örnek olacak çok sevgili hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Özden Tacal'a,

Tezimin özellikle hayvan deneyi çalışmalarında güler yüzlü yardımları, bilgi ve tecrübesi ile katkıda bulunan GÜTF Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. K. Gonca Akbulut'a,

Görüş, öneri ve ilgisi ile katkıda bulunan HÜTF Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Yasemin Aksoy'a,

Manevi desteğini esirgemeyen ve çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan HÜEF Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Kevser Biberoğlu'na,

Tezimin akım sitometrisi analizleri sırasında yardımları ile katkıda bulunan HÜ Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Fatima Aerts-Kaya'ya, çalışmalarım sırasında yardımcı olan HÜEF Biyokimya Anabilim Dalı araştırma görevlisi Seda Önder'e ve hayvan deneyi çalışmalarında yardımcı olan NNYÜ öğretim görevlisi Arzu Keskin-Aktan'a,

Hacettepe Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı hocalarıma ve tüm çalışma arkadaşlarıma,

Ayrıca, çalışmanın gerçekleşmesine katkılarından dolayı TÜBİTAK'a (Proje no. SBAG-113S256) ve Hacettepe Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (Proje no. TDK-2017-14607),

Çok teşekkür ederim.

Ve son olarak yaşamımın her aşamasında yanımda olan, nazımı çeken, en iyi arkadaşım canım annem Hatice Yüksel'e ve canım babam Mustafa Yüksel'e ve neşe kaynağım biricik kardeşim Meltem Yüksel'e sonsuz teşekkürler. İyi ki varsınız...

ÖZET

Yüksel, M., Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin Amiloid Prekürsör Protein ve Amiloid Beta Peptitler Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Programı Doktora Tezi, Ankara, 2017. Bu tez çalışmasında, Anabilim Dalımızda daha önce gerçekleştirilen çalışmalar ile insan eritrosit asetilkolinesterazı ile insan plazma bütirikolinesterazının inhibitörleri olduğu gösterilen iki fenotiyazin yapılı bileşiğin [(toluidin mavisi (TBO) ve tiyonin (TH)], Alzheimer hastalığının (AH) nöropatolojik belirteçleri üzerindeki etkileri, insan doğal tip APP751 ve insan doğal tip presenilin 1'i kalıcı olarak eksprese eden Çin hamster over (PS70) hücreleri ve 3xTg-AD transgenik fareler kullanılarak sandviç ELISA ve Western blot yöntemleri ile değerlendirildi. PS70 hücrelerinin, 0-15 μ M TBO veya TH ile muamele edilmesi sonucunda, hücre dışına salıverilen A β 40, A β 42 ve sAPP α düzeyleri, kontrole göre doza bağımlı olarak azaldı. TBO'nun A β peptitler üzerine olan etkisi, amiloid prekürsör protein (APP) ve β -bölge APP-kesim enzimi 1 (BACE1) ekspresyonlarındaki düşüşe bağlanırken; TH ise sadece APP ekspresyonunu azalttı. AH'nin yaşa bağımlı nöropatolojik özelliklerini taklit eden 3xTg-AD fareler, genç ve yaşlı olarak iki gruba ayrılıp, farelere 30 gün boyunca her gün intraperitoneal olarak 4 mg/kg fenotiyazin yapılı bileşik enjekte edildi. TH'nin 3xTg-AD genç farelerde APP işlenmesini etkilemediği, TBO'nun ise hem genç hem de yaşlı farelerde hipokampus dokusundaki çözünmeyen A β peptit düzeylerini anlamlı olarak azalttığı bulundu. Aynı zamanda yaşlı farelerde TBO uygulamasının, APP, BACE1 ve presenilin 1 düzeyleri ile tau hiperfosforilasyonunu etkilemediği görüldü. Bu bulgular ışığında, TH'den ziyade TBO'nun, hem kolinerjik sistem üzerinden etki etmesi hem de APP işlenmesindeki inhibe edici rolü nedeniyle, özellikle AH'nin hafif evresinde daha iyi tedavi sonuçları verebilecek potansiyel bir ilaç adayı olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer hastalığı, amiloid- β peptit, amiloid prekürsör protein, kolinesteraz inhibitörü, toluidin mavisi, tiyonin.

Destekleyen Kurumlar: TÜBİTAK (Proje no. SBAG-113S256) ve Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (Proje no. TDK-2017-14607).

ABSTRACT

Yüksel, M., Investigation of the Effects of Phenothiazine-Structured Compounds on Amyloid Precursor Protein and Amyloid Beta Peptides, Hacettepe University Institute of Health Sciences Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2017. In the present study, we aimed to investigate the effects of two phenothiazine-structured compounds [toluidine blue O (TBO) and thionine (TH)], which were found to be potent inhibitors of human erythrocyte acetylcholinesterase and human plasma butyrylcholinesterase in our previous studies, on the neuropathological hallmarks of Alzheimer's disease (AD) in Chinese hamster ovary cells stably expressing human APP 751 and presenilin 1 (PS70) and in 3xTg-AD transgenic mice by using sandwich ELISA and Western blotting. After treatment of PS70 cells with 0-15 μ M of TBO or TH, the levels of secreted A β 40, A β 42 and sAPP α were decreased in a dose-dependent manner compared with control. The effect of TBO on A β peptides was thought to be due to the lowered expression of amyloid precursor protein (APP) and β -site APP-cleaving enzyme 1 (BACE1) whereas TH reduced only APP expression. 3xTg-AD mice exhibiting age-dependent neuropathological characteristics of AD were separated into two groups as young and old mice, and those mice were intraperitoneally injected with 4 mg/kg phenothiazine-structured compound daily for 30 days. TH was found to have no effect on APP processing in young 3xTg-AD mice while TBO decreased the levels of insoluble A β peptides in the hippocampi of both young and aged mice. Besides, TBO administration did not cause any significant changes in the expression levels of APP, BACE1 and presenilin 1 in addition to tau hyperphosphorylation. Considering these findings, it was concluded that especially TBO might be a potential AD drug candidate and a better treatment in mild AD because of its inhibitory roles on cholinergic system and APP processing.

Key Words: Alzheimer's disease, amyloid- β peptides, amyloid precursor protein, cholinesterase inhibitors, toluidine blue O, thionine.

Supported by: TUBITAK (Project no. SBAG-113S256) and Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project no. TDK-2017-14607).

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Alzheimer Hastalığı	2
2.1.1. Alzheimer Hastalığının Nöropatolojisi	2
2.1.2. Alzheimer Hastalığının Klinik Özellikleri	5
2.1.3. Alzheimer Hastalığında Risk Faktörleri	5
2.2. Amiloid Prekürsör Protein	8
2.2.1. Amiloid Prekürsör Proteinin İşlenmesi	9
2.2.2. α -sekretaz	11
2.2.3. β -sekretaz	12
2.2.4. γ -sekretaz	13
2.3. A β Peptitler ve Senil Plak Oluşumu	16
2.4. Tau Proteini	17
2.5. Tau'nun Hiperfosforilasyonu ve Nörofibriler Yumak Oluşumu	18
2.6. Alzheimer Hastalığında Tedavi Stratejileri	21
2.6.1. Nörotransmitter-Temelli Yaklaşımlar	22
2.6.2. Amiloid-Temelli Yaklaşımlar	22
2.6.3. Tau-Temelli Yaklaşımlar	26
2.6.4. Diğer Yaklaşımlar	26
2.7. Kolinerjik Sistem	26

2.7.1. Kolinesterazlar	27
2.7.2. Alzheimer Hastalığında Kolinergik Sistem	29
2.8. Kolinesteraz İnhibitörleri	32
2.9. Alzheimer Hastalığının Tedavisinde Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin Kullanımı	33
2.10. Çalışmada Kullanılan Fenotiyazin Yapılı Bileşikler	35
3. GEREÇ ve YÖNTEM	38
3.1. Gereçler	38
3.1.1. Aletler	38
3.2. Yöntemler	39
3.2.1. PS70 Hücre Kültürü	39
3.2.2. Fenotiyazin Yapılı Bileşikler ile Muamele ve Hücre Lizatlarının Hazırlanması	39
3.2.3. Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkilerinin Akım Sitometri ile Değerlendirilmesi	40
3.2.4. 3xTg-AD Fareler	41
3.2.5. 3xTg-AD Farelerin Fenotiyazin Yapılı Bileşikler ile Muamelesi	42
3.2.6. 3xTg-AD Fare Beyin Dokularından Protein Ekstraksiyonu	44
3.2.7. Protein Tayini	44
3.2.8. sAPP α , A β 40 ve A β 42 Düzeylerinin ELISA ile Tayini	45
3.2.9. SDS-PAGE ve Western Blot	45
3.2.10. İstatistiksel Veri Analizi	48
4. BULGULAR	49
4.1. AH Patolojisi Gösteren Hücresel Modelde Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin Hücre Canlılığı ve Amiloid Patolojisi Üzerine Etkileri	49
4.1.1. Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin PS70 Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri	49
4.1.2. PS70 Hücrelerinde Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin A β Patolojisi Üzerine Etkileri	53
4.1.3. PS70 Hücrelerinde Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin Hücre Dışına Salınan sAPP α Üzerine Etkileri	56

4.1.4. PS70 Hücrelerinde Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin Hücre İçi Total APP Üzerine Etkileri	58
4.1.5. PS70 Hücrelerinde Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin BACE1 Üzerine Etkileri	60
4.2. 3xTg-AD Fare Modelinde Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin AH Patolojisi Üzerine Etkileri	62
4.2.1. Fenotiyazin Yapılı Bileşikler ile Muamelenin 3xTg-AD Fare Vücut Ağırlığı ve Kan Glukoz Düzeyleri Üzerine Etkisi	62
4.2.2. 8,5 Aylık 3xTg-AD Farelerde Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin Aβ Patolojisi Üzerine Etkileri	64
4.2.3. 14 Aylık 3xTg-AD Farelerde TBO'nun Aβ Patolojisi Üzerine Etkisi	66
4.2.4. 14 Aylık 3xTg-AD Farelerde TBO'nun APP, BACE1 ve PS1 Üzerine Etkileri	71
4.2.5. 14 Aylık 3xTg-AD Farelerde TBO'nun Tau Patolojisi Üzerine Etkisi	74
5. TARTIŞMA	79
5.1. Amiloid Patolojisi Gösteren Hücresel Modelde Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin Nöropatolojik Belirteçler Üzerindeki Etkileri	79
5.2. Transgenik Fare Modelinde Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin AH Nöropatolojik Belirteçler Üzerindeki Etkileri	81
5.2.1. Hafif AH Patolojisi Gösteren 3xTg-AD Farelerde Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin Nöropatolojik Belirteçler Üzerindeki Etkileri	82
5.2.2. Şiddetli AH Patolojisi Gösteren 3xTg-AD Farelerde TBO'nun Nöropatolojik Belirteçler Üzerindeki Etkisi	83
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	87
7. KAYNAKLAR	88
8. EKLER	
EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri	
EK-2: Tez Çalışması ile İlgili Bildiriler ve Yayınlar	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

Aβ	Amiloid Beta
ACh	Asetilkolin
AChE	Asetilkolinesteraz
ADAM	Disintegrin ve Metalloproteinaz Ailesi
AICD	APP Hücre İçi Bölgesi
AH	Alzheimer hastalığı
APLP	APP Benzeri Protein
APOE	Apolipoprotein E
APP	Amiloid Prekürsör Protein
BACE1	Beta-Bölge APP-Kesim Enzimi 1
BChE	Bütirilkolinesteraz
ChAT	Kolin Asetiltransferaz
ChE	Kolinesteraz
CTF	Karboksi Terminal Fragman
ER	Endoplazmik Retikulum
GABA	Gama Aminobütirik Asit
GSK-3β	Glikojen Sentaz Kinaz 3 β
MethB	Metilen Mavisi
MT	Mikrotübül
NMDA	N-Metil-D-Aspartat
NFY	Nörofibriler Yumak
PHF	Çift Sarmallı Filaman
PS/PSEN	Presenilin
sAPP	Çözünür Form APP
Ser	Serin
TBO	Toluidin Mavisi
Thr	Treonin
TGN	Trans-Golgi Ağı
TH	Tiyonin

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Alzheimerlı ilk vakanın <i>Bielschowsky</i> 'nin gümüş boyama yöntemi ile boyanmış beyin kesitleri.	2
2.2. AH'ye sahip postmortem beynin görüntüsü.	3
2.3. APP'nin ve sekretazlar ile kesim yerlerinin şematik gösterimi.	10
2.4. Sinir hücresinde APP'nin işlenmesi.	11
2.5. γ -sekretaz kompleksinin yapısı.	14
2.6. Amiloid fibril oluşumu.	16
2.7. Tau izoformlarının şematik gösterimi.	18
2.8. AH'de tau fosforilasyonu.	19
2.9. AH tedavisinde terapötik ilaçların ve hedeflerin sınıflandırılması.	21
2.10. Amiloid kaskad hipotezi tarafından önerilen AH ile sonuçlanan patolojik olayların gelişimi.	23
2.11. Sinapta kolinerjik sinir iletimi.	27
2.12. <i>Torpedo</i> AChE'nin ve insan BChE'nin üç boyutlu yapısı.	28
2.13. İleri derecede AH patolojisine sahip insan beyni korteks bölgesinde, AChE ve BChE için boyanmış plakları gösteren fotomikrograflar.	31
2.14. Hücrelerde AChE ile APP dağılımı/işlenmesi ve önerilen gen düzenlenmesi.	31
2.15. Fenotiyazinin yapısı.	33
2.16. Çalışmada kullanılan fenotiyazinlerin yapısı.	36
3.1. 3xTg-AD transgenik fareler.	41
3.2. 3xTg-AD farelerde yaşla birlikte değişen fenotip karakterizasyonu.	42
4.1. Fenotiyazin yapıları bileşiklerle muamele edilen PS70 hücrelerinin inverted mikroskop ile elde edilen görüntüleri.	50
4.2. TH'nin PS70 hücre canlılığı üzerine etkisi.	51
4.3. TBO'nun PS70 hücre canlılığı üzerine etkisi.	52
4.4. PS70 hücrelerinde TBO'nun A β peptit düzeyleri üzerine etkisi.	54
4.5. PS70 hücrelerinde TH'nin A β peptit düzeyleri üzerine etkisi.	55
4.6. Fenotiyazin yapıları bileşiklerin PS70 hücrelerinde sAPP α düzeyi üzerine etkileri.	57

4.7.	PS70 hücrelerinde fenotiyazin yapılı bileşiklerin hücre içi APP üzerine etkileri.	59
4.8.	PS70 hücrelerinde fenotiyazin yapılı bileşiklerin BACE1 üzerine etkileri.	61
4.9.	3xTg-AD farelerde fenotiyazin yapılı bileşiklerin kan glukoz düzeyleri üzerine etkileri.	63
4.10.	8,5 aylık 3xTg-AD farelerde fenotiyazin yapılı bileşiklerin hipokampus dokusundaki çözünmeyen A β patolojisi üzerine etkileri.	65
4.11.	14 aylık 3xTg-AD farelerde TBO'nun hipokampus dokusundaki çözünür A β patolojisi üzerine etkisi.	67
4.12.	14 aylık 3xTg-AD farelerde TBO'nun hipokampus dokusundaki çözünmeyen A β patolojisi üzerine etkisi.	68
4.13.	14 aylık 3xTg-AD farelerde TBO'nun korteks dokusu A β patolojisi üzerine etkisi.	70
4.14.	14 aylık 3xTg-AD farelerde TBO'nun hipokampus dokusundaki APP ve BACE1 üzerine etkileri.	72
4.15.	14 aylık 3xTg-AD farelerde TBO'nun hipokampus dokusundaki PS1 üzerine etkisi.	73
4.16.	14 aylık 3xTg-AD farelerde TBO'nun hipokampus dokusuna ait çözünür fraksiyondaki total tau üzerine etkisi.	75
4.17.	14 aylık 3xTg-AD farelerde TBO'nun hipokampus dokusuna ait çözünür fraksiyondaki tau patolojisi üzerine etkisi.	76
4.18.	14 aylık 3xTg-AD farelerde TBO'nun hipokampus dokusuna ait çözünmeyen fraksiyondaki tau patolojisi üzerine etkisi.	78
5.1.	AChE ile A β ve fosfo-tau (p-Tau) arasındaki çoklu ilişki.	86

TABLolar

Tablo		Sayfa
2.1.	AH ile ilişkili genler.	8
2.2.	AH tedavisinde kullanılan FDA tarafından onaylı kolinesteraz inhibitörleri.	32
3.1.	3xTg-AD transgenik farelerin fenotiyazin yapılı bileşiklerle muamele edilmesi.	43
3.2	Çalışmada kullanılan primer antikorlar.	47
4.1.	Fenotiyazin yapılı bileşikler ile muamele edilen 3xTg-AD farelerin uygulama öncesi ve sonrasında ölçülen vücut ağırlığı değerleri.	62

1. GİRİŞ

Alzheimer hastalığı (AH), demansın en yaygın formu olup, hala tam olarak tedavi edilemeyen nörodejeneratif bir beyin hastalığıdır. Hastalığın temel patolojik özellikleri beyinde oluşan amiloid plaklar, nörofibriler yumaklar ile hipokampus ve korteks bölgelerinde görülen sinir kaybıdır. Amiloid plaklar, amiloid prekürsor proteinin β - ve γ -sekretazlar ile ardışık olarak kesilmesi sonucu oluşan amiloid- β peptitlerin kümeleşmesi ile meydana gelirken, nörofibriler yumaklar ise hiperfosforile tau proteinin agregasyonu ile oluşmaktadır (1).

AH'ye sahip bireylerde kolinerjik nöronların sayısındaki azalma, sinir iletiminde görevli bir nörotransmitter olan asetilkolin (ACh) düzeyinin azalmasıyla bağlantılıdır (2). Bu nedenle, günümüzde resmi olarak satışta olan AH ilaçlarının çoğu kolinerjik sistemi hedef alan kolinesteraz (ChE) inhibitörlerini içermektedir (3). ChE inhibitörlerinin kullanımı ile ACh'yi hidroliz eden enzimler [asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirikolinesteraz (BChE)] inhibe edilip, azalan ACh düzeyi artırılarak kolinerjik sinir iletimindeki fonksiyon bozukluğu telafi edilmektedir (4).

Alzheimerlı beyinlerde BChE'nin AChE'ye oranı sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında; dramatik olarak değişerek 0,5'ten 11'e kadar yükselmektedir. BChE'nin fonksiyonel öneminin anlaşılmasıyla, AH tedavisinde BChE inhibisyonunun da kritik olabileceği öngörülmektedir (5). ChE inhibitörleri semptomatik tedavi sağlasa da son bulgular, bu inhibitörlerin AChE ve/veya BChE inhibitörü olmasının yanında, amiloid metabolizmasını da değiştirebildiğini göstermiştir (6, 7). Dolayısıyla günümüzde AH'yi tedavi etmeye yönelik gerçekleştirilen kolinerjik sistem temelli ilaç araştırmaları, hastalıkta gözlenen diğer patolojik özellikleri de inhibe edici etkilere sahip bileşikler üzerinde yoğunlaşmaktadır (6).

Anabilim dalımızda daha önce yapılan çalışmalarda fenotiyazin yapılı bileşiklerden toluidin mavisinin (TBO) ve tiyoninin (TH), ChE'leri nM- μ M seviyelerinde etkili bir şekilde inhibe ettiği bulunmuştur (8). Bu çalışmanın amacı, TBO ve TH'nin amiloid ve tau patolojileri üzerindeki etkilerini *in vitro* ve *in vivo* modeller kullanarak araştırmak ve bu iki bileşiğin AH'nin tedavisindeki olası rolünü belirlemektir. Çalışma, AH'nin tedavisinde kullanılacak yeni ilaç tasarımlarına katkılar sağlaması açısından önem taşımaktadır.

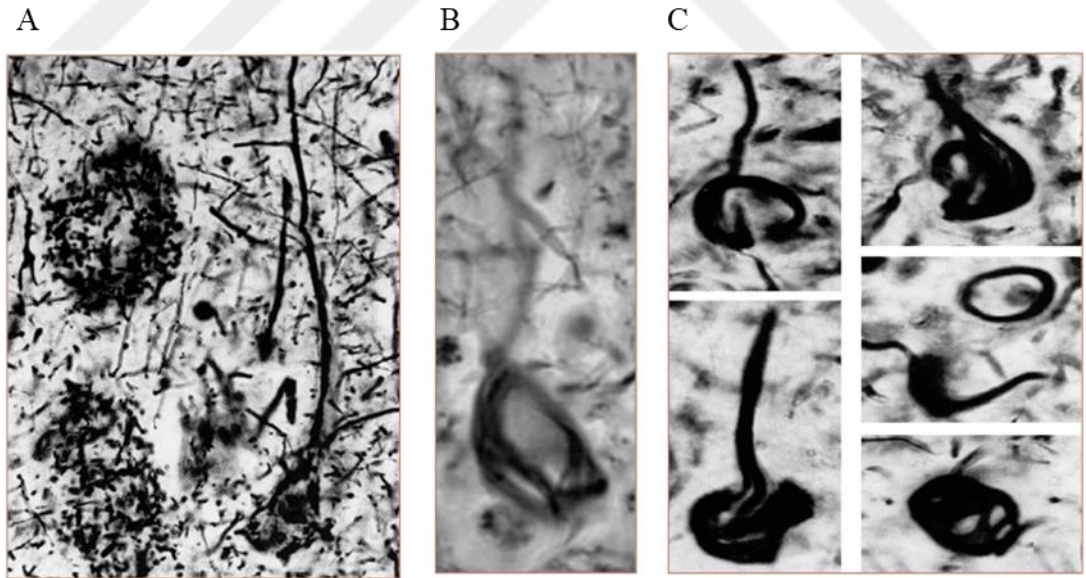
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı (AH) kronik olarak ilerleyen, hafıza ve dikkat gibi bilişsel fonksiyonlarda bozulmaya neden olan nörodejeneratif bir hastalıktır (1). Günümüzde AH yaşlılar arasında görülen demans türlerinin en yaygını olup, 2050 yılında her 85 kişiden birinin AH'ye sahip olacağı tahmin edilmektedir (9).

2.1.1. Alzheimer Hastalığının Nöropatolojisi

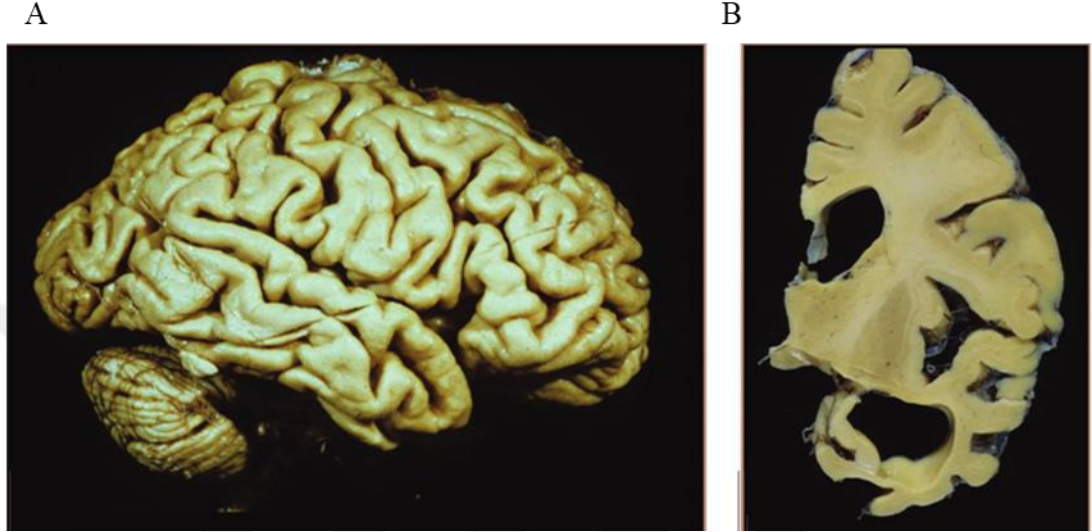
AH, ilk olarak 1907 yılında Dr. Alois Alzheimer tarafından, hafıza kaybı ve ilerlemiş bilişsel bozukluğa sahip bir vakanın incelenmesi üzerine tanımlanmıştır. Dr. Alzheimer, hastanın ölümünden sonra beyini gümüş boyama yöntemi ile görüntüleyerek, günümüzde AH'nin başlıca nöropatolojik özellikleri olarak adlandırılan amiloid plakları ve nörofibriler yumakları (NFY) rapor etmiştir (Şekil 2.1.) (10).



Şekil 2.1. Alzheimerlı ilk vakanın *Bielschowsky*'nin gümüş boyama yöntemi ile boyanmış beyin kesitleri: (A) Amiloid plaklar (B) ve (C) Nörofibriler yumaklar (11).

Alzheimer patolojisi gösteren hastaların beyinlerinde, amiloid plakların ve NFY'lerin birikmesi ile sinir hücresi kaybı arasında bir korelasyonun olduğu bilinmektedir (12). AH ilerlerledikçe, beyindeki nöronal fonksiyonların ve sinaptik

bağlantıların kaybı ve beynin farklı bölgelerindeki sinir hücresi ölümleri aşamalı olarak artmaktadır (13). Sinir kaybı hipokampal primidal bölgede %60'a, ön ve temporal neokortekste ise %80'e kadar çıkarken, beyinde serebral atrofiyle birlikte genişlemiş ventriküller gözlenmektedir (Şekil 2.2.) (14).



Şekil 2.2. AH'ye sahip postmortem beynin görüntüsü: (A) Daralmış kıvrımlar ve genişlemiş boşluklar ile orta düzeyde atrofiye sahip beynin görüntüsü (B) Hipokampus atrofisini ve ventriküler genişlemeyi gösteren koronal kesit (14).

Alzheimerlı beyinde gözlenen senil plaklar, 39-43 aminoasit uzunluğundaki amiloid beta ($A\beta$) peptit (~4 kDa) adı verilen küçük peptitlerin hücre dışında birikmesiyle oluşmaktadır (15, 16). Amiloid prekürsör proteinin (APP) sırasıyla; β - ve γ -sekretaz enzimleri tarafından kesilmesiyle oluşan $A\beta$ peptitler, öncelikle diffüz plaklar olarak toplanıp, ilerleyen evrede fibriler yapıya ve nörotik plaklara dönüşmektedir (17). Diffüz plaklar hasta olmayan bireylerde de gözlenebilirken, oluşumu prelinik lezyon olarak değerlendirilmektedir. AH sonucu gelişen nörotik plaklar, distropik akson ve dendritler ile aktive olmuş mikroglia ve reaktif astrositlerle çevrilidir (18).

NFY'ler ise mikrotübüllere (MT) bağlanan tau proteininin hiperfosforile formunu içeren çift sarmallı filamanlardan (*paired helical filament*; PHF) oluşur ve sinir hücresinin gövdesinde birikir (19). Bu yumaklar, Pick's hastalığı, progresif supranükleer palsi vb. taupatiler olarak adlandırılan başka nörodejeneratif hastalıklarda da oluşabilmektedir (20).

AH'de, amiloid plaklar ve NFY'ler gibi proteinimsi kümelerin yanında, serebral amiloid anjiopati (kongofilik amiloid anjiopati; KAA) (21), kronik inflamasyon (22), nörotransmitter sistemlerin dejenerasyonu (2) ve Lewy cisimcikleri (23) gibi diğer nöropatolojik değişimler de söz konusudur.

Alzheimerlı hastaların beyinlerinde vasküler değişimler de gözlenmektedir. AH'de yaygın olarak gözlenen (~%80) fakat önlenemez bir durum olan KAA'da A β peptitler, leptomeninks ve neokortikal damarlarda birikmektedir (14, 21). KAA'ya neden olan A β peptitlerin kaynağı tam olarak bilinmese de, bu peptitlerin sinir hücresi bileşenlerinin hücrelerarası sıvıya dağılması veya damar duvar hücreleri tarafından üretilmesi sonucu oluştuğu düşünülmektedir (14). A β peptitlerin damarlarda birikmesi, beyin dışına kan akışını azaltarak peptitlerin atılımını olumsuz olarak etkileyebilir ve beyinde daha fazla A β birikimine ve sonrasında plak oluşumuna neden olabilir (24).

Alzheimerlı beyinlerin bir diğer özelliği de kronik inflamasyon göstermeleridir. Bağışıklık sistemi bileşeni olan mikrogliya hücreleri, senil plaklarda aktif halde bulunmaktadır. Ayrıca çeşitli bağışıklık sistemi proteinlerinin düzeylerinde de artış gözlenmektedir. İnflamasyon, nörodejenerasyona verilen genel bir cevap gibi gözükse de inflamatuvar mekanizmaların AH patogenezinde önemli bir rol oynayacağına dair sağlam kanıtlar bulunmaktadır (22).

AH, özellikle kolinerjik sistemde olmak üzere nörotransmitter işlev bozukluğuyla sonuçlanmaktadır. Alzheimerlı beyinlerde, nörotransmitter asetilkolin (ACh) sentezinden sorumlu kolin asetiltransferaz (ChAT) enzimin düzeyinde azalma görülmektedir (2). Bu azalma ile hastanın beynindeki senil plakların sayısı ve bilişsel bozukluk seviyesi arasında ters orantılı bir ilişkinin olduğu bulunmuştur (25). AH'de, çoğunlukla kortekste kolinerjik sinir dağılımının kaynağı olan Meynert bazal çekirdeği olarak bilinen önbeyin bölgesindeki sinir hücreleri, sinir popülasyonunun %75'inden fazlasının kaybıyla sonuçlanan seçici bir dejenerasyona uğrar (26). Ayrıca γ -aminobütirik asit (GABA), glutamat, serotonin gibi diğer nörotransmitter sistemlerinde de sinir kaybı görülmektedir (2, 18).

2.1.2. Alzheimer Hastalığının Klinik Özellikleri

AH'nin klinik semptomları, özellikle yaşanmış son olayları içeren hafıza kaybı ve nedenselleştirme, yargılama, dil becerisi gibi bilişsel özelliklerdeki bozukluklardan oluşmaktadır. Hastalığın ilerleyen evrelerinde, hasta çok basit görevleri dahi yapamaz duruma gelebilmektedir (1). AH'de semptomların gelişimi hastadan hastaya değişse de hastalık üç evreye ayrılmıştır: Hafif, orta ve ileri. Hafif evrede, hafızanın ilk olduğu bölge olan hipokampustaki nöronların etkilenmesi sonucunda hafıza kaybı görülmektedir. Hastalığın orta evresinde, nedenselleştirmeden sorumlu korteks bölgesi etkilenir ve hastalar mantıksal düşünme yetilerini kaybeder. İleri evrede ise, başka beyin bölgeleri de olumsuz olarak etkilenir, hasta normal fizyolojik fonksiyonların çoğunda kontrol kaybı yaşar ve hastalık ölümle sonuçlanır (27). Hastalığın seyri sinsidir ve ilk teşhisten sonra ortalama yaşam süresi 5- 10 yıl olarak değişmesine rağmen hastalar 20 yıla kadar yaşayabilmektedir (28).

Gelişmiş ülkelerde, AH'ye bağlı olarak ortaya çıkan sosyal ve finansal yük, diğer hastalıklardan daha fazladır (29). Günümüzde AH ile bağlantılı bazı semptomların tedavisi için ilaçlar bulunmasına rağmen, hastalığın ilerlemesini durdurmak için herhangi bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Bu nedenle, süregelen bilimsel araştırmalarda AH, önemli bir yer tutmaktadır (30).

2.1.3. Alzheimer Hastalığında Risk Faktörleri

AH riskini arttıran faktörler değiştirilebilir ve değiştirilemez risk faktörleri olarak ikiye ayrılabilir.

Potansiyel olarak değiştirilebilir risk faktörleri yedi ana başlık altında toplanmaktadır: Diyabet, orta yaş hipertansiyonu ve obezitesi, sigara, depresyon, eğitim seviyesi ve fiziksel inaktivite. Günümüzde dünya genelindeki AH vakalarının yarısı değiştirilebilir risk faktörlerine dayandırılabilir. Bu faktörler önleyici tedavinin hedefini oluşturmaktadır (31). Avrupa (32) ve Kanada'da (33) yapılan çalışmalar, fiziksel aktivite ve bilişsel egzersiz artışının, uzun vadede demansın yaygınlığında azalmaya neden olabileceğini göstermiştir. Bunun yanında, her bir risk faktörünün yaygınlığının on yılda bir %10-20 oranında azalacağı ve bu nedenle 2050 yılı itibarıyla AH'nin dünyadaki yaygınlık oranının %8-15 oranında düşebileceği tahmin edilmektedir (31).

Diğer yandan yaş, cinsiyet, aile geçmişi, genetik faktörler vb. gibi değiştirilemez faktörler hastalığın patogenezi anlamak açısından önem arz etmektedir (34). Dünya genelinde yapılan klinik çalışmalar, AH'deki en önemli risk faktörünün yaş olduğunu göstermektedir. Hastalığın görülme sıklığı ilerleyen yaşla birlikte artarken, 65 yaşın üstünde her beş yılda bir AH riski iki katına çıkmaktadır (34). Yaş, zaman içinde amiloid plak oluşumunun patolojik sürecinin bir yansıması olarak düşünülebilir. Kişinin yaşam süreci uzadıkça, amiloid plağın birikme olasılığı fazla olup, kişide demans görülme olasılığı da artmaktadır. Ayrıca, yaşlanan beyin zamansal değişikliklere maruz kalır ve oksidatif stres, travma ve iskemik damar hastalığından kaynaklanan beyaz cevher hastalığı vb. zaman içinde oluşabilir. Sonuçta, beyindeki birikmiş zarar, yaşlı bireylerde bilişsel hasar olasılığını arttırmaktadır (34).

AH ve cinsiyet arasındaki ilişkiye bakıldığında, AH'ye yakalanma riski kadınlarda erkeklerden daha fazlayken (33, 35, 36), tam tersine, vasküler demans ise erkeklerde kadınlardan daha yaygın olarak gözlenmektedir (35, 36). Ancak cinsiyet faktörünün, kadın ve erkek arasındaki hormonal değişikliklerden mi yoksa sosyoekonomik farklılıklardan mı kaynaklandığı hala araştırılmaktadır (34).

Birinci dereceden aile bireylerinden (ebeveyn veya kardeş) birinin Alzheimer hastası olması, kişide hastalığın görülme riskini yaklaşık olarak %3,5 arttırmaktadır. İki veya daha fazla birinci dereceden akrabasının AH'ye sahip olması ise riski %7,5 seviyelerine çıkarmaktadır (37). Bir araştırma, AH'ye sahip Afrika-Amerikalı bireylerin akrabalarının hastalığa yakalanma riskinin, beyaz Amerikalı bireylere göre daha fazla olduğunu göstermiştir (38).

AH'nin oluşumunda, genetik faktörlerin önemli bir etkisi vardır. Günümüzde, AH ile bağlantısı kanıtlanan dört gen mutasyonu bulunmaktadır: *APP*, *presenilin 1* (*PSEN1*), *presenilin 2* (*PSEN2*) ve *apolipoprotein E* (*APOE*) (Tablo 2.1.) (34). AH'den etkilenen küçük bir grup (%1- %6), ilk üç genden birinde mutasyona sahiptir. Bu durum, erken başlangıçlı ailesel AH (30-60/65 yaş arası) olarak adlandırılmaktadır. *APP*, *PSEN1* veya *PSEN2* genlerinde gözlenen mutasyonlar, özellikle toksik formda olan Aβ peptit düzeylerinde artışa, dolayısıyla senil plak oluşumuna ve sonunda da sinir hücresinin ölümüne neden olmaktadır (Tablo 2.1.) (39). AH'nin en yaygın formu olan sporadik veya geç başlangıçlı AH ise daha geç yaşlarda (60-65 yaş sonrası)

görülmektedir. Henüz sporadik AH'ye neden olan bir gen kesin olarak saptanamamasına rağmen, sporadik AH ile ilişkili majör genin *APOE* olduğu düşünülmektedir. *APOE* geninin üç aleli bulunmaktadır: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$ (Tablo 2.1.). ApoE, kolesterol ve trigliseritlerin dağılımında ve metabolizmasında rol oynayan önemli bir proteindir (40). 65 yaş sonrası, ailesinde AH geçmişi bulunan bireylerde, $\epsilon 4$ allel sayısına bağlı olarak AH riski de artmaktadır (41). *APOE* $\epsilon 4$ geni taşıyan kişilerde daha fazla total kolesterol ve LDL kolesterol bulunmaktadır (42). Ayrıca, apoE $\epsilon 2$ ve apoE $\epsilon 3$ ile karşılaştırıldığında, *in vitro* sinir hücrelerine kolesterol alımının, apoE $\epsilon 4$ 'e göre daha az olduğu görülmüştür (43). *APOE* $\epsilon 4$ 'e sahip bireylerde, amiloid ve yumak patolojisinin gelişimi (44) ve mitokondriyal hasarın oluşumu (45), diğer *APOE* polimorfizmlerini taşıyanlara göre daha fazladır. Sporadik AH ile ilişkili diğer genleri tanımlamak üzere 2009 yılından bu yana gerçekleştirilen genom çapında ilişkilendirme çalışmaları ile AH riskini arttıran ABCA7, CLU, CR1, PICALM, TREM2, SORL1 vb. 20 adet civarı gen/*loci* tanımlanmıştır. Genel olarak bu genler inflamatuvar cevap, lipid metabolizması ve endositoz gibi AH'de rolü olan üç yoldan birinde yer almaktadır. Sporadik AH'de, apoE $\epsilon 4$ ve diğer genlerin yanında, yukarıda bahsedilen çevresel, diyetset ve egzersiz gibi faktörler ve/veya bu faktörlerin kombinasyonları da hastalığın başlamasında/ilerlemesinde etkilidir (46).

Tablo 2.1. AH ile ilişkili genler (34).

Gen	Kromozom	Mutant genin penetransı	Frekans	Mutasyon çeşidi	Patoloji
APP	21q21	Yüksek	Erken başlangıçlı ailesel AH'nin yaklaşık %18'ini oluşturmaktadır.	APP'nin A β kısmında yanlış anlamlı mutasyon	APP'nin işlenmesi sırasında artan A β 42 üretimi
PSEN1	14q24.3	Yüksek	Erken başlangıçlı ailesel AH'nin yaklaşık %78'ini oluşturmaktadır.	Çoğunlukla yanlış anlamlı mutasyon	A β üretimine ve birikmesine neden olan γ -sekretaz kesiminde artış
PSEN2	1q31.42	Bilinmiyor	Yaklaşık %4	Yanlış anlamlı mutasyon	A β üretimine ve birikmesine neden olan β -sekretaz kesiminde artış
ApoE	19q13.2	Risk faktörü, AH'ye neden olmak için tek başına yeterli değil.	Allel frekansı: ϵ 2- %10 ϵ 3- %70 ϵ 4- %15	Homozigot veya heterozigot ϵ 4 genotipi	A β birikimini ve plak oluşumunu arttırmak için moleküler şaperon gibi davranma

2.2. Amiloid Prekürsör Protein

1980'lerin ortasında, AH ile ilişkili amiloid plakların izole edilmesi sonucunda, plakların yaklaşık 40 aminoasit uzunluğunda A β polipeptitlerden oluştuğu (16, 47) ve A β 'nin ise daha büyük bir öncül protein olan amiloid prekürsör proteinden (APP) türediği bulundu (48). APP'nin yapısını belirlemek üzere yapılan çalışmalar sonucunda, öncül proteinin 695 aminoasit uzunluğunda olduğu ve hücre yüzeyi reseptör özelliği taşıdığı ortaya çıkarıldı (49).

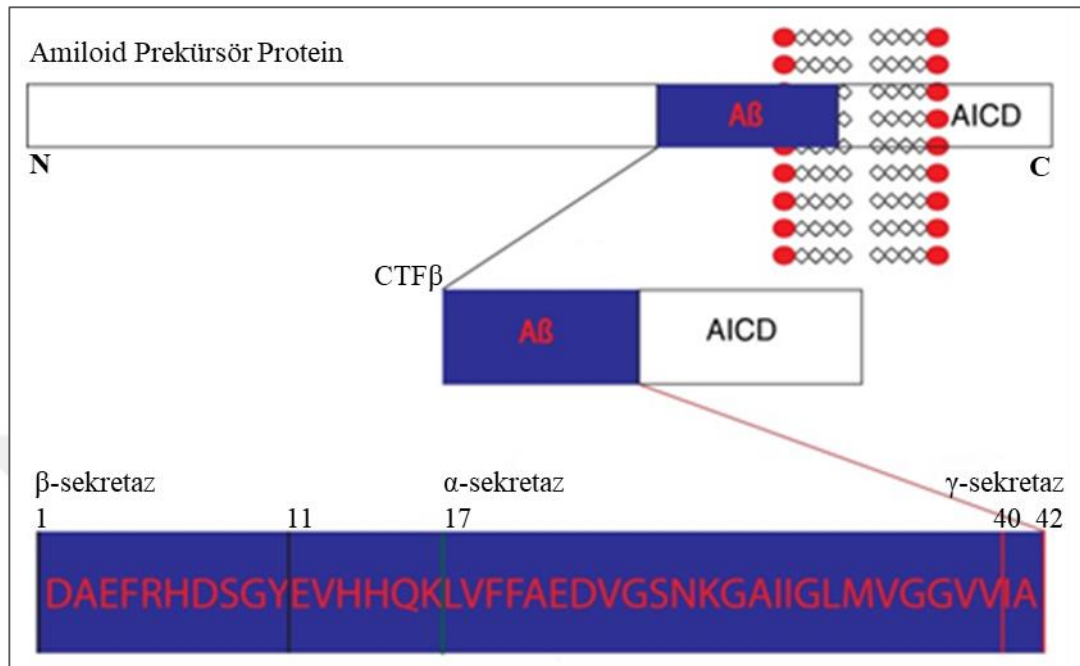
APP geni, 21. kromozomda yerleşik olup, intron bölgelerinin yanında 18 ekzon içermektedir (48). APP transkripti, alternatif *splicing* sonucunda APP695, APP751 ve APP770 (sırasıyla; 695, 751 ve 770 aminoasit uzunluğunda) olmak üzere üç majör izoformda eksprese edilmektedir. Ekzon 7 ve 8 bölgelerini içermeyen APP695 izoformu, daha çok sinir hücrelerinde eksprese edilirken (50), ekzon 8 bölgesini içermeyen APP751 ve tüm ekzon bölgelerini içeren APP770 izoformları ise birçok dokuda eksprese edilmektedir ve ayrıca kunitz proteaz inhibitör bölgesi içerirler (51).

APP, APP-benzeri protein 1 (APLP1) ve APP-benzeri protein 2 (APLP2) olmak üzere içerisinde iki homolog protein bulunan bir protein ailesinde yer almaktadır. APLP1'in ekspresyonu sadece nöron hücreleri ile kısıtlıyken, APLP2 beyin dışında APP'ye benzer şekilde ubiquitin ile konjüge olarak eksprese edilmektedir. Ailedeki proteinler E1 ve E2 bölgeleri açısından benzerlikler göstermelerine rağmen A β bölgesi sadece APP proteinine özgüdür (52). APP *knockout* fareler ile yapılan çalışmalar, farelerin kısır, kolaylıkla fark edilemeyen anormal fenotipte ve yaşayabilir olduğunu göstermiştir (53). Ancak, APP/APLP2, APLP1/APLP2 çift *knockout* veya APP/APLP1/APLP2 üçlü *knockout* fareler, doğum sonrası erken dönemde ölmektedir. İlginç şekilde, APP/APLP1 çift *knockout* fareler ise yaşamlarına devam edebilirler. Bu durum, APLP2'nin, APP veya APLP1'in fonksiyonunu yerine getirebildiğini göstermektedir (54). APP/APLP2 çift *knockout* farelerde periferik ve merkezi sinir sistemlerinde gözlenen anormal gelişimler, APP'nin sinaptik bağlantısının motor nöronların düzgün gelişimi için gerekli olduğunu göstermiştir (55). Sonuçta, APP'nin ve APLP'lerin fonksiyonları tam olarak bilinmese de, *knockout* farelerde gözlenen fonksiyon kayıpları, bu proteinlerin gelişimde önemli roller oynadığını düşündürmektedir.

2.2.1. Amiloid Prekürsör Proteinin İşlenmesi

APP, karboksil ucu hücre içine bakan ve A β bölgesi membran ile hücre dışı bölgede yerleşmiş olan, tip I transmembran proteindir (Şekil 2.3.). APP endoplazmik retikulumda (ER) sentezlenip, Golgi aygıtı boyunca trans-Golgi ağına (TGN) taşınmaktadır (56). Taşınma boyunca APP, N- ve O-bağlı glikolizasyona, hücre dışı ve hücre içi bölgelerde fosforilasyona ve tirozin sülfasyonuna maruz kalmaktadır (57). Olgunlaşmamış APP'nin yalnızca %10'u hücre yüzeyine ulaşabilir. Hücre yüzeyine

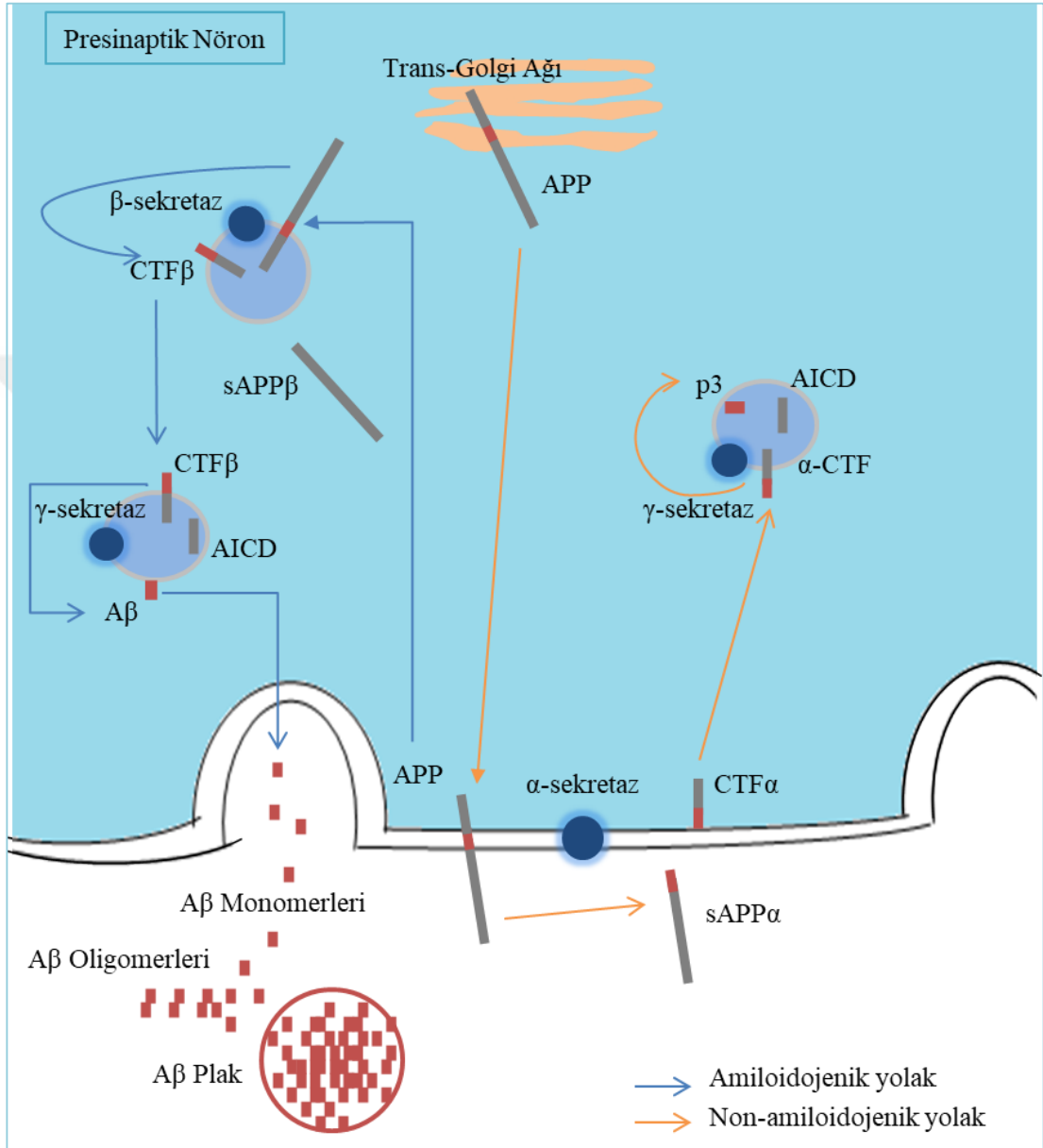
taşınan APP, aynı zamanda endozomal/lizozomal yıkılma yoluyla tekrar hücre içine alınıp lizozomlarda degrade olabilmektedir (58).



Şekil 2.3. APP'nin ve sekretazlar ile kesim yerlerinin şematik gösterimi. α -sekretaz enzimi APP'yi lümen kısmında bulunan A β bölgesi içinden keserken, β -sekretaz kesim noktası, amino ucuna yaklaşık 17 aminoasit daha yakındır. Bir sonraki aşamada, γ -sekretaz tarafından transmembran bölgeden kesim gerçekleşmektedir (17).

APP, farklı proteazları içeren iki farklı ana yolak boyunca post-translasyonel işlenmeye maruz kalmaktadır: amiloidojenik yolak ve non-amiloidojenik yolak (52). APP, TGN'den geçerek olgun forma dönüştükten sonra salgı vezikülleri ile hücre yüzeyine ulaşır. Amiloidojenik yolda APP'nin işlenmesi, hücre yüzeyinde bulunan APP'nin endozomlar aracılığıyla hücre içine alınmasıyla başlamaktadır. β -sekretaz, APP'yi vezikül içinde bulunan yerden iki bölgeye parçalamaktadır: çözünür form APP β (sAPP β) ve 99 aminoasit içeren karboksi-terminal fragmanı (CTF β veya C99). CTF β 'nın daha sonra γ -sekretaz ile kırılması aşamasında, 39-43 aminoasit uzunluğunda A β monomerlerinin oluşumu gerçekleşir. A β , ER ve Golgi/TGN'de üretilir ve salgı veziküllerinde toplanır (56). Hücre dışına salıverilen A β monomerleri, kümeleşerek oligomerlere ve ilerleyen aşamada plaklara dönüşmektedir. Amiloidojenik olmayan (non-amiloidojenik) yolda işlenme, genel olarak α -sekretaz'ın bulunduğu hücre yüzeyinde gerçekleşmektedir. Burada APP, α -sekretaz ile

kesilir ve çözünür formda olan APP α (sAPP α) ve 83 aminoasit içeren karboksiterminal fragmanı (CTF α veya C83) salıverilir. CTF α , daha sonra γ -sekretaz ile p3 ve AICD olarak iki parçaya ayrılmaktadır (Şekil 2.4.) (59).



Şekil 2.4. Sinir hücresinde APP'nin işlenmesi (56, 59).

2.2.2. α -sekretaz

α -sekretaz, APP'yi plazma membranı bölgesinden kesen membrana bağlı bir endoproteazdır (59). APP'nin α -sekretaz tarafından kesilmesi, A β peptit oluşumunu

olanaksız hale getirmektedir, çünkü enzimin kesim noktası APP'nin A β bölgesi içindeki Lys16 ve Leu17 amino asitleri arasında bulunmaktadır (15).

Disintegrin ve metalloproteinaz (ADAM) ailesine ait proteinazlardan üçü (ADAM9, ADAM10 ve ADAM17), α -sekretaz aktivitesine sahiptir (60-62). APP gibi ADAM'lar da tip I integral membran proteinleridir. Sinir hücrelerinde aşırı eksprese edilen insan ADAM10 enziminin, APP V717I mutasyonu taşıyan farelerde sAPP α üretimini arttırdığı ve A β oluşumunu azalttığı rapor edilmiştir. Ancak katalitik olarak inaktif ADAM10 içeren farelerde ise daha fazla amiloid plak oluşumu gözlenmiştir (63). ADAM9 ve ADAM17 genlerinin birlikte susturulması, sAPP α düzeyini değiştirmezken, bu genlerin aşırı eksprese edilmesi ise sAPP α düzeyini arttırmıştır. Bu bulgular, ADAM9 veya ADAM17'den daha ziyade ADAM10'un α -sekretaz aktivitesinden sorumlu olduğunu düşündürmektedir (64).

APP'nin α -sekretaz ile kesilmesi sonucu oluşan sAPP α , çözünür formda hücre dışına salıverilirken, CTF α membrana bağlıdır ve γ -sekretaz tarafından kesime uğrar. Son yıllarda yapılan çalışmalar, sAPP α 'nın nöroprotektif role sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır (65). Sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında, AH'ye sahip kişilerde sAPP α düzeyi daha düşüktür (66). AH hastalarında düşük düzeydeki sAPP α 'nın bozulan uzaysal hafıza ile ilişkili olduğu bulunmuştur (67). Ayrıca, sAPP α 'nın nörit uzamasını, sinaptogenezi ve hücre adhezyonunu desteklediği ve embriyonik ve yetişkin nöral kök hücrelerin proliferasyonunu düzenlediği rapor edilmiştir (57). *In vivo* çalışmalar, sAPP α 'nın öğrenme ve hafızayı güçlendirdiğini (68) ve APP yokluğunda anatomik, davranışsal ve elektrofizyolojik anormallikleri düzelttiğini (69) göstermiştir. Sonuç olarak, APP'nin fizyolojik fonksiyonlarının çoğunu gerçekleştiren bölgesinin hücre dışı bölge olduğu ve aynı zamanda sAPP α 'nın, APP'nin nöronal olarak en yararlı proteolitik ürünü olduğu ileri sürülmektedir (57).

2.2.3. β -sekretaz

A β oluşumundaki ilk basamak, APP'nin β -sekretaz enzimi tarafından proteolitik kesimidir. Majör β -sekretaz enzimi, Asp2 veya memapsin 2 olarak da adlandırılan β -bölge APP kesim enzimi 1 (BACE1)'dir (70).

BACE1, aktif bölgesi lümen kısmında bulunan ve tip I membran bölgesi içeren membrana bağlı bir aspartil proteazdır (70). Alternatif *splicing* sonucunda değişen

uzunluklarda BACE1 transkriptleri oluşmasına rağmen 501 aminoasit uzunluğundaki BACE1'in β -sekretaz aktivitesinin daha güçlü olduğu bulunmuştur (71). BACE1 erken Golgi, geç Golgi/erken endozom ve endozom gibi hücre kısımlarında daha yaygındır çünkü optimal aktivitesini gerçekleştirmek için asidik çevreye ihtiyaç duymaktadır (15).

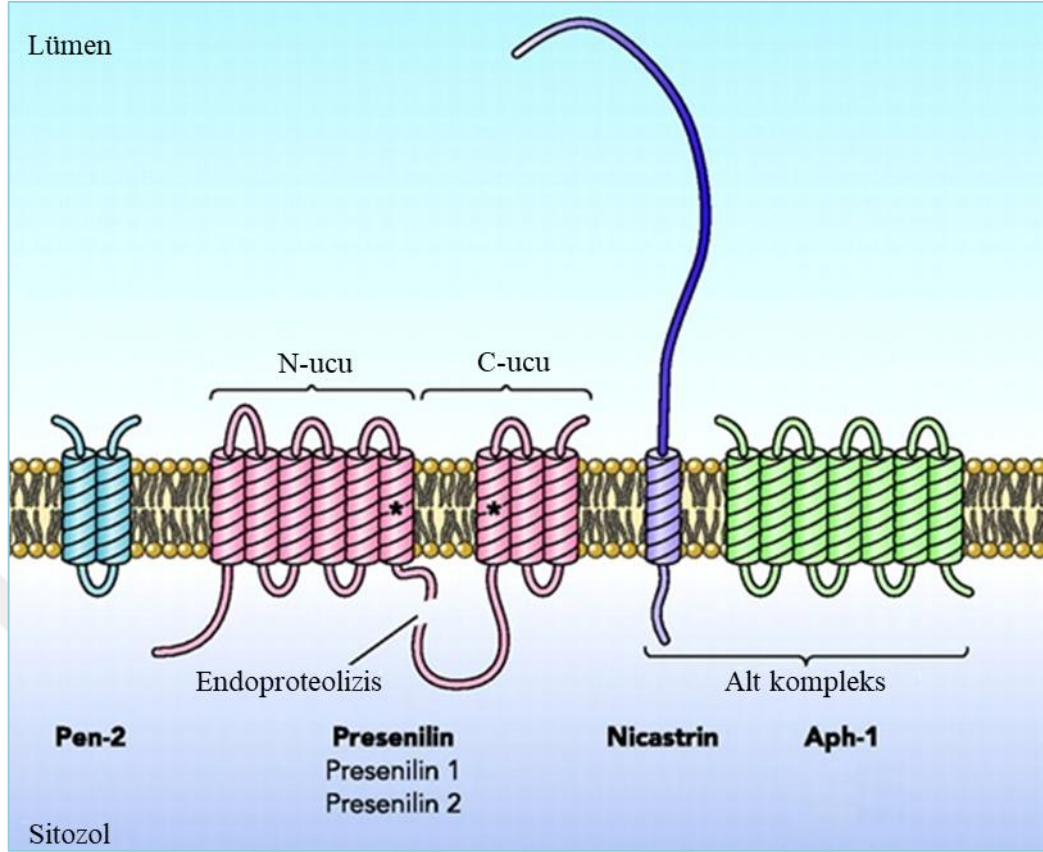
AH'ye sahip bireylerde BACE1'in ekspresyonu ve aktivitesi artmaktadır (72). BACE1 *knockout* fareler ile yapılan bir çalışmada, kontrol farelere göre A β 40 ve A β 42 düzeylerinin azaldığı, kolinerjik fonksiyon bozukluğunun, sinir hücresi kaybının ve hafıza bozukluğunun düzeldiği gözlenmiştir (73).

BACE1'in 21. kromozomda bulunan ve BACE2 olarak adlandırılan bir homoloğu bulunmaktadır (74). Beyindeki BACE2 ekspresyon düzeyi, BACE1'den daha düşüktür (75). BACE2, APP'yi α -sekretaz bölgesine yakın bir yerden daha etkili olarak kesmektedir (76).

β -sekretaz ile kesim sonrasında, APP'nin hücre dışı bölgesi sAPP β olarak salıverilirken, kalan kısım membrana bağlı CTF β 'yi oluşturmaktadır. sAPP α ve sAPP β arasında sadece 17 amino asit uzunluğunda bir fark olmasına rağmen, sAPP β , sAPP α 'nın sahip olduğu nöroprotektif etkilerden yoksundur (57). Yapılan bir çalışmada sAPP β 'nin, ölüm reseptör 6'nın (*death receptor 6*) bir ligandı olduğu ve aksonal kısalma ve nöronal hücre ölümüne neden olduğu bulunmuştur (77).

2.2.4. γ -sekretaz

APP'nin α - veya β -sekretaz ile kesimi sonrasında oluşan APP C-terminal fragmanları, daha sonra γ -sekretaz ile membran içinde işlenmektedir. γ -sekretaz, 4 ana protein biriminden [presenilin (PS1 veya PS2), presenilin enhancer 2 (PEN2), anterior pharynx-defective 1 (APH1) ve nikastrin] oluşan büyük bir proteinaz kompleksidir (Şekil 2.5) (78).



Şekil 2.5. γ -sekretaz kompleksinin yapısı (79) .

PS1, γ -sekretaz kompleksinin katalitik merkezi olarak fonksiyon görmektedir. PS1, 42-43 kDa molekül ağırlığına sahip bir polipeptit olarak sentezlenir ve post-translasyonel olgunlaşma sırasında N-terminal (27-28 kDa) ve C-terminal fragmanlarını (16-17 kDa) oluşturmak üzere 6. ve 7. transmembran bölgelerini birleştiren büyük sitoplazmik düğüm bölgesinden endoproteolitik kesime uğrar (78). Kesim sonrasında iki fragman, fonksiyonel PS heterodimeri oluşturmak için birbiriyle etkileşir (80).

γ -sekretaz kompleksi yapısında bulunan PEN2, iki ucu da lümen kısmına bakan iki transmembranlı bir saç tokası-benzeri proteindir (81). PEN2, zimojen formda bulunan PS1'i aktif proteaza çevirmektedir (82).

PS ile etkileşen nikastrin, büyük bir hücre dışı bölgeye sahip tip I membran glikoproteinidir (83). Nikastrin γ -sekretaz kompleks oluşumunda iskele protein görevi görmektedir. Glikolizasyona uğrayan olgun formdaki nikastrinin hücre dışı bölgesindeki konformasyonel değişiklik, γ -sekretaz kompleksinin oluşması için gereklidir (84). Nikastrin, ayrıca α -/ β -sekretaz aktivitesi ile oluşan APP C-terminal

fragmanlarına bağlanarak, kompleksin substrat reseptörü gibi davranabilmektedir (85).

γ -sekretaz kompleksini oluşturan bir diğer protein A Φ 1 de, multi-transmembran proteinidir. γ -sekretaz kompleksinin enzimatik aktivitesi ve trafiği için öncelikle A Φ 1 ve nikastrinden oluşan alt kompleks oluşmalıdır. Bu kompleks daha sonra PS ile etkileşir ve A Φ 1, kompleksin birleşmesinde stabilize edici iskele görevi görür. Daha sonra komplekse PEN2'nin de katılmasıyla konformasyonel aktivasyon gerçekleşir (86).

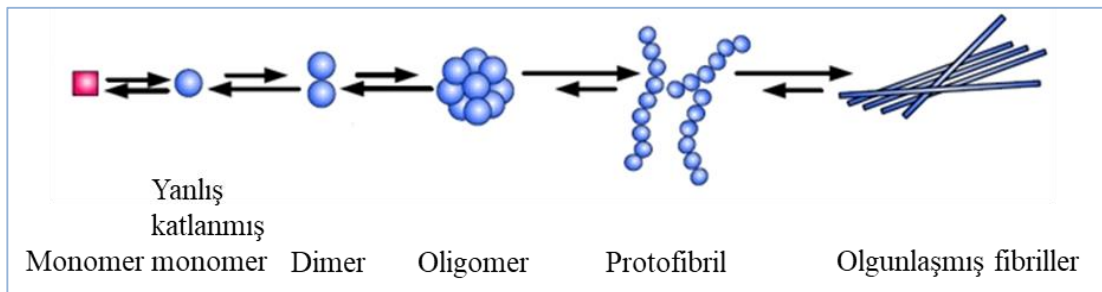
γ -sekretaz kompleksi en çok ER, Golgi/TGN, endositik ve ara kompartmanlarda bulunmaktadır. APP CTF'lerin γ -sekretaz kompleksi tarafından kesilmesi ise TGN ve erken endozomda gerçekleşmektedir (86).

APP'nin γ -sekretaz kompleksi tarafından işlenmesi için öncelikle α - veya β -sekretazlar tarafından hidroliz edilmesi gerekmektedir. α -sekretaz aktivitesiyle oluşan CTF α 'nin, bir sonraki aşamada γ -sekretaz kompleksi ile kesilmesiyle 3 kDa ağırlığındaki p3 peptit ve APP hücre içi bölgesi (AICD) oluşmaktadır. p3 peptit (A β ₁₇₋₄₂), A β ₁₋₄₂ ile birlikte plak yapısına katılan bileşenlerdendir (87). *In vitro* çalışmalar, p3 peptitin nörotoksik etkilere sahip olabileceğini göstermiştir (88). Ancak tam olarak A β içermediği için daha zararsız olduğu düşünülmektedir (65). Diğer yandan, β -sekretaz aktivitesiyle oluşan CTF β 'nin γ -sekretaz ile işlenmesi sonucunda 39-43 aminoasit uzunluğunda A β peptitler ve AICD oluşmaktadır. A β peptitler, kompleksin yerleşmiş olduğu ER, Golgi/TGN ve endozom/lizozom gibi kompartmanlarda üretilip çoğunlukla hücre dışına salıverilir (15). Peptitler uzunluk bakımından heterojen olmalarına rağmen, bazal şartlarda üretilen total A β 'nin yaklaşık %90'ı A β 40'dan ve %10'dan az kısmı da A β 42'den oluşmaktadır (65). Her iki yolak sonucu oluşabilen AICD, değişen uzunluklarda (50, 53, 59 aminoasit) kısa ve instabil peptitlerdir. AICD üzerinde bazı korunmuş bölgeler bulunmaktadır. Bu bölgeler, peptitin başka proteinlere bağlanabilmesine ve böylece farklı fonksiyonlar kazanmasına aracılık etmektedir. Örneğin, AICD, Fe65 ve Tip60 (histon asiltransferaz) ile transkripsiyonel olarak aktif bir kompleks oluşturarak çekirdeğe taşınır ve burada neprilisin, p53, lipoprotein reseptör 1 gibi genlerin aktivasyonunda görev alır (52).

2.3. A β Peptitler ve Senil Plak Oluşumu

AH'deki merkezi rolünden dolayı A β peptitlerin fizyolojik ve patolojik fonksiyonları detaylı olarak araştırılmıştır. Beyinde pM düzeydeki A β 'nın, uzun süreli potansiyel artış sonucu sinaptik plastisiteyi ve hafızayı olumlu yönde etkilediği rapor edilmiştir (89). Az miktarda A β peptit varlığının fizyolojik açıdan olumlu etkileri olmasına rağmen, A β 'nın fazla miktarda üretilmesi nörodejeneratif kaskad sonucunda sinaptik fonksiyon bozukluğuna, yumak oluşumuna ve sonrasında sinir hücresinin ölümüne neden olmaktadır (15).

En yaygın A β peptit formlarından A β 40, A β 42'den daha az toksik iken, A β 42 daha çok hidrofobik ve amiloidojeniktir (90). Ailesel AH mutasyonları üzerine yapılan çalışmalar, A β 42/A β 40 oranındaki artışın, AH patogenezi için bir belirteç olabileceğini göstermiştir (91). A β 42 düzeyindeki artış, oligomerizasyon, fibrilasyon ve amiloid plak oluşumunun temelini oluşturmaktadır (87). A β peptitler, öncelikle çözünür plaklar halinde birikir ve sonrasında fibriller, nörotik plaklara dönüşmektedir (17). Monomerik A β peptit, genel olarak α -helikal veya düzensiz yapıdan oluşurken, yanlış katlanmış polimerler, β -tabaka konformasyonunu almaktadır. Genişlemiş β -tabaka oluşumuna neden olan konformasyonel değişiklikler, homofilik bağlantıları artırır ve sonunda A β oligomer oluşumuna yol açar. Kinetik çalışmalar monomerik A β peptitin yanlış katlanmasının oligomer oluşumundan önce geldiğini ileri sürmektedir. Daha sonra, A β oligomerleri, fibril büyümesi için öncül görevi görmektedir (Şekil 2.6.). (92). Protofibriller yaklaşık 4-11 nm çapında, uzunluğu ≤ 200 nm olan antiparalel-kırmalı tabaka flamanları içermektedir. Dokularda hücre dışı olarak biriken amiloid fibriller, patojenik etkiye sahiptir (93).



Şekil 2.6. Amiloid fibril oluşumu (92).

Senil plakların yapısında, majör A β peptitlerin yanında translasyon sonrasında modifikasyona uğrayan bazı A β türleri de bulunmaktadır. A β peptitler uçlarından kesilme, rasemizasyon, izomerizasyon veya fosforilasyon gibi değişimler geçirebilmektedir. Bu A β peptit türlerinin, oligomer ve agregasyon oluşumunu arttırdığı düşünülmektedir (92).

A β peptitler, sekrete olmadan önce veya tekrar hücreye alınmalarından dolayı, hücre içinde de birikmektedir. A β peptitlerin hücre içi birikiminin etkileri üzerine yapılan araştırmalar hala devam etmektedir ve hücre dışı A β 'nin yanında hücre içi A β 'nin da AH patogenezinde önemli olduğu ileri sürülmektedir (30).

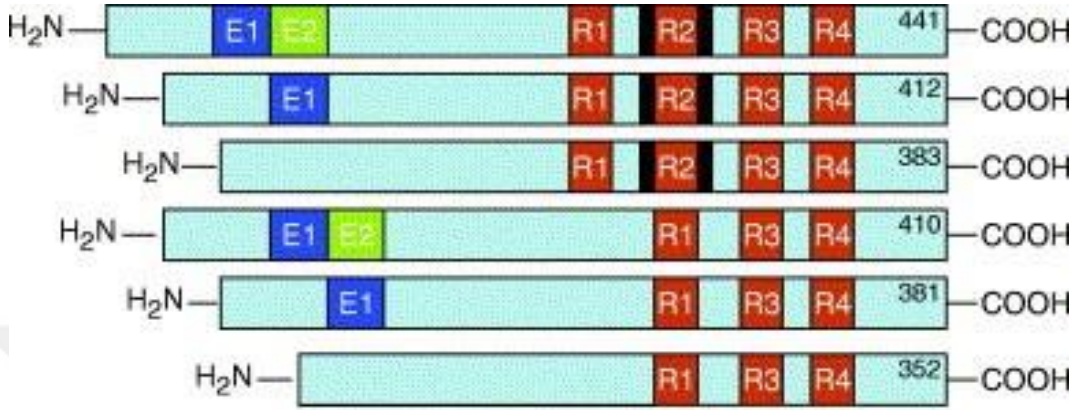
AH'de A β peptitlerin üretimi ve klirensi arasındaki denge de önemlidir. A β peptitlerin klirensindeki bozukluk, A β peptit birikimine neden olmaktadır. A β peptit, beyinden farklı yollarla temizlenebilir: 1: Kan-beyin bariyeri boyunca reseptör-aracılığıyla (lipoprotein reseptör-bağlı protein, P-glikoprotein vb.) kan damarına taşınıp beyinden uzaklaştırılabilir. 2: Hücre içinde lizozomal yolla veya hücre içi ve dışında insülin-parçalayan enzim veya neprilisin gibi enzimler tarafından proteolitik olarak yıkılabilir. 3: Periferik anti-A β antikorlar, A β kümeleşmesini önleyerek A β fibrillerini çözebilir. Böylece beyin ve kan arasındaki A β dengesizliği, peptitlerin beyinden reseptör-aracılı taşınması ve uzaklaştırılmasıyla önlenabilir (94).

2.4. Tau Proteinini

Mikrotübüller ile ilişkili bir protein olan tau, hücre iskelet yapısının önemli bir bileşenidir ve α - ve β - tübülün ile etkileşerek mikrotübüllerin stabilizasyonunu sağlamaktadır. MT'ler, nöronal yapının sürdürülmesi, aksonal taşınma ve nöronal plastisite için gereklidir. Tau, sinir hücresi olmayan hücrelere verildiği zaman, nörit-benzeri uzantıların ortaya çıkmasını sağlamaktadır. Bu da onun akson ve nörit uzamasında rolü olduğunu göstermektedir (95).

Tau proteini, 17. kromozomda bulunan *mikrotübül-assosiye protein tau* (MAPT) adı verilen tek bir genden sentezlenmektedir ve alternatif *splicing* sonucunda altı farklı protein izoformu meydana gelmektedir. Tau geni 15 ekzon içermektedir ve ekzon 2, 3 ve 10 alternatif olarak birleştirilebilir (96). Ekzon 9-12 tarafından dört adet kusurlu, artarda dizilmiş tekrarlar kodlanmaktadır. Alternatif *splicing* sonucunda ekzon 10'un olup olmamasına bağlı olarak, 3R ve 4R tau adı verilen üç veya dört

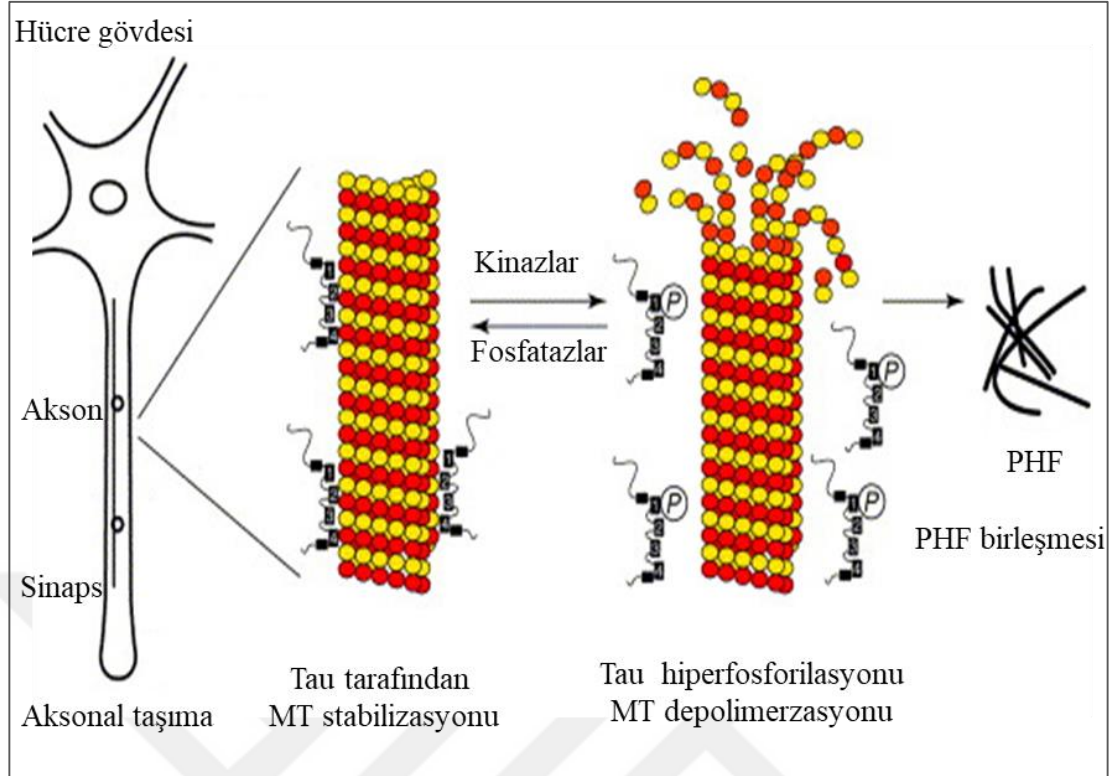
tekrarlı bölgeler içeren izoformlar oluşmaktadır. Ekzon 2 ve 3'ün alternatif olarak birleştirilmesi, amino ucunda sıfır (0N), bir (1N) ve iki (2N) eklentileri ile sonuçlanabilir. Oluşan izoformlar şu şekilde adlandırılır: 3R0N, 3R1N, 3R2N, 4R0N, 4R1N ve 4R2N (Şekil 2.7.) (97).



Şekil 2.7. Tau izoformlarının şematik gösterimi. Tau, kromozom 17'de bulunan *MAPT* adı verilen tek bir gen tarafından kodlanır. Ekson 2'yi, 3'ü ve 10'u içeren alternatif *splicing* sonucunda altı tau izoformu oluşmaktadır (1).

2.5. Tau'nun Hiperfosforilasyonu ve Nörofibriler Yumak Oluşumu

Tau proteininin normal fosforilasyonu, akson boyunca ve beyin farklı bölgelerinde aşamalı olarak değişmektedir. Örneğin, tau beyaz cevherde akson uçlarında daha az fosforillenmiş halde bulunmaktadır. Ayrıca hücre iskeletinin yeniden modellenmesi aşamasında da tau'nun fosforilasyonunda değişimler olmaktadır ve bu durum, sinaptik plastisiteyi desteklemek için önem taşımaktadır. Ancak, tau proteininin anormal fosforilasyonu, tau'nun tübülünlere bağlanmasını olumsuz olarak etkiler ve MT'lerin yapısının bozulmasına neden olur (98) (Şekil 2.8.).



Şekil 2.8. AH'de tau fosforilasyonu. Tau tübülince bağlanıp, MT stabilizasyonunu sağlamaktadır. Tau proteininin bazı aminoasitlerden hiperfosforilasyonu sonucunda, tau MT yapısından ayrılır, PHF'ler olarak kümeleşir ve sonuçta MT depolimerizasyonu ve aksonal taşınmada bozulma gerçekleşir (98).

Sağlıklı beyinde, serin (Ser) ve treonin (Thr) birimlerinden fosforile olmak üzere her bir mol tau için yaklaşık 2-3 mol fosfat bulunmaktadır. Bununla birlikte, Alzheimerli beyinlerden izole edilmiş tau'nun fosforilasyonu, sağlıklı beyinlerden izole edilen tau'nun fosforilasyonuna göre 3-4 kat daha fazladır (99). AH'li beyinlerde şu ana kadar tespit edilen 40'dan fazla tau fosforilasyon bölgesi bulunmaktadır. Farklı bölgelerde fosforilasyon, tau'nun biyolojik ve patolojik rolü üzerinde farklı etkiler göstermektedir. Örneğin, tau proteininin Ser262, Thr231 ve Ser235 birimlerinden fosforillenmesi, MT'lere bağlanmasını sırasıyla; ~%35, ~%25 ve ~%10 azaltırken, Thr231, Ser396 ve Ser422 birimlerinden fosforillenmesi tau'nun filamanlar şeklinde kümeleşmesini teşvik etmektedir (100). *In vitro* kinetik çalışmalar, Ser199/Ser202/Thr205, Thr212, Thr231/Ser235, Ser262/Ser356 ve Ser422 bölgelerinden fosforillenen tau'nun, diğer MT-bağlı proteinleri MT'lerden ayıran bir inhibitör molekülüne dönüştüğünü, ileri sürmektedir. Tau'nun fosforillenmesi sonucunda oluşan PHF-tau, MT'leri bir arada tutma becerisini kaybetse de nörodejenerasyonun gerçekleşmesi için bu durum tek başına yeterli olmayabilir.

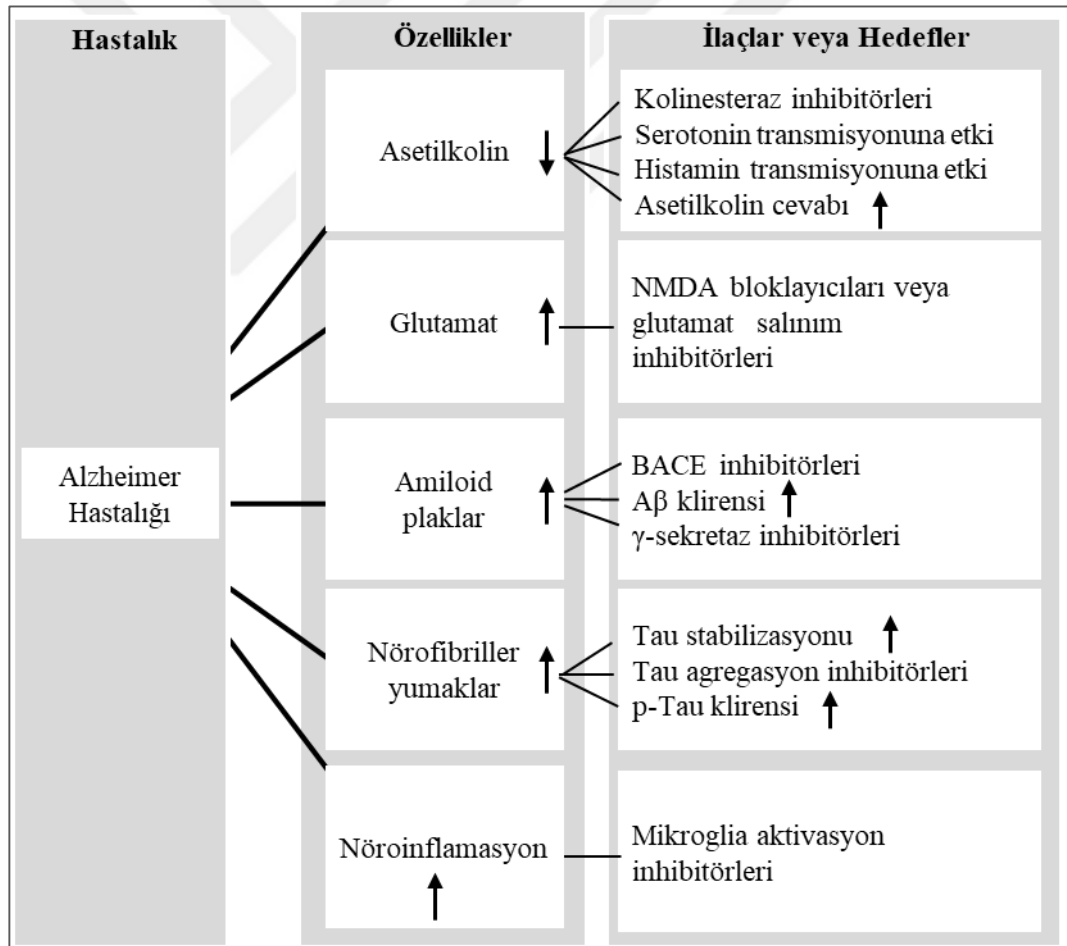
Sonuç olarak, nörofibriler dejenerasyonun, tau'nun anormal fosforilasyonunun sebep olduğu aktivite kaybından ziyade, toksik etkiyi arttırmasından kaynaklandığı söylenebilir (100).

Daha önce yapılan çalışmalar, NFY'lerin sayısı ve demansın şiddeti arasında güçlü bir ilişkinin olduğunu göstermiştir (101). Ancak, son zamanlarda polimerize PHF'lerden ziyade, polimerize olmamış anormal tau veya oligomerlerin toksik olduğunun gösterilmesi, NFY'lerin nörodejeneratif zararın bir göstergesi olabileceği durumunu düşündürmektedir. NFY patolojisinin yanında, nöronal kayıp ve davranış bozuklukları gösteren FTDP-17 P301L mutasyonuna sahip transgenik farelerle yapılan bir çalışmada, mutant tau ekspresyonunun 4. ayda inhibe edilmesi sonucunda, farelerde gözlenen davranış bozukluklarının düzeldiği, ancak NFY'lerin ilerlemeye devam ettiği bulunmuştur (102). Bu durum, NFY'lerin bilişsel fonksiyon kaybı veya hücre ölümüne neden olmak için tek başına yeterli olmadığının göstergesidir. Hatta toksik anormal tau'nun, PHF/NFY'ler olarak polimerize olması, hiperfosforile tau'nun toksik etkisini azaltmak için nöronların geliştirdiği bir savunma mekanizması bile olabilir (100). Benzer şekilde, Huntington hastalığı gibi bazı taupatilerde de protein kümelerinden ziyade fibril yapıda olmayan protein oligomerleri daha patojeniktir (103).

Tau proteini, farklı kinazlar tarafından fosforillenmektedir. Majör tau kinazları, glikojen-sentaz kinaz 3 β (GSK-3 β) (104), siklin-bağımlı protein kinaz 5 (105), cAMP-bağımlı protein kinaz (106) ve mitojen-aktif protein kinaz (107) olarak sıralanabilir. Tau'nun defosforilasyonunu yapan fosfatazlar arasında ise protein fosfataz 2, en fazla vurgulanandır (108). Transgenik fare modelleri ile yapılan çalışmalarda, birbiriyle örtüşen birden fazla sürecin tau hiperfosforilasyonuna katkı sağladığı gözlenmiştir. Beyin glukoz metabolizması, inflamasyon ve A β oluşumu gibi durumlar, üst sinyal yollarını uyarak tau hiperfosforilasyonunu teşvik etmektedir (109). Aynı zamanda, toksik tau'nun geri-dönüşüm döngüsü ile A β toksisitesini arttırdığı da gözlenmiştir çünkü hem A β 'nin hem de tau'nun çözünür toksik kümeleri, prion-benzeri mekanizmalar gibi kendi kendine çoğalıp, beyin boyunca yayılmaktadır. Sonuçta, çözünür hücre dışı A β türleri ve sitoplazmik tau, akut nöron ölümünü ve sinaptik fonksiyon bozukluğunu tetiklemektedir (110).

2.6. Alzheimer Hastalığında Tedavi Stratejileri

AH'nin tedavisinde kullanılmak üzere şu ana kadar Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onay almış dördü kolinesteraz (ChE) inhibitörü, biri N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonisti olmak üzere toplam beş adet ilaç bulunmaktadır. Sözü edilen ilaçlar, AH'nin semptomatik tedavisinde kullanılmakla birlikte, hastalığın önlenmesinde herhangi bir yarar sağlamamaktadır. Bu nedenle modern terapötik yaklaşımlar, hastalığın oluşmadan önlenmesini veya seyrinin tamamen durdurulmasını amaçlamaktadır. AH'de gözlenen nöropatolojik değişimleri hedef alan çeşitli terapötik yaklaşımlar mevcuttur (Şekil 2.9.). Tüm bu yaklaşımların amacı, klinikte kullanım sırasında, güvenilir ve tolere edilebilir bir tedavi sunmaktır (111).



Şekil 2.9. AH tedavisinde terapötik ilaçların ve hedeflerin sınıflandırılması (112).

2.6.1. Nörotransmitter-Temelli Yaklaşımlar

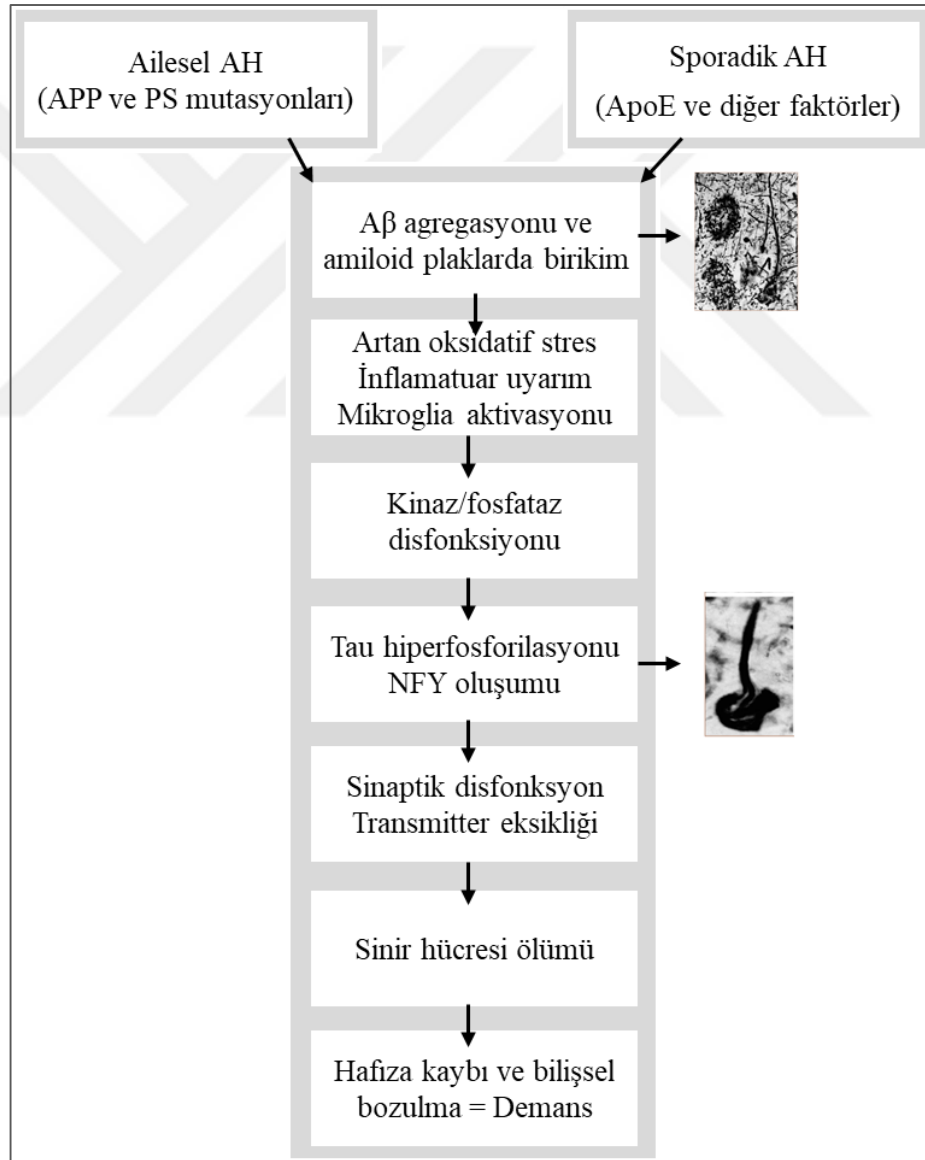
AH'den en çok etkilenen hücreler, kolinerjik sinir sisteminde yer alan nöronlardır. Nöronlar serebral kan akışı, bilişsel algı, öğrenme, hafıza, serebral korteks gelişimi ve uyku-uyanıklık döngüsü gibi birçok aktivitenin sağlanması ve düzenlenmesinde görev almaktadır. Kolinerjik sistemi hedef alan tedavi stratejisi, azalan ACh seviyesini artırarak, sinir uyarımını devam ettirmeyi amaçlamaktadır (113). Glutamat ise hipokampal ve neokortikal beyin bölgelerindeki ana eksitatör nörotransmitter olarak bilişsellik, öğrenme ve hafıza süreçlerinde önemli rollere sahiptir ve post-sinaptik hücrelerde NMDA reseptörleri tarafından tanınmaktadır. AH'de, artan presinaptik glutamat salıverilmesi ve azalan geri alıma bağlı olarak aşırı derecede hücre dışı glutamat birikimi görülmektedir ve bu da NMDA reseptörlerinin sürekli aktif halde bulunmasına neden olmaktadır. Bu nedenle bu sistemi hedef alan ilaçlar NMDA reseptör antagonisti olarak görev almaktadır (114).

Şu ana kadar AH'nin tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen tedavi yaklaşımları içinde; en iyi semptomatik iyileşme, nörotransmitter sistemlerdeki değişimleri hedef alan ilaçlar ile gerçekleştirilmiştir (111). AH'nin semptomatik tedavisi için resmi olarak satılan ilaçların yanında, kolinerjik ve glutamaterjik sinir sistemini hedef alan yeni ilaçlar da geliştirilmektedir. Hastalıkta hipokampal nöronlar içinde ilk etkilenen kolinerjik ve glutamaterjik nörotransmitter sistemlerinin yanında GABA, histamin ve serotonin gibi diğer nörotransmitter sistemlerde de fonksiyon bozuklukları görülmektedir (111). Bu nedenle, prelinik çalışmaları tamamlanıp klinik faz denemelerine geçmiş olan ve GABAerjik, histaminerjik ve serotonerjik sistemleri hedef alan bileşikler de bulunmaktadır (115).

2.6.2. Amiloid-Temelli Yaklaşımlar

AH tedavisinde kullanılan amiloid temelli yaklaşım, "amiloid hipotezi"nden köken almaktadır. Bu hipoteze göre, AH patolojisi oluşumunun temel nedeni, beyinde biriken A β peptitlerdir. Prelinik ve klinik kanıtlar, A β peptit homeostazın bozulmasının AH başlangıcında anahtar bir role sahip olduğunu göstermektedir (112). Amiloid hipotezi, kaskad şeklinde gelişen bir dizi patolojik değişimlerden oluşmaktadır. Erken başlangıçlı ailesel AH'de gözlenen genetik değişimler, sporadik AH'de gözlenen *APOE* genindeki mutasyon, karmaşık genetik bağlantılar veya

çevresel faktörler, beyinde patolojik A β peptit türlerinin birikimine neden olmaktadır. Toksik A β peptit türleri, nöronal homeostazı bozacak birtakım olayları (mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, oksidatif stres aktivasyonu, inflammatuar uyarım vb.) tetiklemektedir. Bu değişimler, bazı kinaz ve fosfatazların fonksiyonunu olumsuz olarak etkileyerek tau hiperfosforilasyonuna ve NFY oluşumuna neden olmaktadır. Dolayısıyla sinaptik fonksiyon bozukluğu ve transmitter eksikliği ile seyreden hücre ölümü, demans ile sonuçlanmaktadır (Şekil 2.10.) (116). Ayrıca bazı tedavi stratejileri, kaskad şeklinde ilerleyen patolojik değişimlerin başlangıç noktası olduğu için, APP'nin işlenmesini de hedef almaktadır (112).



Şekil 2.10. Amiloid kaskad hipotezi tarafından önerilen AH ile sonuçlanan patolojik olayların gelişimi (116).

Amiloid temelli tedavi yaklaşımları, APP metabolizmasının değişik yönlerini hedef alsa da asıl amaç, A β peptitlerin nörotoksik forma ulaşmasını engellemektir. Bu yaklaşım genel olarak üç ana başlık altında toplanmaktadır: Sekretaz modülatörleri ile A β üretimini inhibe etmek, anti-agreganlar ile A β agregasyonunu önlemek ve immunoterapi ile A β klirensini arttırmak (117).

A β peptit üretimini azaltmaya yönelik çabalar, APP yıkımının gerçekleştiği amiloidojenik ve non-amiloidojenik yolların modifiye edilmesine odaklanmaktadır. Bu yaklaşımın mantığı, α -sekretaz aktivitesinin artmasıyla APP'nin toksik olmayan ürünlere dönüşeceği; tam tersine β - ve γ -sekretazların inhibe edilmesiyle de amiloidojenik APP işlenmesinin azalacağı temeline dayanmaktadır (118). Hücre yüzeyi reseptörlerinin (119) veya protein kinaz C gibi hücre içi sinyal yollarının uyarılmasıyla (120), α -sekretaz aktivitesi düzenlenebilmektedir. Böylece uyarılan α -sekretaz yolağı aracılığıyla nöroprotektif etkisi olduğu bilinen sAPP α düzeyi arttırılabilmektedir (117).

β -sekretaz aktivitesi, amiloidojenik yolda önemli bir basamaktır. AH'ye neden olan herhangi bir *BACE1* mutasyonu olmasa da APP'nin N-ucunda görülen İsveç tipi ailesel mutasyon (KM670/671NL), APP'yi *BACE1* için daha iyi bir substrat haline getirmektedir (121). Bu mutasyona sahip farelerde, *BACE1*'in susturulması sonucu hipokampal hafıza kayıplarının düzeldiği görülmüştür (73). Bu durum, *BACE1* inhibisyonunun AH tedavisinde terapötik bir hedef olabileceğine işaret etmektedir (117). Ancak *BACE1*'in başka fizyolojik substratları da bulunduğu için enzimi tamamen inhibe etmek çeşitli problemlere neden olmaktadır. *BACE1*'in substratları, membrana bağlı proteinler olup, tip I transmembran proteinleri daha yaygındır (122). APP homolog proteinleri APLP1 ve APLP2, p-selektin glikoprotein ligand-1 (PSGL-1), düşük dansiteli lipoprotein reseptör-bağlı protein, voltaj kapılı sodyum kanalı β 2 altbirimi, neuregulin-1 (NRG1) ve neuregulin-3 (NRG3) *BACE1* tarafından işlenen proteinlerden bazılarıdır (123). Bu proteinlerin çoğu, kontakt-bağımlı hücreler arası iletişimle ilişkilidir veya reseptör olarak görev alır, ayrıca sinir sisteminde ve diğer organlarda belirli rolleri bulunmaktadır (122). Örneğin, NRG1 ve NRG3 proteinlerinin *BACE1* tarafından kesiminin engellenmesi sonucunda, miyelin kılıf kalınlaşmasında azalma görülmektedir. Bunun yanında, *BACE1*'in inhibe edilmesi PSGL-1 proteininin görev aldığı doğuştan ve kazanılmış bağışıklık cevabında lökosit göçünü

değiştirmektedir (123). Farklı araştırma grupları tarafından üretilen BACE1 *knockout* farelerinin, farklı fenotipik ve biyokimyasal özellikler gösterdiği rapor edilmiştir. Bazı çalışmalar BACE1 *knockout* farelerin fenotipik olarak doğal tip farelere benzediğini ve sağlıklı olduğunu rapor ederken (73); diğer çalışmalarda ise BACE1 *knockout* farelerin çoğunun ilk haftada öldüğü ve hayatta kalanların da kontrol farelerine göre daha küçük ve hiperaktif olduğu gözlenmiştir (124). BACE1 tarafından düzenlenen önemli hücresel işlemler ve *in vivo* bulgular, kronik BACE1 inhibisyonunun, toksik etkilere neden olabileceğini işaret etmektedir (117).

Diğer yandan γ -sekretaz inhibitörleri de AH tedavisinde kullanılabilecek potansiyel ajanlardır. Ancak BACE1'e benzer şekilde, γ -sekretaz da APP'den başka substratlar için proteaz görevi görmektedir. γ -sekretaz tarafından kesime uğrayan diğer proteinlere örnek olarak, Notch reseptörü, Notch reseptör ligandları delta1 ve delta2, reseptör tirozin protein kinaz ErbB4, tümör baskılayıcı gen E-kaderin verilebilir (117). Örneğin, γ -sekretaz'ın seçici olmayan inhibisyonu ile engellenen Notch sinyali, hücrede anormal lenfosit farklılaşması gibi patolojiler ile sonuçlanmaktadır (125). Bu tarz sorunların önüne geçmek için son zamanlarda yapılan araştırmalar, sekretazların seçici inhibisyonuna yani modülatör kullanımına odaklanmaktadır (118).

A β peptitler sağlıklı beyinlerde de bulunmaktadır ve AH'de neden oldukları toksik etki, oligomer, fibril ve protofibril yapılarına dönüşüp amiloid plaklar şeklinde kümeleşmelerinden kaynaklanmaktadır (92). Bu nedenle, AH'yi tedavi etmeye yönelik geliştirilen bir diğer yaklaşım da kümeleşmeyi engelleyen ilaçlar kullanmaktır. Tramiprosate, kolostrinin gibi klinik denemelere ulaşmış bazı anti-A β agregasyon ajanları, bu tip ilaçlara örnek olarak verilebilir. (117).

Amiloid kaskadını hedef alan üçüncü yaklaşım ise beyinden amiloidin uzaklaştırılmasıdır. AH'nin oluşumu ve gelişiminde en önemli patofizyolojik aşama, amiloid plaklar olduğu için amiloidin ortamdan uzaklaştırılmasıyla hastalığın tedavisine katkıda bulunulacağı düşünülmektedir. Bu amaçla izlenebilecek üç farklı yol; amiloid-parçalayıcı enzimlerin aktivitesini arttırmak, amiloidin beyin ve periferel dolaşım arasında taşınmasını sağlayan reseptörleri modüle etmek ve amiloid hedefli aşilar yardımıyla peptitlerin immünolojik cevap ile direk yok olmasını sağlamak olarak sıralanabilir (117).

2.6.3. Tau-Temelli Yaklaşımlar

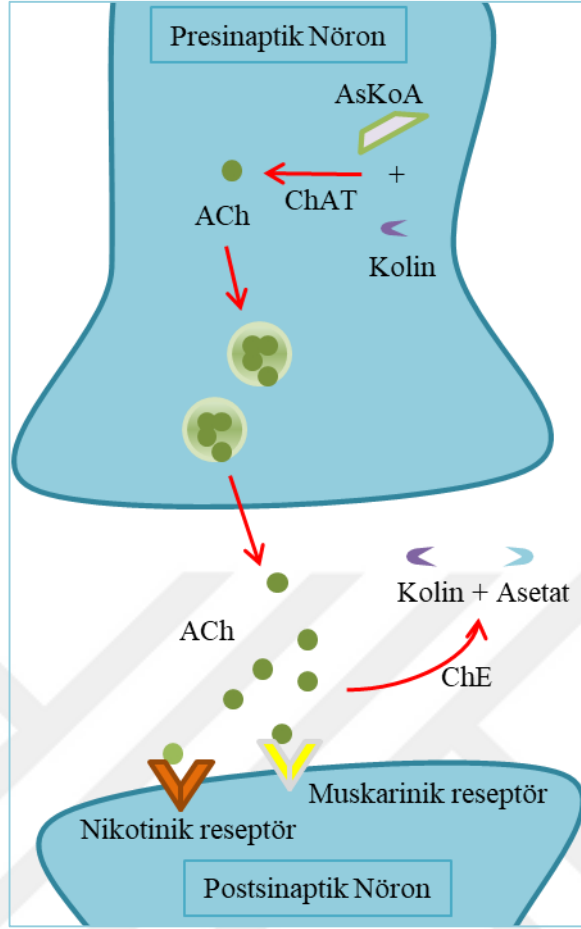
AH'de gözlenen NFY oluşumunu hedef alan tedavi stratejileri, temel olarak tau hiperfosforilasyonunu önleme, tau agregatlarının oluşumunu inhibe etme veya mikrotübüllerin stabilizasyonunu arttırmayı amaçlamaktadır. Tau fosforilasyonunda görev alan GSK-3 β 'yı inhibe edebilen lityum (126), mikrotübülleri stabilize eden paklitaksel (127) ve tau oligomerizasyonunu bloke eden metilen mavisi (128), tau patolojisini iyileştirmede olumlu sonuçlar veren bileşiklere örnek olarak verilebilir.

2.6.4. Diğer Yaklaşımlar

Yukarıda bahsedilen durumlara ek olarak, AH'de patolojik değişime uğrayan başka faktörler de bulunmaktadır ve bu değişimlerden bir veya birkaçını hedef alan farklı ilaçlar geliştirilmektedir. Örneğin, AH gelişimi sırasında inflamatuvar cevap oluşumunu hedef alan nonsteroid anti-inflamatuvar ilaçların kullanımının, hastalığa karşı koruyucu etki gösterdiği gözlenmiştir. Ayrıca antioksidan etki gösteren bileşiklerin veya vitaminlerin, kolesterol seviyesini azaltan ilaçların veya nöroprotektif yararı gösterilmiş kaspaz inhibitörlerinin, AH ilerleyişini önleyebileceğine dair bulgular mevcuttur (115, 117).

2.7. Kolinergik Sistem

ACh, öğrenme ve hafızada rol oynayan önemli bir nörotransmitterdir (129). ChAT enzimi, presinaptik bölgede asetilKoA (AsKoA)'dan koline asetil grubunu transfer ederek ACh biyosentezini katalizlemektedir (130). Sinaptik yarığa salıverilen ACh, postsinaptik sinir hücresi membranında bulunan nikotinik asetilkolin veya muskarinik asetilkolin reseptörüne yüksek afinite ile bağlanarak sinir iletiminin gerçekleşmesini sağlamaktadır. Sinaptik yarıқта bulunan ACh ise ChE adı verilen enzimler tarafından hızlıca hidrolize edilerek asetat ve koline parçalanmaktadır (Şekil 2.11.) (131).

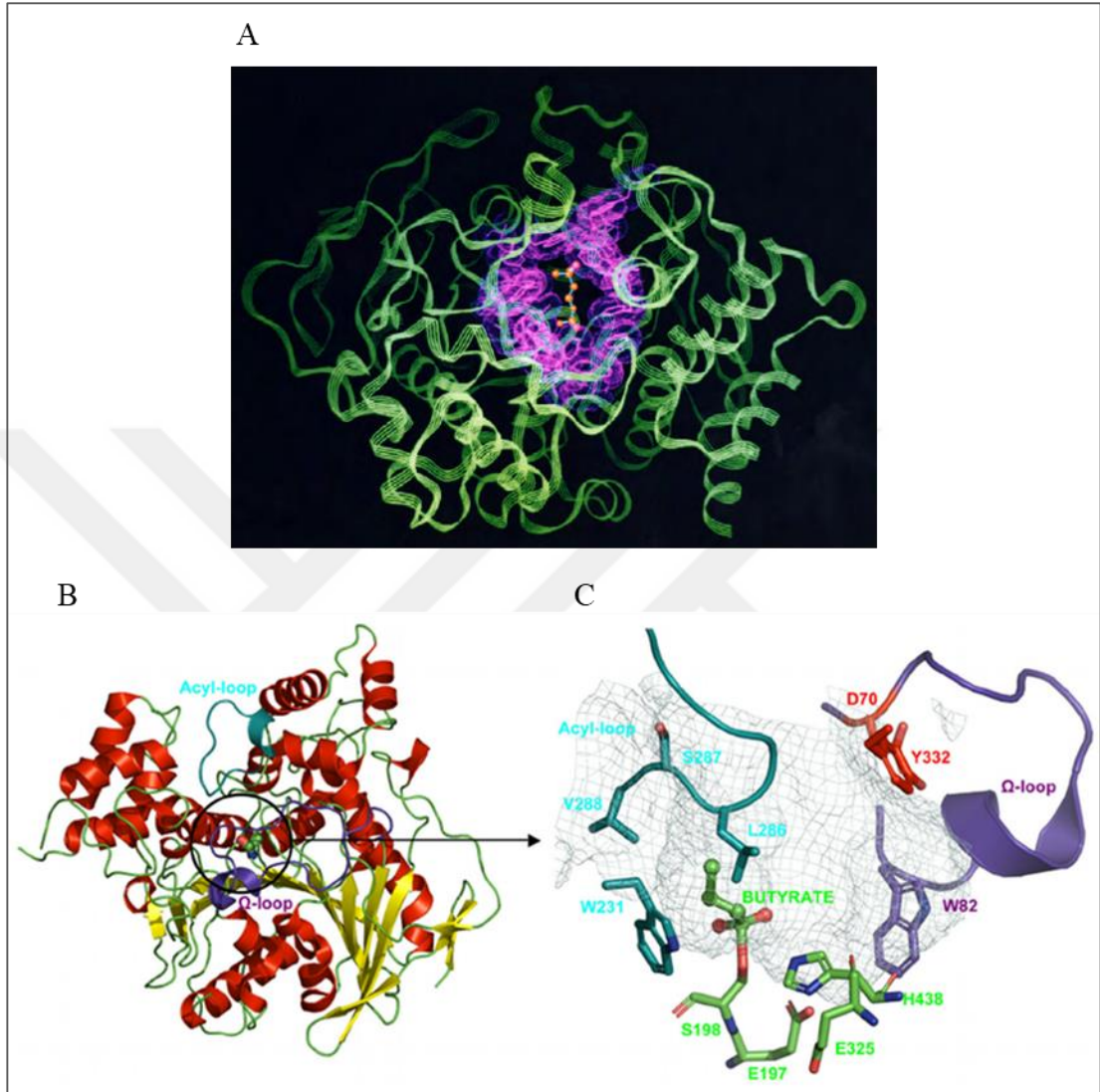


Şekil 2.11. Sinapsta kolinerjik sinir iletimi. Presinaptik nöronda ACh, ChAT enzimi ile AsKoA ve kolin'den sentezlenmektedir. Veziküller içinde toplanan ACh, sinaps boşluğuna salıverilir. Postsinaptik nöron üzerinde bulunan reseptörler ile sinyal iletimi, bir sonraki sinir hücresine aktarılır. Sinapsta ACh, ChE aktivitesi ile kolin ve asetata parçalanır (132).

2.7.1. Kolinesterazlar

Merkezi sinir sisteminde iki tip ChE bulunmaktadır: Asetilkolinesteraz (AChE, EC 3.1.1.7) ve bütirilkolinesteraz (BChE, EC 3.1.1.8) (Şekil 2.12.). ChE'ler, ~574 aminoasitten oluşan glikoprotein yapısındaki serin hidrolazlardır (133). AChE ve BChE sırasıyla; insan kromozomu 7 ve 3'de bulunan farklı genler tarafından kodlanmaktadır (5). *Torpedo* AChE ve insan BChE sekans dizileri, %51-54 oranında aynı olmakla birlikte %70-72 oranında benzerdir (133). Sağlıklı bireylerde AChE, kas ve sinir sisteminde bol miktarda bulunurken, BChE öncelikle karaciğerde sentezlenir ve sonrasında plazmaya salıverilir (134). Beyinde, AChE genelde nöronlarda, BChE

ise endotel hücrelerin ve nöronların yanında çoğunlukla glia hücrelerinde bulunmaktadır (135).



Şekil 2.12. *Torpedo* AChE'nin ve insan BChE'nin üç boyutlu yapısı. (A) *Torpedo* AChE'nin yapısı şeritler halinde gösterilmiştir: Pembe çubuklar ve nokta yüzey, korunmuş aromatik aminoasitleri (14 adet); turuncu top ve çubuk, aktif bölgeye bağlanmış substrat (ACh) modelini göstermektedir (136). (B) İnsan BChE'nin üç boyutlu yapısı. (C) İnsan BChE'nin aktif bölgesi. Yeşil, karbon atomlarını; mavi, azot atomlarını; kırmızı, oksijen atomlarını; mor, Ω ilmeğini; açık mavi, açıl bağlama cebini göstermektedir. (137).

Kolinesterazlar arasındaki temel farklılıklar, sağlıklı ve AH'li beyinlerdeki iki enzimin rollerini açıklamaktadır. Sağlıklı beyinlerde ChE aktivitesinin %80'i AChE tarafından gerçekleştirilirken, kalan aktiviteden BChE sorumludur (138). Kolinesterazların her monomerinde 20 Å derinliğinde, substratın girdiği, fakat

aminoasitlerce farklılık gösteren bir katalitik bölge bulunmaktadır. AChE'nin aktif merkez oyuğu hacmi ($302 \text{ \AA}^3$), BChE'ninkinden ($502 \text{ \AA}^3$) yaklaşık $200 \text{ \AA}^3$ daha küçüktür (134). Bu durum, kolinesterazların substrat seçicilikleri ve inhibitörlere olan seçici duyarlılıklarında farklılıklara neden olmaktadır. AChE'nin, ACh'e olan spesifitesi, BChE'ye göre daha fazladır. BChE, ayrıca nöroaktif peptitler gibi farklı moleküllerin metabolizmasında da rol oynamaktadır (139).

AChE ve BChE, amfifilik ya da çözünür olmak üzere aynı katalitik altbirimlerden oluşan farklı globüler ve asimetrik moleküler formlara sahiptir. Merkezi sinir sisteminde, dört globüler protein altbiriminden oluşan G4 formu ve monomerik olan G1 formları, her iki enzimde de gözlenmesine rağmen, dimerik G2 formu ise sadece AChE de bulunmaktadır (140). Tetramerik G4 formu, 20 kDa uzunluğunda proline zengin hidrofobik bir çıpayla (PRiMA) plazma membranına tutunmaktadır. Bu form, AChE'nin merkezi sinir sistemindeki en yaygın formunu oluşturmaktadır (141). G4 formunun tam tersine, G1 formunun miktarı daha azdır ve ACh yıkımında minör rol oynamaktadır (140). Memelilerde bu formların yanında, enzimlerin üç adet tetramerik formunun kollajen bağlayıcılar ile membrana tutunduğu asimetrik yapıdaki kollajen-kuyruklu formları da bulunmaktadır (142).

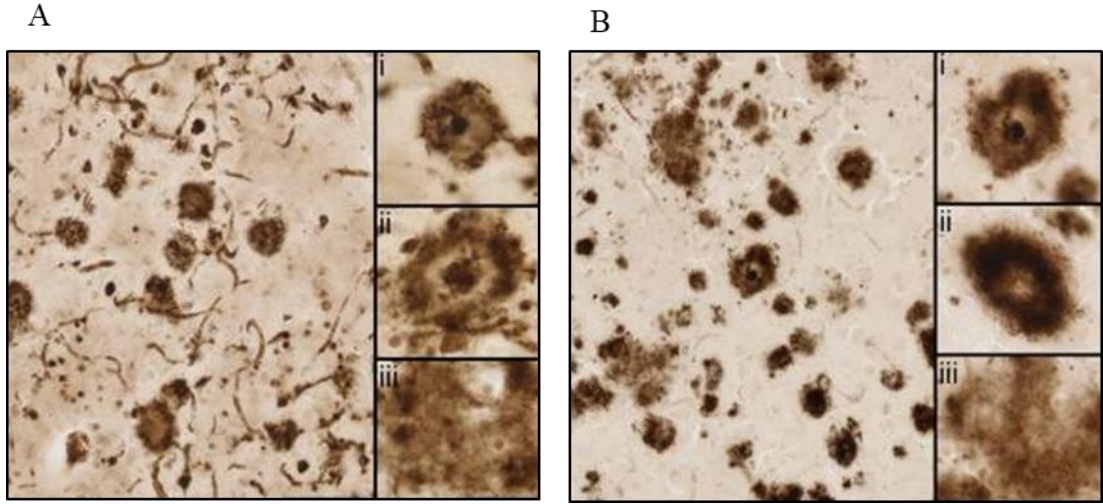
2.7.2. Alzheimer Hastalığında Kolinerjik Sistem

Kolinerjik bazal ön beyin (CBF) sistemi, septal/diagonal kompleks ve Meynert'in bazal nükleusu içindeki magnoselüler hiperkromik nöronlardan oluşmaktadır. CBF nöronları, hipokampus, amigdala ve neokorteks bölgelerine majör kolinerjik sinir dokusunu sağlamakta olup, hafıza, öğrenme ve davranış gibi fonksiyonlarda rol oynamaktadır. AH'de kolinerjik nöronlarda bozulmalar görülmektedir (143). Otopsi yapılan Alzheimerlı beyinlerde, CBF çekirdeğinde total nöronal popülasyonun %75'ini aşan sinir hücresi kaybına ek olarak (26), ACh sentezinden sorumlu olan ChAT enzim aktivitesinde de düşüş gözlenmiştir (2). AH'de gözlenen kolinerjik aktivitedeki bozulmalar, bilişsel azalma ve hafıza kaybı ile bağlantılıdır (25). ACh'nin öğrenme ve hafızadaki rolünün anlaşılmasıyla, AH patolojisinde "kolinerjik hipotez" kavramı ortaya çıkmıştır. Kolinerjik hipotez, AH'de gözlenen bilişsel, fonksiyonel ve davranış bozukluklarının ortaya çıkmasında azalan kolinerjik iletimin önemli bir rolü olduğunu vurgulamaktadır. Ancak AH'nin erken

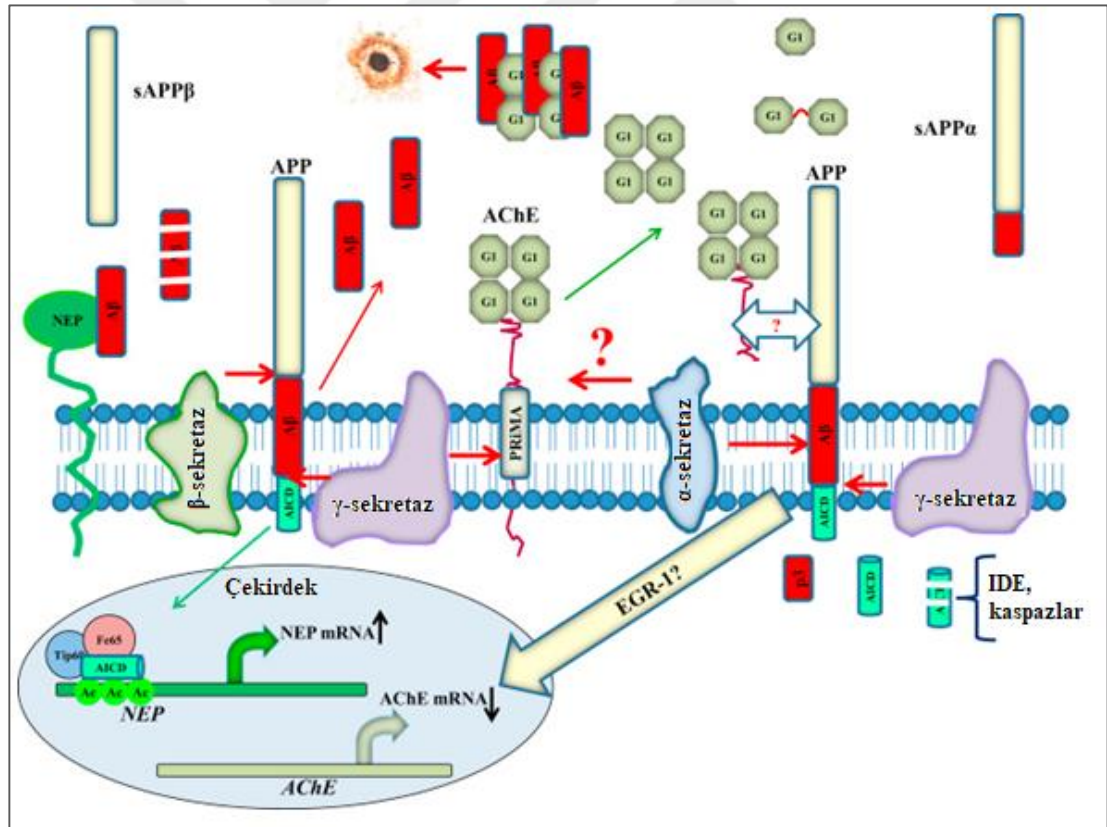
evrelerinde veya hafif bilişsel bozulmaya sahip hastalarda kolinerjik eksikliğin olmaması, bu hipotezi kısıtlayan bir durumdur (132).

AH'de AChE aktivitesi %55-67 oranında azalırken, BChE aktivitesi %80'e kadar artmaktadır (138). Ayrıca, AH'de senil plak sayısı ile kolinesterazların aktivite değişimleri arasında da bir bağlantı mevcuttur. Plak sayısı arttıkça BChE aktivitesinde artış olurken, AChE aktivitesi ise azalmaktadır (25). Kolinerjik sistemdeki önemi geçmiş yıllarda gözardı edilen BChE'nin, AH'de aktivitesinin artması, BChE'yi hedef alan çalışmalara bir ivme kazandırmıştır. BChE'nin ACh hidrolizinde destekleyici bir rol oynadığı gözükmesine rağmen, AChE yokluğunda enzimin fonksiyonel önemi artmaktadır. AChE *knockout* farelerle yapılan araştırmalar, BChE'nin AChE aktivitesini kompanse edebildiğini kanıtlamıştır (144). BChE'nin insan beynindeki rolünü analiz etmek için yapılan detaylı histokimyasal çalışmalar, enzimin memeli merkezi sinir sisteminde ChAT ile birlikte (145) tüm hipokampal ve temporal neokortikal bölgede bulunduğunu ve bu bölgelerde asetiltiyokolini (sentetik ACh) hidroliz ettiğini göstermiştir (146).

Alzheimerlı beyinde AChE ve BChE, NFY'lerin (147) ve amiloid plakların yapısında bulunabilen enzimlerdir (Şekil 2.13.) (148). AChE, A β 'yi içeren kompleksler oluşturarak A β peptitlerin agregasyonunu indüklemektedir (149). AChE'yi ve A β peptitleri içeren kompleksler, AChE'nin biyokimyasal özelliklerinin değişmesine ve amiloid fibrillerin nörotoksitesinin arttırmasına neden olmaktadır (150). AChE'nin amiloid plak yapısına katılan formu, çözünür G1 ve G2 formlarıdır. Diğer yandan, membrana bağlı G4 formunun ise APP işlenmesinde rolü olduğu düşünülmektedir. AChE ve APP arasında gen düzeyinde de bir ilişki bulunmaktadır. Holo APP, hafıza oluşumunda rol alan *early growth response protein 1* (EGR-1) geninin ekspresyonunu negatif olarak etkilerken; EGR-1, AChE geninin promoter bölgesine bağlanabilmektedir. AChE'nin amiloid patolojisine hangi mekanizmalar üzerinden etki ettiği hala araştırılmaktadır (Şekil 2.14.) (151). BChE'nin ise plak olgunlaşmasının daha geç dönemlerinde amiloid plaklara eklendiği (152), ve protein-protein bağlantısına olan eğilimi (153) veya A β agregasyonunu etkilediği bilinen metal iyonları tarafından etkilenmesi (154) sonucunda A β peptitlerin diffüz formdan kompakt forma geçişini tetiklediği düşünülmektedir (152).



Şekil 2.13. İleri derecede AH patolojisine sahip insan beyni korteks bölgesinde, AChE ve BChE için boyanmış plakları gösteren fotomikrograflar. (A) AChE için boyanmış kesit. (B) BChE için boyanmış kesit (155).



Şekil 2.14. Hücrelerde AChE ile APP dağılımı/işlenmesi ve önerilen gen düzenlenmesi (151).

2.8. Kolinesteraz İnhibitörleri

AH'de kolinerjik sistemin olumsuz olarak etkilenmesi, hastalığın tedavisinde kullanılmak üzere pek çok kolinesteraz inhibitörlerinin geliştirilmesine neden olmuştur. Böylece ACh'yi hidroliz eden ChE'lerin inhibisyonu sağlanarak, azalan ACh'nin düzeyinin artırılması ve kolinerjik fonksiyonun iyileştirilmesi hedeflenmiştir.

AH'nin semptomatik tedavisinde ChE inhibitörlerinin kullanımı, standart bir yöntem olup (4), günümüzde FDA tarafından onaylı beş ilaçtan üçü ChE inhibitörüdür: Donepezil, galantamin ve rivastigmin. Bu üç ilaca ek olarak, iyonik glutamat reseptörünün bir tipi olan NMDA antagonisti memantin ile birlikte donepezili içeren çift etkili bir ilaç daha bulunmaktadır. FDA onaylı son ilaç ise sadece memantini içermektedir. Onaylanan ilk ChE inhibitörü olan takrin ise hepatoksisite gibi yan etkilere neden olduğu için kullanımdan kaldırılmıştır (3). Tablo 2.2.'de FDA tarafından onaylı ChE inhibitörleri ile ilgili detaylı bilgiler verilmektedir. ChE inhibitörleri ile tedavi iki aşamadan oluşmaktadır: Klinik olarak verimli dozu belirlemek için doz-artış fazı ve en uygun terapötik dozun uygulandığı durağan faz (4).

Tablo 2.2. AH tedavisinde kullanılan FDA tarafından onaylı kolinesteraz inhibitörleri (3, 4, 156).

Bileşik	İlaç ismi	Kimyasal sınıf	Etki aralığı	AChE IC ₅₀ (nM)	BChE IC ₅₀ (nM)	Seçicilik
Donepezil	Aricept	Piperidin	Tüm evreler	323 ± 126	12800 ± 700	AChE > BChE (40 kat)
Galantamin	Razadyne	Alkoloid	Hafif-orta	5000 ± 170	59200 ± 1700	AChE > BChE (12 kat)
Rivastigmin	Exelon	Karbamat	Hafif-orta	4760 ± 110	238 ± 20	BChE > AChE (20 kat)

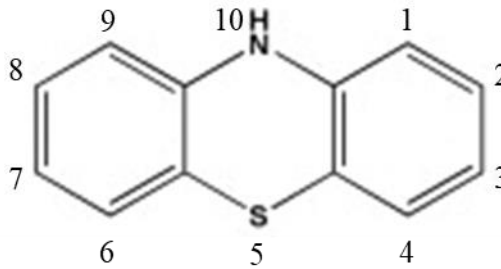
Bu bileşiklerin yanında onaylı olmayan fakat araştırma aşamasında olan ve klinik denemelere girmiş başka ChE inhibitörleri de bulunmaktadır. Fizostigmin, metrifonat, eptastigmin ve (-) huperzin A bunlardan birkaçıdır. Herbir ChE inhibitörü enzim seçiciliği, hedef enzime bağlanma şekli ve inhibisyon tipi açısından farklılıklar

göstermektedir. Bu durum, farklı yapıdaki kolinesteraz inhibitörlerinin AH tedavisinde farklı etkiler göstermesine neden olmaktadır (157).

Kolinerjik sistemi hedef alarak ACh düzeyini arttırmaya yönelik ilaçlar, Alzheimerlı hastalarda semptomatik yarar sağlamasına rağmen bu ilaçların 36 aya kadar süren olumlu etkileri, onların AH patolojisi üzerinde yavaşlatıcı etkilerinin de olabileceği ihtimalini ortaya çıkarmıştır (6, 7). Bazı ChE inhibitörleri ile farklı hücre hatları (158, 159) ve hayvan modelleri (160, 161) kullanılarak yapılan son çalışmalar, bu inhibitörlerin kolinerjik etkilerinin yanında A β düzeylerini de azaltarak amiloid metabolizmasını düzenleyebildiğini göstermiştir. Ayrıca kolinerjik aktivasyon ve APP metabolizması arasındaki bağ, AH patolojisinin birçok yönünü hedef alan ilaç araştırmaları dönemini başlatmıştır.

2.9. Alzheimer Hastalığının Tedavisinde Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin Kullanımı

Fenotiyazinler, $S(C_6H_4)_2NH$ kimyasal çekirdeğe sahip azot ve sülfür içeren trisiklik bileşiklerdir (Şekil 2.15.). Ana fenotiyazin bileşiğinin (10H-dibenzo-1,4-tiyazin) 1883'te Bernthesen tarafından sentezlenmesinden günümüze kadar beş binden fazla fenotiyazin türevi elde edilmiştir (162). Fenotiyazin yapıları, azota bağlı yan zincirdeki farklılıklara göre üç ana alt gruba ayrılmaktadır: Asiklik grup taşıyan alifatik bileşikler, piperidin-türevi grup taşıyan piperidinler ve piperazin-türevi yan zincir taşıyan piperazinler (163).



Şekil 2.15. Fenotiyazinin yapısı (162, 163).

Fenotiyazin yapıları çeşitli biyolojik ve kimyasal özelliklere sahip oldukları için veterinerlik, farmakoloji ve biyotıp alanlarında kullanılmaktadır (162, 164). Fenotiyazinlerin sentezlendikten sonraki ilk tıbbi kullanımı, sıtma tedavisi için

olmuştur. Ayrıca fenotiyazınların antifungal, insektisit, antihelmintik ve antihistaminik ilaçlar olarak kullanımı da söz konusudur (163, 164).

Fenotiyazın yapılı bileşikler, hücre fizyolojisinde önemli rolleri olan kalsiyum-bağlayıcı protein kalmoduline bağlanmaktadır. Bu nedenle, kalmodulin tarafından düzenlenen ve değişik biyokimyasal yollarda görev alan birçok enzimin aktivitesinde azalma meydana gelmektedir (165). Benzer şekilde fenotiyazın yapılı bileşikler, protein kinaz C'yi de inhibe etmektedir (166). Fenotiyazınların enzimler üzerindeki inhibe edici etkisi kimyasal yapılarından kaynaklanmaktadır (165, 166).

Fenotiyazın yapılı bileşikler, son 50 yıldır dünyada en çok reçetelenen psikotropik ilaçlardır. İlaçların nöroleptikler olarak psikiyatrik uygulamalarda kullanılması, merkezi sinir sisteminde özellikle dopaminerjik reseptörlere yüksek afinite ile bağlanabilme özelliklerinden kaynaklanmaktadır (167). Ayrıca, fenotiyazın türevleri α -adrenerjik, serotonin, histamin, muskarinik veya GABA-erjik sinir reseptörlerini de inhibe etmektedir (168). Nöroleptik fenotiyazın yapısındaki ilaçların, membran lipid tabakasına yüksek afiniteleri bulunur ve kan-beyin bariyerini kolayca geçebilirler çünkü lipofilik halka yapıları ve özellikle 2. ve 10. pozisyonda bulunan ve lipofilitelelerini daha da arttıran yan zincirleri mevcuttur (169).

Bazı fenotiyazın türevleri ise neoplastik ve genotoksik olarak zarar görmüş hücreler üzerinde anti-proliferatif etki göstermektedir. Fenotiyazınların bu özellikleri, kanser tedavisinde destekleyici olarak kullanılmalarına olanak sağlamaktadır. Bileşikler, toksik olmayan dozlarda uygulandıkları zaman, kanser hücrelerinin tedavisinde kullanılan radyasyonun ve diğer kimyasal ilaçların toksik etkisini arttırmaktadır (163).

Son yıllarda yapılan araştırmalar, fenotiyazın yapılı bileşiklerin, AH gibi serebral patolojilerin tedavisinde de kullanılabileceğine işaret etmektedir. Nöronal hücre kültürü ve farklı nörodejeneratif hastalık modelleri kullanılarak yapılan çalışmalar sonucunda fenotiyazın halkasındaki azota bağlı yan zincir taşımayan bileşiklerin, düşük dozlarda uygulandıklarında bile antioksidatif ve nöroprotektif etkiler gösterdiği bulunmuştur (170). Bu durum, hücre içinde fenotiyazınların azot üzerindeki hidrojeni uzaklaştırarak radikalleşmesi ve böylece yüksek antioksidan özelliğine sahip olmasıyla açıklanmaktadır (164). Ayrıca, prion ile enfekte olmuş transgenik fare modellerinden elde edilen sinir hücrelerinde, fenotiyazın yapılı

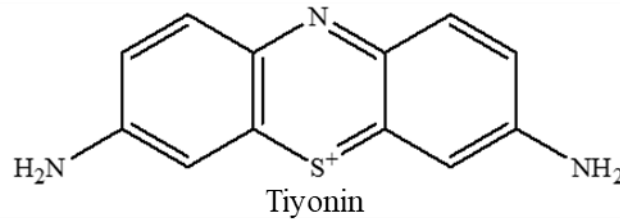
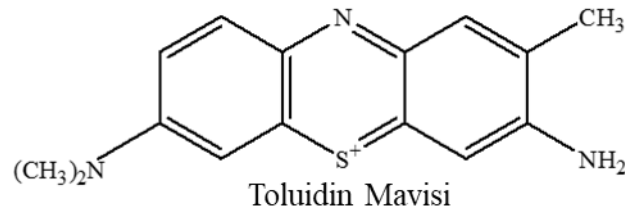
bileşiklerin, yanlış katlanmış prion proteinini stabilize ederek amiloid fibril oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir (171).

Fenotiyazin yapılı bileşiklerin nöroprotektif ve anti-prion etkilerinin yanında, kolinesterazlar üzerinde de inhibe edici etkilere sahip olmaları, bu bileşiklerin AH tedavisinde potansiyel ilaç adayları olabileceğini düşündürmektedir. Örneğin, fenotiyazin yapılı bileşiklerden biri olan metilen mavisi (MethB), AH tedavisinde kullanılmak üzere detaylı olarak araştırılan ve faz III klinik denemelerine ulaşmayı başarmış güçlü bir terapötik ajandır. Yapılan araştırmalar sonucunda MethB'nin her iki ChE'yi inhibe ettiği (172), toksik çözünür A β formlarını zararsız öncüllere dönüştürdüğü (173), proteozom aktivitesini etkileyerek A β klirensini arttırdığı (174), tau oligomerizasyonunu bloke ettiği (128) ve BACE1 aktivitesini inhibe ettiği (175) bulunmuştur. Faz II çalışmaları sırasında MethB'nin absorpsiyonu, metabolizması ve dağılımı ile ilgili problemlerin ortaya çıkması ile daha sonraki klinik denemelerde MethB'nin redükte formu olan löko-MethB kullanılmaya başlanmıştır (176). Ancak löko-MethB'nin faz III klinik denemeleri de başarısızlıkla sonuçlanmıştır fakat gelecekte yeni denemeler planlanmaktadır (177).

2.10. Çalışmada kullanılan fenotiyazin yapılı bileşikler

Toluidin mavisi (TBO) ve tiyonin (TH), MethB'ye yapıcı benzerlik gösteren fenotiyazin yapılı bileşiklerdir (Şekil 2.16.). Her iki bileşik de radikal hale dönüşebildikleri için redoks özellik göstermektedir (178, 179).

TH, fotogalvanik hücrelerde, ışığı elektrik enerjisine çevirme (180) veya nanopartikül yapımı (181) gibi sanayi alanlarında geniş kullanım alanına sahiptir. Henüz yapılan bir çalışmada, prostat spesifik antijeni tayin etmede kullanılan elektrokimyasal sandviç immunoassay yönteminde, yaban turbu peroksidazı ile birlikte, TH ile konjuge edilmiş poliklonal antikor kullanımının, sensörün elektrokimyasal sinyalini arttırdığı gösterilmiştir (182). Ayrıca virüslerin, lökositlerin ve bakterilerin sebep olduğu kontaminasyon durumlarında, TH varlığında yapılan fotodinamik tedavi ile patojenler inaktive edilebilmektedir (183).



Şekil 2.16. Çalışmada kullanılan fenotiyazinlerin yapısı.

Benzer şekilde TBO da mikrobiyal enfeksiyonlarda ve oral biyofilmlerde fotodinamik tedavide kullanılan etkili bir fotosensitizerdir (184). Bunun yanında, TBO, oral ve midesel neoplazmaları takip etmede (185) ve tiroit ameliyatı sırasında paratiroid bezini saptamada (186) canlı hücreleri ve dokuları boyama için uygulanmaktadır. Ayrıca TBO koyunda (187), köpekte ve insanlarda (188) methemoglobinemi tedavisi için de kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar her iki bileşiğin de DNA (189), çift zincirli RNA (190) ve mRNA'nın poliA kuyruğuna (191) güçlü bir şekilde bağlandığını göstermiştir. Bu özellikleri sayesinde, bileşiklerin patojenik organizmalarda veya kanser hücrelerinde RNA ve DNA gibi yapıları hedef alan terapötik ajanlar olarak kullanılabileceği de düşünülmektedir (190).

TBO ve TH'nin AH tedavisinde kullanılabileceğine dair ilk bulgu, Wischik ve ark. tarafından yapılan bir araştırmaya aittir (192). Çalışmada, *in vitro* koşullarda AH-benzeri tau agregasyonu oluşturulmuş ve bazı fenotiyazin yapıları bileşiklerin bu model üzerindeki inhibisyonu incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, TBO'nun ($K_i=69$ nM) kesik tau proteininden oluşan agregatlar üzerine inhibitör etkisinin, TH'den ($K_i=98$ nM) daha fazla olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte TH'nin tau-tübülün bağlanmasını inhibe ettiği gözlenmiştir ($K_i=7.86$ nM). MethB ise tau-tau bağlanmasını TBO ve TH'den çok daha az etkili olarak inhibe etmiştir ($K_i=3.4$ μ M) (192). TBO'nun ve MethB'nin antioksidan özelliklerinin incelendiği bir başka araştırmada ise, her iki bileşiğin farklı nörolojik hastalıkların tedavisinde nöroprotektif etki sağlayabileceği ileri sürülmüştür (193).

Anabilim dalımızda daha önce gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda, TBO'nun ($K_i=0.008\pm0.003 \mu\text{M}$) ve TH'nin ($K_i=2.1 \pm 0.42 \mu\text{M}$) insan BChE'yi nonlineer olarak inhibe ettiği ve TBO'nun insan eritrosit AChE'si üzerinde lineer karışık tip inhibisyona neden olduğu bulunmuştur ($K_i= 0.041\pm0.005 \mu\text{M}$). Bölge yönelimli mutagenез çalışmaları ise TBO'nun insan BChE'ye bağlanmasında enzimin periferik anyonik bölgesinin önemli rol oynadığını göstermiştir (8). Sözü edilen bileşiklerin, *in vitro* tau agregasyonunu inhibe etmelerinin yanında kolinesterazları da güçlü seviyede inhibe etmeleri, her ikisinin de AH tedavisinde kullanılabilecek potansiyel ilaç adayları olabileceğini düşündürmektedir.



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereçler

AH'nin üç nöropatolojik özelliğini taklit eden (yaşa bağımlı A β patalojisi, tau patolojisi ve bilişsel fonksiyonlarda azalma) 3xTg-AD transgenik fareler (B6;129-*Psen1*^{tm1Mpm} Tg(APP^{Swe},tauP301L)1Lfa/Mmjax; n= 40; 3 aylık; dişi), Jackson Laboratuvarı'ndan (Bar Harbor, Maine, ABD) satın alındı.

İnsan doğal tip APP751 ve insan doğal tip presenilin 1'i birlikte eksprese eden Çin hamster over (PS70) hücreleri Prof. Sascha Weggen (Heinrich Heine Üniversitesi, Düsseldorf, Almanya) tarafından temin edildi.

İnsan APP (kat# KHB0051), insan A β 40 (kat#KHB3481) ve ultrasensitiv insan A β 42 (kat# KHB3544) ELISA kitleri, Invitrogen'den (ABD); ECL, *Super Signal West Femto* kit ve BCA protein assay kit, Pierce'dan (ABD); Bio-Rad protein assay kit, Bio-Rad'den (ABD); toluidine blue O (TBO) ve tiyonin asetat (TH), Sigma-Aldrich (St. Louis, ABD)'den satın alındı. Aksi belirtilmediği takdirde; diğer tüm kimyasallar, Sigma-Aldrich, Merck (Almanya) veya Biological Industries (İsrail) kaynaklıydı.

3.1.1. Aletler

Hücre kültürü çalışmaları için Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda mevcut olan alt yapıdan (laminar flow kabin, karbondioksitli inkübatör, soğutmalı santrifüj, inverted mikroskop vb.) yararlanıldı.

ELISA ve protein tayinleri için Biotek Powerwave mikrolaka okuyucusu (BioTek, Highland Park, ABD), protein elektroforezi ve transferi için ise sırasıyla; Bio-Rad Mini-Protean 3 ve Bio-Rad Mini Trans-Blot elektroforetik transfer hücresi kullanıldı. Jel ve membranların görüntülenmesi, Bio-Rad ChemiDoc XRS+ jel görüntüleme cihazı (Bio-Rad, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Akım sitometri çalışmaları için Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde bulunan FACS Aria akım sitometri cihazından (Beckon Dickinson Biosciences, ABD) ve formik asitin uzaklaştırılmasında Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'nde bulunan *Benchtop Manifold freeze dryer* cihazından (Millrock, Kingston, NY, ABD) yararlanıldı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. PS70 Hücre Kültürü

Çalışmada, amiloid patolojisi hücre modeli olarak PS70 hücreleri kullanıldı.

PS70 hücreleri (pasaj sayısı ≤ 5), 75 cm²'lik flakonlar içerisinde %10 fetal sıgır serumu (FBS), %1 sodyum piruvat ve 100 Ü penisilin-0.1 mg/ml streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ortamında, 37°C'de ve %5 CO₂ varlığında, %80-90 yaygınlık gösterene kadar çoğaltıldı. Hücreler yaygınlık gösterdiğinde %0,25 tripsin-EDTA ile pasajlama gerçekleştirildi. Ara dönemlerde ise hücreler antibiyotik içermeyen, %5 DMSO içeren tam hücre kültür ortamı içerisinde dondurularak saklandı.

3.2.2. Fenotiyazin Yapılı Bileşikler ile Muamele ve Hücre Lizatlarının Hazırlanması

PS70 hücreleri, 6 kuyucuklu veya 100 mm'lik hücre kültür plaklarına, sırasıyla; her kuyucukta $2.5-3 \times 10^5$ hücre veya her plakta $1.5-2 \times 10^6$ hücre olacak şekilde hücre kültürü ortamı içinde ekildi. Hücreler tutunup %80-90 yaygınlık gösterene kadar çoğaltıldı.

Stok TBO ve TH çözeltileri (0,25-3 mM) sırasıyla; PBS ve metanol içerisinde taze olarak hazırlandı ve 0,2 µm membran filtreler kullanılarak sterilize edildi. Uygulama günü hücre kültür ortamı, %1 FBS ve %1 sodyum piruvat içeren taze renksiz DMEM ortamı ile değiştirilerek, PS70 hücreleri, son konsantrasyonları 1,25-15 µM olacak şekilde fenotiyazin yapılı bileşiklerle (10 µl) veya PBS/metanol (kontrol, 10 µl) ile 37°C'de ve %5 CO₂ varlığında 6 saat veya 24 saat muamele edildi.

Fenotiyazin yapılı bileşiklerin sekrete sAPPα, Aβ40 veya Aβ42 düzeyleri üzerine etkisini incelemek için kültür ortamları toplandı, proteaz inhibitör karışımı eklenerek analizlerde kullanılmak üzere porsiyonlar halinde -20°C'de saklandı. Hücreler ise soğuk PBS ile iki kez yıkandıktan sonra, 1 mM EDTA, 1 mM fenilmetilsulfonil florür (PMSF) ve proteaz inhibitör karışımı içeren RIPA tamponu (150 mM NaCl, %1 IGEPAL® CA-630, %0,5 sodyum deoksikolat, %0,1 SDS ve 50 mM Tris, pH 8.0) ile 10 dk muamele edilerek, adhere hücrelerin plaklardan ayrılmasına izin verildi. Hücre süspansiyonları, daha sonra 4°C ve 13.000 g'de 20 dk

santrifüjlendi ve elde edilen süpernatantlar, hücre lizatları olarak analizlerde kullanılmaya kadar porsiyonlar halinde -20°C 'de saklandı.

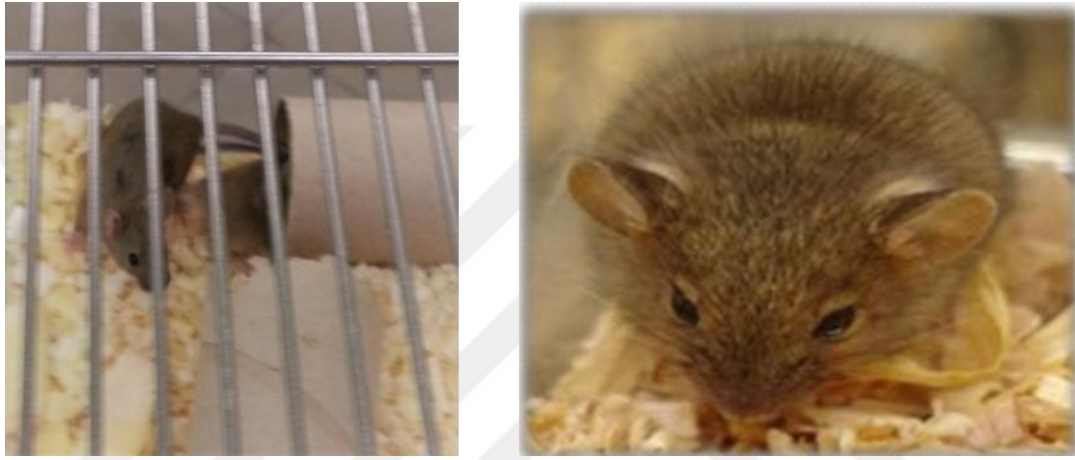
3.2.3. Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkilerinin Akım Sitometri ile Değerlendirilmesi

Fenotiyazin yapılı bileşiklerin PS70 hücre canlılığı üzerindeki etkileri, akım sitometri yöntemi ile aşağıdaki protokol uygulanarak analiz edildi:

PS70 hücreleri, 6 kuyucuklu hücre kültür plaklarına ekildi, 37°C 'de ve %5 CO_2 varlığında 24 saat inkübe edilerek hücrelerin plağa tutunmasına izin verildi. Uygulama günü ortam, %10 FBS ve %1 sodyum piruvat içeren taze DMEM ile değiştirildi. Daha sonra hücreler, son konsantrasyonu 1,25-15 μM /kuyucuk olacak şekilde ortama eklenen fenotiyazin yapılı bileşikler (10 μl) veya PBS/metanol (kontrol, 10 μl) ile 37°C 'de ve %5 CO_2 varlığında 6 saat veya 24 saat muamele edildi. Muamele sonrasında her bir kuyucuktaki kültür ortamları FACS tüplerine (5 ml) alındı. Hücreler bir kez 0,5 ml PBS ile yıkandı ve yıkama sonrasında bu sıvı, FACS tüpü içerisine aktarıldı. Daha sonra her kuyucuk, %0,25 tripsin-EDTA (0,5 ml) ile 5 dk inkübe edilerek, hücrelerin kuyucuklardan ayrılmasına izin verildi. Plaklardaki kuyucuklardan ayrılan hücrelerin üzerine tripsini inaktive etmek amacıyla; hemen 1,5 ml DMEM eklendi ve hücre süspansiyonları, FACS tüplerine aktarıldı. Kuyucuklar, iki kez 0,5 ml PBS ile yıkandı ve yıkama sonrasında bu sıvılar da aynı FACS tüpleri içerisine eklendi. Daha sonra FACS tüpleri içerisindeki hücre süspansiyonları, 750 g'de 5 dakika santrifüjlendi. Çöken hücrelerin üzerindeki sıvı uzaklaştırıldı ve hücreler 1 ml PBS ile yıkanarak, karışım 750 g'de 5 dk tekrar santrifüjlendi. Daha sonra PBS uzaklaştırılarak tüplerdeki çöken hücrelerin üzerine propidyum iyodür/PBS (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 200 μl) eklendi. Her analiz, FACS Aria akım sitometri cihazında 10.000 hücre/sn olacak şekilde gerçekleştirildi (Eksitasyon: 351 nm; Emisyon: 617 nm). Veriler, BD FACSDiva v6.1.2 yazılımı ile analiz edildi ve elde edilen sonuçlar, kontrole göre canlı hücre yüzdesi olarak gösterildi.

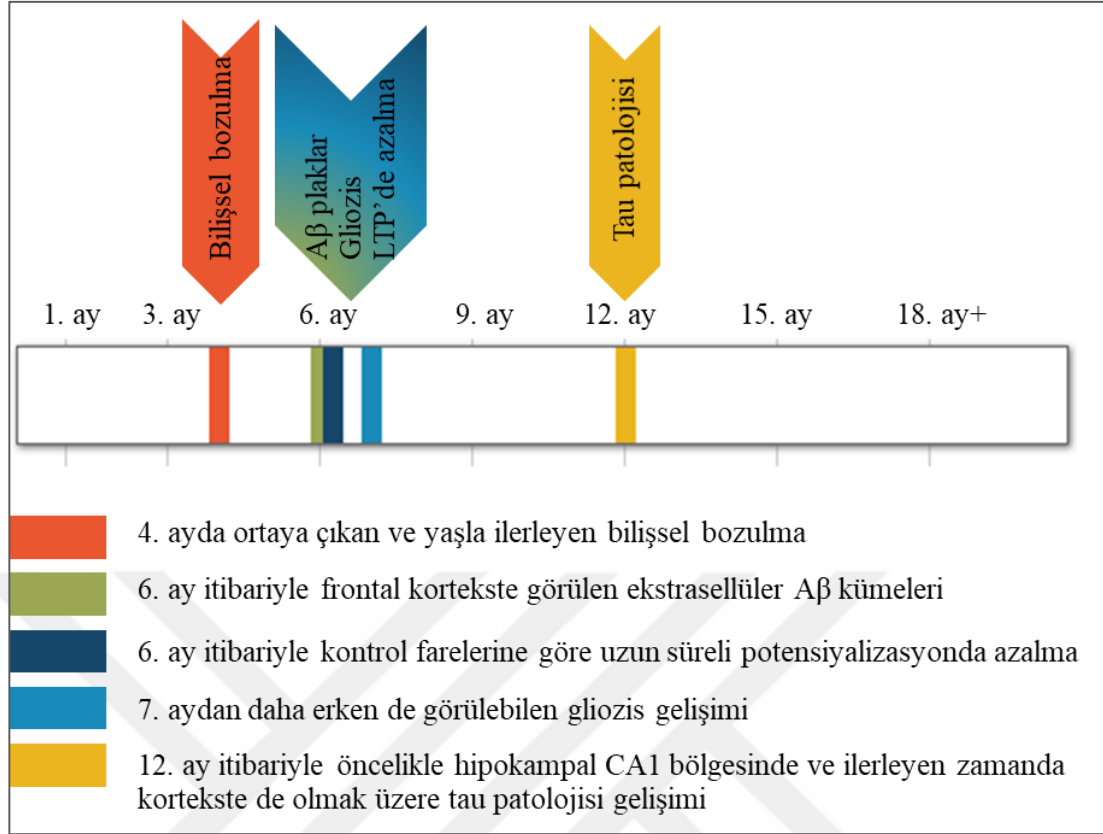
3.2.4. 3xTg-AD Fareler

AH'nin nöropatolojik özelliklerini (yaşa bağımlı A β patalojisi, tau patolojisi ve bilişsel fonksiyonlarda azalma) gösteren 3xTg-AD farelerde (B6;129-Psen1tm1Mpm Tg(APP^{Swe},tauP301L)1Lfa/Mmjax) ailesel Alzheimer hastalığı ile ilişkili APP İsveç mutasyonu, MAPT P301L mutasyonu ve PSEN1 M146V mutasyonu olmak üzere 3 adet mutasyon mevcuttur (Şekil 3.1.). Bu transgenlerin aşırı ekspresyonu, hipokampus ve serebral korteksi içeren merkezi sinir sistemi ile kısıtlıdır.



Şekil 3.1. 3xTg-AD transgenik fareler.

3xTg-AD farelerde A β depolanması, bazı beyin bölgelerinde 3-4 aya kadar erken yaşlarda görülebilmesine rağmen, hücre dışı A β depolanması, ön kortekste 6. aydan sonra gözlenebilmekte ve 12. aydan sonra çok yüksek seviyelere çıkmaktadır. Bu tip farelerde konformasyonel olarak değişmiş ve hiperfosforillenmiş tau agregatları ise 12-15 ay gibi daha geç yaşlarda hipokampus bölgesinde gözlenmektedir. Ayrıca 3xTg-AD farelerde, uzun süreli potansiyalizasyon (LTP) eksikliğini içeren sinaptik fonksiyon bozukluğu da plaklar ve düğümlerden önce meydana gelmektedir. Şekil 3.2.'de 3xTg-AD farelerin yaşla birlikte değişen fenotip karakterizasyonu detaylı olarak verilmiştir (194, 195).



Şekil 3.2. 3xTg-AD farelerde yaşla birlikte değişen fenotip karakterizasyonu (196).

Literatürde, erkek 3xTg-AD farelerin tanımlanan fenotipik özellikleri göstermeyebileceği rapor edildiği için çalışmada sadece dişi transgenik fareler kullanıldı (197, 198). Jackson Laboratuvarı'ndan satın alınan 3xTg-AD fareler (3 aylık, n=36, dişi), Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi'nde standart 12 saat gün ışığı/12 saat karanlık altında, su ve yem erişimi serbest olacak şekilde (*ad libitum*) muhafaza edildi. Transgenik farelerin fenotiyazin yapıları bileşiklerle muamele edilmesi ve beyin dokularının çıkarılması, Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınan onay (G.Ü. ET-13.009) çerçevesinde, Prof. Dr. K. Gonca Akbulut önderliğinde veterinerler tarafından etik kurallara uygun olarak gerçekleştirildi.

3.2.5. 3xTg-AD Farelerin Fenotiyazin Yapılı Bileşikler ile Muamelesi

Çalışma planına göre; 3xTg-AD fareler (3 aylık), iki gruba ayrıldı (Tablo 3.1.): Öncelikle fenotiyazin yapıları bileşiklerin Aβ patolojisine olan etkisini incelemek amacıyla transgenik farelerden 20'si 7,5 aylık olana kadar, kalan 16'sı ise fenotiyazin

yapılı bileşiğin hem A β birikimi, hem de tau patolojisi üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla, 13 aylık olana kadar Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi'nde steril koşullarda ve *ad libitum* beslenme ile yaşlandırıldı.

Tablo 3.1. 3xTg-AD transgenik farelerin fenotiyazin yapılı bileşiklerle muamele edilmesi

Uygulama yaşı, ay	Uygulama süresi, gün	Uygulanan bileşik	n
7,5	30	PBS +%5 EtOH	6
		TBO	7
		TH	7
13	30	PBS +%5 EtOH	7
		TBO	9

Fenotiyazin yapılı bileşiklerin A β patolojisi üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla; 7,5 aylık 3xTg-AD farelere, her gün aynı saatte 4 mg/kg olacak şekilde TBO (n=7), TH (n=7) ve %5 etanol içeren PBS (kontrol; n=6) intraperitoneal (i.p) olarak (enjeksiyon hacmi, ~0.1 ml) 1 ay boyunca uygulandı.

Daha sonra genç farelerden elde edilen sonuçlara bağlı olarak, TBO'nun hem A β patolojisi hem de tau hiperfosforilasyonu üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla; 13 aylık 3xTg-AD farelere, her gün aynı saatte 4 mg/kg olacak şekilde TBO (n=9) ve %5 etanol içeren PBS (kontrol, n=7), i.p olarak (enjeksiyon hacmi ~0.1 ml) 1 ay boyunca enjekte edildi.

Çalışmada fenotiyazin yapılı bileşiklerin uygulama dozu, daha önce çeşitli hayvanlar kullanılarak elde edilen toksisite sonuçlarına göre belirlendi. TBO'nun intravenöz uygulanması sonrasında LD₅₀ değerleri, fare, sıçan, tavşan ve koyun için sırasıyla; 27.56 mg/kg, 28.93 mg/mg, 13.44 mg/kg (199) ve 10 mg/kg (187) olarak rapor edilmiştir. TH'nin intravenöz uygulanması sonrasında kaydedilen LD₅₀ değerleri ise fare ve sıçan için sırasıyla; 8.03 mg/kg ve 7.40 mg/kg olarak bulunmuştur (199). Ayrıca, paratiroid bezlerinin teşhisinde insanlara uygulanabilecek optimum TBO dozunun belirlenmesi için yapılan araştırma sonuçları, 7 mg/kg'den daha düşük dozların güvenli olabileceğini önerirken; diğer bir çalışmada ise insanlarda

ferrihemoglobin tedavisinde 4 mg/kg TBO kullanılmasının yan etkilere neden olmadığı gösterilmiştir (188).

Çalışmada 3xTg-AD farelere uygulamak üzere, TBO ve TH çözeltileri (1 mg/ml), %5 etanol içeren PBS içerisinde her gün taze olarak hazırlandı ve 0,2 µm membran filtreden geçirilerek sterilize edildi. Uygulama başladıktan sonra, her hafta transgenik fareler tartıldı ve uygulama hacmi, her farenin kilosuna göre yeniden belirlendi. Uygulama süresi boyunca farelerde herhangi bir hastalık belirtisi veya anomali gözlenmedi. 1 ay boyunca fenotiyazinlerle muamele edilen transgenik fareler, daha sonra ketamin- ksilazin anestezisi altında feda edilerek beyin dokuları (serebral korteks, hipokampus, serebellum ve diğer kısımlar) çıkarıldı, dokular kullanılıncaya kadar -86°C’de saklandı.

3.2.6. 3xTg-AD Fare Beyin Dokularından Protein Ekstraksiyonu

Fenotiyazin yapılı bileşikler veya PBS +% 5 EtOH ile muamele edilen 3xTg-AD farelerin beyin dokuları (hipokampus ve/veya serebral korteks) iki basamaklı ekstraksiyon yöntemi kullanılarak aşağıdaki protokole göre homojenize edildi (200).

Korteks ve hipokampus dokuları, kendi ağırlıklarının 8 katı kadar hacimde proteaz inhibitör karışımı içeren RIPA tamponu içerisinde cam Dounce homojenizatör ile buz üzerinde parçalandı. Homojenize edilen karışımlar, 4°C’de 100.000 g’de, 1 saat 15 dakika ultrasantrifüjlendi ve elde edilen süpernatantlar, çözünür fraksiyon (RIPA-çözünür) olarak kullanılıncaya kadar porsiyonlar halinde, -86°C’de saklandı.

Kalan pellet üzerine ise, başlangıçtaki doku ağırlığının 8 katı kadar hacimde proteaz inhibitör karışımı içeren %70 formik asit eklendi ve pellet 5 sn süreyle 10 kHz hızda 3 kez buz üzerinde sonike edildi. Sonikasyonun ardından karışım, oda sıcaklığında 150 rpm’de 2 saat karıştırıldı, Daha sonra karışım, 4°C’de 100.000 g’de 1 saat santrifüjlendi, elde edilen süpernatant, çözünmeyen fraksiyon (FA-çözünür) olarak kullanılıncaya kadar porsiyonlar halinde -86 °C’de saklandı.

3.2.7. Protein Tayini

Hücre lizatı ve kültür ortamındaki total protein miktarları ile fare korteks ve hipokampus doku homojenatlarına ilişkin çözünür proteinleri içeren RIPA-çözünür fraksiyon içindeki total protein düzeyleri, BCA protein tayin yöntemine göre belirlendi

(201). Fare korteks/hipokampus doku homojenatlarına ilişkin çözünmeyen proteinleri içeren formik asit-çözünür fraksiyon içindeki total protein miktarları ise Bradford yöntemine göre belirlendi (202). Her iki yöntemde de bilinen derişimlerde sığır serum albümini ile hazırlanan standart eğriler kullanılarak, örneklerdeki total protein miktarları tespit edildi.

3.2.8. sAPP α , A β 40 ve A β 42 Düzeylerinin ELISA ile Tayini

In vitro ve *in vivo* çalışmalar sonrasında fenotiyazinin sAPP α ve A β peptit düzeyleri üzerindeki etkileri, sandviç ELISA ile değerlendirildi. ELISA yöntemi, her bir kitin protokolüne göre gerçekleştirildi (203, 204).

ELISA plağına örnekleri yüklemeyden önce, olası partikülleri gidermek amacıyla; tüm örnekler, 3000 rpm'de, 4 °C'de 5 dakika santrifüjlendi. Ayrıca, hücre kültürü ortamı örnekleri ve RIPA-çözünür fraksiyonlar, standart dilüent tampon ile seyreltikten sonra ELISA plağına uygulanırken, FA-çözünür fraksiyonlar, öncelikle 1:20 oranında nötralizasyon tamponu (1 M Tris-baz, 0,5 M NaH₂PO₄, pH 11) ile nötralize edildi ve sonrasında standart dilüent tampon ile dilüe edilerek ELISA plağına yüklendi. Daha sonra kitin protokolüne aynen uyularak, hem standartlar hem de örneklerin absorbanları 450 nm'de mikroparka okuyucusu ile ölçüldü.

Standart eğri oluşturmada, log-log veya dört parametre lojistik eğri grafikleme yöntemleri kullanıldı. Örneklerdeki sAPP α , A β 40 ve A β 42 miktarları standart eğri yardımıyla belirlenerek; bulunan değerler total protein miktarlarına göre normalize edildi.

3.2.9. SDS-PAGE ve Western Blot

Hücre Lizatlarının Jele Yüklenmesi

PS70 hücrelerinde fenotiyazin yapıllı bileşiklerin hücre içi APP ve BACE1 ekspresyonu üzerine olan etkileri, *Western blot* yöntemi ile analiz edildi. Hücre lizatları (15-25 μ g protein) 1:1 oranında 2x *Laemmli* tamponu (0,125 M Tris/HCl pH 6,8, %20 gliserol, %4 SDS, %0,0025 bromfenol mavisi, %10 β -merkaptoetanol) ile karıştırıldı, 95 °C'de 5 dakika kaynatıldı ve *stain free any kD™ Mini-Protean® TGX™ precast* jelle (Bio-Rad) yüklenerek, SDS-PAGE işlemine tabi tutuldu (200 V, ~1 saat).

Fare Hipokampus Doku Homojenatlarının Jele Yüklmesi

Transgenik farelerde TBO'nun APP, BACE1, PS1 ve tau hiperfosforilasyonu üzerindeki etkisini değerlendirmek için *Western blot* yöntemi kullanıldı.

RIPA-çözünür örnekler, 2x *Laemmli* tamponu ile 1:1 oranında karıştırıldıktan sonra 95 °C'de beş dakika kaynatıldı.

FA-çözünür örnekler ise öncelikle formik asiti uzaklaştırmak amacıyla *Benchtop Manifold freeze dryer* ile kuru buz içerisinde gece boyunca liyofilize edildi. Daha sonra pellet üzerine %0,00125 bromfenol mavisi ve %5 β-merkaptoetanol içeren tampon (70 mM Tris/HCl pH 6.8, %1,5 SDS, %20 gliserol) eklendi. Çözünmeyi kolaylaştırmak için örnekler hafifçe karıştırılarak 95 °C'de beş dakika kaynatıldı.

Transgenik farelerin hipokampuslarına ait RIPA- ve FA-çözünür örnekler (30-50 µg protein), *stain free any kD™ Mini-Protean® TGX™ precast* jele yüklenerek SDS-PAGE işlemine tabi tutuldu (200 V, ~1 saat).

Membrana Transfer ve Görüntüleme

SDS-PAGE sonrasında her bir jel, UV ışığı altında 1 dakika aktive edilerek, jeldeki proteinler Bio-Rad ChemiDoc XRS+ cihazı ile görüntülendi. Daha sonra jeldeki proteinler, Bio-Rad mini trans-blot elektroforetik transfer hücresi kullanılarak, PVDF membrana (0,45 µm) transfer edildi (100 V, 1 saat). Transfer işlemi tamamlandıktan sonra, UV ışığı ile aktive edilmiş proteinleri içeren membranın görüntüsü alındı.

Daha sonra membran, %5 yağsız süt tozu içeren TBS-T (20 mM Tris, 150 mM NaCl ve % 0,05 (v/v) Tween 20, pH 7.6) tamponu içerisinde oda sıcaklığında 2-3 saat çalkalandı, non-spesifik bölgeler blokladı. Bloklama sonrasında membran, %3 yağsız süttozu içeren TBS-T içerisindeki uygun primer antikor (Tablo 3.2.) ile 4°C'de gece boyunca inkübe edildi. Membrana bağlanmayan primer antikorun fazlası, membranın 3 kez 10 dakika TBS-T tamponu ile yıkanması ile uzaklaştırıldı. Daha sonra membran, %3 yağsız süttozu içeren TBS-T tamponu içerisindeki HRP ile konjüge sekonder antikor (anti-fare IgG-peroksidaz veya anti-tavşan IgG-peroksidaz, 1:40.000) ile 1 saat oda sıcaklığında muamele edildi. Bağlanmayan sekonder antikorun fazlası, membranın 3 kez 10 dakika süreyle TBS-T tamponu ile yıkanması ile

uzaklaştırıldı. Son aşamada protein bantlarını görüntülemek amacıyla membran, ECL veya *Supersignal West Femto* kemilüminesans substrat ile 1-5 dakika inkübe edildi, plastik bir membran koruyucu içerisinde Bio-Rad görüntüleme cihazına yerleştirilerek görüntülendi. Bantların dansitometrik analizleri ve total proteine göre normalizasyonları, ImageLab™, sürüm 5.1 yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi.

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan primer antikorlar

Primer antikor	Hedef	Kaynak	Dilüsyon faktörü	Sağlayıcı Firma
Anti- β -Amiloid 1-16 (6E10)	İnsan beta amiloid 1-16	Fare monoklonal	1:1000	BioLegend
Anti-BACE1 (C-terminal)	Beta sekretaz	Tavşan poliklonal	1:1000	BioLegend
Anti-presenilin 1 (EP2000Y)	Presenilin 1	Tavşan monoklonal	1:5000	Abcam
Anti-Human Tau (HT7)	Epitop insan tau 159-163 aa	Fare monoklonal	1:1000	ThermoFisher Scientific
Anti-Human PHF-Tau (AT270)	İnsan fosfo PHF-tau Thr 181	Fare monoklonal	1:400/1:800	ThermoFisher Scientific
Anti-Human PHF-Tau (AT8)	İnsan fosfo PHF-tau Ser 202+Thr 205	Fare monoklonal	1:200	ThermoFisher Scientific

Ayrıca farklı bir primer antikorla muamele edilmek istenen membranlardan primer ve sekonder antikorlar, *Western blot stripping* tamponu yardımı ile aşağıdaki protokole göre kaldırıldı:

Öncelikle membran 15-30 dakika 37°C’de *Western blot stripping* tamponu içerisinde çalkalandı. Membran, daha sonra 4 kez, 15 dakika TBS-T ile yıkandı ve sekonder antikor ile tekrar muamele edilerek membrandan primer antikorun tamamen soyulduğu gözlemlendi. Sonrasında membran 3x15 dakika TBS-T ile yıkandıktan sonra

bloklamaya bırakıldı ve uygun primer ve sekonder antikorlarla yukarıda belirtildiği gibi, muamele edildi.

3.2.10. İstatistiksel Veri Analizi

Tüm veriler, ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası (SH) olarak gösterilmiştir. Hücre kültürü çalışmalarından elde edilen veriler, çoklu gruplar arası farklılıkların değerlendirilmesi için *repeated measures ANOVA* testi ile ve bunun ardından ikili grupların karşılaştırmaları *Dunnett's* veya *Bonferroni's post hoc* testleri ile analiz edildi.

Uygulamaya başlamadan önce ve uygulama tamamlandıktan sonra transgenik farelerdeki kilo değişimlerinin değerlendirilmesinde, iki yönlü ANOVA testi ve bunun ardından ikili grupların karşılaştırmaları için *Dunnett's post hoc* testi kullanıldı. Transgenik fare çalışmalarından elde edilen diğer veriler ise, çoklu grup karşılaştırmaları için *Kruskal-Wallis* testi ile ve bunun ardından ikili grup karşılaştırmaları *Dunnett post-hoc* testi ile değerlendirildi. Sadece ikili grup karşılaştırmalarında ise *Mann-Whitney U* testi kullanıldı. 0,05'in altındaki *p* değeri anlamlı olarak alındı. İstatiksel yazılım olarak GraphPad Prism 5, sürüm 5.03 kullanıldı.

4. BULGULAR

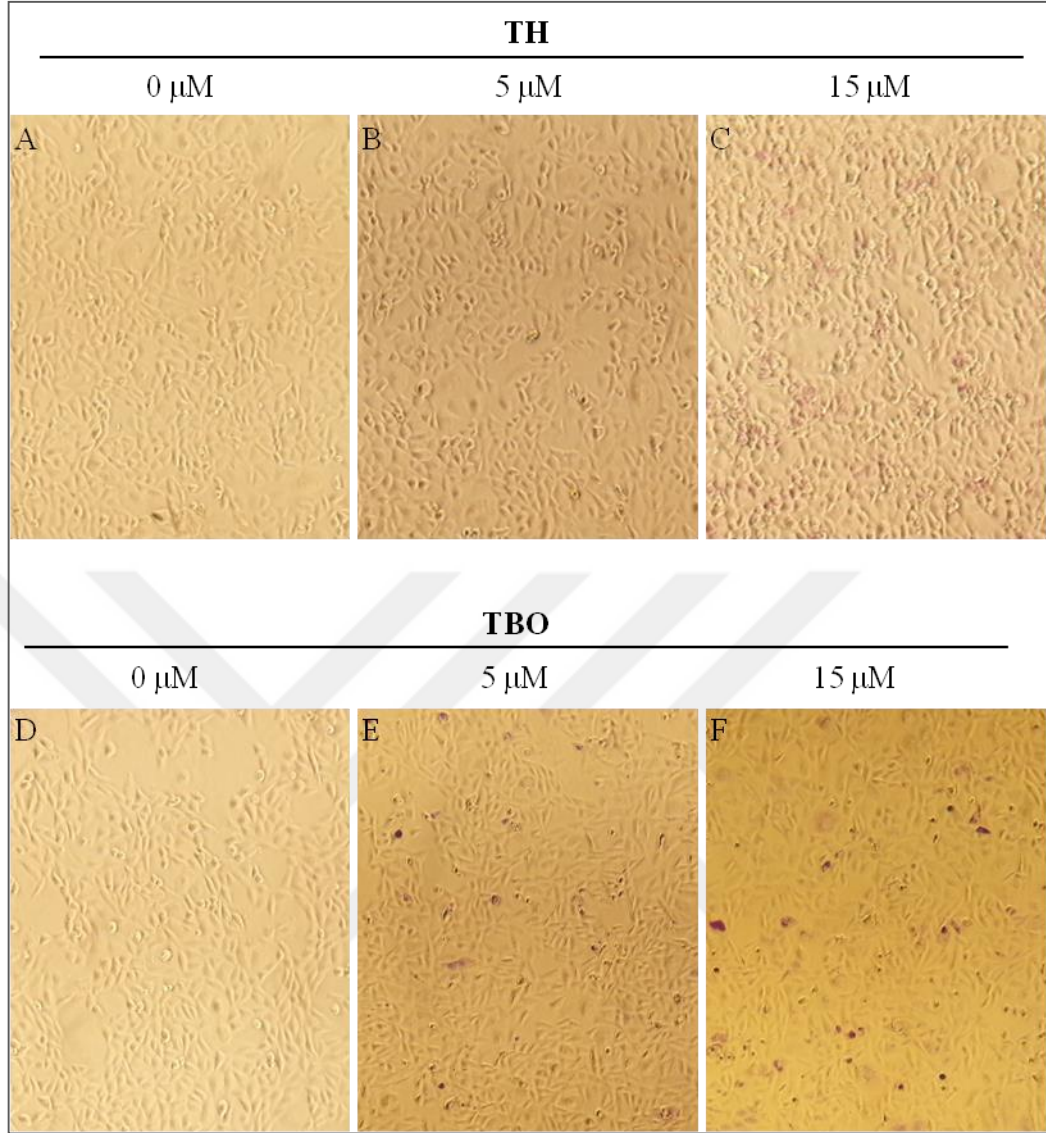
4.1. AH Patolojisi Gösteren Hücresel Modelde Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin Hücre Canlılığı ve Amiloid Patolojisi Üzerine Etkileri

4.1.1. Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin PS70 Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

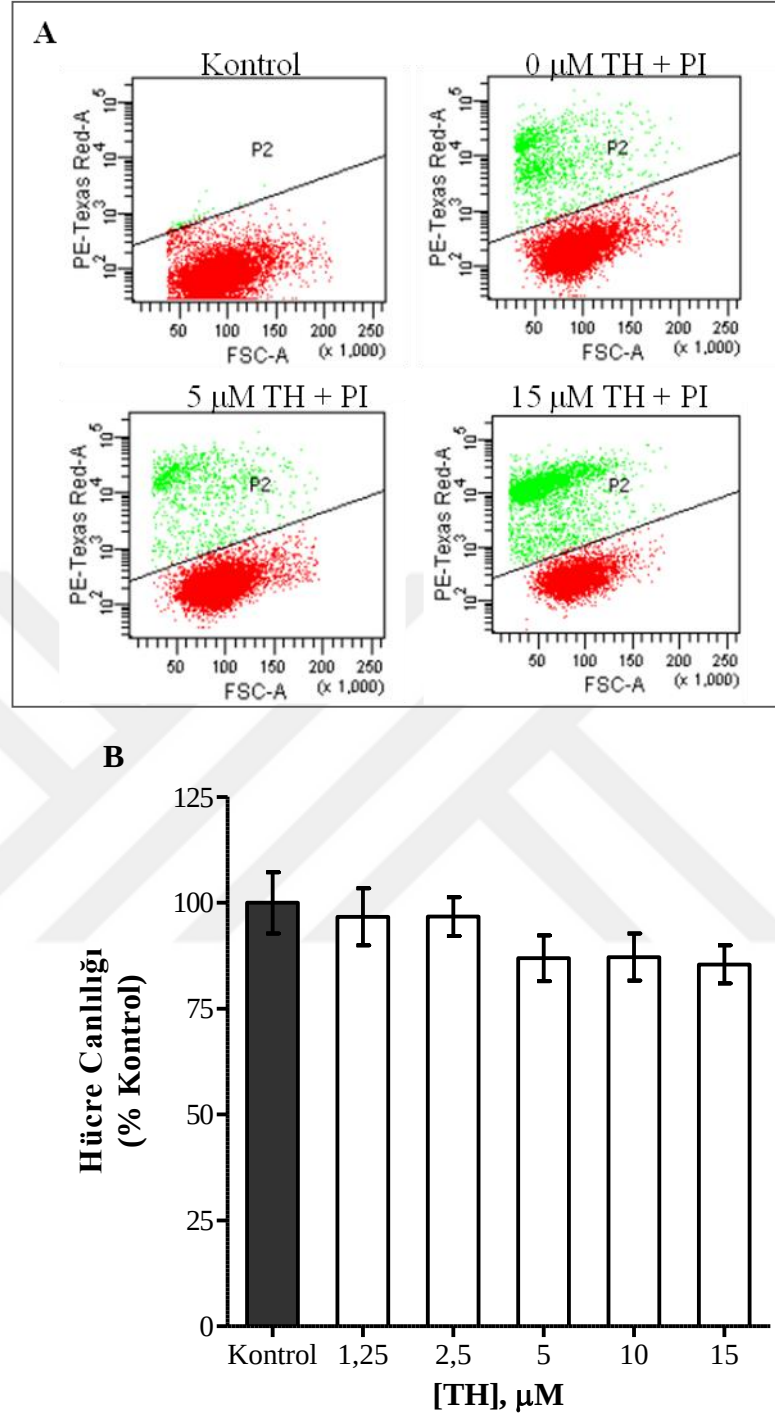
TBO veya TH'nin PS70 hücre canlılığı üzerine etkileri, propidyum iyodür (PI) kullanılarak, akım sitometrisi ile analiz edildi. PI, membran bütünlüğü bozulmuş ölü hücrelerin içerisine giren ve DNA çift zincirine bağlanarak hücreleri boyama özelliğine sahip bir boyadır.

Çalışmada, PS70 hücreleri 0-15 μ M TBO veya TH ile 6 saat ve/veya 24 saat muamele edildi. 24 saat sonunda hücreler, *inverted* mikroskop ile incelendiğinde; TH ile muamele edilmiş hücrelerin canlılığı etkilenmezken (Şekil 4.1A.-C.), TBO ile muamele edilmiş hücrelerin ise kontrole göre; hücre canlılığının olumsuz olarak etkilendiği gözlemlendi. Akım sitometrisi sonuçları da bu gözlemleri doğrulayarak, 24 saat muamele sonrasında TBO'nun doza bağımlı olarak hücre canlılığını azalttığını TH'nin ise hücre canlılığında anlamlı bir değişime yol açmadığını gösterdi (Şekil 4.2.).

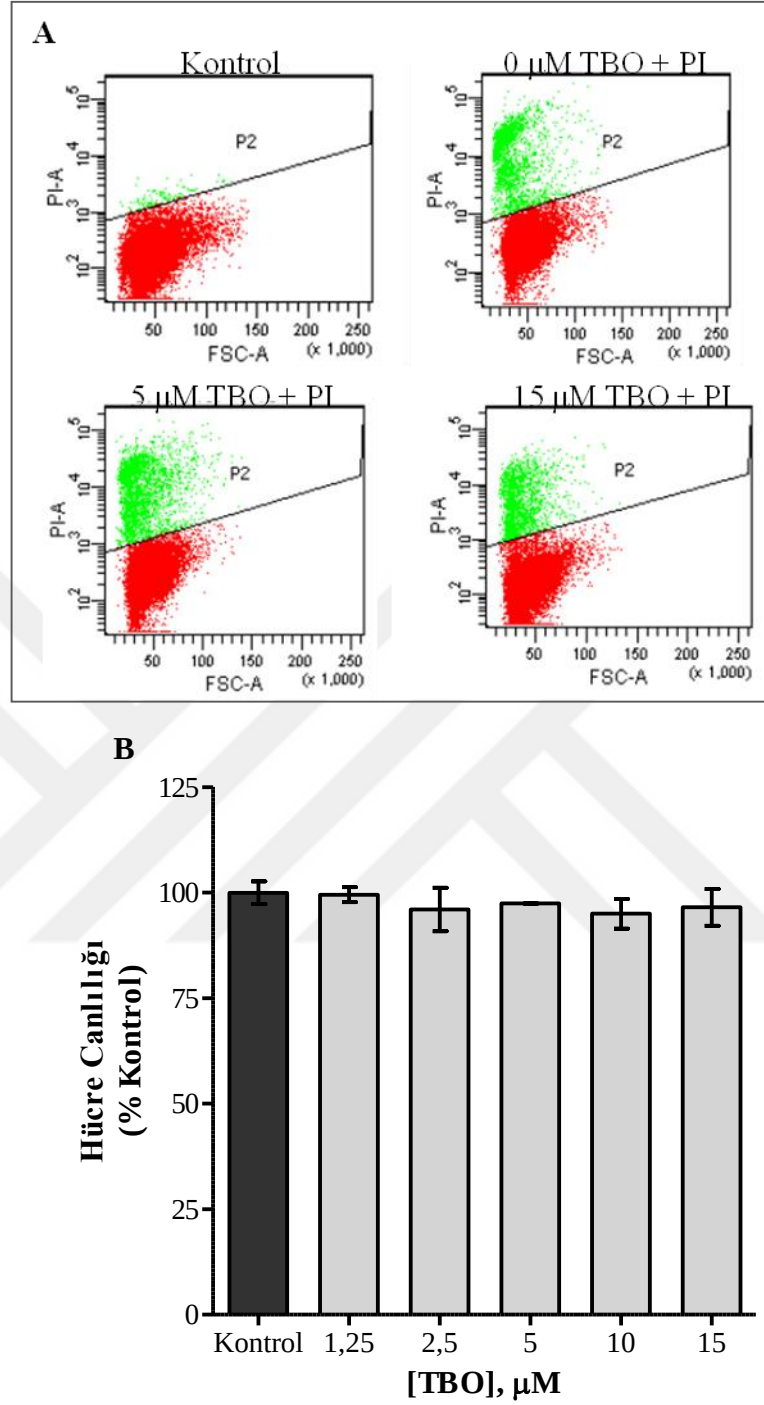
PS70 hücrelerinin 6 saat 0-15 μ M TBO ile muamelesi sonrasında gerçekleştirilen mikroskopik gözlem (Şekil 4.1D.-F.) ve akım sitometrisi sonuçlarına (Şekil 4.3.) göre ise; kontrol hücrelerine göre, hücre canlılığı açısından anlamlı bir değişimin olmadığı bulundu. Bu nedenle, PS70 hücrelerinin çalışılan konsantrasyonlarda fenotiyazin yapılı bileşikler ile muamele süreleri, TBO ve TH için sırasıyla; 6 saat ve 24 saat olarak belirlendi.



Şekil 4.1. Fenotiyazin yapıli bileşiklerle muamele edilen PS70 hücrelerinin inverted mikroskop ile elde edilen görüntüleri. (A-C) 0-15 μ M TH ile 24 saat veya (D-F) 0-15 μ M TBO ile 6 saat muamele edilen PS70 hücreleri, 40X objektif altında görüntülenmiştir.



Şekil 4.2. TH'nin PS70 hücre canlılığı üzerine etkisi. 0-15 μM TH ile 24 saat muamele edilen PS70 hücrelerinde, hücre canlılığındaki değişim, akım sitometrisi ile değerlendirildi. **(A)** TH ile muamele edilmiş PS70 hücrelerinde ölü ve canlı hücre dağılımını gösteren temsili akım sitometrisi grafikleri (yeşil noktalar, ölü hücreler; kırmızı noktalar, canlı hücreler). **(B)** TH ile muamele sonrasında akım sitometrisi ile ölçülen hücre canlılığındaki değişimin kontrole göre yüzdesel olarak ifadesi, $\text{ort} \pm \text{SH}$ ile gösterilmiştir ($n=5$; *Repeated measures ANOVA*; $p > 0.05$).



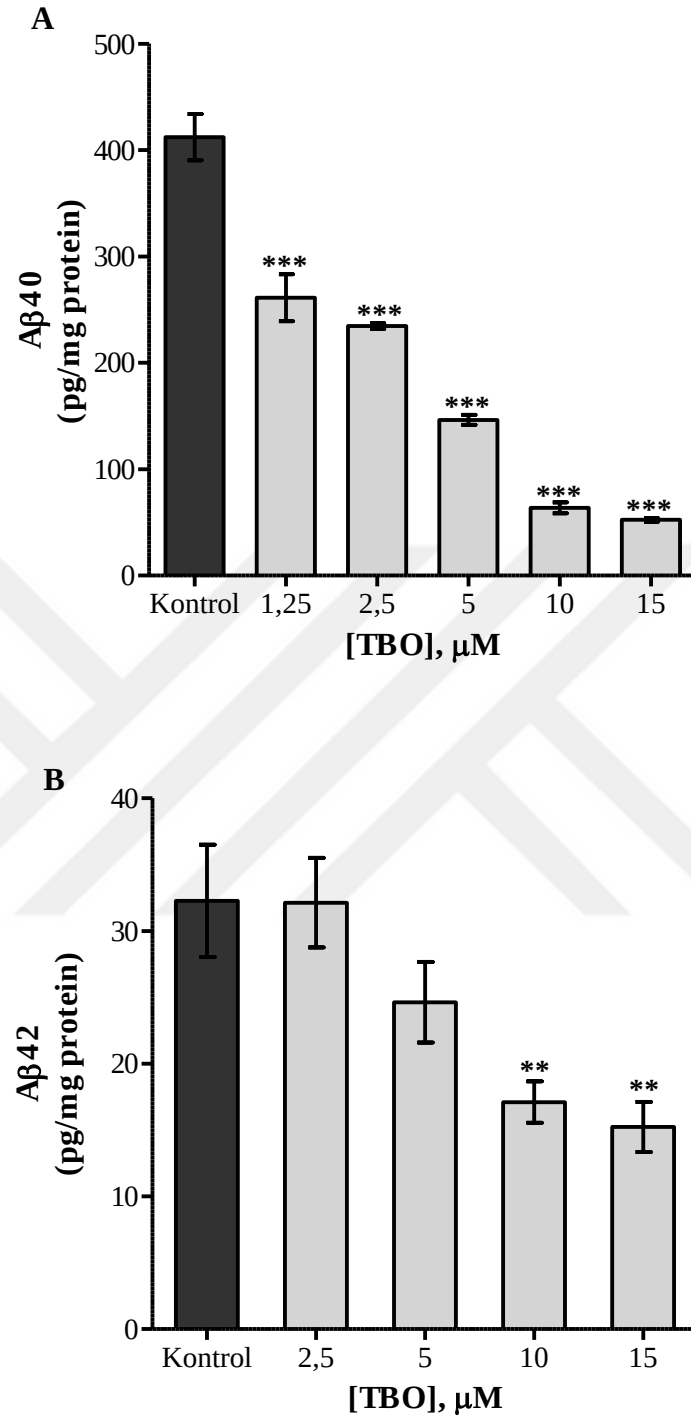
Şekil 4.3. TBO'nun PS70 hücre canlılığı üzerine etkisi. 0-15 μM TBO ile 6 saat muamele edilen PS70 hücrelerinde, hücre canlılığındaki değişim akım sitometrisi ile değerlendirildi. **(A)** TBO ile muamele edilmiş PS70 hücrelerinde ölü ve canlı hücre dağılımını gösteren temsili akım sitometrisi grafikleri (yeşil noktalar, ölü hücreler; kırmızı noktalar, canlı hücreler). **(B)** TBO ile muamele sonrasında akım sitometrisi ile ölçülen hücre canlılığındaki değişimin kontrole göre yüzdesel olarak ifadesi, $\text{ort} \pm \text{SH}$ olarak gösterilmiştir ($n=3$; *Repeated measures ANOVA*; $p > 0.05$).

4.1.2. PS70 Hücrelerinde Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin A β Patolojisi Üzerine Etkileri

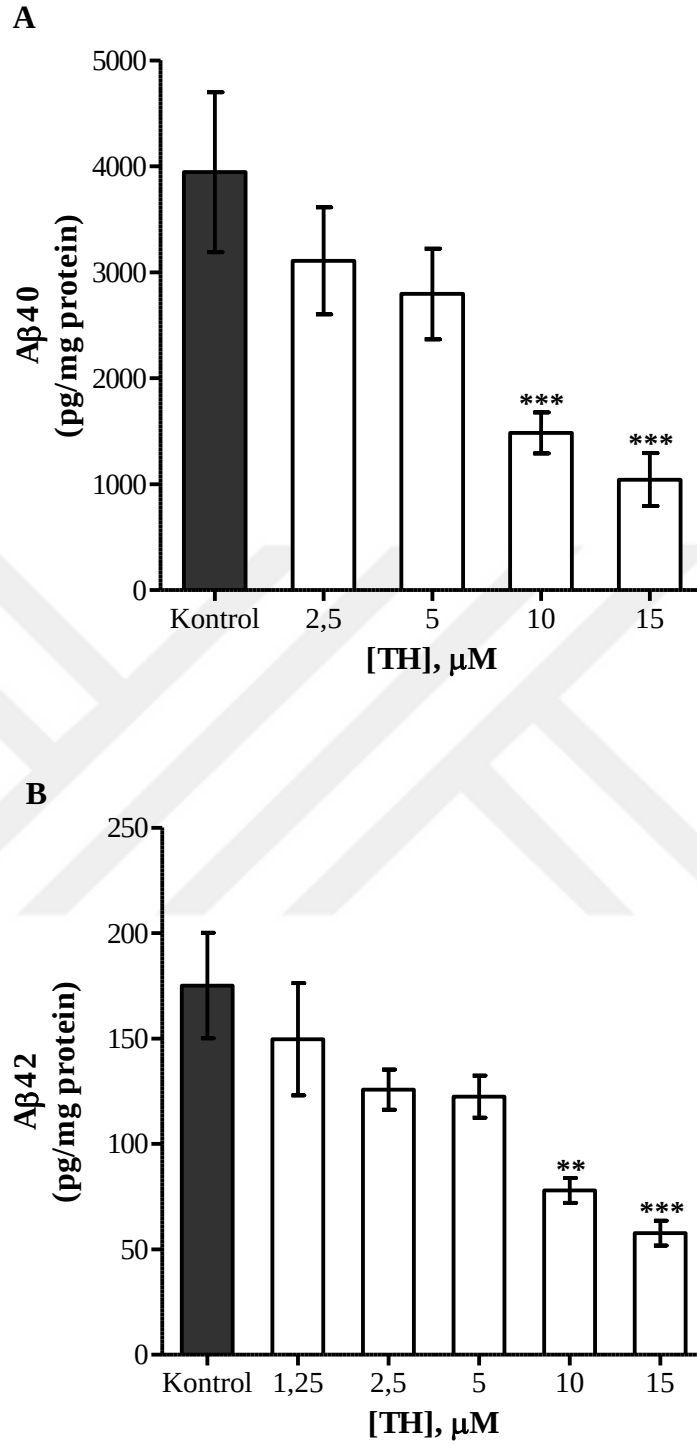
PS70 hücreleri, 0-15 μ M TBO ve TH ile sırasıyla; 6 saat ve 24 saat süre ile muamele edildi ve belirtilen süreler sonunda hücre kültürü ortamları toplandı. Daha sonra sandviç ELISA yöntemi kullanılarak, aynı örneklerde sekrete A β 40 ve A β 42 düzeyleri belirlendi.

PS70 hücrelerinin farklı derişimlerde TBO ile muamele edilmesi sonrasında, hücre dışına salıverilen A β 40 ve A β 42 düzeylerinde doza bağımlı azalma gözlemlendi. TBO'nun A β 40 salıverilmesi üzerine olan inhibe edici etkisi, kontrole karşılaştırıldığında; 1,25 μ M TBO için %37 iken, 15 μ M TBO'da %87 idi. (***, $p < 0.001$). Elde edilen veriler istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde; çalışılan tüm TBO derişimleri için A β 40 düzeyindeki azalmanın anlamlı olduğu saptandı (Şekil 4.4A.). Diğer taraftan, 10 μ M ve 15 μ M TBO ile muamele edilen hücrelerde A β 42 düzeylerinin kontrole göre sırasıyla; %47 ve %53 oranında azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu (**, $p < 0.01$) (Şekil 4.4B.).

TH ile muamele edilen PS70 hücrelerinde, kültür ortamına salıverilen A β 40 ve A β 42 düzeylerinde de doza bağımlı bir azalma gözlemlendi. 10 μ M ve 15 μ M TH ile muamele sonrasında, A β 40 düzeyleri, sırasıyla; kontrolün %38'i ve %26'sı kadardı (***, $p < 0.001$) (Şekil 4.5A.). Benzer şekilde, 10 μ M ve 15 μ M TH ile muamele sonrasında A β 42 salıverilmesinin kontrole göre sırasıyla; %55 (**, $p < 0.01$) ve %67 (***, $p < 0.001$) oranında anlamlı olarak azaldığı bulundu (Şekil 4.5B.).



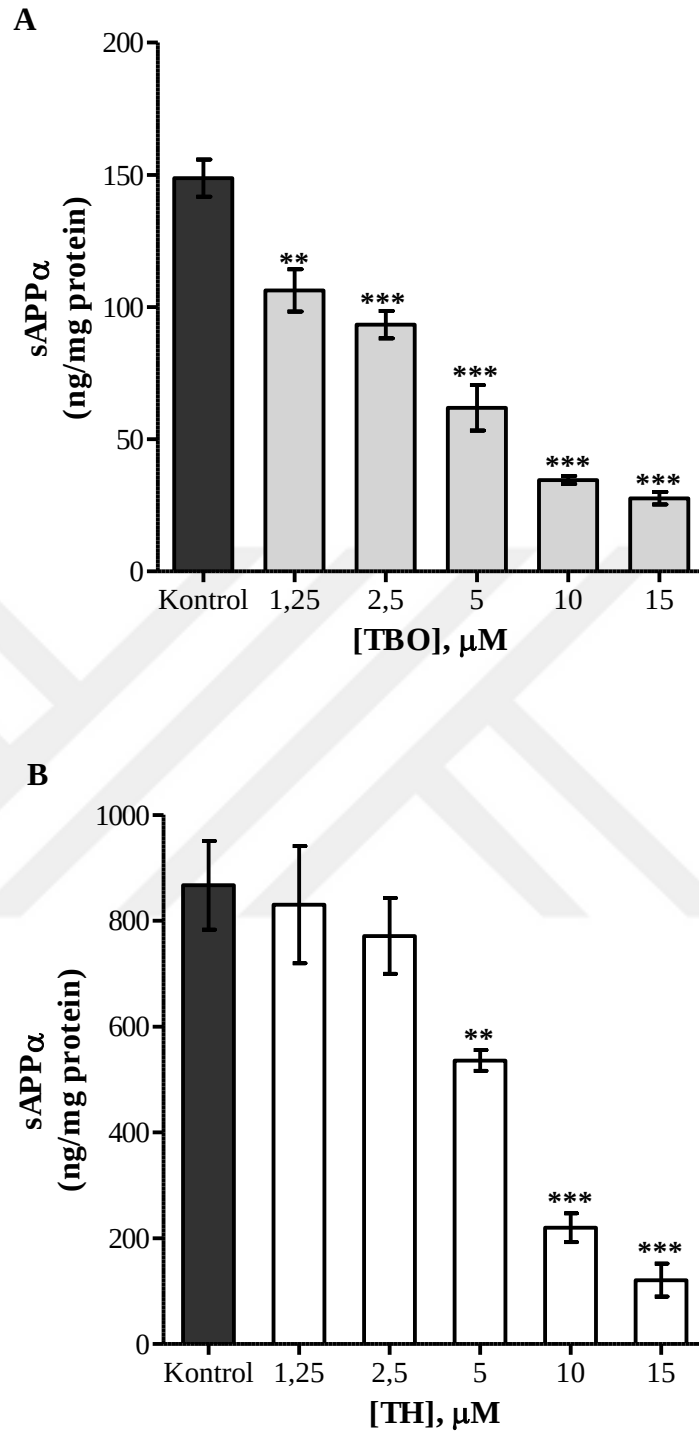
Şekil 4.4. PS70 hücrelerinde TBO'nun A β peptit düzeyleri üzerine etkisi. 0-15 μM TBO ile 6 saat muamele sonrasında, PS70 hücrelerinde ortama salıverilen (A) A β 40 ve (B) A β 42 düzeylerindeki değişim. 3 bağımsız deneyin verileri, $\text{ort} \pm \text{SH}$ olarak gösterilmiştir (*Repeated measures ANOVA-Dunnett's post hoc testi*; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).



Şekil 4.5. PS70 hücrelerinde TH'nin A β peptit düzeyleri üzerine etkisi. 0-15 μM TH ile 24 saat muamele sonrasında, PS70 hücrelerinde ortama salıverilen (**A**) A β 40 ve (**B**) A β 42 düzeylerindeki değişim. 3-4 bağımsız deneyin verileri, $\text{ort} \pm \text{SH}$ olarak gösterilmiştir (*Repeated measures ANOVA- Dunnett's post hoc testi*; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

4.1.3. PS70 Hücrelerinde Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin Hücre Dışına Salınan sAPP α Üzerine Etkileri

Çalışmada sAPP α düzeyleri, A β peptit düzeylerinin analiz edildiği aynı kültür ortamı örneklerinde sandviç ELISA yöntemi kullanılarak incelendi. Elde edilen sonuçlara göre, 6 saat muamele sonrasında TBO'nun sAPP α düzeylerini çalışılan her dozda kontrole göre azalttığı ve bu azalmaların istatistiksel açıdan anlamlı olduğu gözlemlendi (Şekil 4.6A.). 1,25-15 μ M TBO ile muamele edilen PS70 hücrelerinde sAPP α düzeylerindeki azalma, kontrole göre %29 - %81 oranındaydı (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$). Diğer yandan, kontrole karşılaştırıldığında; TH ile muamele edilen PS70 hücrelerinde sAPP α düzeyindeki azalmalar 5 μ M, 10 μ M ve 15 μ M için sırasıyla; %38 (**, $p < 0.01$), %75 ve %86 (***, $p < 0.001$) oranında olup, bu azalmaların istatistiksel açıdan anlamlı olduğu bulundu (Şekil 4.6B.).

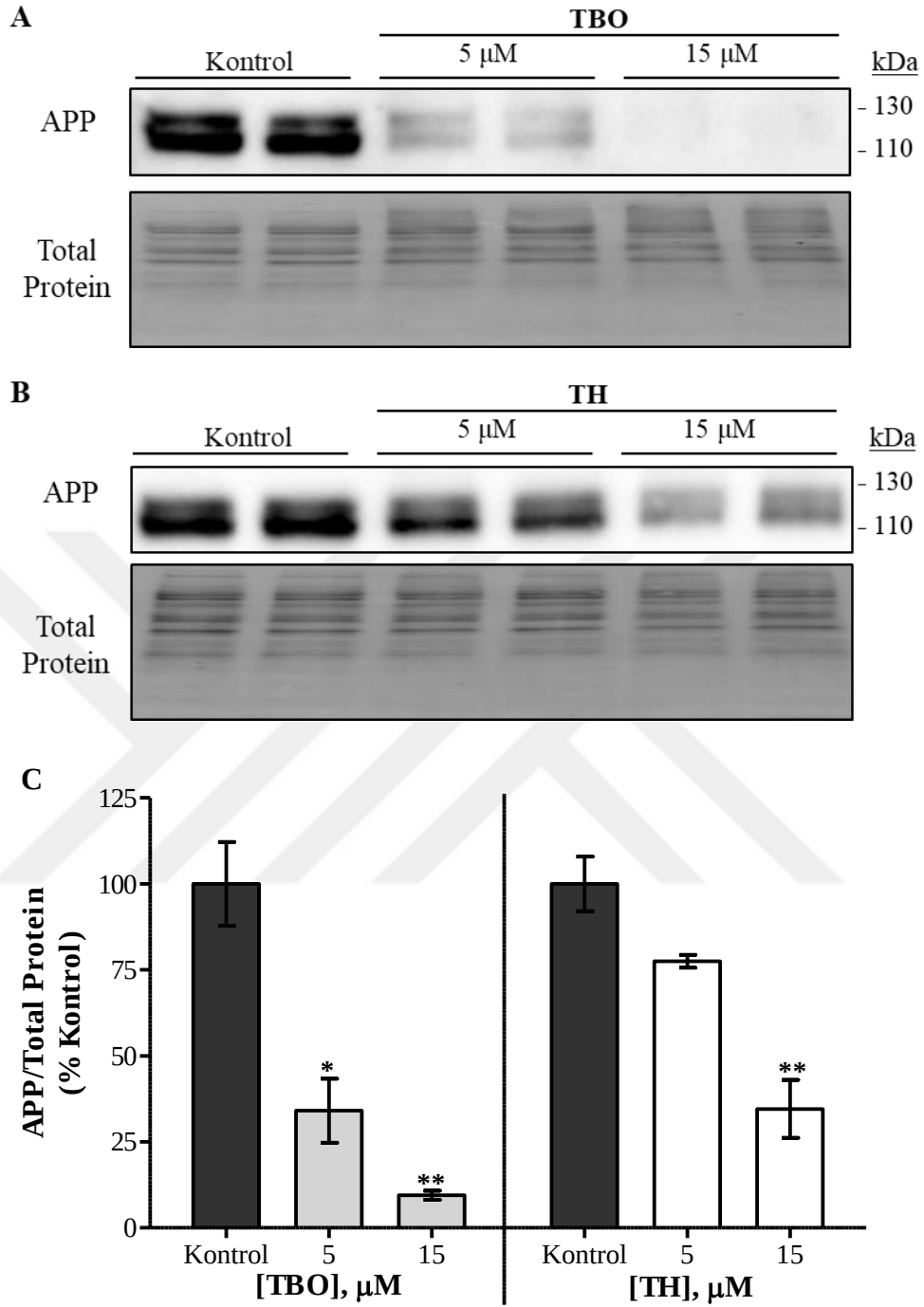


Şekil 4.6. Fenotiyazin yapıli bileşiklerin PS70 hücrelerinde sAPP α düzeyi üzerine etkileri. (A) 6 saat TBO veya (B) 24 saat TH ile muamele edilen PS70 hücrelerinde ortama salıverilen sAPP α düzeylerindeki değişim. 3 bağımsız deneyin verileri, $\text{ort} \pm \text{SH}$ olarak gösterilmiştir (*Repeated measures ANOVA-Dunnett's post hoc testi*; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

4.1.4. PS70 Hücrelerinde Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin Hücre İçi Total APP Üzerine Etkileri

PS70 hücrelerinin fenotiyazin yapılı bileşikler ile muamelesi sonrasında; gözlenen sekrete A β peptit düzeylerindeki azalmanın, total APP ekspresyonundaki olası bir azalmadan kaynaklanabileceği düşünüldü. Bu nedenle PS70 hücre lizatlarında, fenotiyazin yapılı bileşiklerin total APP düzeyleri üzerine etkisi, insan A β peptitinin 1-16 amino asit sekansına spesifik 6E10 antikoru kullanılarak, western blot yöntemi ile değerlendirildi. Western blot sonuçları, hücre içindeki APP'nin mRNA işlenmesinden ve posttranslasyonel modifikasyonlardan dolayı 110 ve 130 kDa olmak üzere iki bant verdiğini göstermektedir (Şekil 4.7A. ve 4.7B.). Dansitometrik analizler için APP'ye ait gözlenen iki bant birleştirildikten sonra, elde edilen bant yoğunlukları, her şeritteki total protein miktarına göre normalize edildi ve veriler kontrolün yüzdesi olarak gösterildi.

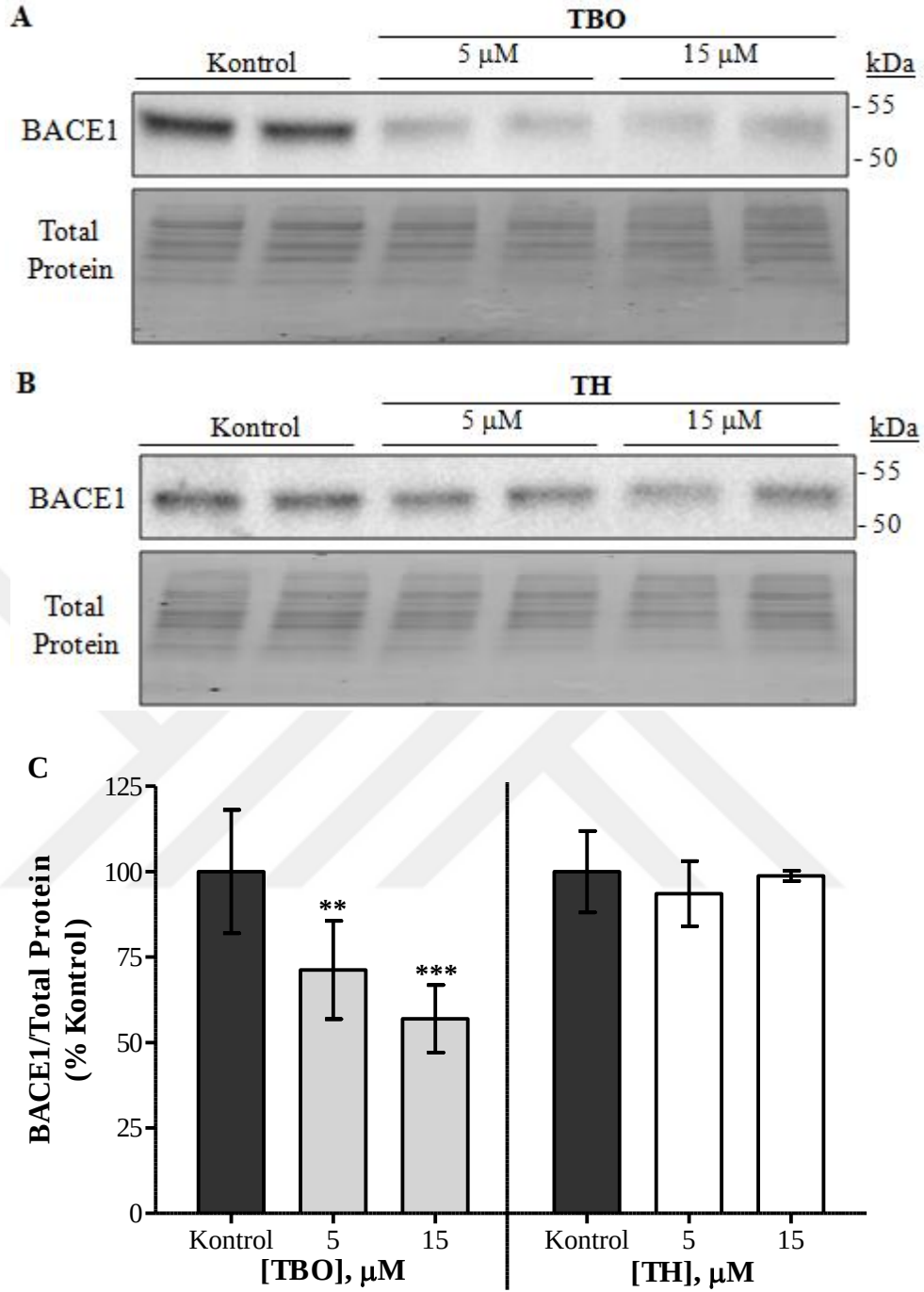
Sonuçlar, her iki fenotiyazin yapılı bileşiğin, A β peptit ve sAPP α salıverilmesindeki azalmaya paralel olarak, hücre içindeki APP düzeylerini de doza bağımlı olarak azalttığını işaret etti. Şekil 4.7C.'de görüldüğü gibi, 5 μ M TBO muamelesi hücre içi APP düzeyini kontrole göre; %66 oranında azaltırken (*, $p < 0.05$), 15 μ M TBO, %90 oranında bir azalmaya neden oldu (**, $p < 0.01$). Diğer taraftan, 5 μ M ve 15 μ M TH ile muamele edilmiş hücrelerde hücre içi APP düzeyleri, kontrole göre sırasıyla; %22 ve %65 oranında azaldı (**, $p < 0.01$) (Şekil 4.7C.).



Şekil 4.7. PS70 hücrelerinde fenotiyazin yapıları bileşiklerin hücre içi APP üzerine etkileri. Hücre lizatlarında APP düzeylerindeki değişim, 6E10 antikoru kullanılarak Western blot analizi ile değerlendirildi. **(A)** 0-15 μ M derişimlerde, 6 saat TBO (n=3) veya **(B)** 24 saat TH (n=3) ile muamele sonucunda APP ve total proteine ait temsili immünoblot görüntüleri. **(C)** Western blot sonucunun niceliksel olarak analizi. APP düzeyleri, her bir örnek için total proteine göre normalize edildi. Sonuçlar, kontrole göre yüzdesel olarak ifade edildi (*Repeated measures ANOVA-Dunnett's post hoc testi*; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

4.1.5. PS70 Hücrelerinde Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin BACE1 Üzerine Etkileri

Amiloidojenik yolda rol oynayan ve A β peptitlerin oluşmasında ilk basamağı katalizleyen en önemli sekretaz, BACE1'dir. PS70 hücre lizatlarında, fenotiyazin yapılı bileşiklerin BACE1 ekspresyonu üzerine etkileri, karboksi terminal BACE1 poliklonal antikor kullanılarak Western blot yöntemi ile değerlendirildi. Western blot sonuçları, 50-55 kDa arasında BACE1'e ait yoğun bir bantın olduğunu gösterdi (Şekil 4.8A. ve 4.8B.). Yapılan kantitatif analizler sonucunda, TBO'nun BACE1 ekspresyonunu doza bağımlı olarak azalttığı bulundu. 5 μ M ve 15 μ M TBO ile muamele edilen PS70 hücrelerinde BACE1 düzeylerinin kontrole göre sırasıyla; %29 (**, $p < 0.01$) ve %43 (***, $p < 0.001$) oranında azaldığı gözlemlendi. (Şekil 4.8C.). Ancak TH ile muamele edilmiş PS70 hücrelerinde, BACE1 düzeyleri açısından kontrole göre anlamlı bir değişim gözlenmedi (Şekil 4.8C.).



Şekil 4.8. PS70 hücrelerinde fenotiyazin yapıları bileşiklerinin BACE1 üzerine etkileri. Hücre lizatlarında BACE1 düzeylerindeki değişim, poly8401 antikorunu kullanılarak Western blot analizi ile değerlendirildi. (A) 0-15 μ M derişimlerde, 6 saat TBO (n=6) veya (B) 24 saat TH (n=5) ile muamele sonucunda BACE1 ve total proteine ait temsili immünoblot görüntüleri. (C) Western blot sonucunun niceliksel olarak analizi. BACE1 düzeyi, her bir örnek için total proteine göre normalize edildi. Sonuçlar, kontrole göre yüzdesel olarak ifade edildi (*Repeated measures ANOVA-Bonferroni's post hoc testi*; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

4.2. 3xTg-AD Fare Modelinde Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin AH Patolojisi Üzerine Etkileri

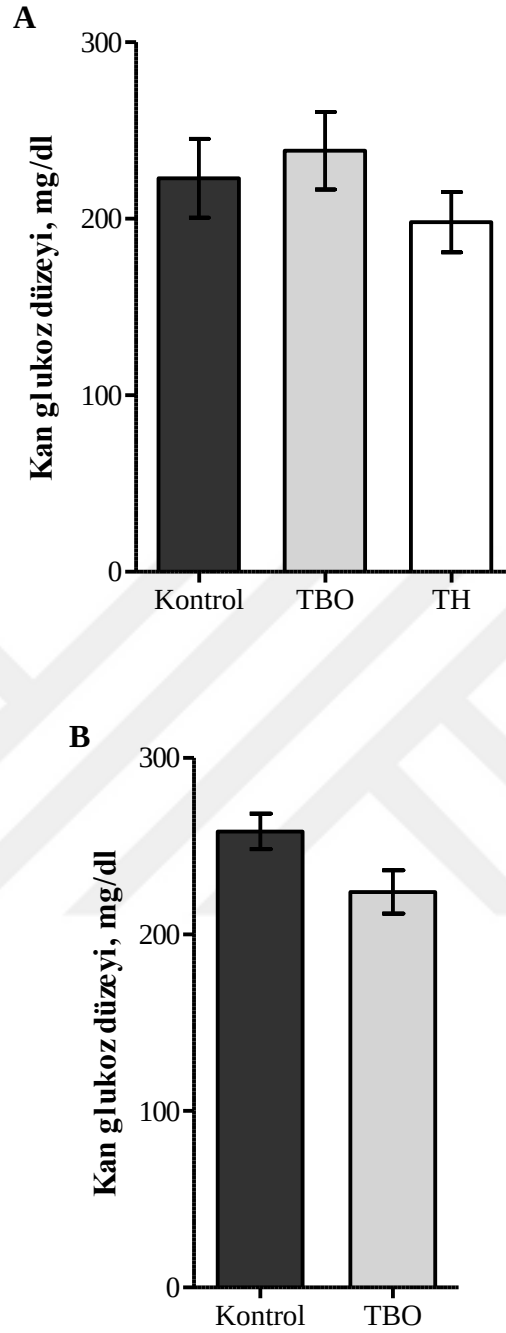
4.2.1. Fenotiyazin Yapılı Bileşikler ile Muamelenin 3xTg-AD Fare Vücut Ağırlığı ve Kan Glukoz Düzeyleri Üzerine Etkisi

Çalışmada öncelikle 7,5 aylık 3xTg-AD farelere, 4 mg/kg olacak şekilde TBO (n=7), TH (n=7) ve kontrol grubu olarak %5 etanol içeren PBS (n=6); her gün aynı saatte 30 gün boyunca i.p. olarak uygulandı (enjeksiyon hacmi ~0.1 ml). Ayrıca 13 aylık 3xTg-AD transgenik farelere 4 mg/kg olacak şekilde TBO (n=9) veya kontrol grubu olarak %5 etanol içeren PBS (n=7) her gün aynı saatte 30 gün boyunca i.p. olarak enjekte edildi (enjeksiyon hacmi ~0.1 ml). Uygulama süresi esnasında, her iki yaş grubundaki transgenik farelerde herhangi bir hastalık belirtisi veya anomali gözlenmedi. Fenotiyazin yapılı bileşikler ile uygulama öncesinde ve çalışma sonrasında 3xTg-AD farelerin vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında; 8,5 aylık fareler için herhangi bir anlamlı değişim gözlenmedi. 14 aylık farelerde ise TBO ile muamele sonrasında vücut ağırlığında uygulama öncesine göre anlamlı bir azalma gözükmesine rağmen, iki yönlü ANOVA testi ile kontrole göre zaman ve uygulama arasındaki ilişki incelendiğinde; herhangi bir bağlantı bulunamadı (Tablo 4.1.). Bununla birlikte, fenotiyazin ile muamele edilen genç ve yaşlı farelerde uygulama sonunda ölçülen kan glukoz değerleri, kontrol grubu ile benzer seviyelerde idi (Şekil 4.9.).

Tablo 4.1. Fenotiyazin yapılı bileşikler ile muamele edilen 3xTg-AD farelerin uygulama öncesi ve sonrasında ölçülen vücut ağırlığı değerleri

Gruplar		Vücut ağırlığı $\pm$ SH, g		p	
Yaş	Uygulanan	0. gün	30. gün	Zamana göre	Kontrole göre
8,5	PBS +%5 EtOH	26,57 $\pm$ 0,92	23,97 $\pm$ 0,97	0,081	-
	TBO	25,79 $\pm$ 0,70	24,04 $\pm$ 0,53	0,232	ns
	TH	25,33 $\pm$ 0,65	24,37 $\pm$ 0,40	0,071	ns
14	PBS +%5 EtOH	27,00 $\pm$ 1,04	25,43 $\pm$ 0,67	0,233	-
	TBO	26,54 $\pm$ 0,56	24,28 $\pm$ 0,45	0,006	ns

(ns: istatistiksel olarak anlamsız p değeri)

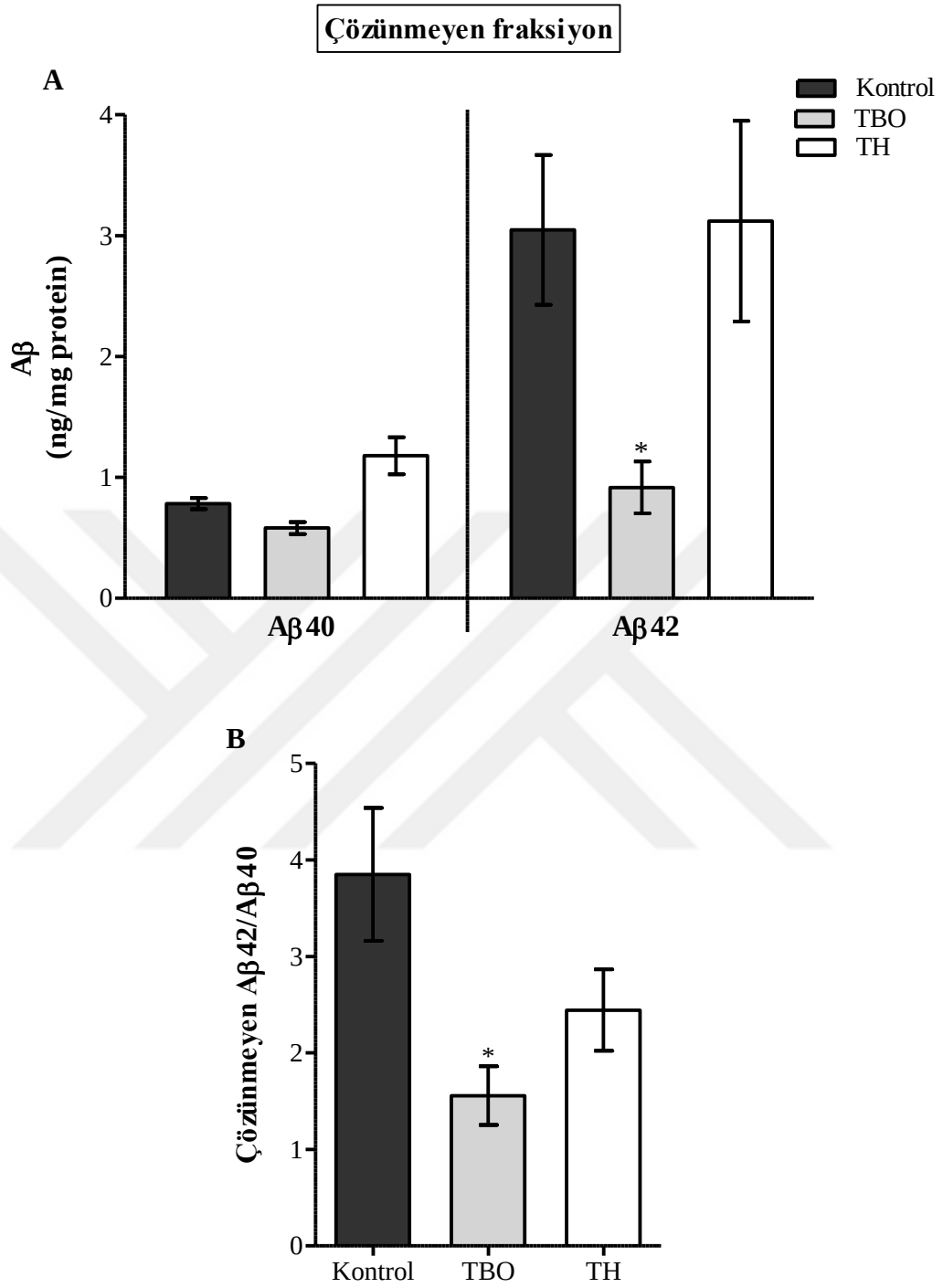


Şekil 4.9. 3xTg-AD farelerde fenotiyazin yapılı bileşiklerin kan glukoz düzeyleri üzerine etkileri. 7,5 aylık fareler 4 mg/kg TBO (n=7), TH (n=7) ve PBS (+%5 EtOH) (n=6) ile; 13 aylık fareler ise 4 mg/kg TBO (n=9) ve PBS (+%5 EtOH) (n=7) ile 30 gün boyunca hergün muamele edildi. Uygulama sonrasında (**A**) 8,5 aylık farelerde ve (**B**) 13 aylık farelerde kan glukoz düzeylerindeki değişim $\text{ort} \pm \text{SH}$ olarak gösterilmiştir (Çoklu ortalama karşılaştırılmasında, *Kruskal-Wallis* testi; ikili ortalama karşılaştırılmasında *Mann-Whitney U* testi kullanıldı. $p > 0.05$).

4.2.2. 8,5 Aylık 3xTg-AD Farelerde Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin A β Patolojisi Üzerine Etkileri

4 mg/kg TBO (n=7) veya TH (n=7) ile 1 ay boyunca muamele edilen 8,5 aylık 3xTg-AD farelerin hipokampus dokularındaki çözünmeyen A β 40 ve A β 42 düzeyleri, sandviç ELISA yöntemi ile belirlendi ve elde edilen sonuçlar kontrol grubu (n=6) ile karşılaştırıldı. Aynı transgenik farelerin hipokampus dokusundaki çözünür A β peptit düzeyleri ile korteks dokusundaki A β peptit düzeyleri ise kullanılan ticari ELISA kitleri ile ölçülemeyecek kadar çok düşük olduğu için analiz yapılamadı.

TBO ile muamele edilen 8,5 aylık 3xTg-AD farelerde, çözünmeyen fraksiyondaki A β 40 düzeyleri ölçüldüğünde; kontrol grubuna göre %26 oranında bir azalmanın olduğu, ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu (Şekil 4.10A.). Diğer taraftan, TBO ile muamele edilen farelerde çözünmeyen fraksiyonlardaki A β 42 düzeylerinin kontrol grubuna göre; %70 oranında azaldığı ve bu azalmanın ise istatistiksel açıdan anlamlı olduğu gözlemlendi (*, $p < 0.05$) (Şekil 4.10A.). TH ile muamele edilen 8,5 aylık 3xTg-AD farelerde ise çözünmeyen A β 40 ve A β 42 düzeyleri açısından kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişim saptanmadı (Şekil 4.10A.). Sonuçlara göre; 8,5 aylık 3xTg-AD farelerde TBO, hipokampus dokusundaki çözünmeyen A β 42 birikimini yüksek oranda azaltmaktadır. Ayrıca TBO ile muamele edilen farelerde çözünmeyen fraksiyonlardaki A β 42/A β 40 oranı, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise %60 oranında anlamlı bir azalmanın olduğu bulundu. (Şekil 4.10B.).

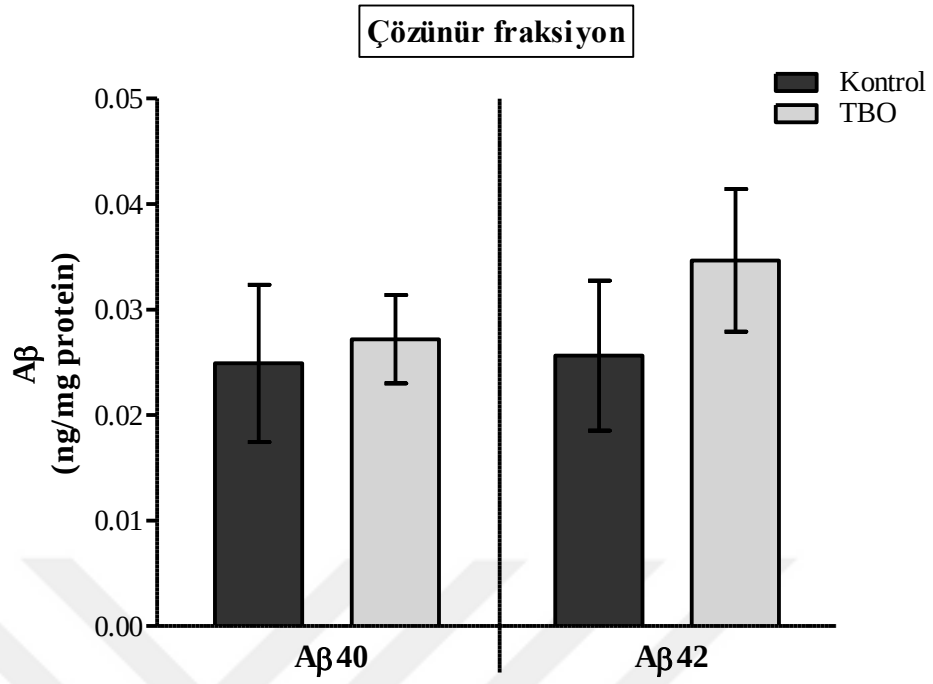


Şekil 4.10. 8,5 aylık 3xTg-AD farelerde fenotiyazin yapıllı bileşiklerin hipokampus dokusundaki çözünmeyen A β patolojisi üzerine etkileri. 3xTg-AD farelerin, 4 mg/kg TBO (n=7), TH (n=7) ve PBS (+%5 EtOH) (n=6) ile 1 ay muamelesi sonrasında A β peptit düzeylerindeki değişim: **(A)** A β 40 ve A β 42 seviyelerindeki değişim. **(B)** A β 42/A β 40 oranındaki değişim, ort $\pm$ SH olarak gösterilmiştir (Kruskal-Wallis testi- Dunnnett's post-hoc testi; *, $p < 0.05$).

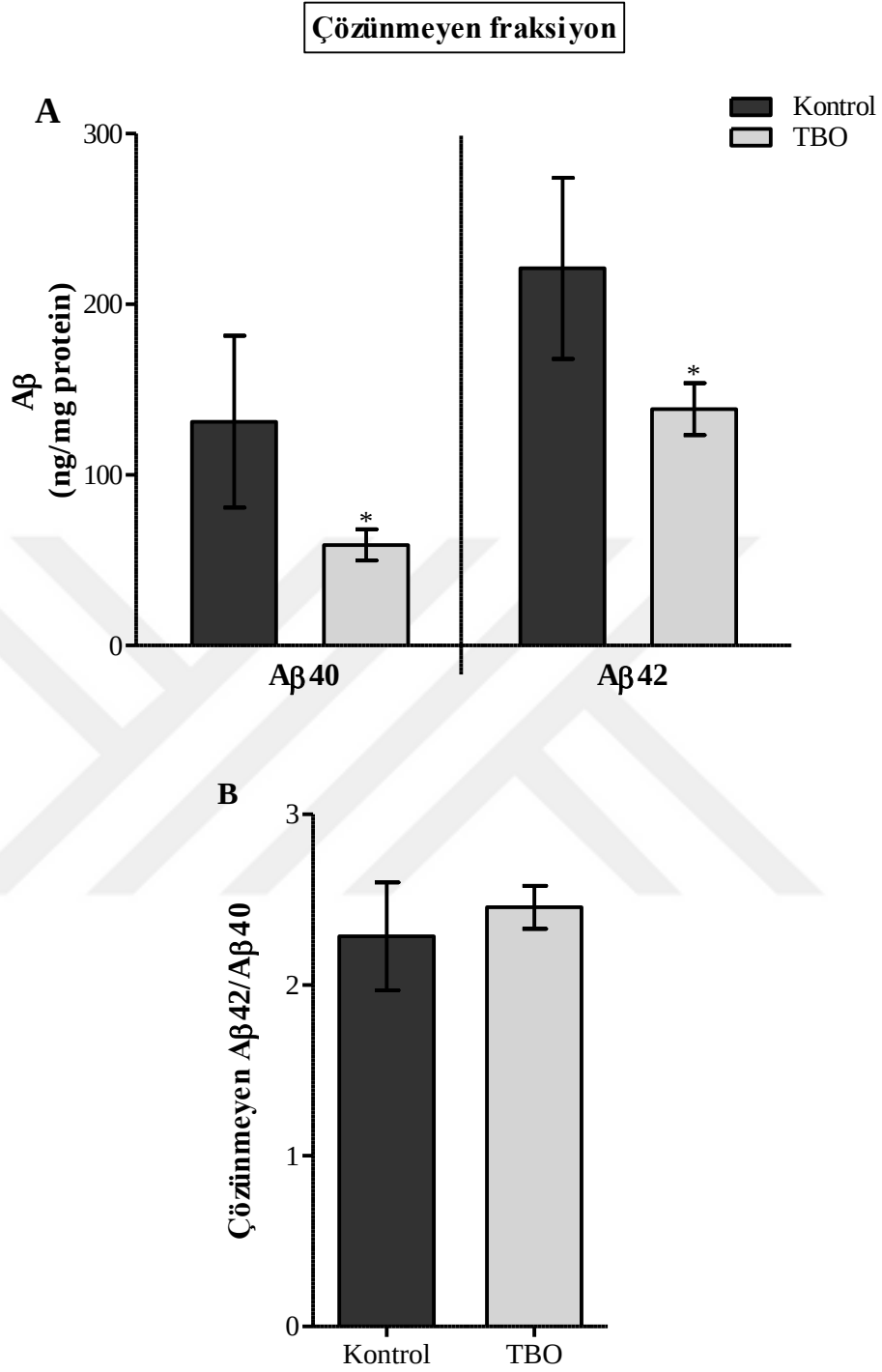
4.2.3. 14 Aylık 3xTg-AD Farelerde TBO'nun A β Patolojisi Üzerine Etkisi

14 aylık kontrol 3xTg-AD farelerle yapılan çalışmalar sonucunda; hipokampus dokularına ait çözünmeyen fraksiyonlardaki A β 40 ve A β 42 düzeylerinin, 8,5 aylık kontrol transgenik farelere göre arttığı, çözünür fraksiyondaki A β peptitlerin de kullanılan ELISA kitleri ile ölçülebilir düzeye ulaştığı bulundu. Bu durum, transgenik farelerde yaşa bağımlı olarak artması beklenen AH patolojisini desteklemektedir.

4 mg/kg TBO ile 1 ay boyunca muamele edilen 14 aylık 3xTg-AD farelerin (n=9) hipokampus dokusundaki çözünür fraksiyonlar analiz edildiğinde; A β 40 ve A β 42 düzeyleri açısından kontrol grubuna göre (n=7) anlamlı bir değişim saptanmadı (Şekil 4.11.). Ancak bu farelerin hipokampus dokularındaki çözünmeyen A β 40 ve A β 42 düzeylerinin ise kontrol grubuna göre sırasıyla; %55 ve %37 oranında azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu bulundu ($p<0.05$) (Şekil 4.12A.). TBO ile muamele edilen farelerde çözünmeyen fraksiyonlardaki A β 42/A β 40 oranı değerlendirildiğinde ise; kontrol grubuna göre anlamlı bir değişimin olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.12B.).



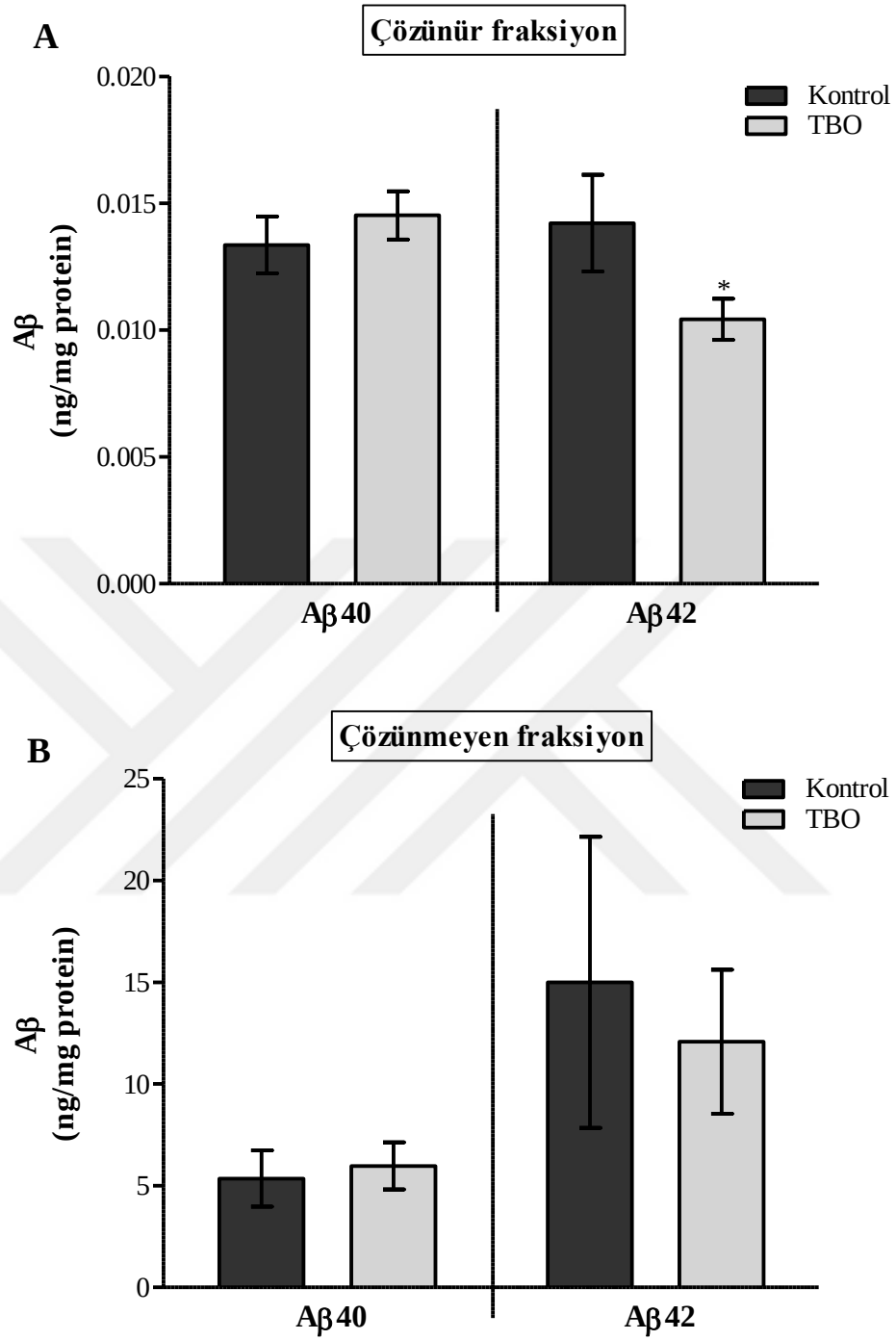
Şekil 4.11. 14 aylık 3xTg-AD farelerde TBO'nun hipokampus dokusundaki çözünür Aβ patolojisi üzerine etkisi. 3xTg-AD farelerin, 4 mg/kg TBO (n=9) ve PBS (+%5 EtOH) (n=7) ile 1 ay muamelesi sonrasında Aβ40 ve Aβ42 düzeylerindeki değişim, ort± SH olarak gösterilmiştir (*Mann-Whitney U* testi; $p > 0.05$).



Şekil 4.12. 14 aylık 3xTg-AD farelerde TBO'nun hipokampus dokusundaki çözünmeyen Aβ patolojisi üzerine etkisi. 3xTg-AD farelerin, 4 mg/kg TBO (n=9) ve PBS (+%5 EtOH) (n=7) ile 1 ay muamelesi sonrasında Aβ peptit düzeylerindeki değişim: **(A)** Aβ40 ve Aβ42 seviyelerindeki değişim **(B)** Aβ42/Aβ40 oranındaki değişim, $\text{ort} \pm \text{SH}$ olarak gösterilmiştir (Mann-Whitney U testi; *, $p < 0.05$).

TBO ve PBS (+5% EtOH) ile muamele edilen aynı farelerin korteks dokusuna ait çözümler fraksiyonlarındaki A β patolojisi karşılaştırıldığında; TBO'nun sadece çözümler A β 42 düzeylerini %27 oranında anlamlı olarak azalttığı ($p<0.05$), çözümler A β 40 düzeylerinde ise anlamlı bir değişime neden olmadığı bulundu (Şekil 4.13A.). Ayrıca çözünmeyen fraksiyondaki A β peptit düzeylerinde ise kontrol grubuna göre anlamlı bir değişim gözlenmedi (Şekil 4.13B.).



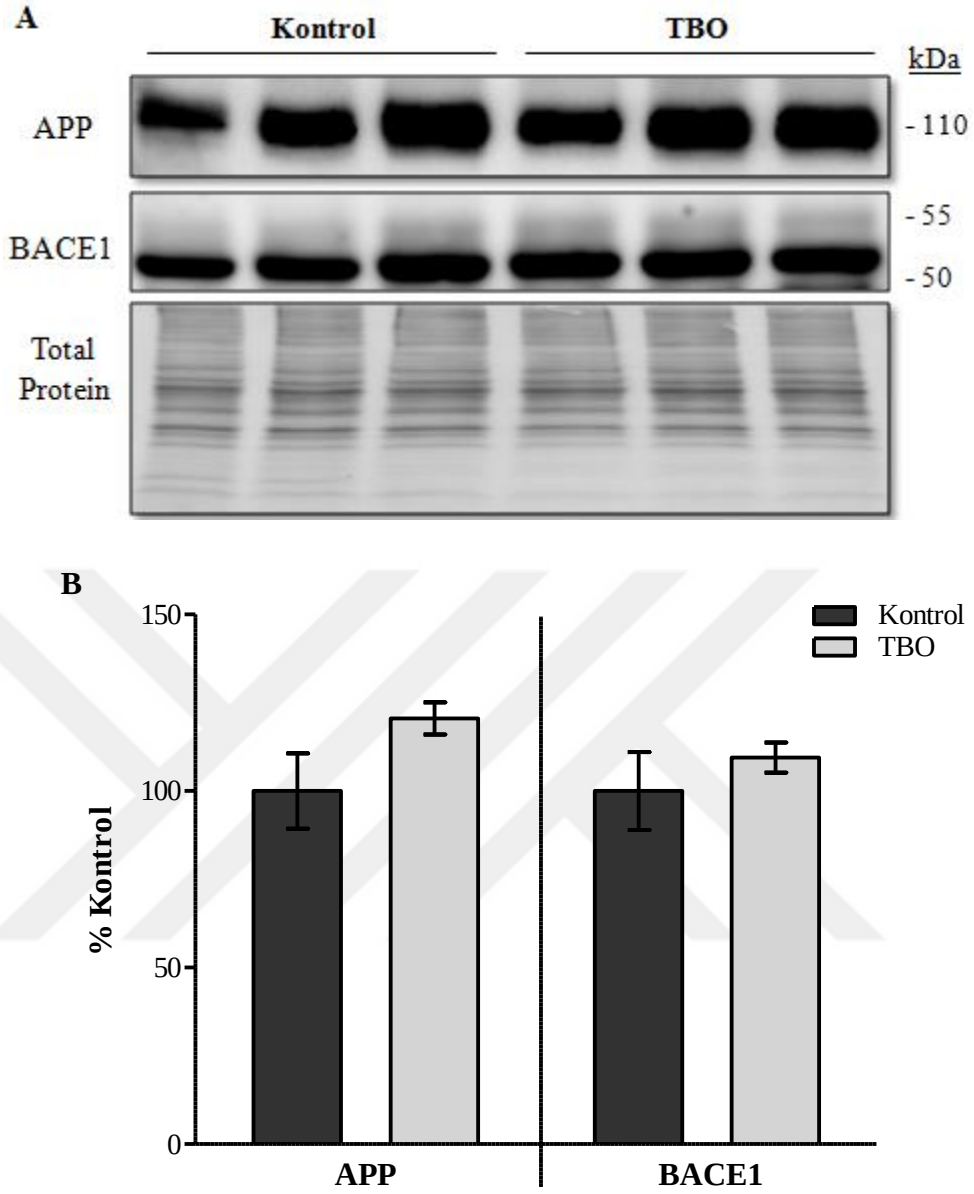


Şekil 4.13. 14 aylık 3xTg-AD farelerde TBO'nun korteks dokusu Aβ patolojisi üzerine etkisi. 3xTg-AD farelerin, 4 mg/kg TBO (n=9) ve PBS (+%5 EtOH) (n=7) ile 1 ay muamelesi sonrasında (**A**) çözünür ve (**B**) çözünmeyen fraksiyonlardaki Aβ40 ve Aβ42 seviyelerindeki değişim, ort± SH olarak gösterilmiştir (Mann-Whitney U testi; *, $p < 0.05$).

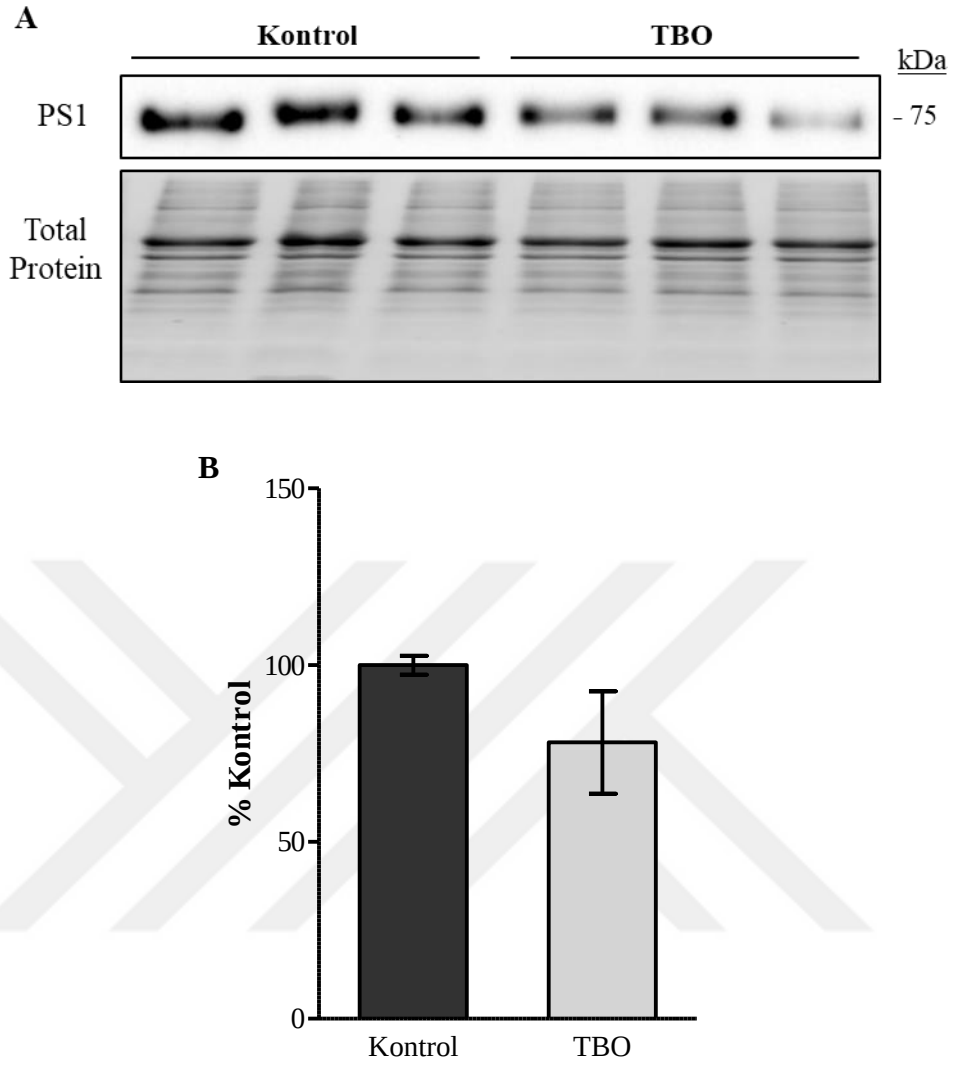
4.2.4. 14 Aylık 3xTg-AD Farelerde TBO'nun APP, BACE1 ve PS1 Üzerine Etkileri

14 aylık 3xTg-AD farelerde, TBO'nun total APP, BACE1 ve PS1 düzeyleri üzerine etkisi, hipokampus dokusuna ait çözünür fraksiyonlarda, sırasıyla; 6E10, poly8401 ve EP2000Y antikorları kullanılarak Western blot yöntemi ile değerlendirildi (Şekil 4.14A. ve 4.15A.). ImageLab yazılımı ile her bir örnek için APP, BACE1 ve PS1'e ait bantların yoğunluğu, kendi şeritlerindeki total protein yoğunluğuna göre normalize edildi ve elde edilen sonuçlar kontrolün yüzdesi olarak gösterildi (Şekil 4.14B. ve 4.15B).

İmmunoblot görüntülerinin dansitometrik analizi sonucunda; TBO hipokampus dokusundaki APP ve BACE1 düzeylerini kontrol grubuna göre sırasıyla; %21 ve %10 arttırırken, PS1 düzeyinde ise kontrol grubunun %22'si kadar bir azalma gözlemlendi. Ancak APP, BACE1 ve PS1 ekspresyonundaki değişimlerin hiçbiri istatistiksel açıdan anlamlı değildi (Şekil 4.14B. ve 4.15B).



Şekil 4.14. 14 aylık 3xTg-AD farelerde TBO'nun hipokampus dokusundaki APP ve BACE1 üzerine etkileri. 3xTg-AD farelerin 4 mg/kg TBO (n=9) ve PBS (+%5 EtOH) (n=5) ile 1 ay muamelesi sonrasında çözünür fraksiyonda APP ve BACE1 düzeylerindeki değişim, sırasıyla 6E10 ve poly8401 antikorları kullanılarak Western blot analizi ile değerlendirildi. **(A)** APP, BACE1 ve total proteine ait temsili immüno blot görüntüleri. **(B)** Western blot sonucunun niceliksel olarak analizi. APP ve BACE1 düzeyleri, her bir örnek için total proteine göre normalize edildi. Sonuçlar kontrole göre yüzdesel olarak ifade edildi (*Mann-Whitney U* testi; $p > 0.05$).

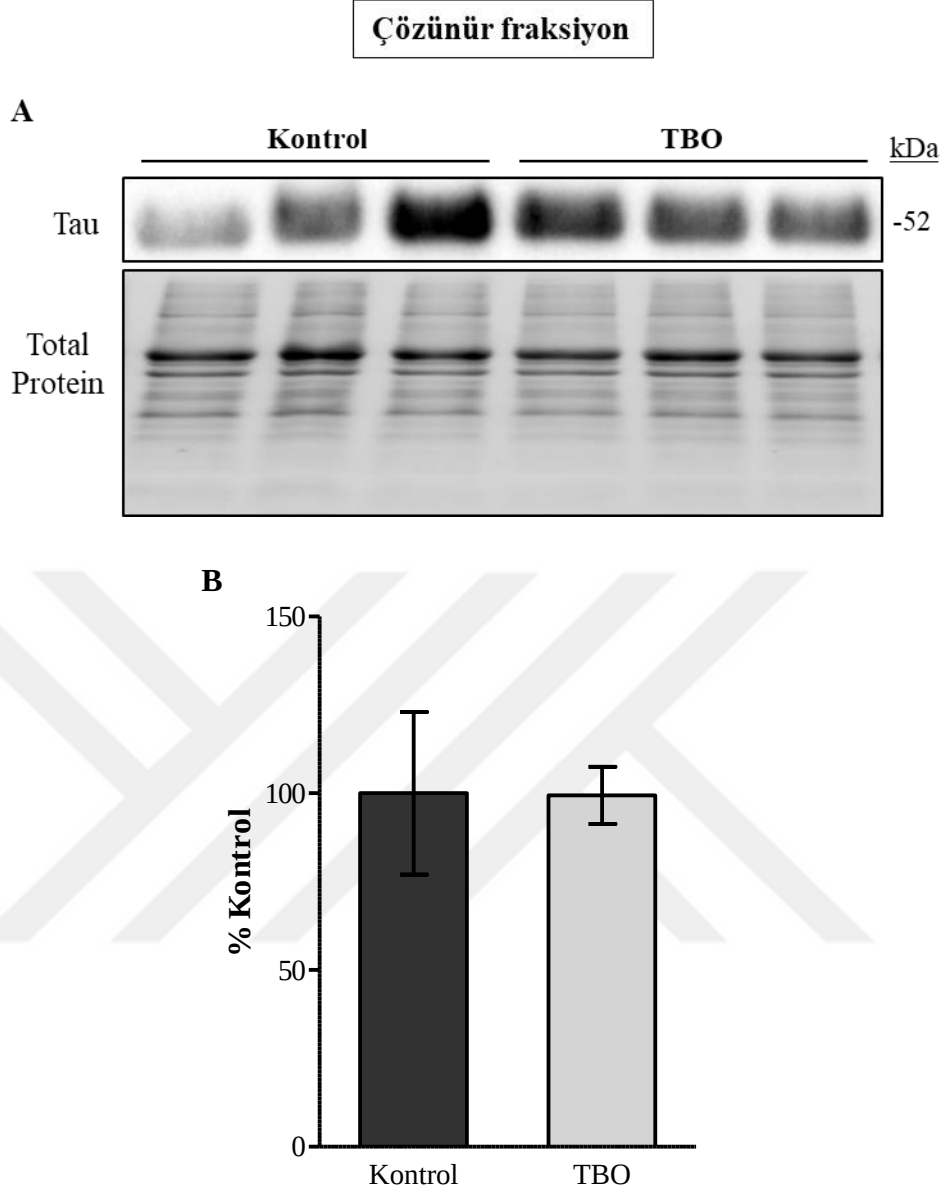


Şekil 4.15. 14 aylık 3xTg-AD farelerde TBO'nun hipokampus dokusundaki PS1 üzerine etkisi. 3xTg-AD farelerin 4 mg/kg TBO (n=5) ve PBS (+%5 EtOH) (n=3) ile 1 ay muamelesi sonrasında çözünür fraksiyonda PS1 düzeylerindeki değişim, EP2000Y antikoru kullanılarak Western blot analizi ile değerlendirildi. **(A)** PS1 ve total proteine ait temsili immüno blot görüntüleri. **(B)** Western blot sonucunun niceliksel olarak analizi. PS1 düzeyleri, her bir örnek için total proteine göre normalize edildi. Sonuçlar kontrole göre yüzdesel olarak ifade edildi (*Mann-Whitney U* testi; $p > 0.05$).

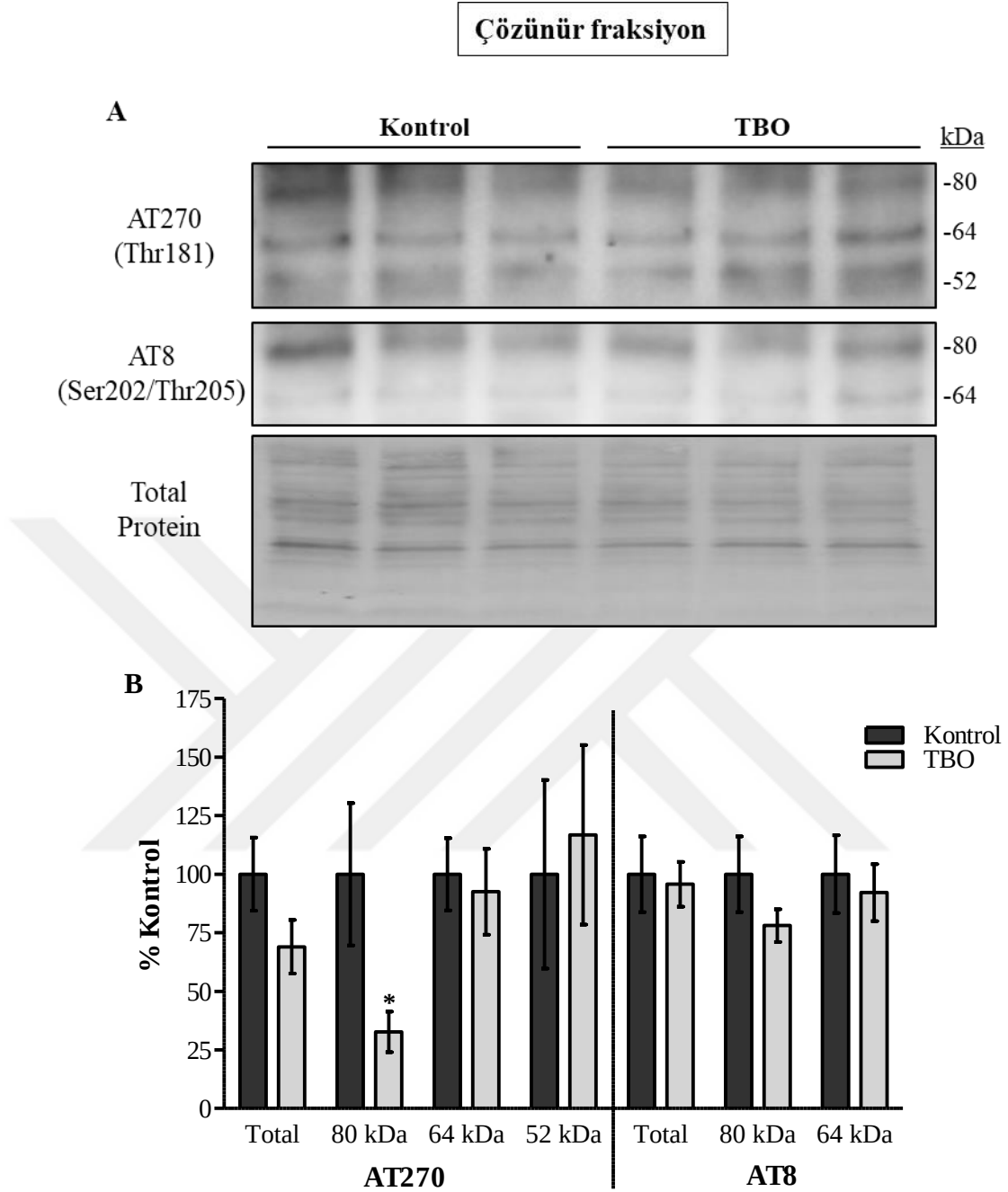
4.2.5. 14 Aylık 3xTg-AD Farelerde TBO'nun Tau Patolojisi Üzerine Etkisi

TBO'nun 14 aylık 3xTg-AD farelerde gözlenen total tau ve tau hiperfosforilasyonu üzerindeki etkisi, farelerin hipokampus dokularına ait çözünür ve/veya çözünmeyen fraksiyonlarında, üç farklı primer antikor kullanılarak, Western Blot yöntemi ile değerlendirildi. Çalışmada, HT7 antikor, total tau'nun analizinde; AT270 ve AT8 antikorları ise sırasıyla; Thr 181'den fosforillenmiş tau ve Ser 202 ve Thr 205'den fosforillenmiş tau'nun analizlerinde kullanıldı.

TBO ile muamele edilen 14 aylık transgenik farelerin hipokampus dokusundaki çözünür fraksiyonlarında, HT7 antikor ile 52 kDa'da gözlenen tau proteinine ait bantın (Şekil 4.16A.) dansitometrik analizi sonucunda, kontrole göre; anlamlı bir değişimin olmadığı saptandı (Şekil 4.16B.). Diğer taraftan, AT270 antikor ile üç farklı çözünür tau izoformu gözlemlendi: 80 kDa, 64 kDa ve 52 kDa (Şekil 4.17A.). TBO'nun etkisiyle, AT270 antikor ile 80 kDa'da bant veren tau formunda, kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bulunurken ($p < 0.05$), taunun diğer iki formu için herhangi bir değişiklik gözlenmedi (Şekil 4.17B.). Ayrıca AT8 ile 80 kDa ve 64 kDa'da gözlenen (Şekil 4.17A.) çözünür fosforile tau formları üzerinde TBO'nun herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edildi (Şekil 4.17B.). Her iki antikorla gözlenen fosforile tau bantları total olarak analiz edildiğinde ise, kontrol grubuna göre; istatistiksel olarak anlamlı bir değişim bulunmadı (Şekil 4.17B.).



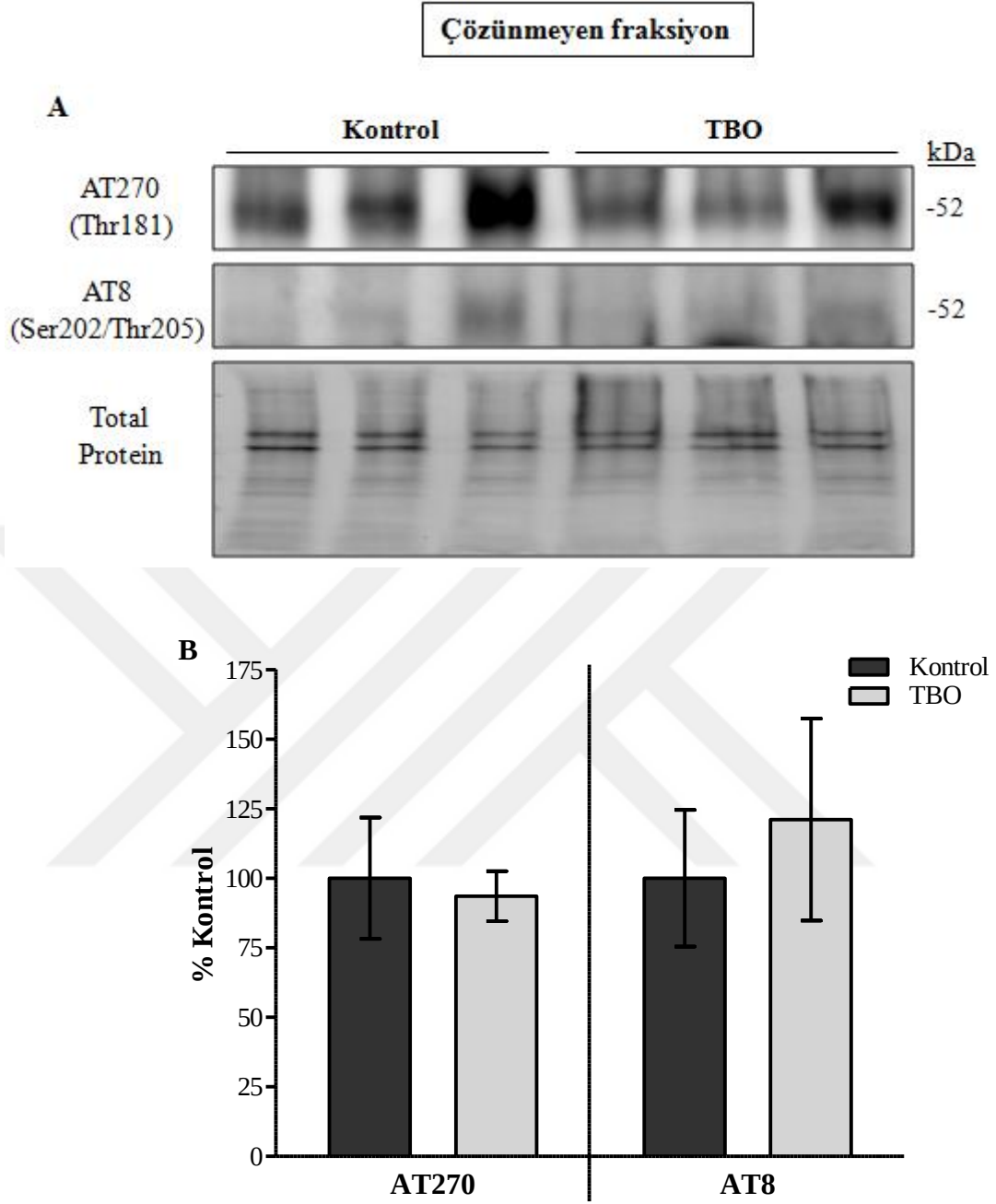
Şekil 4.16. 14 aylık 3xTg-AD farelerde TBO'nun hipokampus dokusuna ait çözünür fraksiyondaki total tau üzerine etkisi. 3xTg-AD farelerin 4 mg/kg TBO (n=9) ve PBS (+%5 EtOH) (n=5) ile 1 ay muamelesi sonrasında çözünür fraksiyonda total tau düzeylerindeki değişim, HT7 antikoruna kullanılarak Western blot analizi ile değerlendirildi. **(A)** Tau ve total proteine ait temsili immünoblot görüntüleri. **(B)** Western blot sonucunun niceliksel olarak analizi. Tau düzeyi, her bir örnek için total proteine göre normalize edildi. Sonuçlar kontrole göre yüzdesel olarak ifade edildi (*Mann-Whitney U* testi; $p > 0.05$).



Şekil 4.17. 14 aylık 3xTg-AD farelerde TBO'nun hipokampus dokusuna ait çözünür fraksiyondaki tau patolojisi üzerine etkisi. 3xTg-AD farelerin 4 mg/kg TBO (n=9) ve PBS (+%5 EtOH) (n=6-7) ile 1 ay muamelesi sonrasında çözünür fraksiyonda fosforile tau düzeylerindeki değişim, AT270 (Thr181) ve AT8 (Ser202/Thr205) antikorları kullanılarak Western blot analizi ile değerlendirildi. **(A)** Fosforillenmiş tau izoformları ve total proteine ait temsili immünoiblot görüntüleri. **(B)** Western blot sonucunun niceliksel olarak analizi. Fosforillenmiş tau izoformlarının düzeyleri, her bir örnek için total proteinine göre normalize edildi. Sonuçlar kontrole göre yüzdesel olarak ifade edildi (Mann-Whitney U testi; *, $p < 0.05$).

TBO'nun agrege olmuş hiperfosforile tau üzerine olan etkisi, çözünmeyen fraksiyonda AT270 ve AT8 antikorları ile analiz edildi. Sonuçlar çözünmeyen fraksiyonda 52 kDa'da tek bir tau formunun olduğunu gösterdi (Şekil 4.18A.). AT270 ve AT8 ile tanınan fosforile tau bantlarının kantitatif analizine göre, TBO'nun sırasıyla; Thr181 ve Ser202/Thr205 bölgelerinde bulunan fosforile tau düzeylerinde anlamlı bir değişime yol açmadığı bulundu (Şekil 4.18B.).





Şekil 4.18. 14 aylık 3xTg-AD farelerde TBO'nun hipokampus dokusuna ait çözünmeyen fraksiyondaki tau patolojisi üzerine etkisi. 3xTg-AD farelerin 4 mg/kg TBO (n=9) ve PBS (+%5 EtOH) (n=7) ile 1 ay muamelesi sonrasında çözünmeyen fraksiyonda fosforile tau düzeylerindeki değişim, AT270 (Thr181) ve AT8 (Ser202/Thr205) antikorları kullanılarak Western blot analizi ile değerlendirildi. (A) Fosforillenmiş tau ve total proteine ait temsili immünoblot görüntüleri. (B) Western blot sonucunun niceliksel olarak analizi. Fosforillenmiş tau düzeyleri, her bir örnek için total proteine göre normalize edildi. Sonuçlar kontrole göre yüzdesel olarak ifade edildi (Mann-Whitney U testi; $p > 0.05$).

5. TARTIŞMA

AH'nin nöropatolojik özellikleri, hipokampus ve korteks bölgesinde oluşan nörotik plaklar ve NFY'lerdir (1). Ayrıca hastalıkta, şiddetli sinir kaybıyla birlikte, sinaptik süreçlerin bozulduğu kolinerjik fonksiyon bozukluğu da gözlenmektedir. Bu durum, hafıza ve dikkat gibi fonksiyonlarda rol oynayan nörotransmitter ACh düzeyindeki azalma ile bağlantılıdır (205). Günümüzde kullanımda olan AH ilaçlarının çoğunu, kolinerjik nöronların aktivitesini arttıran ChE inhibitörleri, oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalar, bu ilaçlar tarafından sağlanan bilişsel istikrarın, sadece kolinerjik aktivasyondaki artıştan dolayı değil, aynı zamanda ilaçların amiloid metabolizması üzerindeki inhibitör etkilerinden de kaynaklandığını göstermiştir (6). Böylece, hastalığın oluşumunu tamamen önlemek veya ilerleyişini durdurmak amacıyla, çok hedefli yeni ilaç tasarımlarına yönelik araştırmalar hız kazanmıştır.

Bu tez çalışmasında, Anabilim dalımızda daha önce gerçekleştirilen çalışmalar ile AChE'nin ve BChE'nin güçlü inhibitörleri olduğu gösterilen (8) iki fenotiyazin-türevi bileşiğin (TBO ve TH), AH patolojisi üzerindeki olası inhibe edici etkileri; Aβ peptitler, APP, β-sekretaz, γ-sekretaz ve tau hiperfosforilasyonu açısından *in vitro* ve *in vivo* koşullarda değerlendirildi.

5.1. Amiloid Patolojisi Gösteren Hücresel Modelde Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin Nöropatolojik Belirteçler Üzerindeki Etkileri

Çalışmanın ilk aşamasında insan doğal tip APP751 ve insan doğal tip presenilin1'i stabil olarak eksprese eden Çin hamster over (PS70) hücreleri kullanılarak, fenotiyazin yapılı bileşiklerin Aβ peptitler üzerine olan etkileri araştırıldı. Çalışmada PS70 hücrelerinin tercih edilmesinin nedeni, bu hücrelerin amiloid patolojisinin iyi bir hücresel modeli olmasından kaynaklanmaktadır.

Öncelikle akım sitometrisi sonuçlarına göre; hücre canlılığının etkilenmediği fenotiyazinlerin dozları ve muamele süreleri belirlendi. PS70 hücreleri, 0-15 µM TBO veya TH ile sırasıyla; 6 saat veya 24 saat muamele edildi, ortama salıverilen Aβ40, Aβ42 ve sAPPα düzeyleri, sandviç ELISA yöntemi ile belirlendi. Sonuçlara göre, her iki fenotiyazin yapılı bileşiğin kontrole göre; hücre dışına salıverilen Aβ40 ve Aβ42 düzeylerinde doza bağımlı bir azalmaya neden olduğu gözlemlendi. Literatürde kolinesteraz inhibitörü olan takrin (206), simserin ve analoglarının (207), rivastigmin

(159, 208) ve MethB'nin (175) A β peptit salıverilmesi üzerinde inhibe edici etkiler gösterdiği rapor edilmiştir. TBO'nun ve TH'nin hücre dışına salıverilen ve plak oluşumunda rol oynayan A β peptit düzeylerini doza bağımlı olarak azaltması, her iki bileşiğin AH'nin potansiyel tedavisi için kullanılabileceğine dair ilk ipucunu vermektedir.

A β peptit seviyelerindeki azalma, non-amiloidojenik APP işlenmesindeki aktivasyon artışına bağlı olabileceği için (118) anti-amiloidojenik yolağın ürünü olan sAPP α düzeyleri, aynı örneklerde incelendi. Sonuçlara göre, hücrelerin TBO veya TH ile muamele edilmesi, sekrete sAPP α düzeylerini doza bağımlı olarak azalttı. Benzer şekilde, bazı ChE inhibitörleri de sAPP α düzeyinde azalmaya neden olurken (209-211), rivastigmin tam tersi etki göstererek *in vitro* koşullarda salıverilen sAPP α düzeyini arttırmıştır (159, 208). sAPP α , A β tarafından tetiklenen nörodejenerasyonu önlerken, aynı zamanda antiapoptotik ve nöroprotektif etkiye de sahiptir (57). APP/APLP2 çift *knockout* NexCre farelerle yapılan bir çalışmada, önbeyin nöronlarında bozulan sinaptik fonksiyonların, sAPP α 'nın uygulanmasıyla ortadan kalktığı gösterilmiştir (212). TBO ve TH ile muamele sonrasında azalan sAPP α , hücreleri, hücrel zarara daha hassas hale getirmiş olabilir. Ancak, amiloidojenik A β peptit seviyelerindeki azalmanın, sAPP α 'nın sebep olabileceği böyle bir etkiyi kompanse edip etmediği ise araştırılması gereken bir durumdur.

TBO'nun ve TH'nin APP işlenmesi üzerine etkileri, ER/golgi ağı boyunca APP trafiğindeki değişimin yanında, APP proteolizinin veya A β degradasyonunun indüklenmesiyle açıklanabilir. ChE inhibitörü takrin ve lizozomal proteoliz inhibitörü olan löpeptin ile yapılan bir çalışmada, lizozomal proteolizi tek başına %80 oranında azalttığı bilinen löpeptinin etkisinin, takrin varlığında tersine çevrilmediği gözlenmiştir. Bu durum, takrin varlığında azalan APP'nin proteolitik yıkımının, lizozom dışında başka bir kompartmanda (ör. ER) gerçekleştiğini düşündürmektedir (206). Amiloid patolojisi üzerinde MethB'nin etki mekanizmasının incelendiği bir çalışmada ise, MethB'nin proteozom aktivitesini arttırarak A β peptitleri azalttığı ve erken dönem bilişsel bozulmayı düzelttiği görülmüştür (174). Alternatif olarak TBO ve TH, ER'de olgunlaşmamış APP havuzu oluşturup APP'nin hücre yüzey trafiğini de kısıtlamış olabilir. Dolayısıyla fenotiyazinlerin, lizozomal proteolizi aktive edip

etmediğini göstermek ve ayrıca A β peptitleri yıkan enzimlerin yanında proteozom bileşenlerinin aktivitelerini de incelemek yararlı olacaktır.

Bununla birlikte, TBO ve TH ile muamele sonucunda hücre içi total APP düzeylerinin kontrole göre azalması, hücre dışına salıverilen proteolitik ürünlerin azalmasının en olası sebebi olarak gözükmektedir. Bu durum, fenotiyazinlerin APP sentezine bağlı bir mekanizmayı etkilediğini düşündürmektedir. Yapılan çalışmalar ile ChE inhibitörü ganstigminin, APP metabolizmasını muskarinik reseptörler üzerinden değiştirdiği bulunmuştur (213). Ganstigmin uygulaması sonrasında artan ACh seviyesi ile uyarılan muskarinik reseptörlerin, sinyal yolağında rol oynayan protein kinaz C'nin aktivasyonunu sağlayıp APP işlenmesini düzenlediği ileri sürülmüştür. Bu durum APP işlenmesinin, kolinerjik modülasyonunda görev aldığı bilinen protein kinaz C ϵ izoformu ile ilişkilendirilmektedir (214). Başka bir ChE inhibitörü olan fenserin (215) ve bazı analoglarının (216), *in vitro* koşullarda APP üretimini, post-transkripsiyonel düzeyde azalttığı bulunmuştur. Fenserinin A β peptitler üzerindeki inhibitör etkisi, reseptör sinyal yolları veya fenserinin anti-ChE aktivitesinden ziyade, APP mRNA üzerinde bulunan 5'-*untranslated* bölgesindeki transkripsiyonel *enhancer*'in aktivasyonu yolu ile gerçekleşmektedir (215). İleriki çalışmalarda, TBO veya TH ile muamele sonucunda etkilenen APP sentez yolundaki olası transkripsiyonel ve transkripsiyonel yolların aydınlığa kavuşturulması, her iki fenotiyazinin etki mekanizmalarını anlamak açısından yol gösterici olacaktır.

A β düzeylerindeki azalma, APP'yi amiloidojenik olarak işleyen enzimlerin (β -ve/veya γ -sekretaz) düzeyindeki azalma ile de açıklanabilir. Western blot sonuçlarına göre; TBO muamelesi BACE1 ekspresyonunu azaltırken, TH herhangi bir anlamlı değişikliğe neden olmamıştır. Sonuç olarak, TBO amiloid metabolizması üzerindeki etkisini, BACE1'in yanında APP'yi de azaltarak göstermektedir. Diğer yandan, TH ile muamele sonrasında azalan A β düzeyleri, sadece APP ekspresyonundaki düşüşün bir sonucu şeklinde ortaya çıkabilir.

5.2. Transgenik Fare Modelinde Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin AH Nöropatolojik Belirteçler Üzerindeki Etkileri

TBO ve TH ile gerçekleştirilen *in vitro* çalışmaları, AH'nin nöropatolojik özelliklerini gösteren 3xTg-AD transgenik fare modelinin kullanıldığı *in vivo*

çalışmalar takip etti. Yaşa ve bölgeye bağlı olarak biriken A β peptitler, NFY oluşumu ve sinaptik fonksiyon bozukluğu, 3xTg-AD fareleri, potansiyel AH terapötiklerini araştırmak için iyi bir model yapmaktadır (194).

In vivo çalışmalardaki TBO ve TH'nin uygulama dozu, daha önce bu bileşikler kullanılarak çeşitli canlılar üzerinde gerçekleştirilmiş toksisite çalışmalarına göre belirlendi (Bkz. 3.2.2.). Her iki fenotiyazin yapıları bileşiğin redoks özelliği göstermeleri nedeni ile hücre içine geçişlerinin, redükte formlarına dönüşerek olduğu ileri sürülmektedir. Bir başka deyişle, bileşikler hücre yüzeyi ile temasa geçtiklerinde renksiz, yüksüz ve lipofilik olan redükte löko formlarına dönüşür ve hücre içine nüfuz ederler (179). Bu şekilde hücre içine girebilen TBO için önerilen sistem; bileşiğin plazma membranının dış yüzeyinde bir redüktaz ile temasa geçip löko forma dönüştüğü ve hücre içinde tekrar okside olup boya formunu aldığıdır (217, 218). Literatürde TH ile ilgili herhangi bir bilgi bulunmamasına rağmen, TBO'nun löko formuna dönüşüp kan beyin bariyerini geçtiği bilinmektedir (219).

Çalışmanın bu aşamasında 4 mg/kg TBO, TH veya kontrol grubu olarak PBS (+%5 EtOH), genç ve yaşlı transgenik farelere 30 gün boyunca her gün intraperitoneal olarak enjekte edildi.

5.2.1. Hafif AH Patolojisi Gösteren 3xTg-AD Farelerde Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin Nöropatolojik Belirteçler Üzerindeki Etkileri

In vivo çalışmaların ilk aşamasında, fenotiyazin yapıları bileşiklerin amiloid patolojisi üzerindeki etkileri, hafif düzeyde AH patolojisi gösteren 8,5 aylık 3xTg-AD farelerde incelendi. Korteks dokusu fraksiyonları ile hipokampal çözünür fraksiyonlardaki A β peptit düzeyleri, çalışmada kullanılan ELISA kitleri ile ölçülemeyecek kadar çok düşük olduğu için analiz edilemedi.

8,5 aylık 3xTg-AD farelerin hipokampus dokusunda, amiloid plakları oluşturan çözünmeyen A β formlarının düzeyleri incelendiğinde; TBO'nun toksik form olan A β 42 düzeyini, A β 40'dan daha fazla azalttığı bulundu. 3xTg-AD farelerin TH ile muamelesi sonrasında A β 42 düzeyinde kontrole göre, anlamlı olmayan bir artış gözlenirken, A β 40 düzeyinde anlamlı bir değişiklik bulunmadı. Beklenmedik şekilde, hücre modelinde TH'nin APP işlenmesi üzerindeki gözlenen inhibe edici etkisi, *in vivo* koşullarda gözlenmedi. Bu durum, daha karmaşık bir biyolojik sistemde, fenotiyazin

yapılı bileşiklerin etkisini gösterebilmesi için bir aydan daha uzun muamele süresine veya 4 mg/kg'dan daha yüksek uygulama miktarına gereksiniminden kaynaklanabileceği şeklinde yorumlandı. Sonuç olarak, TBO'nun seçilen doz ve uygulama süresi açısından amiloid patolojisi üzerinde TH'den daha etkili bir inhibitör olduğu bulundu.

5.2.2. Şiddetli AH Patolojisi Gösteren 3xTg-AD Farelerde TBO'nun Nöropatolojik Belirteçler Üzerindeki Etkisi

3xTg-AD transgenik farelerde A β birikmesi, 6 aylık erken dönemden itibaren görülebilmese rağmen, tau patolojisi, 12-15 ay gibi daha geç dönemde gözlenmektedir (194). Bu nedenle, 8,5 aylık farelerde TBO'nun, hem A β hem de tau patolojisi üzerindeki inhibitör etkisi, şiddetli AH patolojisi gösteren 14 aylık transgenik farelerde araştırıldı.

Sonuçlara göre, TBO'nun artan yaşla birlikte, hipokampus dokusundaki amiloid patolojisi üzerindeki etkisinin farklılaştığı görüldü. 14 aylık farelerde hipokampal çözünmeyen A β 42'deki azalma, genç farelerde hipokampal çözünmeyen A β 42'deki azalmanın, hemen hemen yarısı kadardı. A β 42'nin tersine, 14 aylık farelerde çözünmeyen A β 40 düzeyindeki azalmanın ise genç farelere göre iki kat daha fazla olduğu görüldü. Bu sonuçlar ışığında, yaşlı ve genç farelerde, AH patogenezi için belirteç olarak kullanılan A β 42'nin A β 40'a oranı (91) karşılaştırıldığında; TBO'nun 8,5 aylık farelerde amiloid patolojisini daha iyi inhibe ettiği sonucuna varıldı. Bir başka deyişle; oligomerizasyon, fibrilasyon ve amiloid plak oluşumunun temelini oluşturan A β 42 düzeyindeki şiddetli azalma, TBO'nun hafif AH patolojisini tedavi etmede daha etkin bir ilaç adayı olabileceğini önermektedir. Daha önce yapılan bir çalışmada, 3xTg-AD farelerin NMDA reseptör antagonisti memantin ile muamelesi sonrasında A β peptitlerin düzeyleri incelendiğinde; yaşa bağlı olarak farklı sonuçlar elde edildiği rapor edilmiştir (28). Bu çalışmada, genç farelere göre yaşlı farelerde, memantinin etkisi ile FA-çözünür fraksiyondaki A β peptit düzeylerinin daha şiddetli olarak azaldığı, ancak çözünür A β peptitlerin ise tersine arttığı bulunmuştur (220).

Korteks dokusundaki A β peptitlerin düzeyleri incelendiğinde; TBO'nun çözünür A β 42'yi kontrole göre anlamlı olarak azalttığı, ancak çözünür A β 40'da ve çözünmeyen A β peptitlerde anlamlı bir değişime neden olmadığı gözlemlendi. Bu durum,

TBO'nun, hipokampal çözünmeyen A β peptitleri içeren plak oluşumunda daha etkin bir inhibitör olduğunu göstermektedir.

Çalışmada, 14 aylık 3xTg-AD farelerde APP, BACE1 ve PS1 ekspresyonları, bu proteinlere spesifik antikorlar kullanılarak incelendi. TBO uygulanan farelerde, PS1 düzeyinde %20 kadar bir azalma görülmesine rağmen APP, BACE1 ve PS1 ekspresyonlarının hiçbirinde kontrole göre anlamlı bir değişim gözlenmedi. Hücrel PS1 seviyelerinin AChE ekspresyonu ile bağlantılı olduğu (221) ve hem membrana bağlı hem de çözünür formdaki AChE'nin PS1 ve γ -sekretaz aktivitesini düzenlediği (222) bilinmektedir. Bu nedenle, istatistiksel açıdan anlamlı olmamasına rağmen, PS1 düzeyinde gözlenen azalma, AChE ile arasındaki ilişkiye bağlı olabilir. Ancak yapılan çalışmalar, AChE inhibitörlerinin PS1 üzerindeki etkisinin kalıcı olmadığını ve PS1 üzerindeki etki kaybının, AChE'nin up-regülasyonu ile bağlantılı olduğunu göstermiştir (221).

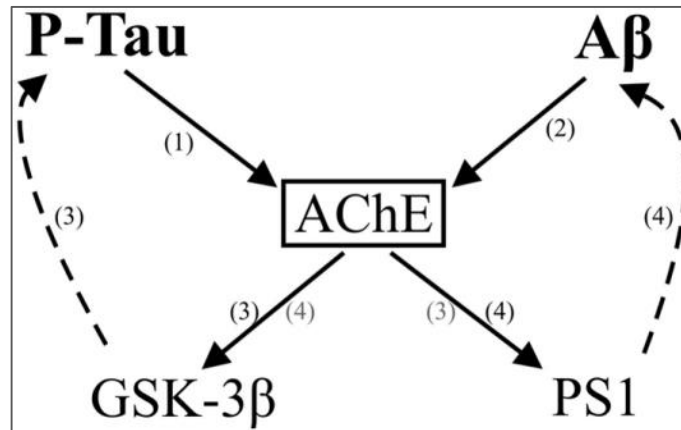
Amiloidojenik yolağın substratı olan APP ile proteolitik enzimleri olan BACE1 ve PS1 düzeylerinde bir değişimin olmaması, TBO'nun A β peptitlerini, ChE enzimleri üzerinden etkilediği olasılığını ortaya çıkarmaktadır. AChE, Alzheimerlı beyinde NFY'lerin (147) ve amiloid plakların (148, 223) yapısında yer alan bir enzimdir. Amiloid plak yapısına katılan AChE'nin, değişmiş enzim özellikleri içerdiği (150) ve AChE-A β kompleksleri oluşturup peptitlerin amiloid fibrillere agregasyonunu indüklediği bilinmektedir (149). AChE'ye benzer şekilde, BChE de hem NFY'lerin (147) hem de amiloid plakların yapısında bulunmaktadır (148). BChE'nin plak yapısına daha geç dönemlerde eklendiği gözlenmiştir (152). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, ailesel AH'nin 5 genini içeren bir fare modelinde (5XFAD), *BChE* geni susturulmuştur. Bu farelerde BChE eksikliğinin, fibriler A β beyin plak kümeleşmesini, kontrol 5XFAD farelere göre; %70 daha fazla azalttığı görülmüştür. Bu durum, BChE aktivitesindeki olası bir azalmanın, AH'de tedavi edici rolü olabileceğini önermektedir (224). Sonuçta, AChE'nin ve BChE'nin güçlü inhibitörleri olduğu bilinen TBO'nun varlığı, ChE ve A β peptitleri içeren stabil komplekslerin oluşmasını azaltmış ve devamında da amiloid plak oluşumunu hafifletmiş olabilir. Ayrıca, AChE inhibitörleri ile yapılan inhibisyon çalışmalarında insan rekombinant AChE'si tarafından indüklenen fibril oluşumunun, non-kompetitif veya karışık tip AChE inhibitörleri varlığında daha düşük seviyede olduğu gözlenmiştir (225). Bu durum,

insan eritrosit AChE'nin lineer karışık tip inhibitörü olan TBO'nun (8), farklı inhibisyon tipine sahip ChE inhibitörlerine göre; AH tedavisinde daha etkin olabileceğini önermektedir. TBO'nun ve TH'nin amiloid patolojisi üzerinde gösterdikleri farklı etkiler de bu nedenden kaynaklanıyor olabilir.

İn vivo koşullarda, APP ve BACE1 için elde edilmiş sonuçlar PS70 hücrelerinde gözlenen azalma ile çelişmektedir. Bu tür bir farklılık, *in vivo* modelin daha karmaşık olmasına veya *in vivo* çalışmada kullanılan doz ve uygulama süresi gibi koşullara bağlı olabilir. Bir dipeptidil peptidaz-4 inhibitörü olan linagliptin, değişen derişimlerde 3xTg-AD farelere uygulandığında; amiloid patolojisi üzerindeki inhibe edici etkisinin, uygulanan doz arttıkça arttığı bulunmuştur (226). Benzer şekilde TBO da 3xTg-AD farelerde APP işlenmesini doza bağımlı olarak etkiliyor olabilir. Yani, TBO uygulama dozunun artırılması, amiloid patolojisi üzerinde daha etkin sonuçlar verebilir. Ancak, uygulanacak dozun herhangi bir yan etkiye sebep olmaması önem taşımaktadır. Nonsteroidal seçici androjen reseptör modülatörü ve seçici androjen reseptör β agonisti ile 3xTg-AD farelerde, yapılan başka bir araştırmada ise, artan uygulama süresi ile birlikte A β peptit düzeylerinde görülen azalmanın ters orantılı olduğu bulunmuştur (227). TBO veya TH ile uygulama süresinin artırılması da AH patogenezi üzerinde daha etkili sonuçlar verebilir.

Bu tez çalışmasında, TBO'nun tau patolojisi üzerindeki rolü, total tau ve Thr181 ve Ser202/Thr205 birimlerinden fosforillenmiş tau için çözünür ve çözünmeyen hipokampal homojenatlarda incelendi. Bulgular TBO'nun, Thr181 biriminden fosforillenmiş çözünür tau seviyesini azalttığını, ancak bu azalmanın anlamlı olmadığını gösterdi. Çözünür total tau ve Ser202/Thr205 birimlerinden fosforilllenmiş çözünür ve çözünmeyen tau düzeylerinde de anlamlı bir değişim gözlenmedi. Tau patolojisi açısından elde edilen sonuçlar, *in vitro* tau agregasyonunu inhibe ettiği bilinen TBO (192) için çelişkili gözükebilir; ancak, *in vitro* tau agregasyonunu inhibe ettiği bilinen başka bir fenotiyazin türevi olan MethB (192) ile aynı fareler üzerinde yapılan bir çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir. MethB Thr181 birimindeki tau fosforilasyonunu değiştirmemiştir (174). Bunun yanında, MethB'nin pro-agregan insan tau proteinini eksprese eden farelere (Tau(Δ K)) uygulanması sonucunda; Thr231 birimindeki fosforilasyon düzeyinin azaldığı görülmüştür (228). Bu durum TBO'nun, tau patolojisi üzerindeki etkisinin kullanılan

deney modeline, uygulama şartlarına veya tau fosforilasyon bölgelerine göre değişebileceğini düşündürmektedir. Aslında, Şekil 5.1.'de gösterildiği üzere; AChE ile fosfo-tau arasında bir ilişki bulunmaktadır. AChE'nin bir varyantı olan T-AChE, tau hiperfosforilasyonunda rol oynayan GSK-3 β 'yı indükleyerek tau hiperfosforilasyonunu etkilemektedir (229). Bunun yanında AChE, APP işlenmesini ve A β üretimini de değiştirebilmektedir. AChE'nin aşırı ekspresyonu sonucunda PS1 düzeyleri artarken, siRNA ile AChE'nin susturulması üzerine ise PS1 düzeylerinde azalma olmaktadır (221). Bu durum AChE'nin, amiloidojenik APP işlenmesini arttıran dejeneratif bir döngüde rol alabileceği ihtimalini ortaya çıkarmaktadır. Daha zararlı ve büyük bir döngü içinde birbiri ile bağlantılı sistemlerde yer alan dejeneratif döngülerin, AH gelişimini hızlandırdığı söylenebilir (229). AH'de A β peptitler, amiloidojenik APP işlenmesini tetikleyen bir geri besleme ilmeğini teşvik ediyor olabilir (230). Son yapılan *in vitro* çalışmalar, A β 42'nin, toksik bir ilmek oluşturarak PS1 seviyelerinde artışa neden olduğunu göstermiştir (231). Ayrıca, SH-SY5Y hücrelerinde A β 42 ile tetiklenen PS1 artışının, siRNA AChE ile ön muamale sonucunda önlenemediği gözlenmiştir (221). Sonuç olarak, hem A β 42'nin hem de fosfo-tau'nun, AChE artışını tetiklediği ve bu durumun da PS1 ve dolayısıyla A β üretimini etkilediği düşünülmektedir (229). Ancak bu çalışmada, bir AChE inhibitörü olan TBO'nun, seçilen tedavi (doz/süre) rejiminde fosfo-tau üzerinde etkili olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 5.1. AChE ile A β ve fosfo-tau (p-Tau) arasındaki çoklu ilişki. AChE'nin hem A β hem de p-Tau ile etkileştiği ileri sürülmektedir. P-Tau, AChE aktivitesinde artışa sebep olabilirken (1), N-terminali uzatılmış T-AChE varyantı ise GSK-3 β 'yı aktive etmektedir (3). A β peptitler de AChE düzeylerini arttırabilir. Sıra ile AChE, APP işlenmesini ve A β peptitleri, PS1 üzerinden etkileyebilir (4). Sonuç olarak, artan AChE hem amiloidojenik hem de tau hiperfosforilasyon yollarını etkileyebilir (229).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, daha önceki çalışmalarımızla hem AChE'nin hem de BChE'nin güçlü inhibitörleri olduğu gösterilen fenotiyazin yapısındaki TBO'nun ve TH'nin, amiloid ve tau patolojileri üzerine olan etkileri, *in vitro* ve *in vivo* koşullarda incelendi. Her iki bileşik, PS70 hücrelerinde sitotoksik etkiye neden olmadan, amiloid patoloji elemanları A β 40 ve A β 42 ile non-amiloidojenik yolağın ürünü olan sAPP α salıverilmesini azalttı. TBO'nun A β peptitler üzerine olan etkisi, azalan substrat düzeyi (APP) ve APP'yi hidroliz eden BACE1 ekspresyonundaki azalmaya bağlanırken, TH ise sadece APP ekspresyonunu azalttı. *In vivo* koşullarda ise TH, A β düzeyleri üzerinde inhibe edici bir etkiye neden olmazken; TBO, hücre kültürü çalışmalarına benzer şekilde A β peptit düzeylerini azalttı. Bu azalma, hafif AH patolojisi gösteren farelerde, yaşlı farelere göre toksik form üzerinde daha şiddetliydi. Ancak, hücrelerde APP ve BACE1 seviyelerinde gözlenen düşüş, transgenik farelerde görülmedi. Bunun yanında, TBO yaşlı 3xTg-AD farelerin hipokampus dokusunda ne total tau ne de fosforile tau formlarında, seçilen uygulama koşulları altında anlamlı bir değişime neden oldu.

In vitro ve *in vivo* sonuçlar birlikte göz önüne alındığında; TH'den ziyade nöroprotektif özelliğe sahip olan TBO'nun (193), hem kolinerjik sistem üzerinden etki etmesi (8) hem de APP işlenmesindeki rolünden dolayı, AH'nin hafif evresinde daha iyi sonuçlar verebilecek potansiyel bir ilaç adayı olabileceği sonucuna varıldı. TBO'nun nasıl bir mekanizma ile- APP trafiğini değiştirerek mi yoksa hücre içi proteolizi artırarak mı- APP işlenmesini etkilediğini araştırmak yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. LaFerla FM, Oddo S. Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction. *Trends Mol Med*. 2005;11(4):170-6.
2. Perry EK, Gibson PH, Blessed G, Perry RH, Tomlinson BE. Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia. Choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in necropsy brain tissue. *J Neurol Sci*. 1977;34(2):247-65.
3. Medications for memory Loss [Internet]. 2017 [Erişim Tarihi 21.06.2017]. [Available from: (Erişim adresi) http://www.alz.org/alzheimers_disease_standard_prescriptions.asp.
4. Grossberg GT. Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: getting on and staying on. *Curr Ther Res Clin Exp*. 2003;64(4):216-35.
5. Greig NH, Utsuki T, Yu Q, Zhu X, Holloway HW, Perry T, et al. A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: attention to butyrylcholinesterase. *Curr Med Res Opin*. 2001;17(3):159-65.
6. Giacobini E. Long-term stabilizing effect of cholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl*. 2002(62):181-7.
7. Racchi M, Mazzucchelli M, Porrello E, Lanni C, Govoni S. Acetylcholinesterase inhibitors: novel activities of old molecules. *Pharmacol Res*. 2004;50(4):441-51.
8. Biberoglu K, Tek MY, Ghasemi ST, Tacal O. Toluidine blue O is a potent inhibitor of human cholinesterases. *Arch Biochem Biophys*. 2016;604:57-62.
9. Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, Arrighi HM. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2007;3(3):186-91.
10. Alzheimer A, Stelzmann RA, Schnitzlein HN, Murtagh FR. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clin Anat*. 1995;8(6):429-31.
11. Grand J, Feldman HH. Historical concepts of Alzheimer's disease and dementia. In: Feldman HH, editor. *Atlas of Alzheimer's Disease*: CRC Press; 2007. p. 1-26.
12. Mann DM, Yates PO, Marcyniuk B. Correlation between senile plaque and neurofibrillary tangle counts in cerebral cortex and neuronal counts in cortex and subcortical structures in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 1985;56(1):51-5.
13. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*. 1991;82(4):239-59.
14. Mackenzie I. Neuropathology of Alzheimer's disease. In: Feldman HH, editor. *Atlas of Alzheimer's Disease*: CRC Press; 2007. p. 71-81.
15. Zhang YW, Thompson R, Zhang H, Xu H. APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain*. 2011;4:3.
16. Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985;82(12):4245-9.

17. Gouras GK, Olsson TT, Hansson O. β -Amyloid peptides and amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*. 2015;12(1):3-11.
18. Selkoe DJ, Schenk D. Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2003;43:545-84.
19. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986;83(13):4913-7.
20. Hernandez F, Avila J. Tauopathies. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64(17):2219-33.
21. Thal DR, Ghebremedhin E, Orantes M, Wiestler OD. Vascular pathology in Alzheimer disease: correlation of cerebral amyloid angiopathy and arteriosclerosis/lipohyalinosis with cognitive decline. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2003;62(12):1287-301.
22. Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, et al. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2000;21(3):383-421.
23. Hansen LA, Masliah E, Galasko D, Terry RD. Plaque-only Alzheimer disease is usually the lewy body variant, and vice versa. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1993;52(6):648-54.
24. Nicoll JA, Yamada M, Frackowiak J, Mazur-Kolecka B, Weller RO. Cerebral amyloid angiopathy plays a direct role in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Pro-CAA position statement. *Neurobiol Aging*. 2004;25(5):589-97; discussion 603-4.
25. Perry EK, Tomlinson BE, Blessed G, Bergmann K, Gibson PH, Perry RH. Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. *Br Med J*. 1978;2(6150):1457-9.
26. Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, Delon MR. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science*. 1982;215(4537):1237-9.
27. Lau L-F, Brodney MA. Therapeutic Approaches for the Treatment of Alzheimer's Disease: An Overview. In: Lau L-F, Brodney MA, editors. *Alzheimer's Disease*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2008. p. 1-24.
28. Walsh JS, Welch HG, Larson EB. Survival of outpatients with Alzheimer-type dementia. *Ann Intern Med*. 1990;113(6):429-34.
29. Tang Q, Song P, Xu L. The Government's role in regulating, coordinating, and standardizing the response to Alzheimer's disease: Anticipated international cooperation in the area of intractable and rare diseases. *Intractable Rare Dis Res*. 2016;5(4):238-43.
30. Takahashi RH, Nagao T, Gouras GK. Plaque formation and the intraneuronal accumulation of beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Pathol Int*. 2017;67(4):185-93.

31. Norton S, Matthews FE, Barnes DE, Yaffe K, Brayne C. Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: an analysis of population-based data. *Lancet Neurol.* 2014;13(8):788-94.
32. Matthews FE, Arthur A, Barnes LE, Bond J, Jagger C, Robinson L, et al. A two-decade comparison of prevalence of dementia in individuals aged 65 years and older from three geographical areas of England: results of the cognitive function and ageing study I and II. *Lancet.* 2013;382(9902):1405-12.
33. Lindsay J, Laurin D, Verreault R, Hébert R, Helliwell B, Hill GB, et al. Risk factors for Alzheimer's disease: A prospective analysis from the Canadian study of health and aging. *Am J Epidemiol.* 2002;156(5):445-53.
34. Hsiung G-Y. Epidemiology of Alzheimer's disease and dementia. In: Feldman HH, editor. *Atlas of Alzheimer's Disease*: CRC Press; 2007. p. 27-40.
35. Andersen K, Launer LJ, Dewey ME, Letenneur L, Ott A, Copeland JR, et al. Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia: The EURODEM Studies. EURODEM Incidence Research Group. *Neurology.* 1999;53(9):1992-7.
36. Shadlen M-F, Larson EB, Yukawa M. The epidemiology of Alzheimer's disease and vascular dementia in Japanese and African-American populations: the search for etiological clues. *Neurobiol Aging.* 2000;21(2):171-81.
37. van Duijn CM, Clayton D, Chandra V, Fratiglioni L, Graves AB, Heyman A, et al. Familial aggregation of Alzheimer's disease and related disorders: a collaborative re-analysis of case-control studies. *Int J Epidemiol.* 1991;20 Suppl 2:S13-20.
38. Green RC, Cupples LA, Go R, Benke KS, Edeki T, Griffith PA, et al. Risk of dementia among white and African American relatives of patients with Alzheimer disease. *JAMA.* 2002;287(3):329-36.
39. Bekris LM, Yu C-E, Bird TD, Tsuang DW. Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 2010;23(4):213-27.
40. Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y. Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(15):5644-51.
41. Liddell M, Williams J, Bayer A, Kaiser F, Owen M. Confirmation of association between the e4 allele of apolipoprotein E and Alzheimer's disease. *J Med Genet.* 1994;31(3):197-200.
42. Sing CF, Davignon J. Role of the apolipoprotein E polymorphism in determining normal plasma lipid and lipoprotein variation. *Am J Hum Genet.* 1985;37(2):268-85.
43. Rapp A, Gmeiner B, Huttinger M. Implication of apoE isoforms in cholesterol metabolism by primary rat hippocampal neurons and astrocytes. *Biochimie.* 2006;88(5):473-83.
44. Nagy Z, Esiri MM, Jobst KA, Johnston C, Litchfield S, Sim E, et al. Influence of the apolipoprotein E genotype on amyloid deposition and neurofibrillary tangle formation in Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 1995;69(3):757-61.

45. Gibson GE, Haroutunian V, Zhang H, Park LC, Shi Q, Lesser M, et al. Mitochondrial damage in Alzheimer's disease varies with apolipoprotein E genotype. *Ann Neurol*. 2000;48(3):297-303.
46. Rosenthal SL, Kamboh MI. Late-onset Alzheimer's disease genes and the potentially implicated pathways. *Curr Genet Med Rep*. 2014;2:85-101.
47. Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984;122(3):1131-5.
48. Tanzi RE, Gusella JF, Watkins PC, Bruns GA, St George-Hyslop P, Van Keuren ML, et al. Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science*. 1987;235(4791):880-4.
49. Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, et al. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*. 1987;325(6106):733-6.
50. Sandbrink R, Masters CL, Beyreuther K. Beta A4-amyloid protein precursor mRNA isoforms without exon 15 are ubiquitously expressed in rat tissues including brain, but not in neurons. *J Biol Chem*. 1994;269(2):1510-7.
51. Yoshikai S, Sasaki H, Doh-ura K, Furuya H, Sakaki Y. Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene. *Gene*. 1990;87(2):257-63.
52. 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.
53. Dawson GR, Seabrook GR, Zheng H, Smith DW, Graham S, O'Dowd G, et al. Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein. *Neuroscience*. 1999;90(1):1-13.
54. Heber S, Herms J, Gajic V, Hainfellner J, Aguzzi A, Rulicke T, et al. Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J Neurosci*. 2000;20(21):7951-63.
55. Wang P, Yang G, Mosier DR, Chang P, Zaidi T, Gong YD, et al. Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-like protein 2. *J Neurosci*. 2005;25(5):1219-25.
56. Greenfield JP, Tsai J, Gouras GK, Hai B, Thinakaran G, Checler F, et al. Endoplasmic reticulum and trans-Golgi network generate distinct populations of Alzheimer beta-amyloid peptides. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(2):742-7.
57. Chasseigneaux S, Allinquant B. Functions of Abeta, sAPPalpha and sAPPbeta : similarities and differences. *J Neurochem*. 2012;120 Suppl 1:99-108.
58. Caporaso GL, Takei K, Gandy SE, Matteoli M, Mundigl O, Greengard P, et al. Morphologic and biochemical analysis of the intracellular trafficking of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein. *J Neurosci*. 1994;14(5 Pt 2):3122-38.
59. Sisodia SS. Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89(13):6075-9.

60. Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, et al. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(7):3922-7.
61. Buxbaum JD, Liu KN, Luo Y, Slack JL, Stocking KL, Peschon JJ, et al. Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem*. 1998;273(43):27765-7.
62. Koike H, Tomioka S, Sorimachi H, Saido TC, Maruyama K, Okuyama A, et al. Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem J*. 1999;343 Pt 2:371-5.
63. Postina R, Schroeder A, Dewachter I, Bohl J, Schmitt U, Kojro E, et al. A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest*. 2004;113(10):1456-64.
64. Kuhn P-H, Wang H, Dislich B, Colombo A, Zeitschel U, Ellwart JW, et al. ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive α -secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J*. 2010;29(17):3020-32.
65. Nhan HS, Chiang K, Koo EH. The multifaceted nature of amyloid precursor protein and its proteolytic fragments: friends and foes. *Acta Neuropathol*. 2015;129(1):1-19.
66. Lannfelt L, Basun H, Wahlund LO, Rowe BA, Wagner SL. Decreased alpha-secretase-cleaved amyloid precursor protein as a diagnostic marker for Alzheimer's disease. *Nat Med*. 1995;1(8):829-32.
67. Almkvist O, Basun H, Wagner SL, Rowe BA, Wahlund LO, Lannfelt L. Cerebrospinal fluid levels of alpha-secretase-cleaved soluble amyloid precursor protein mirror cognition in a Swedish family with Alzheimer disease and a gene mutation. *Arch Neurol*. 1997;54(5):641-4.
68. Meziane H, Dodart JC, Mathis C, Little S, Clemens J, Paul SM, et al. Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(21):12683-8.
69. Ring S, Weyer SW, Kilian SB, Waldron E, Pietrzik CU, Filippov MA, et al. The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *J Neurosci*. 2007;27(29):7817-26.
70. Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, et al. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*. 1999;286(5440):735-41.
71. Tanahashi H, Tabira T. Three novel alternatively spliced isoforms of the human beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme (BACE) and their effect on amyloid beta-peptide production. *Neurosci Lett*. 2001;307(1):9-12.

72. Holsinger RM, McLean CA, Beyreuther K, Masters CL, Evin G. Increased expression of the amyloid precursor beta-secretase in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 2002;51(6):783-6.
73. Ohno M, Sametsky EA, Younkin LH, Oakley H, Younkin SG, Citron M, et al. BACE1 deficiency rescues memory deficits and cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron*. 2004;41(1):27-33.
74. Solans A, Estivill X, de La Luna S. A new aspartyl protease on 21q22.3, BACE2, is highly similar to Alzheimer's amyloid precursor protein beta-secretase. *Cytogenet Cell Genet*. 2000;89(3-4):177-84.
75. Bennett BD, Babu-Khan S, Loeloff R, Louis JC, Curran E, Citron M, et al. Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues. *J Biol Chem*. 2000;275(27):20647-51.
76. Yan R, Munzner JB, Shuck ME, Bienkowski MJ. BACE2 functions as an alternative alpha-secretase in cells. *J Biol Chem*. 2001;276(36):34019-27.
77. Nikolaev A, McLaughlin T, O'Leary D, Tessier-Lavigne M. N-APP binds DR6 to cause axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature*. 2009;457(7232):981-9.
78. Vetrivel KS, Zhang YW, Xu H, Thinakaran G. Pathological and physiological functions of presenilins. *Mol Neurodegener*. 2006;1:4.
79. Wakabayashi T, De Strooper B. Presenilins: Members of the γ -Secretase Quartets, But Part-Time Soloists Too. *Physiology*. 2008;23(4):194-204.
80. Thinakaran G, Borchelt DR, Lee MK, Slunt HH, Spitzer L, Kim G, et al. Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron*. 1996;17(1):181-90.
81. Crystal AS, Morais VA, Pierson TC, Pijak DS, Carlin D, Lee VM, et al. Membrane topology of gamma-secretase component PEN-2. *J Biol Chem*. 2003;278(22):20117-23.
82. Ahn K, Shelton CC, Tian Y, Zhang X, Gilchrist ML, Sisodia SS, et al. Activation and intrinsic gamma-secretase activity of presenilin 1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(50):21435-40.
83. Fagan R, Swindells M, Overington J, Weir M. Nicastrin, a presenilin-interacting protein, contains an aminopeptidase/transferrin receptor superfamily domain. *Trends Biochem Sci*. 2001;26(4):213-4.
84. Shirotani K, Edbauer D, Capell A, Schmitz J, Steiner H, Haass C. Gamma-secretase activity is associated with a conformational change of nicastrin. *J Biol Chem*. 2003;278(19):16474-7.
85. Shah S, Lee SF, Tabuchi K, Hao YH, Yu C, LaPlant Q, et al. Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell*. 2005;122(3):435-47.
86. Niimura M, Isoo N, Takasugi N, Tsuruoka M, Ui-Tei K, Saigo K, et al. Aph-1 contributes to the stabilization and trafficking of the gamma-secretase complex through mechanisms involving intermolecular and intramolecular interactions. *J Biol Chem*. 2005;280(13):12967-75.

87. Iwatsubo T, Saido TC, Mann DM, Lee VM, Trojanowski JQ. Full-length amyloid-beta (1-42(43)) and amino-terminally modified and truncated amyloid-beta 42(43) deposit in diffuse plaques. *Am J Pathol.* 1996;149(6):1823-30.
88. Wei W, Norton DD, Wang X, Kusiak JW. Abeta 17-42 in Alzheimer's disease activates JNK and caspase-8 leading to neuronal apoptosis. *Brain.* 2002;125(Pt 9):2036-43.
89. Puzzo D, Privitera L, Leznik E, Fa M, Staniszewski A, Palmeri A, et al. Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J Neurosci.* 2008;28(53):14537-45.
90. Burdick D, Soreghan B, Kwon M, Kosmoski J, Knauer M, Henschen A, et al. Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. *J Biol Chem.* 1992;267(1):546-54.
91. Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, et al. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron.* 1996;17(5):1005-13.
92. Kumar S, Walter J. Phosphorylation of amyloid beta (Abeta) peptides - a trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer's disease. *Aging (Albany NY).* 2011;3(8):803-12.
93. Rambaran RN, Serpell LC. Amyloid fibrils: Abnormal protein assembly. *Prion.* 2008;2(3):112-7.
94. Wang YJ, Zhou HD, Zhou XF. Clearance of amyloid-beta in Alzheimer's disease: progress, problems and perspectives. *Drug Discov Today.* 2006;11(19-20):931-8.
95. Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev.* 2004;84(2):361-84.
96. Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron.* 1989;3(4):519-26.
97. Himmler A, Drechsel D, Kirschner MW, Martin DW, Jr. Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Mol Cell Biol.* 1989;9(4):1381-8.
98. Mandelkow E-M, Mandelkow E. Tau in Alzheimer's disease. *Trends in Cell Biology.* 1998;8(11):425-7.
99. Ksiezak-Reding H, Liu WK, Yen SH. Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments. *Brain Res.* 1992;597(2):209-19.
100. Gong CX, Iqbal K. Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau: A promising therapeutic target for Alzheimer disease. *Curr Med Chem.* 2008;15(23):2321-8.
101. Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology.* 1992;42(3 Pt 1):631-9.

102. Santacruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, et al. Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science*. 2005;309(5733):476-81.
103. Arrasate M, Mitra S, Schweitzer ES, Segal MR, Finkbeiner S. Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature*. 2004;431(7010):805-10.
104. Hanger DP, Hughes K, Woodgett JR, Brion JP, Anderton BH. Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci Lett*. 1992;147(1):58-62.
105. Noble W, Olm V, Takata K, Casey E, Mary O, Meyerson J, et al. Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo. *Neuron*. 2003;38(4):555-65.
106. Litersky JM, Johnson GV. Phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase inhibits the degradation of tau by calpain. *J Biol Chem*. 1992;267(3):1563-8.
107. Drewes G, Lichtenberg-Kraag B, Doring F, Mandelkow EM, Biernat J, Goris J, et al. Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state. *Embo J*. 1992;11(6):2131-8.
108. Gong CX, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Dephosphorylation of Alzheimer's disease abnormally phosphorylated tau by protein phosphatase-2A. *Neuroscience*. 1994;61(4):765-72.
109. Medeiros R, Baglietto-Vargas D, LaFerla FM. The role of tau in Alzheimer's disease and related disorders. *CNS Neurosci Ther*. 2011;17(5):514-24.
110. Bloom GS. Amyloid-beta and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *JAMA Neurol*. 2014;71(4):505-8.
111. Anand R, Gill KD, Mahdi AA. Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology*. 2014;76 Pt A:27-50.
112. Hung SY, Fu WM. Drug candidates in clinical trials for Alzheimer's disease. *J Biomed Sci*. 2017;24(1):47.
113. Berger-Sweeney J. The cholinergic basal forebrain system during development and its influence on cognitive processes: important questions and potential answers. *Neurosci Biobehav Rev*. 2003;27(4):401-11.
114. Revett TJ, Baker GB, Jhamandas J, Kar S. Glutamate system, amyloid ss peptides and tau protein: functional interrelationships and relevance to Alzheimer disease pathology. *J Psychiatry Neurosci*. 2013;38(1):6-23.
115. Kumar A, Singh A, Ekavali. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacol Rep*. 2015;67(2):195-203.
116. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 2002;297(5580):353-6.
117. Tayeb HO, Yang HD, Price BH, Tarazi FI. Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: Beyond cholinesterase inhibitors. *Pharmacol Ther*. 2012;134(1):8-25.

118. Schenk D, Basi GS, Pangalos MN. Treatment strategies targeting amyloid beta-protein. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(9):a006387.
119. Nitsch RM, Slack BE, Wurtman RJ, Growdon JH. Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science*. 1992;258(5080):304-7.
120. Hung AY, Haass C, Nitsch RM, Qiu WQ, Citron M, Wurtman RJ, et al. Activation of protein kinase C inhibits cellular production of the amyloid beta-protein. *J Biol Chem*. 1993;268(31):22959-62.
121. Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, et al. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet*. 1992;1(5):345-7.
122. Hemming ML, Elias JE, Gygi SP, Selkoe DJ. Identification of beta-secretase (BACE1) substrates using quantitative proteomics. *PLoS One*. 2009;4(12):e8477.
123. Vassar R, Kandalepas PC. The beta-secretase enzyme BACE1 as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. 2011;3(3):20.
124. Dominguez D, Tournoy J, Hartmann D, Huth T, Cryns K, Deforce S, et al. Phenotypic and biochemical analyses of BACE1- and BACE2-deficient mice. *J Biol Chem*. 2005;280(35):30797-806.
125. Wong GT, Manfra D, Poulet FM, Zhang Q, Josien H, Bara T, et al. Chronic treatment with the gamma-secretase inhibitor LY-411,575 inhibits beta-amyloid peptide production and alters lymphopoiesis and intestinal cell differentiation. *J Biol Chem*. 2004;279(13):12876-82.
126. Engel T, Goni-Oliver P, Lucas JJ, Avila J, Hernandez F. Chronic lithium administration to FTDP-17 tau and GSK-3beta overexpressing mice prevents tau hyperphosphorylation and neurofibrillary tangle formation, but pre-formed neurofibrillary tangles do not revert. *J Neurochem*. 2006;99(6):1445-55.
127. Zhang B, Maiti A, Shively S, Lakhani F, McDonald-Jones G, Bruce J, et al. Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(1):227-31.
128. Congdon EE, Wu JW, Myeku N, Figueroa YH, Herman M, Marinec PS, et al. Methylthioninium chloride (methylene blue) induces autophagy and attenuates tauopathy in vitro and in vivo. *Autophagy*. 2012;8(4):609-22.
129. Drachman DA, Leavitt J. Human memory and the cholinergic system. A relationship to aging? *Arch Neurol*. 1974;30(2):113-21.
130. Oda Y. Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Pathol Int*. 1999;49(11):921-37.
131. Taylor P. The cholinesterases. *J Biol Chem*. 1991;266(7):4025-8.
132. Lleo A, Greenberg SM, Growdon JH. Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease. *Annu Rev Med*. 2006;57:513-33.

133. Lockridge O, Bartels CF, Vaughan TA, Wong CK, Norton SE, Johnson LL. Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. *J Biol Chem.* 1987;262(2):549-57.
134. Saxena A, Redman AM, Jiang X, Lockridge O, Doctor BP. Differences in active site gorge dimensions of cholinesterases revealed by binding of inhibitors to human butyrylcholinesterase. *Biochemistry.* 1997;36(48):14642-51.
135. Darvesh S, Hopkins DA, Geula C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat Rev Neurosci.* 2003;4(2):131-8.
136. Dvir H, Silman I, Harel M, Rosenberry TL, Sussman JL. Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. *Chem Biol Interact.* 2010;187(1-3):10-22.
137. Masson P, Carletti E, Nachon F. Structure, activities and biomedical applications of human butyrylcholinesterase. *Protein Pept Lett.* 2009;16(10):1215-24.
138. Perry EK, Perry RH, Blessed G, Tomlinson BE. Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1978;4(4):273-7.
139. Taylor P, Radic Z. The cholinesterases: from genes to proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1994;34:281-320.
140. Atack JR, Perry EK, Bonham JR, Candy JM, Perry RH. Molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the aged human central nervous system. *J Neurochem.* 1986;47(1):263-77.
141. Perrier AL, Massoulie J, Krejci E. PRiMA: the membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain. *Neuron.* 2002;33(2):275-85.
142. Chatonnet A, Lockridge O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem J.* 1989;260(3):625-34.
143. Mufson EJ, Ginsberg SD, Ikonomic MD, DeKosky ST. Human cholinergic basal forebrain: chemoanatomy and neurologic dysfunction. *J Chem Neuroanat.* 2003;26(4):233-42.
144. Mesulam MM, Guillozet A, Shaw P, Levey A, Duysen EG, Lockridge O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience.* 2002;110(4):627-39.
145. Reid GA, Chilukuri N, Darvesh S. Butyrylcholinesterase and the cholinergic system. *Neuroscience.* 2013;234:53-68.
146. Mesulam M, Guillozet A, Shaw P, Quinn B. Widely spread butyrylcholinesterase can hydrolyze acetylcholine in the normal and Alzheimer brain. *Neurobiol Dis.* 2002;9(1):88-93.
147. Mesulam MM, Asuncion Moran M. Cholinesterases within neurofibrillary tangles related to age and Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 1987;22(2):223-8.
148. Moran MA, Mufson EJ, Gomez-Ramos P. Colocalization of cholinesterases with beta amyloid protein in aged and Alzheimer's brains. *Acta Neuropathol.* 1993;85(4):362-9.

149. Alvarez A, Opazo C, Alarcón R, Garrido J, Inestrosa NC. Acetylcholinesterase promotes the aggregation of amyloid- β -peptide fragments by forming a complex with the growing fibrils. *J Mol Biol.* 1997;272(3):348-61.
150. Alvarez A, Alarcon R, Opazo C, Campos EO, Munoz FJ, Calderon FH, et al. Stable complexes involving acetylcholinesterase and amyloid-beta peptide change the biochemical properties of the enzyme and increase the neurotoxicity of Alzheimer's fibrils. *J Neurosci.* 1998;18(9):3213-23.
151. Nalivaeva NN, Turner AJ. AChE and the amyloid precursor protein (APP) - Cross-talk in Alzheimer's disease. *Chem Biol Interact.* 2016;259(Pt B):301-6.
152. Guillozet AL, Smiley JF, Mash DC, Mesulam MM. Butyrylcholinesterase in the life cycle of amyloid plaques. *Ann Neurol.* 1997;42(6):909-18.
153. Darvesh S, Kumar R, Roberts S, Walsh R, Martin E. Butyrylcholinesterase-mediated enhancement of the enzymatic activity of trypsin. *Cell Mol Neurobiol.* 2001;21(3):285-96.
154. Loeffler DA, Connor JR, Juneau PL, Snyder BS, Kanaley L, DeMaggio AJ, et al. Transferrin and iron in normal, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease brain regions. *J Neurochem.* 1995;65(2):710-24.
155. Darvesh S, Cash MK, Reid GA, Martin E, Mitnitski A, Geula C. Butyrylcholinesterase is associated with beta-amyloid plaques in the transgenic APPSWE/PSEN1dE9 mouse model of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2012;71(1):2-14.
156. Macdonald IR, Rockwood K, Martin E, Darvesh S. Cholinesterase inhibition in Alzheimer's disease: is specificity the answer? *J Alzheimers Dis.* 2014;42(2):379-84.
157. Cummings JL. Cholinesterase inhibitors: A new class of psychotropic compounds. *Am J Psychiatry.* 2000;157(1):4-15.
158. Li Q, Wu D, Zhang L, Zhang Y. Effects of galantamine on β -amyloid release and beta-site cleaving enzyme 1 expression in differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Exp Gerontol.* 2010;45(11):842-7.
159. Yang H-Q, Sun Z-K, Yang W-M, Han H-M, Ma J-J, Li W. Effects of rivastigmine on secreted amyloid precursor protein and beta-amyloid secretion in neuroblastoma SK-N-SH cells. *Neurochem J.* 2013;7(3):215-20.
160. Dong H, Yuede CM, Coughlan CA, Murphy KM, Csernansky JG. Effects of donepezil on amyloid- β and synapse density in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Res.* 2009;1303:169-78.
161. Mohamed LA, Qosa H, Kaddoumi A. Age-related decline in brain and hepatic clearance of amyloid-beta is rectified by the cholinesterase inhibitors donepezil and rivastigmine in rats. *ACS Chem Neurosci.* 2015;6(5):725-36.
162. Pluta K, Morak-Młodawska B, Jeleń M. Recent progress in biological activities of synthesized phenothiazines. *Eur J Med Chem.* 2011;46(8):3179-89.
163. Sudeshna G, Parimal K. Multiple non-psychiatric effects of phenothiazines: a review. *Eur J Pharmacol.* 2010;648(1):6-14.

164. Ohlow MJ, Moosmann B. Phenothiazine: the seven lives of pharmacology's first lead structure. *Drug Discov Today*. 2011;16(3):119-31.
165. Weiss B, Prozialeck WC, Wallace TL. Interaction of drugs with calmodulin. Biochemical, pharmacological and clinical implications. *Biochem Pharmacol*. 1982;31(13):2217-26.
166. Aftab DT, Ballas LM, Loomis CR, Hait WN. Structure-activity relationships of phenothiazines and related drugs for inhibition of protein kinase C. *Mol Pharmacol*. 1991;40(5):798-805.
167. Snyder SH, Banerjee SP, Yamamura HI, Greenberg D. Drugs, neurotransmitters, and schizophrenia. *Science*. 1974;184(4143):1243-53.
168. Peroutka SJ, Snyder SH. Relationship of neuroleptic drug effects at brain dopamine, serotonin, alpha-adrenergic, and histamine receptors to clinical potency. *Am J Psychiatry*. 1980;137(12):1518-22.
169. Seelig A, Gottschlich R, Devant RM. A method to determine the ability of drugs to diffuse through the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91(1):68-72.
170. Moosmann B, Skutella T, Beyer K, Behl C. Protective activity of aromatic amines and imines against oxidative nerve cell death. *Biol Chem*. 2001;382(11):1601-12.
171. Cronier S, Beringue V, Bellon A, Peyrin JM, Laude H. Prion strain- and species-dependent effects of antiprion molecules in primary neuronal cultures. *J Virol*. 2007;81(24):13794-800.
172. Kucukkilinc T, Ozer I. Multi-site inhibition of human plasma cholinesterase by cationic phenoxazine and phenothiazine dyes. *Arch Biochem Biophys*. 2007;461(2):294-8.
173. Ladiwala ARA, Dordick JS, Tessier PM. Aromatic small molecules remodel toxic soluble oligomers of amyloid β through three independent pathways. *J Biol Chem*. 2011;286(5):3209-18.
174. Medina DX, Caccamo A, Oddo S. Methylene blue reduces A β levels and rescues early cognitive deficit by increasing proteasome activity. *Brain Pathol*. 2011;21(2):140-9.
175. Mori T, Koyama N, Segawa T, Maeda M, Maruyama N, Kinoshita N, et al. Methylene blue modulates β -secretase, reverses cerebral amyloidosis, and improves cognition in transgenic mice. *J Biol Chem*. 2014;289(44):30303-17.
176. Panza F, Solfrizzi V, Seripa D, Imbimbo BP, Lozupone M, Santamato A, et al. Tau-centric targets and drugs in clinical development for the treatment of Alzheimer's disease. *Biomed Res Int*. 2016;2016:3245935.
177. TauRx Pharmaceutical Phase 3 [Internet] 2017 [Erişim Tarihi 02.08.2017]. [Available from: (Erişim adresi) <http://taurx.com/phase-3.html>].
178. Guha SN, Moorthy PN, Kishore K, Naik DB, Rao KN. One-electron reduction of thionine studied by pulse radiolysis. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences - Chemical Sciences*. 1987;99(4):261-71.

179. Audi SH, Olson LE, Bongard RD, Roerig DL, Schulte ML, Dawson CA. Toluidine blue O and methylene blue as endothelial redox probes in the intact lung. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278(1):H137-50.
180. Albery WJ, Foulks AW, Hall KJ, Hillman AR, Egdell RG, Orchard AF. Thionine coated electrode for photogalvanic cells. *Nature.* 1979;282(5741):793-7.
181. Ou C, Yuan R, Chai Y, Tang M, Chai R, He X. A novel amperometric immunosensor based on layer-by-layer assembly of gold nanoparticles–multi-walled carbon nanotubes–thionine multilayer films on polyelectrolyte surface. *Anal Chim Acta.* 2007;603(2):205-13.
182. Biniiaz Z, Mostafavi A, Shamspur T, Torkzadeh-Mahani M, Mohamadi M. Electrochemical sandwich immunoassay for the prostate specific antigen using a polyclonal antibody conjugated to thionine and horseradish peroxidase. *Microchim Acta.* 2017;84(8):2731–8.
183. Mohr H, Redecker-Klein A. Inactivation of pathogens in platelet concentrates by using a two-step procedure. *Vox Sang.* 2003;84(2):96-104.
184. Vilela SF, Junqueira JC, Barbosa JO, Majewski M, Munin E, Jorge AO. Photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms by malachite green and phenothiazine dyes: an in vitro study. *Arch Oral Biol.* 2012;57(6):704-10.
185. Sridharan G, Shankar AA. Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2012;16(2):251-5.
186. Yeager RM, Krementz ET. Toluidine blue in identification of parathyroid glands at operation. *Ann Surg.* 1969;169(6):829-38.
187. Cudd LA, Burrows GE, Clarke CR. Pharmacokinetics and toxicity of tolonium chloride in sheep. *Vet Hum Toxicol.* 1996;38(5):329-32.
188. Kiese M, Lorcher W, Weger N, Zierer A. Comparative studies on the effects of toluidine blue and methylene blue on the reduction of ferrihaemoglobin in man and dog. *Eur J Clin Pharmacol.* 1972;4(2):115-8.
189. Tuite E, Kelly JM. The interaction of methylene blue, azure B, and thionine with DNA: Formation of complexes with polynucleotides and mononucleotides as model systems. *Biopolymers.* 1995;35(5):419-33.
190. Saha B, Kumar GS. Binding interaction of phenothiazinium dyes with double stranded RNAs: Spectroscopic and calorimetric investigation. *J Photochem Photobiol, B.* 2017;167:99-110.
191. Paul P, Mati SS, Bhattacharya SC, Kumar GS. Spectroscopic, calorimetric, cyclic voltammetric and molecular modeling studies of new methylene blue-polyadenylic acid interaction and comparison to thionine and toluidine blue O: Understanding self-structure formation by planar dyes. *Dyes Pigm.* 2017;136:205-18.
192. Wischik C, Edwards P, Lai R, Roth M, Harrington C. Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93(20):11213-8.

193. Poteet E, Winters A, Yan L-J, Shufelt K, Green KN, Simpkins JW, et al. Neuroprotective actions of methylene blue and its derivatives. *PLoS One*. 2012;7(10):e48279.
194. Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: Intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron*. 2003;39(3):409-21.
195. Billings LM, Oddo S, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM. Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron*. 2005;45(5):675-88.
196. Research models: 3xTg [Internet]. 2017 [Erişim Tarihi 04.07.2017]. [Available from: (Erişim adresi) <http://www.alzforum.org/research-models/3xtg>.
197. Hirata-Fukae C, Li HF, Hoe HS, Gray AJ, Minami SS, Hamada K, et al. Females exhibit more extensive amyloid, but not tau, pathology in an Alzheimer transgenic model. *Brain Res*. 2008;1216:92-103.
198. Clinton LK, Billings LM, Green KN, Caccamo A, Ngo J, Oddo S, et al. Age-dependent sexual dimorphism in cognition and stress response in the 3xTg-AD mice. *Neurobiol Dis*. 2007;28(1):76-82.
199. Haley TJ, Stolarsky F. A study of the acute and chronic toxicity of toluidine blue and related phenazine and thiazine dyes. *Stanford Med Bull*. 1951;9(2):96-100.
200. Rostagno A, Ghiso J. Isolation and biochemical characterization of amyloid plaques and paired helical filaments. *Curr Protoc Cell Biol*. 2009;Chapter 3:Unit 3.33 3..1-.
201. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985;150(1):76-85.
202. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72(1):248-54.
203. Savage MJ, Trusko SP, Howland DS, Pinsker LR, Mistretta S, Reaume AG, et al. Turnover of amyloid beta-protein in mouse brain and acute reduction of its level by phorbol ester. *J Neurosci*. 1998;18(5):1743-52.
204. Westmark CJ, Hervey CM, Berry-Kravis EM, Malter JS. Effect of anticoagulants on amyloid beta-protein precursor and amyloid beta levels in plasma. *J Alzheimers Dis Parkinsonism*. 2011;1:101.
205. Richter JA, Perry EK, Tomlinson BE. Acetylcholine and choline levels in post-mortem human brain tissue: preliminary observations in Alzheimer's disease. *Life Sci*. 1980;26(20):1683-9.
206. Lahiri DK, Farlow MR, Sambamurti K, Nall C. The effect of tacrine and leupeptin on the secretion of the beta-amyloid precursor protein in HeLa cells. *Life Sci*. 1997;61(20):1985-92.

207. Greig NH, Utsuki T, Ingram DK, Wang Y, Pepeu G, Scali C, et al. Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer β -amyloid peptide in rodent. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(47):17213-8.
208. Bailey JA, Ray B, Greig NH, Lahiri DK. Rivastigmine lowers A β and increases sAPP α levels, which parallel elevated synaptic markers and metabolic activity in degenerating primary rat neurons. *PLoS One*. 2011;6(7):e21954.
209. Lahiri DK, Chen D, Maloney B, Holloway HW, Yu Q-s, Utsuki T, et al. The experimental Alzheimer's disease drug posiphen [(+)-phenserine] lowers amyloid- β peptide levels in cell culture and mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;320(1):386-96.
210. Greig NH, Sambamurti K, Yu Q-s, Brossi A, Bruinsma GB, Lahiri DK. An overview of phenserine tartrate, a novel acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2005;2(3):281-90.
211. Lahiri DK, Farlow MR, Sambamurti K. The secretion of amyloid β -peptides is inhibited in the tacrine-treated human neuroblastoma cells. *Mol Brain Res*. 1998;62(2):131-40.
212. Hick M, Herrmann U, Weyer SW, Mallm JP, Tschape JA, Borgers M, et al. Acute function of secreted amyloid precursor protein fragment APPsalpha in synaptic plasticity. *Acta Neuropathol*. 2015;129(1):21-37.
213. Mazzucchelli M, Porrello E, Villetti G, Pietra C, Govoni S, Racchi M. Characterization of the effect of ganstigmine (CHF2819) on amyloid precursor protein metabolism in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Neural Transm*. 2003;110(8):935-47.
214. Pakaski M, Kasa P. Role of acetylcholinesterase inhibitors in the metabolism of amyloid precursor protein. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2003;2(3):163-71.
215. Shaw KT, Utsuki T, Rogers J, Yu Q-S, Sambamurti K, Brossi A, et al. Phenserine regulates translation of β -amyloid precursor protein mRNA by a putative interleukin-1 responsive element, a target for drug development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(13):7605-10.
216. Utsuki T, Yu Q-s, Davidson D, Chen D, Holloway HW, Brossi A, et al. Identification of novel small molecule inhibitors of amyloid precursor protein synthesis as a route to lower Alzheimer's disease amyloid- β peptide. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;318(2):855-62.
217. Wondrak GT. NQO1-activated phenothiazinium redox cyclers for the targeted bioreductive induction of cancer cell apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 2007;43(2):178-90.
218. Blazquez-Castro A, Stockert JC, Sanz-Rodriguez F, Zamarron A, Juarranz A. Differential photodynamic response of cultured cells to methylene blue and toluidine blue: role of dark redox processes. *Photochem Photobiol Sci*. 2009;8(3):371-6.

219. Becker H, Quadbeck G. Tierexperimentelle Untersuchungen über die Funktionsweise der Blut-Hirnschranke. *Zeitschrift für Naturforschung B*. 1952;7(9-10):493-7.
220. Martinez-Coria H, Green KN, Billings LM, Kitazawa M, Albrecht M, Rammes G, et al. Memantine improves cognition and reduces Alzheimer's-like neuropathology in transgenic mice. *Am J Pathol*. 2010;176(2):870-80.
221. Silveyra MX, Garcia-Ayllon MS, Serra-Basante C, Mazzoni V, Garcia-Gutierrez MS, Manzanares J, et al. Changes in acetylcholinesterase expression are associated with altered presenilin-1 levels. *Neurobiol Aging*. 2012;33(3):627.e27-37.
222. Campanari ML, Garcia-Ayllon MS, Belbin O, Galceran J, Lleo A, Saez-Valero J. Acetylcholinesterase modulates presenilin-1 levels and gamma-secretase activity. *J Alzheimers Dis*. 2014;41(3):911-24.
223. Ulrich J, Meier-Ruge W, Probst A, Meier E, Ipsen S. Senile plaques: staining for acetylcholinesterase and A4 protein: a comparative study in the hippocampus and entorhinal cortex. *Acta Neuropathol*. 1990;80(6):624-8.
224. Reid GA, Darvesh S. Butyrylcholinesterase-knockout reduces brain deposition of fibrillar β -amyloid in an Alzheimer mouse model. *Neuroscience*. 2015;298:424-35.
225. Bartolini M, Bertucci C, Cavrini V, Andrisano V. β -Amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: inhibition studies. *Biochem Pharmacol*. 2003;65(3):407-16.
226. Kosaraju J, Holsinger RM, Guo L, Tam KY. Linagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, mitigates cognitive deficits and pathology in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*. 2016:1-11.
227. George S, Petit GH, Gouras GK, Brundin P, Olsson R. Nonsteroidal selective androgen receptor modulators and selective estrogen receptor beta agonists moderate cognitive deficits and amyloid-beta levels in a mouse model of Alzheimer's disease. *ACS Chem Neurosci*. 2013;4(12):1537-48.
228. Hochgräfe K, Sydow A, Matenia D, Cadinu D, Könen S, Petrova O, et al. Preventive methylene blue treatment preserves cognition in mice expressing full-length pro-aggregant human Tau. *Acta Neuropathol Commun*. 2015;3(1):25.
229. García-Ayllón M-S, Small DH, Avila J, Sáez-Valero J. Revisiting the role of acetylcholinesterase in Alzheimer's disease: Cross-talk with P-tau and β -Amyloid. *Front Mol Neurosci*. 2011;4(22).
230. Cribbs D. H., Davis-Salinas J., Cotman C. W., E. VNW. A β induces increased expression and processing of amyloid precursor protein in cortical neurons. *Alzheimer Res*. 1995;1:197-200.
231. Matrone C, Ciotti MT, Mercanti D, Marolda R, Calissano P. NGF and BDNF signaling control amyloidogenic route and A β production in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(35):13139-44.

EKLER

EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

SAYI : 66332047-604.01.02/ 39-3971
KONU :

21.02/2013

Sayın

Doç.Dr. Özden TACAL
Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Özden TACAL, K.Gonca AKBULUT ve Kevser BİBEROĞLU'ndan oluşan, G.Ü.ET-13.009 kod numaralı ve "*Alzheimer Hastalığının Tedavisinde Fenoksazin ve Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin Kullanımlarının Değerlendirilmesi ve Etki Mekanizmalarının Araştırılması*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-13.009 and entitled "*Evaluation of the use of Phenoxazine and Phenothiazine-Structured Compounds in the Treatment of Alzheimer's Disease and Investigation of Their Action Mechanisms*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

EK : 1 Liste

Prof.Dr.Leyla AÇIK
Gazi Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

EK-2: Tez Çalışması ile İlgili Bildiriler ve Yayınlar

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler:

Yuksel M, Biberoglu K, Onder S, Akbulut KG, and Tacal O. Effects of phenothiazine-structured compounds on APP processing in Alzheimer's disease cellular model. Biochimie. 2017; 138:82-89.

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

Yuksel M., Biberoglu K., Onder S., Akbulut K. G., Tacal O. Toluidine blue O, but not thionine, alters APP processing in 3xTg-AD mice. 42. FEBS Kongresi; Kudüs, İsrail: The FEBS Journal 284 (Suppl. 1); 2017. p. 242

Yuksel M., Biberoglu K., Onder S., Akbulut K. G., Tacal O. Effect of toluidine blue O on tau pathology in an Alzheimer's disease animal model. FEBS İleri Düzey Kursu ALC17-012; Spetses, Yunanistan: Poster No. 68; 2017. p. 117

Yuksel M., Biberoglu K., Onder S., Akbulut K. G., Tacal O. The extracellular A β levels are reduced by the cholinesterase inhibitor toluidine blue O in an Alzheimer's disease-like cellular model. 41. FEBS Kongresi; Kusadasi, Türkiye: The FEBS Journal; 2016. p. 321

Yuksel M., Biberoglu K., Onder S., Akbulut K. G., Tacal O. The effect of thionine on amyloid- β peptide levels in PS70 cells. 12. Uluslararası Kolinesterazlar Toplantısı- 6. Uluslararası Paraokzanazlar Kongresi; Alicante, İspanya: Poster Oturumu S07P; 2015. p. 126

ÖZGEÇMİŞ

I-Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı :Melike YÜKSEL
Doğum Yeri ve Tarihi :Ulukışla - 1986
Uyruğu :Türkiye Cumhuriyeti
İletişim Adresi :Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya
Anabilim Dalı Kat:-1 Sıhhiye/Ankara
Telefon :+90-312 3051499
e-posta : melike.ytek@hacettepe.edu.tr / mel_yuksel@yahoo.com

II-Eğitim

2012 - 2017 **Biyokimya Doktorası**
Biyokimya Doktora Programı Programı
Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye
Tez: “Fenotiyazin yapıli bileşiklerin amiloid prekürsör protein ve amiloid beta peptitler üzerindeki etkilerinin araştırılması”

2009 - 2011 **Mikrobiyoloji ve Biyokimya Yüksek Lisansı**
Mikrobiyoloji ve Biyokimya Master Programı
Georg-August Üniversitesi, Göttingen, Almanya
Tez: “Roles of long chain acyl CoA synthetases in lipid metabolism of Arabidopsis”

2004 - 2009 **Moleküler Biyoloji ve Genetik Lisansı**
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Orta Doğu Teknik Üniversitesi Ankara, Türkiye

III-Mesleki Deneyim

2013 – şu an **Araştırma Görevlisi**
Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

IV-Bilimsel Faaliyetler

Yayınlar

**SCI, SSCI,
AHCI
indekslerine
giren dergilerde
yayınlanan
makaleler**

Yuksel M., Biberoglu K., Onder S., Akbulut K. G., Tacal O. Effects of phenothiazine-structured compounds on APP processing in Alzheimer's disease cellular model. *Biochimie*. 2017; 138:82-89.

Biberoglu K., **Yuksel M.**, Ghasemi S. T., Tacal O. Toluidine blue O is a potent inhibitor of human cholinesterases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2016;604:57-62.

**Hakemli
konferans/
sempozyumların
bildiri
kitaplarında yer
alan yayınlar**

Yuksel M., Biberoglu K., Onder S., Akbulut K. G., Tacal O. Toluidine blue O, but not thionine, alters APP processing in 3xTg-AD mice. 42. FEBS Kongresi; Kudüs, İsrail: The FEBS Journal 284 (Suppl. 1); 2017. p. 242

Yuksel M., Biberoglu K., Onder S., Akbulut K. G., Tacal O. Effect of toluidine blue O on tau pathology in an Alzheimer's disease animal model. FEBS İleri Düzey Kursu ALC17-012; Spetses, Yunanistan: Poster No. 68; 2017. p. 117

Yuksel M., Biberoglu K., Onder S., Akbulut K. G., Tacal O. The extracellular A β levels are reduced by the cholinesterase inhibitor toluidine blue O in an Alzheimer's disease-like cellular model. 41. FEBS Kongresi; Kusadasi, Türkiye: The FEBS Journal 283 (Suppl. 1); 2016. p. 321

Biberoglu K., **Yuksel M.**, Onder S., Tacal O. Azure B reduces extracellular amyloid- β levels in PS70 cells. 41. FEBS Kongresi; Kusadasi, Türkiye: The FEBS Journal 283 (Suppl. 1); 2016. p. 266

Yuksel M., Fulda M. The combined role of long chain acyl-CoA synthetase 2, long chain acyl-CoA synthetase 4 and long chain acyl-CoA synthetase 9 in the development of Arabidopsis roots. 4. Uluslararası Moleküler Biyoloji Derneği Kongresi; Ankara, Türkiye:2016.

Yuksel M., Biberoglu K., Onder S., Akbulut K. G., Tacal O. The effect of thionine on amyloid- β peptide levels in PS70 cells. 12. Uluslararası Kolinesterazlar Toplantısı- 6. Uluslararası Paraokzanazlar Kongresi; Alicante, İspanya: Poster Oturumu S07P; 2015. p. 126

Yuksel M., Biberoglu K., Onder S., Akbulut K. G., Tacal O. The effect of toluidine blue o on amyloid- β peptide levels in human neuroblastoma cells. 40. FEBS Kongresi; Berlin, Almanya: The FEBS Journal; 2015. p. 177

Yuksel M., Fulda M. The combined role of long chain acyl-CoA synthetase 2, long chain acyl-CoA synthetase 4 and long chain acyl-CoA synthetase 9 in lipid metabolism of Arabidopsis. 40. FEBS Kongresi; Berlin, Almanya: The FEBS Journal; 2015. p. 106

Biberoglu K., **Yuksel M.**, Ghasemi S. T., Tacal O. The role of peripheral anionic site in binding of Toluidine blue O to human butyrylcholinesterase. 39. FEBS Kongresi; Paris, Fransa. The FEBS Journal; 2014. p. 386

Yer Aldığı Projeler

2017- devam ediyor	İnsan pankreas kanseri hücre hattında fenotiyazin yapıli bileşiklerin amiloid prekürsörbenzeri protein 2 üzerindeki etkilerinin değeriendirilmesi ve etki mekanizmalarının araştırılması. HÜ Bilimsel Araştırmalar Proje Koordinasyon Birimi. Araştırmacı.
2017- devam ediyor	Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin Amiloid Prekürsör Protein Ve Amiloid Beta Peptitler Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması. HÜ Bilimsel Araştırmalar Proje Koordinasyon Birimi. Araştırmacı.
2015-2016	ECF385 Biyokimya III Laboratuvar Ders İçeriğinin Klinik Biyokimya Yöntemleri ile Zenginleştirilerek Güncellenmesi. HÜ Bilimsel Araştırmalar Proje Koordinasyon Birimi. Araştırmacı.
2015-2016	Azur B'nin amiloid beta peptidler üzerindeki etkilerinin araştırılması. HÜ Bilimsel Araştırmalar Proje Koordinasyon Birimi. Araştırmacı.
2013 – 2016	Alzheimer hastalığının tedavisinde fenoksazin ve fenotiyazin yapıli bileşiklerin kullanımlarının değeriendirilmesi ve etki mekanizmalarının araştırılması. TÜBİTAK. Bursiyer.

2017-2014 Arası Katıldığı Kongreler ve Kurslar

10-14/09/2017	42. FEBS Kongresi, Kudüs, İsrail
07-10/09/2017	17. FEBS Genç Bilim İnsanları Forumu, Kudüs, İsrail
27/08-01/09/2017	FEBS İleri Düzey Kursu ALC17-012, Spetses, Yunanistan
06-07/05/2017	3. ODTÜ Sinirbilim Günleri, Ankara, Türkiye
27-29/11/2015	4. Uluslararası Moleküler Biyoloji Kongresi, Ankara, Türkiye
04-09/07/2015	40. FEBS Kongresi, Berlin, Almanya

01-08/11/2014	Deney Hayvanları Kullanımı Sertifika Kursu, Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, Türkiye
15-16/09/2014	Sağlık Bilimlerinde Gelişmiş Teknolojiler Sempozyumu, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, Türkiye

Aldığı Burslar/Ödüller

2017	17. FEBS Genç Bilim İnsanları Forumu (YSF) Bursu
2017	FEBS Gençlik Seyahat Fonu (YTF) Bursu (FEBS İleri Düzey Kursu ALC17-012, Spetses, Yunanistan)
2015	Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Seyahat Yardımı (40. FEBS Kongresi, Berlin, Almanya)
2015	40. FEBS Kongresi (Berlin, Almanya) Kayıt Ücreti Muafiyeti
2009 – 2011	Almanya’da lisansüstü eğitim için DAAD (Alman Akademik Değişim Servisi) –TEV (Türk Eğitim Vakfı) Ortak Bursu
2009	Yüksek Şeref Öğrencisi Lisans Mezuniyeti- Orta Doğu Teknik Üniversitesi
2008	Erasmus Öğrenci Staj Hareketliliği Bursu