

T.C
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRURJİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL ALZHEİMER HASTALIĞI
MODELİNDE APOSİNİNİN (APOCYNIN) UZAYSAL
ÖĞRENME, DENGE VE BELLEK FONKSİYONLARINA
ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. YENER AKYUVA
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. S. ÇAĞATAY ÖNAL

MALATYA – 2015

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tez çalışmamın tüm aşamalarında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocam Prof. Dr. S. Çağatay ÖNAL'a, uzmanlık eğitimim süresince bilgi, birikim ve deneyimlerini aktararak bu disiplinde yetişmemi sağlayan sayın hocalarım Prof. Dr. Arif ÖNDER, Prof. Dr. Ayhan KOÇAK, Prof. Dr. Süleyman R. ÇAYLI, Doç. Dr. M. A. ALADAĞ, Yrd. Doç. Dr. M. Akif DURAK, Yrd. Doç. Dr. M. Namık ÖZTANIR'a saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tezimin hazırlanmasındaki katkılarından dolayı Farmakoloji Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Hakan PARLAKPINAR'a, Embriyoloji ve Histoloji Anabilim Dalı'nda Doç. Dr. Mehmet GÜL'e, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ'e, Fizyoloji Anabilim Dalı'nda Doç. Dr. Ergül ALÇİN'e, Biyoistatistik Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Cemil ÇOLAK 'a, kütüphanesini tezim için açan Nöroloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Yüksel KABLAN'a , Tüm Tıbbi Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı, İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı ve Farmakoloji Laboratuvarı çalışanlarına, ve mesai arkadaşlarım Dr. Tuncay Ateş'e, Dr. Gökhan REŞİTOĞLU'na, Dr. Cengiz GÖLÇEK'e, Dr. A. Alper TAKMAZ'a, Dr. Ahmet YARDIM'a, Dr. Ramazan PAŞAHAN'a, Dr. Veysel KIYAK'a, Dr. Mustafa BAŞARAN'a, Dr. Sarp ŞAHİN'e ve diğer tüm çalışma arkadaşlarıma, maddi ve manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim aileme, ihtisas sürem boyunca sabır ve destekleri için sevgili eşime teşekkür ederim.

Dr. Yener AKYUVA

KISALTMALAR

ACH	: Asetilkolin
ACHE	: Asetilkolin esteraaz
ADC	: Arjinin dekarboksilaz
ADP	: Adenozin difosfat
AH	: Alzheimer Hastalığı
APO	: Aposinin (4-hydroxy-3-methoxyacetophenone) (Apocynin)
ATP	: Adenozin trifosfat
BOS	: Beyin omirilik sıvısı
CHAT	: Kolinasetil transferaz
COX-2	: Siklooksijenaz-2
DM	: Diabetes Mellitus
DMSO	: Dimethylsulfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DTNB	:Ditiyobis-nitro benzoik asit
GLUT 2	: Glukoz transporter 2
GSH	: Redükte Glutasyon
H-E	: Hemotoksilen Eozin
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
ICV	: İntraserebroventriküler
IGH	: İmmün Growth Faktör
IL 10	: İnterlökin 10
INOS	: İndüklenebilir Nitrik oksit sentetaz
IP	: İntraperitoneal
LPS	: Lipopolisakkarit
MDA	: Malondialdehit
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
MPTP	: 1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6- tetrahidropiridin
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NBM	: Bazal magnoselüler çekirdek, 2- Meynert çekirdeği
NOX	: Azot Oksit
O₂	: Oksijen

PET	: Pozitron emisyon tomografisi
RNA	: Ribonükleik asit
RPM	: Revolution per minute (Dakikada devir sayısı)
SF	: Serum fizyolojik
SPECT	: Bilgisayarlı tek foton emisyon tomografisi
STZ	: Streptozotosin
TBA	: Tiyobarbitürik Asit
TCA	: Triklor asetik asit
TEM	: Transmission Elektron Mikroskop
TGF β	: Tümör β büyüme faktörü



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
KISALTMALAR.....	iii
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar GRAFİKLER DİZİNİ	vii
RESİMLER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. AMAÇ	2
3. GENEL BİLGİLER	3
3.1. Tarihçe:	3
3.2. Alzheimer Hastalığı Hakkında:	3
3.3. Kolinerjik Sistem ve Öğrenme-Bellek.....	5
3.4. Deneysel Alzheimer Hastalığı Modeli.....	6
3.5. Deneyde Kullanılan Temel Moleküller	7
3.5.1. Aposinin (APO):	7
3.5.2. Streptozotosin (STZ).....	8
3.5.3. Glutasyon (GSH).....	9
3.5.4. Malondialdehit (MDA)	10
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	12
4.1. Rota-rod, Akselere-rod Testi:	12
4.2. Water-Maze Su Havuzu Testi:.....	13
4.3. Anestezi	15
4.4. Deneysel Alzheimer Hastalığı Modeli Oluşturulması.....	15
4.5. Aposinin tedavisi hazırlanması:.....	18
4.6. Deney Grupları	18
4.6.1. Kontrol grubu (SHAM):	18
4.6.2. Deneysel AH geliştiği kabul edilen grup:.....	18
4.7. Histopatoloji ve Biyokimyasal Analizler için Doku ve Kan Örneklerinin Alınması	19
4.7.1. Malondialdehit (MDA; Tiyoarbitürik Asit Reaktif Ürünleri, TBARS) Analizi. 19	
4.7.2. Redükte Glutasyon(GSH) Analizi.....	21

4.7.3. Histopatolojik inceleme yapılması.....	22
5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	24
6. BULGULAR.....	25
7. TARTIŞMA	40
8. SONUÇ	45
9-ÖZET	46
10-SUMMARY	48
KAYNAKLAR	50



TABLÖLER GRAFİKLER DİZİNİ

TABLÖLER

SAYFA

Tablo 3.1: Santral kolinerjik yollar.....	5
Tablo 4.1: Grup numaraları ve 10 günlük tedavi sonrası yaşayan rat sayısı.....	18
Tablo 4.2: MDA düzeylerinin tayini.....	20
Tablo 4.3: GSH düzeylerinin tayini.....	22
Tablo 6.1: İntraperitoneal aposinin tedavisi almış ve almamış kontrol grubu ve Deneysel AH grubu arasında kanda çalışılan rutin biyokimya analizi.....	26

GRAFİKLER

Grafik 4.1: MDA standart grafiği.....	21
Grafik 4.2: GSH Standart grafiği.....	22
Grafik 6.1: Tedavi öncesi STZ ve kontrol (yapay BOS) grubu Rota-rod Akselere-rod sonuçları	25
Grafik 6.2: Tedavi öncesi STZ ve kontrol (yapay BOS) grubu Water-Maze sonuçları	25
Grafik 6.3: İntraperitoneal Aposinin tedavisi almış ve almamış kontrol grubu ve deneysel AH grubu arasında MDA ve GSH analizi	26
Grafik 6.4: STZ ve Kontrol (Yapay BOS) Grubundaki Aposinin Tedavisi Verilmemiş ve Verilmiş Grupların Rota-Rod ve Akselere-Rod Sonuçları	27
Grafik 6.5: Aposinin Tedavisi Sonrası STZ ve Kontrol (Yapay BOS) Grubu Water-Maze Sonuçları	28

Resim 3.1: Aposinin (APO) şematik gösterimi.....	7
Resim 3.2: Streptozotosinin (STZ) şematik gösterimi.....	8
Resim 3.3: Redükte glutatyonun (GSH) şematik gösterimi.....	9
Resim 3.4: Malondialdehidin(MDA) şematik gösterimi.....	10
Resim 4.1: Ratlara rota-rod cihazında denge ve uyum testi görüntüsü.....	13
Resim 4.2: Bir deneğe Water-Maze öğrenme testi yapılırken.....	15
Resim 4.3: Sterotaksi cihazında serebroventriküler Streptozotosin enjeksiyonu yapılması.....	17
Resim 6.1: Water-Maze sıcaklık-hareket çizelgesi.....	30
Resim 6.2: BOS+SF grubunda korteks, hipokampus ve koroid pleksus görüntüsü.....	31
Resim 6.3: BOS+SF grubunda nöron nükleusu ve nöronal yapıların TEM Görüntüsü.....	32
Resim 6.4: BOS+APO grubunda korteks, hipokampus ve koroid pleksus görüntüsü.....	33
Resim 6.5: BOS+APO grubunda nöron nükleusu ve nöronal yapıların TEM görüntüsü.....	34
Resim 6.6: STZ+SF grubunda korteks, hipokampus ve koroid pleksus görüntüsü.....	35
Resim 6.7: STZ+SF grubunda nöron nükleusu ve nöronal yapıların TEM görüntüsü.....	37
Resim 6.8: STZ+APO grubunda korteks, hipokampus ve koroid pleksus görüntüsü.....	38
Resim 6.9: STZ+APO grubunda nöron nükleusu ve nöronal yapıların TEM görüntüsü.....	30

1. GİRİŞ

Yaşlı nüfusun arttığı topluluklarda demans önemli bir sağlık problemidir. 2004 yılında ABD’ki verilere göre 35 milyon 65 yaş üstü kişi bulunmaktadır. 2050 yılında bu yaş grubunun 82 milyon kişiye ulaşacağı öngörülmüştür. ABD’de her yıl yaklaşık 360.000 yeni Alzheimer hastalığı (AH) olgusu bildirilmektedir ve bu, ülkede maliyeti en yüksek üçüncü hastalık olarak kabul edilmektedir (1,2,3). ABD nüfusuna oranla ülkemiz istatistiki verilerine göre günümüzde yaklaşık olarak üç yüz bin AH olduğu tahmin edilmektedir (4,5). En sık demans nedeni olan ve tüm vakalarının %50-70’ini oluşturan AH, 65 yaş üzeri kişilerde %3-11, 85 yaş üzerinde ise %20-47 gibi yüksek bir prevalansa sahiptir (1). AH’nda kesin tanı, progresif demans bulgularının yanında biyopsi ya da otopsi ile AH’na özgü patolojik bulguların saptanması ile konulur. Klinik kriterler ve laboratuvar teknikleri ile ancak olası AH tanısına varılabilmektedir (1,3,6).

Ratlara sterotaksik yöntemle beyin ventrikülü içine Streptozotosin (STZ) verilerek beyin parankiminde oluşturulan insülin dirençli diyabet modeli geliştirilmesi, son dönemlerde yaşa bağlı bilinç hasarı ve sporadik AH ile ilişkilendirilen ve en çok kabul gören deneysel AH modelidir (7,8). Yaşlı nüfusun giderek arttığı dünyada AH’na yönelik tedavi yöntemleri geliştirilmekle beraber; uzaysal öğrenme, denge ve bellek fonksiyon kaybını tamamen durduran veya geri kazandıran farmakoterapotik (ilaç) bulunmamaktadır (1,6).

STZ’nin yol açtığı bu AH modelindeki nörodejenerasyondan, serbest radikaller sorumlu tutulmaktadır (9,10). Aposinin (APO), Apocynum cannabinum bitkisinin köklerinden doğal yoldan elde edilen NADPH-oksidad inhibitörü olarak kullanılan bir maddedir. Aposinin günümüzde azot oksit (NOX) ailesinin piyasada bulunan en seçkin inhibitörlerinden biridir. Yapılan deneysel çalışmalarda beyin ve sinir dokusunda iskemiye bağlı hasarı azalttığı vurgulanmıştır (9,10). Ancak deneysel AH etkisini araştırmaya yönelik bir çalışma, henüz literatürde bulunmamaktadır.

2. AMAÇ

Bu çalışmada ratlara intraventriküler Streptozotosin (STZ) verilerek oluşturulmuş deneysel AH modelinde intraperitoneal verilmiş Aposinin (APO) tedavisinin öğrenme, denge ve bellek fonksiyonları üzerinde etkisini rota-rod, akselere-rod ve water-maze öğrenme testleri, histopatoloji ve biyokimyasal analizler yardımı ile araştırılması amaçlanmıştır.



3. GENEL BİLGİLER

3.1. Tarihçe:

1901’de Alman nörolog Dr. Alois Alzheimer 51 yaşında Frankfurtlu bir kadını muayene etti. Auguste isimli bu kadında dört yıldır süren delüzyonel kıskançlık ve ilerleyici kognitif gerileme vardı. Hastalığın nedeni bilinmiyordu ve Dr. Alzheimer hastayı 5 yıl sonraki ölümüne kadar takip etti. Bu süre içerisinde Dr. Alzheimer, hastanın kognitif bozukluklara bağlı olarak ilerleyici kötüleşmesini kaydetti. Bu süreçte Auguste’de, konuşma, beceri gerektiren hareketler (praksi) ve karar verme ile ilgili zorluklar gelişti. 1906’da ölümünden sonra Alzheimer ve laboratuvar ekibi, yeni geliştirilmiş boyama tekniklerini kullanarak Auguste’nin beyinde nöropatolojik inceleme yaptılar. Alzheimer sonuçları 1906 ve 1907’de, Almanca olarak ‘ serebral korteksin tuhaf bir hastalığı ‘ şeklinde bildirmiştir. iki yıl sonra, Krapelin, yazısında bu tuhaf hastalığı ilk kez Alzheimer hastalığı olarak isimlendirmiştir (1,6,11,12).

3.2. Alzheimer Hastalığı Hakkında:

Beyin, temel sağ kalma içgüdüsünden karmaşık entellektüel analiz ve yaratıcı düşünceye dek vücudun tüm fonksiyonlarını kontrol eder. Beyinde her yapının farklı bir sorumluluğu vardır ve yerine gerekli işlevleri yüklenen, görevleri farklı olan değişik yapılardan oluşmuştur (13). Nöronlar ve nörotransmitterler aracılığıyla birbiri ile müthiş bir uyum içinde olan beyinde yaşlanma süreci ile yerine konulamayan hızlı bir nöron kaybı sürecine girilir. Nöron harabiyeti ile bu uyum bozulur ve bellek, denge ve hareket etme yetisi zarar görür. AH sürecinde bu yıkım belirgindir ve beyin geri dönüşü olmayan ilerleyici bir hastalık evresine girmiştir (1,6,14,15).

Birçok nörodejeneratif hastalığın ortak bir özelliği beyinde bazı proteinlerin anormal birikimidir. Bunlar yiyecekler ile aldığımız proteinler değildir. Vücudun kendisi tarafından üretilen, dönem içinde aktif görevi olan ve yıkımı yapılamadığından birikerek toksik etki oluşturan maddelerdir. AH’da amiloid ve nörofibriler protein birikiminin fazla olması bu proteinin doğrudan veya dolaylı etkisini düşündürmektedir (1,11,13,16).

Çeşitli araştırmalar, AH olanların beyinde belirgin inflamasyon olduğunu göstermiştir. Mikroglialar apoptoza uğramış nöronların yıkım ürünlerinin yok edilmesi

işini yaparken, amiloid plaklara karşı inflamatuvar yanıtı tetiklediği ve oksidatif stress geliştirdiği düşünülmektedir (13,16). Protein interlekin-1, COX-2 enzimi ve kompleman olarak bilinen sitokinlerin bu otoinflamasyondan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Fakat bu ilişkinin hastalık süreci ile ilişkisi net belirlenememiştir (13). İnflamasyon sürecinde hücrenin enerji fabrikası olan mitokondrilerdeki hasarla serbest radikal üretiminin arttığı ve oluşan bu oksidatif sürecin AH'daki asıl tahripten sorumlu tutulması şimdilik bir teori olarak kalmıştır. Maalesef antioksidan olarak bilinen moleküllerin bu süreçteki yeri ve etkisi net değildir (13,17-19).

AH patogenezi ile ilgili gelişmelere hastalığın patoloji bulguları yol gösterici olmuştur. Histolojik olarak hücre içinde artan serbest radikallerin oluşturduğu hasara bağlı olarak biriken nörofibriler yumaklar, ekstrasellüler yerleşimli nörotik (amiloid) plaklar, granülovakuolar dejenerasyon, sinaptik kayıp ve bazal magnoselüler çekirdek (NBM), hipokampus, asosiasyon korteksinde kolinerjik hücre kaybı, histopatolojik bulguları oluşturur (20-24).

Radyolojik görüntülemeye ise volümetrik çalışmalarla temporal loblarda, hipokampal bölgede atrofinin görülmesi AH tanısını destekleyen bir bulgudur. Fonksiyonel görüntüleme yöntemlerinden SPECT ile serebral kan akımının, PET ile temporo-parietal bölgede glukoz metabolizmasının azaldığının gösterilmesi yine AH'nı destekleyen bulgulardandır (25-28). Bu yüzden deneysel AH çalışmalarında beyin glukoz intoleransı oluşturulması uygun bir model olarak düşünülmektedir (7,8).

AH'nın ilerlemesini durduran veya geciktiren tedaviler bulunmakla birlikte, hastalığı önleyen bir tedavi henüz bulunmamıştır (1,6,11). Halen kullanılan tedavi hastalığın bilişsel ve davranışsal belirtilerini kontrol altına almaya yöneliktir. AH'da bilişsel yıkımın tedavisinde donepezil, rivastigmine, galantimine gibi kolinesteraz inhibitörü olan ilaçlar kullanılmaktadır. Davranışsal belirtileri düzenlemek için antipsikotik, antidepresan ve anksiyolitik ilaçların etkilerinden faydalanılır. AH patogenezinde oluşum veya kötüleşme basamağına yönelik bir tedavi mevcut değildir. AH'nda anti-inflamatuvar, nonsteroidal anti-inflamatuvar ilaçlar, östrojen deneme aşamasında kalmış başlıca ilaçlardır. Vitamin E, selegiline ve ginkgo gibi bazı antioksidanların AH'nda olumlu etkileri belirtilmişse de bu tedaviler yaygınlaşmamıştır (1,14,21,29-31).

3.3. Kolinerjik Sistem ve Öğrenme-Bellek

MSS’de kolinerjik yollar ilk kez Schute ve Lewis tarafından araştırılmış (32), daha sonra devam eden çalışmalarda bazal ön beyindeki nöronlardan neokorteks, hipokampus, amigdala ve olfaktor bulbusa kolinerjik yollar uzandığı gösterilmiştir (33-36). Mesulam, santral kolinerjik yolları başlıca altı gruba ayırarak sınıflandırmıştır (34) (Tablo 1).

Tablo 3.1: Santral kolinerjik yollar (34)

Grup(Ch)	Lokalizasyon	Projeksiyon
Ch 1	Medial septal çekirdek	Hipokampus
Ch 2	Diagonal band(vertikal)	Hipokampus
Ch 3	Diagonal band(horizontal)	Olfaktor bulbus
Ch 4	NBM	Neokorteks ve amigdala
Ch 5	Pedinkülopontin çekirdek	Talamus
Ch 6	Laterodorsal tegmental çekirdek	Talamus

İlk kez 1872’de Meynert tarafından mikroskopik tanımlaması yapılan NBM, bazal ön beyinde, globus pallidusun altında dağınık şekilde bulunan büyük ve hiperkromatik hücreli nöronlar topluluğudur. Yaklaşık % 80-90 oranında kolinerjik nöronlardan oluşan bu çekirdekten frontal, parietal ve temporal kortekse ve amigdalaya efferent lifler uzanır (33-36). Az sayıdaki afferentlerini ise korteks, ventral pallidum, hipotalamus ve medial septal çekirdeklerden alır (37,38). Başlıca anterolateral, anteromedial, intermedioventral, intermediodorsal ve posterior gruplara ayrılır. Her grup, korteksin ayrı bir bölgesine efferentler gönderir (33-35). AH’da NBM’de ciddi nöron kaybı ve Asetilkolin(ACH) seviyesinde belirgin azalma olduğu gösterilmiştir (13,14,21,39). ACH’nin anıların oluşturulması ve geri çağırılmasında başlıca nörotransmitter olduğu gösterildiğinden, fonksiyonunu anlamak; AH patofizyolojisini anlamak açısından önemlidir.

Öğrenme ve bellek fonksiyonlarının nöroanatomi ve nörofizyolojisi henüz tam olarak belirlenememiştir. Anatomik bağlardan ve kimyasal yollardan oluşan kompleks bir sistem tarafından düzenlendiği düşünülmektedir (33,40). Bazal ön beyin (septal

çekirdekler ve NBM), amigdala, hipotalamus, hipokampus, talamus ve korteksin (orbitofrontal, temporopolar, insula, singular ve parahipokampal giruslar) birbirleriyle bağlantılarından oluşan anatomik yolların, hemisferin bir bölgesinden diğerine bilginin taşınmasını sağladığı varsayılmaktadır. Kimyasal yolları ise kortekse uzanan kolinerjik (NBM), serotonerjik (beyin sapı raphe çekirdekleri) ve noradrenerjik (locus seruleus) yolların oluşturduğu ve bunların bilginin alınış şeklini düzenlediği düşünülmektedir. Hem anatomik, hem de kimyasal bağlantılarda yer alan NBM'in, korteks ile limbik sistem arasında kapı görevi görerek, öğrenme ve bellek fonksiyonlarında önemli rol oynadığı gösterilmiştir (33,40,41). Deney hayvanlarında ve insanlarda yapılan farmakolojik çalışmalarda, antikolinerjik ilaçlarla (skopolamin vb.) ağır öğrenme ve bellek bozuklukları gözlenmiştir (33,36,42,43). Yaşlı Parkinson hastalarında da antikolinerjik ilaçların demansa yol açtığı saptanmıştır (16). AH'da ve demans ile seyreden nörodejeneratif hastalıklarda yapılan otopsi çalışmaları NBM'deki nöronlarda atrofi ve azalma olduğunu ortaya koymuştur (14,21,22,44,45). Bu hastalarda kortikal ChAT, AchE aktivitelerinde ve ACH miktarında azalma saptanmış, bunun NBM'deki bir hasara bağlı olduğu düşünülmüştür (14,21,22,44,45).

Yüksek serum insülin seviyesi ve periferik insülin aktivitesinin azalması ile oluşan insüline direnç sendromu yaş bağımlı kognitif hasar ve sporadik AH ile ilişkilendirilen bir durumdur (7,8). Bu da bize beyindeki insülin sinyal sistemindeki bir hasarın, demansın muhtemel bir nedeni olabileceğini göstermiştir (7,8,28). Bu yüzden STZ verilmiş hayvan modelleri demans ve sporadik AH araştırmaya yönelik uygun bir modeldir. Oksidatif strese antioksidan sistemin serbest radikal oluşumunu engelleyemediği süreçte AH patolojik sürecinin hızlandığı bilinmektedir (21,46). STZ'nin yol açtığı bu hasar modelinde serbest radikaller sorumlu tutulmaktadır (7,21,46).

3.4. Deneysel Alzheimer Hastalığı Modeli

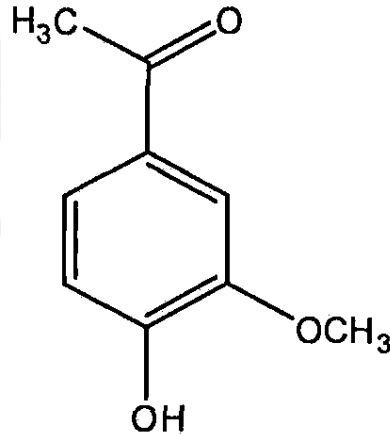
AH ile ilgili ratlarda yapılan çalışmalarda STZ'nin diabetojenik etkisinden yararlanılarak oluşturulmuş serebral insülin-IGF fonksiyonundaki bozulma, enerji metabolizmasında defisite ve dolaylı olarak kognitif fonksiyonlarda gerilemeye neden olmuştur (7,8,47,48). Aynı zamanda hem ratlarda hem de gönüllü sağlıklı insanlarda

intavenriküler insülin verilmesinin, hafızayı ve kognitif enerjiyi olumlu etkilediği yapılan araştırmalarda gösterilmiştir (49,50).

Sporadik AH için en uygun modellerden biri beyin ventrikülü içine STZ enjeksiyonu yapılmasıdır (7,8,48). STZ'in insülin reseptör fonksiyonunu etkileyerek; dirençli oksidatif stres gelişmesine, mitokondri organelinde disfonksiyon oluşumuna neden olduğu ve bozulan bu enerji metabolizması ile proapoptotik sinyal yolunun aktifleştiği düşünülmektedir (7). Aynı zamanda diabetes mellitus (DM) ve AH birlikteliğinin sık görülmesi (1,6,47) STZ ile yapılan bu deneysel AH modelinin, AH tipi neurodejenerasyona en uygun model olduğunu düşündürmektedir (7,8,48).

3.5. Deneyde Kullanılan Temel Moleküller

3.5.1. Aposinin (APO):

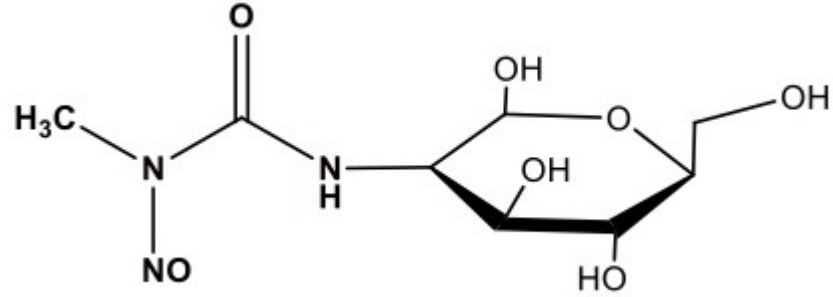


Resim 3.1: Aposininin Şematik gösterimi(51)

Aposininin ilk olarak Oswald Schmiedeberg isimli bir alman farmakolog tarafından 1883 yılında apocynum cannabinum isimli bir bitkide bulunduğu gösterilmiştir (52,53). Önceleri bu bitki ödem ve kalp hastalıkları tedavisinde kullanılmaktaydı. 1990'lı yıllarda Aposininin, anti-inflamatuar özelliğini vücutta serbest radikal, oksijen iyonu ve peroksidaz oluşumunu engelleyerek oluşturduğu gösterilmiştir. Bunu O₂ süperoksida (O₂⁻) indirgeyen NADPH oksidazı inhibe ederek yaptığı bulunmuştur (9,51-53). Bu molekülün kimyasal bağ yapısı 4-hydroxy-3-methoxyacetophenone olduğu saptanmıştır (51-53) ve antioksidan etkisinden yararlanılarak artrit, barsak hastalıkları, astım, ateroskleroz tedavisinde kullanılmıştır (54-55). Seçiciliği olmadığı halde aposininin

deneysel inflamatuvar ve nörodejeneratif birçok hastalıkta da olumlu etkisi olduğu gösterilmiştir (9,51-55).

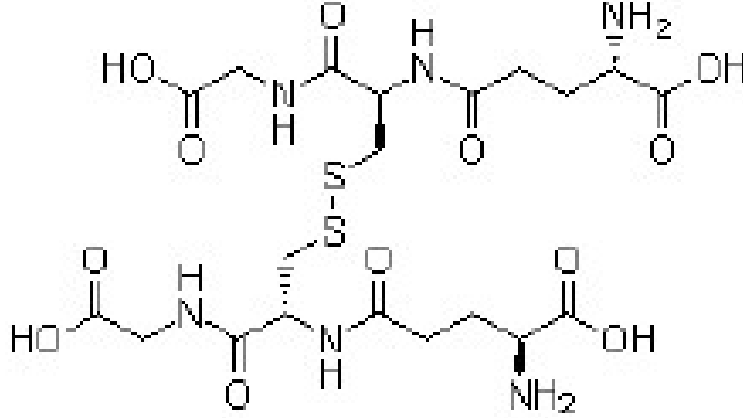
3.5.2. Streptozotosin (STZ)



Resim 3.2: Streptozotosin şematik gösterimi(56)

Glukozamin türevi bir nitrozoüre olan antineoplastik bir ilaçtır. Selektif olarak Langerhans adacıklarında β hücrelerini parçalar ve makrofaj infiltrasyonu sonrası DM tablosu oluşturabilir (56-58). STZ aynı zamanda alkilleyici bir ajandır ve ADP ribolizasyonunu etkinleştirerek DNA hasarı oluşturur. Bu tek başına DM gelişimine neden olur. STZ'nin glukozu benzer bir yapısı vardır ve glukozu hücre içine taşıyan glukoz transporter tip 2 (GLUT 2) reseptörleri tarafından hücre içine taşınır ve burada toksik etkisini gösterir (56,57,59,60).

3.5.3. Glutatyon (GSH)

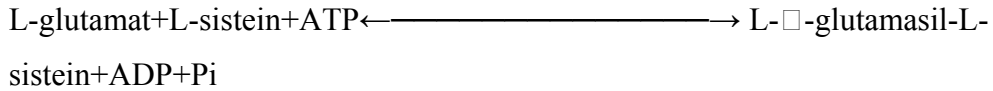


Resim 3.3: Okside glutatyon şematik gösterimi(61)

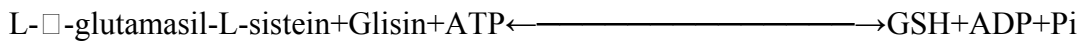
Bütün hücreler oksidan maddelere karşı, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlardan oluşan bir düzeneğe sahiptir. Enzimatik olmayan maddelerden en önemlisi GSH'tır. GSH iç ve dış kaynaklı toksik kimyasallara karşı hücresel savunma sisteminde önemli bir rol oynar. Karaciğer GSH enziminin yapıldığı başlıca organdır (62,63). Bu madde, karaciğer hücrelerinin sitoplazmasında oluşturulduktan sonra dolaşım / taşıma sistemi ile farklı organlar ve alt hücre bölümlerine ulaştırılır (64).

Tripeptit tiyol olan glutatyon; metabolizma, taşıma, oksijen ve diğer bileşiklerin zararlı etkilerine karşı hücrelerin korunmasında önemli bir işleve sahiptir (62,63). GSH, glutamilsistein sentetaz ve glutatyon sentetazın etkileşimleri ile hücre içinde oluşturulur. Organizmadaki GSH sentezi aşağıdaki şekilde gerçekleşir (61,64).

□-glutamilsisteinsentetaz



Glutatyon sentetaz



GSH, iki farklı düzenekle hücrenin antioksidan etkinliğinde görev alır. Birincisi bu enzimin aracılığı olmaksızın oksidanlara doğrudan hidrojen göndererek etki gösterir.

İkincisi GSH-Px katalizine enzim koenzimi olarak katılır ve H_2O_2 'in ve lipid peroksitlerin detoksifikasyonunda işe karışır (61,64). GSH sentezi organizmada en azından üç faktör ile düzenlenmektedir (64).

- 1) Hücrede gamma-glutamilsistein sentetazın varlığı,
- 2) Substratların özellikle L-sisteinin mevcudiyeti,
- 3) Gamma-glutamilsistein sentetaz üzerine GSH'ın 'feedback' baskılaması

GSH'ın hücre içi seviyesinin herhangi bir şekilde azalması, lipid peroksidasyonuna veya diğer hücresel hasarlara yol açabilmektedir (17). Endojen GSH, proteinlerdeki tiyol gruplarını oksidasyondan korur. Reaktif oksijen türleri ile doğrudan tepkimeye girerek onları detoksifiye eder. GSH, DNA ve protein sentezi, enzim aktivitesinin düzenlenmesi gibi diğer hücresel işlevlerde de koruyucu rol alır. Araştırmacılar, azalan GSH üretiminin, hücresel savunma sisteminde oksidanlara karşı bir zaafiyet oluşturacağını bildirmişlerdir (17,61,64).

3.5.4. Malondialdehit (MDA)



Resim 3.4: Malondialdehit (MDA) şematik gösterimi(65)

Malondialdehid, hücre lipidlerinin okside edilerek yapılarının bozulması sonucu oluşan ana metabolittir (65,66). Doymamış yağ asidi oksidasyonunun yan ürünü olan MDA, proteinleri ve fosfolipidleri çapraz bağlayarak membranda polimerizasyona, iyon taşınmasının ve enzim işlevlerinin olumsuz yönde etkilenmesine neden olur.

Hücre membran stabilizasyonunun bozulmasıyla, membran potansiyeli oluşturabilme yeteneği zarar görür. Kalsiyum hücre içine girer, hücre içinde aşırı kalsiyum birikir ve hücre ölür (18,65,66).

Serbest radikal etkinliği, hem plazmada hem de dokuda ölçülebilir ürünlerin oluşmasına neden olur (67,68). Peroksit ürünlerin plazma seviyeleri reaktif oksijen türlerinin etkinliğinin göstergesi olarak kabul edilir. Reaktif oksijen türleri ile lipidlerin peroksidasyonundan oluşan MDA, poliansatüre yağ asitlerinden bir çift bağın yeniden düzenlenmesi ile elde edilir (18,66). Oksidasyon yan ürünü olan MDA'nın oluşumu ayrıntıları ile incelenmiş ve oksidatif hasarın bir göstergesi olan tiyobarbitürik asit reaksiyonu yöntemi ile ölçmenin mümkün olduğu ortaya konulmuştur (18,65-68).



4. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma İnönü Üniversitesi Deneysel Araştırma Birimi ve Deney Hayvanları Etik Kurulu kararıyla 25.11.2013 tarihinde 2013/A-86 protokol numarasıyla onaylanmış olup, Ocak 2014-Mayıs 2014 tarihleri arasında yapılmıştır. Çalışmada daha önce herhangi bir deneyde kullanılmamış ağırlıkları 200-275 gram arasında değişen 3-4 aylık 35 dişi ve 35 erkek Wistar-Albino sıçan kullanıldı. Sıçanlar İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarından temin edildi. Çalışma İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında cerrahi aletler, stereotaksi cihazı, akselere-rod, rota-rod cihazı, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında Water-Maze su havuzu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

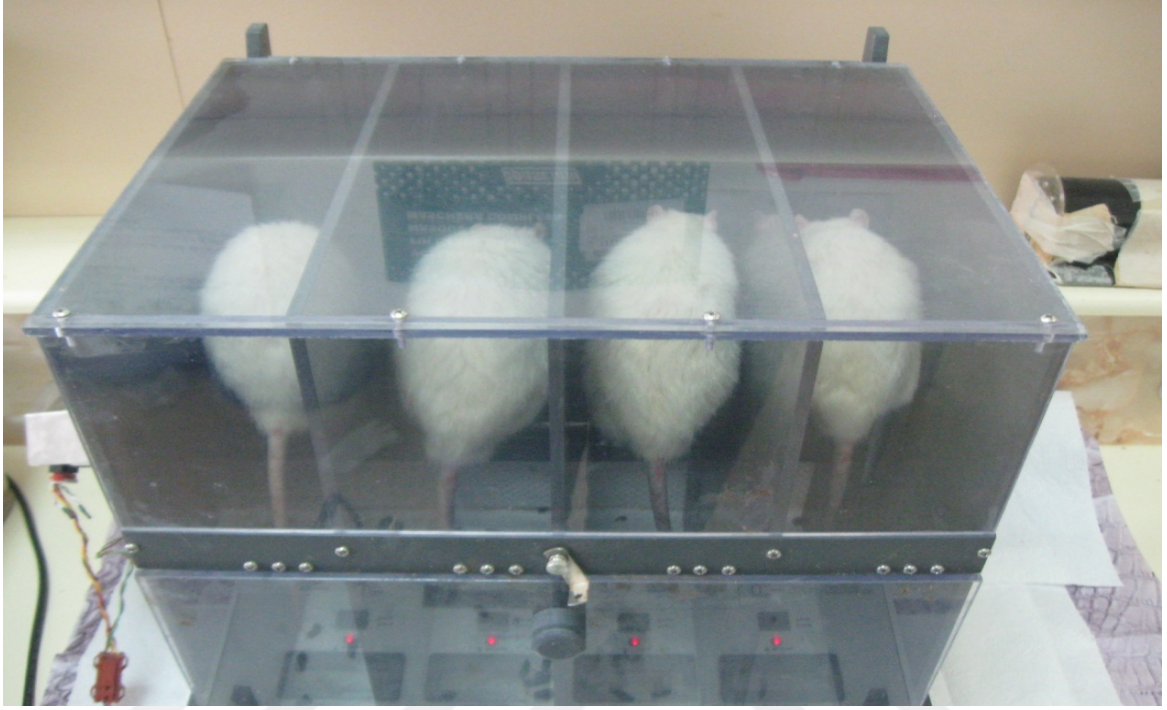
Sıçanlar çalışma öncesinde, çalışma sırasında ve sonrasında her kafeste en fazla dört hayvan bulunacak şekilde polikarbon kafeslerde barındırıldı. Sabit oda sıcaklığında ve nemde ($22\pm3^{\circ}\text{C}$ sıcaklık ve $62\pm7\%$ nem), her gün kafes temizliği ve beslenme (standart hayvan yemi ve yeterince su) gereksinimi sağlanmak şartı ile barındırıldı. Deney süresince, uygun şekilde ışık almaları sağlanan bir ortamda (12'şer saatlik ışık-karanlık siklusu içinde) tutuldu. Hayvan yemleri özel çelik kafeslerde, su ise paslanmaz çelik bilyeli biberonlarda verildi.

Ratlara deneye dahil edilmeden önce dakikada 5 devir (5 rpm) toplam 300 saniye rota-rod denge ve öğrenme testi yapılmış. Bu testte başarılı olmayan ratlar aynı yaş, cinsiyet ve ortalama ağırlığa sahip testi başarıyla geçen ratlarla değiştirilmiştir.

4.1. Rota-rod, Akselere-rod Testi:

Bu test deney hayvanlarında motor becerileri değerlendirmeye yönelik özel bir cihazla yapılır. İçine yerleştirilmiş deney hayvanlarının (sıklıkla rat veya fare) döndüğü çubuklardan oluşur. Rat daha önce ayarlanmış hızda sistem üzerinde yürümeye zorlanır. Ratın dönen sisteme uyum sağlayamayıp düştüğü süre cihaz tarafından ölçülür. Bu verilen tedavinin etkisini, oluşturulan beyin hasarını veya rattaki tükenmişlik hissini değerlendiren bir testir (69). Bilgisayara kurulu olan cihaz, deneyin amacına göre ayarlanarak, çubuklar belli bir süre sabit bir hızda veya artıp-azalan dakika devir sayısında (rpm) döner. Bu araştırmada Rotamex 4/8 sistemi (Columbus Instruments, Columbus, Ohio) kullanılarak AH'da gelişen denge ve kordinasyon eksikliğini

maksimum 300 saniye 5, 10, 20, 30, 40 rpm de, 240 ve 600 saniyede 1'den 79'a hızlanan rpm de saptanması hedeflenmiştir (69-73).



Resim 4.1: Ratlara rota-rod cihazında denge ve uyum testi görüntüsü

4.2. Water-Maze Su Havuzu Testi:

Richard Morris tarafından geliştirilen Morris su havuzu, uzaysal hafızayı test etmek için tasarlanmış bir davranış deneyidir. Deney birkaç defa tekrar edildiği zaman, platforma ulaşmak için harcanan süredeki (gecikme süresi) ve uzaklıktaki (yol) değişiklikler sıçandaki öğrenme ve hafıza yeteneğinin göstergesidir (7,74). Morris su havuzu, içerisinde gizli bir platformu bulunduran, içi su dolu, geniş, sirküler bir tanktır. Gizli platform boyalı suyun altında görülmeyecek şekilde bulunur ve deneyden deneye bu platformun yeri sabit kalır. Su havuzu üzerinde tavana asılı kamera sıçanı anlık takip edip bilgisayara veri aktarır. Bilgisayar programı ile gecikme süresi, uzaklıktaki değişiklikler gruplar ve deney günleri karşılaştırmalı olarak hesaplanır (7,74,75). Bazı çalışmalarda Morris su havuzundaki su, süt tozu ile beyazlatılır, bazılarında ise havuzun içi toksik olmayan siyah boya ile boyanır (76). Biz çalışmamızda Wistar-Albino cinsi

beyaz renkte sıçan kullandığımız için siyah toksik olmayan boyayla (Mixol) boyalı siyah havuz kullandık. Havuzun çevresi perde ile kapatılır ve üzerine ve duvara her yön için değişik renklerde farklı ipuçları asılır (7,74-76). Havuzun çapı 120 cm, yüksekliği 59,5 cm , su yüksekliği 40 cm dir. Morris su havuzu 26 +/-1 derece su ile doldurulur. Platform su yüzeyinden 1 cm derine yerleştirilir ve platform çapı 10 cm, havuz kenarından uzaklığı 22 cm.dir (7,78,79). Platformun üstü ise ratların tutunmasını sağlayacak ve kendisini güvende hissedeceği şekilde lifli bir kumaşla kaplıdır. Deneyimizde ratlar dört gün aynı saatlerde aynı iki noktadan en az yarım saat geçtikten sonra su havuzuna konuldu (75,77,78). Ratların platformu bulması için 90 saniye beklendi ve platformu 90 saniye içinde bulan rata bulduktan sonra 15 saniye platform yerini öğrenmesi için süre verildi (7,79). Platformu bulamayan rat 90 saniye sonunda platforma konuldu. Burada 15 saniye sabit kalması sağlanarak yine platform yerini öğrenmesi sağlandı (7,79).

4. gün sonunda platform yerini öğrendikleri varsayıldı ve beşinci gün hepsi aynı tek noktadan platformun çıkarıldığı su tankına bırakılıp platform bölgesine ilk geliş zamanı, platform bölgesinde harcadığı zaman ve 90 saniyede katettiği mesafe hesaplandı (77-79). Bu işlem ilaç ve kontrol grubuna aposinin tedavisi öncesinde ve sonrasında aynı şekilde uygulandı ve böylece ratlarda deneysel AH geliştikten sonra öğrenme becerileri hakkında fikir sahibi olunması amaçlandı.



Resim 4.2: Bir deneğe Water-Maze su havuzunda öğrenme testi yapılırken

4.3. Anestezi

Cerrahi işlem öncesi tüm sıçanlara 10 mg/kg dozunda xylazin (Bayer Birleşik Alman İlaç Fabrikaları, İstanbul) ve 75 mg/kg dozunda ketamin hidroklorür (Parke Davis, İstanbul) intraperitoneal yol ile uygulandı. Gereksinim duyulması halinde başlangıçta uygulanan dozların %20'sini aşmayan dozlar aralıklı olarak tekrarlandı.

4.4. Deneysel Alzheimer Hastalığı Modeli Oluşturulması

Ratlar deneyin ilk günü standart anestezi etkisine girdikten sonra kafasındaki tüyler traş edildi ve serebroventriküler STZ uygulaması için rat sterotaksi (ASI instruments small animal stereotaxic frame, İstanbul) cihazı kullanıldı. Ratlar insizor bar interaural çizginin 5 milimetre üzerinde olacak şekilde stereotaksi cihazına konumlandı. Cihazda ratın kafasının sabitlendiği görüldükten sonra ratın gözü suni göz yaşı (Viscotears, Alcon, İstanbul) ile kapatıldı. Asepsi kurallarına uyularak kafada sagittal insizyon açıldı (7). Bregma ve sagittal sütür ekspoz edildikten sonra Paxino-Watson rat atlasından (7,80,81) serebroventrikül girişine uygun olan yerden elmas

dental tur uçla karşılıklı iki mini burr-hole açıldı. Sterotaksi cihazına monte edilmiş 100 mm hamilton mikroenjektörü (No:24) ile 0.8 mm bregma posterioru, 1.5 mm sagital sütün lateralleri, 3.5 mm beyin derinliği olacak şekilde (7,80) birbirini takip eden günlerde günde 10 rat olacak şekilde aynı seansta toplam 50 rata bilateral 3 mg/kg serebroventriküler STZ enjeksiyonu yapıldı (82-84). Gene aynı kordinatlardan 20 rata kontrol grubu olarak bilateral 20  l yapay BOS enjeksiyonu yapıldı (7,82-84). İlacın emilimi olması için enjeksiyon sırasında süre tutulup 5 dakika içinde yavaş enjeksiyon yapıldı (7). Açılan burr-hole alanı kemik mum (Ethicon, İstanbul) ile kapatıldı. Ardından cilt tek tabaka primer sütüre edildi. STZ (Sigma, St Louis, MO) deneyden önce biyokimya labaratuarında hazırlanmış olan yapay BOS (7,85) (3 mM KCl, 140mMNaCl, 1.2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0.3 mM NaH₂PO₄, 1 mM Na₂ HPO₄, 3 mM D-glucose) un içinde deneyden hemen önce 25 mg/ml solüsyonlar şeklinde hazırlandı. STZ'nin sıcakta etkisi azalacağından oluşan solüsyonlar buz dolabında muhafaza edildi (7). Uygulamalar sonrası tüm denekler gıda ve sıvı gereksinimi için serbest bırakıldı. Gelişmesi beklenen nörodejeneratif yıkım için son cerrahi gününden itibaren 21 gün beklendi (7,82-84).



Resim 4.3: Sterotaksi cihazında serebroventriküler STZ enjeksiyonu yapılması

İlk önce serebroventriküler STZ enjeksiyonu yapılmış sıçanlardan, işlem sonrası yaşayan 34 rata, kontrol grubundan yaşayan 16 rata water maze su havuzu ve rota-rod akselere-rod testleri yapıldı. İşlem sonrası kontrol grubundan 2 rat hemiparezi geliştiği için çıkarıldı, işlemlere uyumlu olan ve yapılan test sonuçları deneysel AH ile uyumlu olan 15 rat ilaç grubunu oluşturdu. Ardından kontrol grubu yedişerli iki gruba, deneysel AH geliştiği düşünülen grup ise aposinin tedavisi verilecek olan grup 7 rattan, serum fizyolojik verilecek olan grup ise 8 rat olacak şekilde toplam 4 gruba ayrıldı. Serum fizyolojik verilen deneysel AH gelişen grupta tedavi sırasında 2 rat kaybedildi.

4.5. Aposinin tedavisi hazırlanması:

Aposinin (Sigma, St. Louis, MO) tuzlu 0.001% Dimethylsulfoksit (DMSO) ile çözüldü (9,10,86-88). Bu solüsyon 10 mg/kg dan (yaklaşık 2-2.5 ml) günde 1 kez 10 gün intraperitoneal olarak enjekte edildi (9,86,87). Kontrol grubuna ise aynı hacimde SF intraperitoneal olarak enjekte edilerek enjeksiyona bağlı stres faktörü geliştirildi.

4.6. Deney Grupları

4.6.1. Kontrol grubu (SHAM):

- 1) **BOS+SF:** Serebroventriküler yapay BOS + peritona SF tedavisi verilen grup
- 2) **BOS+APO:** Serebroventriküler yapay BOS + peritona Aposinin tedavisi verilen grup

4.6.2. Deneysel AH geliştiği kabul edilen grup:

- 3) **STZ+SF:** Serebroventriküler STZ + peritona SF tedavisi verilen grup
- 4) **STZ+APO:** Serebroventriküler STZ + peritona Aposinin tedavisi verilen grup

Tablo 4.1: Grup numaraları ve 10 günlük tedavi sonrası yaşayan rat sayısı

Gruplar	Yaşayan Sıçan Sayısı
Grup 1 (BOS+SF)	7
Grup 2 (BOS+APO)	7
Grup 3 (STZ+SF)	6
Grup 4 (STZ+APO)	7

Grupların tedavisi tamamlandıktan sonra water maze su havuzu ve rota-rod akselere-rod testleri tekrar edilmiş testler tamamlandıktan sonra ratlardan doku ve kan örnekleri alınması amacıyla denekler sakrifiye edilmiştir.

4.7. Histopatoloji ve Biyokimyasal Analizler için Doku ve Kan Örneklerinin Alınması

Tüm gruplarda yer alan sıçanlarda, önceden belirlenen süreç sonrasında, xylazine ve ketamin hidroklorür kullanılarak derin anestezi oluşturuldu. Derin anesteziyi takiben sıçanlara torakotomi uygulandı. Torakotomi sonrasında kan örneği intrakardiyak yoldan alındı.

Ratlardan kan örneği alındıktan sonra hızlı bir şekilde beyin dokusu hasarsız şekilde çıkarıldı. Beyin dokusunun histolojik ve biyokimyasal analizi için beyin hemisferlere ayrılıp biri histolojik inceleme için, biri daha önceden hazırlanmış ve her bir denek için numaralanmış kaplara alınarak biyokimyasal analiz yapılmak üzere -70 C'de bekletildiler.

Gruplardan alınan beyin numuneleri tartıldı ve üzerlerine %10'luk (w/v) homojenat oluşturacak şekilde fosfat tamponu (Ph:7.4, 50 mM) ilave edildi. Buz içinde 1-2 dakika süreyle 12000 devir/dakika homojenize (Ultra Turrax Type T25-B homogenizer, IKA Labortechnik, Germany) edildi. Elde edilen homojenatların bir kısmı MDA analizinde kullanıldı. Geriye kalan homojenatlar 5000 rpm'de, 4 C'de, 30 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant örnekler GSH analizinde kullanıldı.

4.7.1. Malondialdehit (MDA; Tiyoarbitürik Asit Reaktif Ürünleri, TBARS) Analizi

İki molekül tiyoarbitürik asidin (TBA) bir molekül MDA ile asit ortamda reaksiyona girerek pembe renkli ürün oluşturması esasına dayanmaktadır. Oluşan bu bileşik 535 nm'de maksimum absorbanı vermektedir(67).

Kullanılan Reaktifler

1. %1'lik fosforik asit
2. %0.6'lık tiyoarbitürik asit(TBA)
3. N-Butanol(konsantre)

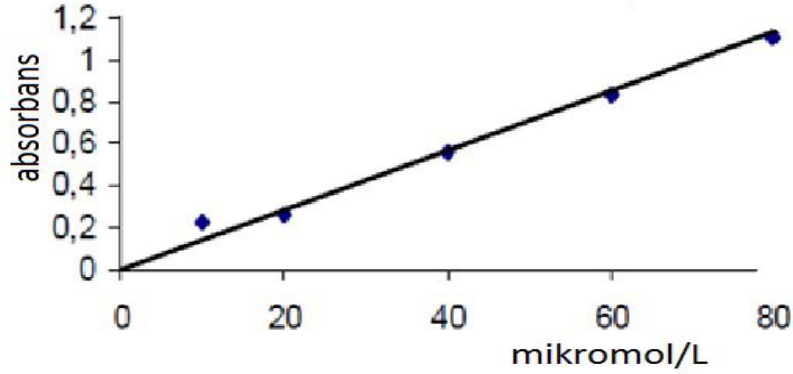
4. Standartlar için 1, 1', 3, 3' tetraetoksipropan (kalibrasyon grafiği çiziminde kullanılmak üzere 2.5, 5, 10, 20, 40 mikromolarlık standartlar kullanıldı).

Tablo 4.2:MDA düzeylerinin tayini(67,68)

	Kör	Standart	Numune
Doku Homojenatı	-----	-----	250 µL
Standart	-----	250 µL	-----
%1'lik fosforik asit	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL
%0.6'lık TBA	500 µL	500 µL	500 µL
Etanol	250 µL	-----	-----
Vortekslenip 45 dakika kaynar su banyosunda (95 °C'de inkubasyon ve soğutma)			
N-Butanol	2 mL	2 mL	2 mL

Hazırlanan çözeltiler yukarıda çalışma tablosunda belirtildiği şekilde vida kapaklı cam tüplere eklendi. Çözeltilerin karışması için 5 dakika boyunca her bir tüp kuvvetlice çalkalandı. 5 dakikanın sonunda numuneler 3000 devir/dakikada 20 dakika santrifüj edildi. Üstteki süpernatant (n-butanol fazı) direkt olarak kuartz küvete alındı. Oluşan pembe renkli süpernatantların absorbansları spektrofotometrede 535 nm'de okundu ve 1, 1', 3, 3' –tetraetoksipropan ile hazırlanan standart grafikten yararlanılarak µmol/L cinsinden MDA düzeyleri bulundu(Şekil 1)(67,68). Sonuçlar nmol/g yaş doku olarak ifade edildi.

Grafik 4.1: MDA standart grafiği (67)



4.7.2. Redükte Glutatyon(GSH) Analizi

Süpernatant numunelerine %10'luk TCA çözeltisi ilave edildi, iyice karıştırıldı ve 3000 devir/dakikada 4 °C'de, 20 dakika santrifüj edilerek proteinlerin çökmesi sağlandı. Elde edilen açık renkli proteinsiz süpernatant numuneleri, GSH analizinde kullanıldı.

GSH analizi, Elman'ın tarif ettiği metoda göre yapıldı(89). Metodun GSH ölçüm prensibi, analiz tüpünde bulunan glutatyon 5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit ile reaksiyona girerek sarı-yeşilimsi renk vermesi ve oluşan bu rengin ışık şiddeti spektrofotometrede 410 nm dalga boyunda okunarak redükte glutatyon miktarının tayin edilmesi şeklindedir (63,64,89).

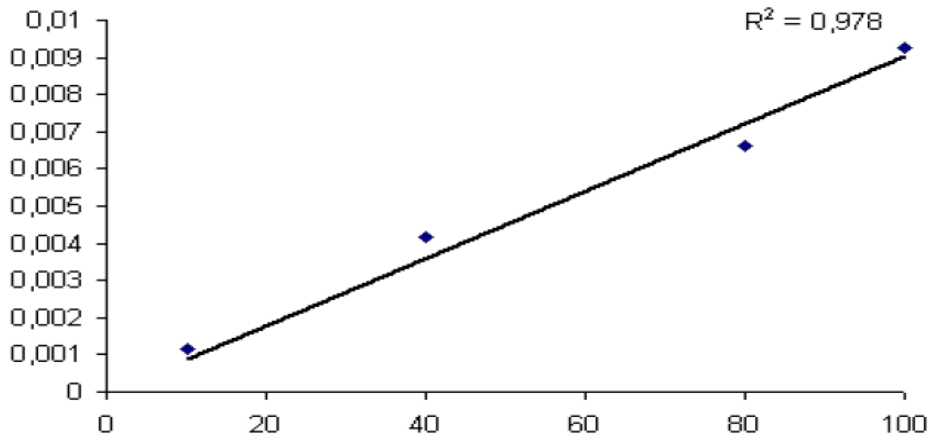
Kullanılan reaktifler

- 1)%10'luk triklor asetik asit(TCA)
- 2)0.3 M disodyum hidrojen fosfat
- 3)%0.4'lük 5,5'-Ditiyobis-2-nitrobenzoik asit(DTNB)
- 4)%1'lik trisodyum sitrat (DTNB'yi çözmek için)
- 5)Redükte glutatyon standart çözeltileri: Kalibrasyon grafiğini oluşturmak üzere 125, 250, 500, 1000 mikromolarlık GSH standart çözeltileri kullanıldı.

Tablo 4.3:GSH Düzeylerinin Tayini (89)

	Kör	Standart	Numune
Proteinsiz Süpernatant	-----	-----	250 µL
Standart çözeltiler	-----	250 µL	-----
0.3 M Na ₂ HPO ₄	2 mL	2 mL	2 mL
%0.4'lük DTNB	250 µL	250 µL	250 µL
Distile su	250 µL	-----	-----

Yukarıdaki tabloda belirtilen çalışma şemasına göre deney tüpleri hazırlandı, çözeltilerin karışması için tüpler çalkalandı. Spektrofotometre kör ile 410 nm’de sıfır absorbansa ayarlandı. Oda ısısında 5 dakika bekletilen numunelerde oluşan rengin şiddeti spektrofotometrede 410 nm’de okundu ve glutatyon standart grafiğinden yararlanılarak µmol/L cinsinden GSH düzeyleri bulundu(Şekil 2). Sonuçlar nmol/g yaş doku olarak ifade edildi.

**Grafik 4.2:GSH standart grafiği(89)**

4.7.3. Histopatolojik inceleme yapılması

Histopatolojik inceleme için alınan beyin dokusu örnekleri % 10'luk formaldehit ile 48 saat tespit edildi. Tespit işlemini sonrasında beyin dokusu örnekleri rutin histolojik doku takip sürecinden geçirildikten sonra parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom yardımıyla 6 µm kalınlığında kesitler hazırlandı. Lamlar üzerine alınan kesitler hematoksilin – eozin (H-E) ile boyandıktan sonra Leica DFC 280 ışık

mikroskobu ve Leica Q Win Görüntü Analiz Sistemi (Leica Microsystems Imaging Solutions, Cambridge, UK) ile incelenerek fotoğraflar çekildi.

Elektron mikroskopik inceleme için beyin korteksinden alınan 2x2x2 mm boyutlarındaki doku örnekleri % 2.5 gluteraldehit ve % 1 osmium tetroksit ile tespit edildikten sonra aseton ile dehidrate edilerek araldit bloklar içine gömüldü. Araldit bloklardan ultramikrotom ile 80 nm kalınlığındaki ince kesitler bakır gridler üzerine alındı. İnce kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlama işlemini takiben Zeiss Libra 120 Transmission elektron mikroskop (TEM) ile incelenerek fotoğraflar alındı.



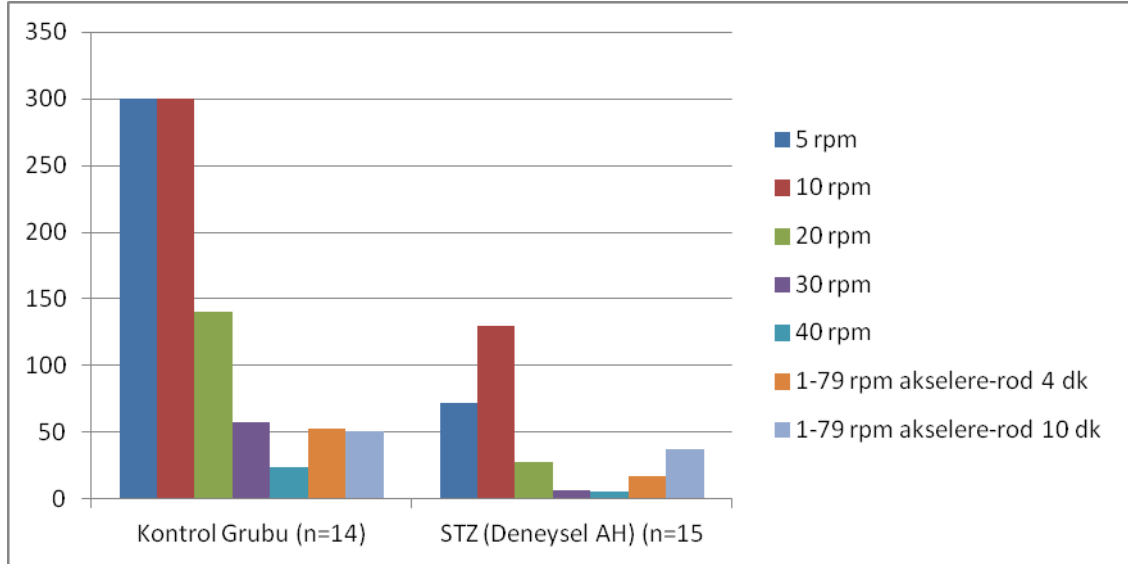
5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Bu çalışmanın istatistiksel analizlerinde tanımlayıcı veriler ortanca (minimum-maximum) olarak özetlendi. 4 grubun (BOS+SF, BOS+APO, STZ+SF, STZ+APO) karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi kullanıldı. Çoklu karşılaştırmalarda Bonferoni düzeltilmeli Mann Whitney U testi kullanıldı. $P<0.05$ değerleri anlamlı kabul edildi. Analizlerde IBM SPSS Statics v.22.0 for Windows paket programı kullanıldı. Grafikler Mikrossoft Excel programında oluşturuldu.



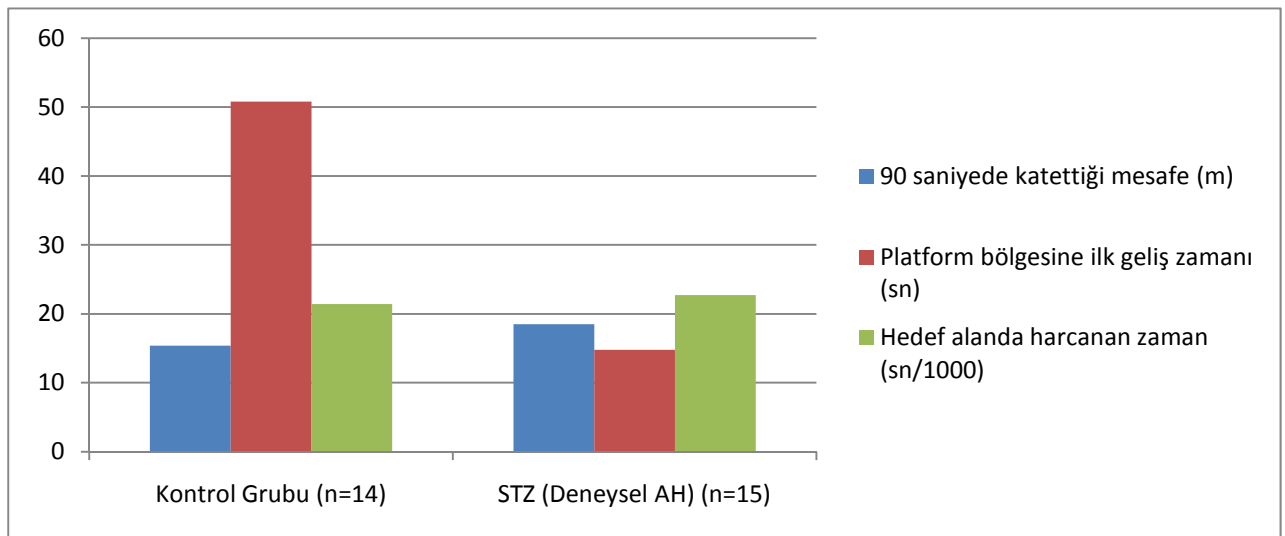
6. BULGULAR

Gafık 6.1: Tedavi öncesi STZ ve kontrol (yapay BOS) grubu Rota-rod Akselere-rod sonuçları



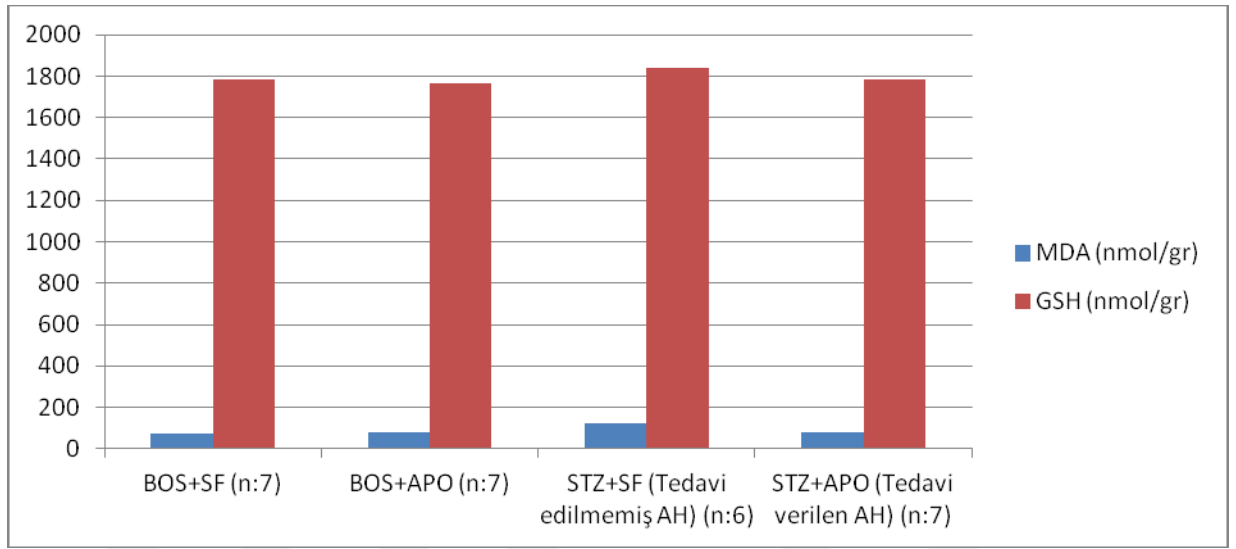
Deneysel Alzheimer grubu ile kontrol grubu arasında yapılan rota-rod ve akselere-rod testinde 5 rpm, 10 rpm, 20 rpm, 30 rpm, 40 rpm, 1-79 rpm akselere-rod 4 dk arasında belirgin fark bulunurken; 1-79 rpm akselere-rod 10 dk için belirgin fark bulunamamıştır.

Grafık 6.2: Tedavi öncesi STZ ve kontrol (yapay BOS) grubu Water-Maze sonuçları



Deneysel Alzheimer grubu ile kontrol grubu arasında tedavi öncesi yapılan water-maze testinde platforma ilk geliş zamanları arasında belirgin fark bulunurken 90 saniyede katettiği mesafe ve hedef alanda harcanan zamanlar arasında belirgin fark bulunamamıştır.

Grafik 6.3: İntraperitoneal Aposinin tedavisi almış ve almamış kontrol grubu ve deneysel AH grubu arasında MDA ve GSH analizi



İntraperitoneal Aposinin tedavisi almış ve almamış kontrol grubu ve deneysel AH grubu arasında beyin parankiminde bakılan MDA ve GSH analizi arasında istatistiksel olarak MDA için anlamlı bir fark saptanırken GSH için bulunamamıştır.

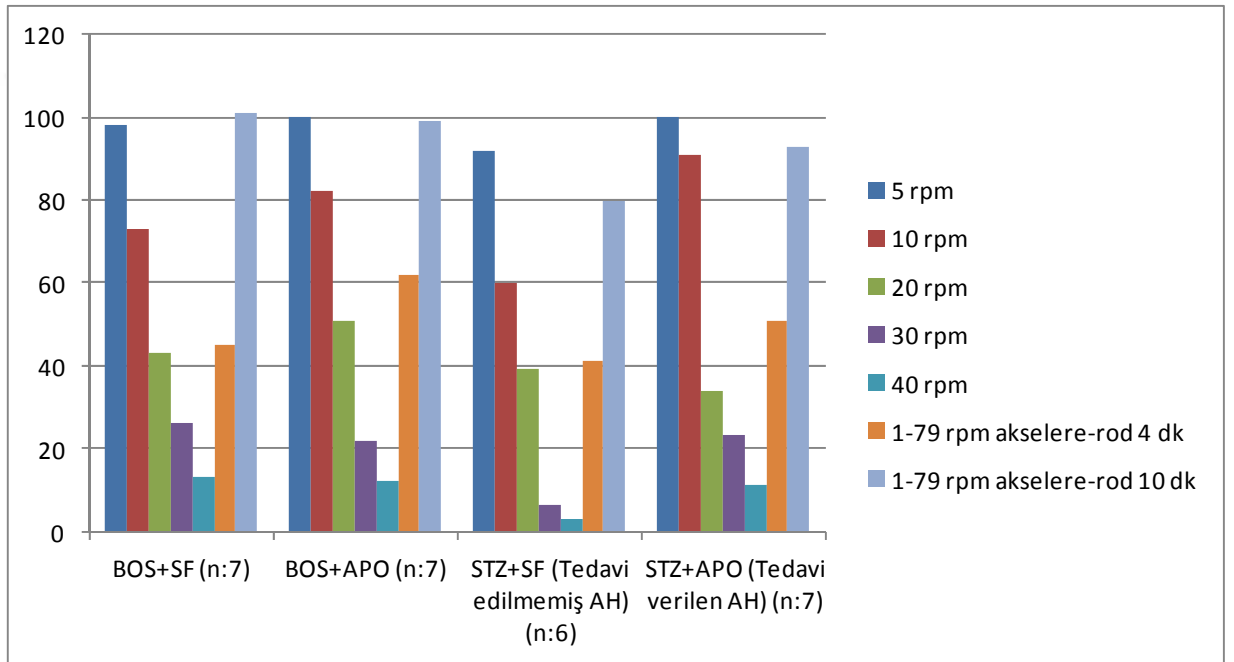
Tablo 6.1: İntraperitoneal Aposinin Tedavisi Almış ve Almamış Kontrol Grubu ve Deneysel AH Grubu Arasında Kanda Çalışılan Rutin Biyokimya Analizi

	Glukoz mg/dL	BUN mg/dL	Kreatin mg/dL	AST U/L	ALT U/L	Na mmol/L	K mmol/L	Ca mg/dL
BOS+SF(n=7)	205(150-311)	20(17-21)*	0,49(0,41-0,56)	183(113-261)	75(55-143)	138(120-140)é	4.7(4.3-5)	9.8(5.1-10.1)
STZ+APO(7)	211(154-288)	15(12-19)	0,44(0,39-0,53)	123(80-172)	83(62-114)	136(125-141)#	4.9(4-6)	9.4(8.8-10.7)
STZ+SF(n=6)	215(139-298)	17.5(14-21)	0,44(0,33-0,51)	153(94-277)	73(46-117)	138(118-140)#	4.1(3.6-5.1)	9.2(7.9-10)
BOS+APO(7)	223(130-292)	19(17-21)*	0,5(0,44-0,64)	169(108-462)	80(51-354)	141(138-143)	4.5(4.1-6.2)	9.8(9.5-11.5)
P	0.978	0.012	0.091	0.273	0.848	0.046	0.387	0.159

*: STZ+APO grubuna göre farklı (p<0,05),
#: BOS+APO grubuna göre farklı (p<0,05),
é: STZ+SF grubuna göre farklı (p<0,05),

İntraperitoneal Aposinin tedavisi almış ve almamış kontrol grubu ve deneysel AH grubu arasında kanda çalışılan rutin biyokimya analizinde BUN için BOS+SF,BOS+APO grupları ile STZ+APO grubu, Na için BOS+APO ile STZ+SF, BOS+SF ile STZ+SF, BOS+APO ile STZ+APO arasında anlamlı fark bulunurken, glukoz, kreatin, AST, ALT, K, Ca analizinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

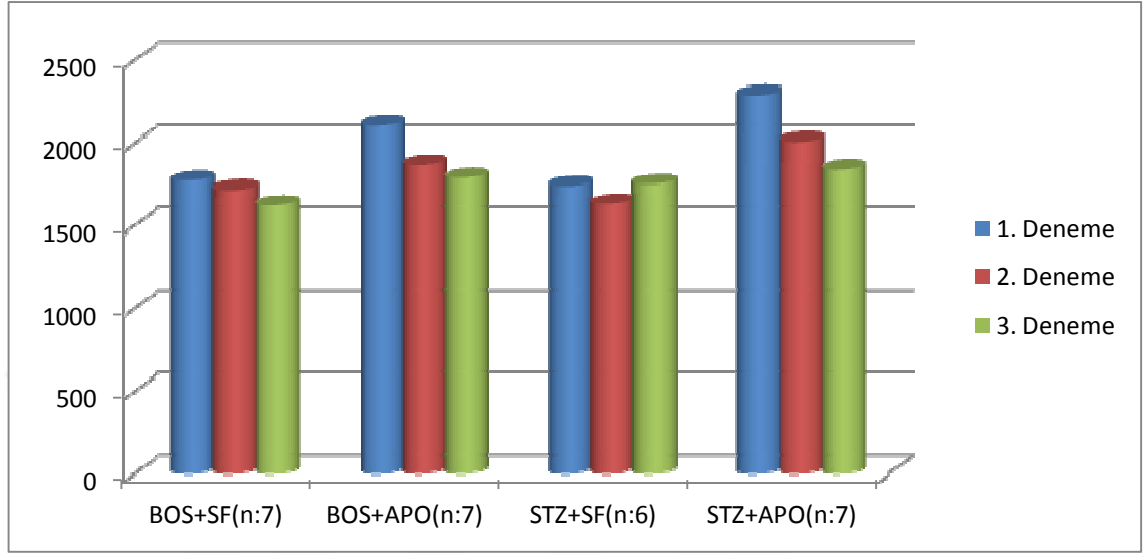
Grafik 6.4: STZ ve Kontrol (Yapay BOS) Grubundaki Aposinin Tedavisi Verilmemiş ve Verilmiş Grupların Rota-Rod ve Akselere-Rod Sonuçları



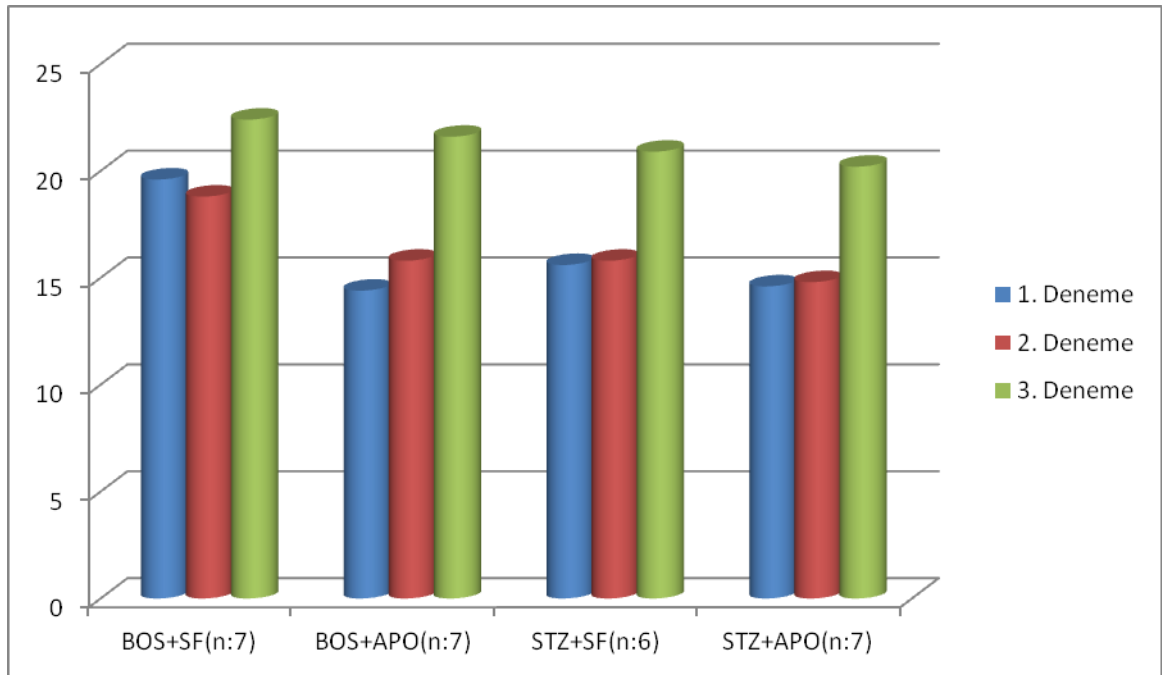
Aposinin tedavisi verilmiş ve verilmemiş deneysel Alzheimer grubu ile kontrol grubu arasında yapılan rota-rod akselere-rod testinde 30 ve 40 rpm de STZ-SF grubu ile BOS-SF, BOS-APO, STZ-APO grupları arasında belirgin fark bulunurken, 5 rpm, 10 rpm, 20 rpm, 1-79 rpm akselere 4 dk, 1-79 rpm akselere 10 dk içinde belirgin fark bulunamamıştır.

Grafik 6.5: Aposinin Tedavisi Sonrası STZ ve Kontrol (Yapay BOS) Grubu Water-Maze Sonuçları

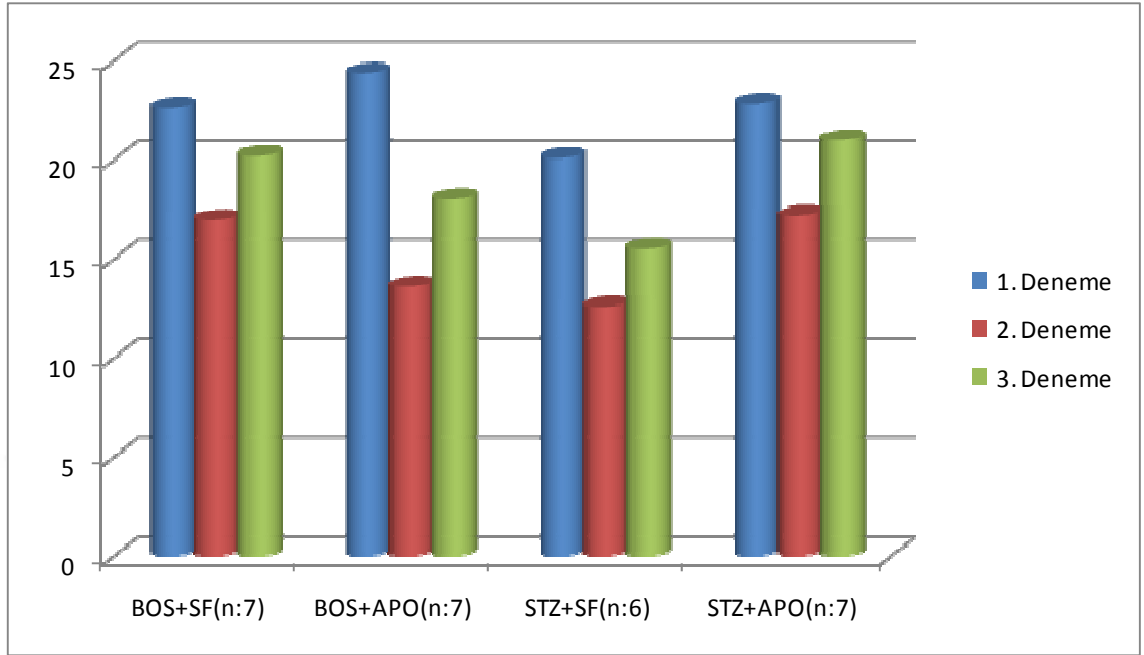
1- 90 Saniyede kattettiği mesafe (cm) (A)



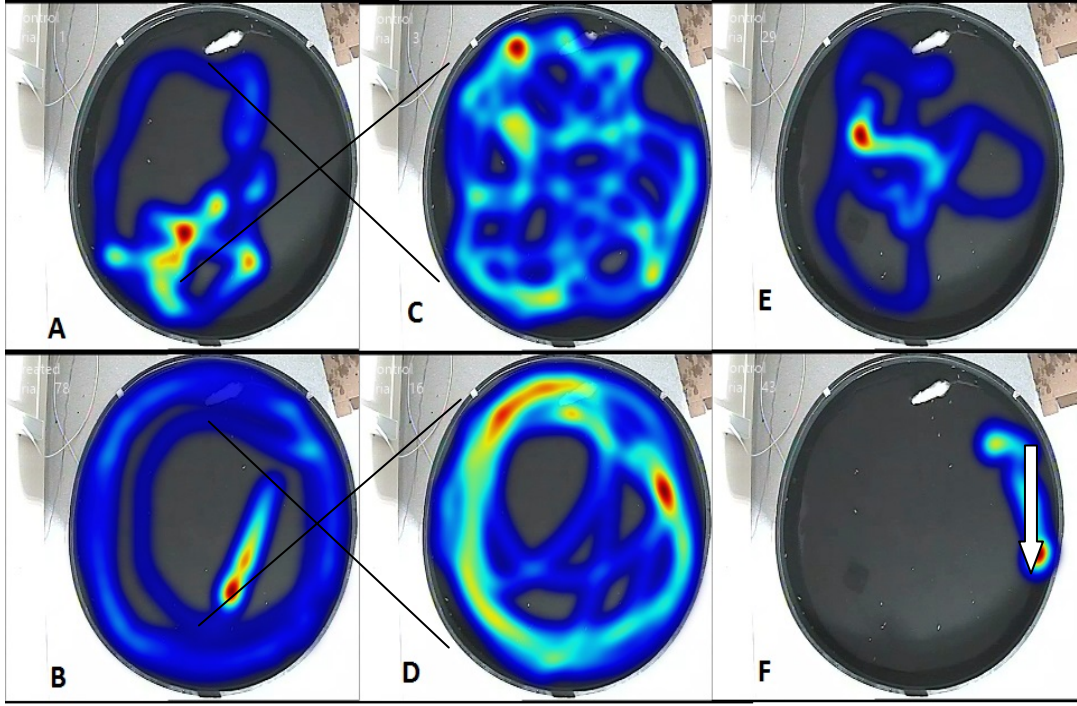
2- Platform bölgesine ilk geliş zamanı (sn) (B)



3- Hedef alanda harcanan zamanı (sn) (C)



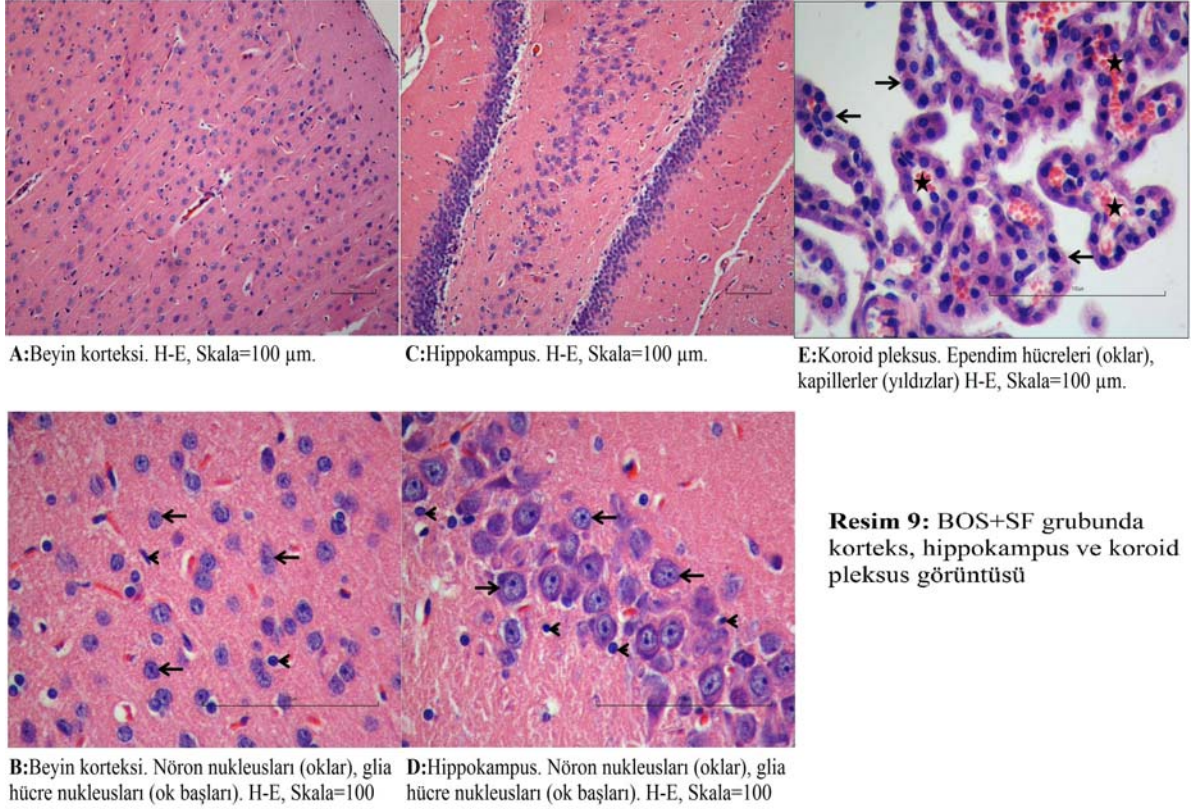
Deneyisel Alzheimer grubu ile kontrol grubu arasında tedavi sonrası yapılan water-maze testinde platforma ilk geliş zamanı, 90 saniyede katettiği mesafe ve hedef alanda harcanan zaman arasında istatistiksel olarak belirgin fark bulunamamıştır.



Resim 6.1: Water-Maze sıcaklık hareket çizelgesi(Resim 8A-B de su tankının kuadrantlara ayrılmış hali gösterilmiştir. Resim 8Fde platform yeri ok ile gösterilmiştir. Rat resmi başlangıç yerini sembol etmektedir.)

Yapılan water-maze testinde hedef alanda harcanan zaman, 90 saniyede katettiği mesafe ve platforma ilk geliş zamanı arasında istatistiksel olarak belirgin bir fark bulunmamakla beraber sıcaklık-hareket çizelgesinde anlamlı olduğunu düşündüğümüz bir durum ortaya çıkmıştır. Kontrol ve tedavi gruplarındaki sonuçlar (Resim 8-A) hedef alanda harcanan zamanın bilinçli olduğunu düşündürmekle beraber tedavi edilmemiş grupta burada geçen zamanın tesadüf olabileceğini düşündüren(Resim 8-B) çizelgeler çoğunluktadır. Fazla yol kateden özellikle STZ-APO, BOS-SF, BOS-APO grubundaki ratların platformu aradığını (Resim 8-C) gösteren çizelgeler bulunmaktadır. STZ-SF grubundaki ratların amaçsız dairesel hareketler çizdiği (Resim 8-D) görülmektedir. Son olarak özellikle STZ-APO grubundaki ratların daha önce platformun bulunduğu bölgede platformu kısa bir süre aradıktan sonra hareketsiz geçen bir süreç görülürken (Resim 8-E), STZ-SF grubunda bazı ratlarda ağır depresyon ve tükenmişlik hissi varlığını düşündüren (Resim 8-F) hareketsizlik ve yüzmeme durumu saptanmıştır. Ancak bu durumlar istatistiksel analizde sayısallaştırılamamıştır.

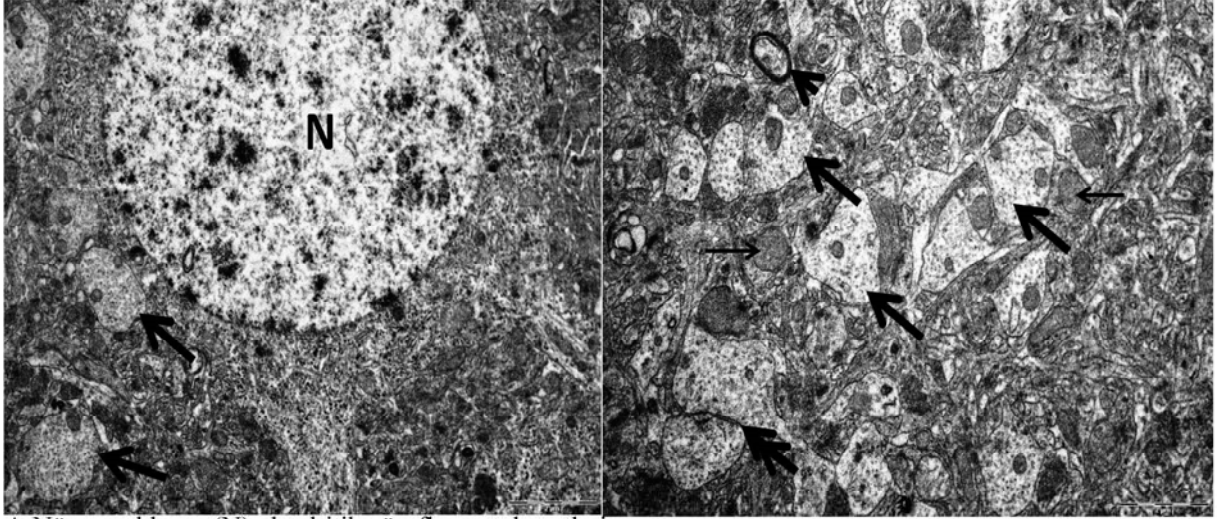
6.1. Grupların Beyin Parankimi Arasındaki Histopatolojik Karşılaştırma



Resim 9: BOS+SF grubunda korteks, hipokampus ve koroid pleksus görüntüsü

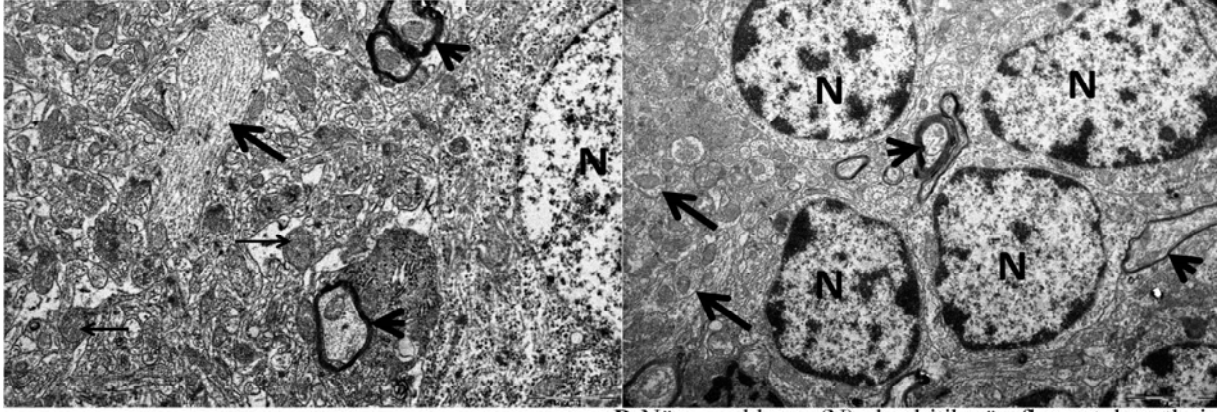
Resim 6.2: BOS+SF grubunda korteks, hipokampus ve koroid pleksus görüntüsü

BOS+SF grubundaki H-E ile boyanmış olan beyin dokusu kesitleri normal histolojik yapıda değerlendirildi. Korteksin histolojik tabakalanması seçilebiliyordu. Nöron nukleusları genel olarak ökromatik ve düzgün konturlu olarak izlendi. Nöron/glia hücre oranı olağan yapıda değerlendirildi. Hipokampus alanında granüler ve piramidal nöronlar normal histolojik görünümde izlendi. Koroid pleksusların kübik-prizmatik şekilli ependimal hücreleri ve kapillerler normal histolojik yapıda değerlendirildi (Resim 9A-E).



A:Nöron nukleusu (N), dendritik nöroflament demetleri ve mitokondriyon (oklar). TEM, Skala=2 μ m

C:Dendritik nöroflament demetleri ve mitokondriyon (kalın ok), miyelinli akson (ok başı), mitokondriyonlar (ince ok), sinaps (çift başlı ok). TEM. Skala=2 μ m

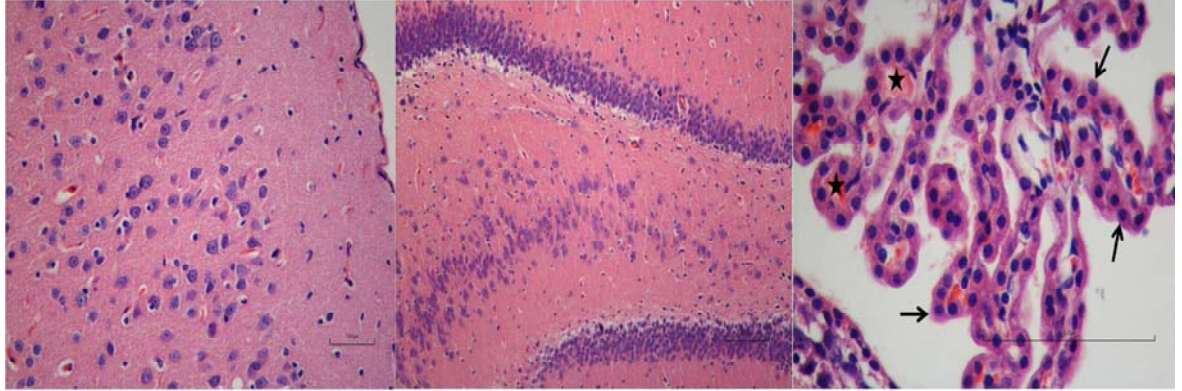


B:Nöron nukleusu (N), dendritik nöroflament demetleri (kalın ok), miyelinli akson (ok başları),

D:Nöron nukleusu (N), dendritik nöroflament demetleri ve mitokondriyon(kalın ok), miyelinli akson(ok başları). TEM, Skala=2 μ m

Resim 6.3: BOS+SF grubunda nöron nükleusu ve nöronal yapıların TEM görüntüsü

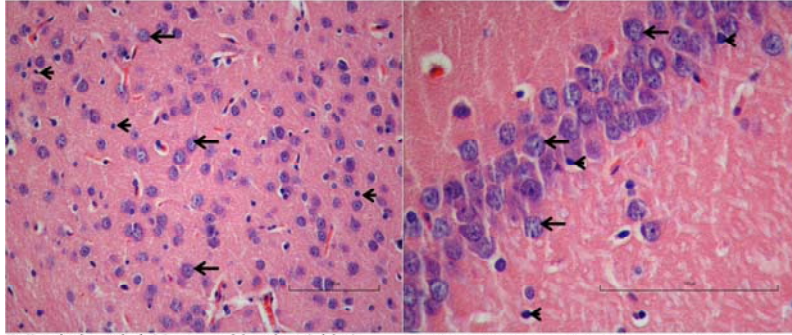
BOS+SF grubuna ait beyin dokularının transmisyon elektron mikroskopik incelenmesinde nöronlar genel olarak ökromatik ve düzgün konturlu nukleuslar içermektedir. Mitokondriyonlar yuvarlak şekilli yoğun kristalı olarak izlendi. Yer yer granüler endoplazmik retikulum belirgin olarak normal ultrastrüktürel yapıda değerlendirildi. Glia hücreleri ve nöron somaları arasındaki alanlarda çok sayıda izlenen dendrit ve akson kesitleri yoğun ve düzgün nörofilament ağı ve yer yer mitokondriyonlar içermektedir (Resim 10A-D).



A:BOS+APO grubunda beyin korteksi. H-E, Skala=100 µm.

C:Hippokampus. H-E, Skala=100 µm.

E:Koroid pleksus. Ependim hücreleri (oklar), kapillerler (yıldızlar) H-E, Skala=100 µm.

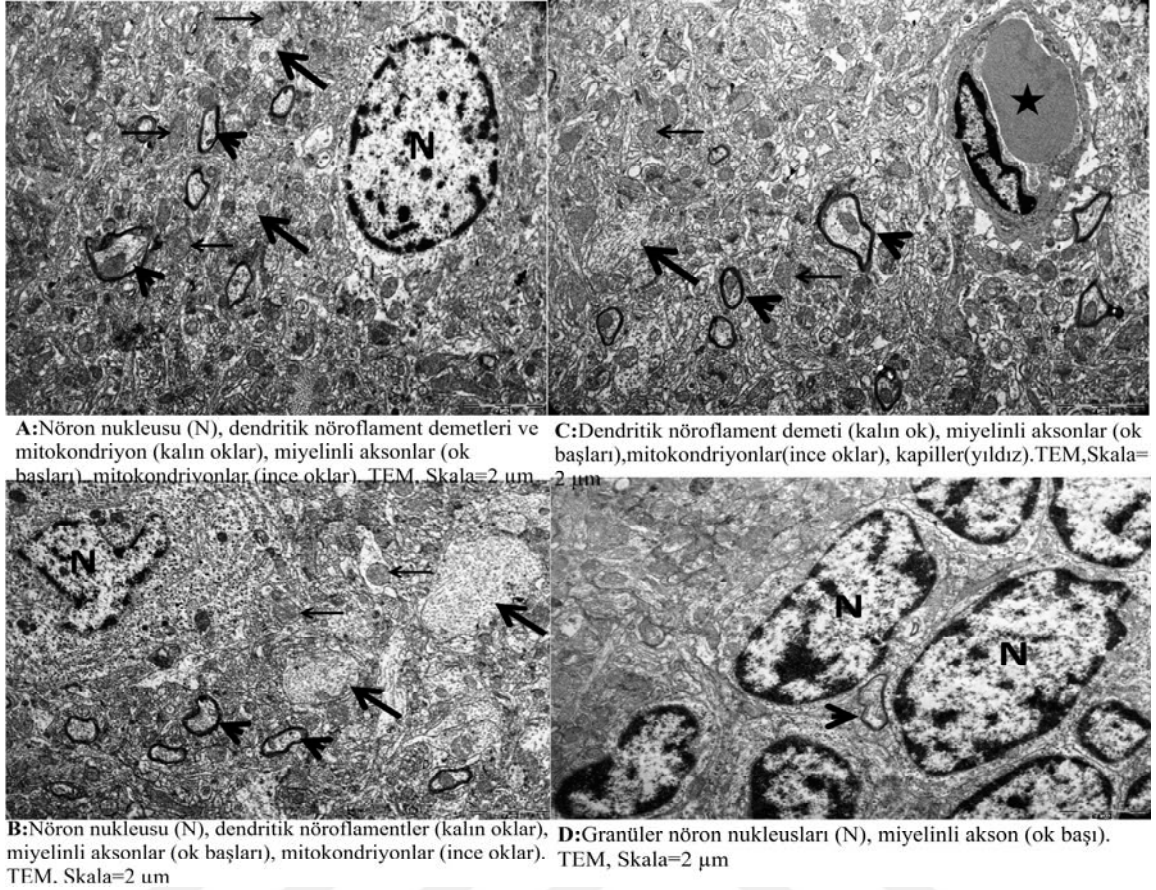


B:Beyin korteksi. Nöron nukleusları (oklar), glia hücre nukleusları (ok başları). H-E, Skala=100 µm.

D:Hippokampus. Nöron nukleusları (oklar), glia hücre nukleusları (ok başları). H-E, Skala=100 µm.

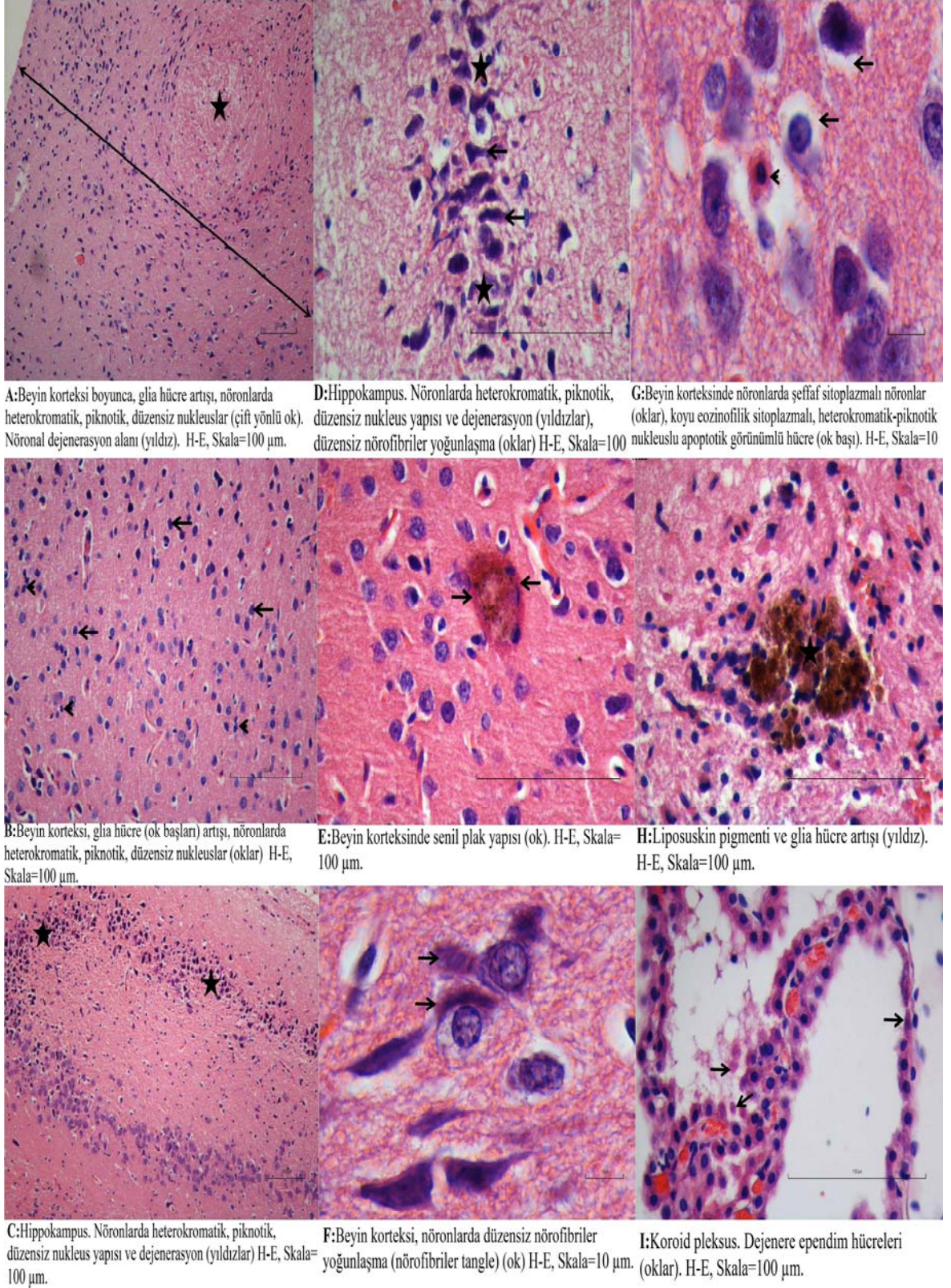
Resim 11: BOS+APO grubunda korteks, hippocampus ve koroid pleksus görüntüsü

Resim 6.4: BOS+APO grubunda korteks, hippocampus ve koroid pleksus görüntüsü



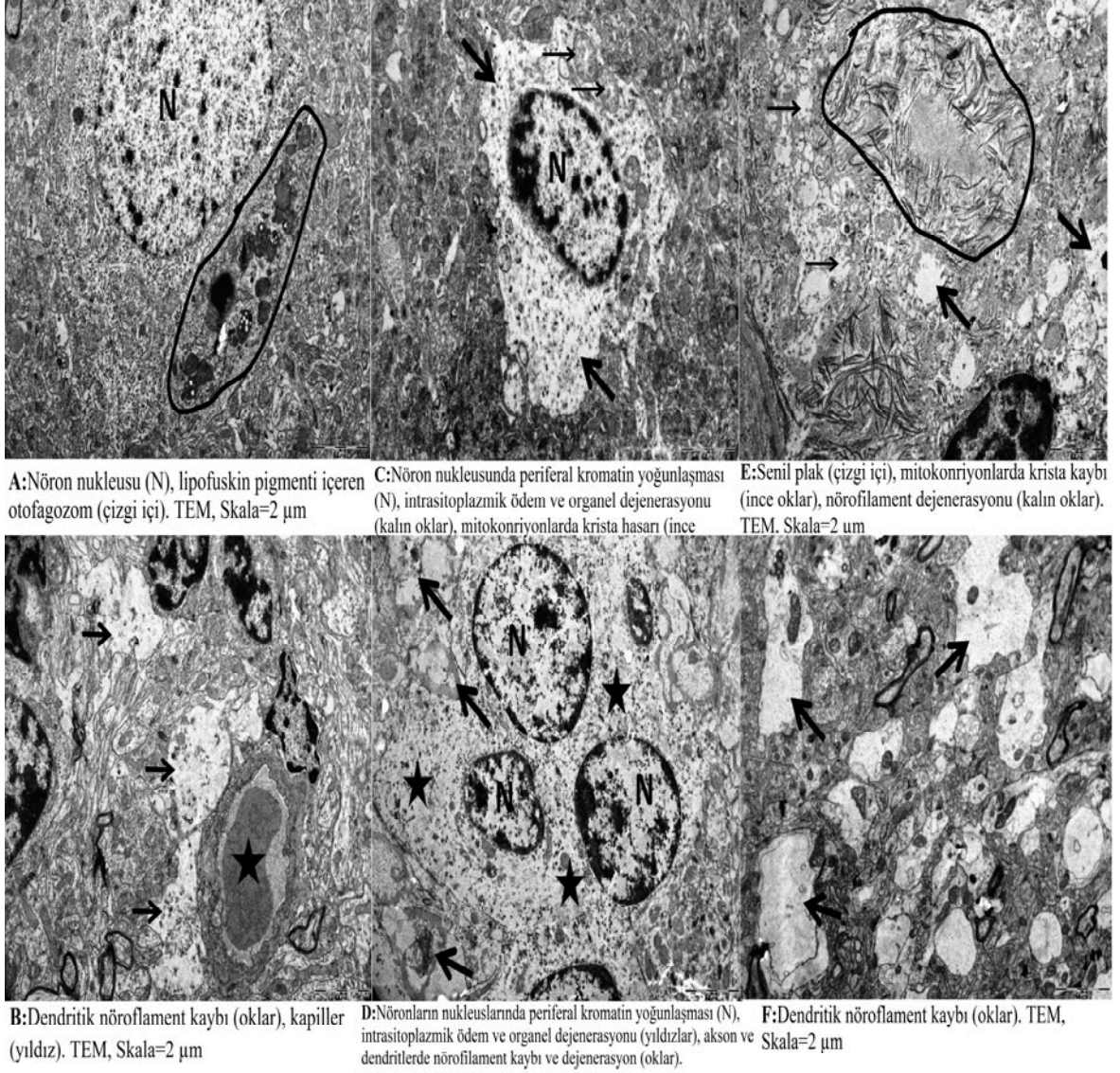
Resim 6.5: BOS+APO grubunda nöron nükleusu ve nöronal yapıların TEM görüntüsü

BOS+APO grubuna ait ışık mikroskopik ve ultrastrüktürel bulgular BOS+SF grubu ile benzemekte olup kesitler normal histolojik (Resim 11A-E) ve ultrastrüktürel (Resim 12A-D) yapıda değerlendirildi.



Resim 6.6: STZ+SF grubunda korteks, hipokampus ve koroid pleksus görüntüsü

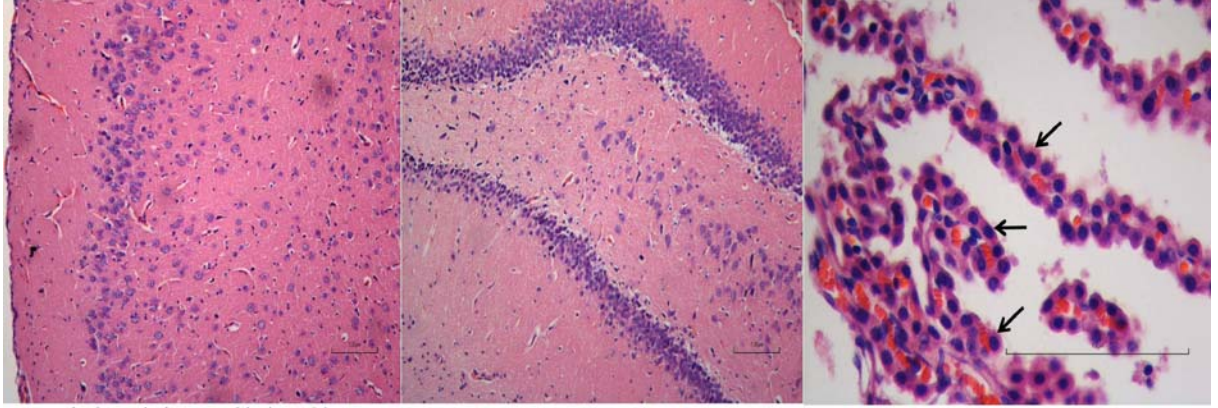
STZ+SF grubuna ait ışık mikroskopik olarak incelenen kesitlerde yer yer tüm korteks tabakalarında çok sayıda heterokromatik ve düzensiz konturlu nöron nukleusları saptandı. Genel olarak korteks tabakasında belirgin nöron/glia hücre oranında glia hücre sayısı yönünde belirgin artış dikkati çekti. Korteks içerisinde değişik çaplarda dairesel şekilli, sınırları belirgin nekrotik görünümlü alanlarda nöron kayıpları saptandı. Hippokampus bölgesinde, özellikle piramidal nöronlarda belirgin heterokromazi, piknozis ve yer yer dejenerasyon tespit edildi. Korteks ve hippocampus alanlarındaki nöronlarda düzensiz nörofibriler yoğunlaşma (nörofibriler tangle) saptandı. Bazı nöronların perinuklear sitoplazmik alanlarının şeffaf görünümde olduğu saptandı ve intrasitoplazmik ödem yönünde değerlendirildi. Yer yer koyu eozinofilik sitoplazmalı, piknotik nukleuslu hücreler apoptozis yönünde değerlendirildi. Korteks içerisinde farklı genişlikte bazı alanlarda lipofuksin pigmenti birikimi tespit edildi. Ayrıca yine korteks bölgesinde yer yer farklı çaplarda senil plak yapılarına rastlandı. Koroid pleksus ependim hücrelerinin bazılarının boylarının kısalarak yassı şekil aldığı, bazılarının ise dejeneratif değişiklikler gösterdiği tespit edildi (Resim 13A-I).



Resim 6.7: STZ+SF grubunda nöron nükleusu ve nöronal yapıların TEM görüntüsü

STZ+SF grubuna ait beyin dokularının transmisyon elektron mikroskopik incelenmesinde bazı nöronların sitoplazmasında lipofuscin pigmenti de içeren geniş otofagozomal yapılar görüldü. Yaygın olarak dendritik ve aksonal yapılarındaki nörofilamentlerde belirgin azalma ve düzensizleşme, yer yer de total nörofilament kaybı tespit edildi. Bazı nöronlarda ileri derecede intrasitoplazmik ödem ve organel dejenerasyonu ile birlikte nükleusta periferel kromatin yoğunlaşması dikkati çekti. Bu gruptaki nöronlarda yaygın olarak değişik dercelerde mitokondri hasarı ve dejenerasyonu saptandı. Bazı alanlarda nöronlarda intrasitoplazmik ödem, total organel dejenerasyonu ve nükleuslarında periferel kromatin yoğunlaşması dikkati çekti. Nöron

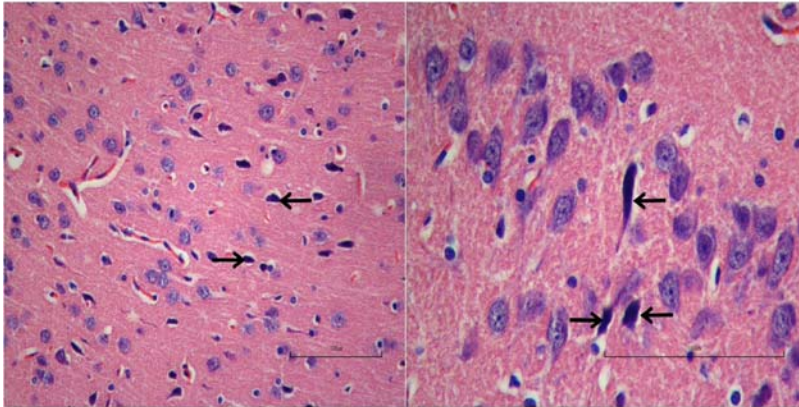
somaları ve glia hücreleri arasındaki alanlarda dendritik nörofilament düzensizliği, kaybı ve dejenerasyonu yaygın olarak görüldü. Ultrastrüktürel incelemede yer yer merkezi bölgesi homojen, periferik düzensiz fibriler yapılar içeren senil plaklar tespit edildi (Resim 14A-F).



A:Beyin korteksi. H-E, Skala=100 µm.

C:Hippokampus. H-E, Skala=100 µm.

E:Koroid pleksus. Ependim hücreleri (oklar), H-E, Skala=100 µm.



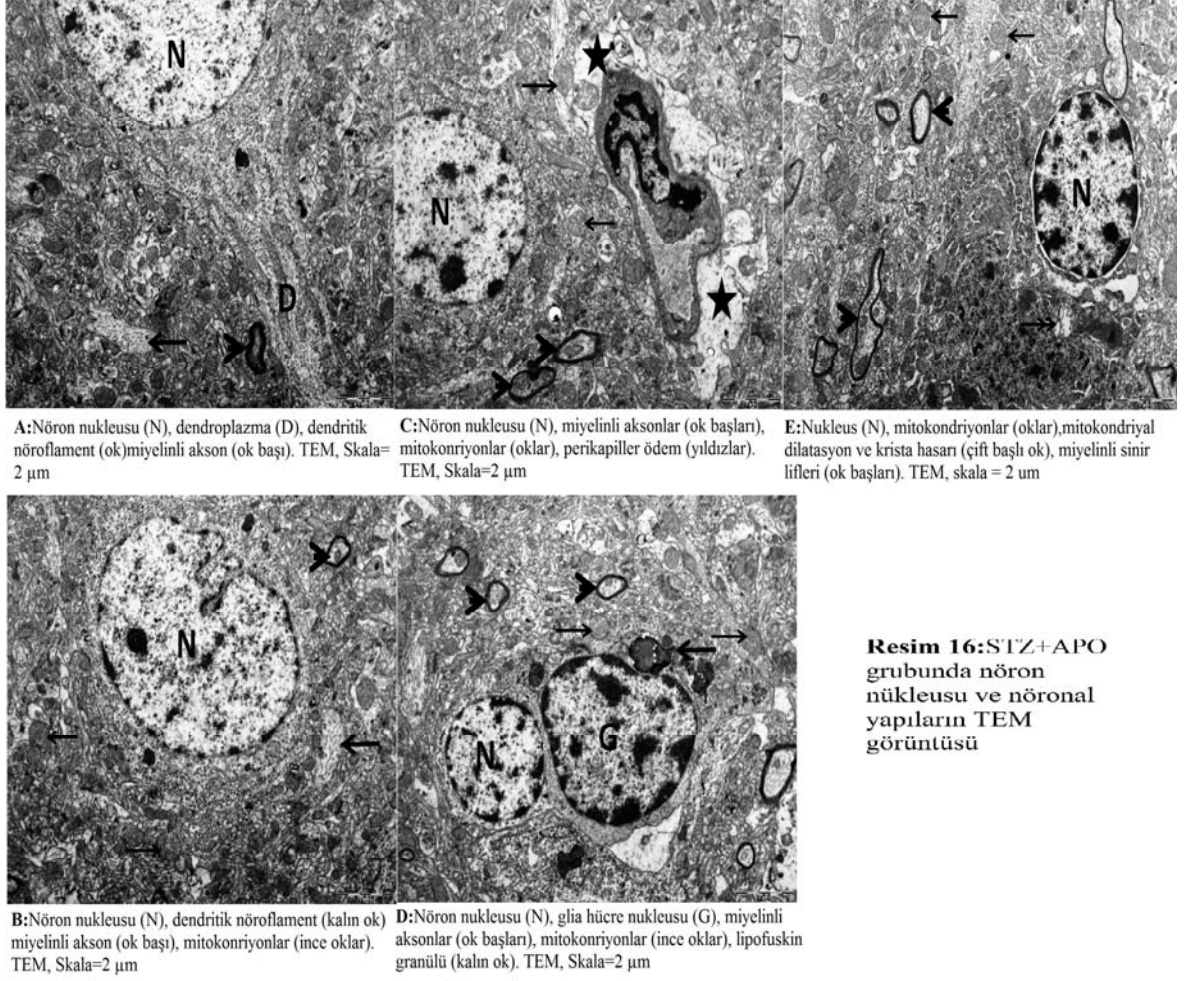
B:Beyin korteksi. nöronlarda heterokromatik, piknotik nükleuslar (oklar) H-E, Skala=100 µm

D:Hippokampus. Heterokromatik, piknotik nükleuslu nöronlar ve nörofibriler tangle (oklar). H-E, Skala=100 µm.

Resim 15: STZ+APO grubunda korteks, hippocampus ve koroid pleksus görüntüsü

Resim 6.8: STZ+APO grubunda korteks, hippocampus ve koroid pleksus görüntüsü

STZ+APO grubundaki kesitlerin ışık mikroskopik incelenmesinde korteks içerisinde yer yer hiperkromatik nükleuslu nöronlara rastlandı. Hipokampus bölgesinde granüler ve piramidal nöronlar arasında yer yer hiperkromatik nükleus ve nörofibriler tangle yapıları tespit edildi. Bu grupta izlenen hasar bulguları STZ+SF grubundakinden belirgin olarak azalmıştı(Resim 15A-E).



Resim 6.9: STZ+APO grubunda nöron hipokampus ve koroid pleksus görüntüsü

STZ+APO grubuna ait kesitlerin ultrastrüktürel incelenmesinde nöronlar genel olarak normal ultrastrüktürel yapıda değerlendirilmekle birlikte bazı nöronlarda lipofuscin pigmenti birikimi ve fagozom yapıları dikkati çekti. Ayrıca yer yer perikapiller alanlarda ödem ve bu alanlara yakın dendritik yapılarda nörofilament kaybı dikkati çekti. Bu grupta izlenen ultrastrüktürel hasar bulguları STZ+SF grubuna göre belirgin olarak azalmıştı(Resim16A-E).

7. TARTIŞMA

Bu çalışmada intraserebroventriküler STZ ile oluşturulmuş deneysel AH'ı modelinde aposinin tedavisinin etkinliği sorgulandı. Rota-rod, akselere-rod ve water maze testi ile deneklerde denge, üç boyutlu öğrenme ve bellek fonksiyonları incelendi. Kontrol ve tedavi grubunun beyin dokusunda MDA ve GSH düzeyleri, kanda rutin biokimyasal parametreler ve hematoksilen-eozin ve TEM yöntemiyle histopatolojik değişiklikler araştırıldı. Deney hayvanı olarak ucuz ve kolay sağlanabilir olması ve çevresel direncinin yüksek olması nedeniyle sıçan tercih edildi.

Beyinde sinaptik iletide iyon konsantrasyonunu düzenleme, elektriksel potansiyellerin oluşumu, eksitator nörotransmitterlerin aktif alınımı ve sentez işlemleri gibi olaylar için önemli ölçüde enerji kullanılır. Beyin, temel enerji kaynağı olarak önemli bir metabolik substrat olan glukoz kullanır (90). Beyinde glukoz metabolizması oksidatif olup, glukozun çoğu karbondioksit ve suya okside olur. Glukozun karbondioksit ve suya tam oksidasyonu her zaman meydana gelmeyebilir. Böyle bir durumda beyinde istenmeyen yan metabolitler gelişir (91). Beyine glukoz taşınması kan-beyin engelinden sodyumdan bağımsız olan yüksek molekül ağırlıklı glukoz taşıyıcı proteinler (glucose transporter (GLUT)) aracılığı ile gerçekleşir. Beyin dokusuna glukozun geçişi ekstrasellüler glukoz konsantrasyonuna bağlıdır. Bu yüzden hiperglisemik durumlarda hücre içi glukoz seviyesi anormal derecede yüksektir. Kan plazmasında glukoz miktarının normal değerlere göre artması ile meydana gelen kısa süreli hiperglisemi ve diabetes mellitusda olduğu gibi uzun süreli hiperglisemi çeşitli metabolik yollar aracılığıyla kan beyin engeli yapısının değişmesine ve nöronal hasara neden olabilir (92). Bu metabolik yollardan bazıları nöronal aktiviteden bağımsız olarak pasif yanıtların yer aldığı dolaylı yolu oluşturur. Ayrıca hipergliseminin merkezi sinir sistemindeki nöronlarda gen ekspresyonunda oluşturduğu aktif yanıtların nöronal hasarda çok önemli bir yere sahip olduğu gösterilmiştir (93). Bu genler nörotransmisyon, lipid metabolizması, nöronal gelişme, oksidatif hasar ve DNA onarımı gibi önemli görevlerde yer almaktadırlar. Kronik deneysel diyabetlilerde hipokampal dentat girusta insülin benzeri büyüme faktörü ve reseptörleri ekspresyonunun “downregüle” edildiği gözlenmiştir. Bu durum nöronal apoptosise eğilimde önemlidir (94).

Beyinde oluşan hiperglisemi komplikasyonlarının reaktif oksijen türleri ile olan ilişkisini inceleyen çalışmalarda, nonenzimatik glukasyon, enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres, sorbitol yol aktivitesi, hipoksi ve iskemi-reperfüzyon sonucu oluşan doku hasarının serbest radikal üretimini arttırdığı ve antioksidan savunma sistemini değiştirdiği vurgulanmaktadır (95-96).

Kognitif ve davranış bozuklukları ile kendini gösteren ensefalopati hipergliseminin geç komplikasyonlarından biri olarak ortaya çıkabilir. Diyabetli kişilerde kronik hiperglisemiye bağlı olarak ortaya çıkan ilerleyici demans insidansı da yüksektir (97). Hipokampal CA1 ve CA3 nöronlarındaki bir başka değişiklik nitrik oksit sentetaz mRNA ve protein konsantrasyonlarının azalmasıdır. Bu da uzun süreli potansiyasyonu azaltır, kognitif hafıza ve öğrenmede bozulmaya neden olur (98).

Son dönemlerde yapılan çalışmalar beyinde geliştirilen hipergliseminin deneysel AH modeli için en uygun model olduğunu desteklemiştir (7,48,56). Streptozotosin (STZ) yapısında bir glukoz molekülü içerdiği için plazma membranındaki glukoreseptörlere bağlanır. STZ glukozla uyarılan insülin salınımını bloke eder ve hem hiperglisemiye neden olur hem de hücrelerin glukozdan yararlanmasına engel olur (57,58). STZ'nin temel etki yerlerinden biri de nükleer DNA'dır. STZ'in hücre içinde dekompozisyonu ile oluşan reaktif karbonyum iyonları DNA bazlarında alkilasyona neden olarak apoptoz gelişimini indükler (57-59). İCV STZ enjeksiyonu ile beyin parankiminde bozulma olduğu ve bu bozulmaya oksidatif hasarın eşlik ettiği bilimsel olarak gösterilmiştir (7,48,56,59). Biz aposinin tedavisinin hem motor ve kognitif fonksiyon testlerinde, hem de paralel olarak oksidatif hasarda azalmaya neden olarak bozulmuş biyokimyasal ve histopatolojik yapıları düzeltebileceğini düşünerek bu araştırmayı yaptık.

Birçok proinflamatuvar sitokin, etkilerini indüklenebilir NOS aracılığıyla NO oluşumunu arttırarak yaparlar. iNOS ekspresyonunu uyaran makrofajlar LPS ile aktive edildiklerinde, arjininin hem transportunu hem de sentezini tetiklerler (10,52). Aposinin, inflamasyon süresince makrofaj aktivasyonunun düzenlenmesinde rol oynar. Makrofajlarda NADPH oksidaz enziminin aktiviteleri LPS ve sitokinler tarafından düzenlenir. İndüklenebilir NOS oluşumunu tetikleyen LPS, doza bağımlı olarak, geri dönüşümlü bir şekilde ADC ve NADPH oksidaz aktivitesini modüle eder. İndüklenebilir NOS ve NADPH oksidaz ekspresyonunu uyaran makrofajlar LPS ile

aktive edildiklerinde, arjininin hem transportunu hem de sentezini stimüle ederler. Buna bağlı olarak intraselüler arjinin ve dolayısıyla NO miktarı artar. Lipopolisakkarit, ADC aktivitesini azaltır. Ayrıca LPS varlığında iNOS inhibitörlerinin hidrolizi stimüle edilir. İnterlökin-10, TGF- β ve IL-4, makrofajların enflamatuvar aktivasyonunu baskılayarak NO üretimini inhibe eder. IL-10 ve TGF- β , stimüle edilemeyen hücrelerde ADC ve NADPH oksidaz aktivasyonunu azaltır. İnterlökin-4 ise ADC aktivitesini değiştirmeksizin, LPS'in NADPH oksidaz üzerindeki etkisini geri çevirebilir (9,51,53). Dolayısıyla aposininin sitokin oluşumunda rolü vardır(54).

İnflamasyon sürecinin modülasyonunda rolü olduğu bilinen aposininin Alzheimer etyopatogenezinde önemi bilinen inflamasyon bileşeni üzerine etkili olabileceğini öngördük (9,54). Bu nedenle hayvanların beyin dokularında serbest radikal oluşumuna bağlı hasarı değerlendirmek için indirgenmiş glutatyon (GSH) ve MDA aktivitesi ölçtük. Öğrenme ve bellek fonksiyonları bozulmuş olan STZ grubunda beyin dokusunda lipid peroksidasyonunu gösteren yüksek MDA düzeyi ve endojen antioksidan GSH düzeyinin azaldığını görmeyi planladık. Yalnız ratlarda AH gelişmesi için 21 gün beklendi. Ardından rota-rod, akselere-rod, water-maze testi yapıldı. 10 günlük aposinin tedavisi ve aynı testlerin tekrarı sonrası 45 günlük süre geçti. Mevcut yıkıma bağlı gelişen bu parametrelerden deneysel AH grubunda (STZ-SF) diğer gruplara göre MDA için istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır. GSH'nın bu süreçte normal değerlere ulaştığı düşünüldü ve bu değerler arasında bir fark bulunamadı. Dolayısıyla bulgularımız; aposininin bozulmuş kognitif fonksiyonlar üzerindeki düzeltici etkisinin, serbest radikal oluşumuna bağlı hasarı engelleyerek yaptığını tümüyle gösterememiştir. AH'da kanda bilinen rutin biyokimyasal bir tanı koydurucu parametre yoktur. Deneyimizde gruplar arasında anlamlı olmayan BUN ve Na değerlerinde fark olmakla beraber bu değerler daha çok ilaç gruplarında belirlemiştir. Anlamlı bir sonuç çıkarılamamıştır.

Romero ve arkadaşları (99) lipid peroksidasyonunun ve oksidatif stresin yüksek olduğu ensefalit, AH gibi durumlarda; MDA metabolit düzeyinin yüksek olmasının, buna sekonder hücre defansına bağlı antioksidan olan GSH düzeyinin azalmasının beklendiğini belirtmişlerdir. Yalabık ve arkadaşları (100) deneyde kullandığımız metodu kullanarak ratlarda AH gelişmesini sağlamış, tedavide agmatini kullanarak bu

sonuçları elde etmişlerdir. Yalnız oksidatif süreçten sonraki zamanda MDA-GSH arasındaki ilişki net değildir.

Ratlarda üç boyutlu öğrenme ve bellek fonksiyonlarının araştırılmasında kullanılan başlıca test Morris'in 'Water maze' testidir. Bu testte deneğin çevrede sabit konumda duran nesneler yardımıyla, yüzme havuzunda sabit bir çeyrekte gizlenmiş olan platformu bulabilme yeteneği araştırılır. Çevredeki nesneler yardımıyla konumu saptama, yani üç boyutlu öğrenme ve bunu belleğe kaydetme ile normal bir ratın ilerleyen test günlerinde daha kısa süre içerisinde platforma ulaşması beklenir. Deney günü platform kaldırıldığında platformun bulunduğu çeyrekte harcadığı zaman, buraya ilk yönelme zamanı ve katettiği mesafeden ratın öğrenme becerisi ile ilgili bilgi edinilir.

Turan ve ark. (7) deneyimizdeki gibi İCV STZ kullanarak ratlarda AH gelişmesini sağlamış ve deneklere water-maze testi yapmışlardır. Test sonuçlarında hedef alanda harcanan zamanı değerlendirmişler ve kontrol grubunda en iyi, ilaç grubunda en kötü sonuçların çıktığını görmüşlerdir. Tedavi olarak circumin verdiklerinde ilaç grubundaki sonuçların düzeldiğini tespit etmişlerdir. Biz ratlara yaptığımız deney sonrası istatistiksel olarak bunları saptayamamış olup hareket-sıcaklık haritalarında anlamlı olabileceğini düşündüğümüz sonuçlar elde ettik. Şöyle ki Sergui ve arkadaşları (74) rodentlerin Water-maze testinde yüzme patternlerinin her zaman öngürülemediğini, öğrenme güçlüğü çeken veya stress altındaki ratların farklı şekillerde su tankında yol aldığını ve bunların bazen istatistiksel olarak anlamlı çıkmayacağını, bu yüzden yüzme patternlerinden de bilgi sahibi olunulabileceğini açıklamıştır. Kalıcı uzamsal (Spatial persistent) hedefe dönük yüzme şeklinin platform yerini öğrenmiş ratlarda çoğunlukta görüldüğünü belirtmişlerdir. Merkezi uzamsal olmayan (Nonspatial concentrik) olarak değerlendirdiği gruptaki durum, hedefe tamamen dönük olmayan ve stres durumunda beliren bir araştırma yöntemi olarak tarif edilmiştir. Rastgele uzamsal (nonspatial random) olarak ise hedefle ilgisi olmayan, platform bölgesini üç boyutlu olarak öğrenememiş ratlarda görülen bir durum olarak açıklanmıştır. Resim 8'de deneyimizde ilaç ve kontrol grubundaki bazı örnekler paylaşılmış olup STZ-SF grubunda rastgele uzamsal ve merkezi uzamsal olmayan ısı sıcaklık görüntüsü sunulurken, diğer gruplarda (BOS-SF, BOS-APO, STZ-APO) kalıcı uzamsal ısı-sıcaklık görüntüsü takdim edilmiştir.

Ratlarda denge ve motor koordinasyon fonksiyonlarının değerlendirilmesinde kullanılan test ise rota-rod ve akselere-rod testleridir. Motor koordinasyonunda deney hayvanı uzun ekseni etrafında dönen yatay bir çubuk üzerine yerleştirilir. Hayvan bu düzenekte dik kalır ve düşmeyip ileriye yürümesi gerekir. Kliniği ilerlemiş Alzheimer hastalarında motor ve denge koordinasyonunun bozulması beklenir (1,2,7). Deneyimizde ratlara İCV STZ enjeksiyonun 21. gününde AH geliştiği kabul edilmiş (7) ilk yapılan denge ve kordinasyon testinde kontrol grubunda belirgin fark olduğunu gösteren sonuçlar çıkmıştır. Yapılan rota-rod, akselere-rod testinde 5 rpm, 10 rpm, 20 rpm, 30 rpm, 40 rpm, akselere 4 dakikada istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunurken, akselere 10 dakika testinde bir fark bulunamamıştır.

Yamamoto ve Yamada(100) ratlarda iskemi modeli ile organik beyin sendromu geliştirmiş ve Ca⁺ kanal blokörü ile tedavi etmiştir. Sonuçları değerlendirildiğinde tedavi edilmeyen organik beyin sendromu gelişmiş grupta da rota-rod ve akselere-rod sonuçlarının düzeldiğini görmüşlerdir. Fakat bu düzelmenin tedavi edilen ve kontrol grubundaki düzelme kadar daha belirgin olmadığını öne sürmüşlerdir. Aoki ve ark.(101) MPTP ile farelerde parkinsonizm geliştirmiş ve beyin hasarına sekonder farelerde lokomotor aktivitenin azaldığını rota-rod testi ile göstermişlerdir. Deneyimizde ratlarda lokomotor aktivitenin daha hızlı olması gerektiği 30,40 rpm lere STZ-SF grubunun rota rod testinde diğer gruplara göre anlamlı olarak beyin hasarına bağlı lokomotor aktivitenin azaldığı saptanmıştır.

Literatürde AH'na yönelik ICV STZ enjeksiyonu ile yapılan oldukça fazla histopatolojik çalışma mevcuttur (84,102-105). Bu çalışmalarda STZ enjeksiyonu sonrası beyinde AH geliştiğine dair ciddi bulgular saptanmıştır. Nöronal dokularda gelişen dejenerasyon, lipofuscin granülleri ve senil plaklar bu çalışmalarda olduğu gibi bizim araştırmamızda da belirlenmiştir. Bizim araştırmamız da bu çalışmalardaki gibi ICV STZ enjeksiyonunun deneysel AH için uygun bir model olduğunu desteklemiştir. Deneyimizde aposininin histolojik olarak deneysel AH'nda olumlu etkileri saptanmış olup literatürde bu konuda bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

8. SONUÇ

Sıçanlarda intraserebroventriküler Streptozotosin verilerek oksidatif hasar geliştirilmesi, öğrenme ve bellek fonksiyonlarının bozulmasına neden olarak deneysel AH modeli oluşmasını sağlayabilir.

Erken dönemde bozulan öğrenme ve bellek fonksiyonları geç dönemde düzelmektedir. Geç dönemde gözlenen bu düzelme oluşturulan lezyona bağlı olarak trofik mekanizmaların uyarıldığını düşündürmektedir.

Water-Maze testi bellek ve uzaysal öğrenme, rota-rod, akselere-rod testi denge ve bellek fonksiyon kaybı hakkında bilgi verebilir.

Araştırmamızda gruplar arasında kanda bakılan biyokimya değerleri ve parankimde çalışılan GSH arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Fakat parankimde çalışılan MDA, rota-rod akselere-rod, Water-Maze testlerinde ve histopatolojik incelemelerde anlamlı olabilecek sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmanın daha kapsamlı ve geniş gruplar ile desteklenmesi gerekmektedir.

Aposinin tedavisinin ileri testler ile desteklenerek AH tedavisi yöntemlerine seçenek sağlayabileceği öngörülmüştür. Çalışmamızda Aposinin tedavisinin beyin dokusu üzerinde olumlu koruyucu etkisi olduğu lehine bulgular mevcuttur. Bu günümüzdeki tedavi yöntemlerine ek destekler ve seçenekler sağlayabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızdaki sonuçların daha geniş gruplar ve uygun doz-zaman aralıkları ile yapılacak tedavi arayışlarına ışık tutacağını düşünmekteyiz.

9. ÖZET

DENEYSEL ALZHEİMER HASTALIĞI MODELİNDE APOSİNİN'İN UZAYSAL ÖĞRENME, DENGE VE BELLEK FONKSİYONLARINA ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Amaç: Bu çalışmada intraserebroventriküler Streptozotosin verilerek oluşturulan deneysel Alzheimer Hastalığında; uzaysal öğrenme, denge ve bellek fonksiyon kaybının bir antioksidan olan ve intraperitoneal olarak verilen Aposinin ile tedavisi amaçlanmıştır. Tedavi girişiminin etkisi water-maze, rota-rod, akselere-rod testi, parankimde MDA-GSH analizi, kanda rutin biokimya, histopatolojik olarak hematoxilen-eosin ve transmission elektron mikroskop ile değerlendirilmiştir.

Materyal ve Metod: Çalışmamızda ağırlıkları 200-275 gram arasında değişen 35 dişi ve 35 erkek Wistar-Albino sıçan kullanıldı. 50 rata aynı seanslarda toplam 20 mikrolitre stereotaktik yöntemle bilateral yapay BOS ta çözünmüş 3 mg/kg intraserebroventriküler STZ verildi. 20 rata ise aynı hacimde bilateral yapay BOS enjeksiyonu yapıldı. İntraserebroventriküler STZ enjeksiyonu yapılmış sıçanlardan, işlem sonrası 21. günde yaşayan 34 rata, kontrol grubundan yaşayan 16 rata water maze ve rota-rod akselere-rod testleri yapıldı. İşlemlere uyumlu olan ve yapılan test sonuçları deneysel AH ile uyumlu olan 15 rat ilaç grubunu, 14 rat kontrol grubunu oluşturdu. İlaç ve kontrol grupları rastgele iki gruba ayrıldı. Bir gruba intraperitoneal 10 mg/kg dan aposinin tedavisi, diğer gruba ise aynı hacimde serum fizyolojik verildi. Tedavi tamamlandıktan sonra deneklere water maze, rota-rod, akselere-rod testi tekrar edildi. Ardından ratlar kurban edildi. Kurban edilen ratların kanında rutin biokimya bakıldı. Beyin parankimi hasarsız olarak çıkartılıp iki hemisfere ayrıldı. Bir hemisferden MDA-GSH analizi, diğerinden histopatolojik inceleme yapıldı.

Bulgular: Deneysel AH grupları ile kontrol grupları arasında yapılan rota-rod, akselere-rod testinde tedavi öncesi 5 rpm, 10 rpm, 20 rpm, 30 rpm, 40 rpm, akselere 4 dk arasında belirgin fark bulundu. Tedavi sonrası aposinin tedavisi verilmemiş AH grubunda 30-40 rpmlerde fark saptandı. Yapılan water maze testinde ise tedavi öncesi platforma ilk geliş zamanında kontrol grubu lehine fark saptandı. Tedavi sonrası gruplar arasında bir fark görülmedi. Deneklerin kanında çalışılan rutin biyokimya ve beyin parankiminde bakılan GSH arasında fark saptanmadı. Beyin parankiminde bakılan

MDA arasındaki fark anlamlıydı. Hemotoksilen-eosin ve TEM histopatolojik incelemesinde aposinin tedavisi alan grupta tedavi almayan gruba göre belirgin olarak daha az nicelikte AH'na ait histopatolojik bulgular saptanmıştır. Bu bulgular kontrol grubunda görülmemiştir.

Sonuç: Bu çalışmada, ratlara İCV STZ verilerek oluşan oksidatif stresin AH için uygun bir model olduğu görülmüştür. Bu modelde oluşan beyin hasarı tedavisinde Aposininin olumlu etkisi olduğu Water-maze, rota-rod, akselere-rod, histopatolojik testler ve biyokimyasal analiz ile görülmüştür. İleri testler ile desteklendikten sonra aposinin tedavisinin günümüzdeki AH tedavi yöntemlerine ek bir seçenek sağlayabileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Alzheimer hastalığı, Stereotaksi, Streptozotosin, Aposinin, Rota-rod testi, Akselere-rod testi, Water-Maze testi

10. SUMMARY

EVALUATION OF THE EFFECTS OF APOCYNINE ON SPATIAL LEARNING, BALANCE AND MEMORY FUNCTION IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF ALZHEIMER DISEASE

Scope: The aim of this study is the evaluation of the therapeutic effect of intraperitoneal apocynine application in an experimental model of Alzheimer disease. The model is realized by intracerebroventricular STZ injection and the treatment is evaluated by focusing on spatial learning, balance and memory function. The reference investigations are water-maze, rota-rod, accelerod tests, MDA-GSH levels of neural tissue, routine blood biochemistry and histopathology by hematoxylin-eosin and transmission electron microscopy

Material and Method: The study involved a total of 70 Wistar-Albino rats (35 males and 35 females) weighing 200-275 gr each. 3 mg/kg STZ dissolved in 20 microliters of artificial CSF is applied to 50 rats via stereotactic route in a single session. Only artificial CSF of the same volume is injected to 20 rats stereotactically as control. 34 rats from the STZ group and 16 rats from the control group survived for twenty-one days after the first application. They are evaluated by water maze, rota-rod and accelerod tests. 15 rats with test results suitable for experimental Alzheimer disease made up the treatment and 14 rats the control group. Treatment and control groups were randomly divided into two groups. One of the subgroups from each received 10 mg/kg intraperitoneal apocynine injection while the other had isotonic saline injection with the same volume. After the interventional procedure, water maze, rota-rod and accelerod tests were repeated. Then rats were sacrificed and routine blood biochemistry parameters were studied. Brain is extracted with no extra damage and the two hemispheres were separated. MDA-GSH analyses were performed from one hemisphere, while the other hemisphere was spared for histopathological investigation.

Results: On pretreatment group, significant difference between the experimental Alzheimer disease and the control groups was remarked. Rota-rod tests with 5 rpm, 10 rpm, 20 rpm, 30 rpm, 40 rpm and 4 minute accelerod test revealed significant difference within these groups. There is also significant difference related to the Alzheimer disease

group without apocynine administration in the tests with 30-40 rpm. For pretreatment, there is significant difference in the arrival period to the platform in favor of control group in water maze tests. No difference was detected between the groups in posttreatment. The routine biochemical analysis from blood and GSH analysis from brain parenchyma revealed no significance. MDA analysis in neural tissue was significant. Hematoxylin-eosin staining and TEM histopathological results disclosed significant results in favor of apocynine treatment group. Control groups lack these histopathological findings.

Conclusion: This study proves that the experimental model involving stereotactic ICV STZ administration for Alzheimer disease is relevant and the oxidative stress performed by these means is applicable. Brain injury performed by this technique is effectively managed by apocynine administration. This is confirmed by water maze, rota-rod and accelerod tests, histopathological and biochemical investigation. It is probable that apocynine administration for Alzheimer disease may be an effective and feasible alternative therapy method if it is supported by further investigations.

Key Words: Alzheimer Disease, Stereotaxis, Streptozotocine, Apocynine, Rota-rod test, Accelerod test, Water-maze test

KAYNAKLAR

1. Geldmacher D.S: Alzheimer demansın güncel tanı ve tedavisi, Bakar S, Erkol G(Eds): 1. Baskı 2004 pp 3-49
2. Bloomington M.N: National Chronic Care Consortium and the Alzheimer's Association: Tools for the Assessment and Treatment of Dementia in Managed Care Settings. National Chronic Care Consortium, 1999 pp 1-63
3. <http://www.alz.co.uk/info/alzheimers-disease> (on-line access on 5 jan, 2015)
4. <http://www.alz.org.tr/alzheimerhastaligi.aspx> (on-line access on 5 jan, 2015)
5. <http://www.nia.nih.gov/alzheimers/topics/alzheimers-basics> (on-line access on 5 jan, 2015)
6. Mayo Klinik; Alzheimer Hastalığı, Petersen R(Eds), Çeviri: Bingöl A. Güneş Kitapevi 2004
7. Işık A.T, Çelik T, Ulusoy G, Öngörü Ö, Elibol B, Doruk H, Bozoğlu E, Kayir H, Mas M.R, Akman Ş. Curcumin ameliorates impaired insulin/IGF signalling and memory deficit in a streptozotocin-treated rat model. AGE (2009) 31:39–49
8. Lester-Coll N, Rivera EJ, Soscia SJ, Doiron K, Wands JR, de la Monte SM. Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: relevance to sporadic Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 2006 Mar;9(1): 13-33.
9. Wanga Q, Tompkins K. D, Simonyia A, Korthuisb R. J, Sunb A. Y, Suna G. Y. Apocynin protects against global cerebral ischemia–reperfusion-induced oxidative stress and injury in the gerbil hippocampus. Brain Research 1090 (2006): 182–189
10. Altıntaş R, Polat A, Vardı N, Oğuz F, Beytur A, Sagır M, Yıldız A, Parlakpınar H. The protective effects of apocynin on kidney damage caused by renal ischemia/reperfusion. Journal of Endourology 27.5 (2013): 617-624.
11. Costa PT Jr, Williams TF, Somerfeld M, et al: Early identification of Alzheimer's Disease and Related Dementias. Clinical Practice Guideline, Quick Reference Guide for Clinicians, No. 19. Rockville, MD, US Department of Health and Human Services, Public Health Service. Agency for Healthcare Policy and Research, AHCPR Publication No. 97-0703, November 1996

12. Woods, B. Dementia care: progress and prospects. *Journal of Mental Health*(1995), 4(2), 115-124.
13. Hanley MR: Peptide regulatory factors in the nervous system. *Lancet* 1373-1376, 1989
14. Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, et al: Alzheimer's disease and senile dementia: Loss of neurons in the basal forebrain. *Science* 215: (1982) 1237-1239,
15. Foley, J: The experience of being demented. In: Binstock RH, Post SG, Whitehouse PJ, Eds. *Dementia and Aging: Ethics, Values and Policy Choices*. Baltimore, The Johns Hopkins University Press, 1992, 10-65
16. Kellet JM, Bachelard HS, Senile dementia; The cholinergic system, in Bachelard HS, Lunt GG, Marsden CD(Eds): *Clinical neurochemistry vol 2*. London, Academic Press, 1986, pp 39-42
17. Ignazio G, Giangliuigi V, Carlos S, Paolo B and Emenuele A. Oxidation of circulating proteins in alcoholics: Role of acetadehyde and Xanthine oxidase. *J. Hepatol*, 1996, 25:28-36
18. Erten SF. Deneysel medulla spinalis iskemisinde melatoninin antioksidan enzimler üzerine etkisi. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirurji Anabilim Dalı, Malatya (1999), pp 24-32
19. Lendon C, Ashall F, Goate AM. Exploring the etiology of Alzheimer Disease using molecular genetics. *JAMA*(1997), 277:825-831
20. Perry VH, Gordon S: Macrophages and microglia in the nervous system. *TINS* 11(1988):273-277
21. Weller RO: *Systemic Pathology vol 4*, London, Churchill Livingstone, 1990, pp 372-379
22. Whitehouse PJ, Struble RG, Hedreen JC, et al: Neuroanatochemical evidence for cholinergic deficit in Alzheimer's disease. *Psycho Pharmacol Bull* 19(1983):437-440
23. Brown WR, Moody DM, Thore CR ve ark. Cerebrovascular pathology in Alzheimer's disease and leukoaiosis. *Ann N Y Acad Sci*(2000), 903:39-45
24. Yamada M. Cerebral amyloid angiopathy: an overview. *Neuropathology*, (2000) 20(1): 8-22.

25. Petersen RC, Stevens JC, Ganguli M, et al. Practice parameter: early detection of dementia: mild cognitive impairment (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. May 8 2001;56(9):1133-42
26. Van de Pol LA, Korf ES, van der Flier WM, Brashear HR, Fox NC, Barkhof F. Magnetic resonance imaging predictors of cognition in mild cognitive impairment. *Arch Neurol*. Jul 2007;64(7):1023-8
27. Rowe CC, Ng S, Ackermann U, Gong SJ, Pike K, Savage G. Imaging beta-amyloid burden in aging and dementia. *Neurology*. May 15 2007;68(20):1718-25
28. Jagust WJ, Budinger TF, Reed BR. The diagnosis of dementia with single photon emission computed tomography. *Arch Neurol*. Mar 1987;44(3):258-62
29. Bradley GW., Daroff RB, Fenichel GM, Jankovic J. *Neurology in Clinical Practice*, 4th edition. 2004. 22-38
30. Van Marum RJ. Current and future therapy in Alzheimer's disease. *Fundam Clin Pharmacol* 2008; 22: 265-274
31. Ülger Z, Arıoğlu S. Demans tedavisi. *İç Hastalıkları Dergisi* 2007; 14: 33-8
32. Schute CCD, Lewis PR: The ascendind cholinergic reticuler system, neocortical, olfactory and subcortical projections. *Brain* 90(1967):497-522
33. Fibiger HC, Damsma G, Day JC: Behavioral pharmacology and biochemistry of central cholinergic neurotransmission, in Napier TC, Kaliwas PW, Hanin I(Eds): *The basal forebrain*. New York, Plenum pres, 1991, pp 399-414
34. Mesulam MM, Mufson EJ, Levey AI, et al: Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: Cytochemistry and cortical connnection of the septal area, diagonal band nuclei, nucleus basalis(substantia innominata), and hypothalamus in thr rhesus monkey. *J Comp Neurol* 214 (1983):170-197,
35. Mesulam MM, Mufson EJ, Wainer BH, et al: Central cholinergic pathways in the rat: An overview based an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience* 10(1983): 1185-1201,

36. Olton D, Markowska A, Voytko ML, et al: Basal forebrain cholinergic system: A functional analysis, in Napier TC, Kaliwas PW, Hanin I(Eds): The basal forebrain. New York, Plenum pres, 1991, pp 353-372
37. Mesulam MM, Mufson EJ: Neural inputs into the nucleus basalis of the substantia innominata (Ch4) in the rhesus monkey. *Brain* 107(1984):253-274
38. Zaborszky L, Cullinan WE, Braun A: Afferents to basal forebrain cholinergic projection neurons: An update, in Napier TC, Kaliwas PW, Hanin I(Eds):The basal forebrain. New York, Plenum pres, 1991, pp 43-100
39. Geula C, Mesulam MM: Cholinergic systems in Alzheimer's disease, *Alzheimer Disease*. RD Terry, R Katzman ve ark. (Ed), 2nd Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, (1999) s.269-292
40. Mesulam MM: Large-scale neurocognitive Networks and distributed processing for attention, language, and memory. *Ann Neurol*(1990) 28:597-613,
41. Wilson FAW: The relationship between learning memory and neuronal responses in the primate brain, in Napier TC, Kaliwas PW, Hanin I(Eds): The basal forebrain. New York, Plenum press, 1991, pp 253-266
42. Drachman DA, Leavitt J: Human memory and cholinergic system. *Arch Neurol* 30(1974):113-121,
43. Nissen MJ, Knopman DS, Schacter DL: Neurochemical dissociation of memory systems. *Neurology* 37(1987):789-794
44. Hansen LA, DeTeresa R, Davies P: Neocortical morphometry, lesion counts, and choline acetyltransferase levels in the age spectrum of Alzheimer's disease. *Neurology* 38(1988):48-74
45. Mesulam MM, Mufson EJ, Rogers J: Age-related shrinkage of cortically projecting cholinergic neurons: A selective effect. *Ann Neurol* 22(1986):31-36,
46. Bulut S: Alzheimer Hastalığı'nda Oksidatif Stres. *Türkiye Klinikleri Journal of Neurology* 1.1 (2003): 54-61
47. Yorulmaz H: Hiperglisemi ve Beyin. *Marmara Medical Journal* 26 (2013): 118-21.
48. Veerendra K, M. H. ve Y. K. Gupta: Effect of *Centella asiatica* on cognition and oxidative stress in an intracerebroventricular streptozotocin model of

- Alzheimer's disease in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 30.5-6 (2003): 336-342
49. Banks W. A, Joshua B. O, and Michelle A. E. "Insulin in the brain: there and back again." *Pharmacology & Therapeutics* 136.1 (2012): 82-93
 50. Schulingkamp R. J: Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications." *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 24.8 (2000): 855-872
 51. Kleniewska P. Piechota A. Skibska B. Gorąca A. The NADPH oxidase family and its inhibitors. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)* (2012), 60, 277–294
 52. Tossi, V. *Plant Signal Behaviour* 4(2009): 880-882
 53. Petrônio M. S: Apocynin: chemical and biophysical properties of a NADPH oxidase inhibitor. *Molecules* 18.3 (2013): 2821-2839
 54. Genovese T. Modulation of NADPH oxidase activation in cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *Brain Res*(2011) 1372:92-102
 55. Impellizzeri D. Effect of Apocynin, an inhibitor of NADPH oxidase, in the inflammatory process induced by an experimental model of spinal cord injury. *Free Radic Res*(2011) 45:221-36
 56. Aksoy N, Vural H, Sabuncu T, Aksoy S. Effects of melatonin on oxidative-antioxidative status of tissues in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Biochem Funct* (2003); 21:121-5.
 57. Junod A: Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *Journal of Clinical Investigation* 48.11 (1969): 2129
 58. Lenzen S: The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 51.2 (2008): 216-226
 59. Szkudelski T: The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological Research* 50.6 (2001): 537-546
 60. Ganda O. P, Aldo A. Rossini, and Arthur A. L: Studies on streptozotocin diabetes. *Diabetes* 25.7 (1976): 595-603.
 61. Lushchak V.I: Free Radical Oxidation of Proteins and Its Relationship with Functional State of Organisms. *Biochemistry*(2007), 72: 809-872
 62. Vina J, Estrela JM, Guerri C and Romero FJ. Effect of ethenal on glutathione concentration in isolated hepatocytes, *Biochem J.* (1980), 188.549-552

63. Callans J, Wacker LS, Mitchell MC. Effect of ethanol feeding and withdrawal on plasma glutathione elimination in the rat. *Hepatology*(1987), 7:496-501
64. Piner P. Çukorova Ün. Fen Bilimleri Ens. Yüksek Lisans Tezi. Beyin Dokusunda Glutasyon Metabolizması, Lipid Peroksidasyonu ve Asetilkolinesteraz Aktivitesine Etkileri(2005)
65. Gawel S: Malondialdehyde(MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiadomosci Lekarskie* (Warsaw, Poland: 1960) 57.9-10 (2003): 453-455
66. Draper H. H., Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. *Methods in Enzymology*, 186 (1990): 421-431
67. Elmas Ö. Hemodiyaliz ve periton diyalizi hastalarında serum malondialdehit düzeyleri ve oksidasyona yatkınlık. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences* 24.4 (2004): 316-322
68. Ünalacak M. Hiperglisemik Glukoz Metabolizma Bozukluğu Olan Hastalarda Serum Malondialdehit, α -Tokoferol ve- β -Karoten Düzeyleri. *Fırat Tıp Derg* 10.3 (2005): 113-116
69. Bogo V., Hill T. A., Young R. W: Comparison of accelerod and rotarod sensitivity in detecting ethanol-and acrylamide-induced performance decrement in rats: review of experimental considerations of rotating rod systems. *Neurotoxicology*(1981), 2(4), 765-787
70. Aydogan, M. S., Parlakpınar, H., Ali Erdogan, M., Yucel, A., Ucar, M., Sağır, M., & Colak, C. Effects of Dexmedetomidine and Midazolam on Motor Coordination and Analgesia: A Comparative Analysis(2013). *Current Therapeutic Research*, 75, 22-26.
71. Uzbay, T., Parlakpınar, H., Akdag, E., Celik, T., Yazarbas, G., Ulusoy, G. & Kayir, H: Chronic melatonin treatment reverses disruption of prepulse inhibition in pinealectomized and pinealectomized-plus-ovariectomized rats(2013). *Behavioural Brain Research*, 239, 1-7
72. Rozas G., Guerra M. J., Labandeira-Garcia J. L. An automated rotarod method for quantitative drug-free evaluation of overall motor deficits in rat models of parkinsonism. *Brain Research Protocols*(1997), 2(1), 75-84
73. Van Raamsdonk J. M., Pearson J., Slow E. J., Hossain S. M., Leavitt B. R., Hayden M. R: Cognitive dysfunction precedes neuropathology and motor

- abnormalities in the YAC128 mouse model of Huntington's disease. *The Journal of Neuroscience*(2005), 25(16), 4169-4180
74. Dalm S., Grootendorst J., De Kloet E. R., Oitzl M. S: Quantification of swim patterns in the Morris water maze. *Behavior Research Methods, Instruments, & Computers*(2000), 32(1), 134-139
 75. Petrosini L., Molinari M., Dell'Anna M. E: Cerebellar Contribution to Spatial Event Processing: Morris Water Maze and T-maze. *European Journal of Neuroscience*(1996), 8(9), 1882-1896
 76. Mulder G. B., Pritchett K. The Morris water maze. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* (2003), 42(2), 49-50
 77. Roof R. L., Stein D. G: Gender differences in Morris water maze performance depend on task parameters. *Physiology & Behavior*(1999), 68(1), 81-86
 78. Aydin M., Yilmaz B., Alcin E., Nedzvetsky V. S., Sahin Z., Tuzcu M. Effects of letrozole on hippocampal and cortical catecholaminergic neurotransmitter levels, neural cell adhesion molecule expression and spatial learning and memory in female rats. *Neuroscience*(2008), 151(1), 186-194
 79. Gallagher M., Holland P. C. Preserved configural learning and spatial learning impairment in rats with hippocampal damage. *Hippocampus*(1992), 2(1), 81-88
 80. Paxinos G, Watson C. *The rat Brain in stereotaxic coordinates*. San Diego, London: Academic Press; 1997, 22-24
 81. Pellegrino LJ, Pellegrino AS, Cushman AJ, *A stereotaxic atlas of the rat brain*. New York, Plenum press, 1979. 5-33
 82. Veerendra Kumar M. H, Gupta Y. K: Effect of *Centella asiatica* on cognition and oxidative stress in an intracerebroventricular streptozotocin model of Alzheimer's disease in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*(2003), 30(5-6), 336-342
 83. Sharma B, Singh N, Singh M: Modulation of celecoxib-and streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's disease by pitavastatin and donepezil. *Journal of Psychopharmacology*(2008), 22(2), 162-171
 84. .Ishrat T, Parveen K, Khan M. M, Khuwaja G, Khan M. B, Yousuf S, Islam F: Selenium prevents cognitive decline and oxidative damage in rat model of

- streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's type. *Brain Research*(2009), 1281, 117-127
85. www.alzet.com/products/guide_to_use/cfs_preparation.html, Preparation of artificial CSF (on-line access on 5 jan, 2015)
 86. Impellizzeri D, Mazzon E, Esposito E, Paterniti I, Bramanti P, Cuzzocrea S: Effect of Apocynin, an inhibitor of NADPH oxidase, in the inflammatory process induced by an experimental model of spinal cord injury. *Free Radical Research*,(2011) 45(2), 221-236.
 87. Titova E, Ostrowski R. P, Sowers L. C, Zhang J. H, Tang, J: Effects of Apocynin and Ethanol on Intracerebral Haemorrhage-Induced Brain Injury in Rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*,2007, 34(9), 845-850
 88. Connell B. J, Saleh M. C, Khan B. V, Saleh T. M: Apocynin may limit total cell death following cerebral ischemia and reperfusion by enhancing apoptosis. *Food and Chemical Toxicology*,2011, 49(12), 3063-3069
 89. Elman GL. Tissue sulphydryl groups. *Arch. Biochem Biophys*.1979, 95:351-358
 90. Herculano-Houzel S. Scaling of brain metabolism with a fixed energy budget per neuron: implications for neuronal activity, plasticity and evolution. 2011;6:e17514. doi: 10.1371/journal.pone.0017514.
 91. Clarke DD, Sokoloff L. Circulation and energy metabolism of the brain. In: Siegel, GJ, Agranoff BW, Albers RW, Molinoff SK, Fisher PB, Uhler MD, editors. *Basic Neurochemistry*. Philadelphia: Lippincott- Raven, 1999:637–69.
 92. Horani MH, Mooradian, AD. Effect of diabetes on the blood brain barrier. *Curr Pharmaceut Design* 2003;9:833-40. doi:10.2174/1381612033455314
 93. Klein JP Waxman SG. The brain in diabetes: molecular changes in neurons and their implications for end-organ damage. *Lancet Neurology* 2003; 2: 548–54. doi:10.1016/S1474-4422(03)00503-9
 94. Russell JW, Feldman EL. Insulin-like growth factor-I prevents apoptosis in sympathetic neurons exposed to high glucose. *Horm Metab Res* 1999; 31: 90–6. doi: 10.1055/s-2007-978704

95. Bukan N, Sancak B, Yavuz Ö, et al. Lipid peroxidation and scavenging enzyme levels in the liver of streptozotocin-induced diabetes rats. *Indian J Biochem and Biophys* 2003;40:447-50.
96. Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: A new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999; 48:1-9. doi: 10.2337/diabetes.48.1.1
97. Grober E, Hall CB, Hahn SR, Lipton RB. Memory impairment and executive dysfunction are associated with inadequately controlled diabetes in older adults. *J Prim Care Community Health*. 2011;2:229-33. doi: 10.1177/2150131911409945
98. Holscher C. Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 1997; 20: 298–303. doi: 10.1016/S0166-2236(97)01065-5
99. Romero F. J., Bosch-Morell F., Romero M. J., Jareño E. J., Romero B., Marín N., Romá J. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environmental Health Perspectives*, 106(Suppl 5)(1998), 1229.
100. Yalabık M. Ş, Şehirli Ö, Utkan T, Arıcıoğlu F. Effects of agmatine in streptozotocine induced experimental alzheimer model. *Journal of Marmara University Institute of Health Sciences*, 3(3), (2013). 145-153.
101. Yamamoto M., & Yamada S. Pharmacological Evaluation Methods of Drugs for Treatment of Patients in the Chronic Phase of Organic Brain Syndrome- Effects of Calcium Channel Blockers on Impairment of Brain Function in Senescence-accelerated Mice. *Calcium Ion Modulators-The New Wave of Psychotropic Drugs*, Edited by Kazuhide Inoue and Yasuo Watanabe. (1998). *Calcium Ion Modulators: The New Wave of Psychotropic Drugs*, 67.
102. Aoki E., Yokoyama H., Kimoto H., Yano R., Kato H., Araki T. Chronic administration with rotenone does not enhance MPTP neurotoxicity in C57BL/6 mice. *Journal of Molecular Neuroscience*(2010), 41(1), 17-24.
103. Singh B., Sharma B., Jaggi A. S., Singh N. Attenuating effect of lisinopril and telmisartan in intracerebroventricular streptozotocin induced experimental dementia of Alzheimer's disease type: possible involvement of PPAR- γ

- agonistic property. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System* (2013), 14(2), 124-136.
104. Ishrat T., Hoda M. N., Khan M. B., Yousuf S., Ahmad M., Khan M. M., Islam F. Amelioration of cognitive deficits and neurodegeneration by curcumin in rat model of sporadic dementia of Alzheimer's type (SDAT). *European Neuropsychopharmacology*(2009), 19(9), 636-647.
105. Javed H., Khan M. M., Khan A., Vaibhav K., Ahmad A., Khuwaja G., Islam F. S-allyl cysteine attenuates oxidative stress associated cognitive impairment and neurodegeneration in mouse model of streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's type. *Brain Research*(2011), 1389, 133-142.
106. Shoham S., Bejar C., Kovalev E., Schorer-Apelbaum D., Weinstock M. Ladostigil prevents gliosis, oxidative–nitrative stress and memory deficits induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. *Neuropharmacology* (2007), 52(3), 836-843.